

Therapeutisches Drug Monitoring der direkten oralen Antikoagulanzien



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sebastian Böhr

aus Neustadt an der Weinstraße

im Jahr 2018

Promotionsgesuch eingereicht: Januar 2018

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Ekkehard Haen

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	i
1.	Einleitung	1
1.1.	Blutgerinnung und Fibrinolyse.....	1
1.1.1.	Primäre Hämostase.....	2
1.1.2.	Sekundäre Hämostase	2
1.1.3.	Fibrinolyse.....	3
1.2.	Definition und Ursachen für Thrombosen	4
1.2.1.	Vorhofflimmern	5
1.2.2.	Genetische Faktoren	5
1.3.	Orale Pharmakotherapie der Thrombosen.....	6
1.3.1.	Direkte orale Antikoagulanzien (DOAKs).....	7
1.3.1.1.	Dabigatran (Pradaxa®).....	7
1.3.1.2.	Rivaroxaban (Xarelto®).....	10
1.3.1.3.	Apixaban (Eliquis®)	11
1.3.1.4.	Edoxaban (Lixiana®)	13
1.3.2.	Vitamin-K-Antagonisten (VKA).....	14
1.3.2.1.	Warfarin (Coumadin®) und Phenprocoumon (Marcumar®).....	14
1.4.	INR-Monitoring	15
1.5.	INR-Messungen bei direkten oralen Antikoagulanzien	15
1.6.	Studienlage	16
1.7.	Kontroverse	18
1.8.	Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	19
1.8.1.	Therapeutischer Referenzbereich	20
1.8.2.	Dosisbezogener Referenzbereich ⁴⁷	21
1.8.2.1.	Dosisbezogener Referenzbereich für Talkonzentration	22
1.8.3.	Klinisch-pharmakologische Befundung ⁵⁰	23

1.8.4.	KONBEST ⁵¹	23
1.9.	Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC).....	24
2.	Fragestellung	26
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Methodenentwicklung.....	27
3.1.1.	Probengewinnung.....	27
3.1.2.	Probenvorbereitung	27
3.1.3.	Standards	28
3.1.4.	UHPLC-Anlage	28
3.1.5.	Laborgeräte.....	28
3.1.6.	Säulen	29
3.1.7.	Chemikalien	30
3.1.8.	Arzneistoffe.....	30
3.1.9.	Software	33
3.1.10.	Statistik.....	33
3.2.	Validierung.....	33
3.2.1.	Linearität der Kalibration	33
3.2.1.1.	Kalibrationsbereich	34
3.2.2.	Richtigkeit	34
3.2.3.	Präzision	35
3.2.3.1.	Impräzision innerhalb eines Laufes (intraday imprecision)	35
3.2.3.2.	Impräzision zwischen verschiedenen Messtagen (interday imprecision)	35
3.2.4.	Stabilität	35
3.2.4.1.	Einfrier- und Auftaustabilität	36
3.2.5.	Analytische Grenzwerte	36
3.2.5.1.	Nachweisgrenze (limit of detection, LOD)	36
3.2.5.2.	Bestimmungsgrenze (limit of quantification LOQ)	37

3.2.6.	Wiederfindung.....	38
3.2.7.	Robustheit.....	39
3.2.8.	Selektivität.....	39
3.3.	Werkzeuge für das TDM der direkten oralen Antikoagulanzen	39
3.3.1.	Dosisbezogener Referenzbereich	39
3.3.2.	ATEC	40
3.4.	Anwendungsbeobachtung	40
3.4.1.	Ziele der Anwendungsbeobachtung	40
3.4.2.	Ethische Bedenken	40
3.4.3.	Art der Anwendungsbeobachtung	41
3.4.4.	Patientenkollektiv.....	41
3.4.5.	Einschlusskriterien	41
3.4.6.	Ausschlusskriterien	42
3.4.7.	Comedikation	42
3.4.8.	Ausscheiden aus der Anwendungsbeobachtung	42
3.4.9.	Ärztliche Betreuung der Patienten	43
3.4.10.	Patientenaufklärung.....	43
3.4.11.	Vergütung der Teilnehmer	43
3.4.12.	Ort der Untersuchungen	43
3.4.13.	Prüfplan	43
3.4.14.	Laboruntersuchungen	44
3.4.15.	Dokumentation und Auswertung	45
3.4.16.	Veröffentlichung der Ergebnisse.....	45
3.4.17.	Zustimmung der Ethikkommission	45
3.4.18.	Auftraggeber.....	45
3.4.19.	Finanzierung.....	46
4.	Ergebnisse	47

4.1.	Vorversuche für die Methodenentwicklung	47
4.1.1.	UV-Detektion	47
4.1.2.	Säulenwahl	49
4.1.3.	Fließgeschwindigkeit	52
4.1.4.	Fließmittel	52
4.1.5.	Probenaufarbeitung	54
4.1.6.	Injektionsvolumen	57
4.1.7.	Finale Methodenparameter.....	58
4.2.	Validierung.....	61
4.2.1.	Linearität des Kalibrationsbereiches	61
4.2.2.	Richtigkeit	64
4.2.3.	Impräzision innerhalb eines Laufes.....	64
4.2.4.	Impräzision zwischen verschiedenen Messtagen	65
4.2.5.	Stabilität	66
4.2.6.	Ein- und Auftaustabilität	68
4.2.7.	Nachweisgrenze	68
4.2.8.	Bestimmungsgrenze	68
4.2.9.	Wiederfindung.....	69
4.2.10.	Robustheit.....	69
4.2.11.	Selektivität.....	70
4.3.	Erweiterung der validierten Methode.....	72
4.3.1.	Verkürzung der Laufzeit	72
4.3.2.	Detektion von Edoxaban sowie Phenprocoumon und Warfarin	72
4.4.	Dosisbezogener Referenzbereich	75
4.5.	ATEC	77
4.6.	Patientenproben	78
4.6.1.	Interindividuelle Schwankung der Konzentration.....	79

4.6.2.	Einordnung in DRR _{avg} und ATEC _{avg}	79
4.6.3.	Einordnung in DRR _{min} und ATEC _{min}	82
4.6.4.	Vergleich der Konzentrationsbereiche	85
4.6.5.	Anwendungsbeobachtung	86
4.7.	Patientenkollektiv.....	88
4.7.1.	Geschlecht	88
4.7.2.	Alter.....	88
4.7.3.	Anzahl der Medikamente	89
5.	Diskussion	91
5.1.	Methodenentwicklung.....	91
5.1.1.	Proteinfällung	91
5.1.2.	Injektionsvolumen	91
5.1.3.	Erweiterung der Methode um VKAs und Edoxaban	91
5.2.	Validierung.....	92
5.3.	Vergleich mit anderen Methoden	93
5.4.	Vergleich zwischen DRR für mittlere Tages- und Talkonzentration.....	94
5.5.	Patientenproben	96
5.5.1.	Interindividuelle Schwankung.....	96
5.5.2.	Anwendungsbeobachtung	96
5.5.3.	Rivaroxaban	97
5.5.3.1.	Patient A24	97
5.5.3.2.	Patient A31	98
5.5.3.3.	Patient A19	98
5.5.4.	Apixaban	98
5.5.4.1.	Patient B2	99
5.5.4.2.	Patient B24	99
5.5.5.	Dabigatran	100

5.5.5.1.	Patient C1	100
5.5.5.2.	Patient C2	100
5.6.	Bewertung des Monitorings bei direkten oralen Antikoagulanzien.....	101
6.	Zusammenfassung.....	104
7.	Anlagen	107
7.1.	Anforderungsbogen.....	107
7.2.	Befund Patient A24	108
7.3.	Befund Patient A31	110
7.4.	Befund Patient B24	112
7.5.	Befund Patient C1	114
7.6.	Befund Patient C2	116
7.7.	Formular der Einwilligungserklärung	118
7.8.	Patientenaufklärung.....	120
7.9.	Dokumentationsbogen für das Auftreten von UAWs	123
7.10.	Votum der Ethikkommission	125
7.11.	Publikationen.....	127
7.12.	Rohdaten: Patientendaten und gemessene Konzentrationen	127
7.13.	Lebenslauf	130
7.14.	Danksagung	131
8.	Literaturverzeichnis.....	133
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	139

I. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AkdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
APC	aktiviertes Protein C
ATEC _{avg}	assumed therapeutic effective concentration (mittlere Tageskonzentration)
ATEC _{min}	assumed therapeutic effective concentration (Talkonzentration)
Avg	average
CrCl	Kreatinin-Clearance
CYP	Cytochrom P450
DAD	Diode-Array-Detektor
DDD	daily defined dose
DOAK	direktes orales Antikoagulan
DRR _{avg}	dose-related reference range (basierend auf mittlerer Tageskonzentration)
DRR _{min}	dose-related reference range (basierend auf Talkonzentration)
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	hazard ratio
INR	international normalized ratio
IQWIG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
ISI	internationaler Sensitivitätsindex
LE	Lungenembolie
LM	Lösungsmittel
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification

MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NVAF	nicht-valvuläres Vorhofflimmern
p.a.	per annum
P-gp	P-Glykoprotein
RT	Raumtemperatur
SPAF	stroke prevention in atrial fibrillation
SD	Standardabweichung
t-PA	tissue-type plasminogen activator
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TF	tissue factor
TRR	therapeutic reference range
TVT	tiefe Venenthrombose
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography
UV/VIS	ultra violet/visible
VC	Variationskoeffizient
VKA	Vitamin-K-Antagonist
Vol	Volumen

1. Einleitung

Der deutsche Pathologe Rudolf Virchow (1821-1902) postulierte in jenen Tagen drei Ursachen, welche seiner Meinung nach für die Entstehung von Thrombosen verantwortlich sind:

- Veränderung der Geschwindigkeit des Blutflusses
- Schädigungen der Endothelwände in den Blutgefäßen
- Veränderungen in der Viskosität des Blutes

Obwohl der Ursprung und der Verdienst Virchows, an der nach ihm benannten Virchow-Trias inzwischen fragwürdig ist^{1,2}, haben die Thesen noch heutzutage allgemeine Gültigkeit.

Während zu Zeiten Virchows Thrombosen noch hauptsächlich mit Blutegeln, Bettruhe oder warmen Kompressen behandelt wurden, konnte man Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Extraktion des Hirudin, das im Speichel des Blutegels vorkommt, die erste pharmakologisch aktive Substanz zur Auflösung von Thromben nutzen. Jedoch verhinderten die schlechte Extraktionsausbeute und Verfügbarkeit einen flächendeckenden Einsatz².

Mit der Erforschung der Cumarine und der Zulassung von Warfarin und Phenprocoumon in den 1950er Jahren stand damit erstmals eine Möglichkeit der oralen Therapie zur Antikoagulation zur Verfügung. Fortan waren Laborkontrollen zur Überprüfung der Blutgerinnung fester Bestandteil der antikoagulativen Therapie.

Erst im Jahre 2008 zeigte sich eine neue Entwicklung im Bereich der Antikoagulation. Mit Dabigatran wurde das erste orale Antikoagulanz zugelassen, bei dem keine Laborkontrollen und Dosisanpassung nötig sein sollten. Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban folgten, basierend auf dem gleichen Leitmotiv, kurz darauf.

Inzwischen werden die Vorteile in Bezug auf Überlegenheit und Therapiesicherheit dieser neuen Substanzen heftig diskutiert. Gerade der Streitpunkt über das Wegfallen des Monitoring ist kontrovers³.

1.1. Blutgerinnung und Fibrinolyse

Die Blutgerinnung des Körpers kann in zwei Phasen eingeteilt werden: primäre Hämostase und sekundäre Hämostase. Bei der primären Hämostase erfolgt ein schneller Verschluss des betroffenen Gefäßes durch einen Thrombus, während die sekundäre Hämostase diesen

Thrombus durch Fibringerinnung stabilisiert. Beide Wege laufen jedoch nebeneinander ab und sind miteinander verknüpft.

1.1.1. Primäre Hämostase

Unmittelbar nach einer Gefäßverletzung lagern sich Thrombozyten aus dem Blut an der Wunde an und bilden dort an den kollagenen Bindegewebsfasern einen Punkt. Zusätzlich kommt es durch Serotonin und Thromboxan, welche aus den Thrombozyten freigesetzt werden, zu einer Vasokonstriktion. Die dadurch entstehende Scherspannung katalysiert zusätzlich die Aggregation. Ebenfalls verstärkend wirken: Adenosindiphosphat (ADP), plättchenaktivierender Faktor-4 (PAF-4) sowie Phospholipide. Für einen stabilen Verschluss ist letztendlich die Aktivierung des Glykoproteins IIb/IIIa und die Verknüpfung mit dem von-Willebrandt-Faktor erforderlich. Dieser Verschluss wird durch den oben genannten Faktor sowie Thrombin eingeleitet^{4,5}.

1.1.2. Sekundäre Hämostase

Die Gerinnungskaskade wurde lange als dualer Prozess betrachtet, welcher in Aktivierung über einen extrinsischen Signalweg (Aktivierung durch Gewebeschaden) und einen intrinsischen Signalweg (Aktivierung über Zelloberfläche der Thrombozyten) aufgeteilt ist, die schließlich nach Aktivierung des Faktor X in einen gemeinsamen Weg zusammenlaufen⁶. Nach neueren Erkenntnissen ist jedoch eine zellbasiertes Modell wahrscheinlicher, welches über die drei überlappenden Phasen Initiation, Verstärkung und Proliferation abläuft⁷.

Die Initialphase wird auf Zellen, die den tissue factor (TF) tragen, eingeleitet. Diese Zellen werden bei Schädigung des Endothels freigesetzt oder werden über Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen gebunden, welche bei Aktivierung der Endothelzellen produziert werden. Ein proteolytischer Komplex aus TF und Faktor VIIa beginnt nun mit der Aktivierung von Faktor IX und X und somit deren Umwandlung in Faktor IXa und Xa. Faktor Xa bildet nun mit Faktor Va, welcher durch aktivierte Plättchen am Ort der Verletzung gebildet wird, einen Prothrombinasekomplex der durch Spaltung von Prothrombin kleine Mengen an Thrombin generiert⁷.

Durch die Thrombinbildung wird die Verstärkungsphase angestoßen. Das gebildete Thrombin aktiviert auf der Oberfläche der Blutplättchen nun die Gerinnungsfaktoren V, VIII und

XI. Dadurch werden die Faktoren Va und VIIIa gebildet, welche als Cofaktoren für die daraufhin gesteigerte Produktion von Thrombin an den Blutplättchen fungieren. Somit wird eine positive Feedback-Schleife erzeugt, die sich selbst verstärkt⁷.

In der Vermehrungsphase kommt es durch die Bildung der intrinsischen Tenase durch den Faktor VIIIa/IXa Komplex sowie durch die Produktion weiterer Prothrombinase, welche an die Oberfläche der Blutplättchen binden, zu einer weiteren Beschleunigung der Bildung von Thrombin und Faktor Xa. Durch die erhöhte Menge an Thrombin wird nun ein kritisches Level erreicht, welches für die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen benötigt wird. Die Ansammlung von Fibrin bildet nun einen Thrombus aus, der das Gefäß verschließen kann⁷.

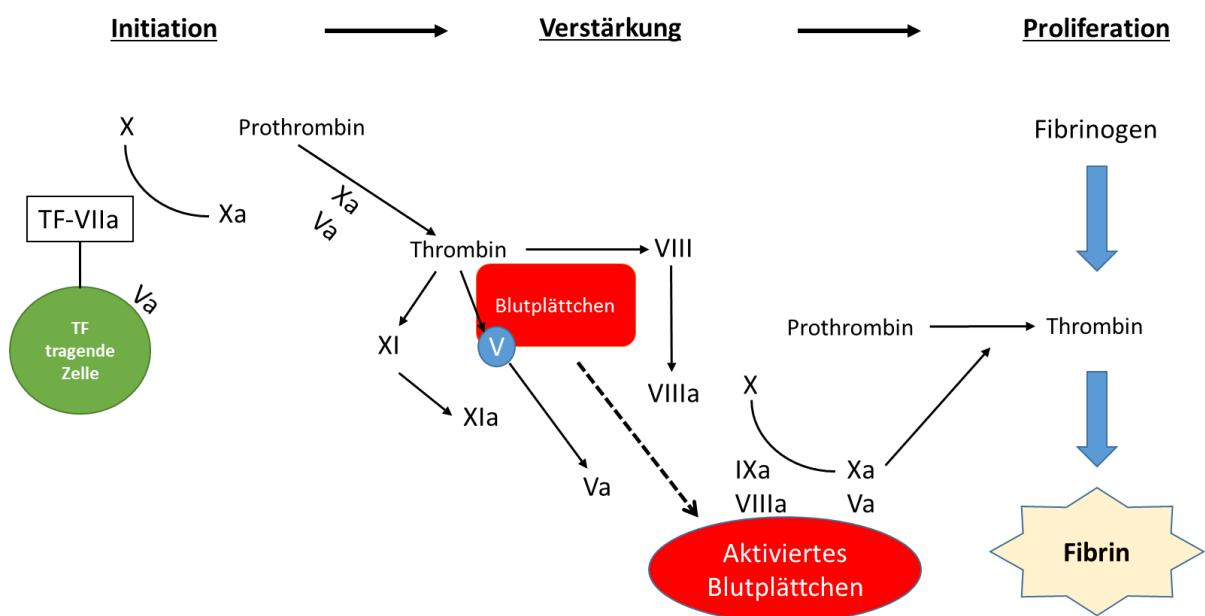


Abbildung 1: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase, modifiziert nach Caterina et al.⁷.

1.1.3. Fibrinolyse

Die Fibrinolyse, so gesehen der Gegenspieler der Gerinnung, sorgt dafür, dass keine unerwünschten Thromben in Gefäßen gebildet werden. Die Aktivierung beginnt durch den Plasminogenaktivator, t-PA, welcher das inaktive Plasminogen zu der Endopeptidase Plasmin umwandelt. Plasmin spaltet dann das Fibrinogeflecht und die Spaltprodukte hemmen zusätzlich die Thrombinbildung sowie die erneute Polymerisation. Auch bei der Plasminbildung ist wieder eine gewisse lokale Spezifität gewährleistet, die unerwünschte Blutungen verhindert. Zum einen wird freies Plasmin durch a2-Antiplasmin abgefangen und inaktiviert.

Bildet sich jedoch Fibrin, wird zum Teil Plasminogen daran gebunden und lokal zu Plasmin aktiviert^{4,5}.

Beim gesunden Menschen stehen Fibrinolyse und Gerinnung im Gleichgewicht. Durch Krankheiten oder Gendefekte kann sich das Gewicht jedoch übermäßig in eine der beiden Richtungen verlagern.

1.2. Definition und Ursachen für Thrombosen

Grundsätzlich spricht man bei einer Thrombose von einem intravasal entstandenen Blutgerinnsel⁵. Wandert ein Blutgerinnsel weiter im Blutstrom und blockiert dadurch Gefäße spricht man von einer Embolie. Diese kann die Durchblutung bestimmter Bereiche im Körper unterbrechen. Besonders kritisch ist dies im Herz oder Gehirn, da diese Minderdurchblutung ischämische Nekrosen verursachen kann.

Die Wahrscheinlichkeit der Normalbevölkerung eine symptomatische Venenthrombose zu entwickeln ist mit einer jährlichen Inzidenzrate von 0,1%^{8,9} relativ gering. Ein häufiger Grund für die Entwicklung einer tiefen Venenthrombose besteht in der Insuffizienz von Venenklappen. Durch Dilatation der Gefäßwände ist hier eine ausreichende Öffnung nicht mehr gegeben und es kommt zunehmend zur Anstauung des Blutes und erhöhter Koagulationsneigung. Weitere Risikofaktoren sind längere Immobilisation bzw. Bettlägerigkeit wodurch die Blutzirkulation im Körper allgemein verlangsamt wird; Bluthochdruck sowie Fremdkörper, wie künstliche Herzklappen oder Dauerkatheter, welche durch Verwirbelungen im Blutfluss und verstärkte Scherkräfte die Gerinnung fördern. Auch können Tumorerkrankungen ein erhöhtes Thromboserisiko bergen, da zum einem durch Tumorwachstum eine Hämostase durch Gefäßkompression erzeugt werden kann, zum anderen können bestimmte Tumoren tissue factor produzieren.

Auch operative Eingriffe oder Verletzungen der Gefäßwand stellen ein grundlegendes Risiko dar. Bei operativen Eingriffen am Hüftgelenk besteht etwa eine 60%ige Wahrscheinlichkeit eine Thrombose zu entwickeln sollte nicht prophylaktisch eine Antikoagulation erfolgen¹⁰. Gründe hierfür liegen vor allem in der Stimulation der Hämostase durch die operative Gefäßverletzung und zusätzlich durch Immobilisation des Patienten, wodurch die Blutzirkulation im Körper vermindert wird.

1.2.1. Vorhofflimmern

Beim Vorhofflimmern handelt es sich um eine Störung der Erregungsbildung im Vorhof des Herzens. Durch die von verschiedenen Stellen ausgehende hochfrequente Erregung des Vorhofs werden jegliche Kontraktionen der Kammer aufgehoben. Durch die Wechselhaftigkeit der Überleitungsblockierung treten Kontraktionen nur noch in sehr unregelmäßigen und irregulären Abständen auf⁵. Daraus folgt eine erhöhte Standzeit des Blutes, welches letztendlich zur Ausbildung von Thromben neigt, die sich zu Embolien entwickeln können.

Aufgrund der CAST-Studie¹¹ kam es zu einem Umdenken bezüglich der Behandlung von Rhythmusstörungen mit Antiarrhythmika, da diese lediglich „EKG-Kosmetik“ betrieben, aber keinen Übervorteil für den Patienten brachten. Im Gegensatz zu den Antiarrhythmika haben Antikoagulanzen einen festen Platz in der Therapie.

Während bei Patienten, die im Durchschnitt 40 Jahre alt sind, mit isoliertem Vorhofflimmern die jährliche Embolierate bei 0,55% liegt, kann das Risiko bei gleicher Diagnose bei einem Patienten mit einem Durchschnittsalter von 69 Jahren auf das Vierfache ansteigen. Bei Patienten, die zusätzlich eine Mitralklappenstenose aufweisen, steigt das Risiko einer Embolie sogar auf das 18-fache an¹². Je nach Risikoeinschätzung sollte auch die Einstellung der Antikoagulation ausfallen. Die SPINAF-Studie konnte zeigen, dass bereits eine schwache Antikoagulation (INR 1,2 – 1,5) das jährliche Embolierisiko mehr als halbieren konnte¹³.

1.2.2. Genetische Faktoren

Zusätzlich existieren auch noch genetische Dispositionen in der Gerinnungskaskade, die bei betroffenen Patienten meist eine lebenslange Therapie mit Antikoagulanzen erfordern.

Der häufigste erbliche Risikofaktor besteht in einer Mutation des Faktor V, dessen Ausprägung auch als aktivierte Protein C (APC) Resistenz bezeichnet wird. Dieser Phänotyp ist in etwa 20-40% aller Patienten, die eine Thrombose entwickeln, zu finden⁶. Der veränderte Faktor V verliert dadurch eine seiner Spaltstellen, welche normalerweise von Protein C erkannt werden. Durch diese Mutation bleibt letztendlich die Regulierung des Faktor V durch Protein C aus, dies führt zu einer überschießenden Koagulation⁶. Das Thromboserisiko ist bei ausgeprägtem Phänotyp um das bis zu 100-fache, gegenüber einem gesunden Individuum, erhöht.

Bei einem weiteren häufigen Gendefekt, der bei 6-8% aller Thrombosepatienten zu finden ist, handelt es sich um eine Punktmutation des Prothrombingens⁶. Zwar schränkt diese Veränderung nicht die Funktionalität des Prothrombin ein, jedoch wird es in erhöhten Mengen gebildet, wodurch im Rückschluss auch mehr Thrombin daraus gebildet werden kann und somit ein erhöhtes Thromboserisiko besteht.⁶

1.3. Orale Pharmakotherapie der Thrombosen

Die aktuell verfügbaren Arzneimittel zur oralen Antikoagulation lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: direkte orale Antikoagulanzien und Vitamin-K-Antagonisten.

Auf der einen Seite finden sich die neueren direkten oralen Antikoagulanzien. Hier unterscheidet man zwischen direkten Thrombin-Inhibitoren (DTI) und Faktor-Xa-Antagonisten. Während DTIs freies und an Fibrin gebundenes Thrombin hemmen und somit hauptsächlich über die Verhinderung der Spaltung des Fibrinogens in Fibrin die Ausbildung eines Thrombus verhindern, hemmen die Faktor-Xa-Antagonisten gezielt den Gerinnungsfaktor Xa, wodurch die Spaltung des Prothrombins in Thrombin verhindert wird.

Die Vitamin-K-Antagonisten hemmen die Vitamin-K-Reduktase sowie die Vitamin-K-Epoxyd-Reduktase, welche für die Regeneration des Vitamin-K-Hydrochinons erforderlich sind. Dadurch wird die Vitamin-K-vermittelte gamma-Carboxylierung der Glutaminsäure unterbunden, welche unter Normalbedingungen als Vorstufe für die Bildung von Gerinnungsfaktoren in der Leber notwendig ist. Somit wird die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der antikoagulatorischen Faktoren Protein C und S gehemmt. Dieser Mechanismus erklärt auch warum bei VKAs von indirekten Antikoagulanzien gesprochen wird. Da diese antikoagulatorischen Faktoren eine viel kürzere Halbwertszeit als ihre Gegenspieler besitzen, kommt es bei Hemmung der Synthese zu einem Ungleichgewicht in Richtung der Koagulation. Deshalb muss bei der Einleitung einer VKA-Therapie stets eine Heparinisierung erfolgen um Bildung von Thrombosen zu vermeiden⁵.

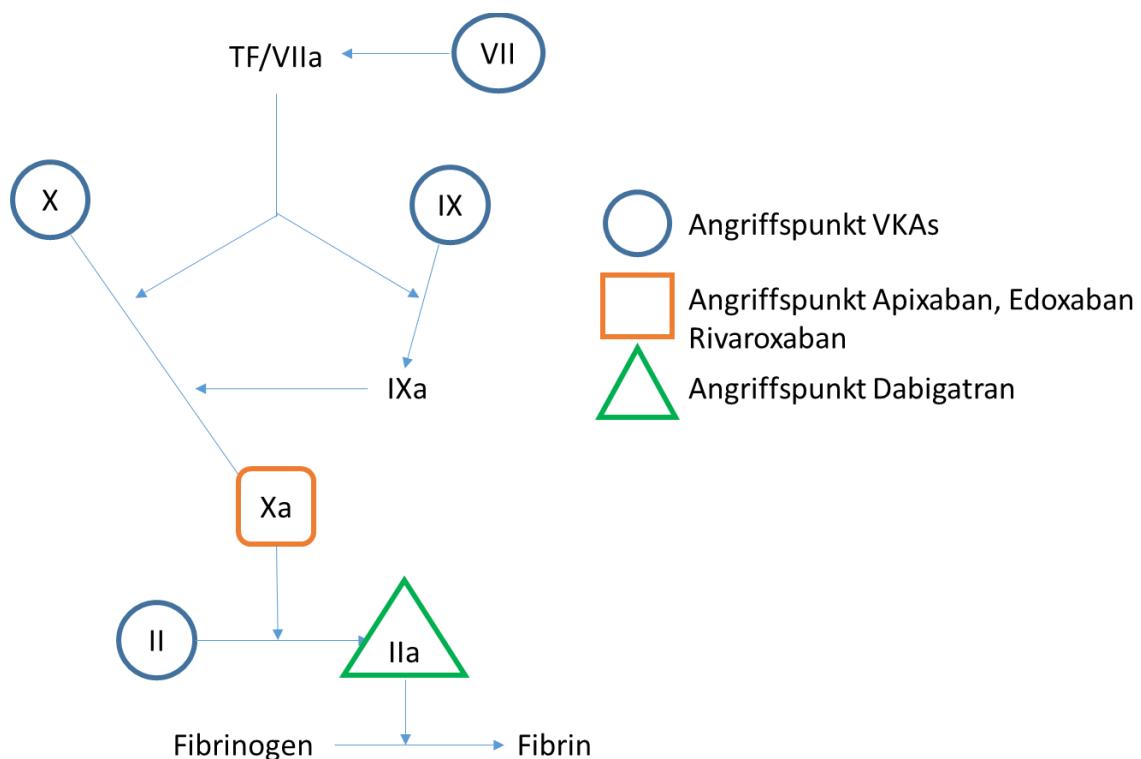


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der Antikoagulanzien in der Gerinnungskaskade, modifiziert nach Caterina et al.⁷.

1.3.1. Direkte orale Antikoagulanzien (DOAKs)

1.3.1.1. Dabigatran (Pradaxa®)

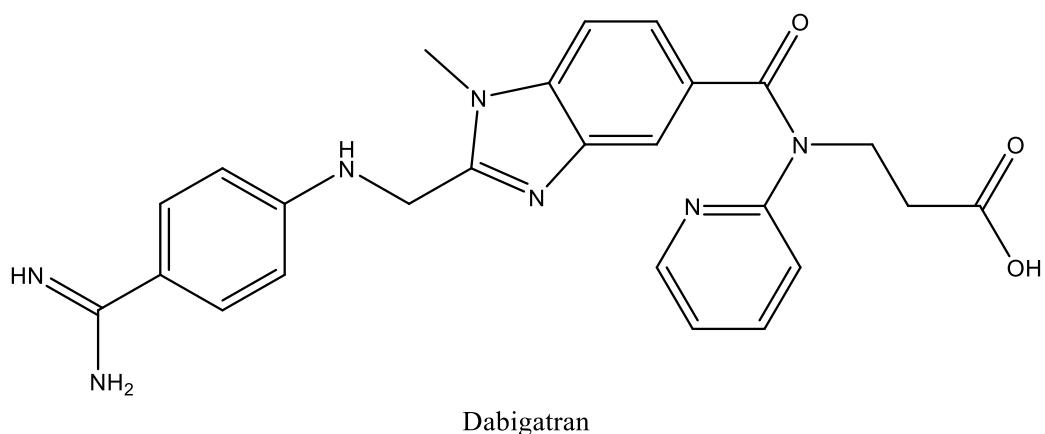


Abbildung 3: Strukturformel von Dabigatran

Dabigatran ist pharmakologisch gesehen ein direkter Thrombininhibitor, welcher durch die Inhibition des Thrombin die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin hemmt und somit die Ausbildung eines Thrombus verhindert. Es erfolgt nicht nur eine Hemmung des freien Thrombins, sondern auch des Thrombins, welches bereits an Fibrin gebunden ist. Seit 2015 ist mit Idarucizumab (Praxbind®) ein Antidot für Dabigatran zugelassen.

Dabigatran wird in Form eines Prodrugs, dem Dabigtranetexilat, verabreicht. Das pharmakologisch inaktive Prodrug wird, durch Hydrolyse der Ester, von unspezifischen Esterasen im Körper in seine Wirkform überführt.

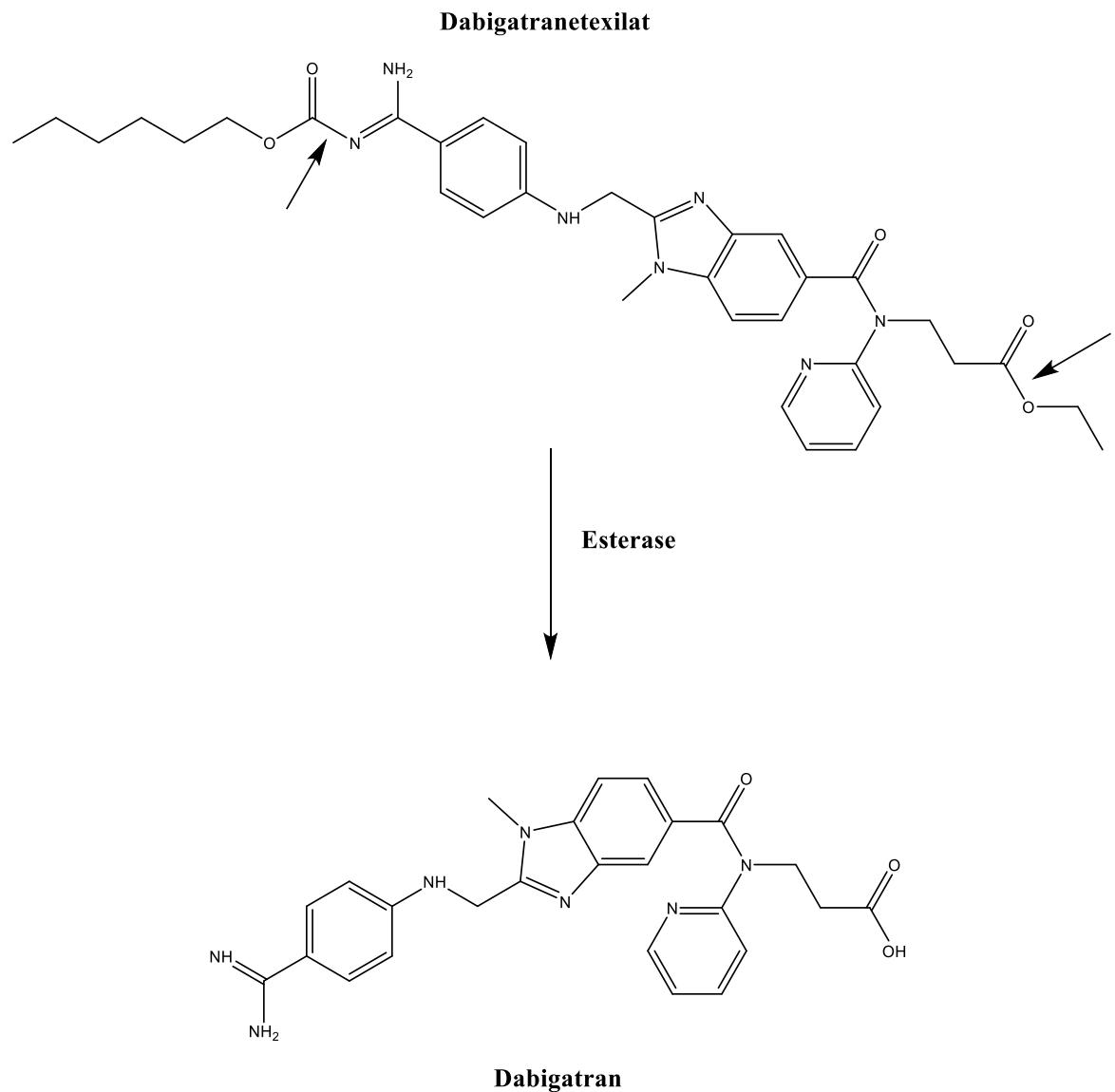


Abbildung 4: Spaltung von Dabigtranetexilat in Dabigatran

Dabigatran ist zur Prophylaxe von Thrombosen nach orthopädischen Eingriffen, zur Prävention von Schlaganfällen und Embolien bei Vorhofflimmern und zur Behandlung von tiefen Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien (LE) in den Wirkstärken von 220 und 300 mg zugelassen. Die Tagesdosis sollte aufgeteilt zwei Mal täglich eingenommen werden. Bei Risikopatienten (erhöhtes Blutungsrisiko, eingeschränkte Nierenfunktion, >80 Jahre) ist eine Dosisreduktion auf 150 bzw. 220 mg empfohlen.

Tabelle 1: Zugelassene Dosierung laut Fachinformation

Wirkstoff	Indikation	Tagesdosis [mg]
Dabigatran	Primärprävention einer venösen Thromboembolie bei orthopädischen Eingriffen	220
	Prävention von Schlaganfall und systemischer Embolie bei erwachsenen Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern und einem oder mehreren Risikofaktoren (SPAF)	300
	Behandlung von TVT und LE	300

Dabigatran erreicht nach 0,5 bis 2 h seinen maximalen Plasmaspiegel bei einer geringen oralen Bioverfügbarkeit von 5,9%. Die Halbwertszeit beträgt zwischen 9 und 13 h^{14,15}. Für die totale Clearance ist ein Wert von $10,82 \pm 2,2$ l/h zu finden¹⁵.

Dabigatran wird hauptsächlich (85%) unverändert über die Niere ausgeschieden. Zusätzlich werden durch Konjugation pharmakologisch wirksame Acylglucuronide gebildet. Diese machen aber weniger als 10% des Gesamtanteils von Dabigatran im Blut aus¹⁴. Das CYP-System scheint nicht an der Metabolisierung beteiligt zu sein, allerdings konnte Dabigatran als Substrat von P-gp identifiziert werden^{15,16}.

Die häufigsten UAW waren Blutungen. Schwere Blutungen traten bei 2,9-3,4% der Patienten auf, Blutungen insgesamt bei 14-17% der Patienten. Übrige häufige Nebenwirkungen waren Bauschmerzen, Diarrhoe, Dyspepsie, Übelkeit¹⁴.

1.3.1.2.Rivaroxaban (Xarelto®)

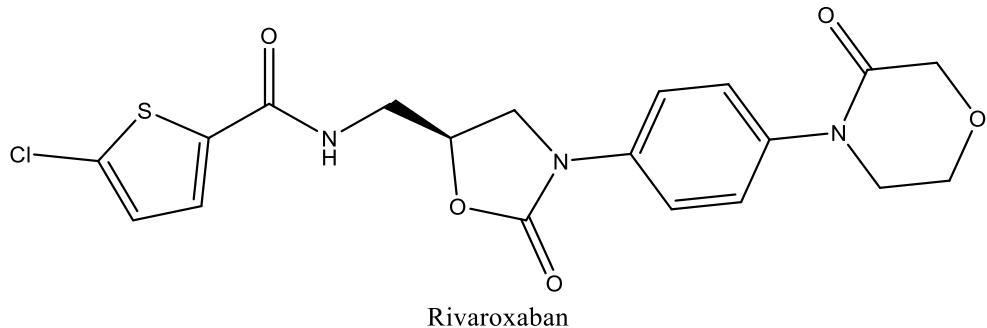


Abbildung 5:Strukturformel von Rivaroxaban

Rivaroxaban ist ein direkter Faktor-Xa-Antagonist.

In Deutschland zugelassen ist Rivaroxaban zur Prophylaxe venöser Thromboembolien nach Knie- und Hüftersatzoperationen, zur Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien, zur Behandlung, sowie zur Prophylaxe von tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien, sowie in Kombination mit Acetylsalicylsäure und/oder Clopidogrel zur Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse nach einem akuten Koronarsyndrom. Dosierung und Indikation sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zugessene Dosierungen und Indikationen von Rivaroxaban

Wirkstoff	Indikation	Tagesdosis [mg]
Rivaroxaban	Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse nach einem akuten Koronarsyndrom (nur in Kombination mit ASS und Clopidogrel)	5
	Prophylaxe venöser Thromboembolien (VTE) nach elektiven Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen	10
	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern	20
	Behandlung von TVT, Lungenembolie (LE) sowie Prophylaxe von deren Rezidiven (ab Tag 22)	20
	Behandlung von TVT, LE sowie Prophylaxe von deren Rezidiven (Tag 1- Tag 21)	30

Bei eingeschränkter Nierenfunktion wird eine Reduktion von 20 auf 15 mg empfohlen. Bei den übrigen Indikationen besteht kein Hinweis für eine Dosisreduktion.

Rivaroxaban erreicht 2-3 h nach Applikation Spitzenkonzentrationen bei einer Bioverfügbarkeit zwischen 66-100%. Die Halbwertszeit beträgt zwischen 5 und 13 h. Bei der totalen Clearance geht man von einem Wert von $7,51 \pm 1,06$ l/h aus^{17,18}.

Etwa 18% der oralen Dosis werden über CYP3A4 und etwa 14% über CYP2J2 metabolisiert. Zusätzlich werden 66% der Dosis über die Niere ausgeschieden. Rivaroxaban konnte außerdem als Substrat von P-gp beschrieben werden¹⁸.

Häufigste Nebenwirkung sind Blutungen. In der ROCKET-Studie traten bei 20,7% der Patienten leichte Blutungen und bei 5,6% der Population schwere Blutungen auf¹⁹.

Übrige häufige Nebenwirkungen sind: Schwindel, Kopfschmerzen, Hypotonie, Pruritus, Schmerzen in den Extremitäten, Fieber, periphere Ödeme, Transaminaseanstieg, sowie Einschränkung der Nierenfunktion mit Kreatinin- und Harnstoff-Anstieg im Blut²⁰.

Zusätzlich gab es im Januar 2017 Meldungen, dass unter Behandlung mit Rivaroxaban Agranulozytose und Stevens-Johnson-Syndrom aufgetreten waren²¹.

1.3.1.3. Apixaban (Eliquis®)

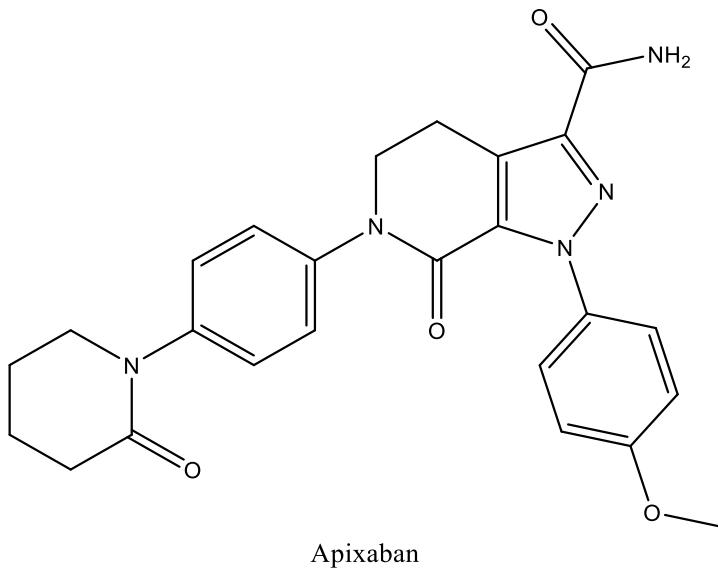


Abbildung 6: Strukturformel von Apixaban

Apixaban zählt wie Rivaroxaban und Edoxaban zu den Faktor-Xa-Antagonisten.

Apixaban ist zugelassen zur Prophylaxe von Thrombosen nach operativem Hüft- oder Kniegelenkersatz, zur Prophylaxe von Schlaganfällen und Embolien bei Vorhofflimmern, sowie zur Behandlung und Prophylaxe von Thrombosen und Embolien und deren Rezidiven.

Tabelle 3: Zugelassene Indikationen und Dosierungen von Apixaban

Wirkstoff	Indikation	Tagesdosis [mg]
Apixaban	Prophylaxe von VTE nach elektiven Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen	5
	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern	10
	Behandlung von TVT und Behandlung von LE sowie Prophylaxe von rezidivierenden TVT und LE (ab Tag 7)	
	Behandlung von TTV und Behandlung von LE sowie Prophylaxe von rezidivierenden TTV und LE (Tag 1- 7)	20

Bei eingeschränkter Nierenfunktion (15-29 ml/min) wird empfohlen die Dosis von 10 mg auf 5 mg täglich zu senken.

Bei einer oralen Bioverfügbarkeit von 50% werden Spitzenkonzentrationen 3 bis 4 h nach der Einnahme erreicht. Apixaban besitzt eine Halbwertszeit von rund 13 h und eine totale Clearance von $3,05 \pm 0,91 \text{ l/h}^{22}$.

Apixaban wird hauptsächlich über CYP3A4/5 metabolisiert, allerdings sind auch CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 und 2J2 an der Verstoffwechselung beteiligt^{23,24}. Zusätzlich ist es Substrat des P-gp²⁴.

