

# Benedikt Karus

---

Benedikt Karus Käsenbachstr. 28/2 72076 Tübingen

Telefon 07071-1468584

Nationale Anti Doping Agentur (NADA)

Mobil 0151-10042062

Herrn Dr. iur. Lars Mortsiefer

eMail benedikt.karus@yahoo.com

Heussallee 38

D – 53113 Bonn

Datum 20.05.2015

## Möglicher Verstoß gegen Anti-Doping-Bestimmungen

Antrag auf eine weitere Analyse meiner restlichen A-Probe 142584

Sehr geehrter Herr Dr. iur. Mortsiefer,

für die bisherigen Bemühungen der NADA um das Ergebnis der Laboranalyse zu dem positiven Befund meiner Urinprobe mit dem Proben-Code 142584 danke ich Ihnen, wie auch dem Kölner Labor. Die Teilnahmemöglichkeit für den von mir benannten Sachverständigen Herrn Dr. Kalbacher hat dabei sehr geholfen.

Die Feststellungen zur A- und B-Probe mit sehr schwachen Ausprägungen von möglichem Darbepoetin werden von mir akzeptiert.

Dennoch bleiben vernünftige und wissenschaftlich entsprechend abgesicherte und zu begründende Zweifel an der Herkunft der schwachen Ausprägung und damit am Ergebnis als nachgewiesene Grundlage gem. Art. 3.1 NADC für einen Verstoß gegen Anti-Doping-Bestimmungen.

Der Nachweis bezieht sich nach dieser Vorschrift sowohl auf das Vorhandensein der Substanz im Körper als auch die Körperfremdheit der erfassten Substanz. Körpereigene Produktion eines Stoffes fällt nicht darunter, da in diesem Fall der Stoff nicht i. S. d. Art. 2.1.1 NADC in den Körper von außen „gelangt“ ist.

Nach den unten stehenden Ausführungen von Herrn Dr. Kalbacher (siehe auch Anlage: „Stellungnahme\_Möglicher Verstoß gegen Anti-Doping-Bestimmungen\_Benedikt Karus\_Detaillierte Begründung für Antrag auf weitere Analyse\_20.05.2015“) kann mit ausreichender Wahrscheinlichkeit belegt werden, dass eine bei mir durchgeführte Immunisierungstherapie das körpereigene EPO so verändert hat, dass es bei der Analyse mit der bislang verwendeten indirekten Nachweismethode zwar schwache Anzeichen für Darbepoetin lieferte, diese jedoch möglicherweise auch auf körpereigenem EPO beruhen können und nicht exogen verursacht sind.

**Die so begründeten Zweifel lassen sich nur klären, wenn der Rest des Urins von der noch vorhandenen A-Probe mit dem Proben-Code 142584 mit einer direkten, substanzspezifischen Methode untersucht wird. Dafür steht in erster Linie das gebräuchliche und anerkannte Verfahren der Massenspektrometrie (MS) zur Verfügung.**

**Ich beantrage daher, mit einer entsprechenden Nachuntersuchung den vernünftigen und begründeten Zweifeln an der körperfremden Zuführung des Stoffes Darbepoetin nachzugehen, da der Nachweis eines Dopingverstoßes aufgrund einer in den Körper gelangten Substanz nach Art. 2.1 NADC den ausreichenden objektiven Nachweis auch der Körperfremdheit nach Art. 3.1 NADC voraussetzt.**

Nach Art. 2.1 NADC muss der Nachweis der Körperfremdheit „überzeugend“, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit von deutlich mehr als 50 %, erfolgen.

Dieser Nachweis ist in meinem Fall nicht ausreichend geführt, da die schwachen Signale des möglichen Darbepoetins mit beachtlicher Wahrscheinlichkeit auch durch die Immunisierungstherapie hervorgerufen worden sein können. Die offene Frage ist mit der genannten Analyseverfahren zu klären.

Im Einzelnen ergeben sich die als wissenschaftlich vernünftig und tragfähig anzusehenden Tatsachen für die Annahme, dass der indirekte Nachweis des Darbepoetins auch auf Veränderungen des körpereigenen EPOs im Rahmen einer Immunisierungstherapie zurückzuführen sein kann, aus der folgenden Expertise des Herrn Dr. Kalbacher, vom Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum der Universität Tübingen:

„Sehr geehrte Damen und Herren,

auf Bitte von Herrn Benedikt Karus war ich vom 20.03.-22.03.2015 bei der Analyse der B-Probe von Herrn Karus im Labor Prof. Dr. W. Schänzer, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln, persönlich anwesend.

