Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin

LMU Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

ANWENDUNGEN DER TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE IM THERAPEUTISCHEN DRUG MONITORING

Kumulative Habilitationsschrift
Fachgebiet Klinische Chemie

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Katharina Habler

(2025)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitende Zusammenfassung 1

2 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund 2

3 Anwendungen der Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring und ihre Bedeutung in der klinischen Chemie 5

3.1 Protokoll zur Wertzuweisung für Massenspektrometrie-basierte Referenzmessverfahren (Schaeffler et al., 2023) 5

3.2 TDM von CDK4/6-Inhibitoren zur Behandlung von Mammakarzinom 9

3.2.1 TDM von Abemaciclib (Habler et al., 2022b) 9

3.2.2 TDM von Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib und die Hauptmetaboliten Abemaciclib M20 und M2 (Habler et al., 2023a) 11

3.3 TDM von CFTR-Modulatoren zur Behandlung Cystischer Fibrose (Habler et al., 2022a) 15

3.4 TDM potentieller COVID-19-Medikamente (Habler et al., 2021) 20

4 Zusammenfassung und Zukunftsperspektiven 24

5 Literatur 25

6 Veröffentlichungen der kumulativen Habilitationsschrift 27

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse mit isotopologem Standard oder strukturell abweichendem internen Standard. 2
Abbildung 2. Schematischer Aufbau eines 2D-LC-MS/MS-Systems mit A) online Probenaufreinigung (extraction column) und B) chromatographischer Auftrennung (analytical column) und anschließender massenspektrometrischer Detektion. 3
Abbildung 3. Überblick über das Therapeutische Drug Monitoring. 4
Abbildung 4. Pyramide der metrologischen Rückführbarkeitskette von Messergebnissen mit Angabe der Berechnung der Messunsicherheit u. 5
Abbildung 5. Schematischer Ablauf des neuartigen Protokolls für die Wertzuweisung bei Referenzmessverfahren mittels ID-LC-MS/MS. 6
Abbildung 6. A) Passing-Bablok-Regression der Messergebnisse (n=12) von Instrument 2 gegen die Messergebnisse von Instrument 1 für die Konzentration von Ciprofloxacin [mg/L] und B) Bland-Altman-Plot der Differenz zwischen Instrument 1 und 2 geteilt durch den Mittelwert [%] gegen den Mittelwert von Instrument 1 und 2 für die Konzentration von Ciprofloxacin der unbekannten Proben [mg/L] (n=12). 7
Abbildung 7. Konzentrations-Zeit-Profil von Abemaciclib in humanem Serum und Plasma über zwölf Stunden nach regelmäßiger zwölfstündiger Einnahme von 150 mg Abemaciclib (Steady State). 10
Abbildung 8. Molekülstrukturen von Abemaciclib, Abemaciclib M20, Abemaciclib M2, Palbociclib und Ribociclib. 12
Abbildung 9. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm von A) Qualitätskontrolle Level B und B) Realprobe #2 mit 40,2 ng/mL Abemaciclib, 95,5 ng/mL Abemaciclib M20 und 47,2 ng/mL Abemaciclib M2. 13
Abbildung 10. Molekülstrukturen von Ivacaftor, Ivacftor M1, Ivacaftor M6 und dem korrespondierenden internen Standard [$^{2}H_{4}$]-Ivacaftor. 16
Abbildung 11. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe eines Patienten mit Kaftrio-Therapie mit 2,36 mg/L Ivacaftor, 9,39 mg/L Ivacaftor M1, 2,61 mg/L Ivacaftor M6, 6,92 mg/L Tezacaftor, 10,5 mg/L Tezacaftor M1 und 6,75 mg/L Elexacaftor. 18
Abbildung 12. Molekülstrukturen von Favipiravir und dem korrespondierenden internen Standard [$^{13}C_{1}$-$^{15}N_{1}$]-Favipiravir. 21
Abbildung 13. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm von Kalibrator Level 1 der potentiellen COVID-19-Medikamente. 22

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Etablierte Einsatzfelder der LC-MS/MS in der Diagnostik..... 3
Tabelle 2. Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen [ng/mL] von Abemaciclib, Abemaciclib M20, Abemaciclib M2 in Realproben (n=8). 13
Tabelle 3. Ergebnisse der mittleren Konzentrationen [mg/L] mit Angabe der Standardabweichung (SD) in Realproben (n=20) von CF-Patienten mit Kaftrio-Therapie. 18
Tabelle 4. Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen [µg/L] potentieller COVID-19 Medikamente in Realproben (je n=6). 21

Abkürzungsverzeichnis

2D-ID-LC-MS/MS	Zweidimensionale Isotopenverdünnungs-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CYP	Cytochrom P450
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicine Agency)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HR	Hormonrezeptor
IS	(Isotopenmarkierter) interner Standard
ISO	Internationale Organisation für Normung
LLOQ	Untere Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MPR	Metabolic-to-parent Ratio
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer/Tandem-Massenspektrometrie
OTT	Orale Tumortherapie/-therapeutika
RMP	Referenzmessverfahren (reference measurement procedure)
SARS-CoV-2	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom-Coronavirus-Typ 2
SIVA (ID)	Stabilisotopenverdünnungsanalyse (isotope dilution)
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
u	Messunsicherheit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ULOQ	Obere Bestimmungsgrenze (upper limit of quantification)
VIM	Internationales Wörterbuch für Metrologie
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitende Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit wurde der hohe diagnostische Wert sowie die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der 2D-ID-LC-MS/MS-Methoden (zweidimensionale Isotopenverdünnungs-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie kombiniert mit Tandem-Massenspektrometrie) für das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) in der Laboratoriumsmedizin herausgearbeitet.

Referenzmessverfahren (RMP) zur Kalibrierung von Messwerten spielen eine zentrale Rolle im Konzept der metrologischen Rückführbarkeit in der Labormedizin. Im Zuge der Arbeit wurde ein neues Protokoll zur Standardisierung von RMP entwickelt, das auf ID-LC-MS/MS-Methoden basiert und eine Konkretisierung der ISO 15193 darstellt. Wesentliche Bestandteile sind hierbei eine standardisierte Messreihe, die automatisierte Datenverarbeitung durch ein neu entwickeltes RMP-Tool sowie die Minimierung der Messunsicherheit auf ein technisch mögliches Minimum.

Orale Tumortherapeutika (OTT) erweitern die Behandlungsoptionen in der Onkologie, stellen jedoch auch Herausforderungen für Ärzte und Patienten dar. Das entwickelte TDM-Verfahren auf Basis der 2D-ID-LC-MS/MS ermöglichte die gleichzeitige Quantifizierung aller zugelassenen CDK4/6-Inhibitoren für die Therapie des Mammakarzinoms und lieferte wertvolle pharmakokinetische Daten, insbesondere zur Therapie mit Abemaciclib. Eine weitere klinische Anwendung dieser Methode ist in einer geplanten Studie zu HR+ HER2- fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs vorgesehen.

Die Therapie mit CFTR-Modulatoren hat die Behandlung von Patienten mit Mukoviszidose (CF) revolutioniert. Im Jahr 2021 wurde die neu entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode erfolgreich in die klinische Routine zur TDM-Überwachung aller zugelassenen CFTR-Modulatoren eingeführt. Fortlaufendes TDM und weitere klinische Studien sollen dazu beitragen, die Versorgung von CF-Patienten durch systematische pharmakokinetische Daten weiter zu verbessern.

In Pandemiezeiten, wie während der COVID-19-Krise, bietet die Wiederverwendung bereits zugelassener Medikamente eine schnellere Lösung als die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Die entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zur Überwachung von potenziellen COVID-19-Therapeutika kann dabei helfen, die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Medikamente zu optimieren.

Nicht nur in zukünftigen Pandemiesituationen, sondern auch bei neuen Arzneimittelzulassungen bieten die im Rahmen dieser Arbeiten offenen LC-MS/MS-Systeme die einzigartige Flexibilität, die hier beschriebenen 2D-ID-LC-MS/MS-Methoden jeweils mit neuen, strukturell ähnlichen Wirkstoffen zu erweitern.

2 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

J.J. Thomson, der 1906 für seine Arbeit zur „Erfindung“ des Elektrons den Nobelpreis für Physik erhielt, konstruierte im Jahr 1912 das später als erstes Massenspektrometer (MS) anerkannte Gerät zur Messung der Massen geladener Atome. (Gove, 2003; Griffiths, 2008)
Das Prinzip der Massenspektrometrie (MS) beruht auf einer massenselektiven Detektion von ionisierten Molekülen basierend auf ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) sind aus drei Quadrupolen aufgebaut, die als Massenanalysator 1, Kollisionszelle und Massenanalysator 2 fungieren. Das Goldstandard-Verfahren der gezielten (targeted) Quantifizierung von niedermolekularen Verbindungen, sogenannten „small molecules“ (Substanzen mit einem Molekulargewicht < 1000 g/mol), mittels MS/MS wird als Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) oder auch als „ID“ (isotope dilution) bezeichnet. In Abbildung 1 ist das Prinzip der SIVA dargestellt.

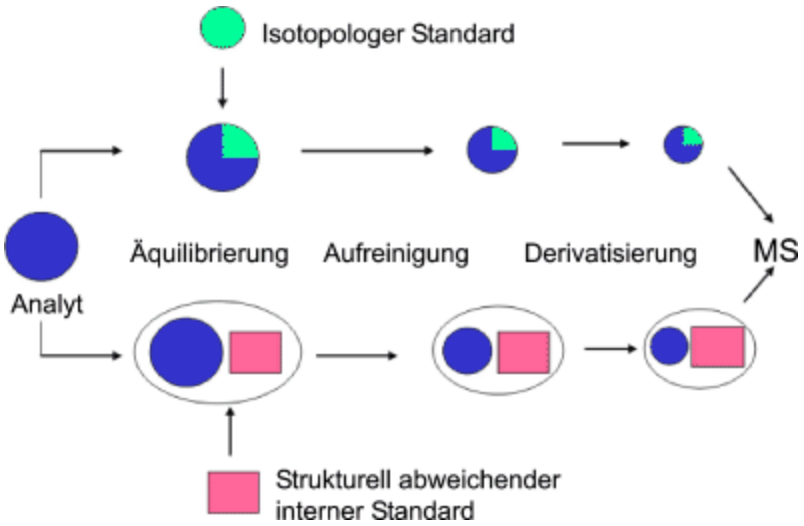


Abbildung 1. Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse mit isotopologem Standard oder strukturell abweichendem internen Standard.

Nach Zugabe eines isotopologen Standards (grün) zum Analyten bzw. zur Probe (blau) bleibt das Verhältnis während Equilibrierung, Aufreinigung und Derivatisierung bis zur MS-Analyse konstant. Beim Einsatz eines strukturell abweichenden internen Standards (pink) kann sich das Verhältnis zwischen internem Standard und Analyt verändern und das Analysenergebnis beeinflussen.

Aus Rychlik & Asam, 2009.