In der Studienpopulation der ARISTOTELE-Studie, die 10 mg Apixaban bei Vorhofflimmern erhielt, traten bei 18,1% Blutungen, bei 4% der Patienten schwere Blutungen auf²⁵.

1.3.1.4. Edoxaban (Lixiana®)

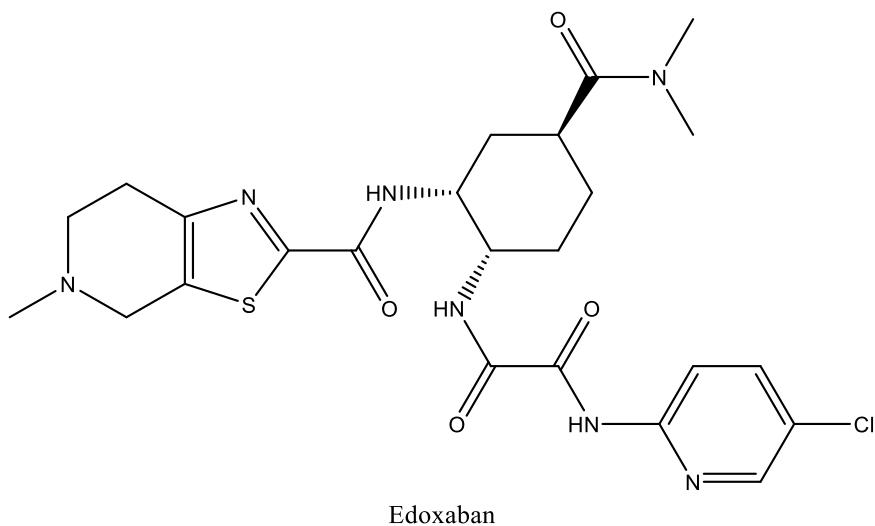


Abbildung 7: Strukturformel von Edoxaban

Edoxaban gehört zur Gruppe der Faktor-Xa-Antagonisten.

Zugelassen ist es in Deutschland zur Prophylaxe von Schlaganfällen und Embolien bei Patienten mit Vorhofflimmern sowie zur Behandlung und Prophylaxe von Thrombosen und Embolien sowie deren Rezidiven.

Tabelle 4: Zugelassene Dosierung und Indikationen von Edoxaban

Wirkstoff	Indikation	Tagesdosis [mg]
Edoxaban	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei erwachsenen Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern	60
	Behandlung von TVT, LE sowie Prophylaxe von deren Rezidiven	

Zusätzlich ist bei eingeschränkter Nierenfunktion ($\text{CrCl} 15-50 \text{ ml/min}$), Körpergewicht $\leq 60 \text{ kg}$, sowie Comedikation mit P-gp-Inhibitoren eine Reduktion der Tagesdosis auf 30 mg angezeigt.

Bei einer oralen Bioverfügbarkeit von 62% erreicht Edoxaban 1-2 h nach Einnahme maximale Plasmakonzentrationen. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 10-14 h und die totale Clearance beläuft sich auf $21,8 \pm 3,03 \text{ l/h}^{26,27}$.

50% der oralen Dosis werden unverändert über die Niere ausgeschieden. Edoxaban wird nur in geringem Maße (10% der oralen Dosis) über CYP3A4 metabolisiert. Es konnte ein schwächer Inhibitionseffekt auf die CYP-Enzyme beobachtet werden. Edoxaban ist Substrat von P-gp und konnte auch hier eine schwache Hemmung des Transporters aufzeigen²⁷.

Häufigste Nebenwirkung sind unerwünschte Blutungen. Bei der Studienpopulation traten bei 14% Blutungen auf, 2,75% zeigten schwere Blutungen²⁶.

Weitere häufige Nebenwirkungen sind laut Fachinformation: Erhöhte Leberwerte (Bilirubin und Gamma-GT), Ausschlag, Juckreiz, Übelkeit sowie Anomalien bei Leberfunktionstests.

1.3.2. Vitamin-K-Antagonisten (VKA)

1.3.2.1. Warfarin (Coumadin®) und Phenprocoumon (Marcumar®)

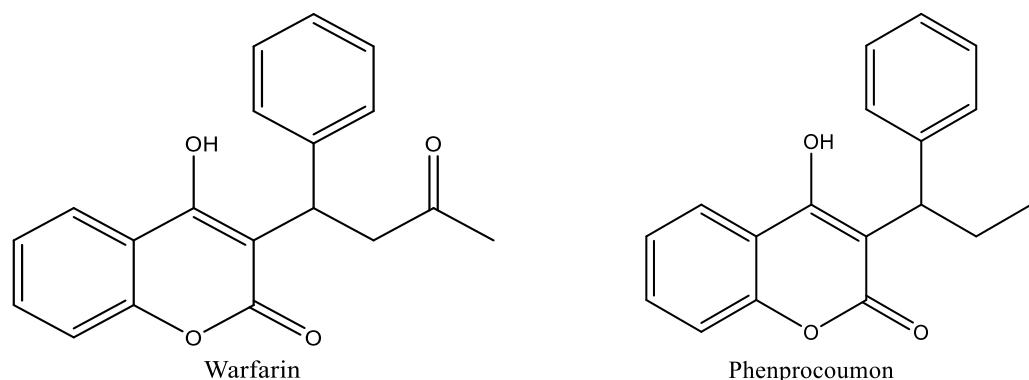


Abbildung 8: Strukturformel von Warfarin und Phenprocoumon

Die beiden Cumarin-Derivate besitzen, wie bereits an der Strukturformel zu erkennen ist, große Ähnlichkeit. Ihr unterschiedlicher Einsatz ist geographisch bedingt. Während Warfarin hauptsächlich im amerikanischen Raum zur Therapie eingesetzt wird, findet in Deutschland fast ausschließlich das von Roche entwickelte Phenprocoumon Verwendung (Verhältnis 99:1²⁸)

Beide Wirkstoffe sind in Deutschland zur Behandlung und Prophylaxe von Thrombosen und Embolien sowie zur Behandlung eines Herzinfarktes bei erhöhtem Risiko eines thromboembolischen Ereignisses zugelassen. Die Dosierung erfolgt individuell nach angestrebtem INR und Indikation. Für Phenprocoumon sind Dosierungen zwischen 1,5 – 6 mg, für Warfarin zwischen 2,5 – 10 mg üblich. Bei Überdosierungen oder bedrohlichen Blutungen kann die Wirkung über die i.v. Gabe von Vitamin-K aufgehoben werden.

Der hauptsächliche Unterschied liegt zwischen den Halbwertszeiten. Während Phenprocoumon eine terminale Halbwertszeit von bis zu 150 Stunden erreicht, liegt diese bei Warfarin zwischen 40 und 50 Stunden^{29,30}. Mit einem Wirkeintritt ist rund 2-3 Tagen nach der ersten Einnahme zu rechnen.

Phenprocoumon wird über CYP3A4 und 2C9 metabolisiert, rund 15% der oralen Dosis werden unverändert über die Niere ausgeschieden. Für Warfarin sind hauptsächlich CYP1A2, 3A4 und 2C9 an dessen Verstoffwechselung beteiligt³¹.

Häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind auch hier die Blutungen. Bei gut eingestellten Patienten treten schwere Blutungen mit einer Häufigkeit von 2-3% auf³².

Weitere häufige Nebenwirkungen sind laut Fachinformation: Hypotonie, Synkope, Brustschmerzen, Atemnot, Ausschlag, Bauchschmerzen bzw. Krämpfe, Durchfall, Übelkeit, Kopfschmerzen, Schwindel, Ödeme, Erschöpfung sowie Asthenie.

1.4. INR-Monitoring

Der INR (international normalized ratio) wird standardmäßig bestimmt, um das Ausmaß der Antikoagulation bei Vitamin-K-Antagonisten zu ermitteln. Dieser Bestimmung zu Grunde liegt die Prothrombinzeit, welche aussagt wie lange, in Sekunden, das Blut benötigt um nach Prothrombingabe vollständig zu gerinnen. Zusätzlich wird diese noch mit dem ISI (Internationaler Sensitivitätsindex) verrechnet, um Schwankungen durch unterschiedliche verwendete Prothrombine auszugleichen.

Formel 1: Berechnung des INR über die Bestimmung der Prothrombinzeit

$$INR = \left(\frac{Prothrombinzeit_{Patient}}{Prothrombinzeit_{Normal}} \right) * ISI$$

Die Einstellung des INR erfolgt nach Indikation und Risikoabschätzung. Während für die Behandlung bei Vorhofflimmern ein Zielbereich von 2-3 sinnvoll erscheint, können bei Ersetz einer Herzklappe auch Werte von bis zu 4,5 nötig sein.

1.5. INR-Messungen bei direkten oralen Antikoagulanzen

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Prothrombinzeit und Konzentration im Blut unter Rivaroxaban besteht, es jedoch zu erheblichen Schwankungen bei der Bestimmung der Prothrombinzeit kommt. Diese unterschiedliche Sensitivität war bedingt durch die Auswahl der Prothrombinreagenzien und ließ sich auch durch Berechnung

über den INR nicht normalisieren³³. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Apixaban und Dabigatran^{34,35}.

Auch Versuche eines Monitorings über die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit, welche bei der Therapie mit Heparinen Anwendung findet, konnten bei Rivaroxaban aufgrund mangelnder Sensitivität nicht überzeugen³⁶.

Überlegungen zur speziellen Anpassung des INR für Rivaroxaban durch Verwendung eines speziellen ISI konnten zwar zeigen, dass damit Schwankungen, welche durch die Verwendung verschiedener Prothrombine entstehen, minimiert werden konnten. Jedoch wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt³⁷.

Gründe für die Nichtübertragbarkeit dieser Labortests liegen sicherlich in der unterschiedlichen Pharmakologie der Arzneistoffe. So hemmen die DOAKs direkt einzelne Faktoren, welche teils an völlig unterschiedlichen Punkten, und nicht zwingend vom Prothrombin beeinflusst, innerhalb der Gerinnungskaskade zu finden sind. Zum anderen spielen vermutlich auch die viel längeren Halbwertszeiten der VKAs eine Rolle, welche diese weit weniger anfällig für Schwankungen in Hinsicht auf den Wirkspiegel macht.

1.6. Studienlage

In der ROCKET-Studie, einer der Zulassungsstudien für Rivaroxaban, wurde die Wirksamkeit von Rivaroxaban gegenüber Warfarin bei Patienten mit Vorhofflimmern hinsichtlich der Prophylaxe von ischämischen Ereignissen untersucht. Hier konnte eine Nicht-Unterlegenheit in Bezug auf die primären Endpunkte, das Auftreten von Schlaganfällen oder systemischen Embolien (Rivaroxaban 1,7% p.a. vs. Warfarin 2,2% p.a.) festgestellt werden, jedoch keine statistisch signifikante Überlegenheit der neuen Therapie ($p=0,12$). Bezuglich der unerwünschten Blutungen traten diese zu 20,7% in der Rivaroxabangruppe und zu 20,3% in der Warfaringruppe auf ($p= 0,44$). Lediglich bedrohliche Blutungen (0,4% vs. 0,8%, $p=0,003$) sowie intrakranielle Blutungen (0,8% vs. 1,2%, $p=0,02$) konnten unter Rivaroxaban signifikant weniger beobachtet werden. Kritisch muss jedoch hier gesehen werden, dass nur 55% der Patienten im Warfarin-Arm, auf den therapeutisch angestrebten INR-Wert eingestellt waren¹⁹.

Hinzu kommt die aktuelle Meldung, dass die Zulassungsstudie überprüft wird, da für die INR-Messungen wohl potentiell defekte Geräte verwendet wurden³⁸.

In der ARISTOTLE-Studie wurde die Therapie unter Apixaban gegen Warfarin bei Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Hier konnte eine signifikante Reduktion der Schlaganfälle pro Jahr um 0,33% unter Apixaban festgestellt werden ($p<0,001$ für Nicht-Unterlegenheit, $p=0,01$ für Überlegenheit). Auch konnte eine Reduktion der Sterblichkeit um 0,42% pro Jahr ($p=0,047$) sowie eine Reduktion der klinisch relevanten Blutungen um 1,94% pro Jahr ($p<0,001$) beobachtet werden. Hämorrhagische Schlaganfälle und intrakranielle Blutungen konnten um 0,23% pro Jahr bzw. 0,47% pro Jahr unter Apixaban reduziert werden. Jedoch fand keine signifikante Verminderung von ischämischen Schlaganfällen statt. Auch hier muss kritisch betrachtet werden, dass nur 66% des Warfarin-Arms auf den therapeutisch angestrebten INR eingestellt waren²⁵.

Zusätzlich ergaben Subgruppenanalysen des IQWIG, dass die Verminderung von Schlaganfällen und Todesfällen nur bei Patienten über 65 Jahren signifikant war und bei jüngeren Patienten diese Ereignisse sogar numerisch häufiger auftraten³⁹.

Betrachtet man die dreiarmige RE-LY-Studie, bei der zwei Dosierungen Dabigatran (110mg zweimal täglich und 150 mg zweimal täglich) gegenüber Warfarin bei Patienten mit Vorhofflimmern getestet wurden, ergab sich für beide Dabigatran-Arme eine Nicht-Unterlegenheit bezüglich der Reduktion von Schlaganfällen und systemischer Embolien, jedoch bestand nur bei der 150 mg Dosierung eine signifikante Reduktion um 0,58% pro Jahr gegenüber Warfarin. Kardiovaskuläre Todesfälle konnten unter beiden Dabigatrandosierungen um 0,26% pro Jahr (110mg) und respektive 0,41% pro Jahr (150mg) gesenkt werden, jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,21$). Herzinfarkte traten unter Dabigatran numerisch häufiger auf als unter Warfarin (0,81% vs. 0,82% vs. 0,64% pro Jahr), auch hier ist keine Signifikanz gegeben ($p=0,12$). Hinsichtlich schwerer Blutungen traten diese nur unter der niedrigeren Dabigatrandosierung signifikant weniger auf, im Vergleich zu der 150 mg Dosierung bestand nur eine numerische Reduktion gegenüber Warfarin (2,71% vs. 3,11% vs. 3,36% pro Jahr). Schwere gastrointestinale Blutungen traten unter der höheren Dabigatrandosierung sogar signifikant häufiger, um 0,49% pro Jahr, als unter Warfarin auf ($p=0,001$). Auch bei dieser Studie muss wieder bemängelt werden, dass nur 60% der Teilnehmer auf den therapeutisch angestrebten INR Bereich eingestellt waren. Bei genauerer Betrachtung der Subgruppen kam man zu dem Ergebnis, dass umso besser das INR-Monitoring der Patienten unter Warfarin war, desto weniger profitierten sie von einer Umstellung auf Dabigatran⁴⁰.

Interessant hierzu ist auch eine Substudie zur RE-LY-Studie von Reilly et al. aus dem Jahr 2014, welche eine Korrelation zwischen Plasmakonzentration, schweren Blutungen und

Schlaganfallwahrscheinlichkeit bestätigt und zu dem Ergebnis kommt, dass patientenspezifische Dosisanpassungen das Nutzen-Risiken Verhältnis unter Dabigatran verbessern könnten⁴¹.

In einer retrospektiven Datenbankauswertung aus dem Jahr 2016 wurde die Effektivität und Sicherheit von Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban gegenüber Warfarin bei der Antikoagulation unter Vorhofflimmern untersucht. Im Hinblick auf die Effektivität konnte hier nur Apixaban das Risiko eines Schlaganfalls oder einer Embolie signifikant reduzieren (HR 0,67, 95% KI 0,46-0,98, p=0,04). Dabigatran und Rivaroxaban konnten keine signifikante Reduktion gegenüber Warfarin zeigen. Ischämische Schlaganfälle traten hier numerisch häufiger auf, hämorrhagische jedoch numerisch seltener. Bezuglich des Auftretens schwerer Blutungen konnten Apixaban (HR 0,45, p<0,001) und Dabigatran (0,79, p<0,01) einen signifikanten Vorteil gegenüber Warfarin zeigen. Bei Rivaroxaban traten schwere Blutungen sogar numerisch häufiger auf (HR 1,04), jedoch bestand hier keine statistische Signifikanz. Alle drei DOAKs konnten jedoch intrakraniellen Blutungen signifikant gegenüber der Warfarin Vergleichsgruppe reduzieren. In der Warfaringruppe waren im Median 56% der Patienten gut auf den INR eingestellt⁴².

1.7. Kontroverse

Bei Betrachtung der Studiendaten stellt sich grundsätzlich die Frage, ob man durch individuelle Dosisanpassung und Konzentrationskontrolle nicht eine höhere bzw. überhaupt eine Überlegenheit gegenüber Warfarin hätte zeigen können.

Gerade in Bezug auf Deutschland sind die Studien kritisch zu hinterfragen, da hierzulande überwiegend mit Phenprocoumon therapiert wird. Zusätzlich kritisiert die AkdÄ die Aussagekraft der Studien bezüglich der INR-Einstellung. Während dort im Schnitt 55-65% der Patienten im Zielbereich waren, werden für Deutschland Werte von 64-79% angenommen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Dabigatran mit der klinischen Wirkung korreliert⁴¹. Ebenso konnte für Apixaban und Rivaroxaban gezeigt werden, dass gemessene Konzentrationen mit der Faktor-Xa-Aktivität korrelieren^{18,43}. Die empfohlene Dosisreduktion bei eingeschränkter Nierenfunktion scheint daher schlüssig, da durch die höheren Konzentrationen auch eine höhere Blutungswahrscheinlichkeit resultiert. Warum basierend auf diesem Wissen kein durchgehendes Monitoring und Dosisanpassung bei zu hohen oder zu niedrigen Konzentrationen indiziert ist, scheint mehr als fragwürdig.

Auch die einmalige Gabe von Rivaroxaban wirft Fragen auf. Bei einer Halbwertszeit von rund 13 Stunden resultieren daraus, pharmakokinetisch gesehen, entweder zu niedrige Konzentration im Talspiegel oder zu hohe Spitzenkonzentrationen.

Laut Arzneimittelreport ist die Verordnung der DOAKs seit Einführung 2011 von 38 Millionen definierten Tagesdosen (DDD) auf rund 253 Millionen angestiegen. Im gleichen Zeitraum fiel die Verordnungszahl der VKAs von 389 auf 364 Millionen DDD ab⁴⁴. Die Kosten der Antithrombotika sind 2015 auf 1.613,9 Mrd. € angestiegen⁴⁴ woran die DOAKs sicherlich ihren Anteil tragen wenn man die Therapiekosten in Tabelle 5 betrachtet.

Tabelle 5: Therapiekosten der oralen Antikoagulanzen, Apothekenverkaufspreis (AVP) aus Rote Liste Stand 22.04.2016, Keine Berücksichtigung von Laborkontrollen

Wirkstoff	Präparat	Dosierung	Kosten/DDD	AVP
Rivaroxaban	Xarelto 20 mg 98 Filmtbl.	1x 20 mg	3,27 €	320,74 €
Apixaban	Eliquis 5 mg 200 Filmtbl.	2x 5 mg	3,44 €	343,49 €
Dabigatran	Pradaxa 150 mg 180 Hartkps	2x 150 mg	3,28 €	295,45 €
Phenprocoumon	Marcumar 98 Tbl. Phenprocoumon acis 100 Tbl.	½ - 1 ½ Tbl.	0,24 € 0,18 €	23,88 € 17,98 €
Warfarin	Coumadin 100 Tbl.	½ - 2 Tbl.	0,34 €	22,90 €

1.8. Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)

Therapeutisches Drug Monitoring ist ein wichtiges Hilfsmittel um die Pharmakotherapie zu optimieren. Beim TDM erfolgt eine Bestimmung der Arzneimittelkonzentration im Blut mit Hilfe analytischer Verfahren. Die bestimmbare Wirkstoffkonzentration ist ausschlaggebend für die Wirkung des Arzneistoffes im Körper, da verschiedene Patienten bei gleicher Dosis aufgrund von individuellen Faktoren wie Alter, genetischen Modifikationen oder Comedikation unterschiedliche Konzentrationen aufbauen. Durch Überwachung des Medikamentenspiegels im Blut lassen sich Unter- bzw. Überdosierungen vermeiden. Es ermöglicht so eine sichere, effektive, und individuell auf den Patienten abgestimmte Therapie (Individualisierung der Therapie).

Besonders bei Arzneistoffen mit einer niedrigen therapeutischen Breite oder bei Arzneistoffen, für deren therapeutischen Effekt keine validen Marker (Psychopharmaka) vorliegen, ist

das TDM wichtig. Jedoch auch bei älteren Patienten mit Polymedikation oder zur Abklärung von Complianceproblemen kann es hilfreich sein.

Bei der Bestimmung im TDM-Labor der Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie in Regensburg wird die gemessene Konzentration für jeden Patienten in Korrelation zum dosisbezogenen Referenzbereich sowie zum therapeutischen Referenzbereich gesetzt. Zusätzlich erhält die anfordernde Klinik oder der anfordernde Arzt nicht nur den blanken Messwert, sondern einen „klinisch-pharmakologischen Befund“, dieser enthält auch mögliche Gründe für etwaige Abweichungen, damit die Medikation dementsprechend optimiert werden kann.

1.8.1. Therapeutischer Referenzbereich

Eine wichtige Kenngröße im TDM ist der therapeutische Referenzbereich (TRR). Er gibt an in welchem Bereich die Wirkstoffkonzentration liegen sollte, um einen optimalen Effekt zu haben. Hierbei muss beachtet werden, dass unterhalb des Bereiches eine Wirkung des Medikamentes relativ unwahrscheinlich ist und oberhalb des Bereiches mit dem vermehrten Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu rechnen ist bzw. hier kaum noch der Therapieeffekt zu verbessern ist oder die Wirkung sogar wieder abnimmt.

Zur Festlegung der unteren therapeutischen Schwelle lassen sich Konzentrationen nutzen, die im Vergleich zum Placebo keine Verbesserung brachten. Für die obere Schwelle müssen Daten, welche den Zusammenhang zwischen Konzentrationen und Häufigkeit des Auftretens von UAWs widerspiegeln, verwendet werden. Leider sind Studien, welche die genannten Daten liefern, sehr selten. Somit sind die bekannten therapeutischen Referenzbereiche für viele Arzneistoffe sehr lückenhaft oder weisen nur eine geringe Validität auf.

Zusätzlich wird eine Warnschwelle festgelegt die, sofern Daten aus Fallberichten zu Intoxikationen fehlen, dem doppelten Wert der oberen Grenze des therapeutischen Referenzbereiches entspricht. Wird diese Warnschwelle überschritten, sollte umgehend der behandelnde Arzt informiert werden, damit dieser, sofern Intoxikationserscheinungen beim Patienten aufgetreten sind, entsprechende Maßnahmen ergreifen und die Dosis entsprechend senken kann^{45,46}.

1.8.2. Dosisbezogener Referenzbereich⁴⁷

Ein Alleinstellungsmerkmal des TDM-Labors in Regensburg stellt die Verwendung des dosisbezogenen Referenzbereiches (DRR) dar. Hierfür wird die erhaltene Wirkstoffkonzentration in Relation zur Dosis des Patienten gesetzt. Ausschlaggebend für die Berechnung ist die Proportionalität zwischen Dosis und Arzneimittelkonzentration im Blut (1). Zusätzlich benötigt man als Proportionalitätsfaktor (2) die totale Clearance des Arzneistoffes, welche sich aus renaler, hepatischer und sonstiger (Atemluft, Schweiß) Clearance zusammensetzt (3). Die Clearance wird im Zuge der Zulassung an gesunden Probanden ermittelt. Mit Hilfe von der Bioverfügbarkeit sowie des Dosierungsintervalls lässt sich die Formel (4) aufstellen. Nach Einsetzen und Auflösen der Formel ergibt sich die obere und untere Grenze des dosisbezogenen Referenzbereiches. Sofern für die Clearance der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung angegeben ist, befinden sich in diesem Bereich 68% der Wirkstoffkonzentrationen von Patienten, die dem Grundkollektiv entsprechen. Der errechnete Bereich gibt die mittlere Tageskonzentration im pharmakokinetischen Gleichgewicht für die jeweilige Dosis an.

Formel 2: Formel zur Berechnung des dosisbezogenen Referenzbereiches

$$(1) c \sim D$$

$$(2) De = c \times Cl_{\text{total}}$$

$$(3) Cl_{\text{total}} = Cl_{\text{renal}} + Cl_{\text{hepatisch}} + Cl_{\text{sonstige}}$$

$$(4) c = \frac{De \times F}{\tau \times (Cl_{\text{total}} \pm SD)}$$

c=Konzentration, D=Dosis, De=Tagesdosis, Cl_{total}=Clearance, F=Bioverfügbarkeit, SD=Standardabweichung, τ=Dosierintervall in h

Es muss festgehalten werden, dass der DRR nicht erreicht werden muss um eine wirksame Pharmakotherapie zu gewährleisten. Der DRR ist als diskriminierender Bereich zu verstehen. Oftmals kann der DRR gar nicht von Patienten getroffen werden, da die Clearance in Phase I oder Phase II Studien an einer Population ermittelt wird, die sich grundlegend von der „normalen“ Patientenpopulation unterscheidet. Die Studienpopulation ist in der Regel viel jünger, erhält keine Comedikation und besitzt auch keine Komorbiditäten oder genetische Modifikationen im Arzneistoffmetabolismus. Es ist somit die Aufgabe des klinischen

Pharmakologen zu erkennen, ob etwaige Abweichungen vom DRR schlichtweg populationsbedingt sind oder ob einer der im folgenden Abschnitt genannten externen Faktoren dafür verantwortlich ist.

Besteht eine Abweichung vom dosisbezogenen Referenzbereich kann dies Hinweise auf ein Complianceproblem (Mangel- oder Übercompliance), eine Arzneimittelinteraktion, einen genetischen Polymorphismus (slow metabolizer und ultra rapid metabolizer), einen Einfluss von Genussmitteln (Enzyminduktion durch Rauchen oder Alkoholkonsum) oder eine Organfunktionsstörung (Nieren- bzw. Leberinsuffizienz) liefern. Sofern der Patient auch ohne Erreichen des dosisbezogenen Bereiches klinisch gut auf die Medikation anspricht und keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen zeigt, muss die Dosierung nicht zwingend angepasst werden. Der behandelnde Arzt sollte sich jedoch darüber im Klaren sein was für die Abweichung verantwortlich ist, damit beispielsweise beim Einstellen des Rauchens oder Umstellen der Comedikation die Dosis entsprechend angepasst werden kann^{46,47}.

1.8.2.1. Dosisbezogener Referenzbereich für Talkonzentration

Im TDM hat es sich etabliert das Blut während der Talkonzentration abzunehmen. Da der im vorigem Abschnitt beschriebene DRR, durch die Berechnung der mittleren Tageskonzentration, hier eine Diskrepanz zwischen Erwartungswert und Realwert aufweist, soll hier zusätzlich die Möglichkeit dargestellt werden einen Erwartungsbereich für die echte Talkonzentration zu berechnen. Basis hierfür ist die folgende Formel von Gex-Fabry et al. (2003)⁴⁸. In die Berechnung fließen auch Halbwertszeit und der zeitliche Abstand zwischen letzter Medikamentengabe und Blutabnahme ein. Die Formel ermöglicht die Vorhersage einer Konzentration im pharmakokinetischen Gleichgewicht zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der letzten Einnahme. Dadurch lässt sich auch bei Arzneistoffen, deren Halbwertszeit kürzer als das Dosierintervall ist, eine Vorhersage über die zu erwartende Konzentration berechnen⁴⁹.

Formel 3: Formel zur Berechnung des dosisbezogenen Referenzbereiches für die Konzentration im pharmakokinetischen Gleichgewicht

$$C = \left(\frac{D}{\tau} \right) \times \left(\frac{F}{Cl_{total}} \right) \times \left[\frac{(ke \times \tau)}{(1 - e^{-ke \times \tau})} \right] \times (e^{-ke \times \Delta t})$$

ke berechnet sich aus der Halbwertszeit über:

Formel 4: Berechnung der Eliminationskonstante

$$ke = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

D = Tagesdosis, F = Bioverfügbarkeit, τ = Dosierintervall, Cl_{total} = totale Clearance, ke = Eliminationskonstante, Δt = Abstand zwischen Blutentnahme und letzter Medikamentengabe, t_{1/2} = Halbwertszeit, C = Konzentration

Alternativ lässt sich die Eliminationskonstante auch über die Konzentration berechnen:

Formel 5: Berechnung der Eliminationskonstante mit gemessener Konzentration

$$ke = \frac{\ln C(x) - \ln C(y)}{\Delta t}$$

C(x) = Konzentration zu Zeitpunkt x, C(y) = Konzentration zu Zeitpunkt y, Δt = zeitlicher Abstand zwischen C(x) und C(y)

1.8.3. Klinisch-pharmakologische Befundung⁵⁰

Im TDM-Labor der Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie in Regensburg wird zusätzlich zu jedem gemessenen Wert ein individueller klinisch pharmakologischer Befund von einem approbierten Apotheker oder Arzt erstellt. Der behandelnde Arzt bekommt als Rückmeldung zusätzlich zum Wirkspiegel eine Angabe über mögliche Arzneimittelinteraktionen, Begründung für Abweichung von den beiden Referenzbereichen sowie eine etwaige Empfehlung zur Dosisanpassung aus labormedizinischer Sicht.

1.8.4. KONBEST⁵¹

KONBEST (Akronym für **K**onzentrations**B**estimmung) ist die internetbasierte Befundungsplattform des TDM-Labors in Regensburg (im Internet zu erreichen unter www.konbest.de). KONBEST dokumentiert sämtliche Schritte des Laborbetriebs, von Eingabe der Patientendaten inklusive Comedikation, über Berechnung der jeweiligen Referenzbereiche nach Eingabe des Messwertes, bis hin zu der Erstellung des Befundes.

Nach Probeneingang werden die Patientendaten, welche unter anderem Alter, Abnahmezeitpunkt, Diagnose, Anforderungsgrund sowie Comedikation des Vortages enthalten, dem Anforderungsbogen entnommen und in KONBEST eingetragen. Dadurch wird eine Probennummer erzeugt, welche der Patientenprobe zugeordnet wird. Nach Erhalten des Messwertes wird dieser eingetragen und der Befund für die Befunder freigegeben. KONBEST berechnet basierend auf den hinterlegten Daten, den dosisbezogenen Referenzbereich und gibt eine grafische Darstellung von möglichen Arzneimittelinteraktionen, basierend auf der Comedikation an. Zusätzlich erfolgt die Darstellung einer 9-Felder-Tafel, welche den Messwert in Bezug zu DRR und TRR einordnet. Nachdem der Befunder die Konzentration bewertet und seinen Befund erstellt hat, wird dieser freigegeben und kann nun in ein PDF-Dokument umgewandelt werden, welches an die jeweilige Klinik gefaxt wird.

Zusätzlich besitzt KONBEST eine weitreichende Datenbankfunktion, in der alle Messwerte und Daten anonymisiert abgespeichert werden und somit Grundlage für wissenschaftliche Auswertungen sowie bei Bedarf patientenspezifische Auswertungen bildet.

1.9. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)

Die ultra-high performance liquid chromatography, synonym auch als ultra-high pressure liquid chromatography bezeichnet, ist eine Weiterentwicklung der klassischen HPLC. Prinzipiell handelt es sich hierbei um eine auf kleine Totvolumina und hohe Drücke optimierte HPLC, mit der eine Effizienzsteigerung durch Verwendung kurzer und dichter gepackten Säulen möglich ist.

Grundlegend für diese Entwicklung ist die Berechnung der Effizienz bzw. der Bodenzahl N. Eine Steigerung der Effizienz resultiert in schmaleren Peaks mit einer größeren Peakhöhe und einer verbesserten Auflösung. Vereinfacht gesehen berechnet sich die Bodenzahl aus dem Quotient von Säulenlänge durch theoretische Bodenhöhe, was in diesem Fall dem Partikeldurchmesser des Füllgutes entspricht.

Formel 6: Formel zu Berechnung der Bodenzahl

$$N = \frac{L}{H}$$

N: Bodenzahl, L: Säulenlänge, H: Bodenhöhe

Die einfachste Möglichkeit die Bodenzahl zu erhöhen besteht folglich darin die Länge unserer Analysensäule zu erhöhen. Dies führt allerdings auch zu längeren Retentionszeiten und

damit auch zu einer längeren Analysenzeiten. Die zweite Möglichkeit besteht in der Verkleinerung der Partikel in unserer Säule, was aber zu einem erhöhten Rückdruck führt. Hier kommt nun die UHPLC ins Spiel. Während normale Anlagen und Säulen für Drücke bis 600 bar ausgelegt sind, halten UHPLC optimierte Geräte Drücke von bis zu 1200 bar stand. Im Endeffekt lässt sich durch Verkleinerung der Partikelgröße und Verkürzung der Säulenlänge vergleichbare Effizienz wie bei langen Säulen und großer Partikelgrößen erreichen, jedoch mit verkürzten Analysezeiten.

Durch die Entwicklung von halbporösem Packmaterial ist diese Effizienzsteigerung jedoch auch auf normale HPLC-Anlagen übertragbar. Halbporöses Material besitzt im Gegensatz zu vollporösem Füllgut einen kompakten Kern mit poröser Umhüllung. Dadurch verkürzt sich der Diffusionsweg des Analyten beim Kontakt mit dem Säulenmaterial, da dieser nicht vollständig eindringen kann (Abbildung 9). Aufgrund dessen lassen sich Säulen mit großem Füllgut verwenden, welche bei weniger Rückdruck vergleichbare Effizienz wie Säulen mit kleinerem vollporösem Packmaterial erzeugen.

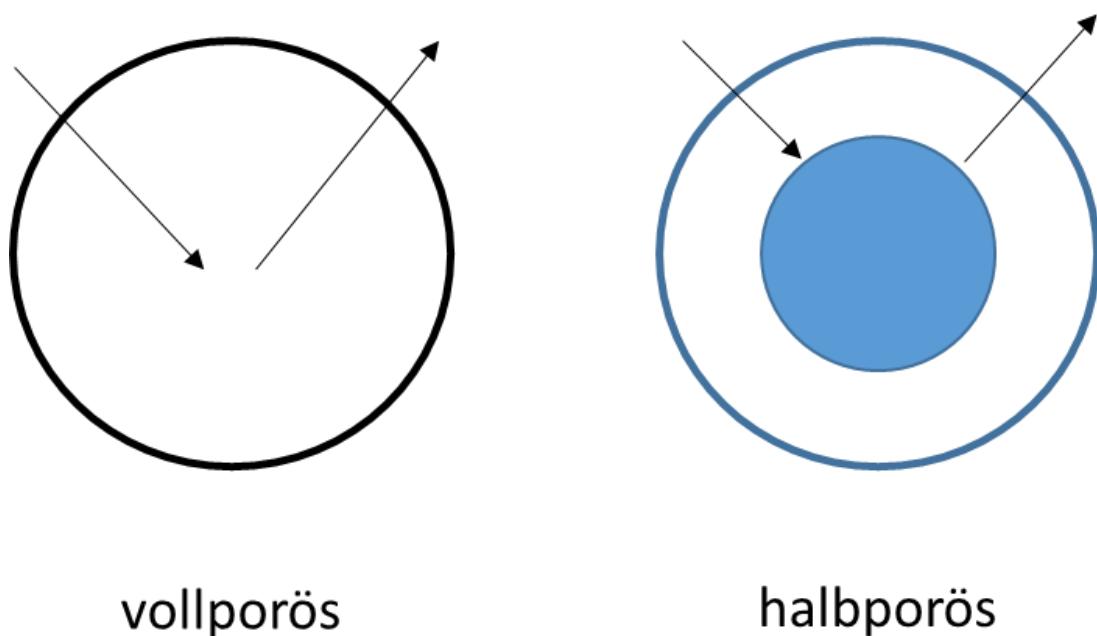


Abbildung 9:Schematische Darstellung der Diffusionswege des Analyten bei vollporösen und halbporösen Säulenmaterial

2. Fragestellung

Aus der vorausgehend beschriebenen Problematik und Eigenschaften der direkten oralen Antikoagulanzen ergeben sich folgende Fragen:

1. Kann eine UHPLC-Methode zur Bestimmung von Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban entwickelt und validiert werden?
2. Können mit der gleichen Methode auch Edoxaban, sowie die Vitamin-K-Antagonisten Phenprocoumon und Warfarin, bestimmt werden?
3. Lässt sich für die DOAKs ein dosisbezogener Referenzbereich sowie ein therapeutischer Referenzbereich bestimmen?
4. Welche Konzentrationen wurden tatsächlich gemessen und wodurch ist deren etwaige Abweichung vom dosisbezogenen Referenzbereich zu erklären?
5. Wie stark ist die interindividuelle Schwankung der Serumkonzentrationen bei den gemessenen Patientenproben?
6. Wie sinnvoll ist das Monitoring von DOAKs nach aktueller Datenlage?

3. Material und Methoden

3.1. Methodenentwicklung

3.1.1. Probengewinnung

Die Begleitbögen der Proben, die in das TDM Labor nach Regensburg zur Konzentrationsbestimmung geschickt werden, wurden regelmäßig auf Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban kontrolliert. Bei Zutreffen wurde Probenrestmaterial dazu verwendet um Messungen durchzuführen. Zusätzlich wurden Proben vermessen, welche im Zuge der von uns durchgeführten Anwendungsbeobachtung eingesandt wurden. Je nach Einsender erhielten wir schon bereit abzentrifugiertes Serum aus venösem Blut oder Vollblut in Serummonovetten. Bis zur Vermessung am Tag des Eingangs wurden die Proben bei 8 °C im Kühlschrank gelagert. Ansonsten wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Für die Gewinnung von medikamentenfreiem Serum, wurden freiwillige Blutspenden von Mitarbeitern des Bezirksklinikums Regensburg sowie der Universität Regensburg verwendet. Zur Aufreinigung dieser Proben wurden Oasis® Sep-Pak-Vac Kartuschen (3cc/500mg) verwendet. Diese wurden zuerst mit jeweils 5 ml Methanol und 5 ml Wasser vorkonditioniert.

Anschließend wurden die Serumspenden (3 ml) auf die Kartuschen gegeben und der Inhalt per Vakuum abgesaugt. Dieses Poolserum wurde entweder direkt verwendet oder bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C eingefroren.

3.1.2. Probenvorbereitung

Vor Vermessung der Proben müssen diese aufgereinigt werden, um störende Bestandteile der Matrix abzutrennen. Hierfür kommen Online- oder Offlineverfahren in Frage. Bei der Online-Aufreinigung wird das Probenmaterial direkt in die HPLC-Anlage eingespritzt und dort über eine vorgesetzte Vorreinigungssäule gereinigt bevor es auf die Analysensäule gelangt. Bei Offlineverfahren erfolgt die Aufarbeitung außerhalb des Systems und es wird die bereits aufbereitete Probe in die Anlage injiziert.

Bei der Vermessung mit der UHPLC-Anlage bestand nicht die Möglichkeit eine Online-Aufarbeitung durchzuführen. Bedingt durch die kleinen Volumina der Kapillare kam es hier in Vorversuchen zu Verstopfungen und zu starken Druckanstiegen bei Injektion von Serum.

Die Probenaufbereitung erfolgte durch Proteinfällung mit Methanol im Verhältnis 1:3 (Vol/Vol). Dazu wurden 100 µl des Probenmaterials abpipettiert und mit 300 µl MeOH versetzt. Anschließend wurden die Proben auf dem Vortexer für eine Minute gemischt und bei 16.060g für drei Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand in ein Glasvial mit einem 330 µl Einsatz gegeben und in den Autosampler der UHPLC-Anlage überführt, welcher auf 8 °C gekühlt wurde.

3.1.3. Standards

Für die Methodenentwicklung und Validierung wurden die Standards zur Erstellung von Kalibriergeraden aus der bezogenen Reinsubstanz hergestellt. Dafür wurden Stammlösungen der jeweiligen Analyten mit einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt und anschließend mit Poolserum auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Für die Quantifizierung der Patientenproben kamen sowohl diese selbst hergestellten Kalibratoren als auch kommerziell erhältlich Standards von der Firma Technoclone GmbH (Wien, Österreich) für Rivaroxaban und Apixaban, sowie von der Firma CoaChrom Diagnostica GmbH (Maria Enzerdorfs, Österreich) für Dabigatran zum Einsatz. Diese kommerziellen Standards werden in Form von lyophilisiertem Plasma geliefert und müssen vor der Verwendung in Wasser gelöst werden.

3.1.4. UHPLC-Anlage

Sämtliche Messungen wurden auf einer Agilent 1290 Infinity LC System UHPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) durchgeführt. Diese bestand aus einem 1290 Autosampler mit Thermostat, Säulenofen, Photodiodendetektor, einer binären Pumpe sowie einem 1260 µ-Entgaser.