Die Analyse wurde entsprechend den Richtlinien der WADA (WADA Technical Document- TD 2014EPO Version vom 01.09.2014) nach der sog. SAR-PAGE Methode vorgenommen. Sowohl die B-Probe als auch die beiden Analysen der A-Probe, die ebenfalls nach diesem Verfahren analysiert wurden, zeigten eine weitere, in negativem Urin nicht vorhandene immunreaktive Bande, die vom Labor als Darbepoetin alpha oder auch NESP charakterisiert wurde.

*Darbepoetin alpha wird durch rekombinante DNA-Technik aus CHO-Zellen gewonnen und unterscheidet sich vom körpereigenen Peptidhormon dadurch, dass fünf der insgesamt 165 Aminosäuren des Proteinteils ausgetauscht wurden und dadurch zwei weitere Zuckerketten eingebaut werden konnten. Im Vergleich zum humanen EPO weist Darbepoetin sechs anstelle von vier Zuckerketten auf. Aufgrund dieser beiden Modifikationen lässt sich Darbepoetin neben humanem EPO im Urin nachweisen.*

*NESP steht für „Novel Erythropoiesis Stimulating Protein“, also ein modifiziertes Erythropoietin (EPO) und ist unter dem Namen Aranesp der Fa. Amgen als Medikament zur Behandlung bei Niereninsuffizienz und ihren Begleiterkrankungen zugelassen.*

*Der Nachweis von Darbepoetin alpha beruht auf zwei Prinzipien:*

- a) es reagiert mit Antikörpern die allgemein gegen EPO (humanes und synthetisches EPO) gerichtet sind. Ein Antikörper dient zum „Capturing“, der Zweite, monoklonale Antikörper, zum immunchemischen Nachweis.*
- b) Darbepoetin alpha migriert im SAR-PAGE bei höherem Molekulargewicht (apparent 37-40 kDa).*

Alle drei Analysen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen und den zuvor mit Darbepoetin gespikten Urinkontrollproben relativ geringe Mengen natürlichen humanen EPOs. Dazu eine weitere, im Gel höher migrierende immunreaktive Bande, die vom Labor als Darbepoetin alpha charakterisiert wurde. Allerdings waren beide Banden der Probe von Herrn Karus relativ schwach, so dass diese erst nach spezieller Kontrastverstärkung deutlich sichtbar wurden.

Für mich war erstaunlich, dass die Urinproben mittels einer sog. Ultrafiltration mit einer 30 kDa-Membran konzentriert wurden, obwohl das körpereigene EPO ein apparentes Molekulargewicht von 34 kDa besitzt. In den Originalarbeiten aus dem Analysenlabor wird auch immer eine 10 kDa-Ultrafiltrations-Membran verwendet. Daher ist möglicherweise mit Verlusten von körpereigenem EPO bei der Konzentrierung des Urins zu rechnen. Da aber die Kontrollen demselben Verfahren ausgesetzt wurden, darf das Gesamtergebnis dadurch nicht grundsätzlich in Frage gestellt werden.

Herr Karus hat sowohl mich als auch das Labor von Prof. Dr. W. Schänzer darüber informiert, dass er seit Oktober 2014 in ca. 4-wöchigem Abstand je zwei Desensibilisierungs-Injektionen intramuskulär zur Behandlung seiner Pollenallergie durch einen Facharzt bekommt.

Grundsätzlich ist daher nicht auszuschließen, dass das körpereigene EPO durch bislang noch nicht bekannte Mechanismen so verändert wird, dass es sich im SAR-PAGE-Verfahren wie das synthetische Darbepoetin alpha verhält. Da die beiden verwendeten Antikörper im Testverfahren auf dieselben Epitope reagieren, können diese nicht direkt zwischen dem körpereigenen EPO und dem synthetischen Darbepoetin alpha unterscheiden, der Nachweis beruht letztendlich nur auf einer Veränderung des Laufverhaltens im Gel.

Eine endgültige Klärung könnte daher nur eine Analysemethode geben, die andere Darbepoetin alpha-spezifische Parameter einbezieht.