In das Institut für Laboratoriumsmedizin des LMU Klinikums hielt die Gaschromatographie gekoppelt mit MS (GC-MS) Mitte der 1970er Jahre Einzug. Ab dem Jahr 2000 folgte die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit MS (HPLC-MS) respektive die zweidimensionale Isotopenverdünnungs-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (2D-ID-LC-MS/MS) zur Quantifizierung bzw. zum Therapeutischen Drug Monitoring (TDM) von Immunsuppressiva. (Vogeser, 2003)

Den schematischen Aufbau eines modernen 2D-LC-MS/MS-Systems mit Autosampler, zwei (binären) Pumpensystemen, Schaltventilen, Säulenofen, Probenaufreinigung über eine online Festphasenextraktion, chromatographischer Auftrennung über eine analytische Säule und anschließender Detektion mittels MS/MS zeigt Abbildung 2.

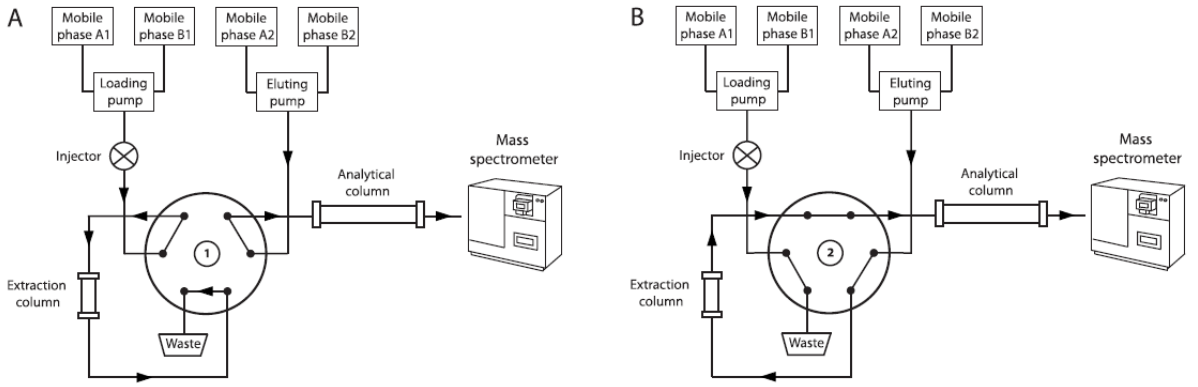


Abbildung 2. Schematischer Aufbau eines 2D-LC-MS/MS-Systems mit A) online Probenaufreinigung (extraction column) und B) chromatographischer Auftrennung (analytical column) und anschließender massenspektrometrischer Detektion.

Aus Habler et al., 2021.

Trotz der Komplexität von MS-Verfahren haben diese im Vergleich zu Immunoassays in der klinischen Chemie viele Vorteile: hohe Selektivität, Spezifität, Sensitivität, exakte Quantifizierung über interne Standards (IS) als Goldstandard, breiter Konzentrationsbereich, geringe Anfälligkeit für Kreuzreaktionen, simultane Bestimmung mehrerer Analyten und Metaboliten (Multiplexing).

Einige der etablierten Einsatzfelder der LC-MS/MS im klinischen Labor sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Etablierte Einsatzfelder der LC-MS/MS in der Diagnostik

#	Klinischer Bereich	Zielanalyten	Literatur
1	Therapeutisches Drug Monitoring	Immunsuppressiva	Vogeser, 2003; Hiemke et al., 2017; Eliasson et al., 2013; Seger & Salzmann, 2020; van der Gugten, 2020
2		Psychopharmaka	
3		Antiinfektiva	
4		Antiepileptika	
5	Klinische Endokrinologie	Steroidprofiling	Vogeser, 2003; Seger & Salzmann, 2020; van der Gugten, 2020
6		Biogene Amine	
7	Abusus	Drogen	Tamama, 2021
8		Alkohol	Jones, 2023
9		Nikotin	Habler et al., 2020
10	Neugeborenen-Screening	Aminosäuren, Acylcarnitine	Vogeser, 2003; van der Gugten, 2020
11	Referenzmessverfahren		Vogeser, 2003; Seger & Salzmann, 2020

Allgemein bietet TDM mittels LC-MS/MS im klinischen Routinelabor eine leistungsstarke und vielseitige Methode zur exakten Quantifizierung von Arzneimittelkonzentrationen in Patientenproben. TDM unterstützt die Individualisierung der Arzneimitteltherapie sowie die Anpassung der Dosierung, dass die mit der therapeutischen Wirksamkeit verbundenen systemischen Medikamentenspiegel erreicht werden können. Ebenso soll dabei das Risiko konzentrationsabhängiger unerwünschter Nebenwirkungen verringert werden. Einblicke in die Pharmakokinetik helfen dabei, Wechselwirkungen zwischen Medikamenten, insbesondere bei Polypharmazie, und patientenspezifischen Faktoren zu verstehen. TDM kann die Wirksamkeit von Medikamenten verbessern, unerwünschte Wirkungen minimieren sowie die Patientensicherheit und den Behandlungserfolg erhöhen, indem es einen umfassenden Ansatz für das Medikamentenmanagement bietet (Abbildung 3). (Eliasson et al., 2013; Ates et al., 2020; Kang & Lee, 2009)

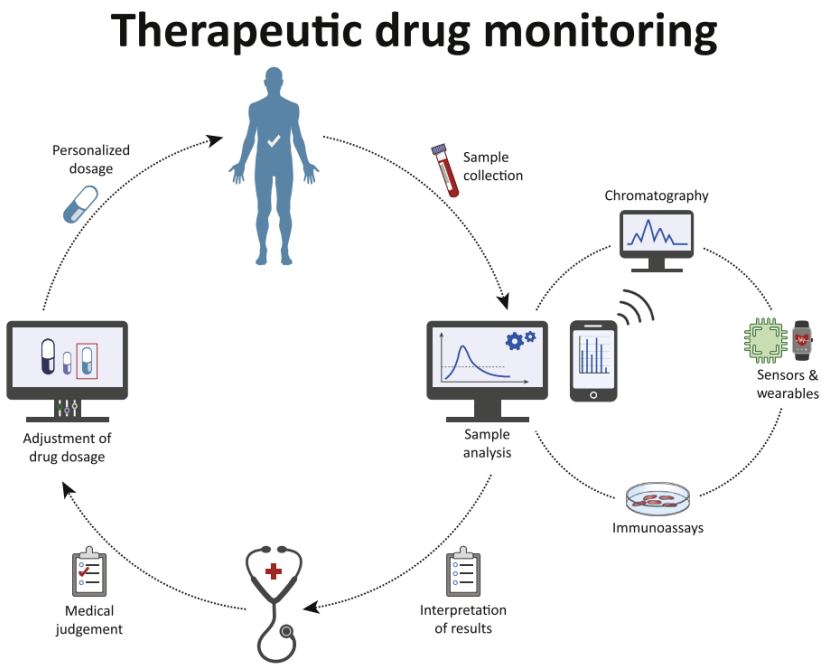


Abbildung 3. Überblick über das Therapeutische Drug Monitoring.

Aus Ates et al., 2020.

Basierend auf dem hohen diagnostischen Stellenwert von MS-basierten Messverfahren wurden im Rahmen dieser Habilitationsarbeit die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von 2D-ID-LC-MS/MS im TDM in der Laboratoriumsmedizin untersucht. Die Basis für das TDM bilden im Sinne der metrologischen Rückführbarkeit Referenzmessverfahren als Standard zur Gewährleistung der analytischen Zuverlässigkeit. TDM von oralen Tumortherapeutika und TDM von Orphan Drugs zeigen ebenso wie die Neuverwendung von zugelassenen Arzneimitteln in Pandemiesituationen die Leistungsfähigkeit von MS-Verfahren auf – mit dem Ziel, durch TDM die personalisierte Medizin zu optimieren.

3 Anwendungen der Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring und ihre Bedeutung in der klinischen Chemie

3.1 Protokoll zur Wertzuweisung für Massenspektrometrie-basierte Referenzmessverfahren (Schaeffler et al., 2023)

Schaeffler, J., **Habler, K.**, & Vogeser, M. (2023). A suggested protocol for value assignment using isotope-dilution-LC-MS/MS in reference measurement procedures - exemplary application for ciprofloxacin in serum. *Clinica Chimica Acta, 549*, 1–6.

Die ISO 17511 beschreibt das Konzept der metrologischen Rückführbarkeit in der Labormedizin im Allgemeinen. Gemäß dem internationalen Wörterbuch für Metrologie (VIM) wird unter metrologischer Rückführbarkeit die Eigenschaft eines Messergebnisses verstanden, bei der das Ergebnis durch eine dokumentierte, ununterbrochene Kette von Kalibrierungen mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden kann, wobei jede Kalibrierung zur Messunsicherheit beiträgt (Abbildung 4). (Pereira, 2016; Schaeffler et al., 2023)

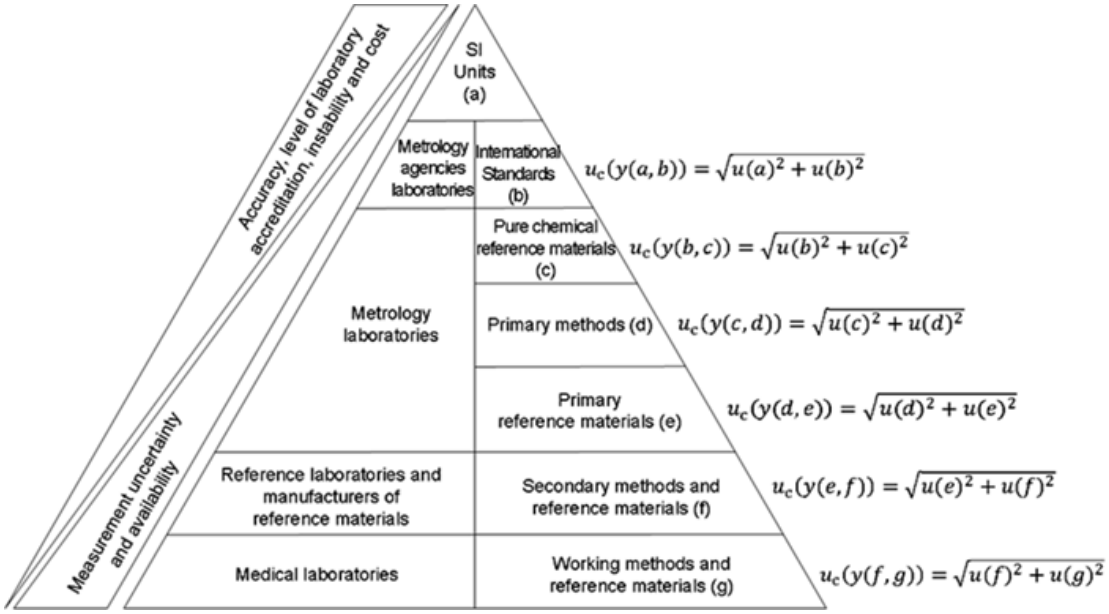


Abbildung 4. Pyramide der metrologischen Rückführbarkeitskette von Messergebnissen mit Angabe der Berechnung der Messunsicherheit u.