3.1.5. Laborgeräte

Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte und Anlagen

Name	Hersteller	Verwendung
1290 DAD	Agilent Technologies (Waldbonn)	Photodiodendetektor
1290 TCC	Agilent Technologies (Waldbonn)	Säulenofen
1290 Autosampler	Agilent Technologies (Waldbonn)	Probenaufbewahrung und Probeninjektion

1290 Binary pump	Agilent Technologies (Waldbronn)	UHPLC-Fließmittelpumpe
1260 μ -Degasser	Agilent Technologies (Waldbronn)	Fließmittelentgasung
Biofuge pico®	Heraeus Instruments (Hanau)	Mikroliterzentrifuge
Megafuge® 2.0R	Heraeus Instrumnets (Hanau)	Zentrifuge
Sonorex® Super RK106	Bandelin (Berlin)	Ultraschallbad
Analysenwaage BP211D	Sartorius (Göttingen)	Einwaagen bis 210g, Ablesbarkeit: 0,01 mg
Feinwaage 1712	Sartorius (Göttingen)	Einwaagen bis 30g, Ablesbarkeit: 0,01 mg
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf (Hamburg)	Kolbenhubpipetten für Volumina zwischen 10 und 1000 μ l
Reax-Top®	Heidolph (Schwabach)	Reagenzglasschüttler
Arium® Basic	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen)	Reinstwassersystem zur Wasseraufbereitung
Vortex Genie® 2	Scientific Industries (Bohemia, NY)	Vortexer zur Mischung/Homogenisierung von Proben
Vakuumkammer	Waters (Eschborn)	Steckplätze für SPE Kartuschen zur Probeaufbereitung
Vakuumpumpe DOA-V130-BN	Gast (Redditch, UK)	Absaugen der Proben durch die SPE Kartuschen per Vakuum
Oasis® Sep-Pak-Vac Kartuschen (3cc/500mg)	Waters (Eschborn)	SPE Kartuschen zur Aufreinigung des Poolserums
Blue Line pH 14	SI Analytics (Mainz)	pH-Elektrode
Filtrivial 0,2 und 0,45 μ m Nylon	BISCHOFF Analysetechnik (Leonberg)	Filtrivial mit Nylonfilter zur Probenaufbereitung
Filtrivial 0,2 μ m, PTFE	BISCHOFF Analysetechnik (Leonberg)	Filtrivial mit Polytetrafluorethylenfilter zur Probenaufbereitung

3.1.6. Säulen

Sämtliche Messungen von Patientenproben wurden mit einer Poroshell 120 EC-C18, 3x50 mm, 2,7 μ m, welcher eine UHPLC guard column, EC-C18, 3x5 mm, 2,7 μ m, als Vorsäule vorgeschaltet war, durchgeführt. Folgende Säulen wurden im Rahmen der Methodenentwicklung verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Säulen und Vorsäulen im Rahmen der Methodenentwicklung und Messungen

Säule	Dimension (Durchmesser/Länge) [mm]	Partikelgröße [μm]	Hersteller
Poroshell 120 EC-C18	3 x 50	2,7	Agilent Technologies (Waldbronn)
Poroshell 120 EC-C18	3 x 100	2,7	Agilent Technologies (Waldbronn)
UHPLC Guard EC-18	3 x 5	2,7	Agilent Technologies (Waldbronn)
Fortis C18	2,1 x 50	1,7	Fortis Technologies (Cheshire, UK)
Fortis Cyano	2,1 x 50	1,7	Fortis Technologies (Cheshire, UK)
Nucleosshell RP18 plus	3 x 100	2,7	Machery-Nagel (Dü- ren)

3.1.7. Chemikalien

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien für Herstellung von Fließmittel und Probenvorbereitung

Name	Hersteller
Acetonitril, HPLC grade	Merck (Darmstadt)
Ameisensäure, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Isopropanol, HPLC grade	Merck (Darmstadt)
Methanol, HPLC grade	Merck (Darmstadt)

3.1.8. Arzneistoffe

Tabelle 9: Liste der verwendeten Arzneistoffe für die Verwendung zur Interferenzmessung oder Kalibratoren

Name	Hersteller/Lieferant
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Alprazolam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Amantadin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Amisulprid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Amitriptylinoxid	Sanofi Aventis (Frankfurt am Main)
Amlodipinbesilat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Apixaban	Hölzel Diagnostika (Köln)
Aripiprazol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Asenapinmaleat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Benperidol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biperiden-HCl	Abbott (Darmstadt)
Bisoprololhemifumarat	Merck (Darmstadt)
Bromazepam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Bupropion	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Buspiron-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chlordiazepoxid-HCl	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
10-OH-Carbamazepin	Novartis (Basel)
Carbamazepin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloprothixen-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cisaprid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Citalopram	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Clobazam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Clomipramin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Clozapin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Clozapin-N-Oxid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dabigatran	Hölzel Diagnostika (Köln)
Dabigatranetexilat	Hölzel Diagnostika (Köln)
Desimipramin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Desmethylvenlafaxin	Wyeth (Dallas, USA)
Dextran T-500	Pharmacia Biotech (Uppsala, SWE)
Diclofenac-Natrium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dihydrocodeintatrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Doxepin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Duloxetin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Edoxaban	Hölzel Diagnostika (Köln)
Enalaprilmaleat	LKT-Laboratories (St.Paul, USA)
Escitalopram	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Estradiol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fluoxetin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fluperlapin	Biotrend (Köln)
Fluphenazindecaonat	Altana Pharm (Wesel)
Fluvoxamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Furosemid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gabapentin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Galantamin	Janssen-Cilag (Neuss)
Glimepirid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydrochlorothiazid	LKT-Laboratories (St. Paul, USA)
Imipramin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Koffein	Caelo (Hilden)
Lactulose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lamotrigin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Levodopa	LKT-Laboratories (St. Paul, USA)
Levomepromazin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lorazepam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Maprotilin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Memantin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Metformin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methylrisperidon	Janssen-Cilag (Neuss)
Metoprololtatrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Mianserin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Mirtazapin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nateglinid	Novartis (Basel)
N-Desmethylclozapin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

N-Desmethylolanzapin	Chem Lab (Zedelgem, BE)
N-Desmethylquetiapin	Astra Zeneca (Wedel)
Nitrazepam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Norclomipramin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nordiazepam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Nordoxepin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nortryptilin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Olanzapin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Omeprazol	LKT-Laboratories (St.Paul, USA)
Oxazepam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Oxcarbazepin	Novartis (Basel, CH)
Paliperidon	Janssen-Cilag (Neuss)
Pantoprazol	Altana Pharma (Wedel)
Paroxetin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Perazin	Altana Pharma (Wesel)
Phenprocoumon	Hözel Diagnostika (Köln)
Phenytoin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipamperon	Janssen-Cilag (Neuss)
Pirenzepin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pregabalin	Pfizer (Freiburg)
Primidon	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Promethazin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Propanolol-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Quetiapinfumarat	Astra Zeneca (Wedel)
Ramipril	LKT-Laboratories (St. Paul, USA)
Reboxetin	Pfizer (Freiburg)
Risperidon	Janssen-Cilag (Neuss)
Rivaroxaban	Bayer (Leverkusen)
Rivastigmin-HCl	Novartis (Basel, CH)
Sertralin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sultiam	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sumatriptan	GlaxoSmithKline (Durham, UK)
Testosteron	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Theobromin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Theophyllin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Topiramat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triamcinolonacetonid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triamteren	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triazolam	Apotheke des Universitätsklinikums (Regensburg)
Trimipramin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Venlafaxin-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Warfarin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ziprasidon	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Zopiclon	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Zuclopentixol	Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.9. Software

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde Chromeleon® 6.80 (Thermo Fisher, Germering) verwendet. Zur Textbearbeitung und Erstellung von Tabellen wurde Microsoft Office 2016 sowie Microsoft Excel 2016 (beide Microsoft, Unterschleißheim) verwendet. Grafiken wurden mit Microsoft Excel und SciDavis erstellt. Die chemischen Strukturformeln wurden mit ChemDraw (Perkin Elmer, Waltham, USA) gezeichnet. Die Erstellung von Befunden erfolgte über die Internetbasierte Plattform KONBEST (www.konbest.de, PSIAC GmbH, Mainz).

3.1.10. Statistik

Sofern nicht anders angegeben erfolgt die Darstellung der Daten als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD).

3.2. Validierung

Die Validierung einer analytischen Methode ist erforderlich um ihre Tauglichkeit für das vorgesehene Einsatzgebiet sicherzustellen.

Die nachfolgenden Validierungspunkte wurden in Anlehnung an die Richtlinien der GTFCH (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie)⁵² sowie der ICH (International conference on Harmonisation)⁵³ unter Beachtung der Grenzwerte nach DIN 32645 (Deutsches Institut für Normung) durchgeführt. Messpunkte der Stabilitätsuntersuchungen wurden für die im unserem Labor übliche Verweildauer der Proben gewählt.

Die Wartung der UHPLC-Anlage erfolgte über die Firma Agilent (Waldbronn), in einjährigem Turnus, durch einen Servicetechniker.

Folgende Punkte wurden untersucht:

3.2.1. Linearität der Kalibration

Unter Linearität einer Messmethode versteht man ihre Eigenschaft Messsignale zu erzeugen, die direkt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Analyten in der Probe sind⁵⁴.

3.2.1.1. Kalibrationsbereich

Der Kalibrationsbereich ist das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration des Analyten, für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden kann. Die Wahl des Bereiches sollte so gestaltet werden, dass zu erwartende Messwerte nicht ober- oder unterhalb des Intervalls liegen⁵⁴.

Es wurden sechs Kalibratoren mit unterschiedlichen Konzentrationen durch Zusatz des Analyten zu Poolserum hergestellt. Danach wurden acht Messungen der Kalibratoren durchgeführt. Anschließend wurde die Peakhöhe gegen die Konzentration grafisch aufgetragen. Daraus wurden Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Gemäß DIN 32645 ist $R^2 \geq 0.98$ zulässig.

3.2.2. Richtigkeit

Richtigkeit bezeichnet die Differenz zwischen Mess- und Sollwert. Sie kann als Maß des systematischen Fehlers bei einem Analyseverfahren betrachtet werden⁵⁴. Das Ausmaß dieser Abweichung wird oft als Bias ausgedrückt.

Die Qualitätskontrollen wurden vermessen und aus den einzelnen Messwerten der Mittelwert gebildet.

Als Sollwert wurde der Mittelwert der gemessenen Peakhöhen aus der Bestimmung des Kalibrationsbereiches verwendet. Anschließend wurde nach folgender Formel der Bias berechnet:

Formel 7: Formel zur Berechnung des Bias

$$\text{Bias [%]} = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100$$

\bar{x} : Mittelwert der Qualitätskontrollen, μ : Sollwert

Nach DIN 32645 sind Bias-Werte von $\pm 15\%$ akzeptabel, in der Nähe der Bestimmungsgrenze werden zusätzlich Werte von $\pm 20\%$ als zulässig gesehen.

3.2.3. Präzision

Beschreibt die Streuung von einzelnen Messwerten um den Mittelwert. Sie gibt die Auskunft über die zufällige Fehlerkomponente eines quantitativen Messverfahrens. Das Ausmaß wird oft als Impräzision ausgedrückt und wird als Variationskoeffizient (VC%) bzw. relative Standardabweichung angegeben⁵².

3.2.3.1. Impräzision innerhalb eines Laufes (intraday imprecision)

Hierbei wurden vier Messläufe unter gleichen Bedingungen innerhalb eines Tages durchgeführt. Dieser Vorgang wurde an fünf weiteren Tagen wiederholt. Die Impräzision ergab sich aus dem Variationskoeffizienten des Messtages der die höchsten Schwankungen innerhalb der Messgänge hatte.

Die Messung erfolgte mit den aufgetauten Qualitätskontrollen in drei verschiedenen Konzentrationen. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Messungen innerhalb eines Tages war gleichmäßig verteilt.

Nach DIN 32645 gilt $VC \leq 15\%$ als akzeptabel. Nahe der Bestimmungsgrenze ist auch $VC \leq 20\%$ ausreichend.

3.2.3.2. Impräzision zwischen verschiedenen Messtagen (interday imprecision)

Hierfür wird dieselbe Probe an fünf aufeinanderfolgenden Tagen unter gleichen Bedingungen gemessen. Die einzige sich verändernde Variable ist der Zeitpunkt der Messung, in diesem Falle der Tag. Dieser Punkt gibt Aussage über die Laborpräzision.

Die Vermessung der Qualitätskontrollen erfolgte aus derselben Probe viermal innerhalb eines Tages. Die Abstände zwischen den Messungen wurden über den Tag gleichmäßig verteilt. Diese Prozedur wurde an fünf weiteren Tagen unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Nach DIN 32645 gilt $VC \leq 15\%$ als akzeptabel. Nahe der Bestimmungsgrenze ist auch $VC \leq 20\%$ ausreichend.

3.2.4. Stabilität

Die Stabilität gibt Auskunft über die Zersetzung bzw. Abbau eines Analyten in einer Matrix unter äußeren Einflüssen über einen bestimmten Zeitraum. Die Stabilität sollte vom Zeitpunkt der Probenentnahme bis zum Abschluss der Analyse gewahrt sein⁵².

Es wurden drei Chargen von Qualitätskontrollen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (40, 150 und 300 ng/ml) hergestellt. Die Proben wurden direkt vermessen und die Peakhöhe als Referenzwert zum Zeitpunkt t=0 festgelegt. Anschließend wurde eine Charge bei Raumtemperatur (25°C), eine im Kühlschrank (8°C) und eine im Gefrierschrank gelagert (-20°C). Vermessung der Proben, die bei Raumtemperatur und im Kühlschrank gelagert sind, erfolgte nach 24, 48, 72 Stunden; 5, 7 und 14 Tagen; 1, 3 und 6 Monaten. Die Vermessung der gefrorenen Proben erfolgte nach 1, 3 und 6 Monaten.

Anschließend wurden die Peakhöhen aller Messungen in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Als maximale tolerierbare Abnahme der Konzentration sind Werte von 15% zu sehen. Nahe der Bestimmungsgrenze ist auch eine Abnahme von bis zu 20% akzeptabel

3.2.4.1. Einfrier- und Auftaustabilität

Hierbei soll die Stabilität der Proben nach mehrmaligem Einfrieren und anschließendem Auftauen getestet werden. Somit kann sichergestellt werden, dass die Lagerung unterhalb des Gefrierpunktes nicht den Abbau beschleunigt.

Drei Qualitätskontrollen der Konzentrationen 40, 150 und 300 ng/ml wurden aufgetaut und danach wieder eingefroren. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Proben vermessen und mit den Kontrollwerten verglichen.

Nach DIN 32645 sind Werte die innerhalb von 90-110% des Kontrollwerts liegen akzeptabel.

3.2.5. Analytische Grenzwerte

3.2.5.1. Nachweisgrenze (limit of detection, LOD)

Unter der Nachweisgrenze versteht man die Konzentration, die noch sicher vom Nullwert sowie zufälligen methodenbedingten Störsignalen unterschieden werden kann.

Die Bestimmung erfolgte nach Alternative 1 DIN 32645⁵². Die Berechnung wurde mit Hilfe des Programmes DINTEST durchgeführt.

Es wurden sechs Kalibratoren mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (20, 40, 75, 150, 200 und 300 ng/ml). Diese wurden im Anschluss acht Mal vermessen und die Mittelwerte der Peakhöhen gegen die Konzentration aufgetragen. Es wurde von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ausgegangen.

Über folgende Formel wurde nun die Nachweisgrenze ermittelt.

Formel 8:Berechnung des LOD nach DIN 32645

$$X_{NG} = s_{x_0} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}}{Q_x}}$$

X_{NG}=Nachweisgrenze nach DIN 32645

s_{x0}=Verfahrensstandardabweichung

t=Quantil der t-Verteilung

α =Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art

m=Anzahl der Wiederholbestimmungen je Konzentration

n=Anzahl der Kalibrationspunkte

\bar{X} =Mittelwert der Gehaltsgrößen

Q_x=Summe der Abweichungsquadrate

3.2.5.2.Bestimmungsgrenze (limit of quantification LOQ)

Die niedrigste Konzentration eines Analyten die mit akzeptablen Bias ($\pm 20\%$) und Impräzision ($\leq 20\%$) bestimmt werden kann. Grundsätzlich wird eine relative Ergebnisunsicherheit von 33% angenommen.

Die Bestimmung erfolgte nach Alternative 1 DIN 32645⁵². Die Berechnung wurde mit Hilfe des Programmes DINTEST durchgeführt.

Es wurden sechs Kalibratoren mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (20, 40, 75, 150, 200 und 300 ng/ml). Diese wurden im Anschluss acht Mal vermessen und die Mittelwerte der Peakhöhen gegen die Konzentration aufgetragen. Es wurde von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ausgegangen.

Über folgende Formel wurde nun die Bestimmungsgrenze ermittelt:

Formel 9: Berechnung des LOQ nach DIN 32645

$$X_{EG} = k \times s_{x_0} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{((k \times X_{NG}) - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

X_{EG} =Erfassungsgrenze nach DIN 32645

X_{NG} =Nachweisgrenze nach DIN 32645

s_{x_0} =Verfahrensstandardabweichung

k = kritischer Messwert der Messgröße

t =Quantil der t-Verteilung

α =Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art

m =Anzahl der Wiederholbestimmungen je Konzentration

n =Anzahl der Kalibrationspunkte

\bar{X} =Mittelwert der Gehaltsgrößen

Q_x =Summe der Abweichungsquadrate

3.2.6. Wiederfindung

Nach Definition ist die Wiederfindung der komplette Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessenden Lösung⁵⁴.

Der Vergleich erfolgte zwischen Analyt im Lösungsmittel und Analyt in aufgearbeiteter Probe (hier Proteinfällung mit Methanol).

Es wurden vier Proben mit jeweils niedriger (10 ng/ml) und hoher Konzentration (75 ng/ml) durch Verdünnung der Stammlösung mit Methanol hergestellt und vermessen. Zusätzlich wurden vier Serumproben mit jeweils niedriger (40 ng/ml) und hoher Konzentration (300 ng/ml) hergestellt und nach Proteinfällung mit Methanol (1/3 Vol/Vol) vermessen. Die Wiederfindung ergibt sich aus dem Verhältnis der Peakhöhen der aufgearbeiteten Proben zu den Peakhöhen der Lösungsmittelproben unter Berücksichtigung der Verdünnung der aufbereiteten Probe.

3.2.7. Robustheit

Die Robustheit trifft Aussage über den Einfluss und Ausmaß bei gezielter Veränderung von Parametern, wie Temperatur und Fließmittelzusammensetzung, einer Methode.

Es wurden Messläufe mit Proben durchgeführt und die Parameter Temperatur (30, 35, 40, 45°C) und Fließmittel (Zusatz von 0,05% und 0,2% Ameisensäure) verändert. Anschließend wurden die Retentionszeiten der Analyten zwischen den unterschiedlichen Methoden verglichen.

3.2.8. Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metabolite, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren⁵².

Es wurden 103 verschiedene Arzneistoffe in Lösungsmittel gelöst und unter gleichen Analysebedingungen vermessen. Anschließend wurden die Retentionszeiten der Substanzen notiert und mit den zu bestimmenden Analyten der Methode verglichen um mögliche Überlagerungen zu entdecken. Es sollten möglichst wenige Interferenzen auftreten.

3.3. Werkzeuge für das TDM der direkten oralen Antikoagulanzien

3.3.1. Dosisbezogener Referenzbereich

Um die gemessenen Konzentrationen patientenbezogen zu interpretieren wurde der dosisbezogene Referenzbereich für die einzelnen Wirkstoffe und zugelassenen Dosierungen berechnet. Aus der Literatur ergaben sich für die totale Clearance (Cl_{total}), inklusive Standardabweichung, sowie die Bioverfügbarkeit (F) folgenden Werte: $Cl_{total} = 3,05 \pm 0,91 \text{ l/h}$ und $F = 0,5$ für Apixaban, $Cl_{total} = 10,8 \pm 2,20 \text{ l/h}$ und $F = 0,06$ für Dabigatran, $Cl_{total} = 21,8 \pm 3,03 \text{ l/h}$ und $F = 0,63 \pm 0,13$ für Edoxaban sowie $Cl_{total} = 7,51 \pm 1,06 \text{ l/h}$ und $F = 0,8-1$ für Rivaroxaban^{15,17,22,27}.

Zusätzlich wurde der dosisbezogene Referenzbereich für die Talkonzentration berechnet und mit dem dosisbezogenen Referenzbereich für die mittlere Tageskonzentration verglichen.

3.3.2. ATEC

Außerdem wurden aus der höchsten und der niedrigsten Konzentration der jeweiligen dosisbezogenen Referenzbereiche ein Bereich gebildet der als ATEC (assumed therapeutically effective concentrations) definiert wird⁵⁵. Dieser dient als vorläufiger Ersatz für den therapeutischen Referenzbereich.

3.4. Anwendungsbeobachtung

Zusammen mit dem Klinikum Nürnberg Nord wurde eine Anwendungsbeobachtung mit dem Titel „Anwendungsbeobachtung der Wirkstoffkonzentrationen von direkten oralen Antikoagulanzien (Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban) im Blut“ geplant. Die Anwendungsbeobachtung wurde der Ethikkommission der Universität Regensburg vorgelegt und erhielt am 20.04.2016 von selbiger eine zustimmende Bewertung für die Durchführung.

Im folgenden Abschnitt ist die Anwendungsbeobachtung dargelegt. Formulare der Anwendungsbeobachtung, sowie das Votum der Ethikkommission sind im Anhang am Ende dieser Arbeit hinterlegt.

3.4.1. Ziele der Anwendungsbeobachtung

Ziel dieser Anwendungsbeobachtung ist, die interindividuelle Streuung der Konzentrationen der direkten oralen Antikoagulanzien im pharmakokinetischen Gleichgewicht zu dokumentieren und an Hand des dosisbezogenen Referenzbereiches und des klinisch-pharmakologischen Befundes die Ursachen abzuklären (primäres Ziel).

Als sekundäres Ziel der Anwendungsbeobachtung wird das Auftreten von unerwünschten Blutungen und das Auftreten von Thrombosen und Embolien dokumentiert. Der für die in den einzelnen Fachinformationen empfohlenen Dosierungen berechnete dosisbezogene Referenzbereich gilt zunächst als „vorläufiger therapeutischer Referenzbereich“ des jeweiligen Wirkstoffes und spiegelt die augenblickliche klinische Situation wider. Die Anwendungsbeobachtung soll als Pilotstudie die Basis für eine spätere Ermittlung der optimal wirksamen Wirkstoffkonzentrationen (therapeutischer Referenzbereich) liefern.

3.4.2. Ethische Bedenken

Aus klinischer und wissenschaftlicher Sicht ist diese Anwendungsbeobachtung notwendig, um die Pharmakotherapie bei Patienten, bei denen eine orale Antikoagulation indiziert ist,

in Zukunft auf die individuellen Bedürfnisse des einzelnen Patienten anpassen zu können. Möglicherweise können die teilnehmenden Patienten von der Messung ihrer Wirkstoffkonzentration bereits während der Anwendungsbeobachtung profitieren, da etwaige Abweichungen der Konzentration dokumentiert werden und der behandelnde Arzt dann, wie bei jedem therapeutischen Drug Monitoring im Einzelfall entscheiden kann, ob die Dosis individuell angepasst wird.

Im Rahmen dieser Anwendungsbeobachtung werden nur Patienten beobachtet, bei denen ohnehin eine Behandlung mit oralen Antikoagulanzen vorgesehen ist. Die drei geplanten Blutabnahmen im Abstand von fünf Tagen mit einem Volumen von jeweils maximal 10 ml können beim Erwachsenen als unkritisch betrachtet werden. Des Weiteren kann die begleitende Patientenbefragung, die bei den Visiten erfolgt, nicht als zusätzliche Belastung des Patienten angesehen werden. Ein aktiver Eingriff in die Therapie der Patienten ist nicht vorgesehen.

Die Patienten bzw. deren Betreuer werden vor ihrem Einschluss über den Zweck der Anwendungsbeobachtung aufgeklärt und haben zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit, von der Anwendungsbeobachtung zurückzutreten.

Ethische Bedenken gegen die Durchführung der Anwendungsbeobachtung bestehen folglich nicht.

3.4.3. Art der Anwendungsbeobachtung

Es handelt sich hierbei um eine unverblindete, dreiarmige klinisch-pharmakologische Anwendungsbeobachtung.

3.4.4. Patientenkollektiv

In die Anwendungsbeobachtung sollten in jeden Arm jeweils 27 Patienten, bei denen eine Behandlung mit Dabigatran, Rivaroxaban bzw. Apixaban indiziert ist, aufgenommen werden. Es wird mit einem Ausfall von 25 % (einem Viertel der Patienten) gerechnet, so dass am Ende in jedem Arm 20 Patienten auswertbar sein werden.

3.4.5. Einschlusskriterien

In die Anwendungsbeobachtung eingeschlossen werden

- Patienten die das 18. Lebensjahr vollendet haben
- Patienten bei denen eine Behandlung mit oralen Antikoagulanzien indiziert ist
- Patienten die bereits mit einem oralen Antikoagulant behandelt werden

3.4.6. Ausschlusskriterien

Von der Anwendungsbeobachtung ausgeschlossen werden:

- Patienten mit akuten, klinisch relevanten Blutungen
- Patienten, bei denen eine Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff festgestellt worden ist
- Patienten mit einer Kreatinin-Clearance < 15 ml/min
- Patienten mit einer Lebererkrankung, die mit einer Koagulopathie und einem klinisch relevanten Blutungsrisiko, einschließlich zirrhotischer Patienten mit Child Pugh B und C, verbunden ist.
- Patientinnen in der Schwangerschaft oder Stillzeit
- Patienten mit Läsionen oder in einer klinischen Situation, welche als signifikantes Risiko für eine schwere Blutung angesehen wird

3.4.7. Comedikation

Eine Comedikation mit Medikamenten, die nicht in der Liste der Ausschlusskriterien genannt werden, ist zulässig und führt nicht zu einem Ausschluss von der Anwendungsbeobachtung. Die Begleitmedikation sowie Änderungen der Begleitmedikation müssen jedoch dokumentiert werden.

3.4.8. Ausscheiden aus der Anwendungsbeobachtung

Ein Patient scheidet aus der Anwendungsbeobachtung aus, wenn mindestens eine der folgenden Kriterien erfüllt wird:

- Zurücknahme der Einverständniserklärung
- Absetzen der antikoagulativen Therapie
- Nachträgliche Erfüllung von einen oder mehreren Ausschlusskriterien

3.4.9. Ärztliche Betreuung der Patienten

Die Patienten werden auch während der Anwendungsbeobachtung von ihrem jeweiligen zuständigen Arzt betreut. Nur er entscheidet über alle therapeutischen Maßnahmen und führt die Therapie so, wie er sie auch ohne die Anwendungsbeobachtung führen würde.

3.4.10. Patientenaufklärung

Die Patienten werden vor Aufnahme in die Anwendungsbeobachtung über Sinn und Zweckmäßigkeit dieser Anwendungsbeobachtung aufgeklärt. Es muss ein schriftliches Einverständnis mit Angabe des Datums gegeben werden. Ein Rücktritt von der Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung ist zu jedem Zeitpunkt ohne Nennung von Gründen möglich. Ein Muster der Einverständniserklärung und der Patientenaufklärung befinden sich im Anhang dieses Protokolls.

3.4.11. Vergütung der Teilnehmer

Eine Vergütung für die Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung ist nicht vorgesehen.

3.4.12. Ort der Untersuchungen

Die Untersuchung der Teilnehmer wird grundsätzlich stationär durchgeführt.

3.4.13. Prüfplan

Bei der Erstvisite (V1) wird der Patient über die Anwendungsbeobachtung aufgeklärt und hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Blutdruck und Puls werden dokumentiert, unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) werden erfragt und durch die körperliche Untersuchung abgeklärt, falls diese bereits durch die Comedikation bestehen.

Die Patienten werden nach Erklärung ihres Einverständnisses mit Stellung der Indikation für eine Therapie mit oralen Antikoagulanzien oder bei bereits bestehender Therapie mit einem oralen Antikoagulant in die Anwendungsbeobachtung eingeschlossen und weiterhin nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft versorgt.

Bei Neueinstellung werden die Patienten, je nach Indikation und Erkrankung, auf die in der Fachinformation empfohlenen Dosis des vom behandelnden Arzt gewählten oralen Antikoagulanz eingestellt. Die Therapie wird wie üblich fortgesetzt, Dosisänderungen werden vom behandelnden Arzt nach seiner klinischen Beurteilung vorgenommen.

Am Tag vor der ersten Einnahme des oralen Antikoagulanz sowie an Tag drei und am Tag fünf der Therapie werden morgens vor der nächsten Tabletteneinnahme 10 ml venöses Vollblut in ein mit Kügelchen (kein Gel!) vorbereitetes Serumröhrchen (z.B. S-Monovette 7,5ml Z, Sarstedt 01.1601) abgenommen. Basierend auf dem klinisch-pharmakologischen Befund kann der behandelnde Arzt nach jeder Dosisänderung und nach Änderung der Comedikation weitere Wirkstoffkonzentrationsbestimmungen anfordern.

Patienten, deren Angehörige und das Pflegepersonal sind aufgefordert, jeden Hinweis auf eine ungewollte Blutung oder auf eine Thrombose und/oder Embolie zu dokumentieren (Dokumentationsbogen in der Anlage).

Mit Entlassung aus dem Krankenhaus endet die Anwendungsbeobachtung. Bei der Entlassungsuntersuchung werden nochmals Blutdruck, Puls und Körpertemperatur dokumentiert, unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) werden erfragt und durch die körperliche Untersuchung abgeklärt.

3.4.14. Laboruntersuchungen

Das Vollblutröhrchen wird zusammen mit dem Anforderungsbogen an das Labor der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg geschickt. Nach Abzentrifugieren erfolgt dort die Wirkstoffkonzentrationsbestimmung aus Serum. Die Auf trennung des Serums erfolgt mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), die Detektion mittels UV-Photometrie und die Quantifizierung mit Hilfe eines externen Standards. Die Methode ist im Labor der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg validiert.

Das Ergebnis wird als Messwert zusammen mit Angabe des dosisbezogenen Referenzbereiches, des vorläufigen therapeutischen Referenzbereiches und dem klinisch-pharmakologischen Befund rückgemeldet.

3.4.15. Dokumentation und Auswertung

Die Messwerte und Ergebnisse werden in dafür geeignete Formulare eingetragen. Die anschließende Auswertung erfolgt durch die beteiligten Wissenschaftler.

Die Wirkstoffkonzentrationen werden gesondert für alle Teilnehmer erfasst und in Korrelation zur Dosis gesetzt.

3.4.16. Veröffentlichung der Ergebnisse

Die Veröffentlichung der erhaltenen Ergebnisse ist ihm Rahmen einer Doktorarbeit, auf nationalen sowie internationalen Kongressen und in Fachzeitschriften angedacht.

3.4.17. Zustimmung der Ethikkommission

Die Durchführung der Anwendungsbeobachtung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, in ihrer Sitzung vom 20.04.2016, zustimmend bewertet. Es bestehen keine berufsethischen oder rechtlichen Einwände gegen die Anwendungsbeobachtung.

3.4.18. Auftraggeber

Auftraggeber der Anwendungsbeobachtung ist die Klinische Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Beteiligte Mitarbeiter und Prüfzentren:

Apotheker Sebastian Böhr

Doktorand in der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen

Leiter der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Dr. med. Reinhold Waimer

Oberarzt in der Gerontopsychiatrie der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Klinikum Nürnberg Nord.

3.4.19. Finanzierung

Die Anwendungsbeobachtung wird über das Drittmittelkonto 3725913 der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg finanziert.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche für die Methodenentwicklung

4.1.1. UV-Detektion

Zuerst wurden Apixaban, Dabigatran, Dabigatranetexilat und Rivaroxaban einzeln vermessen um die jeweiligen UV-Spektren zuordnen zu können und die Maxima zu bestimmen, bei denen die Detektion erfolgen sollte. Aufgrund der Spektren entschieden wir uns Apixaban bei 280 nm, Dabigatran bei 294 nm, Dabigatranetexilat bei 340 nm und Rivaroxaban bei 249 nm zu detektieren.

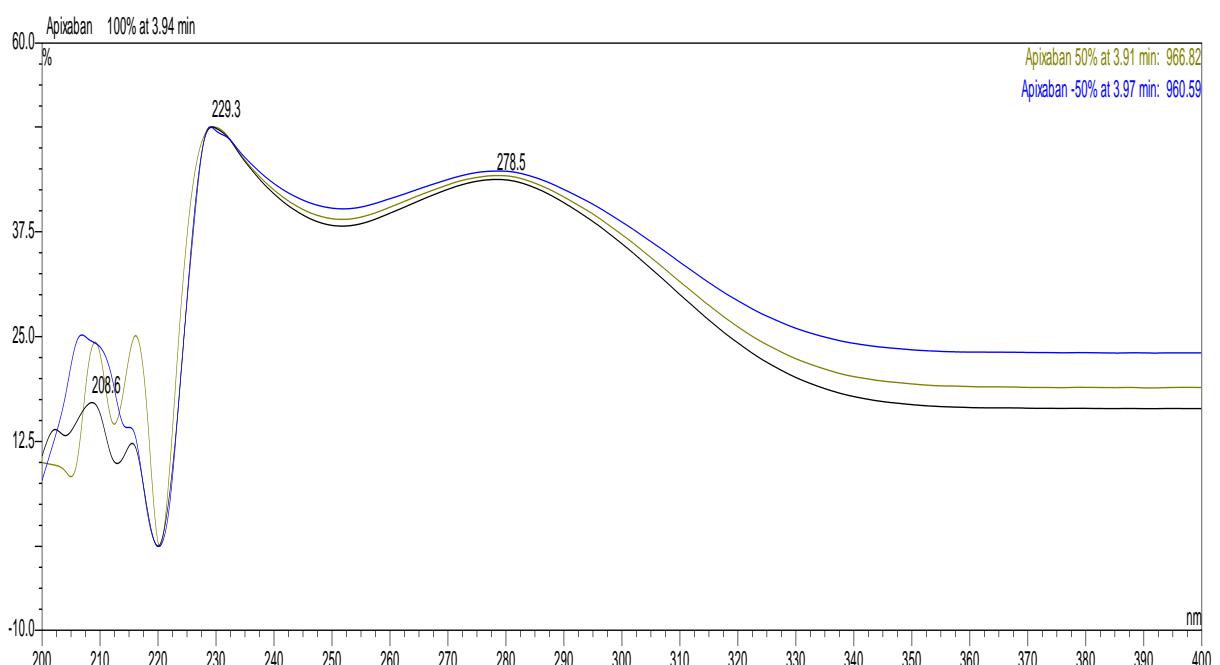


Abbildung 10: UV-Spektrum Apixaban

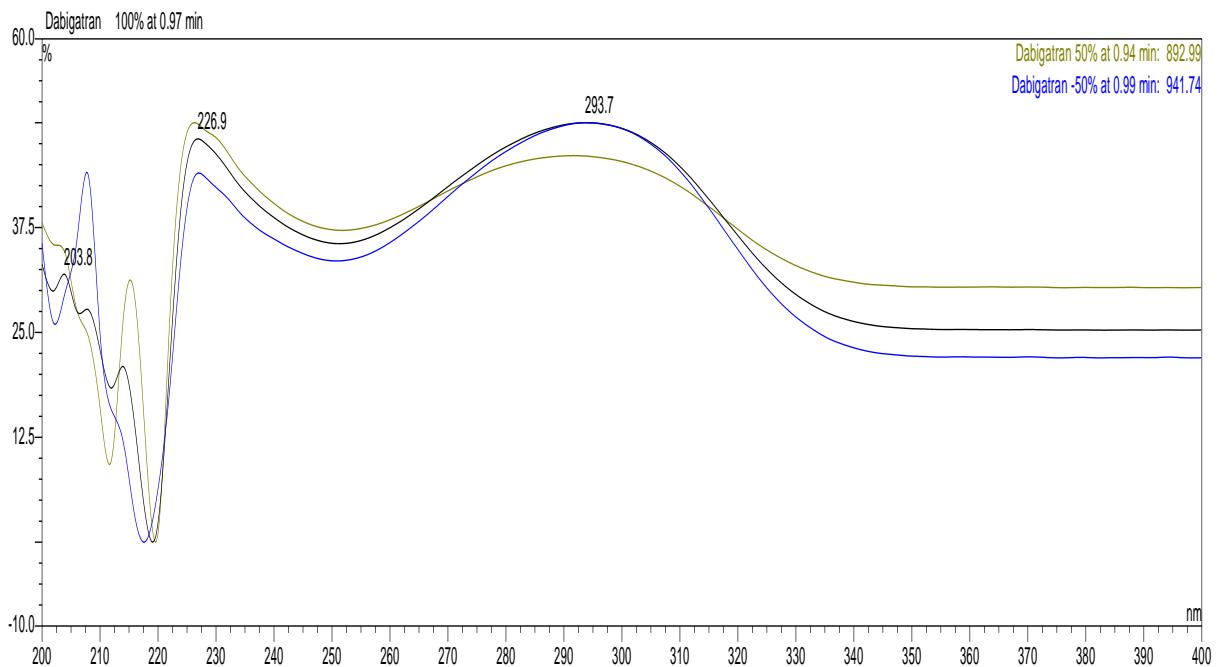


Abbildung 11: UV-Spektrum Dabigatran

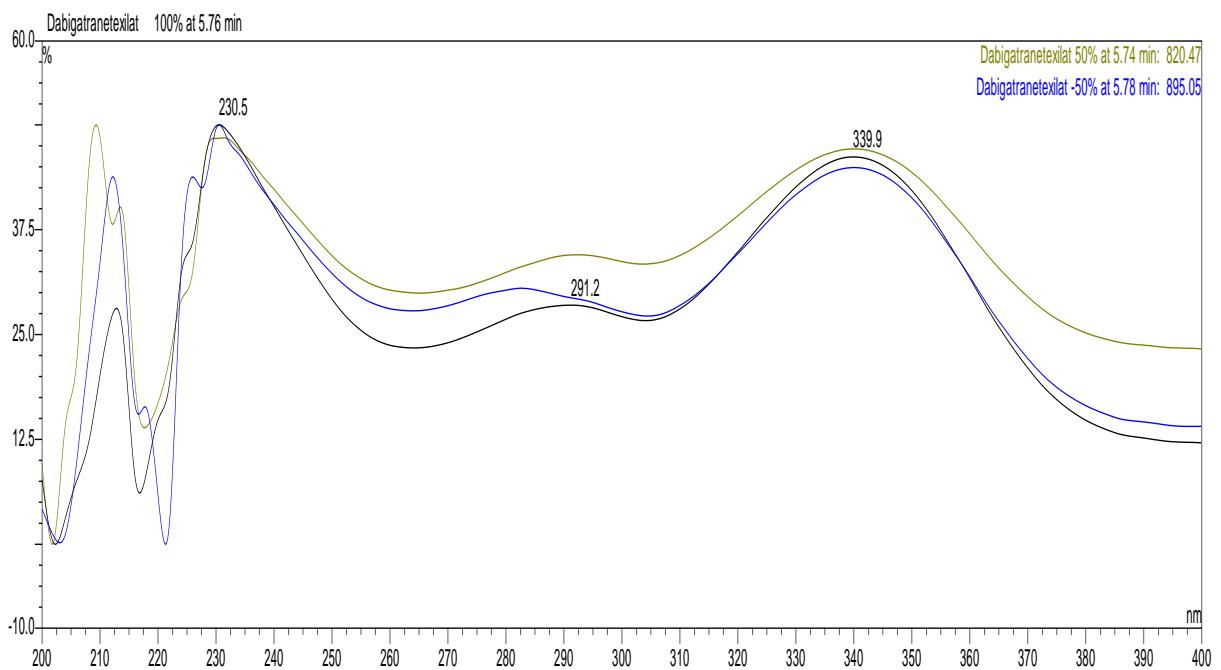


Abbildung 12: UV-Spektrum Dabigatranetexilat

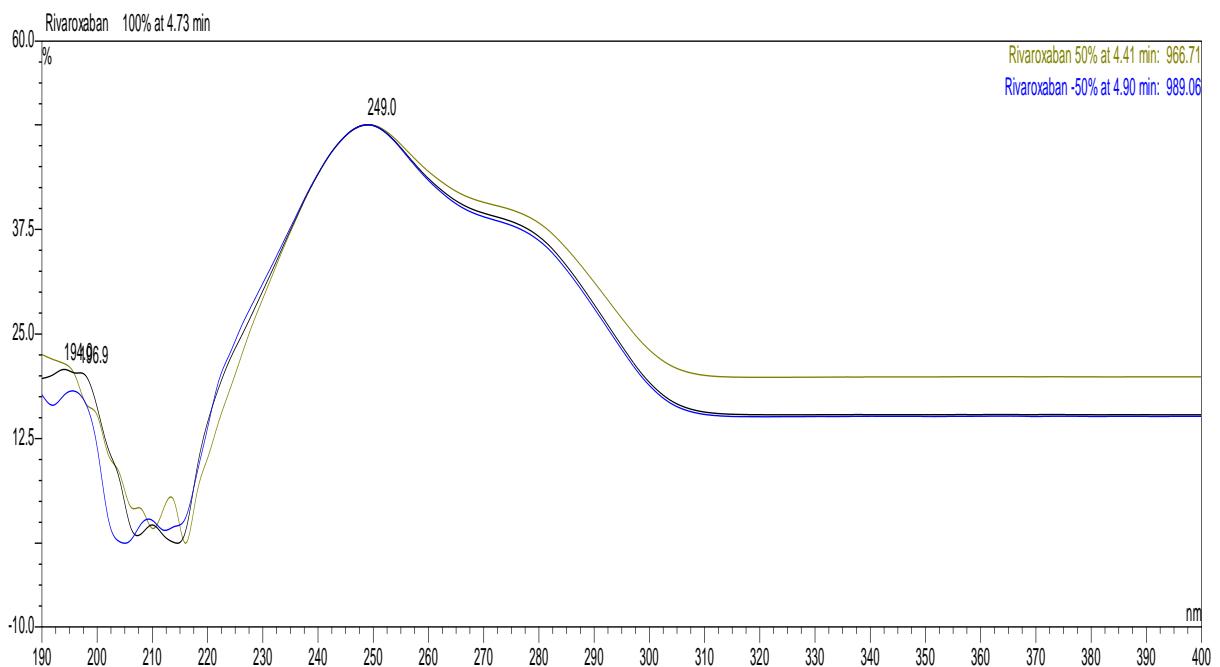


Abbildung 13: UV-Spektrum Rivaroxaban

4.1.2. Säulenwahl

Neben der Poroshell 120 C-18, 50x3,0 mm auf der alle Messungen durchgeführt worden sind, wurde zusätzlich die Auftrennung auf anderen Säule getestet. Der Gradient war bei allen folgenden Chromatogrammen der gleiche. [A] Wasser und [B] MeOH; Start bei [B] 10% über 6 min auf [B] 30%.

Fortis Cyano 1,7 µm, 50x2,1 mm

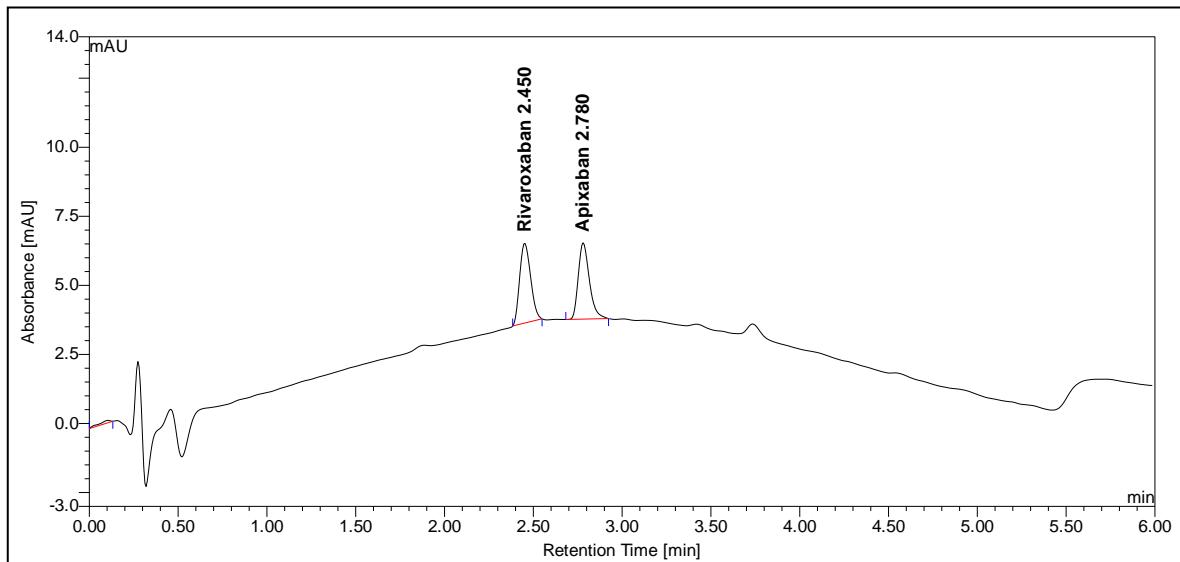


Abbildung 14: Chromatogramm von Apixaban und Rivaroxaban der Fortis Cyano Säule bei $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μl , Säule: Fortis Cyano 1,7 μm , 50x2,1 mm

Hier konnten Apixaban und Rivaroxaban gut getrennt werden. Dabigatran konnte hier trotz der hydrophilen Bedingungen nicht detektiert werden.