Hierfür stehen zwei unabhängige Methoden zur Verfügung:

### **1. Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die IEF ist offiziell als Methode von der WADA zugelassen/empfohlen und beruht darauf, dass das aus CHO-Zellen gewonnene Darbepoetin alpha einen veränderten sialinsäurehaltigen Zuckeranteil besitzt und durch diese Ladungsveränderung ein sehr unterschiedliches Laufverhalten gegenüber humanem EPO beobachtet wird. Das Labor Prof. Dr. W. Schänzer hat dazu verschiedene wissenschaftliche Arbeiten publiziert und besitzt die entsprechende Expertise.

Die etwas geringere Nachweisempfindlichkeit könnte dadurch kompensiert werden, dass man zur Konzentrierung des Resturins der A-Probe eine 10 kDa-Membran verwenden würde.

## 2. Massenspektrometrie (MS)

Durch kombinierte Liquid Chromatography-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) könnte Darbepoetin alpha über die Veränderungen der Aminosäuresequenz eindeutig und spezifisch nachgewiesen werden. Hierfür wurden von einer japanischen Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Schänzer in jüngster Zeit mehrere Arbeiten veröffentlicht.

Das Prinzip beruht im Wesentlichen darauf, das veränderte Peptid (das charakteristische Peptid wird als Peptid T9 bezeichnet) über die monoisotopische Masse genau zu identifizieren. Diese Methode kann somit zu nahezu 100% die Anwesenheit von Darbepoetin alpha beweisen, da nur dieses Derivat diese charakteristische Sequenz aufweist.

Eine detaillierte Beschreibung wurde in der Publikation des Labors Prof. Schänzer/Prof. Thevis (Deutsche Sporthochschule Köln) und dem Labor Prof. Reichel (Doping Kontroll Labor AIT, Seibersdorf, Österreich) veröffentlicht.

*Isolation, Enrichment, and Analysis of Erythropoietins in Anti-Doping Analysis by Receptor-Coated Magnetic Beads and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*  
M. Vogel, M. Blobel, K. Walpurgis, W. Schänzer, C. Reichel and M. Thevis  
*Analytical Chemistry*, 2014, 86, 12014-21

Da von der A-Probe (Proben-Code 142584) noch Restmengen (ca. 25 ml) an Urin vorhanden sind, sollte eine weitere, **von dem ersten Analyseverfahren unabhängige Analysemethode** durchgeführt werden.

### Begründung:

- a) Sowohl die beiden A-Proben als auch die B-Probe (Proben-Code 142584) ergaben sehr schwache Signale von möglichem Darbepoetin.
- b) Herr Karus wurde das letzte Mal am 07.01.2015, also rund 4 Wochen vor dem Wettkampf „ING-Eurocross“ am 08.02.2015 in Diekirch (LUX) mit Pollenallergenen desensibilisiert. Es handelt sich dabei um die Allergenextrakte „AVANZ Frühblühermischung“ und „AVANZ Gräsermischung und Roggen“ der Firma ALK. Eine Veränderung des körpereigenen EPOs kann im Rahmen einer solchen Immunisierungstherapie nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.
- c) Sowohl die Isoelektrische Fokussierung (IEF) als auch die Massenspektrometrie (MS) sind geeignet, Darbepoetin über seine substanzspezifischen Eigenschaften (Ladungsveränderung, unterschiedliche Aminosäuresequenz des synthetischen EPOs) nachzuweisen.

### Schlussfolgerung:

Da die Massenspektrometrie (MS) das derzeit aktuellste Verfahren ist, mit dem sich Darbepoetin auf molekularer Ebene substanzspezifisch sicher nachweisen lässt, sollte diese Methode in einer weiteren Analyse der verbliebenen Urinprobe von Herrn Karus mit dem Proben-Code 142584 bevorzugt werden.“

Neben dem vorstehenden Antrag auf Nachuntersuchung der A-Probe **bitte** ich darum, mir das **Bandenmuster der negativen A-Probe von den Deutschen Crosslaufmeisterschaften am 07.03.2015 in Markt-Indersdorf mit dem Proben-Code 3785396 zukommen zu lassen**. Das Ergebnis dieser Analyse ist von großer Bedeutung für die Klärung der möglichen Beeinflussung des Resultats der hier relevanten positiven A- und B-Probe mit dem Proben-Code 142584 durch die Immunisierungstherapie.

Vielen Dank.

Mit freundlichen Grüßen

Handwritten signature of Benedikt Karus in cursive script.

Benedikt Karus

Anlage: - Stellungnahme\_Möglicher Verstoß gegen Anti-Doping-Bestimmungen\_Benedikt Karus\_Detaillierte Begründung für Antrag auf weitere Analyse\_20.05.2015