Aus Pereira, 2016.

In diesem Zusammenhang beschreibt die ISO 15193 die Anforderungen an Referenzmessverfahren (RMP). Die ISO 15193 ist generisch formuliert und erhebt nicht den Anspruch, auf Besonderheiten verschiedener Analysemethoden einzugehen. Beispielweise gibt es nur die allgemeine Anforderung, dass die Struktur der Messserie angegeben werden muss, ohne konkrete Vorgaben zum Aufbau der Messserie zu machen. ID-LC-MS/MS-

Verfahren werden zunehmend als Grundlage für RMP, insbesondere für “small molecules“, verwendet. Bisher veröffentlichte RMP, die auf LC-MS/MS basieren, unterscheiden sich teilweise in ihrer Struktur und Art der Wertzuweisung nur geringfügig von Routinemethoden. Als Konkretisierung der ISO 15193 wurde ein neues Protokoll entwickelt, das zur Standardisierung von ID-LC-MS/MS-Verfahren im Rahmen von RMP verwendet werden kann. Dieses Protokoll adressiert vor allem die standardisierte Methodenbeschreibung, die standardisierte Messserie, die Datenerfassung, die Auswertung und Beurteilung der analytischen Metadaten für eine eingehende Beurteilung der Zuverlässigkeit der Messung innerhalb einer Messserie sowie die Ergebnisberechnung inklusive der Bestimmung der Messunsicherheit (u). (Schaeffler et al., 2023)

Abbildung 5 zeigt den schematischen Ablauf des neu entwickelten Protokolls für die Wertzuweisung bei RMP mittels ID-LC-MS/MS.

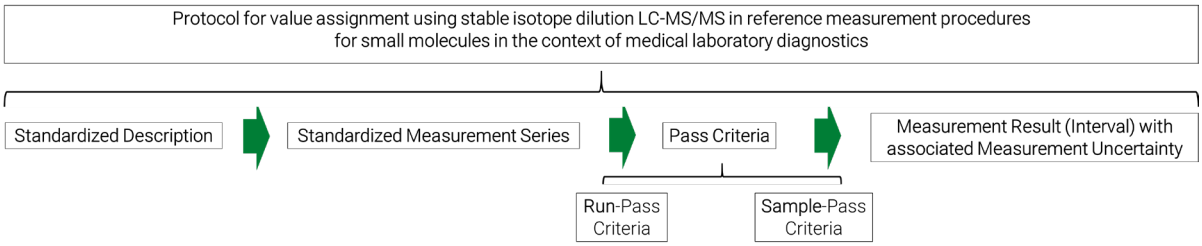


Abbildung 5. Schematischer Ablauf des neuartigen Protokolls für die Wertzuweisung bei Referenzmessverfahren mittels ID-LC-MS/MS.

Aus Habler et al., 2023b

Da vor allem Fokus auf die automatisierte Rohdaten- und Metadatenverarbeitung von LC-MS/MS-Verfahren gelegt worden ist, wurde im Rahmen des Projektes als zentrales Element ein RMP-Verarbeitungs-Tool (Microsoft Excel®) entwickelt. Dieses RMP-Verarbeitungs-Tool erstellt detailliert standardisierte Berichte über die Qualität der Messserie und generiert automatisiert die Messwertzuweisung inklusive Messunsicherheit der analysierten unbekannten Einzelproben. Konkret besteht das RMP-Verarbeitungs-Tool aus folgenden Arbeitsblättern: Gebrauchsanweisung, standardisierte Methodenbeschreibung, Layout der Messserie, Bewertung der Run-Pass-Kriterien, Bewertung der Sample-Pass-Kriterien, Berechnung der Messergebnisse, zugehörige Messunsicherheit, Graphik zu den während der Messserie beobachteten IS-Flächen. (Schaeffler et al., 2023)

Das RMP basiert auf einer 2D-ID-LC-MS/MS-Methode und wurde als Proof-of-Concept für die Quantifizierung von Ciprofloxacin (Breitbandantibiotikum) in Humanserum angewendet. Das TDM von Antibiotika wird zunehmend als wichtig erkannt und bietet eine wesentliche Grundlage, die Behandlung von lebensbedrohlichen Infektionen auf personalisierte Weise zu optimieren. Sobald Routinemethoden beispielsweise zur Bestimmung von Ciprofloxacin

verfügbar werden, ist eine metrologische Rückführbarkeit von Master-Kalibratoren und externen Qualitätskontrollen unter Verwendung von RMP erforderlich. (Schaeffler et al., 2023) Die umfangreiche Leistungsbewertung des entwickelten RMP umfasste die Ungenauigkeit, Impräzision und Reproduzierbarkeit der 2D-ID-LC-MS/MS-Methode. Aus den Ergebnissen dieser Leistungsbewertungsstudie werden strenge und realistische Akzeptanzkriterien für die Anwendung im Langzeitbetrieb des RMP abgeleitet, bei dem in jeder Serie ein Validierungsprogramm durchgeführt wird. Im Rahmen eines inter-Instrumentenvergleichs wurde in zwölf Serumproben (anonymisierte Restmaterialien) an zwei verschiedenen LC-MS/MS-Systemen jeweils in Vierfachbestimmung Ciprofloxacin analysiert (Abbildung 6). (Schaeffler et al., 2023)

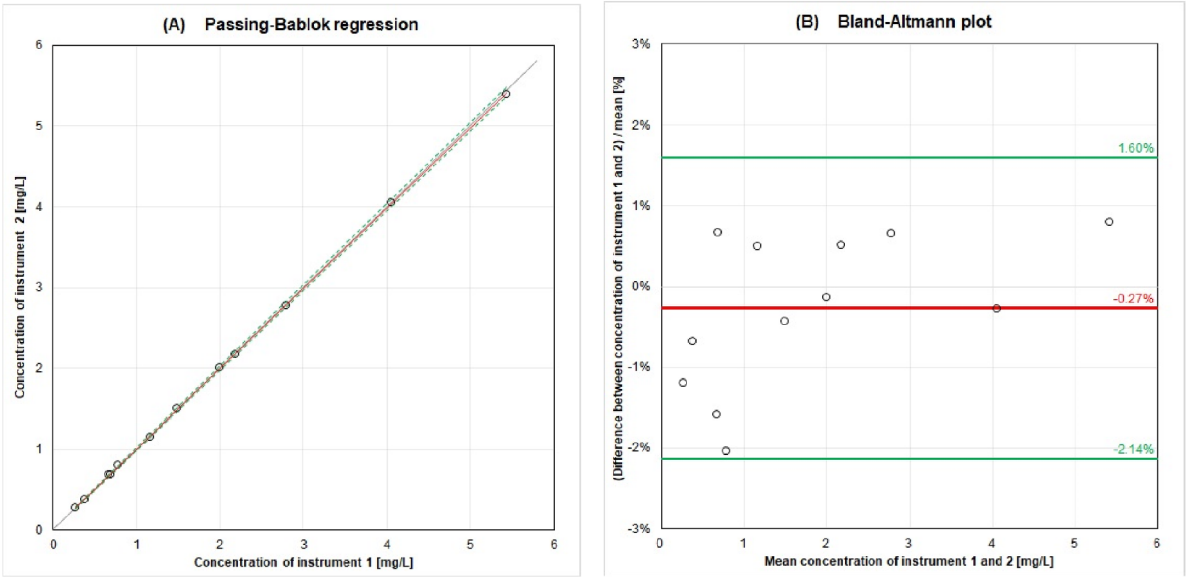


Abbildung 6. A) Passing-Bablok-Regression der Messergebnisse (n=12) von Instrument 2 gegen die Messergebnisse von Instrument 1 für die Konzentration von Ciprofloxacin [mg/L] und B) Bland-Altman-Plot der Differenz zwischen Instrument 1 und 2 geteilt durch den Mittelwert [%] gegen den Mittelwert von Instrument 1 und 2 für die Konzentration von Ciprofloxacin der unbekannten Proben [mg/L] (n=12).

A) graue Linie, Identitätslinie; rote Linie, Regressionslinie; gestrichelte grüne Linien, 95%-Konfidenzintervall. B) rote Linie, Mittelwert der Differenz (Bias); grüne Linien, ±1,96xStandardabweichung.

Aus Schäffler et al., 2023.

Das in dieser Arbeit exemplarisch betrachtete RMP mittels 2D-ID-LC-MS/MS für die Quantifizierung von Ciprofloxacin im Serum hat sich mit einem Variationskoeffizienten (VK) der interassay Impräzision von unter 1 % und einer ausgezeichneten Übereinstimmung zwischen den beiden LC-MS/MS-Systemen als geeignet erwiesen. (Schaeffler et al., 2023)
RMP stehen in der Rückführbarkeitskette weit oben und die Messunsicherheit breitet sich stromabwärts über Routinekalibratoren bis hin zur Patientenmessung im klinischen Routinelabor weiter aus. Allgemein ist es beim TDM entscheidend, im Routinebetrieb eine möglichst geringe Messunsicherheit anzustreben. Schon kleine Unterschiede in den Werten

können im Hinblick auf die Dosisanpassung und Beurteilung therapeutischer Zielwerte klinisch bedeutsam sein. Daher ist die Gewährleistung einer hohen analytischen Zuverlässigkeit, beginnend mit der Zuordnung von Werten zu Kalibratoren, im Interesse der Patienten unerlässlich. Das beschriebene Protokoll für RMP zielt konsequent darauf ab, die Messunsicherheit der Ergebnisse auf das mit den verfügbaren Instrumenten und Materialien technisch machbare Maß zu minimieren und kann für die Wertzuweisung von Kalibriermaterialien und Ringversuchsproben empfohlen werden. (Schaeffler et al., 2023)
Dieses neue Konzept für RMP mittels 2D-ID-LC-MS/MS wurde bereits auf weitere Antibiotika erfolgreich angewendet und kann perspektivisch auch auf andere Substanzklassen, insbesondere “small molecules“, übertragen werden.

3.2 TDM von CDK4/6-Inhibitoren zur Behandlung von Mammakarzinom

3.2.1 TDM von Abemaciclib (Habler et al., 2022b)

Habler, K., Vogeser, M., & Teupser, D. (2022b). An UHPLC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitor abemaciclib in human serum. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab, 24*, 15–21.