Fortis C-18 1,7 µm, 50x2,1 mm

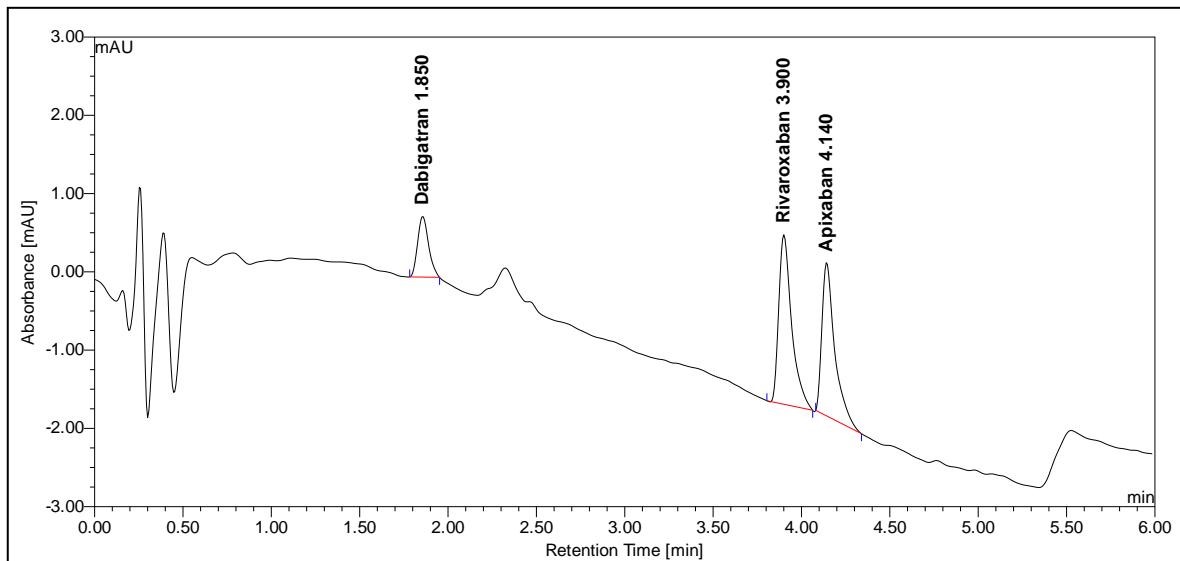


Abbildung 15: Chromatogramm von Dabigatran, Apixaban und Rivaroxaban auf Fortis C18 Säule bei $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μl , Säule: Fortis C-18 1,7 μm , 50x2,1 mm

Hier konnten alle drei Substanzen getrennt werden. Jedoch war die Trennung zwischen Rivaroxaban und Apixaban leicht schlechter als bei der Poroshell. Die Retentionszeiten waren bei 0,7 ml/min ähnlich.

Nucleoshell RP 18plus, 2,7 µm, 100x3 mm

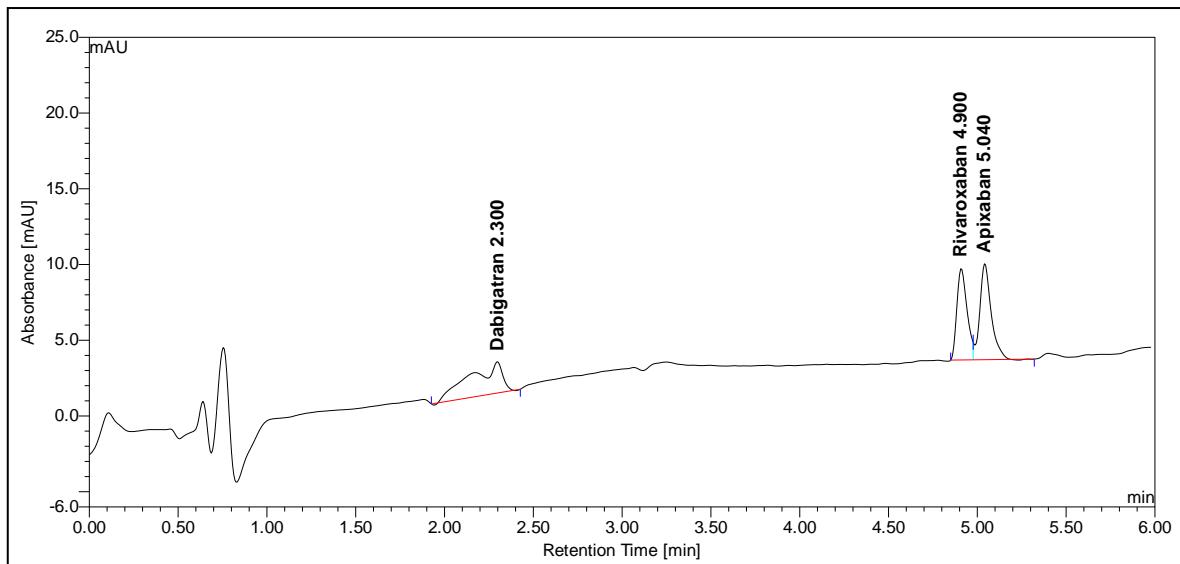


Abbildung 16: Chromatogramm der DOAKs auf der Nucleoshell+ Säule bei $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl, Säule: Nucleoshell RP 18plus, 2,7 µm, 100x3 mm

Hier konnten Apixaban und Rivaroxaban nicht vollständig getrennt werden, Dabigatran wurde detektiert, zeigte aber ungewöhnliche Peakverbreiterung bzw. Doppelpeaks. Retentionszeiten waren, auch bedingt durch die größere Säulenlänge, länger als im Vergleich zur Poroshell.

Letztendlich entschieden wir uns bei der Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm zu bleiben da keine merklichen Vorteile durch die anderen getesteten Säulen zu erkennen waren.

4.1.3. Fließgeschwindigkeit

Tabelle 10: Peakhöhen bei unterschiedlichen Flussraten auf Poroshell 120, EC-C18, 3,0x50 mm, 2,7 µm

Fließgeschwindigkeit [ml/min]	Peakhöhe Rivaroxaban [mAU]
0,5	7,40
0,6	7,72
0,7	7,74
0,8	6,90
0,9	6,61
1,0	6,29

Aus der Testung verschiedener Fließgeschwindigkeiten mit Rivaroxaban auf der Poroshell 120-Säule ergab sich ein Maximum der Peakhöhe bei einem Fluss von 0,7 ml/min.

4.1.4. Fließmittel

Wir starteten mit einem Gradienten aus [A] Wasser und [B] Acetonitril der über 7 min von [B] 10% auf [B] 70%, bei einer Flußrate von 0,7 ml/min, verlief. Zusätzlich enthielten beide Eluenten 0,1% Ameisensäure um eine Ionisation der Analyten zu gewährleisten.

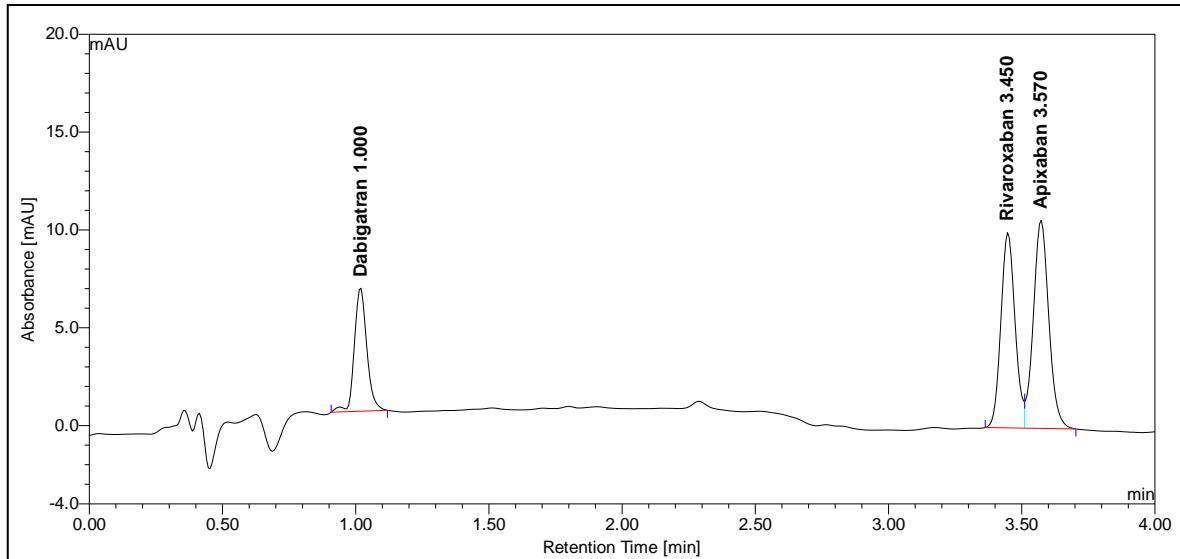


Abbildung 17: Chromatogramm DOAK bei ACN Gradient, $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl, Säule: Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm

Da hier keine Basislinientrennung von Apixaban und Rivaroxaban zu erreichen war, wechselten wir das Fließmittel [B] von Acetonitril zu Methanol.

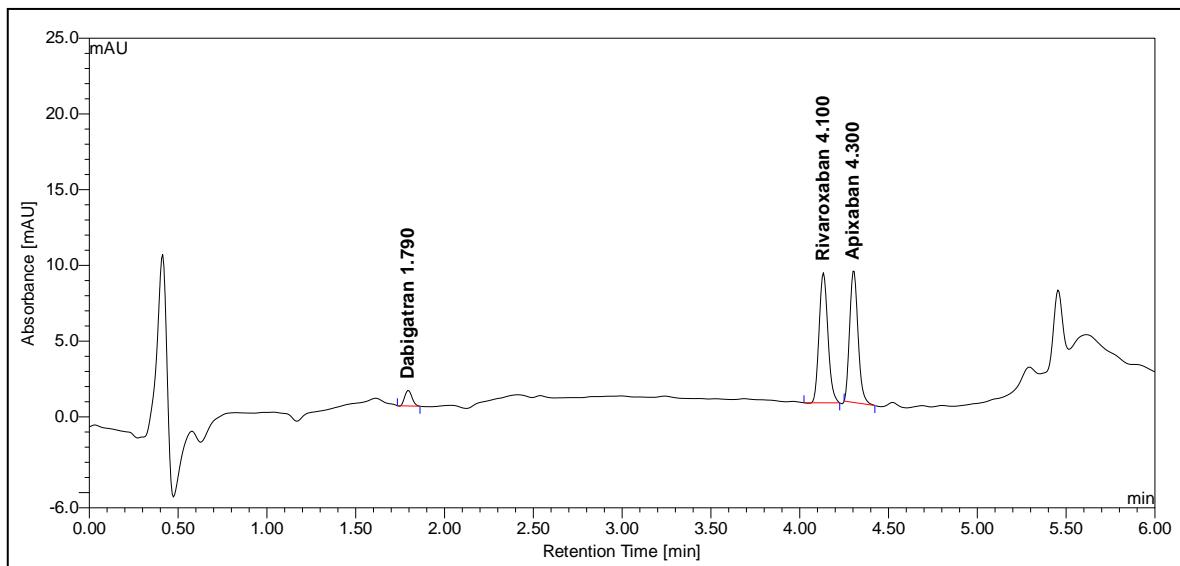


Abbildung 18: Chromatogramm DOAK mit MeOH Gradient, $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μl , Säule: Poroshell C18, 2,7 μm , 50x3 mm

Da die Peaks jetzt besser getrennt, jedoch die Retentionszeiten länger waren, wurde versucht durch Einfügen eines isokratischen Intervalls von [A] 50% [B] 50% ab 1,5 min bis 4,5 min die Auftrennung weiter zu optimieren.

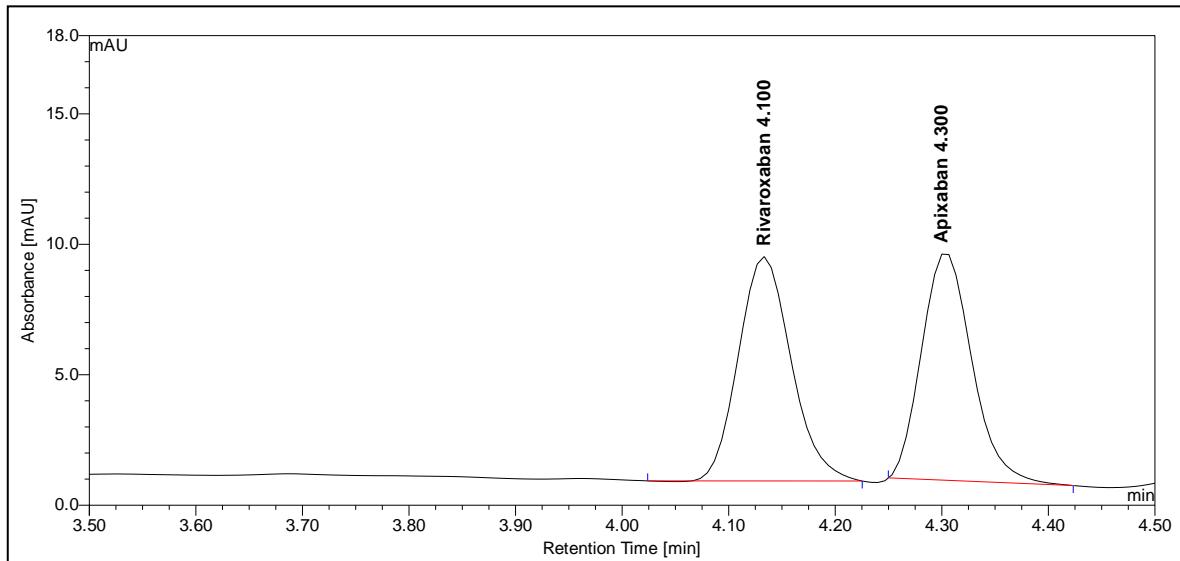


Abbildung 19: Trennung von Apixaban und Rivaroxaban mit reinen Wasser/MeOH Gradienten, $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μl , Säule: Poroshell C18, 2,7 μm , 50x3 mm

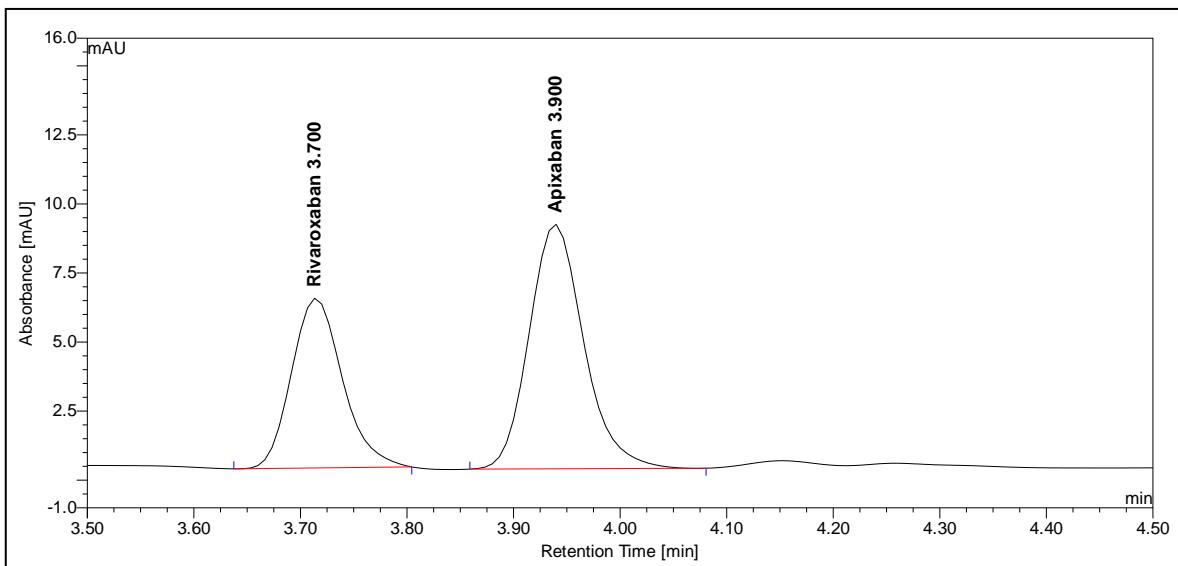


Abbildung 20: Trennung von Apixaban und Rivaroxaban mit Wasser/MeOH Gradienten mit zusätzlichem isokratischen Intervall, $c=1000 \text{ ng/ml}$, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μl , Säule: Poroshell C18, 2,7 μm , 50x3 mm

Hierdurch ließen sich die Retentionstzeiten von Rivaroxaban von 4,1 min auf 3,7 min und von Apixaban von 4,3 min auf 3,9 min verkürzen. Zusätzlich wurde die Peak trennung weiter verbessert (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20).

4.1.5. Probenaufarbeitung

Es wurde anfangs eine Proteinfällung mit Methanol und Acetonitril getestet. Um das optimale Verhältnis zwischen Fällungsreagenz und Probe zu finden, wurden 500 μl Poolserum mit 500 μl Fällungsreagenz versetzt, auf dem Vortexer für eine Minute durchmischt und anschließend für drei Minuten bei 16,060g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und erneut mit 500 μl Fällungsreagenz gemischt. Trat eine Trübung auf oder es war nach erneutem Zentrifugieren ein Pellet zu finden, wurde die Probe verworfen und der Versuchsansatz mit einer höheren Menge an Fällungsreagenz neu durchgeführt. Für Methanol war keine weitere Ausfällung von Serumbestandteilen bei einem Volumenverhältnis (Serum/Reagenz) von 1:3, für Acetonitril von 1:2 festzustellen. Zusätzlich wurde die Effizienz der Fällung in Abhängigkeit der Temperatur des Reagenzes getestet. Es konnte bei der Fällung mit eiskaltem (-20°C) und raumtemperiertem (25°C) Reagenz kein quantitativer Unterschied festgestellt werden.

Beim Vergleich zwischen Methanol und Acetonitril bei 25, 50 und 100 ng/ml, bei einem Injektionsvolumen von 10 μl , ergaben sich folgende Peakhöhen:

Tabelle 11: Vergleich Peakhöhe bei Fällung mit MeOH und ACN, Trennsystem vgl. Abbildung 20

Fällung [vol/vol]	Peakhöhe [mAU]								
	Apixaban			Dabigatran			Rivaroxaban		
	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml
MeOH 1:3	0,96	0,44	0,32	0,51	0,31	0,16	1,49	0,72	0,24
ACN 1:2	1,04	0,66	0,35	0,21	0,09	0,05	1,78	0,80	0,35

Bei Rivaroxaban und Apixaban konnte mit der ACN-Fällung eine bessere Peakhöhe erreicht werden. Hier muss aber bedacht werden, dass bei den ACN-Proben eine höhere Konzentration vorlag da nur 1:2 verdünnt wurde. Bei Dabigatran war die Peakhöhe, trotz Konzentrationsunterschied viel niedriger. Peaks bei den beiden niedrigen Konzentrationen konnten fast nicht ausgewertet werden.

Außerdem wurde die Aufarbeitung mit Filtervials getestet. Zum Einsatz kamen Vials mit Filtern aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und Nylon. Da hier jedoch die Aufreinigung nur unzureichend war (siehe Abbildung 21 bis Abbildung 23) wurde auf weitere Versuche verzichtet.

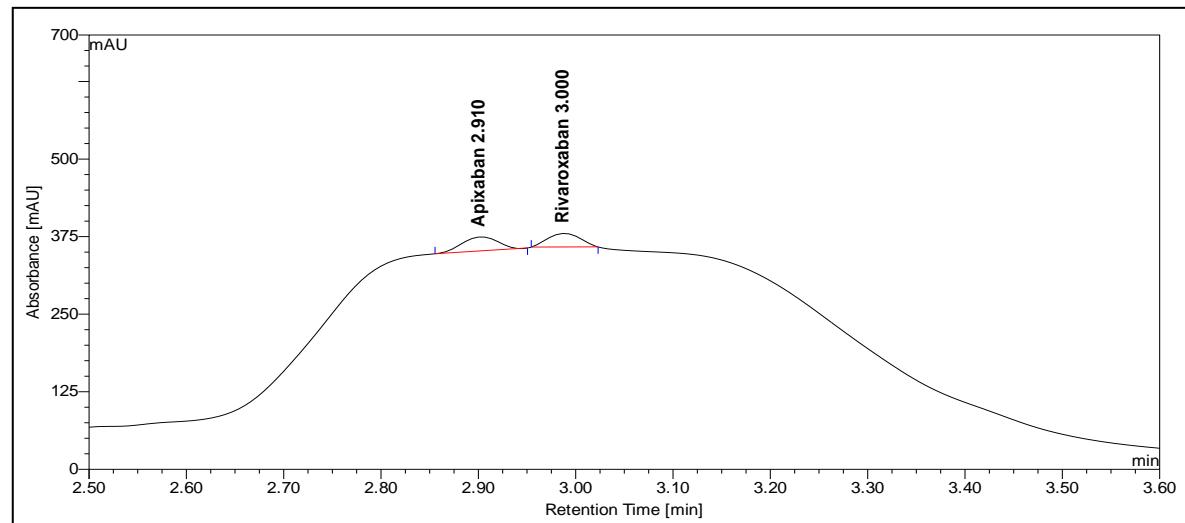


Abbildung 21: Probenvorbereitung mit Filtervial Nylon 0,45µm, Trennsystem vgl. Abbildung 20

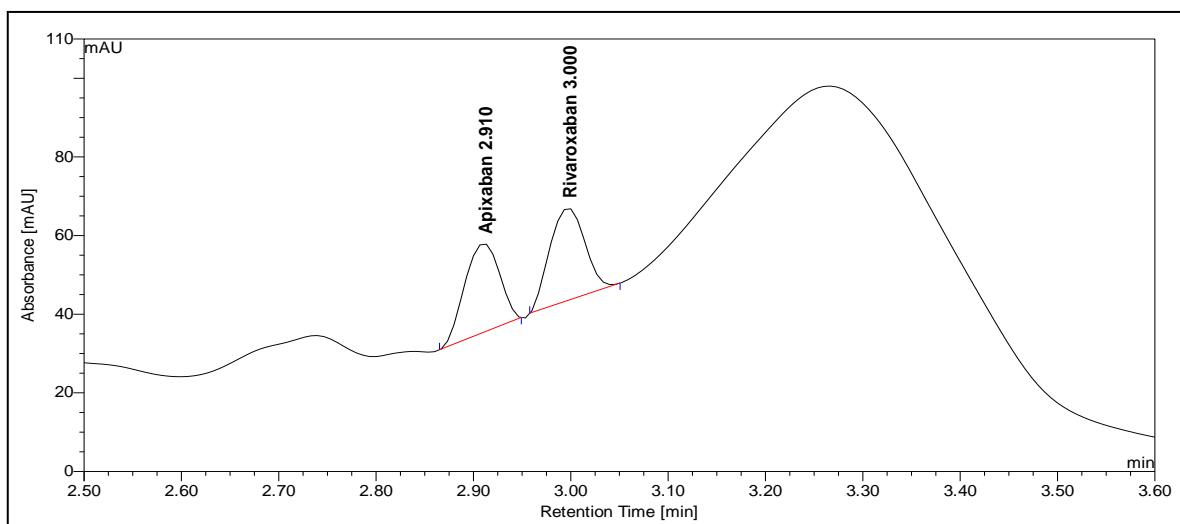


Abbildung 22: Probenvorbereitung mit Filtervial Nylon 0,2µm, Trennsystem vgl. Abbildung 20

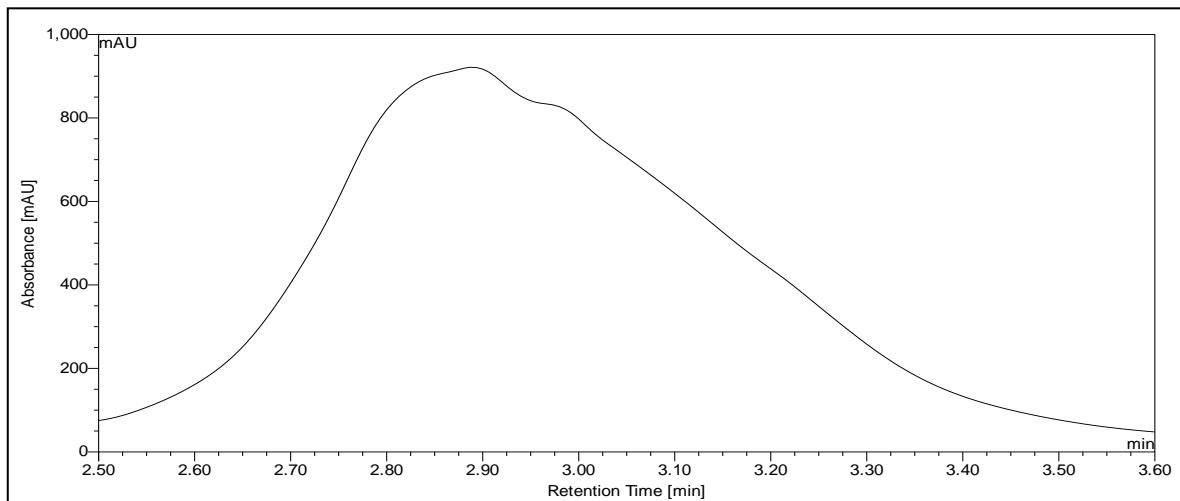


Abbildung 23: Probenvorbereitung mit Filtervial PTFE 0,2 µm, Trennsystem vgl. Abbildung 20

4.1.6. Injektionsvolumen

Nach der Proteinfällung mit Methanol wurden Einspritzvolumina von 5, 10, 20, 30 und 40 μl getestet. (Das maximale Injektionsvolumen der Anlage lag, ohne Umbau des Proben samplers, bei 40 μl .)

Tabelle 12: Peakhöhe bei verschiedenen Injektionsvolumina, Trennsystem vgl. Abbildung 24

Injektionsvolumen [μl]	Peakhöhe [mAU]								
	Apixaban			Dabigatran			Rivaroxaban		
	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml
5	0,49	0,25	0,16	0,46	0,24	0,10	0,94	0,50	0,30
10	0,96	0,44	0,32	0,51	0,31	0,16	1,49	0,72	0,24
20	1,35	0,78	0,45	0,58	0,29	0,11	1,66	0,87	0,08
30	1,35	0,95	0,56	0,64	0,29	0,08	1,41	0,80	0,08
40	1,39	0,78	0,41	0,75	0,36	0,14	1,95	0,88	0,14

Bei Apixaban konnte mit der Erhöhung von 5 auf 10 μl fast eine Verdopplung der Peakhöhe bei allen Konzentrationen erreicht werden. Nach weiterer Erhöhung des Injektionsvolumens stieg die Peakhöhe nur noch leicht an und verringerte sich beim Wechsel von 30 auf 40 μl bei zwei Konzentrationen wieder. Bei Dabigatran nahm die Peakhöhe nur bei der höchsten Konzentration kontinuierlich zu, bei der niedrigen und mittleren nahm sie bei mehr als 10 μl sogar ab. Auch bei Rivaroxaban war der größte relative Anstieg bei der Erhöhung der Injektionsmenge von 5 auf 10 μl zu erkennen. Bei der höchsten und mittleren Konzentration stieg die Peakhöhe bei weiterer Erhöhung an, bei der niedrigsten wurde bei 10 μl das Maximum der Peakhöhe erreicht und fiel danach ab.

Zusammenfassend muss bemerkt werden, dass die Peakqualität bei mehr als 10 μl Injektionsvolumen sichtlich schlechter wurde. Dies äußerte sich vor allem bei den beiden niedrigeren Konzentrationen durch Verbreiterung der Peaks und der Zunahme des Hintergrundrauschens und Störpeaks. Gerade bei Dabigatran und Rivaroxaban konnten Peaks sogar teilweise nicht ausgewertet werden, weil sie im Hintergrund untergingen.

Letztendlich entschieden wir uns für ein Injektionsvolumen von 10 μl , da wir hier den größten Nutzen sehen konnten. Bei Apixaban könnte sich bei sehr niedrigen Konzentrationen eine Erhöhung des Injektionsvolumens als nützlich erweisen.

4.1.7. Finale Methodenparameter

Nach den Vorversuchen kamen wir letztendlich zu folgenden Parametern unter denen die Methode validiert wurde:

- **Probenvorbereitung:** Proteinfällung mit MeOH, Verhältnis 1:3 (Vol/Vol)
- **Säule:** Poroshell 120, EC-C18, 3,0x50 mm, 2,7 µm
- **Injektionsvolumen:** 10 µl
- **Fließmittel:** [A] Wasser mit 0,1% Ameisensäure, [B] MeOH mit 0,1% Ameisensäure
- **Flussrate:** 0,7 ml/min bei 30°C
- **Gradient:** 0-3 min von [B] 10% auf [B] 50%; 3-4,5 min isokratisch mit [B] 50% und [A] 50%; 4,5-7 min von [B] 50% auf [B] 100%
- **Detektion:** UV/VIS; Apixaban bei 280 nm, Dabigatran bei 294 nm, Dabigatranetexilat bei 340 nm und Rivaroxaban bei 249 nm

Zusätzlich wurde vor jedem Batch ein Leerlauf von 7 min zum Equilibrieren der Säule gesetzt. Nach jeder Probe lief zusätzlich ein Spülgang mit [B] 10% isokratisch um die Säule wieder zu reequilibrieren. Folgende Abbildung zeigt das Chromatogramm unter den genannten Messbedingungen.

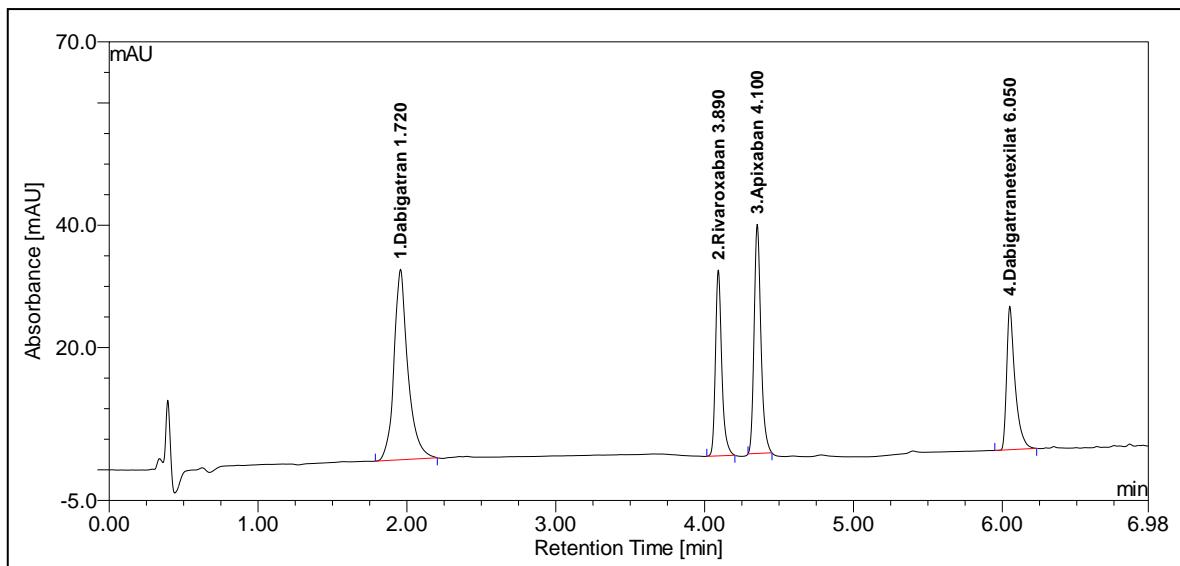


Abbildung 24: Chromatogramm für Dabigatran, Apixaban, Rivaroxaban und Dabigatranetexilat bei 1000ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl

Die Retentionszeiten betrugen 1,72 min für Dabigatran, 3,89 min für Rivaroxaban, 4,10 min für Apixaban sowie 6,05 min für Dabigatranetexilat.

Abbildung 25 bis Abbildung 29 zeigen Chromatogramme von Serumproben bei niedrigen Konzentrationen von Dabigatran, Apixaban und Rivaroxaban jeweils im Vergleich mit einer „leeren“ Serumprobe.

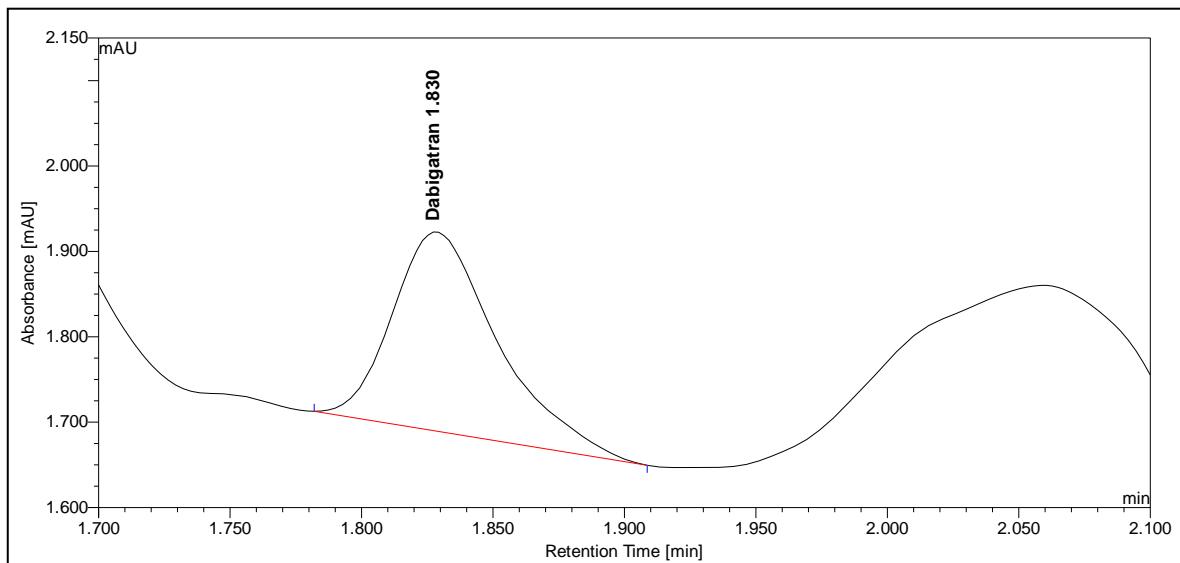


Abbildung 25: Dabigatranpeak in Serum bei 40ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 μ m, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 μ l

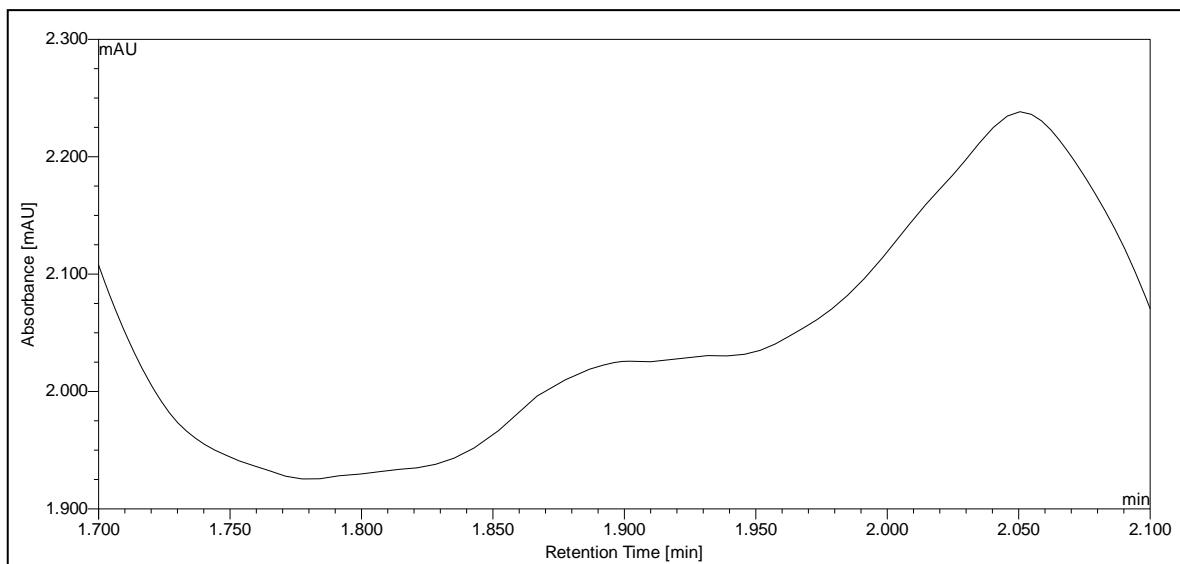


Abbildung 26: Gleicher Abschnitt (vgl. Abbildung 25) bei einer leeren Serumprobe

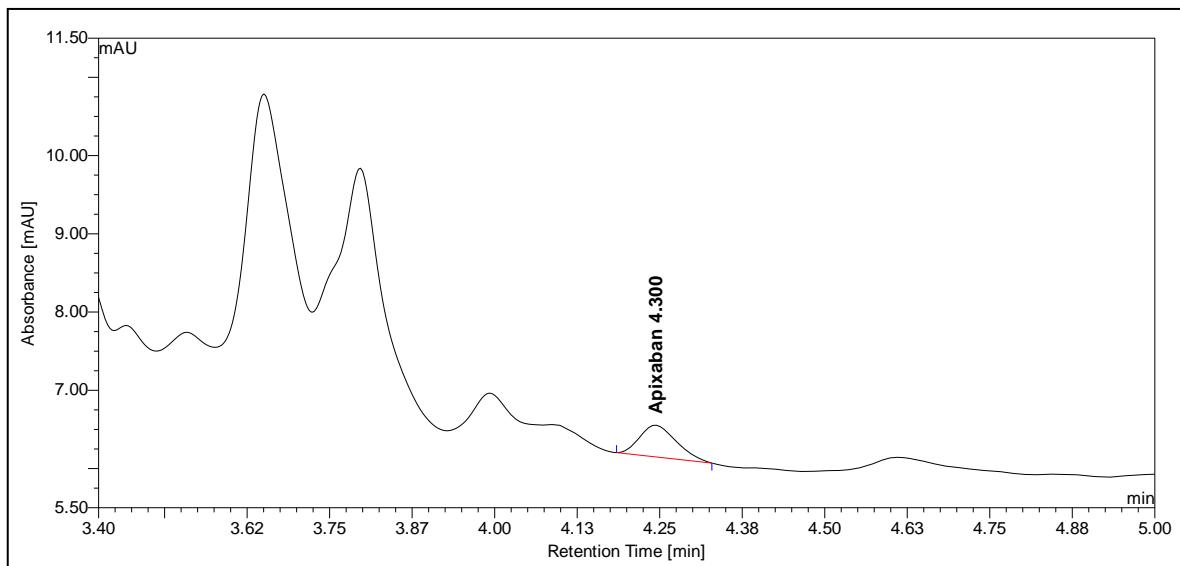


Abbildung 27: Apixabanpeak in Serum bei 46 ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl

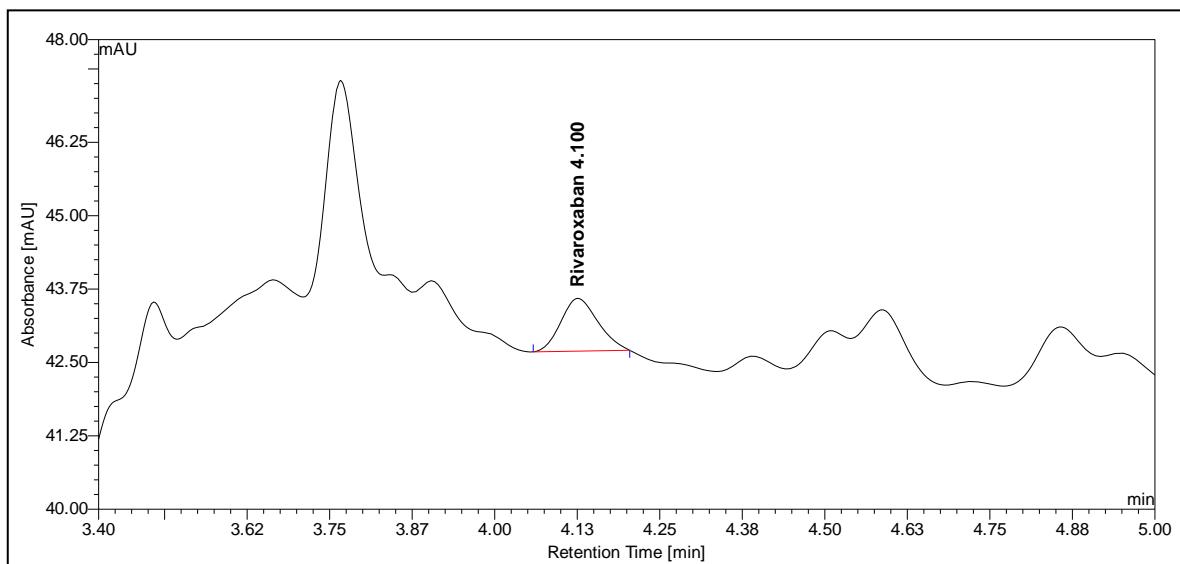


Abbildung 28: Rivaroxabanpeak in Serum bei 42 ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl

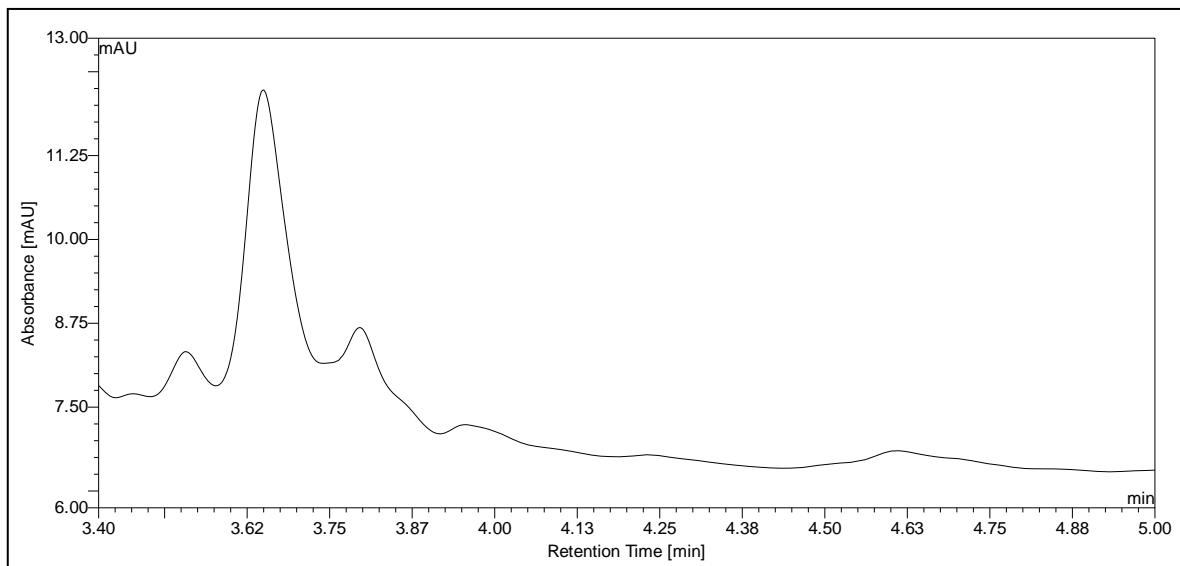


Abbildung 29: Chromatogramm einer leeren Serumprobe des gleichen Zeitabschnitts (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 28)

4.2. Validierung

4.2.1. Linearität des Kalibrationsbereiches

Für den Kalibrationsbereich von 20-300 ng/ml ergaben sich für Apixaban, Dabigatran, Dabigatranetexilat und Rivaroxaban folgende Werte:

Tabelle 13: Messwerte für die Linearität von Konzentration zur Peakhöhe

Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe (SD) [mAU] n=8			
	Dabigatran	Dabigatranet- exilat	Apixaban	Rivaroxaban
300	2,71 (0,07)	5,51 (0,13)	3,27 (0,01)	6,85 (0,07)
200	1,74 (0,05)	3,51 (0,09)	2,18 (0,01)	4,48 (0,04)
150	1,32 (0,03)	2,63 (0,07)	1,70 (0,02)	3,42 (0,05)
75	0,63 (0,10)	1,13 (0,28)	0,86 (0,18)	1,64 (0,36)
40	0,31 (0,01)	0,57 (0,02)	0,55 (0,01)	0,94 (0,02)
20	0,16 (0,01)	0,22 (0,01)	0,34 (0,01)	0,51 (0,02)

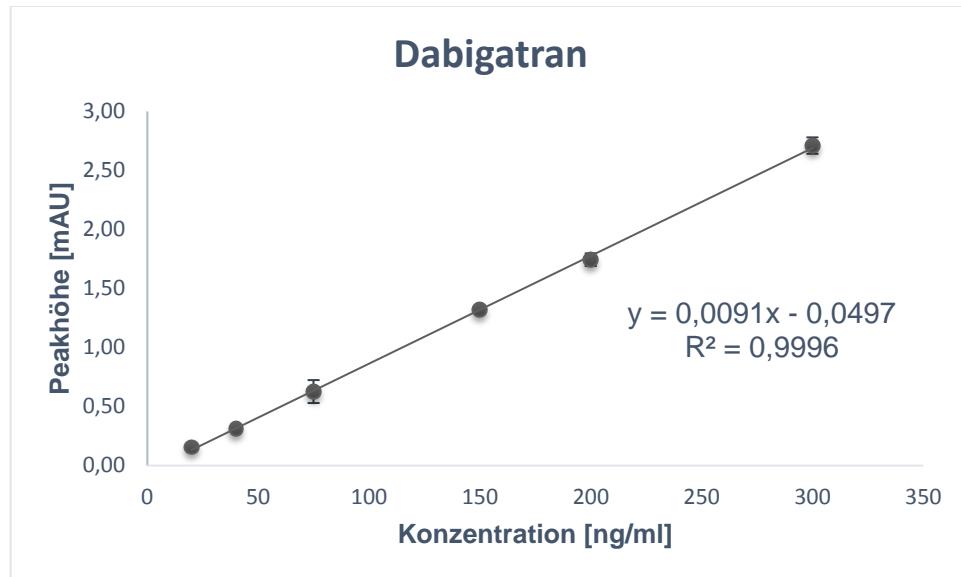


Abbildung 30: Grafische Darstellung der Linearität von Konzentration und Peakhöhe bei Dabigatran

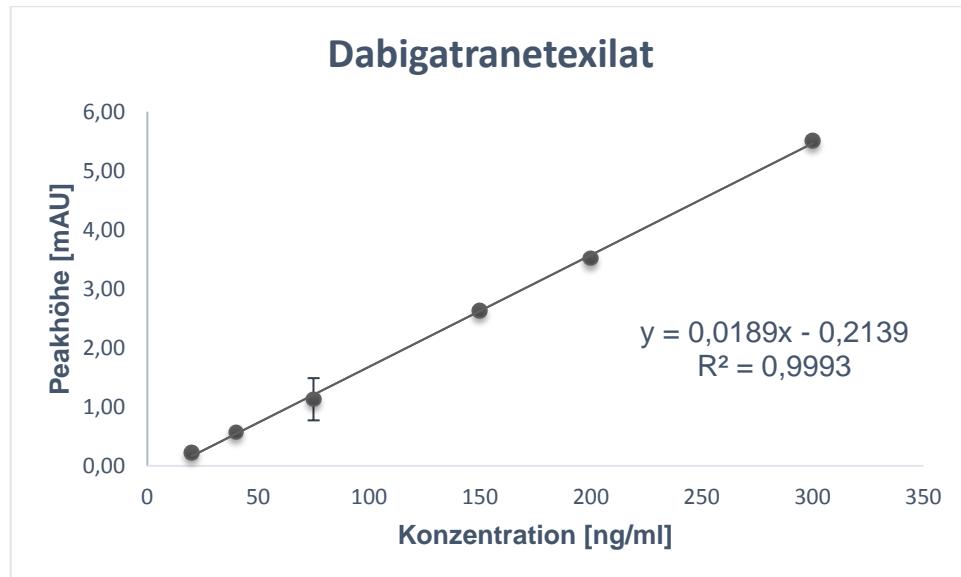


Abbildung 31: Grafische Darstellung der Linearität von Konzentration und Peakhöhe bei Dabigatranetexilat

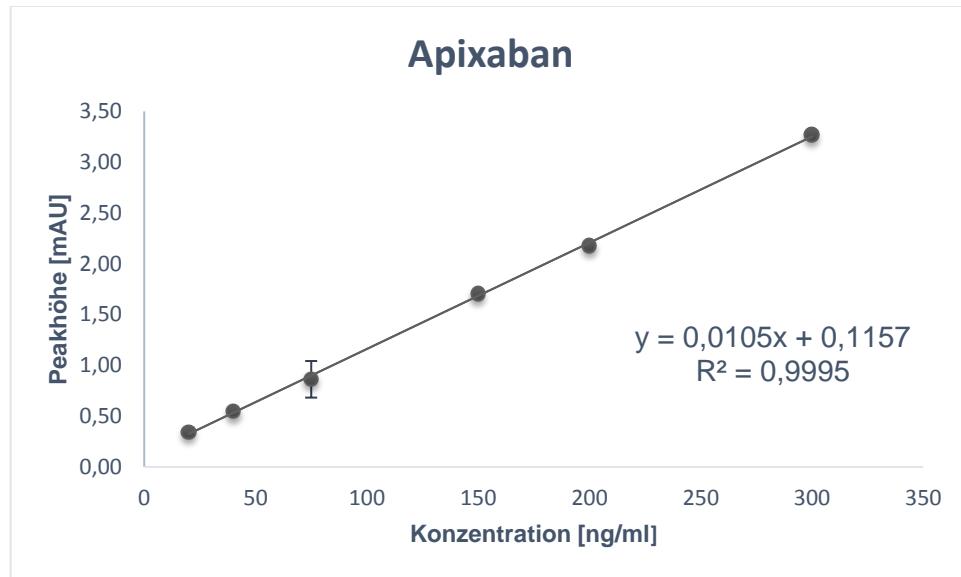


Abbildung 32: Grafische Darstellung der Linearität von Konzentration und Peakhöhe bei Apixaban

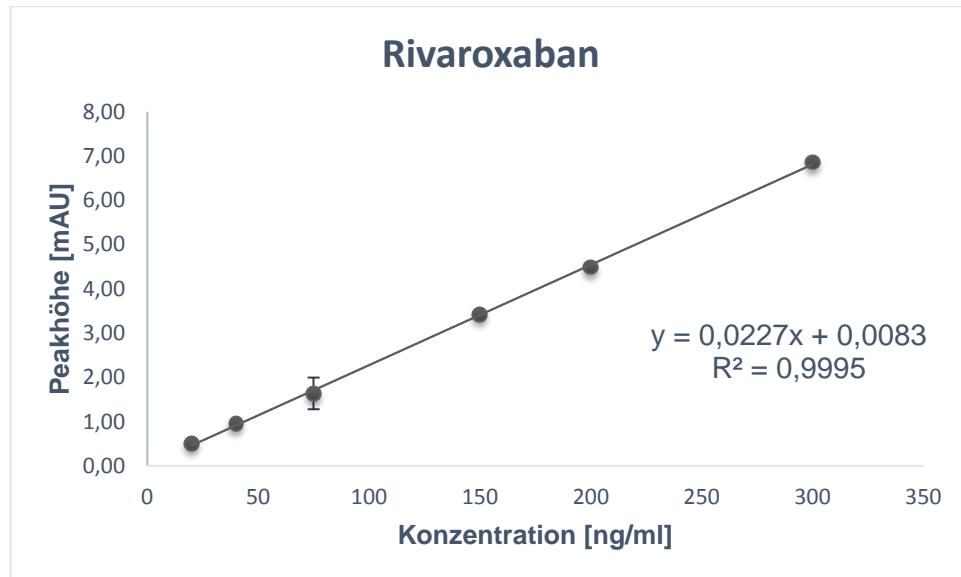


Abbildung 33: Grafische Darstellung der Linearität von Konzentration und Peakhöhe bei Rivaroxaban

Für das Bestimmtheitsmaß ergaben sich für alle vier Substanzen $R^2=0,99$. Damit wurde die Anforderung von $R^2\geq0,98$ erfüllt.

4.2.2. Richtigkeit

Für die Bestimmung des Bias bei 300, 150 und 40 ng/ml ergaben sich folgende Messwerte:

Tabelle 14: Messwerte für die Richtigkeit der DOAKs

	Apixaban			Dabigatran			Dabigatranetexilat			Rivaroxaban		
C [ng/ml]	300	150	40	300	150	40	300	150	40	300	150	40
Sollwert [mAU] (n=7)	3,32	1,74	0,54	2,61	1,30	0,31	5,71	2,77	0,72	6,92	3,54	0,98
SD [mAU]	0,03	0,02	0,01	0,13	0,07	0,03	0,02	0,02	0,02	0,06	0,03	0,01
MW QC [mAu] (n=20)	3,25	1,71	0,51	2,70	1,31	0,30	5,40	2,58	0,58	6,87	3,50	0,93
Bias [%]	-1,98	-2,20	-6,84	3,25	0,93	-2,63	-5,43	-6,92	-18,69	-0,79	-1,00	-5,09

Die höchsten Bias ergab sich für Apixaban mit -6,84% bei 40 ng/ml, für Dabigatran mit 3,25% bei 300 ng/ml, für Dabigatranetexilat mit -18,69% bei 40 ng/ml und für Rivaroxaban mit -5,09% bei 40 ng/ml.

Damit unterschritten alle Substanzen die geforderte Grenze von 15% bzw. 20%.

4.2.3. Impräzision innerhalb eines Laufes

Nachfolgende Werte ergaben sich für die Messung der Impräzision innerhalb eines Laufes:

Tabelle 15: Messwerte und Variationskoeffizienten für die Impräzision innerhalb eines Laufes

	Apixaban			Dabigatran			Dabigatranetexilat			Rivaroxaban		
C [ng/ml]	300	150	40	300	150	40	300	150	40	300	150	40
MW [mAU] (n=7)	3,32	1,74	0,54	2,68	1,30	0,31	5,71	2,77	0,72	6,92	3,54	0,98
SD [mAU]	0,03	0,02	0,01	0,03	0,07	0,03	0,02	0,02	0,02	0,06	0,03	0,01
MW QC [mAu] (n=20)	3,25	1,71	0,51	2,70	1,31	0,30	5,40	2,58	0,58	6,87	3,50	0,93
VC [%]	0,92	0,98	1,78	1,12	5,42	9,59	0,41	0,68	2,58	0,88	0,76	1,11

Der größte Variationskoeffizient ergab sich für Apixaban bei 40 ng/ml mit 1,78%, für Dabigatran mit 9,59% bei 40 ng/ml, für Dabigatranetexilat mit 2,58% bei 40 ng/ml und für Rivaroxaban mit 1,11% ebenfalls bei 40 ng/ml.

Damit lag die Impräzision innerhalb eines Laufes für alle Substanzen unterhalb der geforderten 15%.

4.2.4. Impräzision zwischen verschiedenen Messtagen

Nachfolgende Werte ergaben sich für die Bestimmung der interday Impräzision an fünf Tagen:

Tabelle 16: Messwerte und Variationskoeffizienten für die Impräzision an verschiedenen Messtagen

C [ng/ml]	Apixaban			Dabigatran			Dabigatranetexilat			Rivaroxaban		
	300	150	40	300	150	40	300	150	40	300	150	40
MW [mAU] (n=20)	3,25	1,71	0,51	2,70	1,31	0,30	5,40	2,58	0,58	6,87	3,50	0,93
SD [mAU]	0,07	0,04	0,05	0,04	0,04	0,02	0,28	0,16	0,08	0,07	0,04	0,05
VC [%]	2,14	2,46	9,77	1,60	3,28	6,62	5,15	6,12	13,16	1,06	1,27	5,19

Der größte Variationskoeffizient ergab sich für Apixaban bei 40 ng/ml mit 9,77%, für Dabigatran mit 6,62% bei 40 ng/ml, für Dabigatranetexilat mit 13,16% bei 40 ng/ml und für Rivaroxaban mit 5,19% ebenfalls bei 40 ng/ml.

Damit lag die Impräzision zwischen verschiedenen Messtagen für alle Substanzen unterhalb der geforderten 15%.

4.2.5. Stabilität

Für die Überprüfung der Stabilität bei Raumtemperatur, 8°C und -20°C ergaben sich folgende Messwerte:

Tabelle 17: Messwerte der Stabilitätsuntersuchungen

		Apixaban			Dabigatran			Dabigatranetexilat			Rivaroxaban		
		300 ng/ml	150 ng/ml	40 ng/ml	300 ng/ml	150 ng/ml	40 ng/ml	300 ng/ml	150 ng/ml	40 ng/ml	300 ng/ml	150 ng/ml	40 ng/ml
0 h, RT	c(S D)	3,24 (0,03)	1,73 (0,02)	0,53 (0,02)	2,82 (0,02)	1,41 (0,01)	0,32 (0,01)	5,05 (0,21)	2,27 (0,03)	0,34 (0,03)	6,76 (0,04)	3,52 (0,04)	0,89 (0,05)
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 d, RT	c(S D)	3,24 (0,04)	1,73 (0,02)	0,53 (0,02)	2,82 (0,03)	1,41 (0,02)	0,32 (0,02)	0,85 (0,03)	0,27 (0,01)	n.d.	6,76 (0,07)	3,52 (0,04)	0,89 (0,06)
	%	100	100	100	100	100	100	17	12	0	99,84	100	100
2 d, RT	c(S D)	3,31 (0,05)	1,74 (0,06)	0,56 (0,03)	2,97 (0,05)	1,47 (0,06)	0,32 (0,01)	0,13 (0,05)	n.d.	n.d.	6,89 (0,07)	3,53 (0,11)	0,95 (0,07)
	%	102	101	106	105	105	103	3	0	0	98	98	93
3 d, RT	c(S D)	3,29 (0,05)	1,75 (0,02)	0,53 (0,02)	2,94 (0,06)	1,51 (0,02)	0,33 (0,01)	n.d.	n.d.	n.d.	6,79 (0,07)	3,52 (0,04)	0,92 (0,05)
	%	101	101	98	104	107	107	0	0	0	100	102	105
5 d, RT	c(S D)	3,24 (0,03)	1,69 (0,02)	0,46 (0,02)	2,92 (0,03)	1,49 (0,03)	0,34 (0,01)	n.d.	n.d.	n.d.	6,79 (0,04)	3,46 (0,07)	0,89 (0,04)
	%	100	98	85	104	106	108	0	0	0	100	98	100
7 d, RT	c(S D)	3,23 (0,08)	1,62 (0,03)	0,41 (0,01)	2,91 (0,03)	1,45 (0,03)	0,33 (0,02)	n.d.	n.d.	n.d.	6,80 (0,05)	3,46 (0,07)	0,95 (0,18)
	%	99	93	75	103	103	105	0	0	0	101	98	109
1 d, 8 °C	c(S D)	3,30 (0,04)	1,67 (0,04)	0,52 (0,03)	2,85 (0,05)	1,36 (0,04)	0,31 (0,03)	3,94 (0,05)	1,70 (0,04)	0,26 (0,03)	6,90 (0,09)	3,35 (0,09)	0,86 (0,06)
	%	101	97	97	101	97	99	78	74	77	102	95	97
2 d, 8 °C	c(S D)	3,41 (0,02)	1,71 (0,07)	0,55 (0,03)	2,97 (0,02)	1,41 (0,07)	0,31 (0,02)	3,05 (0,09)	1,29 (0,07)	0,18 (0,02)	7,07 (0,02)	3,42 (0,16)	0,91 (0,07)
	%	105	99	101	105	100	99	60	57	52	105	98	104
3 d, 8 °C	c(S D)	3,30 (0,01)	1,64 (0,06)	0,51 (0,03)	2,94 (0,01)	1,38 (0,06)	0,32 (0,02)	2,26 (0,03)	0,93 (0,05)	0,08 (0,07)	6,90 (0,03)	3,33 (0,13)	0,88 (0,05)
	%	102	96	94	104	98	100	45	41	24	102	96	99
5 d, 8 °C	c(S D)	3,36 (0,03)	1,66 (0,05)	0,52 (0,03)	2,98 (0,03)	1,40 (0,05)	0,33 (0,02)	1,21 (0,02)	0,44 (0,02)	n.d.	6,97 (0,05)	3,34 (0,12)	0,90 (0,07)
	%	103	96	96	106	100	104	31	26	0	103	96	102
7 d, 8 °C	c(S D)	3,36 (0,06)	1,68 (0,07)	0,53 (0,02)	2,92 (0,05)	1,34 (0,06)	0,29 (0,02)	0,68 (0,02)	0,22 (0,02)	n.d.	6,96 (0,12)	3,34 (0,12)	0,89 (0,05)
	%	103	97	97	104	95	91	13	10	0	103	96	102
30 d, RT	c(S D)	2,50 (0,26)	1,35 (0,18)	0,27 (0,01)	2,95 (0,14)	1,50 (0,09)	0,34 (0,06)	n.d.	n.d.	n.d.	6,46 (0,33)	3,26 (0,16)	0
	%	77	78	49	105	107	106	0	0	0	95	94	0
30 d, 8 °C	c(S D)	3,09 (0,10)	1,56 (0,06)	0,41 (0,06)	2,85 (0,05)	1,35 (0,06)	0,30 (0,02)	n.d.	n.d.	n.d.	6,67 (0,12)	3,27 (0,12)	0,84 (0,05)
	%	95	90	77	101	96	95	0	0	0	98	94	96
30 d, -20 °C	c(S D)	3,12 (0,04)	1,62 (0,03)	0,49 (0,01)	2,71 (0,05)	1,29 (0,03)	0,31 (0,01)	5,04 (0,24)	2,37 (0,06)	0,59 (0,05)	6,63 (0,08)	3,36 (0,06)	0,97 (0,02)
	%	96	93	91	96	92	100	99	104	172	98	97	110

(% nimmt Bezug auf die gemessen Ausgangswerte an Tag 0 bei Raumtemperatur, RT = Raumtemperatur, n.d. = nicht detektierbar, Ausgangswerte sind fett hinterlegt)

Apixaban zeigte bei Raumtemperatur bis zu 72 h eine ausreichende Stabilität. Am fünften Tag fiel der Wert bei 40 ng/ml auf 85% ab und damit außerhalb des akzeptablen Bereiches. Die Werte der beiden übrigen Konzentrationen waren noch am siebten Tag innerhalb des Normbereiches und fielen erst am Tag 14 bzw. nach einem Monat um mehr als 10% ab. Bei 8°C waren die Apixabanproben bis zu sieben Tage stabil. Am 14. Tag fiel die Konzentration bei 40 ng/ml auf 88% des Ausgangswertes ab. Bei -20°C zeigte Apixaban bei Lagerung über einen Monat ausreichende Stabilität. Nach 3 Monaten waren alle drei Konzentrationen um 19-24% gefallen.

Dabigatran zeigte bei Raumtemperatur und 8°C über den gesamten Zeitraum von einem Monat eine ausreichende Stabilität. Lediglich bei der Messung der Kühlschrankproben nach 14 Tagen wurde bei 40 ng/ml die Norm mit einer Abweichung von 10,6% knapp überschritten. Bei -20°C zeigte Dabigatran bei Lagerung über einen Monat ausreichende Stabilität. Nach drei Monaten waren alle drei Konzentrationen um 45-55% unterhalb des Referenzwertes gefallen.

Dabigatranetexilat zeigte bei keiner Lagerbedingung eine ausreichende Stabilität. Bereits nach 24h bei Raumtemperatur waren nur 52-71% des Ausgangwertes nachzuweisen, die niedrigste Konzentration war nicht mehr messbar. Nach 72h war keine der drei Konzentrationen mehr in der Probe nachweisbar. Auch bei den im Kühlschrank gelagerten Proben war bereits nach 24h der Gehalt um 22-25% gefallen. Die bei -20°C gelagerten Proben zeigten nach einem Monat bei hoher und mittlerer Konzentration geringe Zersetzung jedoch war der Wert der niedrigen Probe auf 172% angestiegen.

Rivaroxaban zeigte bei Raumtemperatur und Lagerung bei 8°C über den gesamten Zeitraum von einem Monat ausreichende Stabilität. Nur die 40 ng/ml Proben konnten nach einem Monat bei Raumtemperatur nicht mehr detektiert werden. Ebenso waren die Proben bei der Lagerung über einen Monat bei -20°C stabil. Nach drei Monaten waren sie 76-81% des Ausgangwertes gefallen.

Bis auf Dabigatranetexilat zeigten alle Substanzen die geforderte Stabilität für den als Verweildauer zu erwartenden Zeitraum von Proben in unserem Labor.

4.2.6. Ein- und Auftaustabilität

Folgende Messwerte ergaben sich für die Überprüfung der Ein- und Auftaustabilität nach 3 Zyklen:

Tabelle 18: Messwerte für Ein- und Auftaustabilität

	Apixaban			Dabigatran			Dabigatranetexilat			Rivaroxaban		
	300	150	40	300	150	40	300	150	40	300	150	40
Ausgangswert [mAU] (n=9)	3,25	1,73	0,54	2,82	1,40	0,30	0,21	0,03	0,03	6,77	3,46	0,88
SD [mAU]	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,21	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
Auftauwert [mAU] (n=9)	3,27	1,74	0,51	2,76	1,32	0,30	5,24	2,47	0,54	6,83	3,53	0,90
SD [mAU]	0,04	0,04	0,05	0,03	0,03	0,04	0,07	0,05	0,07	0,10	0,09	0,11
Verhältnis [%]	101	101	94	98	94	98	104	109	95	101	102	103

Die Abweichung lag bei allen vier Substanzen innerhalb des geforderten Limits von 90-110% in Bezug auf den Ausgangswert. Die höchste Abweichung ergab sich für Apixaban bei 40 ng/ml mit 94%, für Dabigatran bei 150 ng/ml mit 94%, für Dabigatranetexilat bei 150 ng/ml mit 109% sowie für Rivaroxaban mit 103% bei 40 ng/ml.

4.2.7. Nachweisgrenze

Folgende Nachweisgrenzen wurden, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, sowie einer Ergebnisunsicherheit von 33%, berechnet:

Tabelle 19: Nachweisgrenze der DOAKS berechnet nach DIN 32645

	Apixaban	Dabigatran	Dabigatranetexilat	Rivaroxaban
Nachweisgrenze [ng/ml]	4,49	4,12	5,36	4,18

4.2.8. Bestimmungsgrenze

Folgende Bestimmungsgrenzen wurden, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sowie einer Ergebnisunsicherheit von 33%, berechnet:

Tabelle 20: Bestimmungsgrenze der DOAKs berechnet nach DIN 32645

	Apixaban	Dabigatran	Dabigatranet-exilat	Rivaroxaban
Bestimmungsgrenze [ng/ml]	16,47	15,19	19,43	15,39

4.2.9. Wiederfindung

Folgendes Verhältnis ergab sich aus dem Vergleich der Messwerte von Proben in Lösungsmittel (LM) mit den Serumproben nach Proteinfällung bei 300 und 40 ng/ml:

Tabelle 21: Messwerte für Wiederfindung

	Apixaban		Dabigatran		Dabigatranet-exilat		Rivaroxaban	
C [ng/ml]	300	40	300	40	300	40	300	40
MW LM [mAU] (n=4)	3,30	0,42	3,15	0,29	5,65	0,74	7,20	0,98
SD [mAU]	0,02	0,01	0,19	0,04	0,07	0,003	0,04	0,01
MW Serum [mAU] (n=16)	3,25	0,50	2,39	0,22	5,53	0,75	6,93	0,99
SD [mAU]	0,11	0,01	0,24	0,03	0,16	0,02	0,24	0,04
Wiederfindung [%]	98,40	118,48	75,87	75,32	97,80	101,23	96,28	101,16

4.2.10. Robustheit

Folgende Retentionszeiten ergaben sich bei Veränderung der Temperatur des Säulenofens sowie Variation beim Anteil der Ameisensäure (AS) in beiden Fließmitteln:

Tabelle 22: Gemessene Retentionszeiten bei Veränderung der Temperatur und Säureanteil im Fließmittel

Veränderter Parameter	Retentionszeit [min]			
	Apixaban	Dabigatran	Dabigatranetexilat	Rivaroxaban
Referenz, 30°C, 0,1% AS	4,25	1,82	5,89	3,99
T=35°C	4,15	1,80	5,84	3,91
T=40°C	4,05	1,76	5,77	3,82
T=45°C	3,97	1,73	5,69	3,74
0,2% AS	4,21	1,68	5,82	3,96
0,05% AS	4,21	1,88	5,87	3,97

Mit steigender Temperatur des Säulenofens verkürzte sich die Retentionszeit der einzelnen Substanzen zunehmend. Dabigatran zeigte eine stärkere Verkürzung der Retentionszeiten bei erhöhtem Säureanteil im Fließmittel.

4.2.11. Selektivität

Folgende Retentionszeiten ergaben sich aus der Interferenzmessung:

Tabelle 23: Retentionszeiten der 103 gemessenen Interferenzsubstanzen

Substanz	Reten-tionszeit [min]	Substanz	Reten-tionszeit [min]	Substanz	Reten-tionszeit [min]
Alprazolam	5,30	Gabapentin	n.d.	Brimonidin	n.d.
Amantadin	n.d.	Galantamin	1,03	Prometha-zin	4,30
Amisulprid	1,88	Glimepirid	n.d.	Propanolol	3,59
Amitriptylinoxid	5,53	Hydrochlorothi-azid	1,20	Quetiapin	3,71
Amlodipin	n.d.	Imipramin	4,73	Ramipril	n.d.
Aripiprazol	4,73	Coffein	2,02	Reboxetin	4,12
Ascorbinsäure	n.d.	Lactulose	n.d.	Risperidon	3,04
Asenapin	4,12	Lamotrigin	2,75	Rivastigmin	n.d.
Acetyl-salicylsäure	3,38	Levodopa	n.d.	Sertralin	n.d.
Benperidol	3,29	Levopromazin	5,16	Sultiam	n.d.
Biperiden	n.d.	Lorazepam	5,44	Sumatriptan	1,44
Bisoprolol	3,31	Memantin	n.d.	Testosteron	n.d.
Bromazepam	3,95	Metformin	n.d.	Theobromin	1,25
Bupropion	3,08	Methylrisperi-don	3,38	Theophyllin	1,65
Buspiron	3,11	Metoprolol	2,61	Topiramat	n.d.
Carbamazepin	4,41	Mianserin	3,67	Triamcino-lon	5,74
Chlordiazepoxid	3,37	Mirtazapin	2,44	Triamteren	2,41
Chlorprothixen	5,85	Monohydrocar-bamazepin	6,25	Triazolam	5,36
Cisaprid	3,79	N-Desmethylcloza-pin	3,30	Tri-mipramin	5,32
Citalopram	3,65	Nateglinid	n.d.	Venlafaxin	3,37
Clobazam	5,03	N-dealkylquetia-pin	3,63	Ziprasidon	3,58
Clomipramin	5,83	N-Desmethylolanz-apin	1,56	Zopiclon	4,16
Clozapin	3,47	Nitrazepam	4,38	Zuclopentixol	6,08
Clozapin-N-oxid	3,83	Norclomipramin	5,93		
Dehydroari-pipazol	n.d.	Nordiazepam	5,67		
Desipramin	4,96	Nordoxepin	3,90		

Desmethylvenlafaxin	2,45	Nortriptylin	5,37
Dexamethason	n.d.	O-Desmethylvenlafaxin	2,45
Diclofenac	6,63	Olanzapin	1,58
Dihydrocodein	6,25	Omeprazol	3,35
Doxepin	3,80	Oxazepam	5,41
Duloxetin	5,05	Oxcarbazepin	3,70
Enalapril	n.d.	Paliperidon	2,93
Escitalopram	3,52	Pantoprazol	3,65
Estradiol	6,10	Paroxetin	4,62
Fluoxetin	5,26	Perazin	4,85
Fluperlapin	3,12	Phenytoin	n.d.
Fluphenazin	n.d.	Pipamperon	n.d.
Fluvoxamin	5,42	Pregabalin	n.d.
Furosemid	3,72	Pirenzepin	2,05

(n.d., nicht detektierbar)

Potentielle Überlagerungen ergaben sich zwischen Amisulprid und Dabigatran (1,88 vs. 1,82 min), zwischen Clomipramin und Dabigatranetexilat (5,83 vs. 5,88 min), zwischen Bromazepam und Rivaroxaban (3,95 vs. 4,04 min) sowie zwischen Nitrazepam und Apixaban (4,38 vs. 4,29). In den gemessenen Patientenproben konnten wir keine Interferenzen beobachten.

4.3. Erweiterung der validierten Methode

4.3.1. Verkürzung der Laufzeit

Sollte die Bestimmung von Dabigatranetexilat nicht erforderlich sein, kann die Methode um zwei Minuten auf eine Gesamtlaufzeit von fünf Minuten verkürzt werden. Die chromatographischen Bedingungen bleiben gleich, lediglich der Gradient von [A] 50% auf [B] 100%, beginnend ab 4,5 min wird entfernt und der Lauf nach fünf Minuten beendet.

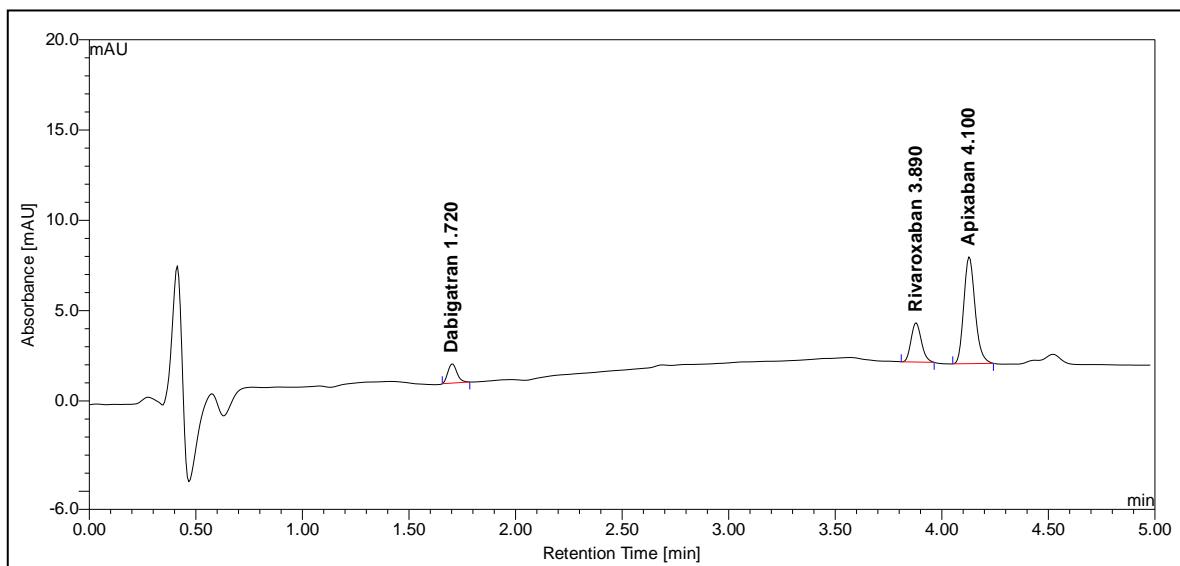


Abbildung 34: Chromatogramm für verkürzte Laufzeit ohne Bestimmung von Dabigatranetexilat bei 1000 ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl

4.3.2. Detektion von Edoxaban sowie Phenprocoumon und Warfarin

Die bestehende Methode konnte auch erfolgreich verwendet werden, um Edoxaban, Phenprocoumon und Warfarin zu detektieren. Hierfür muss jedoch auf die Bestimmung von Dabigatranetexilat verzichtet werden (Abbildung 35).

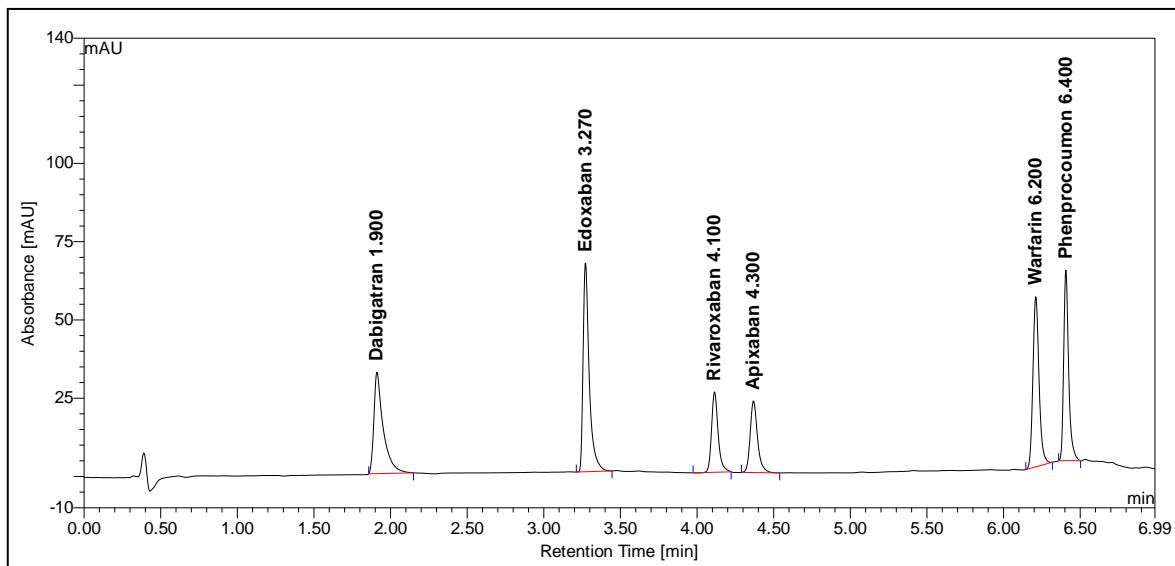


Abbildung 35: Chromatogramm mit zusätzlicher Detektion von Edoxaban, Warfarin und Phenprocoumon bei 1000 ng/ml auf einer Poroshell C18, 2,7 µm, 50x3 mm Säule, Fluss=0,7 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl

Retentionszeiten waren: 3,27 min für Edoxaban, 6,20 min für Warfarin und 6,40 min für Phenprocoumon.

Die Detektion kann für Edoxaban bei 289 nm, für Phenprocoumon bei 285 nm sowie 309 nm und für Warfarin bei 282 nm sowie 305 nm erfolgen.

Im Folgenden sind die aufgenommenen UV-Spektren abgebildet:

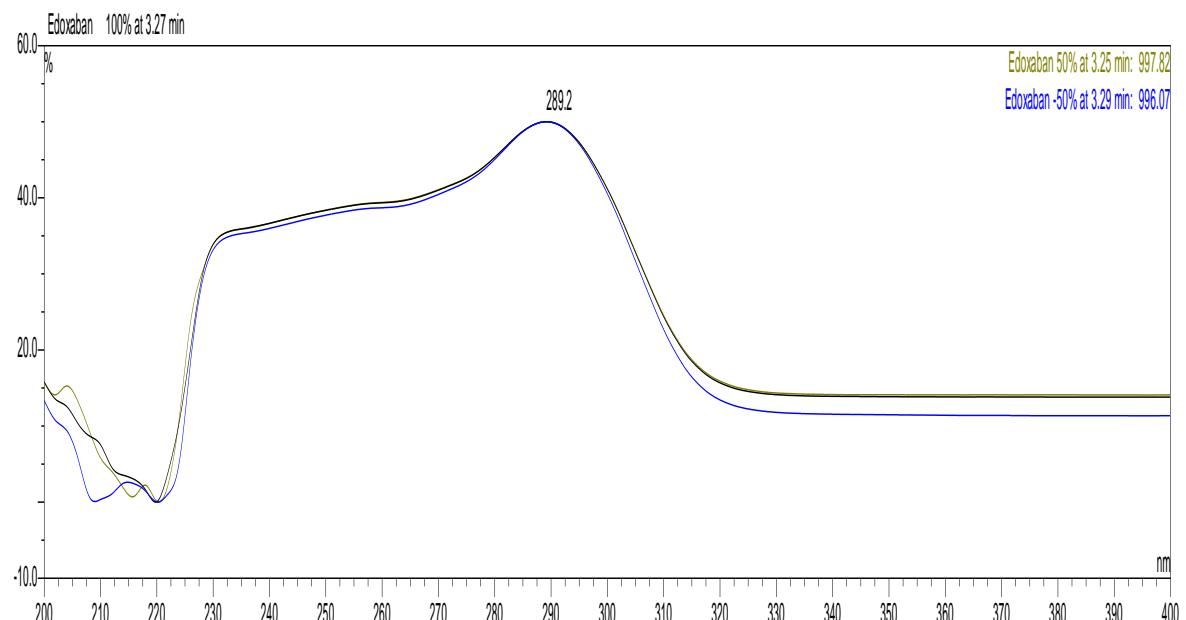


Abbildung 36: UV-Spektrum Edoxaban

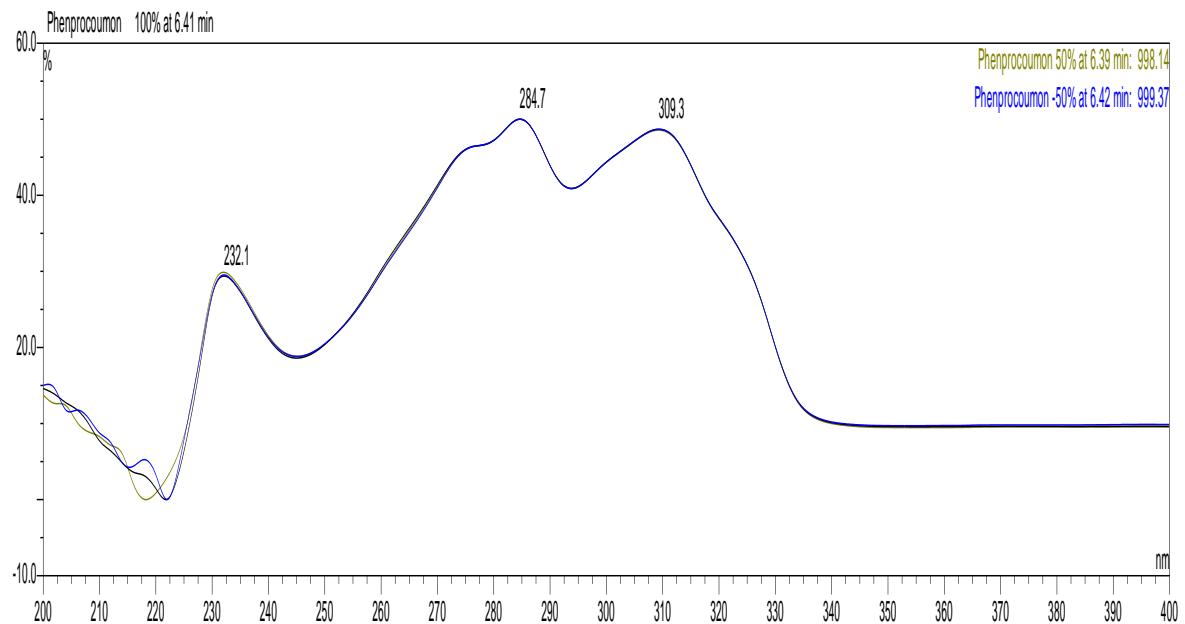


Abbildung 37: UV-Spektrum Phenprocoumon

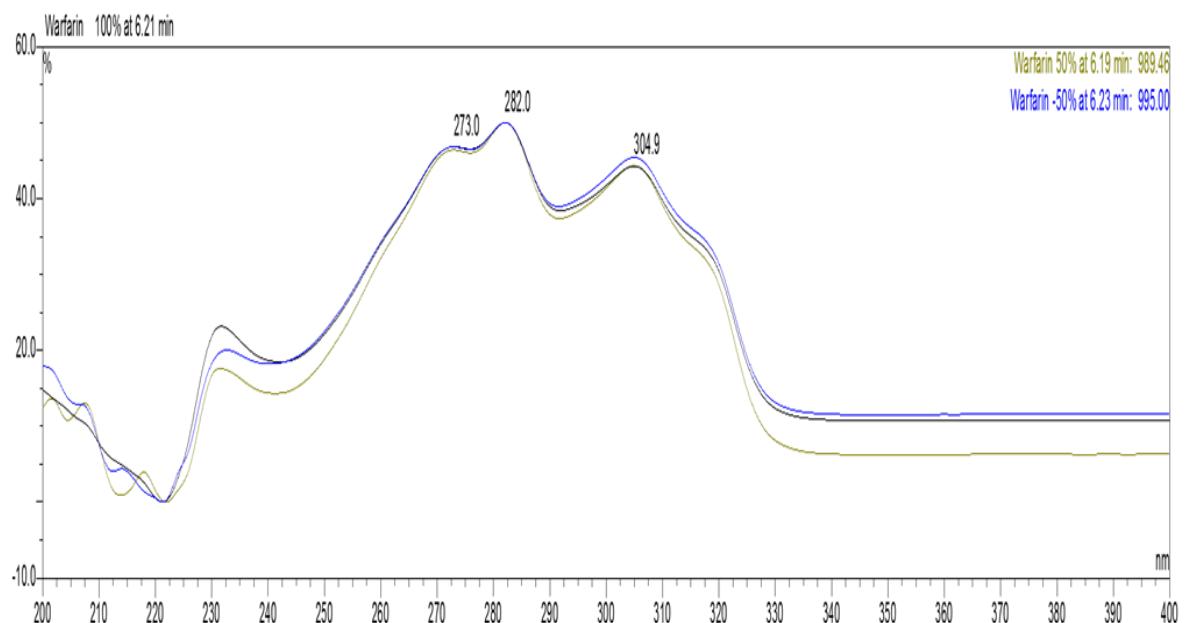


Abbildung 38: UV-Spektrum Warfarin

4.4. Dosisbezogener Referenzbereich

Für die zugelassenen Dosierungen und Indikationen ergaben sich folgenden Referenzbereiche:

Tabelle 24: Zugelassene Dosierungen und zugehörige Dosisbezogene Referenzbereiche für die Talkonzentration und die mittlere Tageskonzentration

Wirkstoff	Indikation	Tages-dosis [mg]	DR _{min} [ng/ml]	Df _{min}	DRR _{avg} [ng/ml]	Df _{avg}
Rivaroxabán	Prophylaxe venöser Thromboembolien (VTE) nach elektiven Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen	10	19 – 27	L:1,87 H:2,69	39 – 65	L:3,89 H:6,46
	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern	20	37 – 54		78 – 129	
	Behandlung von TVT, Lungenembolie (LE) sowie Prophylaxe von deren Rezidiven (ab Tag 22)	20	37 – 54		78 – 129	
	Behandlung von TVT, LE sowie Prophylaxe von deren Rezidiven (Tag 1 – Tag 21)	30	56 – 81		117 – 194	
Wirkstoff	Indikation	Tages-dosis [mg]	DRR _{min} [ng/ml]	Df _{min}	DRR _{avg} [ng/ml]	Df _{avg}
Edoxaban	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei erwachsenen Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern	60	25-39	L:0,42 H:0,65	51-101	L:0,85 H:1,68
	Behandlung von TVT, LE sowie Prophylaxe von deren Rezidiven					
Wirkstoff	Indikation	Tages-dosis [mg]	DRR _{min} [ng/ml]	Df _{min}	DRR _{avg} [ng/ml]	Df _{avg}
Apixaban	Prophylaxe von VTE nach elektiven Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen	5	22 – 41	L:4,44 H:8,19	26 – 49	L:5,27 H:9,71

	Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern	10	44 – 82		53 – 97	
	Behandlung von TVT und Behandlung von LE sowie Prophylaxe von rezidivierenden TVT und LE (ab Tag 7)					
	Behandlung von TVT und Behandlung von LE sowie Prophylaxe von rezidivierenden TVT und LE (Tag 1- 7)	20	88 – 164			105 – 194
Wirkstoff	Indikation	Tagesdosis [mg]	DRR _{min} [ng/ml]	Df _{min}	DRR _{avg} [ng/ml]	Df _{avg}
Dabigatran	Primärprävention einer venösen Thromboembolie bei orthopädischen Eingriffen	220	37 – 57	L:0,17 H:0,26	42 – 64	L:0,19 H:0,29
	Prävention von Schlaganfall und systemischer Embolie bei erwachsenen Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern und einem oder mehreren Risikofaktoren (SPAF)	300	51 – 78		57 – 87	
	Behandlung von TVT und LE	300	51 – 78		57 – 87	

Dosisfaktor (Df) L (low) und H (high) werden mit der jeweiligen Dosis multipliziert, um obere sowie untere Konzentration der jeweiligen dosisbezogenen Referenzbereiche zu erhalten.