Unter den nicht übertragbaren und chronischen Krankheiten ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit die häufigste Todesursache. Mit etwa 2,3 Millionen (25 %) neuen Fällen ist Brustkrebs weltweit die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen. In Deutschland gibt es jährlich etwa 70.000 neue Fälle. Studiendaten zufolge wird jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken. Die Inzidenz nimmt aufgrund der steigenden Lebenserwartung und des allgemeinen Bevölkerungswachstums zu. (Habler et al., 2022b; Habler et al., 2023a)

Sogenannte CDK4/6-Inhibitoren blockieren die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), die wichtige Regulatoren der Zellzyklusprogression und Zellproliferation sind. Eine Hemmung dieser Proteine führt zu Seneszenz und Apoptose. Als jüngster Vertreter der CDK4/6-Inhibitoren wurde Abemaciclib (Handelsname Verzenios) als Mono- oder Kombinationstherapie 2017 bzw. 2018 von der Food and Drug Administration (FDA) und European Medicine Agency (EMA) zur Behandlung von Hormonrezeptor positivem (HR+) und humanem epidermalem Wachstumsfaktor negativem (HER-) fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zugelassen. Üblicherweise wird für die Therapie mit Abemaciclib ein festes Dosierungsschema vorgegeben. Abhängig von der Schwere der Nebenwirkungen (z.B. Neutropenie, Leukopenie, Anämie, Diarrhö) und komplexen pharmakokinetischen Interaktionen durch Cytochrom P450 (CYP) 3A4-Inhibitoren (z.B. Azol-Antimykotika) oder -Induktoren (z.B. Johanniskraut) sind Dosisanpassungen in den Fachinformationen empfohlen. Die orale Tumortherapie (OTT) mit CDK4/6-Inhibitoren erweitert die Behandlungsmöglichkeiten der Tumortherapie und kann aufgrund der Verabreichung im häuslichen Umfeld eine Selbstständigkeit suggerieren, die eine angenehmere Form der allgemein sehr komplexen Therapie darstellen kann. Mangelnde Adhärenz bei OTT, bekräftigt durch Nebenwirkungen und Wechselwirkungen durch Polypharmazie, kann sich zusätzlich direkt auf das Ansprechen, die Wirksamkeit und den Behandlungserfolg auswirken. Diese Herausforderungen für Patienten und Ärzte indizieren ein systematisches TDM von CDK4/6-Inhibitoren. (Habler et al., 2022b; Habler et al., 2023a)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur exakten Quantifizierung von Abemaciclib in Humanblut (über den IS [$^{2}H_{8}$]-Abemaciclib) eine 2D-ID-LC-MS/MS-Methode entwickelt. (Habler et al., 2022b)

Die umfangreiche Methodenvalidierung der TDM-Methode erfolgte auf der Grundlage der “Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA. Sie erfüllte alle erforderlichen Kriterien hinsichtlich Kalibrierung (untere (LLOQ) und obere Bestimmungsgrenze (ULOQ), Ungenauigkeit und Impräzision (intra- und interassay), Carry-over, Selektivität und Empfindlichkeit, Matrixeffekt, Wiederfindung, Prozesseffizienz, Verdünnungslinearität und Stabilität. Als Proof-of-Concept wurde die entwickelte TDM-Methode eingesetzt, um Abemaciclib in Realproben (n=20) einer Patientin mit Abemaciclib-Therapie (Talspiegel im Steady State nach regelmäßiger Einnahme von 150 mg Abemaciclib zweimal täglich, alle zwölf Stunden) zu bestimmen. Um zusätzlich pharmakokinetische Daten (AUC (area under the curve), Zeit (t_{min}/t_{max}) bis zur minimalen und maximalen Konzentration (c_{min}/c_{max}) von Abemaciclib über zwölf Stunden im Steady State in unterschiedlichen Matrizes abzubilden, wurden sowohl Serum- als auch Plasmaproben (je n=7) alle zwei Stunden direkt in Folge abgenommen und mit der TDM-Methode analysiert (Abbildung 7). Das Institutional Review Board entschied, dass für diese Studien keine Genehmigung erforderlich war, da das TDM von Abemaciclib und den Metaboliten im Rahmen eines individuellen Heilversuchs eingesetzt wurde. (Habler et al., 2022b)

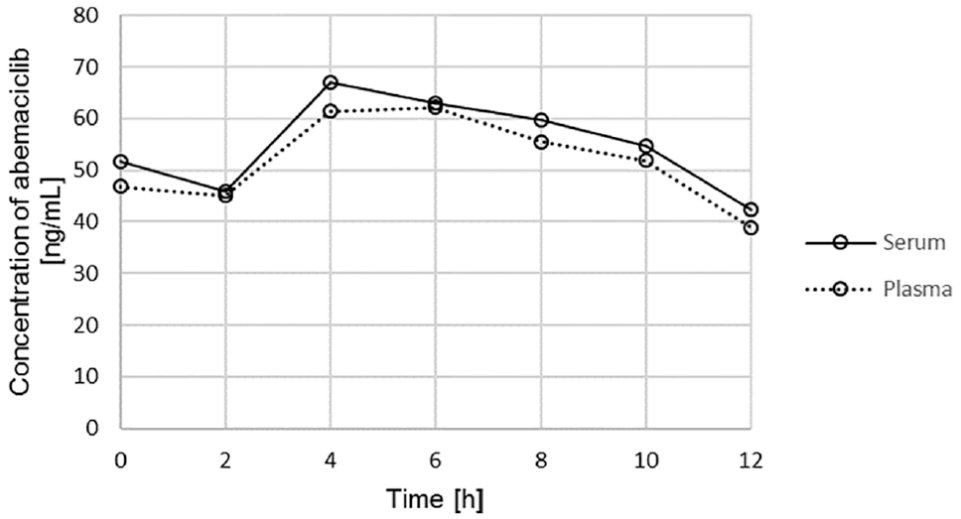


Abbildung 7. Konzentrations-Zeit-Profil von Abemaciclib in humanem Serum und Plasma über zwölf Stunden nach regelmäßiger zwölfstündiger Einnahme von 150 mg Abemaciclib (Steady State).

Aus Habler et al., 2022b.

Die Abemaciclib-Spiegel der 20 Serumproben lagen zwischen 21,8 und 68,4 ng/mL Die pharmakokinetischen Parameter von Abemaciclib im Serum und Plasma waren vergleichbar, sodass beide Probenmatrizes für das TDM von Abemaciclib verwendet werden können: Serum $AUC_{0\text{-}12h}$ 673 ng*h/mL, t_{min} nach 12 Stunden mit c_{min} von 42,3 ng/mL und t_{max} nach 4 Stunden mit c_{max} von 66,9 ng/mL; Plasma $AUC_{0\text{-}12h}$ von 638 ng*h/mL, t_{min} nach 12 Stunden mit c_{min} von 38,9 ng/mL und t_{max} nach 6 Stunden mit c_{max} von 62,1 ng/mL. Im Vergleich dazu lagen

die bisher in der Literatur beschriebenen $AUC_{0\text{-}12h}$ im Steady State je nach Dosis zwischen 546 und 3000 ng*h/mL.
Die im Rahmen dieses Projekts entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode lieferte wichtige pharmakokinetische Daten zur Therapie mit Abemaciclib.

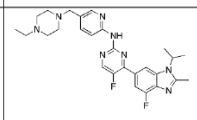
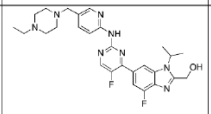
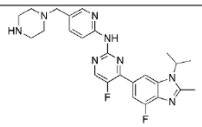
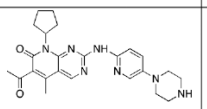
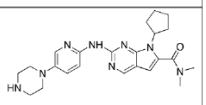
3.2.2 TDM von Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib und die Hauptmetaboliten Abemaciclib M20 und M2 (Habler et al., 2023a)

Habler, K., Kalla, A.-S., Rychlik, M., Vogeser, M., & Teupser, D. (2023a). Therapeutic drug monitoring in breast cancer therapy – LC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, ribociclib, and major metabolites abemaciclib M20 and M2 in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 225*, 1-9.

Neben Abemacliclib sind auch die CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib (Handelsname Ibrance) und Ribociclib (Handelsname Kisqali) kombiniert mit z.B. Aromatasehemmern zur Behandlung von HR+ und HER2- fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs von der FDA und EMA zugelassen. (Habler et al., 2023a)
Die CDK4/6-Inhibitoren Abemaciclib, Palbociclib und Ribociclib unterliegen extensiver Metabolisierung, insbesondere in der Leber durch CYP3A4. Die zum Teil pharmakologisch aktiven Metaboliten von Palbociclib (Metabolit M17 Lactam von Palbociclib) und Ribociclib (Metabolit M4 N-Desmethylribociclib) werden aufgrund ihrer geringen Plasmaexposition von weniger als 10 % als vernachlässigbar angesehen. Im Gegensatz dazu wird Abemaciclib zu den Metaboliten M20 (Hydroxyabemaciclib), M2 (N-Desetyhlabemaciclib) und M18 (Hydroxy-N-Desethylabemaciclib) verstoffwechselt, für die eine Plasmaexposition von 34 % Abemaciclib, 26 % Abemaciclib M20, 13 % Abemaciclib M2 und 5 % Abemaciclib M18 beschrieben ist. Die Metaboliten Abemaciclib M20 und Abemaciclib M2 haben eine ähnlich hohe Potenz wie Abemaciclib selbst und tragen somit zur Wirkung des Arzneimittels bei. Ähnlich zu Abemaciclib wird auch für die Therapie mit Palbociclib oder Ribociclib ein festes Dosierungsschema vorgegeben. Dosierungsanpassungen werden ebenfalls in Abhängigkeit der Schwere der Nebenwirkungen oder bei Polypharmazie, insbesondere bei CYP3A4-Inhibitoren, empfohlen. (Habler et al., 2023a)
Auf der Grundlage der oben beschriebenen TDM-Methode für Abemaciclib wurde diese zu einer TDM-Multi-Methode, ebenfalls basierend auf 2D-ID-LC-MS/MS, erweitert. Sie umfasst letztendlich die simultane Quantifizierung aller bisher zugelassenen CDK4/6-Inhibitoren Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib sowie die pharmakologisch aktiven Metaboliten Abemaciclib M20 und Abemaciclib M2. (Habler et al., 2023a)

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurden die erforderlichen Kriterien der "Bioanalytical Method Validation – Guidance for Industry" der FDA (Kalibrierung (LLOQ und ULOQ, Ungenauigkeit und Impräzision (intra- und interassay), Carry-over, Selektivität und Empfindlichkeit, Matrixeffekt, Wiederfindung, Prozesseffizienz, Verdünnungslinearität und Stabilität) erfüllt. Durch Messung des natürlichen Isotopologs von Ribociclib konnte der Messbereich der entwickelten TDM-Methode so gewählt werden, dass er trotz der deutlich unterschiedlichen Konzentrationsbereiche der Analyten (Faktor 10 bei Ribociclib vs. Abemaciclib M2) für die jeweils erwarteten in-vivo-Konzentrationen in Humanserum geeignet ist. Aufgrund der Probenaufreinigung mittels 2D-Chromatographie und der Quantifizierung über die IS [$^2H_8$]-Abemaciclib, [$^2H_8$]-Palbociclib und [$^2H_6$]-Ribociclib wurde kein Matrixeffekt beobachtet. Somit ergeben sich keine Limitationen oder Ausschlusskriterien bezüglich Hämolyse, Ikterus und Lipämie. Präanalytisch erweisen sich die untersuchten CDK4/6-Inhibitoren als äußerst stabil. Eine Lagerung der Proben bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss ist für acht Tage (Daten nicht publiziert) und bei -80 °C bis zu mindestens einem Jahr möglich. (Habler et al., 2023a)
In Abbildung 8 sind die Molekülstrukturen der CDK4/6-Inhibitoren dargestellt.