Tabelle 25: Vergleich der Dosisfaktoren(Df) zwischen dosisbezogenen Referenzbereichen für Tal- und mittlere Tageskonzentration

	Dosierintervall [h]	Δt [h]	Df _{avg} low	Df _{avg} high	Df _{min} low	Df _{min} high
Rivaroxaban	24	24	3,89	6,46	1,87	2,69
Apixaban	12	12	5,27	9,71	4,44	8,19
Dabigatran	12	12	0,19	0,29	0,17	0,26
Edoxaban	24	24	0,85	1,68	0,42	0,65

Während bei Apixaban und Dabigatran der Unterschied zwischen beiden Bereichen relativ gering ausfiel, zeigte sich bei Rivaroxaban und Edoxaban, die nur einmal täglich gegeben werden, eine erhebliche Differenz zwischen den zu erwartenden dosisbezogenen Referenzbereichen.

4.5. ATEC

Zusätzlich zum dosisbezogenen Referenzbereich wurde, mangels verfügbarer echter therapeutischer Referenzbereiche, eine angenommene therapeutisch effektive Konzentration (ATEC, für assumed therapeutic effective concentration) berechnet. Dieser Konzentrationsbereich wird aus der niedrigsten und höchsten Schwelle des dosisbezogenen Referenzbereiches, für alle zugelassenen Dosierungen gebildet. Bei den Dosisfindungsstudien, im Rahmen der Zulassung, werden die Dosen gesucht bei denen das optimale Verhältnis zwischen erwünschter Wirkung und unerwünschter Wirkung besteht. Da jedoch die aus der Dosis resultierende Konzentration im Körper für die Wirkung verantwortlich ist, wurde angenommen, dass erst bei Unterschreitung des zu erwartenden Konzentrationsbereiches der Normalpopulation, für alle Indikationen, die gerinnungshemmende Wirkung ausbleibt oder zu gering ist. Genauso wurde angenommen, dass bei Überschreitung des ATEC das Risiko einer unerwünschten Blutung zu erleiden unverhältnismäßig ansteigt.



Abbildung 39: Bereich der vom ATEC überspannt wird.

Für den ATEC ergaben sich folgenden Konzentrationsbereiche:

Tabelle 26: Konzentrationsbereiche des ATEC für die mittlere Tageskonzentration sowie für die Talkonzentration

Wirkstoff	ATEC _{avg} [ng/ml]	ATEC _{min} [ng/ml]
Apixaban	26-194	22-164
Dabigatran	42-87	37-78
Edoxaban	51-101	25-39
Rivaroxaban	39-194	19-81

4.6. Patientenproben

Mit der von uns validierten Methode konnten insgesamt 98 Proben von 60 Patienten bestimmt werden, die mit Apixaban, Dabigatran oder Rivaroxaban behandelt wurden. Die Patienten von 34 Rivaroxabanproben erhielten eine Dosis von 20 mg mit einer Konzentration von 32 bis 288 ng/ml, 11 erhielten eine Dosis von 15 mg mit einer Konzentration von 21 bis 117 ng/ml, zwei erhielten eine Dosis von 10 mg mit einer Konzentration von 18 bis 72 ng/ml und zwei erhielten eine Dosis von 30 mg mit einer Konzentration von 54 bis 166 ng/ml. Bei den Apixabanpatienten hatten 23 eine Dosis von 10 mg mit einer Konzentration von 80 bis 626 ng/ml und 19 hatten eine Dosis von 5 mg mit einer Konzentration von 49 bis 473 ng/ml. Des Weiteren hatten die Patienten von sieben Dabigatranproben eine Dosis von 220 mg bei denen eine Konzentration zwischen 23 und 61 ng/ml gemessen wurden.

Die mittlere Konzentration für Rivaroxaban lag für 10 mg bei 45 ± 27 ng/ml, für 15 mg bei 54 ± 28 ng/ml, für 20 mg bei 105 ± 105 ng/ml und für 30 mg bei 110 ± 56 ng/ml (vgl. Abbildung 40). Für Apixaban ergab sich ein Mittelwert von 159 ± 102 ng/ml für die Dosierung von 5 mg sowie ein Mittelwert von 236 ± 134 ng/ml für die 10 mg Dosierung (vgl. Abbildung 41). Der Mittelwert der Dabigatranproben lag bei 32 ± 15 ng/ml, hier wurden nur Proben von Patienten gemessen, die mit 220 mg behandelt wurden.

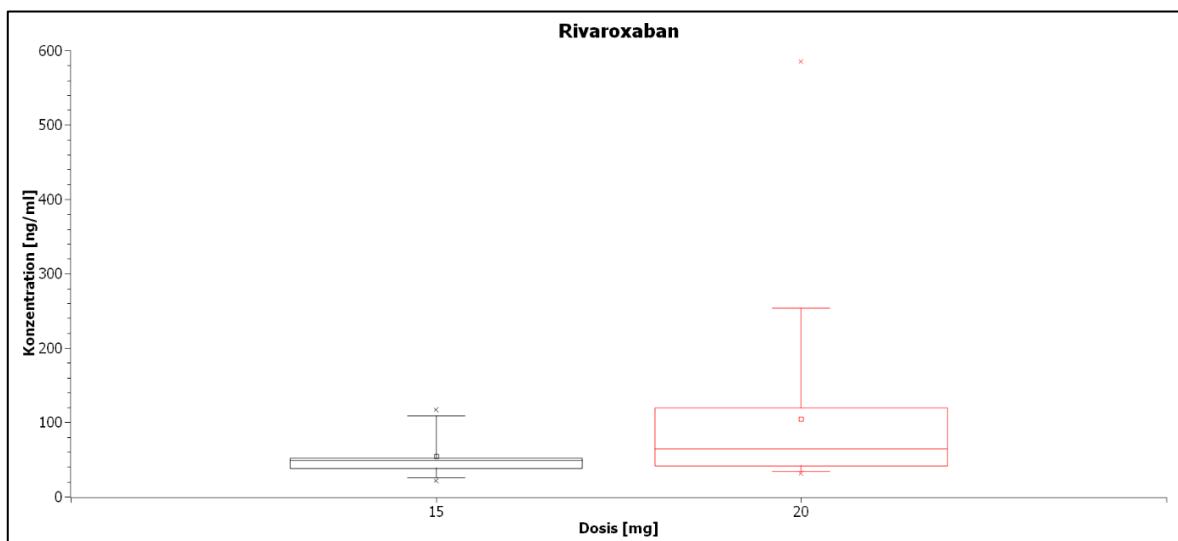


Abbildung 40: Boxplot für 15 und 20 mg Rivaroxaban. Box umfasst jeweils die 25/75 Perzentile der Konzentration. Die Whisker stellen die 5/95 Perzentile dar. Der Punkt gibt den Median an und die Kreuze jeweils Minimum und Maximum.

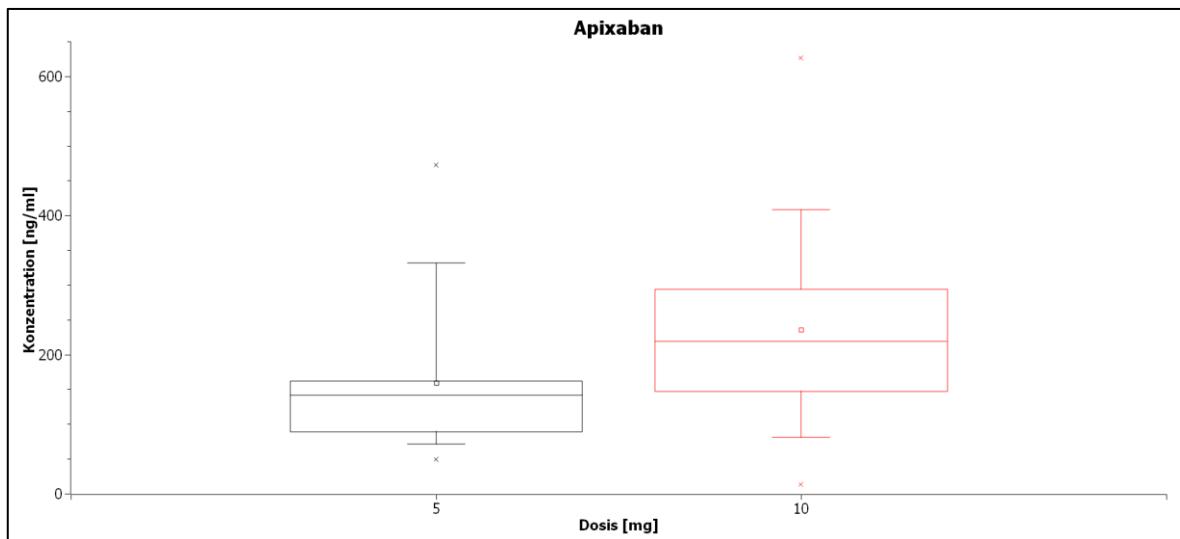


Abbildung 41: Boxplot für 5 und 10 mg Apixaban. Box umfasst jeweils die 25/75 Perzentile der Konzentration. Die Whisker stellen die 5/95 Perzentile dar. Der Punkt gibt den Median an und die Kreuze jeweils Minimum und Maximum.

4.6.1. Interindividuelle Schwankung der Konzentration

Die größte Differenz zwischen niedrigster und höchster Konzentration, bei ein und derselben Dosis, betrug für Rivaroxaban das 9fache bei 20 mg, für Apixaban das 9,7fache bei 5 mg und für Dabigatran das 2,7fache bei 220 mg. Betrachtet man alle Dosierungen ergibt sich eine interindividuelle Variabilität für die Serumkonzentration in der Größenordnung von 3-9 für Rivaroxaban, von 7,8-9,7 für Apixaban und von 2,7 für Dabigatran.

4.6.2. Einordnung in DRR_{avg} und $ATEC_{avg}$

Von den 49 Rivaroxabanproben lagen 9 innerhalb des DRR, 40 lagen außerhalb, davon 10 oberhalb und 30 unterhalb des dosisbezogenen Referenzbereiches. Innerhalb des ATEC lagen 24 Proben, sowie 18 außerhalb. Davon hatte eine Probe eine zu niedrige Konzentration und 17 hatten eine zu hohe.

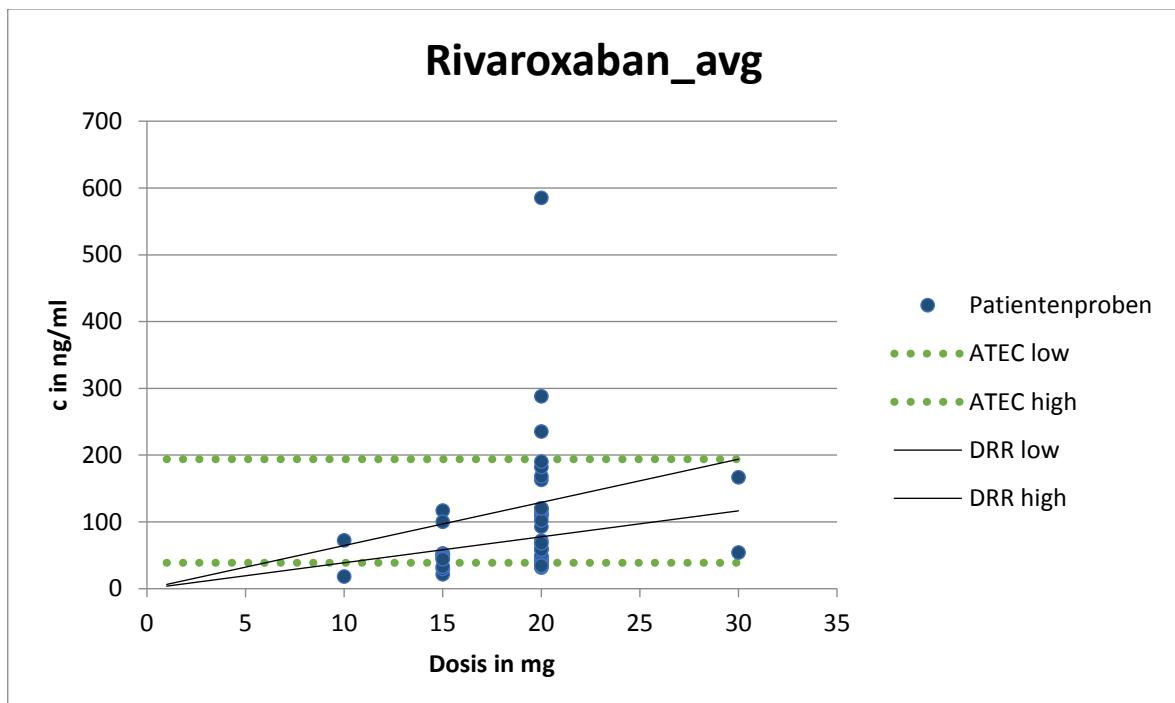


Abbildung 42: Patientenproben von Rivaroxaban in Relation zu DRR_{avg} und ATEC_{avg}

Von den Proben die unterhalb des DRR lagen war bei 6 als Anforderungsgrund Kontrolle der Compliance angegeben und bei 15 Proben war mindestens ein CYP3A4-Induktor oder PGP-Induktor in der Comedikation zu finden. Von den 10 Proben, die den DRR überschritten, fand sich in 9 Fällen ein CYP3A4-Hemmstoff oder PGP-Hemmstoff in der Comedikation. Bei der übrigen Probe waren keine Auffälligkeiten festzustellen.

Tabelle 27: 9-Felder-Tafel für Rivaroxaban

		ATEC_avg		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_avg	zu niedrig	18,4% (9)	42,9% (21)	0
	passend	0	18,4% (9)	0
	zu hoch	0	14,3% (7)	6,1% (3)

Bei den Patienten, die Apixaban erhielten, lagen vier Proben innerhalb des DRR und 38 außerhalb. Von diesen 38 war bei einer die Konzentration zu niedrig und bei 37 zu hoch für die Dosis. Innerhalb des ATEC lagen 24 der Proben und 18 außerhalb, davon eine unterhalb und 17 oberhalb der jeweiligen Grenze.

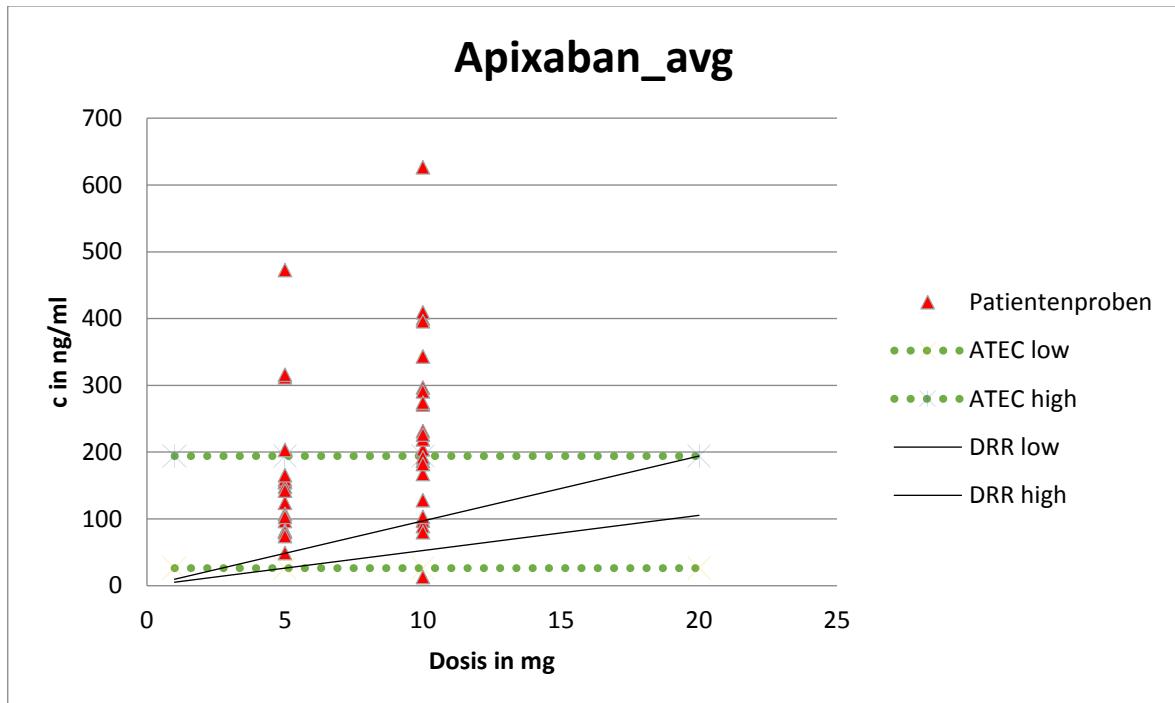


Abbildung 43: Patientenproben von Apixaban in Relation zum DRR_{avg} und ATEC_{avg}

Der Patient dessen Konzentration den DRR unterschritt, hatte zwei Enzyminduktoren in seiner Comedikation. Bei den Proben die eine zu hohe Konzentration für die Dosis hatten, war in der Begleitmedikation von 30 Proben mindestens ein Enzyminhibitor zu finden.

Tabelle 28: 9-Felder-Tafel für Apixaban

		ATEC_avg		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_avg	zu niedrig	2,4% (1)	0	0
	passend	0	9,5% (4)	0
	zu hoch	0	47,6% (20)	40,5% (17)

Von den 7 Proben bei denen Dabigatran bestimmt wurde, lagen zwei sowohl innerhalb des DRR als auch im ATEC. Bei den restlichen fünf Proben wurden beide Bereiche unterschritten. Bei keiner der Proben wurde eine für die Dosis zu hohe Konzentration gemessen.

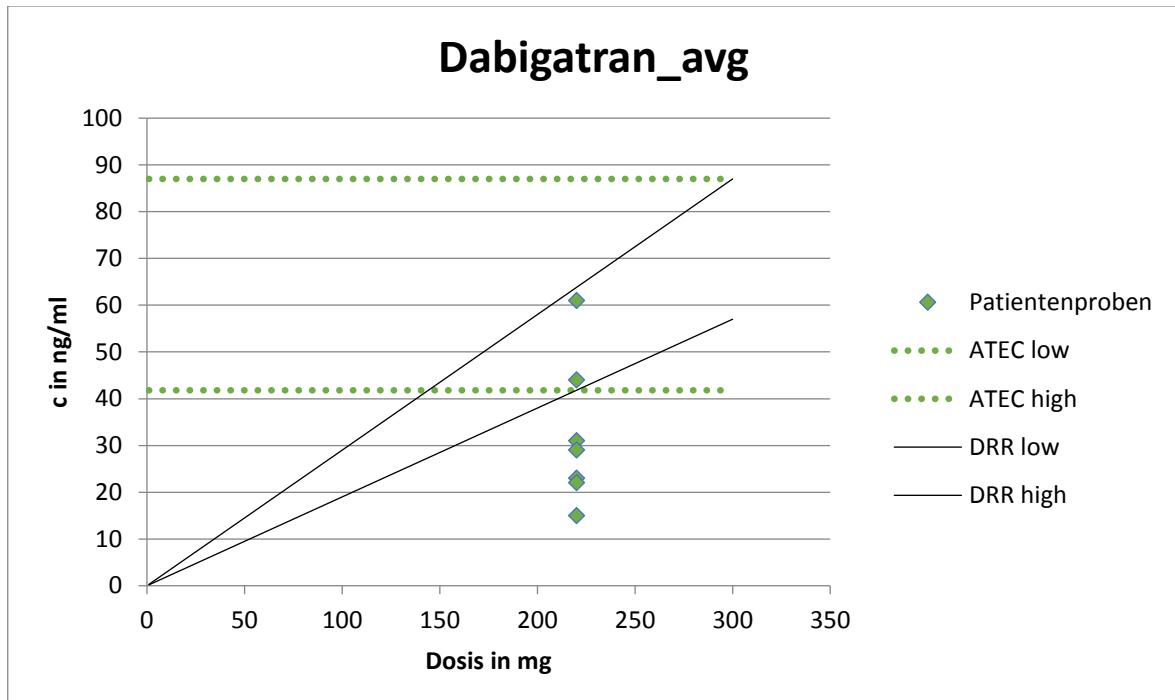


Abbildung 44: Patientenproben von Dabigatran in Relation zum DRR_{avg} und $ATEC_{avg}$

Ein PGP-Induktor war bei zwei Proben, die eine für die Dosis zu niedrige Konzentration hatten, in der Comedikation aufgelistet.

Tabelle 29: 9-Felder-Tafel für Dabigatran

		ATEC_avg		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_avg	zu niedrig	71,4% (5)	0	0
	passend	0	28,6% (2)	0
	zu hoch	0	0	0

4.6.3. Einordnung in DRR_{min} und $ATEC_{min}$

Bezogen auf den dosisbezogenen Referenzbereich der Talkonzentration lagen bei Rivaroxaban 13 Proben innerhalb und 36 Proben außerhalb. Von den 36 Proben die nicht im DRR lagen, waren 8 zu niedrig und 28 Proben zu hoch. Innerhalb des ATEC waren 30 Proben anzusiedeln und 19 außerhalb, davon war eine unterhalb und 18 oberhalb des ATEC.

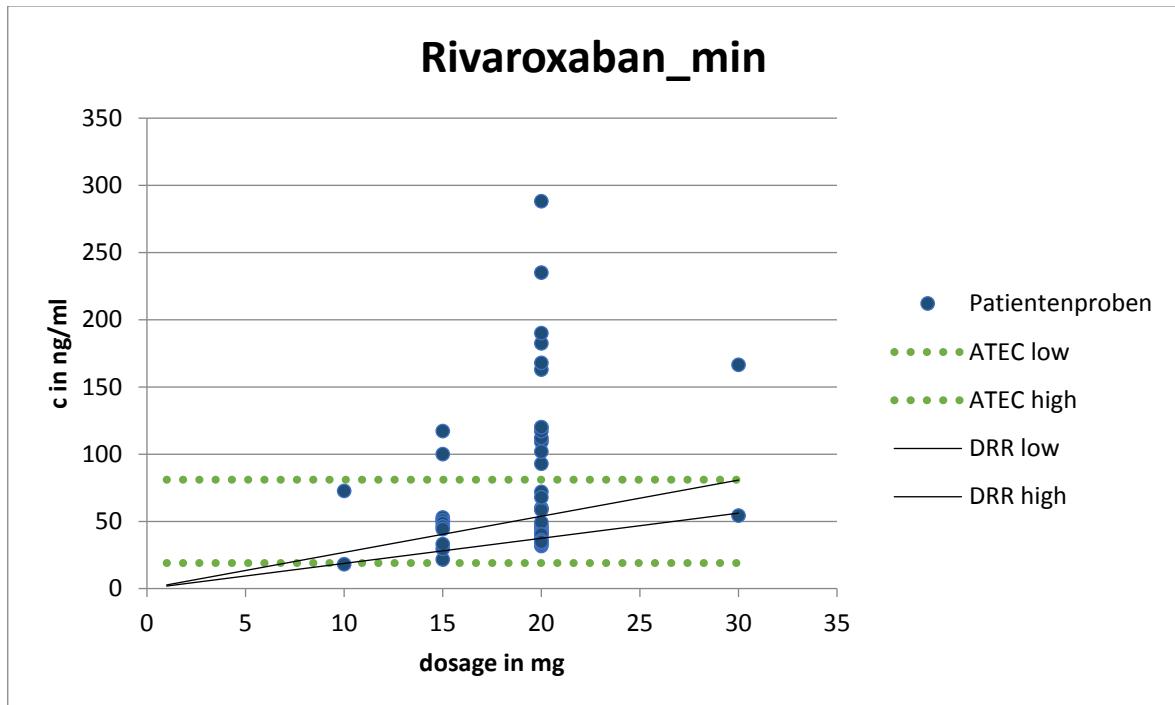


Abbildung 45: Rivaroxabanproben in Relation zu DRR_{min} und ATEC_{min}

Von den 8 Proben, die für die Dosis eine zu niedrige Konzentration hatten, waren bei 5 Proben jeweils 2 Enzyminduktoren in der Comedikation enthalten. Bei den Proben, welche den DRR überschritten, waren in 26 von 28 Fällen ein oder mehrere Enzymhemmstoffe zu finden.

Tabelle 30:9-Felder-Tafel für Rivaroxaban mit Bereichen die sich am Talspiegel orientieren

		ATEC_min		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_min	zu niedrig	2% (1)	14,3% (7)	0
	passend	0	26,5% (13)	0
	zu hoch	0	20,4% (10)	36,7% (18)

Bei Apixaban fand sich eine Probe innerhalb des DRR, eine unterhalb und 40 Proben befanden sich oberhalb. Von den insgesamt 42 Proben, wurden bei 19 Proben Konzentrationen gemessen, die innerhalb des ATEC lagen. 22 Proben lagen oberhalb und eine Probe unterhalb des ATEC.

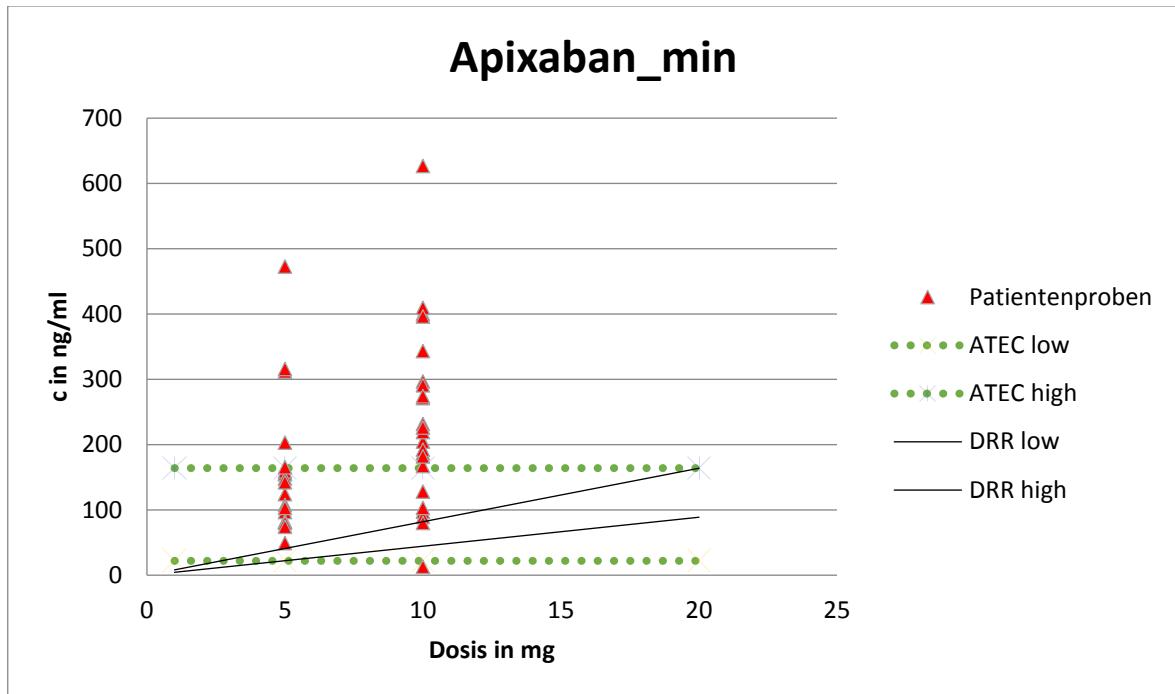


Abbildung 46: Apixabanproben in Relation zu DRR_{min} und ATEC_{min}

Bei der Probe, die den DRR unterschritt, waren zwei Enzyminduktoren in der Comedikation vermerkt. Von den 40 Proben mit Konzentrationen oberhalb des DRRs, waren bei 33 mindesten ein Enzyminhibitor in der Comedikation zu finden.

Tabelle 31: 9-Felder-Tafel für Apixaban mit Bereichen die sich am Talspiegel orientieren

		ATEC_min		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_min	zu niedrig	2,4% (1)	0	0
	passend	0	2,4% (1)	0
	zu hoch	0	42,9% (18)	52,4% (22)

Bei den 7 vermessenen Dabigatranproben hatten 5 Proben sowohl für den DRR als auch für den ATEC eine zu niedrige Konzentration. Eine Probe passte in beide Bereiche und eine Probe war oberhalb des DRR aber innerhalb des ATEC.

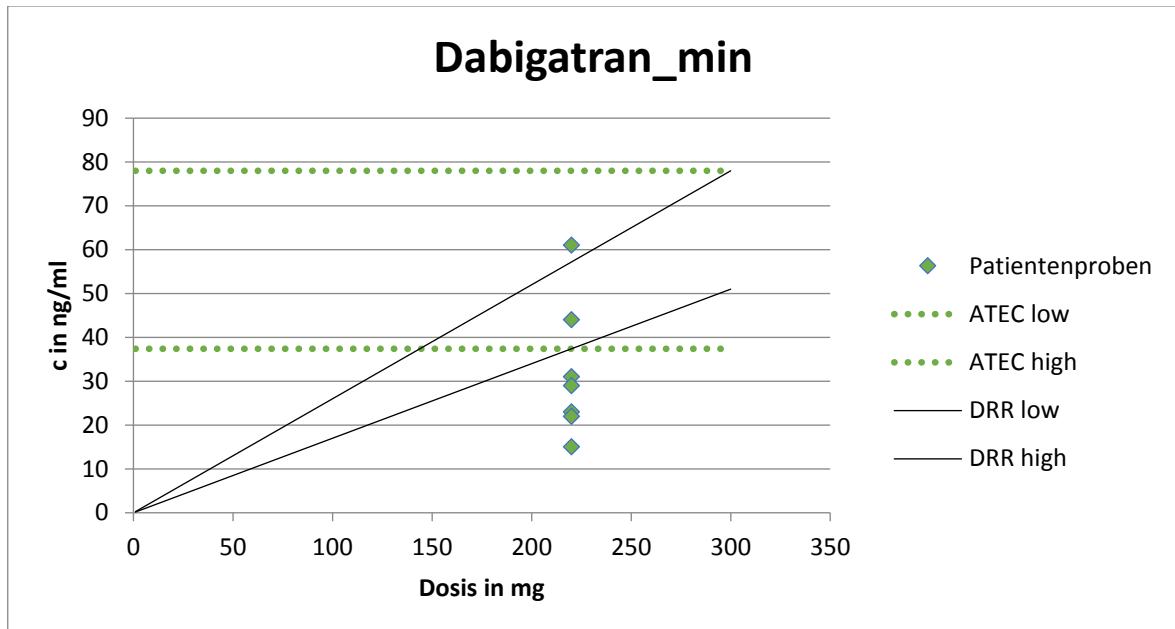


Abbildung 47: Dabigatranproben in Relation zu DRR_{min} und $ATEC_{min}$

Ein PGP-Induktor war bei zwei Proben, die eine für die Dosis zu niedrige Konzentration hatten, in der Comedikation aufgelistet. Die Probe mit der zu hohen Konzentration zeigte keine Auffälligkeiten in der Comedikation.

Tabelle 32: 9-Felder-Tafel für Dabigatran mit Bereichen die sich am Talspiegel orientieren

		ATEC_min		
		zu niedrig	passend	zu hoch
DRR_min	zu niedrig	71,4% (5)	0	0
	passend	0	14,3% (1)	0
	zu hoch	0	14,3% (1)	0

4.6.4. Vergleich der Konzentrationsbereiche

Vergleicht man, anhand der 9-Felder-Tafel, die Aufteilung der Proben in die beiden Bereiche, avg und min, ergibt sich folgendes Bild für den DRR:

Bei Rivaroxaban wechselten 12 Proben in den Bereich passend, welche zuvor als zu niedrig erkannt wurden. Zusätzlich wechselten neun Proben, die zuvor als passend eingestuft waren, in den Bereich zu hoch. Außerdem fanden sich 10 Proben jetzt im Bereich zu hoch, welche vorher als zu niedrig eingestuft waren. Außerdem wurden unter DRR_{avg} neun Proben falsch

negativ und eine Probe falsch positiv eingestuft. Bei DRR_{min} waren drei Proben falsch negativ und zwei falsch positiv. Insgesamt wurden also unter DRR_{min} sechs Proben weniger falsch negativ und eine Probe mehr falsch positiv erkannt.

Von vier Proben bei Apixaban, welche vorher in den DRR passten, überschritten nun drei den DRR. Unter beiden DRRs waren jeweils sieben Proben falsch positiv und keine falsch negativ.

Bei Dabigatran zeigte sich nur ein geringer Unterschied. Eine Konzentration, die vorher in den Bereich passte, überschritt nun den DRR. Sowohl unter DRR_{avg} als auch unter DRR_{min} waren jeweils drei Proben falsch negativ. Zusätzlich war bei DRR_{min} eine Probe falsch positiv.

4.6.5. Anwendungsbeobachtung

Von den in 4.6 beschriebenen Proben stammten 33 aus der Anwendungsbeobachtung. Insgesamt waren diese auf 12 Patienten verteilt. Von 10 Patienten gab es wie geplant drei Blutabnahmen, von jeweils einem Patienten war nur ein Messpunkt respektive zwei Messpunkte verfügbar. Bei keinem der Patienten handelte es sich um eine Neueinstellung auf ein DOAK. Blutungsbezogene UAWs traten nicht auf. In der nachfolgenden Tabelle sind die Messdaten dargestellt.

Tabelle 33: Konzentrationsverlauf der Anwendungsbeobachtung inklusive Schwankung zwischen zwei aufeinander folgenden Blutentnahmen. % bezieht sich auf den Wert des Vortages

Patient	Wirkstoff	Konzentration [ng/ml]			Schwankung [%]	
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 1-3	Tag 3-5
A19	Rivaroxaban	120	190	585	58	208
A23	Rivaroxaban	46	33	44	28	33
A25	Rivaroxaban	36	-	-	-	-
B10	Apixaban	155	155	159	0	3
B13	Apixaban	400	409	626	2	53
B18	Apixaban	182	226	80	24	-65
B19	Apixaban	82	80	74	-3	-8
B20	Apixaban	165	203	142	23	-30
B21	Apixaban	396	274	343	-31	25
B24	Apixaban	167	88	-	-47	-
C1	Dabigatran	23	31	44	35	42
C2	Dabigatran	15	22	29	47	32

Die größte Differenz sowie der größte Anstieg der Konzentration war bei Patient A19 mit 208% zu beobachten. Der größte Abfall der Konzentration war bei Patient B18 zu finden.

Hier fiel die Konzentration von zwischen den beiden Blutentnahmen um 65%. Bei sechs von zwölf Patienten war die Konzentration am letzten Tag der Anwendungsbeobachtung höher als zu Beginn und bei fünf Patienten war die Konzentration zum Schluss niedriger.

Die Comedikation änderte sich im Verlauf der Anwendungsbeobachtung bei fünf Patienten. Bei Patient C2 wurde nach der ersten Messung Torasemid abgesetzt. Bei Patient B18 wurden ebenfalls Furosemid nach dem ersten Tag abgesetzt, zusätzlich waren bei der letzten Messung Prednisolon abgesetzt und Torasemid angesetzt worden. Bei Patient B20 kam nach dem ersten Messtag Ramipril hinzu. Patient B21 erhielt bei der letzten Messung kein Spironolacton und Xipamid mehr, dafür aber zusätzlich Metronidazol und Vancomycin. Außerdem waren bei Patient B24 nach der ersten Messung Mirtazapin und Prothipendyl abgesetzt worden.

4.7. Patientenkollektiv

4.7.1. Geschlecht

In Abbildung 48 ist die Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs dargestellt. Mit 60% zu 40% waren mehr Männer als Frauen in der Population vertreten.

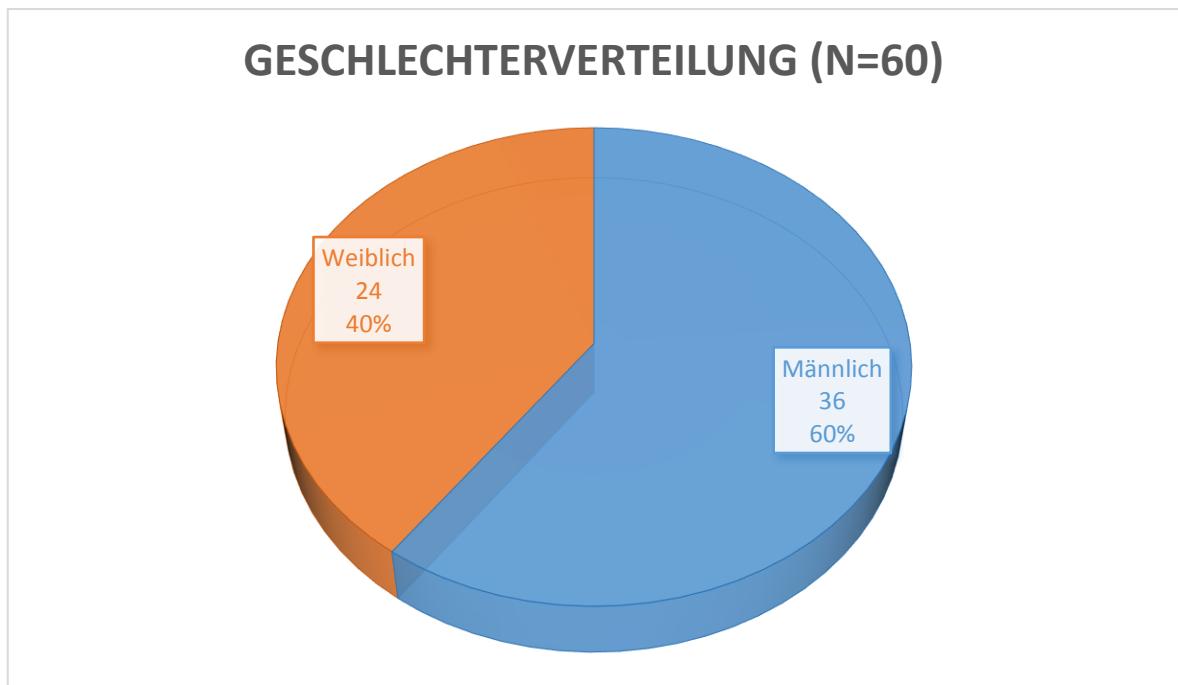


Abbildung 48: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

4.7.2. Alter

Das Durchschnittsalter betrug $69,80 \pm 12,88$ Jahre. Der jüngste Patient war 30 Jahre und der älteste 93 Jahre alt. Die Verteilung der einzelnen Altersklassen ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Bei einem Patienten fehlte die Angabe des Alters.

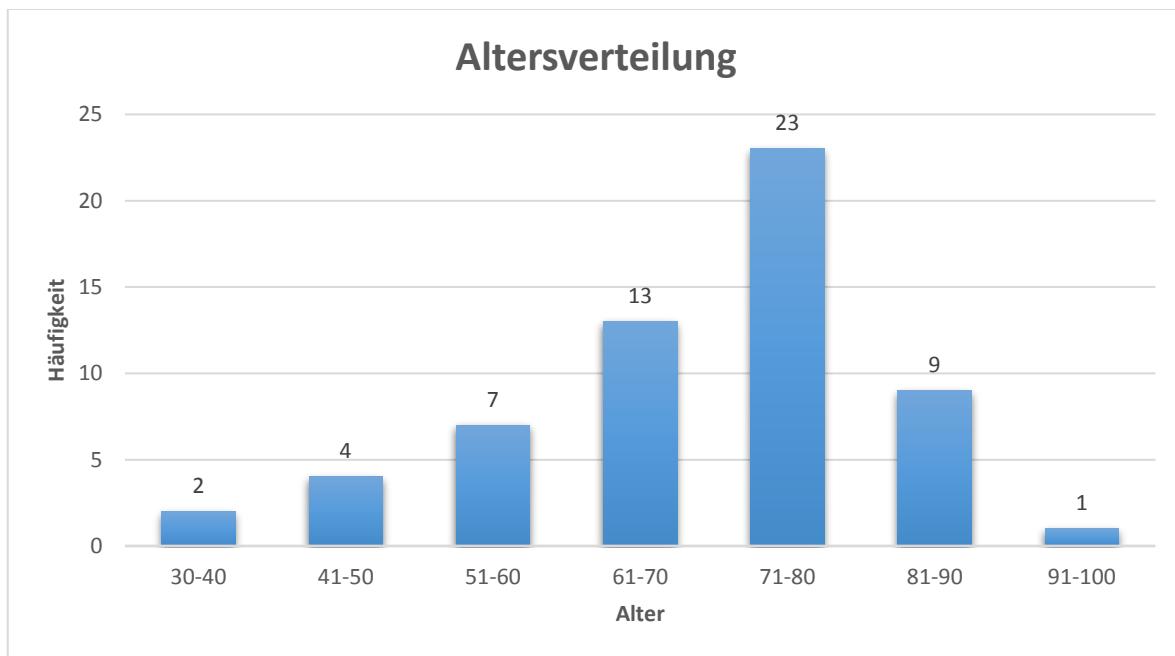


Abbildung 49: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Die meisten Patienten waren zwischen 71 und 80 Jahre alt. Insgesamt waren 76% der Patienten 65 Jahre oder älter.

4.7.3. Anzahl der Medikamente

Im Durchschnitt erhielten die Patienten $8,35 \pm 3,36$ Medikamenten. Das Maximum lag bei einem der Patienten, der mit 16 Medikamenten behandelt wurde.

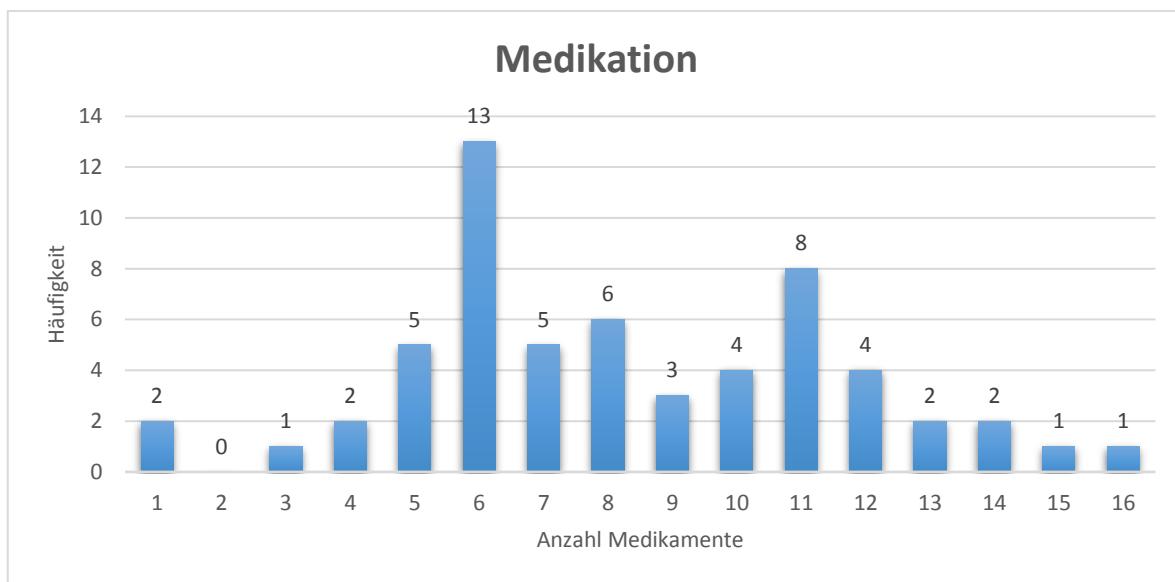


Abbildung 50: Häufigkeit der Polymedikation der Patientenpopulation

Die meisten Patienten erhielten 6 Medikamente. 91,5% erhielten 5 oder mehr Medikamente und 37% der Patienten wurden mit 10 oder mehr Medikamenten gleichzeitig behandelt.