Abbildung 8. Molekülstrukturen von Abemaciclib, Abemaciclib M20, Abemaciclib M2, Palbociclib und Ribociclib.

Analyte	Abemaciclib	Abemaciclib M20	Abemaciclib M2	Palbociclib	Ribociclib
Structure					

Aus Habler et al., 2023a.

Im Rahmen eines individuellen Heilversuchs (nicht genehmigungspflichtig) wurden die Konzentrationen von Abemaciclib, Abemaciclib M20 und Abemaciclib M2 in acht Serumproben einer Patientin mit Abemaciclib-Therapie (Talspiegel im Steady State nach regelmäßiger Einnahme von 150 mg Abemaciclib zweimal täglich, alle zwölf Stunden) bestimmt. Um die weitere Anwendbarkeit der TDM-Methode zu demonstrieren, wurden in gepoolte Serum-Restmaterialien (n=27) aus Routineanalysen verschiedene Mengen der entsprechenden CDK4/6-Inhibitoren dotiert. Dabei wurde der gesamte Messbereich abgedeckt. Die gemessenen Konzentrationen stimmten gut mit den Nominalkonzentrationen überein und wichen nicht mehr als ±10 % davon ab. (Habler et al., 2023a)
Abbildung 9 zeigt beispielhaft ein 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm der Qualitätskontrolle Level B mit allen CDK4/6-Inhibitoren sowie der Serumprobe #2 mit Abemaciclib, Abemaciclib M20 und Abemaciclib M2 und den entsprechenden IS.

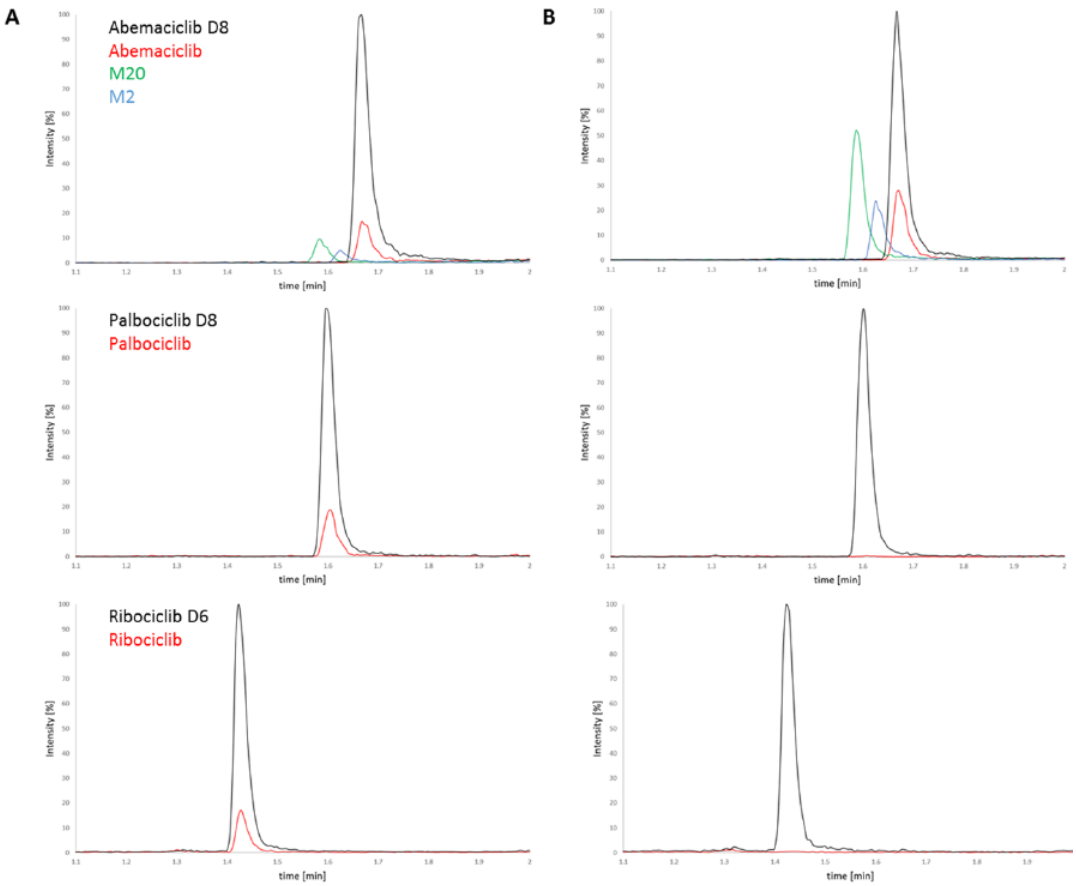


Abbildung 9. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm von A) Qualitätskontrolle Level B und B) Realprobe #2 mit 40,2 ng/mL Abemaciclib, 95,5 ng/mL Abemaciclib M20 und 47,2 ng/mL Abemaciclib M2.

Aus Habler et al., 2023a.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen von Abemaciclib, Abemaciclib M20, Abemaciclib M2 in Realproben (n=8).

Tabelle 2. Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen [ng/mL] von Abemaciclib, Abemaciclib M20, Abemaciclib M2 in Realproben (n=8).

Sample #	Measured concentration of respective analyte, ng/mL (Deviation to nominal concentration, %)		
	Abemaciclib	Abemaciclib M20	Abemaciclib M2
Authentic samples (trough values, 150 mg abemaciclib, twice daily)			
1	29.6	79.0	32.1
2	40.2	95.5	47.2
3	32.5	64.0	29.9
4	21.9	49.6	23.3
5	40.7	84.2	44.3
6	35.2	64.8	26.1
7	31.6	56.4	29.3
8	29.5	67.6	30.0

Aus Habler et al., 2023a.

In den untersuchten Serumproben lag die Konzentration von Abemaciclib zwischen 21,9 und 40,7 ng/mL, von Abemaciclib M20 zwischen 49,6 und 95,5 ng/mL und von Abemaciclib M2 zwischen 23,3 und 47,2 ng/mL (je n=8). Im Durchschnitt ergab sich daraus ein Konzentrationsverhältnis von etwa 1:2:1 Abemaciclib:M20:M2. TDM-Zielspiegel für die Blutkonzentration von Abemaciclib liegen orientierend bei etwa 200 ng/mL, beruhen aber auf nicht belastbaren Daten. Um Zielspiegel zu definieren und die Dosis-Wirkungs-Beziehung genauer zu untersuchen, müssen weitere Studien durchgeführt werden, die auch die pharmakologisch aktiven Metaboliten Abemaciclib M20 und Abemaciclib M2 einschließen. (Groenland et al., 2020; Habler et al., 2022b; Habler et al., 2023a)

Das hier beschriebene TDM von CDK4/6-Inhibitoren bietet ein wertvolles Puzzleteil, um Arzneimittelkonzentrationen mit Dosierungsschemata und Nebenwirkungen zu kombinieren und so die Therapietreue, die Therapiesicherheit und den Behandlungserfolg zu erhöhen. Weitere klinische Anwendung findet die dargestellte 2D-ID-LC-MS/MS-Multi-Methode zum TDM von CDK4/6-Inibitoren in einer geplanten klinischen Studie zu HR+ HER2- fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs.

3.3 TDM von CFTR-Modulatoren zur Behandlung Cystischer Fibrose (Habler et al., 2022a)

Habler, K., Kalla, A.-S., Rychlik, M., Bruegel, M., Teupser, D., Nährig, S., Vogeser, M., & Paal, M. (2022a). Isotope dilution LC-MS/MS quantification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor, and their major metabolites in human serum. *Clinical chemistry and laboratory medicine, 60*, 82–91.

Cystische Fibrose (CF) zählt zu den seltenen Erkrankungen und gilt als die häufigste lebensbedrohliche genetische Störung unter Kaukasiern mit einer Prävalenz von 1:3.000 bis 1:6.000. Weltweit leben schätzungsweise 160.000 Patienten mit CF, davon sind 65 % diagnostizierte CF-Patienten. In Deutschland sind insgesamt ca. 8.000 CF-Patienten registriert. CF ist eine autosomal rezessive genetische Störung und wird durch Mutationen im CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)-Gen verursacht, das die Sekretionszellen in verschiedenen Organen, insbesondere im Atmungs- und Verdauungstrakt, beeinträchtigt. (Habler et al., 2022a; Guo et al., 2022)

Seit der Entdeckung des CFTR-Gens im Jahr 1989 hat sich der Behandlungsansatz von CF-Patienten von symptomatischer Behandlung bis hin zu einer stärker personalisierten Therapie mit sogenannten CFTR-Modulatoren entwickelt. Bei den CFTR-Modulatoren handelt es sich um “small molecules“, die die durch genetische Mutationen verursachte Fehlfunktion des CFTR-Proteins korrigieren sollen. (Habler et al., 2022a)

Der erste CFTR-Modulator Ivacaftor (Handelsname Kalydeco) wurde von der FDA und EMA 2012 zugelassen, gefolgt von einer Kombinationstherapie bestehend aus Lumacaftor und Ivacaftor (Handelsname Orkambi) im Jahr 2015 für die häufigste CF-Mutation, die ΔF508-Mutation. In der Folge wurde 2018 eine duale Therapie aus Tezacaftor und Ivacaftor (Handelsname Symkevi) zugelassen, die eine bessere Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen aufweist. Seit 2019 bzw. 2020 (FDA/EMA) wurde mit der Dreifach-Kombinations-Therapie Elexacaftor, Tezacaftor und Ivacaftor (Handelsname Trikafta (US), Kaftrio (EU)) für Patienten mit mindestens einer ΔF508-Mutation eine erhebliche Verbesserung der Lungenfunktion und der pulmonalen Exazerbation erreicht. Damit ist dies eine vielversprechende Behandlungsoption für etwa 85 % der CF-Patienten. Die Jahreskosten der Triple-Therapie belaufen sich auf ca. 250.000 € pro Patient. (Habler et al., 2022a)

Alle CFTR-Modulatoren werden hauptsächlich durch CYP3A4 und CYP3A5 extensiv metabolisiert. Ivacaftor wird in den weniger aktiven Metaboliten Ivacaftor M1 und in den inaktiven Metaboliten Ivacaftor M6 umgewandelt, Tezacaftor und Elexacaftor hauptsächlich in die weniger aktiven Metaboliten Tezacaftor M1 und Elexacaftor M23, wobei Lumacaftor unmetabolisiert ausgeschieden wird. Arzneimittel, die die CYP3A4-Aktivität beeinflussen,

können die Wirkstoffspiegel der CFTR-Modulatoren im Blut erheblich verändern. Bei der gleichzeitigen Gabe von mäßigen bis starken CYP3A4-Inhibitoren (z.B. Azol-Antimykotika wie Posaconazol, Voriconazol, Isavuconazol) wird empfohlen, die Dosis der CFTR-Modulatoren gemäß den Gebrauchsinformationen anzupassen. Dies gilt auch bei Leberfunktionsstörungen. Die Einnahme von CYP3A4-Induktoren (z.B. Johanniskraut) oder der Konsum von CYP3A4-Inhibitoren (z.B. Grapefruitprodukte) ist zu vermeiden. (Habler et al., 2022a)

Als Teil der personalisierten Medizin kann TDM von CFTR-Modulatoren dazu beitragen, Kosten zu reduzieren und vor allem die Versorgung von CF-Patienten zu optimieren, bei denen das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen droht.