5. Diskussion

5.1. Methodenentwicklung

5.1.1. Proteinfällung

Hier scheint eine Peakverbreiterung durch die Injektion des polaren Acetonitrils für die niedrigen Peakhöhen bei Dabigatran verantwortlich. Da Dabigatran früh, bei einem hohen Wasseranteil des Gradienten, eluiert wird, ist hier der Polaritätsunterschied zwischen Fließmittel und Probenträger stärker, so dass Dabigatran vom Acetonitril vom Anfang der Säule gespült und erst etwas später durch das Fließmittel verdünnt wird, wodurch der Peak breiter wird.

5.1.2. Injektionsvolumen

Hier hätten wir eigentlich eine kontinuierliche Verdopplung der Peakhöhe mit der jeweiligen Verdopplung des Injektionsvolumens erwartet. Eine mögliche Erklärung ist die hohe Polarität des Methanols in Bezug auf das Fließmittel, so dass hier wohl bei Volumina über 10 µl eine kritische Grenze überschritten wurde und es vermehrt zu Peakverbreiterung kam. Gerade bei Dabigatran, das sehr früh, bei Bedingungen mit hohem Wasseranteil im Gradienten, eluiert wird, war dieser Effekt deutlich zu beobachten. Weitere Gründe könnten in der Probenaufbereitung liegen, so dass bei höheren Injektionsvolumina zusätzlich auch der Anteil an Störsubstanzen, der auf die Säule kam, zunahm und so ein höheres Rauschen erzeugt wurde. Zusätzlich muss auch erwähnt werden, dass die Detektionskammer des UV-Detektors nur ein Volumen von 5 µl besitzt. Probenmengen über diesem Wert fließen also nicht auf einmal durch die Kammer, sondern werden über die Software der UHPLC zu einem Signal rechnerisch zusammengesetzt.

5.1.3. Erweiterung der Methode um VKAs und Edoxaban

Die Erweiterung der Methode um Edoxaban erscheint im Kontext des DOAK-Monitorings sinnvoll. Gerade unter dem Aspekt, dass aktuell nur eine Dosis für Edoxaban zugelassen ist, für die bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und Comedikation mit P-gp-Inhibitoren eine Halbierung dieser Dosis empfohlen wird²⁶. Aufgrund der mangelnden Marktpräsenz konnten wir noch keine Proben von Patienten messen, die Edoxaban erhielten.

Bei beiden VKAs, Warfarin und Phenprocoumon, ergibt sich ein anderes Bild. Hier ist die Bestimmung des INR weit verbreitet, klinisch etabliert und kann von den Patienten auch selbst durchgeführt werden. Aus der Literatur ergibt sich zusätzlich eine sehr schlechte Korrelation zwischen Konzentration im Blut und INR⁵⁶, was sicherlich auch dem indirekten Wirkmechanismus der Substanzen geschuldet ist. Zwar ließen sich die Substanzen mit unserer Methode detektieren, jedoch ist der therapeutische Referenzbereich von Phenprocoumon mit 1-3 ng/ml weit unterhalb der Bestimmungsgrenze der übrigen Substanzen, so dass sich eine Bestimmung im therapeutischen Referenzbereich ohne weitere Probenaufbereitung nicht bewerkstelligen lässt. Das routinemäßige Monitoring von VKAs per HPLC gegenüber dem etablierten INR-Monitoring erscheint uns hier nicht sinnvoll. Wünschenswert wäre es aber, wenn der INR nicht als bloßer Messwert, sondern analog zu unserem Ansatz zusammen mit einem klinisch pharmakologischen Befund angegeben wird.

5.2. Validierung

Apixaban zeigte, im Vergleich, den schnellsten Abbau bei Raumtemperatur sowie bei 8°C, besonders bei der niedrigsten Konzentration. Diese Stabilitätsprobleme sind aber wahrscheinlich mehr methodenbedingt als auf die Eigenschaften des Wirkstoffes zurückzuführen. Nach fünf Tagen Lagerung wurde es zunehmend schwerer die Apixaban-Peaks zu bestimmen, da mehr Hintergrundrauschen und Überlagerungen zu beobachten waren. Dies ist höchstwahrscheinlich durch die Abnahme der Serumqualität zu erklären (einzelne Proben waren teilweise stark getrübt oder begannen zu schimmeln). Deswegen konnten wir, nach fünf und sieben Tagen bei Raumtemperatur, nur noch einen Teil der Proben bestimmen (n=5 bzw. n=3 statt n=9). Gleichermaßen kann auf die Proben übertragen werden, die im Kühlschrank bei 8°C gelagert wurden, bei denen die Konzentration nach 14 Tagen abfiel. Hier trat der Zerfall erst später ein, da die Kühlung die Serumqualität länger bewahrte. Bei den von uns vermessenen Patientenproben, welche Apixaban enthielten, konnten wir dieses Phänomen nicht beobachten⁵⁵.

Dabigatranetexilat zeigte unter keiner Lagerbedingung ausreichende Stabilität, da die im Serum vorkommenden Esterasen die beiden Ester des Prodrugs wohl spalten. Wir konnten aber keine Dabigatran-Peaks in Dabigatranetexilatproben oder höhere Konzentration von Dabigatran in Proben, die sowohl den Wirkstoff, als auch das Prodrug enthielten, feststellen. Möglicherweise wird nur einer der beiden Ester gespalten oder es werden andere Zwischenprodukte gebildet.

5.3. Vergleich mit anderen Methoden

Die aktuell verfügbaren Koagulations-Assays sind nicht sinnvoll für die Konzentrationsbestimmung der DOAKs einsetzbar, da sie entweder eine schwache Korrelation in Bezug zur Konzentration haben, schlechte Sensitivität oder eine starke Abhängigkeit von den eingesetzten Reagenzien zeigen^{57,58}. Die einzige Ausnahme bildet der HEMOCLOT®-Test für die Bestimmung von Dabigatran. Dieser erlaubt jedoch nur eine Bestimmung von Konzentrationen über 50 ng/ml und verfügt über eine schlechte Genauigkeit bei Konzentrationen unterhalb oder nahe dieser Schwelle⁵⁹. Chromogene-Assays mit denen die anti-FXa Aktivität bestimmt werden kann, bieten eine geeignete Methode um die Konzentration von Apixaban und Rivaroxaban zu bestimmen. Diese Assays sind kommerziell erhältlich und weit verbreitet. Sie haben jedoch Limitierungen bezüglich ihrer Spezifität sobald sowohl Heparine als auch DOAKs im Blut zu finden sind, da beide dieser Wirkstoffklassen den Faktor Xa beeinflussen. Impräzision und Ungenauigkeit sind vergleichbar mit HPLC-Methoden⁵⁹. Ein großer Vorteil von chromatographischen Methoden besteht in der Möglichkeit alle DOAKs mit nur einer Methode zu bestimmen, während bei den Assay mindesten zwei verschiedene System nötig sind, um einmal Dabigatran und einmal Apixaban, Rivaroxaban oder Edoxaban zu quantifizieren.

Der Vergleich zwischen HPLC-Methoden mit UV/VIS Detektion, wie der von uns entwickelten und mit Massenspektrometrie (MS) ist mehr eine finanzielle Frage. Obwohl mit MS-Kopplung grundsätzlich kürzere Laufzeiten und niedrigere Bestimmungsgrenzen erreicht werden können, benötigen diese Art von Anlagen meist einen höheren Wartungsaufwand und haben höhere Anschaffungs- und Verbrauchsmaterialkosten. Wie mit der von uns validierten Methode gezeigt werden konnte, erreichen Methoden mit UV-Detektion völlig zufriedenstellende Werte bei Genauigkeit und Präzision und besitzen eine ausreichende Bestimmungsgrenze um einen Großteil der Arzneistoffe in ihrem therapeutischen Referenzbereich quantifizieren zu können. Damit bietet die Methode eine wertvolle Alternative für das Routinemonitoring in kleineren Laboren, die bereits eine HPLC mit UV/VIS besitzen oder die für die MS-Detektion nicht die nötigen finanziellen Mittel besitzen.

Im Vergleich zu den von Schmitz et al.⁶⁰ und Gous et al.⁶¹ beschriebenen Methoden bietet unsere Methode zusätzlich die Möglichkeit das Prodrug von Dabigatran, Dabigatranetexilate zu bestimmen. Routinemäßig scheint dessen Monitoring wegen der gezeigten schlechten Stabilität und fehlenden pharmakologischen Aktivität zwar nicht sinnvoll. Jedoch könnte die

Quantifizierung in bestimmten Compliancefragen sinnvoll sein. Hierfür sollte aber die Bestimmung zeitnah nach der Medikamentengabe erfolgen. In den von uns gemessenen Patientenproben, die Dabigatran enthielten, konnte kein Dabigatranetexilat nachgewiesen werden.

5.4. Vergleich zwischen DRR für mittlere Tages- und Talkonzentration

Vergleicht man die beiden Referenzbereiche miteinander lässt sich festhalten, dass sich die Berechnung des DRR_{avg} grundsätzlich einfacher gestaltet. Hier fließen lediglich die totale Clearance und die Bioverfügbarkeit an pharmakokinetischen Parametern in die Formel ein. So lässt sich auch mit wenigen Angaben ein robuster Schätzwert errechnen, der auch bei Aufteilung der Tagesdosis in unterschiedlich große Einzeldosen verlässlich die Konzentration berechnen kann. Kritisch muss jedoch die Berechnung der mittleren Tageskonzentration gesehen werden, obwohl es im TDM üblich ist das Blut im Talspiegel abzunehmen. Besonders deutlich wird dies vor allem bei Substanzen deren Dosierintervall größer als die Halbwertszeit ist (vgl. Rivaroxaban und Edoxaban). Hier kommt es bei Berechnungen von DRR_{avg} zu einer Überschätzung des Erwartungswertes bei Blutabnahme im Talspiegel.

Die Berechnung von DRR_{min} gestaltet sich im Vergleich komplexer, da hier auch noch die Halbwertszeit sowie der Zeitabstand zur letzten Einnahme mit einfließen. Dies ermöglicht jedoch die Abschätzung der exakten Konzentration im Talspiegel sofern der Zeitpunkt der Blutentnahme und der letzten Medikamenteneinnahme bekannt ist. Grundsätzlich ermöglicht die Formel die Berechnung der zu erwartenden Konzentration im pharmakokinetischen Gleichgewicht zu jedem Zeitpunkt im Tagesverlauf. DRR_{min} ist damit stark abhängig von der Vollständigkeit der angegebenen pharmakokinetischen Parameter.

Kritisch für beide Referenzbereiche sollte die Berechnung für Präparate mit veränderter Wirkstofffreisetzung gesehen werden. Hier muss mit gesonderten Clearancewerten gearbeitet werden. Bei DRR_{min} müssen hierbei auch die übrigen pharmakokinetischen Parameter präparatspezifisch angepasst werden.

Durch die Möglichkeit zwei dosisbezogene Referenzbereiche für die DOAKS zu berechnen, stellt sich letztendlich die Frage welcher besser geeignet ist, um mögliche Risikopatienten zu identifizieren. Das heißt Individuen zu erkennen, welche aufgrund ihrer von der Norm abweichenden Eliminationsrate gefährdet sind zu hohe oder zu niedrige Konzentration aufzubauen. Diese sollten außerhalb des dosisbezogenen Referenzbereiches fallen. Die Qualität

eines Referenzbereiches kann also dadurch quantifiziert werden, wie zuverlässig diese Risikopatienten erkannt werden.

Bei Dabigatran ergab sich ein neuer Risikopatient unter Anwendung des DRR_{min} , der nun eine für die Dosis zu hohe Konzentration aufwies. Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass der Patient bereits 79 Jahre alt war. Daraus lässt sich vermuten, dass die Nierenfunktion des Patienten bereits abgenommen hat und dadurch für die Dosis zu hohe Konzentrationen aufgebaut werden. Mit diesem Hintergrund würden wir den Patienten als Risikopatienten einstufen.

Betrachtet man die Apixabankonzentrationen zeigen sich drei Patienten, die nun nicht mehr zur Normalpopulation zählen, da sie den DRR_{min} überschreiten. Diese drei Patienten hatten jeweils zwei bzw. drei CYP-Inhibitoren in ihrer Comedikation. Zusätzlich hatten zwei dieser Patienten das Alter von 80 Jahren überschritten, was in Zusammenhang mit eingeschränkter Nierenfunktion gesehen werden kann. Wir würden auch diese Patienten als Risikopopulation einstufen, welche unter DRR_{avg} , falsch negativ, zur Normalpopulation gezählt wurden.

Bei Rivaroxaban zeigte sich die größte Umverteilung. Hier muss jedoch die Besonderheit beachtet werden, dass Rivaroxaban trotz einer Halbwertszeit von rund 12 h nur alle 24 h appliziert wird. Daraus ergibt sich eine große Diskrepanz zwischen dem gemessenen Talspiegel und der zu erwartenden mittleren Konzentration unter Annahme von DRR_{avg} . Die real gemessenen Werte sind viel niedriger. Deutlich wird dies bei der Betrachtung der Werte, die unter beiden Bereichen für die Dosis zu niedrig waren. Unter DRR_{avg} war hier mit 61% der Großteil der Population anzutreffen. Zwar ließ sich in 17 Fällen ein Enzyminduktor in der Comedikation finden, jedoch entfielen davon sechs auf die Annahme, dass CYP3A4 durch Rauchen induziert wird, was in der Literatur nicht belegt ist. Bei 19 von insgesamt 30 Proben von einem möglichen Complianceproblem auszugehen, erschien unrealistisch. Unter DRR_{min} waren lediglich noch acht Patienten in dieser Risikogruppe zu finden. Von diesen erhielten fünf Patienten jeweils zwei Induktoren gleichzeitig und bei zwei Patienten war bereits von Seiten der Klinik eine Non-Compliance vermutet worden. Es fallen lediglich zwei Patienten auf, für die kein spezieller Grund für die Unterschreitung gefunden werden konnte. Im Vergleich erscheint diese Risikoeinteilung weitaus plausibler.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Population, die nun unter DRR_{min} eine für die Dosis zu hohe Konzentration hatte, die noch unter DRR_{avg} normal oder gar zu niedrig war. Bis auf zwei Patienten, hatten in dieser Gruppe nun alle mindesten einen Enzymhemmstoff in der

Comedikation, 20 der 28 Patienten sogar zwei oder mehr Hemmstoffe. Auch die Einstufung dieser Patienten als Risikogruppe scheint unter den genannten Umständen plausibel.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Einordnung bzw. Vorhersage der Konzentration in Bezug auf die Dosis für die direkten oralen Antikoagulanzen unter der Berechnung der Talkonzentration plausibler und die Zuordnung von Risikopatienten zuverlässiger ist. Hier wurden sechs Individuen weniger als falsch negativ eingestuft und zwei mehr als falsch positiv. Wir empfehlen deshalb die Berechnung von DRR_{min} sowie $ATEC_{min}$.

Es sollte jedoch für Rivaroxaban angemerkt werden, dass diese Berechnung auf der Annahme basiert, dass die Verabreichung der Tagesdosis nur einmal täglich erfolgt. Sollte dies nicht der Fall sein, muss die Formel dementsprechend angepasst werden.

5.5. Patientenproben

5.5.1. Interindividuelle Schwankung

Wie ist die gezeigte interindividuelle Schwankung der Konzentration nun im Hinblick auf das Marketing der festen Dosis zu sehen? Eine koreanische Studie zu Warfarin zeigte unter einem Kollektiv von 74 Patienten eine Schwankung der Konzentration um den Faktor 7,7 bis 9,2⁶². Ebenso konnte für das Antipsychotikum Quetiapin eine Variabilität der Konzentration, bei gleicher Dosis, um den Faktor 9-10 gezeigt werden⁴⁷. Beide sind Arzneistoffe bei denen die Dosisanpassung individuell nach gemessener Konzentration bzw. INR des jeweiligen Patienten erfolgt. Da die von uns gemessenen interindividuellen Konzentrationschwankungen der DOAKs in der gleichen Größenordnung vorzufinden waren, kann von einer „sicheren“ Pharmakokinetik keine Rede sein. Der vorgegebene fixed dose Ansatz für die Therapie ist damit nicht haltbar.

5.5.2. Anwendungsbeobachtung

Die zu beobachtenden Schwankungen der Konzentration bei einzelnen Patienten können vielfältiger Natur sein. Zum einen muss die methodenbedingte Impräzision der Messung berücksichtigt werden. Zum anderen darf davon ausgegangen werden, dass der Abstand zwischen Medikamenteneinnahme und Blutabnahme nicht über alle drei Messpunkte konstant

war. Nimmt man eine zusätzliche Toleranz von ± 2 h für den Abstand zwischen letzter Einnahme und Blutabnahme an, ergibt sich eine Schwankung von 10-20% für die zu erwartende Konzentration.

Bei Patienten, bei denen die Konzentration abfiel und danach wieder stark anstieg, kann eigentlich nur ein Complianceproblem als Erklärung gesehen werden. Interessant sind hierbei auch die beiden Patienten, C1 und C2, die Dabigatran erhielten. Hier stieg die Konzentration im Verlauf der Beobachtung stetig an. Da es keine Neueinstellung war liegt die Vermutung nahe, dass vor Aufnahme in die Anwendungsbeobachtung die Einnahme wohl nur unregelmäßig stattfand.

Eine enzymatische Ursache für eine Konzentrationsänderung kann höchstens bei Patient B24 vermutet werden. Hier fiel nach Absetzen des CYP-Hemmstoffes Mirtazapin die Konzentration um 43% ab. Warum die Konzentration von Patient A19 so stark anstieg, konnte anhand der Daten nicht geklärt werden. Eventuell wurde einer der CYP-Hemmstoffe in der Comedikation kurz vor Aufnahme angesetzt. Denkbar wäre hier auch eine Übercompliance oder falscher Zeitpunkt der Blutabnahme.

5.5.3. Rivaroxaban

Tendenziell fiel auf, dass der Großteil (57%) der Rivaroxabanproben oberhalb des dosisbezogenen Referenzbereiches (DRR_{min}) lag. Mit Blick auf die Altersverteilung und die zahlreichen Enzyminhibitoren in der Comedikation ist dies nicht unerwartet.

5.5.3.1. Patient A24

Auffällig war die Probe des Patienten A24. Hier wurde bei einer Dosis von 20 mg eine Konzentration von 288 ng/ml gemessen. Dies entspricht einer Überschreitung des DRR_{avg} um 123% (129 vs. 288 ng/ml). Der Patient erhielt zusätzlich Amiodaron. Amiodaron und dessen Metabolit, N-desmethyl-Amiodaron, werden in der Literatur als potente Hemmstoffe von CYP3A4^{63,64} sowie der PGP-Pumpe^{64,65} beschrieben. Wir vermuten, dass die starke Erhöhung der Konzentration durch Amiodaron verursacht wurde. Zusätzlich erhielt der Patient mit Ranitidin und Simvastatin zwei zusätzliche CYP3A4-Inhibitoren, die diesen Effekt zusätzlich verstärkt haben können.

5.5.3.2.Patient A31

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei A31, bei dem eine Konzentration von 235 ng/ml unter einer Dosis von 20 mg gemessen wurde. Auch hier wurde die obere Schwelle des DRR um fast das doppelte überschritten. Hier war in der Comedikation Dronedaron, der Nachfolger des Amiodaron. Auch Dronedaron wird als CYP3A4-Hemmstoff und Inhibitor der PGP-Pumpe beschrieben und konnten als irreversibler Inaktivator des CYP-Metabolismus von Rivaroxaban identifiziert werden⁶⁴. Die hohe Konzentration kann zusätzlich durch die CYP3A4-Hemmung des Mirtazapin verstärkt worden sein, welches der Patient ebenfalls erhielt.

5.5.3.3.Patient A19

Interessant auch die Probe mit der höchsten gemessenen Konzentration von Rivaroxaban mit 585 ng/ml. Von diesem Patienten, der Teil der Anwendungsbeobachtung war, waren drei Proben vorhanden. An Tag 1 wurde ein Wert von 120, an Tag 3 ein Wert 190 und schließlich an Tag 5 ein Wert von 585 ng/ml gemessen. Hier zeigte sich ein deutlicher Akkumulationseffekt. Zwar hatte der Patient mit Mirtazapin, Sitagliptin, Simvastatin und Quetiapin gleich vier CYP3A4-Inhibitoren in seiner Comedikation, jedoch blieben die angesetzten Arzneistoffe über den Messzeitraum unverändert. Aufgrund dessen und der deutlichen Akkumulation vermuten wir hier eine Einschränkung der Nierenfunktion, welche aber nicht final abgeklärt werden konnte.

5.5.4. Apixaban

Bei Apixaban zeichnete sich ein viel extremeres Bild ab. Hier waren nur 2,4% aller Proben in den dosisbezogenen Referenzbereich einzuordnen, während 95% selbigen überschritten. Dies veranlasste uns zu überprüfen, ob der verwendete Clearancewert plausibel war. In der offiziellen Produktinformation der European Medicines Agency (EMA) ist ein totale Clearance von 3300 ml/h (keine Standardabweichung angegeben) zu finden⁶⁶. Daraus berechnet sich eine dosisbezogene Konzentration von 63 ng/ml für 10 mg sowie 32 ng/ml für 5 mg. Zusätzlich lässt sich in Frost et al's²² Arbeit eine Clearance von 2260 ± 475 ml/h für Patienten die älter als 65 Jahre sind, finden. Für diesen Wert lässt sich ein Referenzbereich 76-116 ng/ml bei einer Dosis von 10 mg und ein Referenzbereich von 38-58 ng/ml bei einer 5 mg Dosis ermitteln. Diese Konzentrationen passen in den von uns vorgeschlagenen Referenzbereich wobei der für die über 65jährigen, aufgrund der altersbedingten Abnahme der

Clearance, nach oben hin überlappt. Somit können wir davon ausgehen, dass der von uns vorgeschlagene Referenzbereich valide ist.

Wodurch lässt sich nun die ungewöhnliche Verteilung unserer Proben erklären? Betrachtet man die Patientenpopulation fällt auf, dass mehr als zwei Drittel älter als 65 sind und somit wie oben gezeigt mit einer niedrigeren Clearance zu rechnen ist. Während die Metabolisierung von Apixaban hauptsächlich über CYP3A4/5 abläuft, konnte gezeigt werden, dass auch CYP1A2, 2C9, 2C19 und 2C8 an der Verstoffwechselung beteiligt sind²³. Dies erhöht natürlich die Wahrscheinlichkeit für potentielle Arzneimittelinteraktionen. So waren bei 81% der Proben, die den DRR überschritten, mindesten ein CYP-Hemmstoff zu finden, bei 49% der Proben sogar drei oder mehr. Deshalb führen wir die in der Gesamtheit, für die Dosis zu hohe Konzentrationen auf eine Kombination von altersbedingter Abnahme der Clearance mit Enzymhemmung durch Comedikation zurück.

5.5.4.1.Patient B2

Von Patient B2 waren zwei Proben vorhanden, die mit Konzentrationen von 312 und 316 ng/ml bei einer Dosis von 5 mg, weit über dem zu erwartenden Referenzbereich lagen. Als Risikofaktoren waren hier das Alter von 83 sowie mit Clozapin, Simvastatin und Torasemid drei potentielle CYP-Hemmstoffe aufgefallen. Interessanterweise waren von diesem Patienten auch zwei Konzentrationsbestimmungen von Clozapin vorhanden, die mit 247 und 284 ng/ml dem 4,1- bzw. 4,2fachen der zu erwartenden Konzentration bei einer Dosis von 50 mg Clozapin entsprachen. Hier liegt der Verdacht nahe, dass bereits eine Funktionsstörung der Niere oder Leber bestand, welche für den starken Anstieg der Konzentrationen verantwortlich war und noch zusätzlich durch die Arzneimittelinteraktion verstärkt wurde.

5.5.4.2.Patient B24

Bei Patient B24 waren zwei Proben vorhanden, welche im Abstand von zwei Tagen abgenommen wurden. Während bei der Bestimmung der ersten Probe noch ein Wert von 167 ng/ml gemessen wurde und somit weit über der zu erwarteten Konzentration von 53-97 ng/ml lag, ergab sich für die zweite Probe eine Konzentration von 89 ng/ml, die sich sehr gut in den DRR einfügt. Betrachtet man die Comedikation, welche mit Amiodaron, Mirtazapin, Clozapin und Valproinsäure gleich vier CYP-Hemmer enthält, erscheint die zu hohe Konzentration nicht unplausibel. Bei der zweiten Probe war Mirtazapin inzwischen

abgesetzt und somit einer der vier Hemmstoffe entfernt worden. Ob dadurch die CYP-Hemmung soweit abgeschwächt wurde, dass die Konzentration sich halbierte ist nicht völlig auszuschließen. Möglicherweise wurde nach der ersten Probenentnahme eine Einnahme von Apixaban vergessen und durch die weiter anhaltende Inhibition des CYP-Metabolismus befand sich die Konzentration trotzdem im DRR.

5.5.5. Dabigatran

Bei den Proben die sich unterhalb des DRR befanden vermuteten wir entweder Complianceprobleme oder den Einfluss von PGP-Induktoren. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass die fünf Proben die unterhalb des DRR lagen von nur zwei Patienten stammen. Die Konzentrationen waren hier gleichbleibend niedrig. Ein Rückschluss auf die Güte der Clearance kann durch den Einschluss von nur drei Patienten nicht gezogen werden. Da Dabigatran hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden wird und das CYP-System mit keinem merklichen Anteil an der Metabolisierung beteiligt ist¹⁵, ergibt sich hier grundsätzlich weniger Potential für Arzneimittelinteraktionen mit Ausnahme von Arzneistoffen, welche die Aktivität des P-gp beeinflussen¹⁶.

5.5.5.1.Patient C1

Bei Patient C1 standen 3 Konzentrationsmessungen zur Verfügung. Die Konzentration stieg von 23 ng/ml am ersten Tag, über 31 ng/ml an Tag 2, auf 44 ng/ml an Tag 5 an. Da sich die Comedikation im Verlauf nicht änderte, vermuten wir hier, dass vor der ersten Probenentnahme eine Einnahme vergessen wurde und dann über unseren Beobachtungszeitraum wieder regelmäßig eingenommen wurde. Einen Induktionseffekt von Levothyroxin auf P-gp⁶⁷ konnten wir hier nicht feststellen.

5.5.5.2.Patient C2

Patient C2, der ebenfalls drei auswertbare Proben hatte, zeigte ein ähnliches Bild. Hier stieg die Konzentration von 15 auf 29 ng/ml im Verlauf von fünf Tagen an, lag jedoch zu keinem Zeitpunkt innerhalb des DRR. Dieser Anstieg deute ebenfalls auf ein Complianceproblem hin. Wahrscheinlich wurden hier vor Einschluss in die Anwendungsbeobachtung ein oder mehrere Dosen ausgelassen und dann wegen der anstehende Konzentrationskontrolle wieder regelmäßig eingenommen.

5.6. Bewertung des Monitorings bei direkten oralen Antikoagulanzen

Klinische Studien, welche gemessene Konzentrationen in Relation zu klinischen Endpunkten setzen, existieren nicht. Folglich gibt es auch keine definierten therapeutischen Referenzbereiche. Einzige Ausnahme ist hier Dabigatran mit einer Studie von Reilly et al. welche Patienten mit Vorhofflimmern untersuchte⁴¹. Basierend auf dieser Studie war ein therapeutischer Referenzbereich von 40-200 bzw. 40-215 ng/ml in Diskussion.^{3,41}

Die von uns berechneten dosisbezogenen Referenzbereiche können grundsätzlich Auskunft darüber geben, ob ein Patient aufgrund von Complianceproblemen, ungewöhnlichem Metabolisierungsstatus, Arzneimittelinteraktionen oder Schädigung der Ausscheidungsorgane von der zu erwartenden Konzentration für die eingenommene Dosis abweicht. Schlussfolgerungen über den therapeutischen Effekt bei Über- oder Unterschreiten der einzelnen dosisbezogenen Referenzbereiche oder Erreichen eines Referenzbereiches, der einer anderen Indikation entspricht lassen sich nach aktuellem Stand nicht treffen. Zwar lässt sich vermuten, dass ein Patient, der den Konzentrationsbereich einer anderen Indikation erreicht, ein schlechteres Nutzen-Risiko-Verhältnis hat, jedoch fehlen für qualitative Aussagen darüber schlichtweg Studien, die Konzentrationen in Relation zu klinischen Endpunkten setzen. Dafür ist auch die individuelle Risikoabschätzung eines einzelnen Patienten viel zu variabel. Zusätzlich sollte auch angemerkt werden, dass diese Überlegungen auf den Dosisfindungsstudien basieren. Patienten, die dort mit einer festen Dosis untersucht wurden, müssen nicht zwingend auch in den von uns kalkulierten Referenzbereichen gelegen haben. Welche Konzentrationen bei Patienten, die entweder Blutungen erlitten oder Thrombosen entwickelten, steht wieder auf einem ganz anderen Blatt.

Der von uns vorgeschlagene ATEC ist als Sicherheitsbereich gedacht. Er überspannt die Konzentrationen aller zugelassenen Dosierungen, welche bei 68% der Normalpopulation zu erwarten sind. Folglich schlossen wir daraus, dass in diesem Bereich eine therapeutische Wirkung, hier die Antikoagulation, gesichert ist, jedoch bei Unterschreiten die Gefahr besteht, dass der Effekt ausbleibt und beim Überschreiten die Blutungsgefahr überproportional steigt. Vergleichen wir nun unseren ATEC von Dabigatran, der 37-74 ng/ml beträgt, mit dem vorgeschlagenen Wert der Reilly-Studie von 40-215 ng/ml. Während die untere Grenze minimal voneinander abweicht, beträgt das obere Limit knapp das dreifache unseres vorgeschlagenen Wertes. Wie wurde diese obere Grenze nun in der Studie festgelegt? Basis hierfür war der Median des Talspiegels der 300 mg Dosis, welcher 88 ng/ml betrug. Anschließend wurde simuliert ab welcher Konzentration sich die Wahrscheinlichkeit von schweren

Blutungen verdoppelte. Dieser Punkt wurde bei 210 ng/ml erreicht, die Blutungsrate war unter dieser Konzentration von 4% auf 8% angestiegen. Die Übertragbarkeit dieses Ergebnis, also die Erhöhung bzw. Verdreifachung der oberen Schwelle des ATEC, auf Rivaroxaban und Apixaban ist allein schon wegen des unterschiedlichen Wirkmechanismus, sowie der Potenz der einzelnen Substanzen fragwürdig. Wir empfehlen für Apixaban und Rivaroxaban unseren ATEC als Sicherheitsbereich, bei Über- oder Unterschreitung sollte die Dosis entsprechend angepasst werden. Bei Dabigatran würden wir anhand der Datenlage den Wert von 40-215 ng/ml empfehlen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit erheblichen interindividuellen Schwankungen der Konzentration bei ein und derselben Dosis zu rechnen ist. Folglich ist auch mit einem unterschiedlich starken pharmakologischen Effekt beim Patienten zu rechnen. Da die Hersteller zwar bei eingeschränkter Nierenfunktion eine Dosisreduktion und damit auch eine Konzentrationsreduktion empfehlen, ist dieser Grundsatz wohl bekannt. Dass jedoch andere Faktoren, die ebenfalls zu hohen oder zu niedrigen Konzentration führen völlig ausgeklammert werden und keine Konzentrationskontrolle empfohlen ist, scheint gerade bei Arzneimitteln, die in die Blutgerinnung eingreifen, wo jedes Ausbleiben oder Überschießen der gewünschten Wirkung potentiell letal sein kann, völlig paradox.

Es muss hier auch festgehalten werden, dass die direkten oralen Antikoagulanzien, wie ja auch in den Studien durch Nicht-Unterlegenheit gezeigt werden konnte, per se nicht schlecht sind. Die zielgerichtete Entwicklung solcher Wirkstoffe ist wichtig und notwendig. Leider muss man bei Betrachtung des Gesamtbildes den Herstellern den Vorwurf machen, dass im Zuge der Entwicklung Aspekte der Arzneimittelsicherheit zugunsten einer stärkeren Marketingstrategie geopfert wurden.

Auch gestalten sich Dosisanpassungen in der Praxis problematisch. So sind Dosisanpassungen, die von der zugelassenen Dosierung für die jeweilige Indikation abweichen, strikt genommen off-Label. Außerdem ist die auf dem Markt erhältliche Auswahl an Wirkstärken beschränkt, so dass bei nötiger Unterschreitung der niedrigsten auf dem Markt gewählten Dosierung nur die Teilung der Tablette übrig bliebe, welche über keine dafür vorgesehenen Bruchrillen verfügt. Bei Dabigatran, welches nur in Kapselform auf dem europäischen Markt verfügbar ist, stellt sich dadurch eine zusätzliche Problematik.

Abschließend lässt sich sagen, dass zumindest eine grobe Risikoabschätzung mit Hilfe des ATEC möglich ist. Eine Konzentrationskontrolle kann für Risikopatienten durchaus sinnvoll

sein. Eine individualisierte Therapie über das Monitoring der Konzentration, unter Risikoabschätzung der jeweiligen Erkrankung des Patienten, ist aktuell nicht möglich. Hier muss gefordert werden, dass die Hersteller weitere Studien auf Basis von Wirkstoffkonzentrationen durchführen, die eine weitere Optimierung der Therapie ermöglichen können.

6. Zusammenfassung

1. Es wurde eine schnelle, robuste UHPLC-Methode zur Quantifizierung von Apixaban, Rivaroxaban, Dabigatran, sowie dessen Prodrug Dabigatranetexilat entwickelt und validiert. Es konnte die Linearität für alle Substanzen in einem Bereich von 20 – 300 ng/ml gezeigt werden. Die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze lagen für Apixaban bei 4,49 und 16,47 ng/ml, für Rivaroxaban bei 4,18 und 15,39 ng/ml, für Dabigatran bei 4,12 und 15,19 ng/ml sowie für Dabigatranetexilat bei 5,36 und 19,43 ng/ml. Dabigatran und Rivaroxaban waren über einen Zeitraum von einem Monat unter Raumtemperatur und 8°C stabil. Apixaban zeigte keine nennenswerten Stabilitätsprobleme nach 72h bei Lagerung unter Raumtemperatur und nach sieben Tage unter 8°C. Für Dabigatranetexilat konnte unter keiner Lagerbedingung ausreichende Stabilität nachgewiesen werden.

Mit der Methode konnten erfolgreich 98 Patientenproben gemessen werden. Bei den gemessenen Proben konnten keine Interferenzen mit anderen Arzneistoffen beobachtet werden.

2. Mit der gleichen Methode lässt sich auch Edoxaban bestimmen. Zusätzlich können auch Phenprocoumon und Warfarin detektiert werden. Für diese Substanzen wurde die Methode jedoch nicht validiert. Bei den Vitamin-K-Antagonisten ist der Nutzen der Wirkstoffkonzentrationsbestimmung fragwürdig. Aus der Literatur ergibt sich eine sehr schlechte Korrelation zwischen Konzentration im Blut und INR⁵⁶, was sicherlich auch dem indirekten Wirkmechanismus der Substanzen geschuldet ist. Jedoch sollte festgehalten werden, dass die Angabe des Messwertes inklusive Befund der Angabe des reinen Messwertes, sei es nun INR oder Konzentration, mehr Informationen für den Kliniker liefert.
3. Es wurde im Rahmen der Arbeit ein dosisbezogener Referenzbereich für die mittlere Tageskonzentration sowie für die Talkonzentration berechnet. Nach unseren Ergebnissen war die Einordnung in den dosisbezogenen Referenzbereich basierend auf der Talkonzentration zielführender, um Risikopatienten zu erkennen. Hierbei wurden sechs Patienten, die zuvor falsch negativ eingestuft waren, nun korrekt eingeordnet.

Zwar wurden hier auch zwei Patienten mehr als falsch positiv erkannt, jedoch war in der Gesamtheit der Wechsel von Proben innerhalb der 9-Felder-Tafel unter DRR_{min} plausibler.

Zusätzlich wurde von uns ein angenommener therapeutisch wirksamer Konzentrationsbereich definiert. Dieser Konzentrationsbereich wird aus der niedrigsten und höchsten Schwelle des dosisbezogenen Referenzbereiches, für alle zugelassenen Dosierungen gebildet. In diesem Konzentrationsbereich kann davon ausgegangen werden, dass eine therapeutisch wirksame Gerinnungshemmung vorhanden ist, ohne, dass das Risiko unerwünschter Blutungen ansteigt. Grundlage hierfür ist die zu erwartende Konzentration für die in den Zulassungsstudien ermittelten Dosierungen.

4. In der Gesamtheit fand sich der Großteil der Konzentrationen oberhalb dessen, was wir für die jeweilige Dosis erwartet hätten. Grund hierfür war unserer Einschätzung nach das hoher Alter unserer Population, sowie zahlreiche Arzneimittelinteraktionen durch Polymedikation. Dies ist vor allem kritisch für die Psychiatrie, wo durch die zusätzlich verordneten Psychopharmaka das Risiko für potentielle Arzneimittelinteraktionen erhöht ist. Hier müssen sich die Ärzte auf Dosisanpassungen einstellen, vor allem bei Apixaban und Rivaroxaban, welche hauptsächlich über die CYP-Enzyme verstoffwechselt werden. In Relation zum ATEC waren bei Apixaban die Mehrheit der Proben (52%) zu hoch, bei Dabigatran war der Großteil (71%) zu niedrig und bei Rivaroxaban lagen die meisten Proben (47%) innerhalb des ATEC.
5. Die größte interindividuelle Schwankung der Serumkonzentrationen, bei ein und derselben Dosis, betrug bei Apixaban den Faktor 9,7, bei Rivaroxaban den Faktor 9 und bei Dabigatran 2,7. Das Ausmaß der Schwankung ist ähnlich hoch wie es schon bei anderen Arzneistoffen gezeigt werden konnte^{47,68}. Der Ansatz eines fixen Dosisregimes, ohne Berücksichtigung des Individuums, ist somit aus pharmakokinetischer Sicht nicht haltbar.
6. Zwar ist aktuell eine grobe Risikoeinschätzung anhand der gemessenen Konzentration und deren Einordnung in den ATEC möglich, mit der ein mögliches Ausbleiben

der gerinnungshemmenden Wirkung bzw. ein stark erhöhtes Blutungsrisiko vermieden werden kann. Aber eine Einstellung auf definierte Konzentrationsbereiche anhand von Grunderkrankung und individuellem Risiko des einzelnen Patienten, ist mit der aktuellen Datenlage nicht möglich. Hierfür werden mehr klinische Studien benötigt, welche das Auftreten von klinischen Endpunkten (Blutungen oder Thrombosen) in Korrelation zu gemessenen Wirkstoffkonzentrationen setzen. Da diese aktuell noch nicht existieren, bietet die Messung der Wirkstoffkonzentration einen ersten Anhaltspunkt zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit der direkten oralen Antikoagulanzen.

7. Anlagen

7.1. Anforderungsbogen

Stand: 07.08.2016

Konzentrationsbestimmung von Pharmaka

Klinikanschrift: _____

Station: _____ Fax: _____ Tel: _____

Patient (Aufkleber)	<input type="checkbox"/> Privatpatient
Name, Vorname:	_____
Geburtsdatum (m/w):	_____
Größe:	_____ Gewicht: _____
Blutabnahme:	Datum _____ Uhrzeit _____
ICD-10 Diagnosen: _____	

zu bestimmende(s) Medikament(e):

	Probennummer
<input type="checkbox"/> Alprazolam	<input type="checkbox"/> Haloperidol
<input type="checkbox"/> Amisulprid	<input type="checkbox"/> Imipramin+Metab.
<input type="checkbox"/> Amitriptylin+Metab.	<input type="checkbox"/> Lamotrigin
<input type="checkbox"/> Amitriptylin-Oxid	<input type="checkbox"/> Levomepromazin
<input type="checkbox"/> Apixaban	<input type="checkbox"/> Maprotilin
<input type="checkbox"/> Aripiprazol	<input type="checkbox"/> Mirtazapin
<input type="checkbox"/> Bromazepam	<input type="checkbox"/> Nitrazepam
<input type="checkbox"/> Chlordiazepoxid	<input type="checkbox"/> Nordiazepam
<input type="checkbox"/> Citalopram	<input type="checkbox"/> Nortriptylin
<input type="checkbox"/> Clobazam	<input type="checkbox"/> Olanzapin
<input type="checkbox"/> Clomipramin+Metab.	<input type="checkbox"/> Oxazepam
<input type="checkbox"/> Clonazepam	<input type="checkbox"/> Oxcarbazepin+Metab.
<input type="checkbox"/> Clozapin	<input type="checkbox"/> Paliperidon
<input type="checkbox"/> Dagibatran	<input type="checkbox"/> Paroxetin
<input type="checkbox"/> Desipramin	<input type="checkbox"/> Perazin
<input type="checkbox"/> Diazepam	<input type="checkbox"/> Pipamperon
<input type="checkbox"/> Donepezil	<input type="checkbox"/> Quetiapin
<input type="checkbox"/> Doxepin+Metab.	<input type="checkbox"/> Risperidon+Metab.
<input type="checkbox"/> Duloxetin	<input type="checkbox"/> Rivaroxaban
<input type="checkbox"/> Escitalopram	<input type="checkbox"/> Sertralin
<input type="checkbox"/> Flunitrazepon	<input type="checkbox"/> Trimipramin
<input type="checkbox"/> Fluoxetin	<input type="checkbox"/> Venlafaxin+Metab.
<input type="checkbox"/> Flurazepam	<input type="checkbox"/> Ziprasidon
<input type="checkbox"/> Fluvoxamin	
<input type="checkbox"/>	

Hinweis: Blutentnahme morgens vor der nächsten Tabletteneinnahme, bei Depotpräparaten vor der nächsten Injektion Vollblut in S-Monovette 7,5ml Z (Sarstedt 01.1601) - ausreichend für 3 Bestimmungen! Bitte nur in verschraubbaren Röhrchen verschicken!