Nachdem nur äußerst wenige Methoden zur Bestimmung von CFTR-Modulatoren beschrieben waren, die zudem einige Defizite in der Quantifizierung (Standardadditionsverfahren) aufwiesen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die erste 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zur simultanen Quantifizierung der CFTR-Modulatoren Ivacaftor, Tezacaftor, Elexacaftor, Lumacaftor sowie ihrer Hauptmetabolite Ivacaftor M1, Ivacaftor M6 und Tezacaftor M1 in Humanserum entwickelt, validiert und in die Routinediagnostik translatiert. Zur exakten Quantifizierung wurden die IS [$^2H_4$]-Ivacaftor, [$^2H_4$]-Tezacaftor, [$^2H_3$]-Elexacaftor und [$^2H_4$]-Lumacaftor, die zum Teil erst in Speziallaboren aufwendig synthetisiert werden mussten, herangezogen. (Habler et al., 2022a)

In Abbildung 10 sind stellvertretend für CFTR-Modulatoren und ihre IS die Molekülstrukturen von Ivacaftor, Ivacaftor M1, Ivacaftor M6 sowie [$^2H_4$]-Ivacaftor dargestellt.

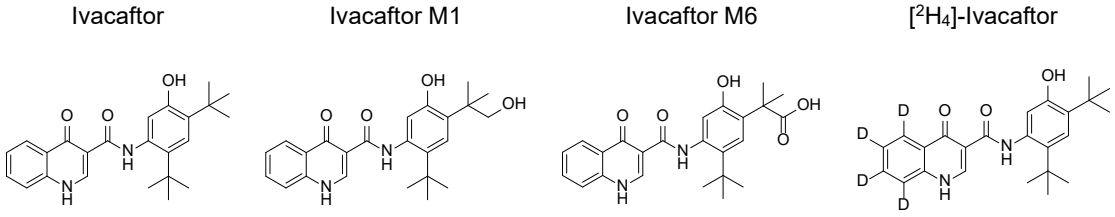


Abbildung 10. Molekülstrukturen von Ivacaftor, Ivacftor M1, Ivacaftor M6 und dem korrespondierenden internen Standard [$^2H_4$]-Ivacaftor.

Aus Habler et al., 2022a.

Für einen perspektivischen Routineeinsatz der TDM-Methode wurden im Rahmen der Methodenentwicklung umfangreiche Stress- und Stabilitätstests durchgeführt. Die Methodenvalidierung erfolgte anhand der “Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA bzw. gemäß den Vorschriften der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen und der DIN EN ISO 15189. Folgende Leistungsmerkmale wurden im Rahmen der Methodenvalidierung adressiert: analytische Sensitivität, analytische Spezifität, Richtigkeit, Wiederholpräzision, Beherrschung von Interferenzen/Störsubstanzen, Messbereich, Linearität im Messintervall (LLOQ bis

ULOQ), Rückführbarkeit der Kalibrier-/Kontrollmaterialien zugeschriebenen Werte durch Referenzmessverfahren (falls verfügbar), Stabilität, Carry-over, Verdünnungslinearität und Matrixeffekt. Die Anforderungen der jeweiligen Leistungskriterien wurden erfolgreich erfüllt und entsprechend internen Qualitätsmanagement-Vorgaben dokumentiert. (Habler et al., 2022a)
Intra- und interassay Ungenauigkeiten bzw. Impräzisionen lagen für alle gemessenen Qualitätskontrollen unterhalb von 7,0 % bzw. 8,3 %. Die Untersuchung von 70 Serumproben von kritisch Kranken mit Polypharmazie (ohne CFTR-Modulatoren-Therapie) bestätigte die Selektivität und Spezifität der TDM-Methode. Die Probenaufreinigung über 2D-Chromatographie kombiniert mit IS zur Quantifizierung ermöglichte eine zuverlässige Kompensation von Matrixeffekten. Es können uneingeschränkt hämolytische, ikterische oder lipämische Proben bestimmt werden. Die Gesamtlaufzeit der entwickelten 2D-ID-LC-MS/MS-Methode von nur fünf Minuten (Bestimmung von bis zu zwölf Proben/Stunde) erlaubt einen hohen Probendurchsatz in der routinemäßigen Patientenversorgung und in klinischen Studien. Ebenfalls vereinfacht die hohe Stabilität von CFTR-Modulatoren das Probenhandling im klinischen Routinesetting erheblich. Unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Eigenschaften der CFTR-Modulatoren und potentiellen CYP3A4-Interaktionen ermöglicht der breite Kalibrierbereich der TDM-Methode die quantitative Erfassung von Tal- und Spitzenspiegeln sowie perspektivisch die Bestimmung der AUC. (Habler et al., 2022a)
Die klinische Anwendbarkeit der TDM-Methode wurde durch die Analyse von 20 anonymisierten Serumproben von CF-Patienten mit Kaftrio-Therapie im Steady State überprüft (Einnahmeschema: zwei Tabletten mit 75 mg Ivacaftor/50 mg Tezacaftor/100 mg Elexacaftor morgens, eine Tablette mit 150 mg Ivacaftor abends, Abstand ca. 12 Stunden). Die Proben wurden 4-5 Stunden nach Einnahme der Dreifach-Kombinationstablette entnommen, was Spitzenwerte widerspiegelt. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Protokollnummer 20-999).
Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen (n=20), die alle innerhalb des linearen Kalibrierbereichs der Methode lagen. Ebenso stimmten die gemessenen Medikamentenkonzentrationen mit den pharmakokinetischen Profildaten aus dem Bewertungsbericht der EMA überein, was die Zweckmäßigkeit der TDM-Methode in einem realen klinischen Umfeld bestätigt. (Habler et al., 2022a)

Tabelle 3. Ergebnisse der mittleren Konzentrationen [mg/L] mit Angabe der Standardabweichung (SD) in Realproben (n=20) von CF-Patienten mit Kaftrio-Therapie.

Analyt	Mittlere Konzentration ± SD [mg/L], (n=20)
Ivacaftor	1,36 ± 0,58
Ivacaftor M1	2,35 ± 0,92
Ivacaftor M6	1,53 ± 0,89
Tezacaftor	5,11 ± 2,49
Tezacaftor M1	6,25 ± 1,53
Elexacaftor	9,27 ± 3,01

Daten aus Habler et al., 2022a.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft ein 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm einer Serumprobe eines Patienten mit Kaftrio-Therapie. Lumacaftor wurde nicht detektiert.

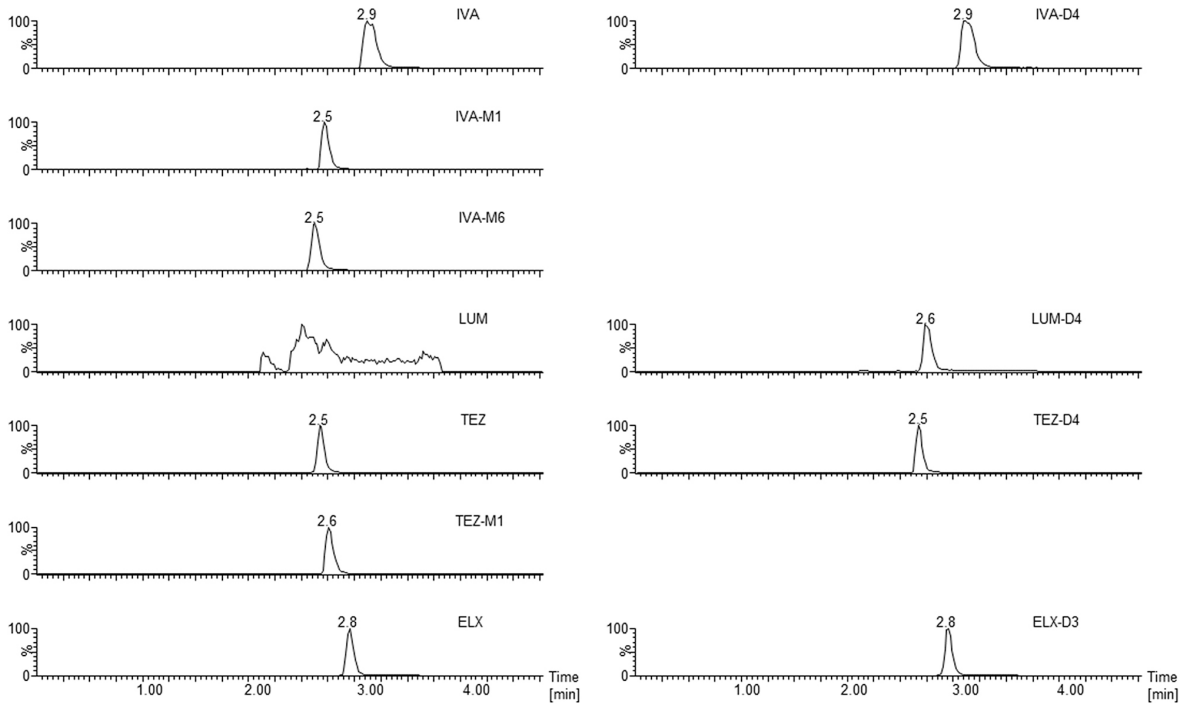


Abbildung 11. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe eines Patienten mit Kaftrio-Therapie mit 2,36 mg/L Ivacaftor, 9,39 mg/L Ivacaftor M1, 2,61 mg/L Ivacaftor M6, 6,92 mg/L Tezacaftor, 10,5 mg/L Tezacaftor M1 und 6,75 mg/L Elexacaftor.

IVA, Ivacaftor; IVA-M1, Ivacaftor M1; IVA-M6, Ivacaftor M6; LUM, Lumacaftor; TEZ, Tezacaftor; TEZ-M1, Tezacaftor M1; ELX, Elexacaftor; IVA-D4, [$^2H_4$]-Ivacaftor; LUM-D4, [$^2H_4$]-Lumacaftor; TEZ-D4, [$^2H_4$]-Tezacaftor; ELX-D3, [$^2H_3$]-Elexacaftor.

Aus Habler et al., 2022a.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zum TDM von CFTR-Modulatoren in Humanserum wurde 2021 erfolgreich in die klinische Routinediagnostik des Instituts für Laboratoriumsmedizin des LMU Klinikums translatiert.

In der TDM-Praxis von Psychopharmaka werden Medikamente und ihre Metaboliten routinemäßig quantifiziert, um eine metabolic-to-parent Ratio (MPR) festzustellen, die zur direkten Messung der Aktivität von metabolisierenden Enzymen dient. Abweichende MPR im Steady State ermöglichen die Identifizierung abnormaler Stoffwechselvorgänge aufgrund von Arzneimittelwechselwirkungen, genetischen Anomalien oder Organfunktionsstörungen, einschließlich Leberschädigungen mit beeinträchtigter CYP-Aktivität. Eine signifikante Abnahme der CYP3A-Aktivität, z.B. durch Azol-Antimykotika, führt in der Regel zu einer verringerten MPR und einem gleichzeitigen Anstieg der Ausgangssubstanz, was eine Dosisanpassung erfordern kann. Zur Bereitstellung einer modernen Pharmakovigilanz umfasst die hier beschriebene quantitative TDM-Methode auch die Metaboliten Ivacaftor M1, Ivacaftor M6 und Tezacaftor M1. Der Metabolit von Elexacaftor, Elexacaftor M23, war zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung noch nicht kommerziell verfügbar. Die beschriebene 2D-ID-LC-MS/MS-Methode bietet aber die einzigartige Möglichkeit, diesen Metaboliten sowie weitere neu entwickelte strukturähnliche CFTR-Modulator-Medikamente unkompliziert integrieren zu können. (Habler et al., 2022a)

Das fortlaufende moderne Routine-TDM von CFTR-Modulatoren sowie weitere klinische Studien mit größeren Patientenzahlen können dazu dienen, die Dosis-Wirkungsbeziehung genauer zu untersuchen, Kosten zu senken und die Versorgung von CF-Patienten zu optimieren.

3.4 TDM potentieller COVID-19-Medikamente (Habler et al., 2021)

Habler, K., Brügel, M., Teupser, D., Liebchen, U., Scharf, C., Schönermarck, U., Vogeser, M., & Paal, M. (2021). Simultaneous quantification of seven repurposed COVID-19 drugs remdesivir (plus metabolite GS-441524), chloroquine, hydroxychloroquine, lopinavir, ritonavir, favipiravir and azithromycin by a two-dimensional isotope dilution LC-MS/MS method in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 196*, 1–8.

Die Coronavirus-Pandemie (COVID-19) hat weltweit die Gesundheitssysteme vor immense Herausforderungen gestellt. Während viele mit SARS-CoV-2 (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom-Coronavirus-Typ 2) infizierte Personen milde bis moderate Symptome aufweisen und ohne medizinische Intervention regenerieren, entwickeln einige schwerwiegende Symptome, die einen Krankenhausaufenthalt bis hin zur Intensivtherapie erforderlich machen. Kortikosteroidtherapie und weitere unterstützende Behandlungen erweisen sich als vorteilhaft für schwerkranke COVID-19 Patienten. In Anbetracht der hohen Dringlichkeit und auch im Hinblick auf kommende Pandemien ist die Neuverwendung zugelassener Medikamente zur Behandlung anderer Erkrankungen wie COVID-19 wichtig. Als potentielle Kandidaten mit antiviraler Wirkung gegen SARS-CoV-2 in-vitro wurden die Arzneimittel mit den Wirkstoffen Remdesivir (Behandlung von Hepatitis C), Chloroquin und Hydroxychloroquin (Behandlung von Malaria), Lopinavir und Ritonavir (Behandlung von HIV), Favipiravir (Behandlung von Influenza) sowie Azithromycin (Breitbandantibiotikum mit antiviralen Eigenschaften) untersucht. Bisher empfohlene Dosierungsschemata führen bei schwerkranken COVID-19 Patienten aufgrund pathophysiologischer Veränderungen nicht unbedingt zu einer angemessenen Wirkstoffexposition. Um subtherapeutische oder toxische Konzentrationen im Blut zu vermeiden und Arzneimittelwechselwirkungen bei Polypharmazie zu adressieren, sind systematische pharmakokinetische Daten nowendig. Daher sollte eine individualisierte optimale Dosierungsstrategie in Betracht gezogen werden, bei der das TDM einen wichtigen Beitrag zur Feststellung der Wirksamkeit und Sicherheit leisten kann. (Habler et al., 2021)

Das Hauptziel der Studie war die Etablierung einer 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zur simultanen Bestimmung von Remdesivir, dem Metaboliten von Remdesivir GS-441524, Chloroquin, Hydroxychloroquin, Lopinavir, Ritonavir, Favipiravir und Azithromycin in Humanserum. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von Remdesivir ($t^1/_2 \approx 1$ Stunde) wurde der Metabolit GS-441524 ($t^1/_2 \approx 24$ Stunden) in die TDM-Methode integriert. Zur exakten Quantifizierung wurden die IS [$^{13}C_6$]-Remdesivir, [$^{13}C_5$]-GS-441524, [$^{2}H_4$]-Chloroquin, [$^{2}H_4$]-Hydroxychloroquin, [$^{2}H_8$]-Lopinavir, [$^{2}H_6$]-Ritonavir, [$^{13}C_1$-$^{15}N_1$]-Favipiravir und [$^{13}C_1$-$^{2}H_3$]-Azithromycin verwendet. Die 2D-ID-LC-MS/MS-Methode wurde nach der “Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA validiert, wobei die erfüllten Leistungskriterien hinsichtlich Kalibrierung (LLOQ und

ULOQ), Ungenauigkeit und Impräzision (VK von inter- und intraassay ≤ 11 %), Carry-over, Selektivität, Matrixeffekt, Wiederfindung, Verdünnungslinearität und Stabilität die Robustheit der TDM-Methode bestätigten. Die internen Standards sowie die 2D-Chromatographie kompensierten die Matrixeffekte zuverlässig, sodass die TDM-Methode durch Hämolyse, Ikterus und Lipämie nicht beeinträchtigt wurde. (Habler et al., 2021)

In Abbildung 12 sind stellvertretend für die potentiellen COVID-19-Medikamente und ihre IS die Molekülstrukturen von Favipiravir und [$^{13}C_1$-$^{15}N_1$]-Favipiravir dargestellt.

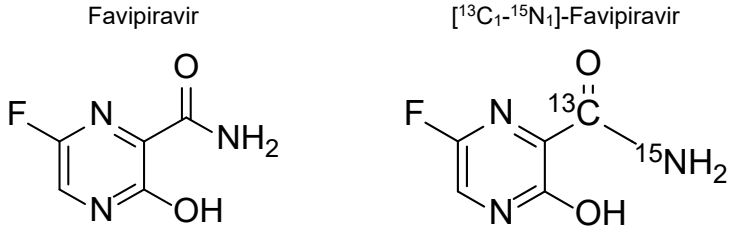


Abbildung 12. Molekülstrukturen von Favipiravir und dem korrespondierenden internen Standard [$^{13}C_1$-$^{15}N_1$]-Favipiravir.

Mit der validierten 2D-ID-LC-MS/MS-Methode wurden anonymisierte Serum-Restproben von Patienten analysiert, die Hydroxychloroquin, Ritonavir, Azithromycin oder Remdesivir erhielten (je n=6). Die Analyse wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und die örtliche Ethikkommission erteilte eine ethische Genehmigung (Dokumentennummer KB 20/029). Gemäß den Fachinformationen und den COVID19-Behandlungsrichtlinien des National Institute of Health waren die Dosierungen wie folgt: Remdesivir, 200 mg an Tag 1 und dann 100 mg täglich für bis zu 9 Tage; Hydroxychloroquin, 2 × 200-400 mg täglich; Ritonavir, 2 × 100 mg täglich in Kombination mit 400 mg Lopinavir; Azithromycin, 1 × 500 mg täglich. In Tabelle 4 sind die gemessenen Konzentrationsbereiche der Serumproben (je n=6) dargestellt.

Tabelle 4. Ergebnisse der gemessenen Konzentrationen [µg/L] potentieller COVID-19 Medikamente in Realproben (je n=6).

Analyt	Konzentrationsbereich [µg/L], (je n=6)
Remdesivir	<LLOQ
GS-441524	60,67 – 174,7
Hydroxychloroquin	509,4 – 745,0
Ritonavir	398,6 – 1067
Azithromycin	64,36 – 284,6

(LLOQ, untere Bestimmungsgrenze)

Daten aus Habler et al., 2021.

Die gemessenen Konzentrationen entsprachen den aus bekannten pharmakokinetischen Daten zu erwartenden Bereichen. Die Konzentration von Remdesivir (t½ ≈ 1 Stunde) war in

den Proben < LLOQ, während der Metabolit von Remdesivir GS-441524 (t½ ≈ 24 Stunden) in den entsprechenden Proben nachgewiesen werden konnte. Da auch ein signifikanter Abbau von Remdesivir (aber nicht von GS-441524) in Plasma und Serum vermutlich durch endogene Esterasen beschrieben ist, ist präanalytisch entweder eine sofortige Analyse oder eine Lagerung der Proben bei -20 °C oder -80 °C bis zur Analyse zu beachten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines begleitenden TDM von GS-441524.
Abbildung 13 zeigt beispielhaft ein 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm von Kalibrator Level 1 (=LLOQ) der potentiellen COVID-19 Medikamente.

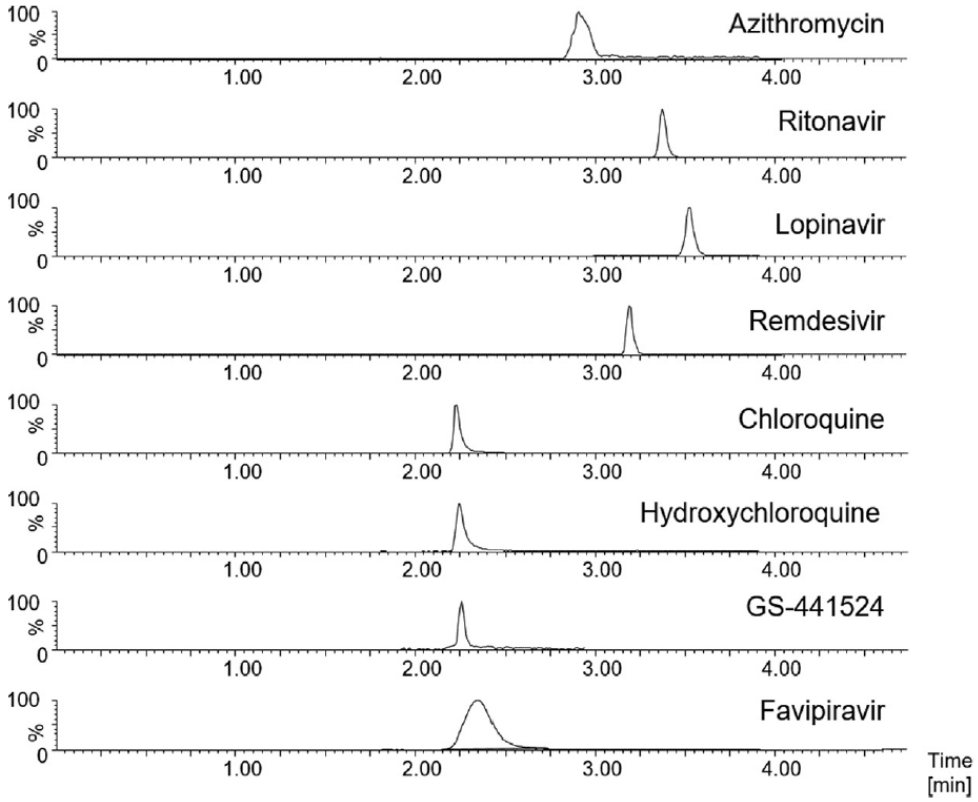


Abbildung 13. 2D-ID-LC-MS/MS-Chromatogramm von Kalibrator Level 1 der potentiellen COVID-19-Medikamente.

Aus Habler et al., 2021.

Im Rahmen dieses Projektes konnte während der pandemischen Ausnahmesituation sehr zügig eine robuste 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zur simultanen Quantifizierung von sieben Medikamenten, die möglicherweise gegen COVID-19 aktiv sind, nämlich Remdesivir (plus Metabolit GS-441524), Chloroquin, Hydroxychloroquin, Ritonavir, Lopinavir, Favipiravir und Azithromycin, etabliert werden. Die Methode kann für routinemäßiges TDM in klinischen Labors verwendet werden und kann dazu beitragen, die Wirksamkeit und Sicherheit von neu verwendeten Medikamenten zu erhöhen.

In zukünftigen Pandemiesituationen bietet MS die einzigartige Möglichkeit, die bereits bestehende 2D-ID-LC-MS/MS-Methode flexibel mit potentiellen neuen Wirkstoffen zu adaptieren.

4 Zusammenfassung und Zukunftsperspektiven

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit konnten der hohe diagnostische Stellenwert sowie die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von 2D-ID-LC-MS/MS-Verfahren im TDM in der Laboratoriumsmedizin dargestellt werden.

RMP zur Zuordnung von Werten zu Kalibriermaterialien spielen im Konzept der metrologischen Rückführbarkeit in der Labormedizin eine entscheidende Rolle. Ein neues Protokoll für die Standardisierung von RMP basierend auf ID-LC-MS/MS-Methoden wurde als Konkretisierung der ISO 15193 konzipiert. Zentrale Elemente sind dabei die standardisierte Messserie und automatisierte Datenverarbeitung mittels des neu entwickelten RMP-Verarbeitungs-Tools sowie die Reduzierung der Messunsicherheit der Messergebnisse auf das technische machbare Maß.

OTT erweitern die Möglichkeiten der Tumortherapie, stellen aber auch eine Herausforderung für Ärzte und Patienten dar. Das entwickelte TDM mittels 2D-ID-LC-MS/MS zur simultanen Quanfizierung von allen bisher zugelassenen CDK4/6-Inhibitoren zur Behandlung von Mammakarzinom lieferte wertvolle pharmakokinetische Daten zur Therapie mit Abemaciclib. Weitere klinische Anwendung findet die TDM-Methode in einer geplanten klinischen Studie zu HR+ HER2- fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs.

Die Behandlung mit CFTR-Modulatoren hat die Therapie von CF-Patienten revolutioniert. Die entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zum TDM von allen bisher zugelassenen CFTR-Modulatoren wurde 2021 erfolgreich in der klinischen Routinediagnostik etabliert. Das fortlaufende Routine-TDM sowie weitere klinische Studien zu CFTR-Modulatoren sollen dazu dienen, die Versorgung von CF-Patienten anhand systematischer pharmakokinetischer Daten zu optimieren.

In Pandemiesituationen, wie während COVID-19, kann die Neuverwendung von zugelassenen Arzneimitteln eine schnellere Lösung bieten als die Entwicklung, Prüfung und Zulassung neuer Wirkstoffe. Die entwickelte 2D-ID-LC-MS/MS-Methode zum TDM von potentiellen COVID-19-Medikamenten kann dazu beitragen, die Wirksamkeit und Sicherheit der neu verwendeten Medikamente zu erhöhen.

Nicht nur in zukünftigen Pandemiesituationen, sondern auch bei neuen Arzneimittelzulassungen bieten die im Rahmen dieser Arbeiten offenen LC-MS/MS-Systeme die einzigartige Flexibilität, die hier beschriebenen 2D-ID-LC-MS/MS-Methoden jeweils mit neuen, strukturell ähnlichen Wirkstoffen zu erweitern.

Die vollständige Automatisierung der relativ komplexen und technisch anspruchsvollen LC-MS/MS-Methoden sowie die damit verbundene Möglichkeit der nahtlosen Integration geschlossener MS-basierter Diagnostikverfahren in Laborstraßen ist vermutlich eine der Innovationen im 21. Jahrhundert im Bereich der MS in der Laboratoriumsmedizin.

5 Literatur

Ates, H. C., Roberts, J. A., Lipman, J., Cass, A. E. G., Urban, G. A., & Dincer, C. (2020). On-Site Therapeutic Drug Monitoring. *Trends in biotechnology*, *38*, 1262–1277.

Eliasson, E., Lindh, J. D., Malmström, R. E., Beck, O., & Dahl, M.-L. (2013). Therapeutic drug monitoring for tomorrow. *European journal of clinical pharmacology*, *69 Suppl 1*, 25–32.

Gove, H. E. (2003). Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins by Michael A. Grayson. *Isis*, *94*, 334–426.

Griffiths, J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, *80*, 5678–5683.

Groenland, S. L., Martínez-Chávez, A., van Dongen, M. G. J., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., Huitema, A. D. R., & Steeghs, N. (2020). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 Inhibitors Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib. *Clinical pharmacokinetics*, *59*, 1501–1520.

Guo, J., Garratt, A., & Hill, A. (2022). Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis*, *21*, 456–462.

Habler, K., Brügel, M., Teupser, D., Liebchen, U., Scharf, C., Schönermarck, U., Vogeser, M., & Paal, M. (2021). Simultaneous quantification of seven repurposed COVID-19 drugs remdesivir (plus metabolite GS-441524), chloroquine, hydroxychloroquine, lopinavir, ritonavir, favipiravir and azithromycin by a two-dimensional isotope dilution LC-MS/MS method in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *196*, 1–8.

Habler, K., Kalla, A.-S., Rychlik, M., Bruegel, M., Teupser, D., Nährig, S., Vogeser, M., & Paal, M. (2022a). Isotope dilution LC-MS/MS quantification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor, and their major metabolites in human serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *60*, 82–91.

Habler, K., Kalla, A.-S., Rychlik, M., Vogeser, M., & Teupser, D. (2023a). Therapeutic drug monitoring in breast cancer therapy – LC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, ribociclib, and major metabolites abemaciclib M20 and M2 in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *225*, 1-9.

Habler, K., Paal, M., & Vogeser, M. (2020). Isotope dilution-LC-MS/MS method for quantification of the urinary cotinine-to-creatinine ratio. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *58*, 1469–1476.

Habler, K., Schäffler, J., & Vogeser, M. (2023b). *Novel protocol for a reference measurement procedure based on ID-LC-MS/MS for the antibiotic ceftazidime*. Poster P0097. Worldlab/Euromedlab (21-25 May 2023), Rome.

Habler, K., Vogeser, M., & Teupser, D. (2022b). An UHPLC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitor abemaciclib in human serum. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, *24*, 15–21.

Hiemke, C., Bergemann, N., Clement, H. W., Conca, A., Deckert, J., Domschke, K., Eckermann, G., Egberts, K., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, U., Hefner, G., Helmer, R., Janssen, G., Jaquenoud, E., Laux, G., Messer, T., Mössner, R., Müller, M. J., Paulzen, M., Pfuhlmann, B., Riederer, P., Saria, A., Schoppek, B., Schoretsanitis, G., Schwarz, M., Silva Garcia, M., Stegmann, B., Steimer, W., Stingl, J. C., Uhr, M., Ulrich, S., Unterecker, S., Waschgler, R., Zernig, G., Zurek, G., & Baumann, P. (2017). Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, 1–89.

Jones, A. W. (2023). Brief history of the alcohol biomarkers CDT, EtG, EtS, 5-HTOL, and PEth. *Drug testing and analysis*, 1–18.

Kang, J. S., & Lee, M. H. (2009). Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean journal of internal medicine*, *24*, 1–10.

Pereira, P. (2016). Uncertainty of Measurement in Medical Laboratories. In L. Cocco (Ed.), *New Trends and Development in Metrology* (pp. 51–80). online: InTech.

Schaeffler, J., Habler, K., & Vogeser, M. (2023). A suggested protocol for value assignment using isotope-dilution-LC-MS/MS in reference measurement procedures - exemplary application for ciprofloxacin in serum. *Clinica Chimica Acta*, *549*, 1–6.

Seger, C., & Salzmann, L. (2020). After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clinical biochemistry*, *82*, 2–11.

Tamama, K. (2021). Advances in drugs of abuse testing. *Clinica Chimica Acta*, *514*, 40–47.

van der Gugten, J. G. (2020). Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clinical Mass Spectrometry*, *15*, 36–43.

Vogeser, M. (2003). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry – Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *41*, 117–126.

6 Veröffentlichungen der kumulativen Habilitationsschrift

1. A suggested protocol for value assignment using isotope-dilution-LC-MS/MS in reference measurement procedures - exemplary application for ciprofloxacin in serum
   Judith Schaeffler, **Katharina Habler**, Michael Vogeser, Clinica Chimica Acta (2023), 549, 1-6. PMID 37709112. IF 5.000.

2. An UHPLC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitor abemaciclib in human serum
   Katharina Habler, Michael Vogeser, Daniel Teupser, Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab (2022), 24, 15-21. PMID 8851261. IF 2.200.

3. Therapeutic Drug Monitoring in Breast Cancer Therapy – LC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, ribociclib, and major metabolites abemaciclib M20 and M2 in human serum
   Katharina Habler, Anne-Sophie Kalla, Michael Rychlik, Michael Vogeser, Daniel Teupser, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2023), 225, 1-9. PMID 36603395. IF 3.400.

4. Isotope dilution LC-MS/MS quantification of the cystic fibrose transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor and their major metabolites in human serum
   Katharina Habler, Anne-Sophie Kalla, Michael Rychlik, Mathias Bruegel, Daniel Teupser, Susanne Naehrig, Michael Vogeser, Michael Paal, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2022), 60, 82-91. PMID 34668357. IF 6.800.

5. Simultaneous quantification of seven repurposed COVID-19 drugs remdesivir (plus metabolite GS-441524), chloroquine, hydroxychloroquine, lopinavir, ritonavir, favipiravir and azithromycin by a two-dimensional isotope dilution LC-MS/MS method in human serum
   Katharina Habler, Mathias Brügel, Daniel Teupser, Uwe Liebchen, Christina Scharf, Ulf Schönermarck, Michael Vogeser, Michael Paal, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2021), 196, 1-8. PMID 7843035. IF 3.571.