Grund der Anforderung (bitte Fragestellung an das Labor so konkret wie möglich formulieren)

- | | | |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Ersteinstellung | <input type="checkbox"/> Compliance – Kontrolle | <input type="checkbox"/> neue Beschwerden (V.a. UAW, siehe unten) |
| <input type="checkbox"/> Umstellen der Medikation | <input type="checkbox"/> Arzneimittelinteraktion | <input type="checkbox"/> Metabolisierungsstatus des Patienten |
| <input type="checkbox"/> Verlaufskontrolle | <input type="checkbox"/> Konzentration im therapeutischen Bereich? | <input type="checkbox"/> Verhältnis von Konzentration zu eingesetzter Dosis? |

Gesamtmedikation am Vortag der Abnahme oder Kopie des Krankenblattes

Handelsname	Tagesdosis [mg] morgens / mittags / abends / nachts	Seit wann oder wann letzte Dosisänderung? Wann 1. Depotinjektion?
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____
		seit: _____ oder <input type="checkbox"/> länger als eine Woche Abgesetzt seit: _____

Bedarf für eine wirksame medikamentöse Therapie

- 0: Patient/in ist überhaupt nicht krank
- 1: Patient/in ist grenzwertig krank
- 2: Patient/in ist leicht krank
- 3: Patient/in ist mäßig krank
- 4: Patient/in ist deutlich krank
- 5: Patient/in ist schwer krank
- 6: Patient/in ist extrem schwer krank

Bedarf für eine Änderung der medikamentösen Therapie

- 0: und wurde unter der angegebenen Medikation deutlich schlechter
- 1: und wurde unter der angegebenen Medikation schlechter
- 2: und wurde unter der angegebenen Medikation etwas schlechter
- 3: und wurde unter der angegebenen Medikation noch nicht besser
- 4: und wurde unter der angegebenen Medikation etwas besser
- 5: und wurde unter der angegebenen Medikation besser
- 6: und wurde unter der angegebenen Medikation deutlich besser

Genussmittel

Patient ist Raucher:

ja, was und wieviel? nein

Patient konsumiert Coffein?

ja, was und wieviel? nein

Patient konsumiert Alkohol?

ja, was und wieviel? nein

Sind neue Beschwerden (UAW?) aufgetreten:

ja nein

Wenn ja, welche?

7.2. Befund Patient A24

Laborbefund – Rivaroxaban**Probe Nr.: 57982****Name: Patient A24**

Abnahme	Eingang	Bestimmung	Befundung	Ausgang
Mo, 21.11.2016	Di, 22.11.2016	So, 27.11.2016	Mo, 28.11.2016	Mo, 23.01.2016

Gesamtwert: 288 ng/ml**Dosisbezogener Referenzbereich: 97 – 129 ng/ml****Therapeutischer Referenzbereich: 39 – 193 ng/ml**

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich			
		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig			
	passend			
	zu hoch			X

 Verdacht auf Arzneimittelinteraktionen**Stoffwechselwege der Medikation des Patienten**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT	Pgp	NAT
Rivaroxaban										X		X	
Amiodaron		X H	X H	X H	X H	X H	X H	X H		X H		X H	
Furosemid	X												
Hydrochlorothiazid	X												
Kalium													
Koffein		X H			X	X		X	X	X			X
Macrogol													
Metoprolol							X	X		X			
Ranitidin		X H					X	X H		H		X	
Simeticon													
Simvastatin					X H	X H	H	X H		X H		X H	
Tamsulosin								X		X			

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch – Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 20 mg Rivaroxaban würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 97 und 129 ng/ml erwarten. Der als "Therapeutischer Referenzbereich" angegebene Konzentrationsbereich gibt die Konzentrationen wieder, die im Mittel für die in Monotherapie zugelassenen Dosierungen zu erwarten wären. Ein echter therapeutischer Referenzbereich, der auf einer Korrelation der Wirkstoffkonzentration mit dem klinischen Effekt beruht, wurde bislang nicht mit einer klinischen Studie etabliert. Rivaroxaban hat mit Amiodaron, Koffein, Metoprolol, Ranitidin, Simvastatin und Tamsulosin gemeinsame Stoffwechselwege (Pgp, CYP3A4/5), die durch Amiodaron, Ranitidin und Simvastatin gehemmt werden. Koffein, Metoprolol und Tamsulosin sind lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet.

Die Konzentration überschreitet den Bereich der für die zugelassenen Dosierungen zu erwarten sind. Wir rechnen hier mit einem erhöhten Risiko für unerwünschte Blutungen. Bitte ziehen sie, auch unter Rücksichtnahme des klinischen Bildes, eine Dosisreduktion in Betracht.

Befundung durch Sebastian Böhr. Nähere Infos: Tel. 0941/943-4766 oder Fax. 0941-943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.3. Befund Patient A31

Laborbefund – Rivaroxaban

Probe Nr.: 58755

Name: Patient A31

Abnahme	Eingang	Bestimmung	Befundung	Ausgang
Fr, 27.01.2017	Mo, 30.01.2017	Di, 31.01.2017	Mi, 01.02.2017	Mi, 01.02.2017

Gesamtwert: 235 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich: 97 – 129 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 39 – 193 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich			
		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig			
	passend			
	zu hoch			X

Verdacht auf Arzneimittelinteraktionen

Verdacht auf Niereninsuffizienz

Stoffwechselwege der Medikation des Patienten

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT	Pgp	NAT	
Rivaroxaban										X			X	
Dronedaron									H		X H		H	
Fluticasone											X I		X I	
Mirtazapin	X H				X	X			X		X H			
Clacium														
Koffein	X H				X	X			X	X	X			X
Oxazepam									X					
Pantoprazol	X I							X			X I		X H	
Paracetamol	X	X			X	X			X	X	X	X		
Pipamperon														
Salmeterol											X			
Sertraline		X		X H			X	X H	X H		X	H		

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch – Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 20 mg Rivaroxaban würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 97 und 129 ng/ml erwarten. Der als "Therapeutischer Referenzbereich" angegebene Konzentrationsbereich gibt die Konzentrationen wieder, die im Mittel für die in Monotherapie zugelassenen Dosierungen zu erwarten wären. Ein echter therapeutischer Referenzbereich, der auf einer Korrelation der Wirkstoffkonzentration mit dem klinischen Effekt beruht, wurde bislang nicht mit einer klinischen Studie etabliert. Rivaroxaban hat mit Dronedaron, Fluticason, Koffein, Mirtazapin, Pantoprazol, Paracetamol, Salmeterol und Sertraline gemeinsame Stoffwechselwege (Pgp, CYP3A4/5), die durch Dronedaron, Mirtazapin und Pantoprazol gehemmt werden, andererseits jedoch durch Fluticason und Pantoprazol induziert werden. Koffein, Paracetamol, Salmeterol und Sertraline sind lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet. Der resultierende Summeneffekt kann im Einzelfall natürlich sehr stark variieren. Wir führen die in Bezug zur applizierten Dosis zu hohe Wirkstoffkonzentration im vorliegenden Fall auf ein Überwiegen der Enzymhemmung zurück. Ist die Nierenfunktion des Patienten normal? Sind bisher Blutungen oder Thrombosen/Embolien aufgetreten?

Wir rechnen bei Überschreiten des therapeutischen Bereiches mit einem erhöhten Blutungsrisiko. Bitte ziehen Sie, auch unter Berücksichtigung des klinischen Bildes, eine Dosisreduktion in Betracht.

Befundung durch Sebastian Böhr. Nähere Infos: Tel. 0941/943-4766 oder Fax. 0941-943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.4. Befund Patient B24

Laborbefund – Apixaban

Probe Nr: 58666

Name: Patient B24

Abnahme	Eingang	Bestimmung	Befundung	Ausgang
Mo, 16.01.2017	Di, 17.01.2017	Sa, 21.01.2017	Mo, 23.01.2017	Mo, 23.01.2017

Gesamtwert: 167 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich: 53 – 97 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 26 – 194 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich			
		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig			
	passend			
	zu hoch		X	

Verdacht auf Arzneimittelinteraktionen

Stoffwechselwege der Medikation des Patienten

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT	Pgp	NAT
Apixaban	X	X			X	X	X H			X	X	X	
Amiodaron		X H	X H	X H	X H	X H	X H	X H		X H		X H	
Clozapin		X	X		X H	X H	X	X H		X H			
Levothyroxin													XI
Mirtazapin		X H			X	X		X		X H			
Prothipendyl													
Tamsulosin								X		X			
Valproinsäure			X H	X	X H	X H	X H	X H	X	X H	X H	X H	

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch – Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 10 mg Apixaban würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 53 und 97 ng/ml erwarten. Der als "Therapeutischer Referenzbereich" angegebene Konzentrationsbereich gibt die Konzentrationen wieder, die im Mittel für die in Monotherapie zugelassenen Dosierungen zu erwarten wären. Ein echter therapeutischer Referenzbereich, der auf einer Korrelation der Wirkstoffkonzentration mit dem klinischen Effekt beruht, wurde bislang nicht mit einer klinischen Studie etabliert. Apixaban hat mit Amiodaron, Clozapin, Levothyroxin, Mirtazapin,

Tamsulosin und Valproinsäure gemeinsame Stoffwechselwege (UGT, Pgp, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5), die durch Amiodaron, Clozapin, Mirtazapin und Valproinsäure gehemmt werden, andererseits jedoch durch Levothyroxin induziert werden. Tamsulosin ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet. Der resultierende Summeneffekt kann im Einzelfall natürlich sehr stark variieren. Wir führen die in Bezug zur applizierten Dosis zu hohe Wirkstoffkonzentration im vorliegenden Fall auf ein Überwiegen der Enzymhemmung zurück. Wurde Mirtazapin zwischen den beiden Konzentrationsmessungen abgesetzt? Möglicherweise ist die Enzymhemmung durch Mirtazapin der Grund für die zu hohe Konzentration in Relation zur Dosis bei dieser Probe.

Aktuell würden wir unter dieser Konzentration noch kein erhöhtes Blutungsrisiko sehen.

Befundung durch Sebastian Böhr. Nähere Infos: Tel. 0941/943-4766 oder Fax. 0941-943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.5. Befund Patient C1

Laborbefund – Dabigatran

Probe Nr.: 57053

Name: Patient C1

Abnahme	Eingang	Bestimmung	Befundung	Ausgang
Mo, 12.09.2016	Do, 15.09.2016	Sa, 17.09.2016	Mo, 19.09.2016	Mo, 19.09.2016

Gesamtwert: 44 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich: 42 – 64 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 42 – 87 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich			
		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig			
	passend		X	
	zu hoch			

Stoffwechselwege der Medikation des Patienten

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT	Pgp	NAT	
Dabigatran	X												X	
Amlodipin				X H	X H	X H		X H		X H				
Bisoprolol								X		X			X	
Levothyroxin														X I
Nortryptilin		X						X	X H	X H	X			
Moxonidin														
Pantoprazol		X I						X			X I		X H	
Quetiapin									X		X H			
Tildin								X			X			
Ramipril	X											X		
Venlafaxin				X H	X	X	X	X H		X H			X	
Torasemid	X				X	X	X H							

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch – Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 220 mg Dabigatran würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 42 und 64 ng/ml erwarten. Der als "Therapeutischer Referenzbereich" angegebene Konzentrationsbereich gibt die Konzentrationen wieder, die im Mittel für die in Monotherapie zugelassenen

Dosierungen zu erwarten wären. Ein echter therapeutischer Referenzbereich, der auf einer Korrelation der Wirkstoffkonzentration mit dem klinischen Effekt beruht, wurde bislang nicht mit einer klinischen Studie etabliert. Dabigatran hat mit Ramipril gemeinsame Stoffwechselwege (Niere), die durch Torasemid gehemmt werden. Ramipril ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet.

Wir gehen davon aus, dass unter dieser Konzentration eine therapeutisch wirksame Antikoagulation gesichert ist.

Befundung durch Sebastian Böhr. Nähere Infos: Tel. 0941/943-4766 oder Fax. 0941-943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.6. Befund Patient C2

Laborbefund – Dabigatran

Probe Nr.: 59034

Name: Patient C2

Abnahme	Eingang	Bestimmung	Befundung	Ausgang
Sa, 11.02.2017	Mi, 15.02.2017	Fr, 17.02.2017	Sa, 18.02.2017	Sa, 18.02.2017

Gesamtwert: 29 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich: 42 – 64 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 42 – 87 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich			
		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig	X		
	passend			
	zu hoch			

Verdacht auf Complianceprobleme

Stoffwechselwege der Medikation des Patienten

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT	Pgp	NAT	
Dabigatran	X												X	
Colecalciferol					X H	X H	X H	X H						
Bisoprolol								X		X			X	
Calcium														
Gabapentin	X													
Digitoxin										X				
Glimepirid						X	X							
Metformin	X													
Ramipril	X										X			

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch – Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 220 mg Dabigatran würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 42 und 64 ng/ml erwarten. Der als "Therapeutischer Referenzbereich" angegebene Konzentrationsbereich gibt die Konzentrationen wieder, die im Mittel für die in Monotherapie zugelassenen

Dosierungen zu erwarten wären. Ein echter therapeutischer Referenzbereich, der auf einer Korrelation der Wirkstoffkonzentration mit dem klinischen Effekt beruht, wurde bislang nicht mit einer klinischen Studie etabliert. Dabigatran hat mit Gabapentin, Metformin und Ramipril gemeinsame Stoffwechselwege (Niere). Gabapentin, Metformin und Ramipril sind lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet. Ist die Compliance der Patientin gesichert?

Sollte wirklich ein Complianceproblem vorliegen, sind Empfehlungen zur Anpassung der Dosis sehr problematisch, da z.B. eine Dosiserhöhung, die labormedizinisch prinzipiell noch möglich wäre, nur das Risiko der Medikation erhöht nicht deren Erfolgsaussichten.

Wir gehen davon aus, dass unter dieser Konzentration mit keiner therapeutisch wirksamen Antikoagulation zu rechnen ist.

Befundung durch Sebastian Böhr. Nähere Infos: Tel. 0941/943-4766 oder Fax. 0941-943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.7. Formular der Einwilligungserklärung

Anwendungsbeobachtung der Wirkstoffkonzentrationen von direkten oralen Antikoagulanzien (Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban) im Blut

Einwilligungserklärung

Name, Vorname des Patienten (Bitte gut leserlich)

Geburtsdatum

Teilnehmer Nr.:

Ich bin persönlich durch

Name der behandelnden Ärztin/des behandelnden Arztes

über Ablauf, Sinn und etwaige Risiken der Anwendungsbeobachtung in vollem Umfang aufgeklärt worden. Ich habe die Patientenaufklärung sorgfältig gelesen und zur Kenntnis genommen.

Des Weiteren erkläre ich mich bereit an den vorgesehenen Blutabnahmen teilzunehmen.

Mir wurde die Gelegenheit eingeräumt mich mit dem behandelnden Arzt/der behandelnden Ärztin ausführlich über den Ablauf und Durchführung zu besprechen. Meine Fragen bezüglich der Anwendungsbeobachtung wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte ausreichen Zeit, meine Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung zu bedenken.

Ich habe zur Kenntnis genommen, dass ich zu jeder Zeit, ohne Angabe einer Begründung, von der Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung zurücktreten darf. Mir entstehen durch Rücktritt von der Teilnahme in keinster Weise Nachteile für meine weitere medizinische Behandlung.

Hiermit erkläre ich mich dazu bereit an der oben genannten Anwendungsbeobachtung freiwillig teilzunehmen.

Eine Kopie der Patientenaufklärung sowie der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Ein weiteres Exemplar verbleibt bei der Studienstelle.

Name des Patienten

Datum, Unterschrift des Patienten

ggf. Name des gesetzlichen Vormundes

Datum, Unterschrift des Vormundes

Ich versichere hiermit, dass ich das Aufklärungsgespräch mit oben genannten Patienten bzw. dessen Vormund geführt habe und dessen Einwilligung zur Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung eingeholt habe.

Name der Ärztin/des Arztes

Datum, Unterschrift der Ärztin/des Arztes

7.8. Patientenaufklärung

Sehr geehrte/r Patient/in,

die nachfolgend beschriebene Anwendungsbeobachtung wurde, wie vom Gesetzgeber gefordert, von der zuständigen Ethikkommission abgesegnet. Die Anwendungsbeobachtung wird am Klinikum Nord in Nürnberg durchgeführt. Finanzierung und Organisation erfolgen durch das BKH Regensburg und das Klinikum Nord in Nürnberg.

Die Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung ist freiwillig und ist nur mit ihrem schriftlichen Einverständnis möglich. Sie können zu jedem Zeitpunkt von der Teilnahme zurücktreten. Bei Nichtteilnahme oder Rücktritt von der Anwendungsbeobachtung entstehen Ihnen keine Nachteile.

Die nachfolgenden Erläuterungen sollen Ihnen Ablauf, Zweck und Ziel der Anwendungsbeobachtung näherbringen. Zusätzlich wird ein behandelnder Arzt mit ihnen ein Aufklärungsgespräch durchführen. Bitte zögern Sie nicht Fragen zu stellen falls ihnen etwas unklar ist. Im Anschluss werden sie genügend Bedenkzeit haben um über Ihre Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung zu entscheiden.

1. Warum wird diese Anwendungsbeobachtung durchgeführt?

Sie werden mit dem Medikament Apixaban, Dabigatran oder Rivaroxaban behandelt, welche zur Gruppe der Gerinnungshemmer zählen. Im Gegensatz zu anderen Präparaten ist hier vom Hersteller keine Kontrolle der Blutspiegel bzw. eine individuelle Anpassung der Dosis vorgesehen. Jedoch steht die Konzentration des Medikamentes im Blut in enger Korrelation mit Wirkung und Nebenwirkung des Arzneimittels. Ein zu hoher Wirkspiegel kann zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, während bei einem zu niedrigen Spiegel der für die Therapie gewünschte Effekt ausbleibt. Der optimal angestrebte Konzentrationsbereich, bei dem eine maximale Wirkung bei Ausbleiben von unerwünschten Wirkungen vorliegt, wird als therapeutischer Referenzbereich bezeichnet.

Wir erhoffen uns von dieser Anwendungsbeobachtung bessere Erkenntnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Dosis und Konzentration im Blut zu erhalten umso die Therapie mit den Medikamenten in Zukunft individuell für die Patienten verbessern zu können.

Bitte beachten Sie, dass Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban bereits von den zuständigen Behörden in Deutschland zugelassen worden sind. Es handelt sich hierbei nicht um eine Studie zum Nachweis der Wirksamkeit oder Verträglichkeit des Medikamentes. Es soll hier

lediglich beobachtet werden wie sich die bei Ihnen gemessene Konzentration in Relation zur Dosis und Wirkung steht.

2. Wie sieht der Zeitplan der Anwendungsbeobachtung aus und was muss bei Teilnahme beachtet werden?

Bei Aufnahme in die Anwendungsbeobachtung wird ihre Krankheitsgeschichte erhoben und sie werden einer ärztlichen Untersuchung unterzogen. Ihre Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung ist von den Ergebnissen dieser Untersuchungen abhängig.

Bei Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung wird ihnen im Verlauf von 5 Tagen zwei Mal Blut abgenommen (jeweils weniger als 10 ml). Die Blutabnahme erfolgt am 1. sowie am 5. Tag nach Beginn ihrer Behandlung im Rahmen der Anwendungsbeobachtung.

Sie erhalten zu Beginn eine Übersicht über diese Termine, die vorher in Absprache mit Ihnen festgelegt werden.

Zusätzliche, auch nicht rezeptpflichtige Medikamente dürfen während der Anwendungsbeobachtung weiterhin eingenommen werden. Wir bitten Sie jedoch den behandelnden Arzt über selbige, auch wenn Sie eines dieser Medikamente absetzen, zu informieren um somit eine lückenlose Dokumentation zu gewährleisten.

3. Habe ich einen persönlichen Nutzen von der Teilnahme an dieser Anwendungsbeobachtung?

Eine Verbesserung Ihrer Therapie durch Teilnahme an der Studie besteht nach aktuellem Kenntnisstand nicht.

4. Sind körperliche Risiken mit der Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung verbunden?

Lediglich durch die Blutentnahme kann es in seltenen Fällen zu Irritationen an der Einstichstelle kommen. Diese äußern sich durch Schmerzen, Entzündungen oder Blutergüsse, welche durch Verletzung der Blutgefäße oder Nerven in der Haut auftreten. Diese Beschwerden sind gewöhnlich nur von sehr kurzer Dauer.

In Ausnahmefällen kann es zu anhaltenden Beschwerden wie Schmerzen oder Taubheitsgefühl kommen.

Bitte zögern Sie nicht beim Auftreten jeglicher Beschwerden, im Rahmen der Anwendungsbeobachtung, diese Ihrem behandelnden Arzt mitzuteilen.

5. Wer ist von der Teilnahme an dieser Anwendungsbeobachtung ausgeschlossen?

Patienten, die das 18. Lebensjahr noch nicht vollendet haben sowie Patienten bei denen während der Voruntersuchungen Zweifel an der medizinischen Vertretbarkeit Ihrer Teilnahme aufgekommen sind.

6. Werde ich entgeltlich für die Teilnahme entschädigt?

Eine Aufwandsentschädigung für die Teilnahme an dieser Anwendungsbeobachtung ist nicht vorgesehen.

7. Was passiert mit meinen Daten?

Während der Anwendungsbeobachtung werden klinisch-pharmakologische Befunde, medizinische Befunde sowie persönliche Daten in Ihrer Akte hinterlegt und gegebenenfalls in elektronischer Form gespeichert. Für die Anwendungsbeobachtung relevante Informationen werden zusätzlich in pseudonymisiertes Form gesammelt, ausgewertet und im Einzelfall weitergegeben.

Pseudonymisiert bedeutet in diesem Fall, dass ihnen ein Code aus Zahlen und Buchstaben, eventuell mit Angabe ihres Geburtsdatums zugeteilt wird, ohne Verwendung ihres eigentlichen Namens oder Initialen.

Die Daten werden für eine Doktorarbeit verwendet und möglicherweise in Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf Kongressen vorgestellt.

8. Was geschieht mit meinen Blutproben?

Im Rahmen der Anwendungsbeobachtung werden die Proben im Labor analysiert. Anschließend werden die Proben und anfallendes Restmaterial vernichtet.

9. An wen kann ich mich bei Fragen wenden?

Sie haben zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit Ihren behandelnden Arzt bei anfallenden Fragen aufzusuchen.

Bitte zögern sie nicht von dieser Möglichkeit Gebrauch zu machen.

7.9. Dokumentationsbogen für das Auftreten von UAWs

Datum

Visite Nr.:

Dokumentationsbogen für das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen im Rahmen der Anwendungsbeobachtung

Wirkstoffkonzentrationen von direkten oralen Antikoagulanzien (Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban) im Blut

Patientencode

Betreuer (Name, Vorname)

Vom Patienten zu erfragen:

Wie belastend waren die Nebenwirkungen ihrer Medikation seit der letzten Befragung?
(Bitte zutreffendes ankreuzen)

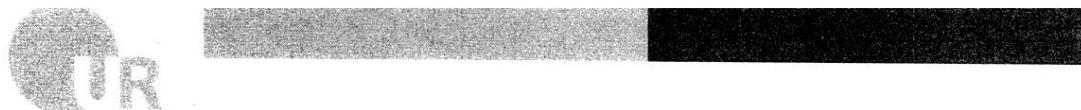
- Nicht belastend
- Leicht belastend
- Stark belastend
- So stark belastend, dass ein Therapieabbruch erforderlich ist (oder aus Sicht des Arztes notwendig erscheint)

Um welche Art von Beschwerden handelte es sich im Einzelnen?

Sind dem Betreuer zusätzliche Beschwerden beim Patient aufgefallen?

Falls ja, bitte hier vermerken.

7.10. Votum der Ethikkommission



Universität Regensburg

FAKULTÄT
MEDIZIN
Ethikkommission

Ethikkommission · Universität Regensburg · 93040 Regensburg

Prof. Dr. med. Christian Stroszczynski, Vorsitzender

Rechtsanwalt Jan von Hassel, Geschäftsführer

Herr Prof. Dr. Dr. Ekkehard Haen
Bezirksklinikum Regensburg
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Universitätsstraße 84
93053 Regensburg

Geschäftsstelle:
Telefon +49 941 943-5370
Telefax +49 941 943-5369
Postanschrift:
Universität Regensburg
ETHIKKOMMISSION
D-93040 Regensburg

ethikkommission@klinik.uni-regensburg.de
<http://ethikkommission.uni-regensburg.de>

20.04.2016

Unser Zeichen:

16-101-0051

Votum der Ethikkommission

für das

Forschungsvorhaben: Anwendungsbeobachtung der Wirkstoffkonzentrationen von direkten oralen Antikoagulanzen (Apixaban, Dabigatran und Rivaroxaban) im Blut

Antragssteller: Prof. Dr. Dr. Ekkehard Haen

Prüfstelle: Bezirksklinikum Regensburg, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie

Die Ethikkommission an der Universität Regensburg erteilt eine zustimmende Bewertung für die Durchführung der o.g. klinischen Prüfung.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg hat in Ihrer Sitzung am 20.04.2016 über das o.g. Vorhaben auf Grundlage der im Anhang aufgeführten Unterlagen beraten. Es ergeben sich daraus keine berufsethischen oder rechtlichen Einwände gegen die vorgelegte Studie.

Es wird auf folgendes grundsätzlich hingewiesen:

1. Unabhängig vom Beratungsergebnis verbleibt die ärztliche und juristische Verantwortung beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.
2. Die Auflagen der Deklaration von Helsinki des Weltärztekongresses in der Fassung von Fortaleza, Brasilien 2013 hinsichtlich ethischen und rechtlichen Aspekten biomedizinischer Forschung am Menschen sind strikt zu beachten.
3. Alle Änderungen oder Erweiterungen in Protokoll sowie der Patienteninformation- und Einwilligung sind schriftlich der Ethikkommission mitzuteilen. Die Korrekturen sind in der jeweils überarbeiteten Version deutlich zu machen.

4. Die Ethikkommission erwartet, dass ihr alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse (u.a. Todesfälle), die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können, unverzüglich schriftlich mitgeteilt werden. Dieses sollte in Verbindung mit einer Stellungnahme des Antragsstellers geschehen, ob aus seiner Sicht die Nutzen-Risiko-Relation des Vorhabens verändert ist.
5. Der Ethikkommission muss der Abbruch oder Abschluss einer Studie mitgeteilt werden. Eine Publikation, bzw. der Abschlussbericht der Studie sollten zum gegebenen Zeitpunkt nachgereicht werden. Bei Langzeitstudien bittet die Kommission 12 Monate nach Studienbeginn um Übersendung eines Zwischenberichtes.
6. Jeder Wechsel im Prüfpersonal ist der Ethikkommission unverzüglich und wenn möglich rechtzeitig im Voraus mitzuteilen. Verlässt ein Antragssteller den Zuständigkeitsbereich dieser Ethikkommission, so stellt dies stets eine bewertungspflichtige Änderung des Forschungsvorhabens dar, für die die Ethikkommission rechtzeitig und im Voraus ins Benehmen zu setzen ist. Das selbe gilt für wesentliche Änderungen an der Prüfstelle.
7. Studienunterlagen sind jederzeit sorgfältig aufzubewahren.
8. Die Ethikkommission bestätigt die Bearbeitung gemäß der GCP/ICH-Richtlinien.
9. Falls kein gesetzlicher Kostenbefreiungstatbestand greift, wird ein gesonderter Kostenbescheid für die Gebühren und Auslagen der Ethikkommission ergehen.

Darüber hinaus empfehlen wir folgendes zu beachten:

Studienbedingte Maßnahmen dürfen nicht über die Krankenkassen abgerechnet werden.

Es sollte eine schriftliche Anfrage an das BfArM oder die Landesüberwachungsbehörde erfolgen, ob es sich vorliegend um eine klinische Prüfung handelt.

PD Dr. Karl Peter Ittner
Stellvertretender Vorsitzender der Ethikkommission

Anlagen:

Liste der eingereichten Unterlagen (Anlage 1)
Mitglieder der Ethikkommission, die an der Entscheidung mitgewirkt haben (Anlage 2)

7.11. Publikationen

Folgende Artikel und Abstracts wurden im Rahmen der Doktorarbeit publiziert:

Originalartikel:

- Boehr S, Haen E. Development of an UHPLC-UV-Method for Quantification of Direct Oral Anticoagulants: Apixaban, Rivaroxaban, Dabigatran, and its Prodrug Dabigatran Etexilate in Human Serum. Therapeutic drug monitoring. 2017;39(1):66-76.

Poster:

- Boehr S, Haen E. Therapeutic drug monitoring of direct oral anticoagulants (DOAC's). Pharmacopsychiatry. 2016;49(03).
- Sebastian Böhr, Ekkehard Haen. Wirkstoffkonzentrationen von Ziprasidon im klinischen Alltag; DGPPN 2016.
- Böhr S, Haen E. Therapeutic drug monitoring of direct oral anticoagulants (DOAC)/UHPLC method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants in human plasma. Pharmacopsychiatry. 2015;48(06).

7.12. Rohdaten: Patientendaten und gemessene Konzentrationen

Tabelle 34: gemessene Konzentrationen und Patientendaten für die Dabigatranproben

Probe	Patient	Geschlecht	Alter	Konzentration (ng/ml)	Tagesdosis (mg)
1	C1	w	74	23	220
2				31	220
3				44	220
4	C2	w	76	15	220
5				22	220
6				29	220
7	C3	m	78	61	220

Tabelle 35: gemessene Konzentrationen und Patientendaten für die Apixabanproben

Probe	Patient	Geschlecht	Alter	Konzentration (ng/ml)	Tagesdosis (mg)
1	B1	w	80	297	10
2				271	10
3	B2	w	83	312	5
4				316	5
5	B3	w	56	124	5
6	B4	m	76	204	10
7	B5	w	66	107	5
8	B6	w	80	187	10

9	B7	m	80	97	5
10	B8	m	53	291	10
11	B9	m	84	231	10
12	B10	m	83	155	5
13				155	5
14				159	5
15	B11	m	79	13	10
16	B12	w	75	473	5
17	B13	w	83	400	10
18				409	10
19				626	10
20	B14	m	76	103	5
21	B15	w	80	82	5
23	B16	w	70	128	10
24				192	10
25				219	10
26	B17	m	82	49	5
27	B18	w	74	182	10
28				226	10
29				80	10
30	B19	w	86	82	5
31				80	5
32				74	5
33	B20	m	?	165	5
34				203	5
35				142	5
36	B21	m	77	396	10
37				274	10
38				343	10
39	B22	w	62	103	10
40	B23	m	58	97	10
41	B24	m	56	89	10
42				167	10

Tabelle 36: gemessene Konzentrationen und Patientendaten für die Rivaroxabanproben

Probe	Patient	Geschlecht	Alter	Konzentration (ng/ml)	Tagesdosis(mg)
1	A1	m	42	72	20
2				47	20
3				32	20
4				43	20
5				45	20
6	A2	m	50	163	20
7	A3	w	77	168	20
8	A4	w	66	110	20
9	A5	m	74	51	15
10	A6	w	73	72	10
11	A7	m	68	33	20
12	A8	m	68	109	20
13	A9	m	83	41	20
14				60	20
15				44	20
16				59	20
17	A10	m	66	54	30
18	A11	m	47	22	15
19	A12	m	68	37	20
20	A13	m	60	166	30

21	A14	m	36	41	20
22				34	20
23	A15	w	55	112	20
24				93	20
25	A16	m	76	182	20
26	A17	m	66	53	15
27	A18	w	47	49	20
28	A19	w	70	120	20
29				190	20
30				585	20
31	A20	m	66	51	15
32	A21	m	30	49	15
33	A22	m	76	29.5	15
34	A23	m	80	40	20
35				58	20
36				35	20
37	A24	m	72	288	20
38	A25	w	71	36	20
39	A26	m	57	117	20
40	A27	m	66	102	20
41	A28	w	93	46	15
42				33	15
43				44	15
44	A29	m	69	68	20
45	A30	m	86	117	15
46	A31	m	77	235	20
47	A32	w	73	18	10
48	A33	w	83	100	15
49	A13	m	60	120	20

7.13. Lebenslauf

seit 01.08.2014

Doktorand

AG Klinische Pharmakologie, Prof.Haen

Universität Regensburg

seit 01.01.2014

Angestellter Apotheker

Adler-Apotheke in Winnweiler

12.2013

3.Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

01.05.2013 – 31.10.2013

Pharmazeut im Praktikum

Novartis Pharma AG, Basel

Pharmaceutical development Oral team CH1

Tätigkeiten: Analytical Imaging

(Stereomikroskopie, Elektronenmiskroskopie sowie Raman-Mikroskopie), Formulierung (Tabletten und überzogenen Tabletten), Dissolution tests

01.11.2012 – 30.04.2013

Pharmazeut im Praktikum

Adler-Apotheke in Winnweiler

01.04.2008 – 30.10.2012

Studium der Pharmazie

Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Abschluss: 2.Staatsexamen

25.07.2011 – 31.08.2011

Wahlpflichtpraktikum

Krankenhausapotheke der Universitätsmedizin Mainz

Thema: Untersuchung der Unversehrtheit von

Infusionslösungen mittels Raman-Spektroskopie

01.09.1998 – 31.03.2007

Schüler

Wilhelm-Erb-Gymnasium in Winnweiler

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

7.14. Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Ekkehard Haen für das Überlassen des Themas und für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Vielen Dank an Herrn Prof. Frieder Kees für fachliche Unterstützung in Sachen HPLC, welche besonders zu Beginn meiner Arbeit sehr hilfreich für mich war.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Sandra Unholzer für ihr nie endendes Vertrauen in mich.

Ich bedanke mich auch bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie: Nagja Ben Omar, Edoardo Calzavara, Bianca Fay, Alexandra Köppls, Benedikt Stegmann, Margarete Silva, Carina Rothammer und Mirjam Schwarz. Vielen Dank für die schöne Zeit in Regensburg und die gute Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Reinhold Waimer für die Zusammenarbeit im Rahmen der Anwendungsbeobachtung und Organisation in Nürnberg. Zusätzlich auch einen Dank an alle beteiligten Ärzte auf Station sowie Patienten, die an der Studie teilgenommen haben.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Thomas Bertsch und dessen Mitarbeitern für die Organisation des Probenversandes in Nürnberg

Danke auch an Michael Herczig und Rene Prchal für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Vom ganzen Herzen danke ich meinen Eltern Monika und Gerhard Böhr, die stets hinter mir standen und mich unterstützt haben. Sie haben mir erst das Studium und die Promotion ermöglicht. Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen.

8. Literaturverzeichnis

1. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *British journal of haematology*. 2008;143(2):180-190.
2. Dickson BC. Venous Thrombosis: On the History of Virchow's Triad. *University of Toronto Medical Journal*. 2004;81(3):166-171. Available at: <http://utmj.org/index.php/UTMJ/article/download/647/595>.
3. Cohen D. Dabigatran: how the drug company withheld important analyses. *BMJ*. 2014;349:g4670. Available at: <http://www.bmj.com/content/bmj/349/bmj.g4670.full.pdf>.
4. Aktories K, Forth W, Förstermann U. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. 9., völlig überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2005.
5. Mutschler E. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; 264 Tabellen und 1357 Strukturformeln*. 9., vollst. neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2008.
6. Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 2000;355(9215):1627-1632. Available at: <http://www.thelancet.com/article/S014067360002225X/fulltext>.
7. Caterina R de, Husted S, Wallentin L, et al. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(4):569-579. Accessed February 27, 2017.
8. Oldgren J, Wallentin L, Alexander JH, et al. New oral anticoagulants in addition to single or dual antiplatelet therapy after an acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *European heart journal*. 2013;34(22):1670-1680.
9. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thrombosis and haemostasis*. 2000;83(5):657-660.
10. Colditz GA, Tuden RL, Oster G. Rates of venous thrombosis after general surgery: combined results of randomised clinical trials. *Lancet (London, England)*. 1986;2(8499):143-146.
11. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, et al. Mortality and Morbidity in Patients Receiving Encainide, Flecainide, or Placebo. *N Engl J Med*. 1991;324(12):781-788.

12. Wehling M, ed. *Klinische Pharmakologie*. 2. überarb. Aufl. Heidelberg: Springer; 2011.
13. Ezekowitz MD, Bridgers SL, James KE, et al. Warfarin in the prevention of stroke associated with nonrheumatic atrial fibrillation. Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Investigators. *The New England journal of medicine*. 1992;327(20):1406-1412.
14. Fachinfo Dabigatran. Available at: <http://www.fachinfo.de/pdf/013108>. Accessed February 28, 2017.
15. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(2):386-399.
16. European Medicines Agency - Human medicines - Pradaxa. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000829/human_med_000981.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d125. Accessed February 26, 2017.
17. Mueck W, Borris LC, Dahl OE, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of once- and twice-daily rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb Haemost*. 2008;453-461.
18. Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clinical pharmacokinetics*. 2014;53(1):1-16.
19. Patel Manesh R., Mahaffey Kenneth W., Garg Jyotsna, et al. Rivaroxaban versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;365(24):2333-2335.
20. fachinfo rivaroxaban. Available at: <http://www.fachinfo.de/pdf/013452>. Accessed February 28, 2017.
21. arznei-telegramm. Available at: <http://www.arznei-telegramm.de/abo/b170119.php3?> Accessed February 28, 2017.
22. Frost CE, Song Y, Shenker A, et al. Effects of age and sex on the single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban. *Clinical pharmacokinetics*. 2015;54(6):651-662.
23. Wang L, Zhang D, Raghavan N, et al. In vitro assessment of metabolic drug-drug interaction potential of apixaban through cytochrome P450 phenotyping, inhibition, and induction studies. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2010;38(3):448-458.
24. fachinfo apixaban. Available at: https://www.pfizer.de/fileadmin/produktdatenbank/pdf/Eliquis_5mg_FI_01.pdf. Accessed February 28, 2017.

25. Granger Christopher B., Alexander John H., McMurray John J.V., et al. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation.
26. fachinfo edoxaban. Available at: <http://fachinformation.srz.de/pdf/daiichisankyo/lixiana60mgfilmtabletten.pdf>. Accessed February 28, 2017.
27. Parasrampuria DA, Truitt KE. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa. *Clinical pharmacokinetics*. 2016;55(6):641-655.
28. Hein L. Antithrombotika und Antihämorrhagika. In: Schwabe U, Paffrath D, eds. *Arzneiverordnungs-Report 2015*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015:477-500.
29. Fachinformation Marcumar.
30. Fachinfo Coumadin. Available at: <http://www.fachinfo.de/pdf/000479>. Accessed February 28, 2017.
31. Kaminsky LS, Zhang Z-Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997;73(1):67-74.
32. Salem DN, Stein PD, Al-Ahmad A, et al. Antithrombotic therapy in valvular heart disease--native and prosthetic: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):457S-482S.
33. Douxfils J, Mani H, Minet V, et al. Non-VKA Oral Anticoagulants: Accurate Measurement of Plasma Drug Concentrations. *BioMed research international*. 2015;2015:345138.
34. Halbmayer W-M, Weigel G, Quehenberger P, et al. Interference of the new oral anticoagulant dabigatran with frequently used coagulation tests. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012;50(9):1601-1605.
35. Cuker A, Siegal DM, Crowther MA, Garcia DA. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the non-vitamin K oral anticoagulants. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(11):1128-1139.
36. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(1):133-139.
37. Tripodi A, Chantarangkul V, Guinet C, Samama MM. The International Normalized Ratio calibrated for rivaroxaban has the potential to normalize prothrombin time results for rivaroxaban-treated patients: results of an in vitro study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(1):226-228.

38. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH. Pharmazeutische Zeitung online: Rivaroxaban: EMA überprüft die Zulassungsstudie. Available at: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=61282>. Accessed March 1, 2017.
39. IQWiG-Bericht Nr. 157: Apixaban (neues Anwendungsgebiet) - Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V, Stand März 2013 - Google-Suche. Available at: https://www.iqwig.de/download/A12-20_Apixaban_neues_Anwendungsgebiet_Nutzenbewertung_35a_SGB_V.pdf. Accessed March 1, 2017.
40. Houston DS, Zarychanski R. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2009;361(27):2671; author reply 2674-5.
41. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(4):321-328.
42. Yao X, Abraham NS, Sangaralingham LR, et al. Effectiveness and Safety of Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban Versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(6).
43. Barrett YC, Wang Z, Frost C, Shenker A. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: Anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thromb Haemost*. 2010;104(6):1263-1271. Available at: <http://www.schattauer.de/index.php?id=5236&mid=13879>.
44. Hein L, Wille H. Antithrombotika und Antihämorrhagika. In: Schwabe U, Paffrath D, eds. *Arzneiverordnungs-Report 2016: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2016:351-368.
45. Haen E. Therapeutic drug monitoring in pharmacovigilance and pharmacotherapy safety. *Pharmacopsychiatry*. 2011;44(6):254-258.
46. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry*. 2011;44(6):195-235.
47. Haen E, Greiner C, Bader W, Wittmann M. Wirkstoffkonzentrationsbestimmungen zur Therapieleitung. Ergänzung therapeutischer Referenzbereiche durch dosisbezogene Referenzbereiche. *Der Nervenarzt*. 2008;79(5):558-566.
48. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP. Therapeutic drug monitoring of olanzapine: The combined effect of age, gender, smoking, and comedication. *Therapeutic drug monitoring*. 2003;25(1):46-53.

49. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*. 2017.
50. Haen E. Der TDM-Befund. *Psychopharmakotherapie*. 2012;19(3):129.
51. Koestlbacher A, Haen E. Konbest – A Web-Based Laboratory Information Management System (LIMS) for TDM-Laboratories. *Pharmacopsychiatry*. 2008;41(05):A23.
52. F.T. Peters et al. Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. *Toxichem Krimtech*. 2009;76(9):185-208.
53. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology : ICH. Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Accessed February 6, 2017.
54. Köber R. *Therapeutisches Drug Monitoring von Antidementiva: Implementierung eines neuen HPLC/UV-Ansatzes für das TDM aller Antidementiva in der medizinischen Routineanalytik und seine Relevanz für die Pharmakotherapie im gerontopsychiatrischen Klinikalltag*. [Zugl.: Regensburg, Univ., Diss., 2011]. Hamburg: Kovač; 2012. Schriftenreihe Hippocrates; 88.
55. Boehr S, Haen E. Development of an UHPLC-UV-Method for Quantification of Direct Oral Anticoagulants: Apixaban, Rivaroxaban, Dabigatran, and its Prodrug Dabigatran Etexilate in Human Serum. *Therapeutic drug monitoring*. 2017;39(1):66-76.
56. Sun S, Wang M, Su L, Li J, Li H, Gu D. Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;42(2):218-222.
57. Mueck W, Schwers S, Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thrombosis journal*. 2013;11(1):10.
58. Lindhoff-Last E, Samama MM, Ortel TL, Weitz JI, Spiro TE. Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations. *Therapeutic drug monitoring*. 2010;32(6):673-679.
59. Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2012;23(2):138-143.
60. Schmitz EMH, Boonen K, van den Heuvel DJA, et al. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct

- oral anticoagulants. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2014;12(10):1636-1646.
61. Gous T, Couchman L, Patel JP, Paradzai C, Arya R, Flanagan RJ. Measurement of the direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human plasma using turbulent flow liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. *Therapeutic drug monitoring.* 2014;36(5):597-605.
 62. Kwon M-J, Kim H-J, Kim J-W, et al. Determination of plasma warfarin concentrations in Korean patients and its potential for clinical application. *The Korean journal of laboratory medicine.* 2009;29(6):515-523.
 63. Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *British journal of clinical pharmacology.* 2000;49(3):244-253.
 64. Cheong EJ, Goh JJ, Hong Y, et al. Application of Static Modeling --in the Prediction of In Vivo Drug-Drug Interactions between Rivaroxaban and Antiarrhythmic Agents Based on In Vitro Inhibition Studies. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2017;45(3):260-268.
 65. Tiberghien F, Loor F. Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay. *Anti-cancer drugs.* 1996;7(5):568-578.
 66. EMA Product information for Eliquis. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002148/WC500107728.pdf. Accessed February 25, 2017.
 67. Jin M, Shimada T, Shintani M, Yokogawa K, Nomura M, Miyamoto K. Long-term levothyroxine treatment decreases the oral bioavailability of cyclosporin A by inducing P-glycoprotein in small intestine. *Drug metabolism and pharmacokinetics.* 2005;20(5):324-330.
 68. Heimann G, Schug S, Bergt U. Pharmakokinetik der kombinierten Antibiotikatherapie beim Neugeborenen. *Monatsschrift Kinderheilkunde : Organ der Deutschen Gesellschaft fur Kinderheilkunde.* 1983;131(2):58-62.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift