

Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin

LMU Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

**Diagnostische Massenspektrometrie:
Ein zentraler Baustein für eine optimierte Antiinfektiva-Therapie**

Kumulative Habilitationsschrift
für das Fach Laboratoriumsmedizin

vorgelegt von
Dr. med. univ. Dr. rer. nat. Michael Paal, PhD

(2025)

Inhalt

1	Bedeutung für das Fachgebiet.....	1
2	Wissenschaftlicher Hintergrund.....	2
2.1	Antiinfektiva-Therapie in kritischer Erkrankung.....	2
2.2	Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring (TDM).....	2
3	Anwendungen der diagnostischen Massenspektrometrie in der Antiinfektiva-Therapie.....	4
3.1	Entwicklung von LC-MS/MS Verfahren für das TDM von Antiinfektiva.....	4
3.1.1	LC-MS/MS Methode für ein TDM von Antibiotika in kritischer Erkrankung (<i>J Pharm Biomed Anal</i> 2018;152:102-110)	4
3.1.2	Zweidimensionale LC-MS/MS Methode für das TDM von potentiellen Arzneimitteln gegen COVID-19 (<i>J Pharm Biomed Anal</i> 2021;196:113935)	6
3.2	Klinischer Einsatz der LC-MS/MS im Antiinfektiva-TDM	8
3.2.1	TDM von Meropenem und Piperacillin in kritischer Erkrankung – Erfahrungen und Empfehlungen aus einem Jahr routinemäßiger klinischer Praxis (<i>Antibiotics (Basel)</i> 2020;9(3):131)	8
3.2.2	Bedeutung der nicht-enzymatischen Degradation von Meropenem (<i>Antibiotics (Basel)</i> 2021;10(6):715).....	10
3.2.3	Etablierung eines TDM für Meropenem aus Lungengewebe (<i>Antimicrob Agents Chemother</i> 2021;65:e0156421).....	12
3.2.4	Quantifizierung von Linezolid aus endotrachealem Aspirat (ENTA) (<i>Intensive Care Med Exp</i> 2024;12:47)	15
4	Zusammenfassung.....	17
5	Literaturverzeichnis.....	18
6	Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift	20

Abkürzungen

BAL	Bronchoalvoläre Lavage
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration
COVID-19	Corona Virus Disease 2019
CrCl	Kreatinin-Clearance
ELF	Epithelial lining fluid
EMA	European Medicines Agency
ENTA	Endotracheales Aspirat
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IF	Interstitielle Flüssigkeit
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie (Liquid chromatography) mit Tandem-Massenspektrometrie-Koppelung
MER	Meropenem
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRM	Multiple reaction monitoring
ORM	Offener-Ring-Metabilit
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Infektionstherapie e.V.
PK/PD	Pharmakokinetik/Pharmakodynamik
PIP	Piperacillin
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome Corona Virus type 2
TIC	Total ion current
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
VK	Variationskoeffizient

1 Bedeutung für das Fachgebiet

Die Laboratoriumsmedizin spielt eine zentrale Rolle in der medizinischen Diagnostik, da sie essentielle Informationen zur Diagnose, Überwachung und Behandlung von Krankheiten liefert. Eine der innovativsten Technologien in diesem Bereich ist die Massenspektrometrie, die durch ihre hohe Präzision und Sensitivität die Analyse von Biomolekülen revolutioniert hat und eine Vielzahl diagnostischer Tests mit beispielloser Genauigkeit ermöglicht.

Ein besonders wichtiger diagnostischer Anwendungsbereich der Massenspektrometrie ist das Therapeutische Drug Monitoring (TDM). Hierbei wird zu definierten Zeitpunkten die Konzentration von Medikamenten im Blut von Patienten ermittelt, um die Dosierung zu optimieren und unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Dies ist besonders entscheidend für die Bestimmung von Antiinfektiva bei schwer kranken Patienten, bei denen krankheits- und therapiebedingte pharmakokinetische Veränderungen zu starken und unvorhersehbaren Schwankungen der Wirkstoffspiegel führen können.

Die vorliegende kumulative Habilitationsarbeit zeigt die Anwendungsmöglichkeiten der diagnostischen Massenspektrometrie im Antiinfektiva-TDM in schwer kranken Patienten auf. So wurden für die bedeutendsten Antiinfektiva in der Intensivmedizin LC-MS/MS Verfahren für unterschiedliche Probenmaterialien (Serum, bronchoalveoläre Lavage, endotracheales Aspirat) entwickelt und die Wirkstoffspiegel in klinische Forschungsprojekten eingehend untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen maßgeblich zur Weiterentwicklung der Laboratoriumsmedizin bei und vertiefen das Verständnis über die Antiinfektiva-Therapie in der kritischen Erkrankung. Dadurch wird die Qualität der Patientenversorgung gesteigert und es können neue Standards in der medizinischen Praxis etabliert werden.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Antiinfektiva-Therapie in kritischer Erkrankung

Trotz aller Fortschritte in der modernen Medizin bleibt die adäquate Dosisfindung von Antiinfektiva bei schwer kranken Patienten eine große Herausforderung. Dies ist einer der Gründe, warum die Sterblichkeitsrate bei Sepsis mit etwa 50 % weiterhin unakzeptabel hoch ist (Bauer et al., 2020). Die kritische Erkrankung stellt jedoch kein einheitliches Krankheitsbild dar, sondern umfasst eine Vielzahl von Krankheitszuständen, die alle gemeinsam haben, dass eine Verletzung oder Erkrankung die Funktionen lebenswichtiger Organe massiv beeinträchtigt. Dadurch besteht ein hohes Risiko einer unmittelbar bevorstehenden bzw. lebensbedrohlichen Verschlechterung, die in der Regel eine intensivmedizinische Behandlung erforderlich macht (Maslove et al., 2022). Die kritische Erkrankung ist durch erhebliche homöostatische Störungen gekennzeichnet, die sowohl durch pathophysiologische Veränderungen bzw. die Progression eines Grundleidens (z.B. akutes Nierenversagen), als auch durch die therapeutischen Maßnahmen zur Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen (z.B. Nierenersatztherapie) verursacht werden (Udy et al., 2013). All diese Faktoren beeinflussen signifikant die pharmakokinetischen (PK) Eigenschaften von Arzneimitteln, weshalb sich in kritischer Erkrankung die Wirkstoffspiegel im Körper erheblich von gesunden Menschen oder Patienten auf Normalstation unterscheiden. Die Pharmakodynamik (PD) eines Antiinfektivums, also die Beziehung zwischen der Konzentration und der biologischen (antimikrobiellen) Wirkung, hängt wiederum stark von dessen Pharmakokinetik ab.

2.2 Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring (TDM)

Das Therapeutische Drug Monitoring (TDM), die Bestimmung von Arzneistoffen zu bestimmten Zeitpunkten, ist ein wirksames Instrument zur Bewertung der Arzneimittlexposition und zur Unterstützung einer individuellen Dosisfindung. Traditionell wurde das Antiinfektiva-TDM eingesetzt, um das Risiko von Arzneimitteltoxizität zu minimieren. Die multizentrische pharmakokinetische Prävalenzstudie „DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive Care Unit Patients“ zeigte jedoch auf, dass ein erheblicher Anteil der schwerkranken Patienten, die mit Beta-Laktam-Antibiotika behandelt wurden, die gängigen PK/PD-Ziele für klinische Wirksamkeit und die Unterdrückung von antimikrobieller Resistenz nicht erreichte, obwohl bis dahin allgemein angenommen wurde, dass Standarddosierungen eine ausreichende Antibiotikaexposition sicherstellen würden (Roberts et al., 2014). Die stetig wachsende Evidenz hat seitdem zu einem Paradigmenwechsel geführt, sodass auch für Antiinfektiva mit einem

breiteren therapeutischen Fenster, einschließlich der Beta-Laktame, zunehmend das TDM zur Dosisanpassung in kritischer Erkrankung herangezogen wird (Abdul-Aziz et al., 2020).

Verschiedene Messtechniken kommen im TDM zur Anwendung. Antikörperbasierte Immunoassays werden besonders für das TDM von ototoxischen und nephrotoxischen Antibiotika (z.B. Aminoglykoside, Glykopeptide) eingesetzt, da sie eine kurze Bearbeitungszeit aufweisen und auf klinisch-chemischen Analysesystemen automatisiert werden können. Dadurch lassen sich Immunoassays auch in kleineren, dezentralen Laboren einsetzen. Allerdings wird in einem Immunoassay in der Regel nur ein einzelner Parameter bestimmt, und es können unerwartete Kreuzreaktivitäten auftreten, wenn die Test-Antikörper mit ähnlichen, jedoch unerwünschten Antigenen (z.B. anderen Medikamenten oder Metaboliten) reagieren. Chromatographische Testsysteme hingegen ermöglichen eine präzise Trennung und gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Substanzen. Als Goldstandard für das TDM gilt die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Koppelung (LC-MS/MS). Hierbei werden die über die Chromatographie aufgetrennten Moleküle ionisiert und in einer ersten Massenspektrometrie-Einheit nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis sortiert. In einer zweiten Stufe werden die Fragmente der Zielsubstanzen weiter selektiert und dem Detektor zugeführt. Um die Genauigkeit und Präzision bei der Quantifizierung zu erhöhen, wird das Isotopenverdünnungsprinzip angewendet: Isotopen-markierte Analoga der Zielanalyte werden als interne Standards zu den Proben hinzugefügt, um Matrixeffekte und Schwankungen im Ionisationsprozess auszugleichen. Eine solche LC-MS/MS Analyse ermöglicht nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung von Medikamenten und deren Metaboliten, sondern auch die Unterscheidung zwischen verschiedenen Isomeren und Strukturvarianten. Aufgrund der sehr hohen Sensitivität können selbst geringste Konzentrationen zuverlässig nachgewiesen werden. Als offene Geräteplattformen bieten LC-MS/MS-Instrumente dem Labornutzer zudem eine enorme Flexibilität bei der Eigenentwicklung hochsensitiver und leistungsstarker Analysemethoden, unabhängig von der Verfügbarkeit kommerzieller Methodenpakete (Thomas et al., 2022). Trotz dieser Vorteile erfordert der Betrieb eines Massenspektrometers jedoch eine hohe messtechnische Expertise und fachkundige Betreuung, um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten.

3 Anwendungen der diagnostischen Massenspektrometrie in der Antiinfektiva-Therapie

3.1 Entwicklung von LC-MS/MS Verfahren für das TDM von Antiinfektiva

3.1.1 LC-MS/MS Methode für ein TDM von Antibiotika in kritischer Erkrankung

(*J Pharm Biomed Anal* 2018;152:102-110)

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, eine Multi-Analyt LC-MS/MS Methode zu entwickeln, welche das TDM der bedeutendsten Antibiotika in der Intensivmedizin ermöglicht, nämlich der Beta-Laktam-Antibiotika Cefepim, Meropenem und Piperacillin, der Fluorchinolone Ciprofloxacin und Moxifloxacin sowie des Oxazolidons Linezolid (Paal et al., 2018). Für einen möglichst effizienten Einsatz in der Routine-Diagnostik sollte diese massenspektrometrische Methode robust sein und die klinisch relevanten Konzentrationsbereiche im Blut zuverlässig abbilden (Tal- und Spitzenspiegel, toxische Spiegel). Die zu entwickelnde TDM-Methode sollte auch durch eine einfache Probenaufarbeitung, eine effiziente chromatographische Trennung und geringe Anforderungen an die LC-MS/MS Instrumentation gekennzeichnet sein.

Die Multi-Analyt-Methode wurde auf einem Waters 2795 Alliance HPLC-System eingerichtet, das mit einem Quattro Micro-Massenspektrometer (Waters, Milford, MA, USA) gekoppelt ist, und gemäß den Vorgaben der aktuellen 'Guideline on Bioanalytic Method Validation' der European Medicines Agency (EMA) validiert. In einem ersten Schritt wurden unter der Verwendung von Antibiotika-Reinsubstanz-Lösungen verschiedene chromatographische Bedingungen und Proteinfällungsreagenzien für die Aufarbeitung von humanem Serum getestet. Eine Basislinien-Auftrennung der Antibiotika innerhalb von 4 Minuten konnte durch die Verwendung einer C8 Reverse-Phase Chromatographie-Säule erreicht werden (siehe Abbildung 1). Als Proteinfällungsreagenz erbrachte eine Mischung aus Methanol und Methyl-tert-butylether (90:10, v/v) die höchste Analyt-Ausbeute und beste Reproduzierbarkeit.

Die Methode wurde umfassend geprüft auf die Aspekte der unteren Messgrenze, Linearität, Selektivität, Genauigkeit und Richtigkeit (erfasst über den Variationskoeffizienten und Unrichtigkeit), Wiederfindung, Verschleppung, Stabilität und Verdünnungslinearität. Zusätzlich wurden qualitative und quantitative Untersuchungen zu Matrixeffekten – also Veränderungen des Detektorsignals durch Bestandteile der Proben – an Antibiotika-freien Patienten-Restseren durchgeführt.

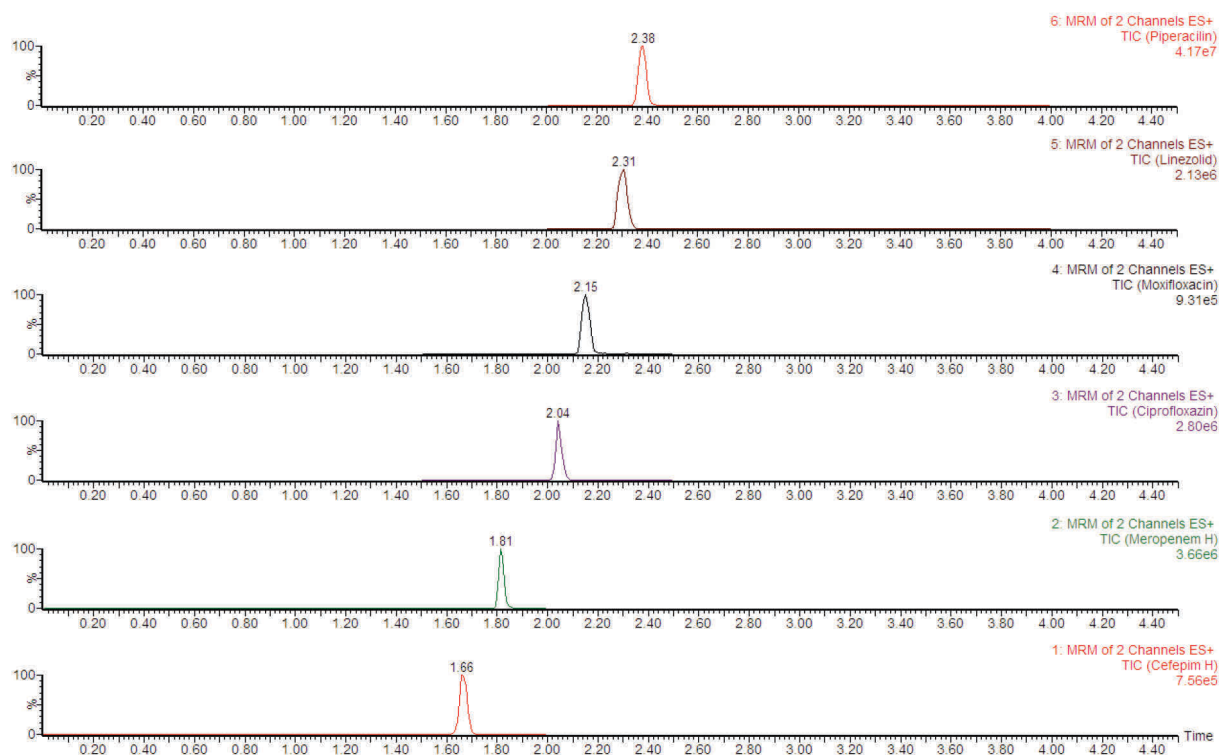


Abbildung 1. Chromatogramme der Antibiotika eines Kalibrators mit mittlerer Konzentration. Die Retentionszeiten der Analyte sind in Minuten angegeben. MRM, multiple reaction monitoring; TIC, total ion current. Aus Paal et al., *J Pharm Biomed Anal* 2018;152:102-110.

Die Prüfung der Multi-Analyt-Methode ergab eine gute Linearität über den gesamten Messbereich. Die Validierung zeigte eine hohe Intra- und Interassay-Präzision sowie Richtigkeit mit Variationskoeffizienten (VK) und Unrichtigkeitswerten von $\leq 12.5\%$ für alle Analyte und Kontrollen, einschließlich der unteren Messgrenze. Untersuchungen zur Selektivität ergaben keine Hinweise auf eine analytische Interferenz. Die Wiederfindungsraten der Analyte betrugen $\geq 77.9\%$, und durch den Einsatz isotoopenmarkierter Standards konnten die Matrixeffekte vollständig ausgeglichen werden. Dies wird durch einen normalisierten Matrixfaktor von 94.6–105.4 % und einen VK von $\leq 8.3\%$ bestätigt. Eine Lagerung der Proben von bis zu sechs Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu drei Tagen bei -20°C hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Analyte.

Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist, dass Antibiotika aus verschiedenen Substanzklassen und mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften simultan quantifiziert werden können. Seit 2018 wird diese LC-MS/MS Methode in leicht abgewandelter Form routinemäßig in der Patientenversorgung am Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der LMU München eingesetzt. Sie bildet die Grundlage für die weiterführende klinische Forschung zum Antibiotika-TDM in der intensivmedizinischen Versorgung am Klinikum der LMU München. Um die Verbreitung dieser Methode weiter zu fördern, wurde das LC-MS/MS Verfahren auch als wissenschaftliches Videoprotokoll veröffentlicht (Schuster et al., 2018).

3.1.2 Zweidimensionale LC-MS/MS Methode für das TDM von potentiellen Arzneimitteln gegen COVID-19

(*J Pharm Biomed Anal* 2021;196:113935)

Der dringende Bedarf an Therapien gegen SARS-CoV-2 während der Pandemie veranlasste Forscher und Kliniker zur Strategie des sogenannten Drug Repurposing, also der Neuausrichtung bereits zugelassener Medikamente zur Behandlung anderer Erkrankungen, wie in diesem Fall COVID-19. Im Rahmen dieser Neupositionierung wurden unterschiedliche Wirkstoffe mit *in vitro* nachgewiesener antiviraler Aktivität gegen SARS-CoV-2 und immunmodulatorischen Eigenschaften als potentielle Kandidaten für klinische Studien angesehen und teilweise mit Notfallzulassung versehen (Chakraborty et al., 2021). Um die Wirksamkeit dieser Substanzen und ihren potentiellen Nutzen besser bewerten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Multi-Analyt Methode für das TDM der repurposed COVID-19 Medikamente Chloroquin, Hydroxychloroquin, Lopinavir/Ritonavir, Favipiravir, Azithromycin und Remdesivir, einschließlich dessen aktiven Metaboliten GS-441524) in humanem Serum entwickelt (Habler et al., 2021).

Die Multi-Analyt-Methode wurde auf einem Waters 2D Acquity UHPLC-System mit zwei Pumpsystem etabliert, gekoppelt an ein Mittelklasse Triple Quadrupol Massenspektrometer Xevo-TQ-S (Waters, Milford, MA, USA). In Anschluß an eine Proteinfällung mit einer Methanol-Lösung, welche isotoopenmarkierte Analoga der Ziel-Analyte beinhaltet, wurden die Extrakte in einer zweidimensionalen Chromatographie mit einer Online-Festphasenextraktion vorbereitet und in der nachfolgenden analytischen Chromatographie in das Massenspektrometer eluiert (siehe Abbildung 2). Die Methode wurde entsprechend den Vorgaben der aktuellen 'Guideline on Bioanalytic Method Validation' der European Medicines Agency (EMA) validiert. Zu den Prüfkriterien zählten die untere Messgrenze und Linearität, Selektivität, Genauigkeit und Richtigkeit, Wiederfindung, Verschleppung, Stabilität und Verdünnungslinearität. Unter der Verwendung von analytfreier Patienten-Restseren wurden zusätzlich qualitative und quantitative Untersuchungen zur Matrixeffekten und der Recovery durchgeführt.

Die LC-MS/MS-Methode zeigte für alle Analyte eine gute Linearität über den gesamten Messbereich und war durchgehend selektiv. Die Intra- und Interassay Impräzision und Unrichtigkeit ergaben stets Wertelagen von $\leq 11.1\%$ und erfüllten somit die Vorgaben der EMA. Ebenso zeigte sich eine gute Recovery mit Wertelagen von $\geq 86.8\%$, und die Matrixeffekte wurden für alle Zielsubstanzen durchgehend kompensiert, was durch einen normalisierten Matrixfaktor von 93.0 – 112.0 % und einen VK von $\leq 6.2\%$ belegt wurde. Eine Probenlagerung von bis zu vier Wochen bei -20°C hatte keinen Einfluss auf die Analyt-Konzentrationen. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde die Methode auf je sechs anonymisierte Serumproben

von Patienten angewendet, die Hydroxychloroquin, Ritonavir, Azithromycin oder Remdesivir erhielten. Aufgrund von Lieferengpässen konnten keine Proben mit Chloroquin gewonnen werden. Für alle Medikamente außer Remdesivir lagen die gemessenen Konzentrationen innerhalb des Kalibrationsbereiches, wie in früheren pharmakokinetischen Studien berichtet. Erwartungsgemäß lag die Konzentration des Nukleosidanalogons Remdesivir aufgrund dessen rascher Metabolisierung unter der Assay-Nachweisgrenze, wohingegen die Konzentration dessen Metaboliten GS-441524 durchgehend im Linearitätsbereich war, was die Notwendigkeit einer gleichzeitigen Metaboliten-Quantifizierung unterstreicht.

Der wesentliche Vorteil dieser Methode gegenüber bestehenden LC-MS/MS Einzel-Assays ist, dass die unterschiedlichen COVID-19-Kombinationstherapeutika in einem einzelnen analytischen Lauf in den für COVID-19 relevanten Konzentrationsbereichen zuverlässig quantifiziert werden können. Durch die Verwendung einer zweidimensionalen Chromatographie werden Matrixeffekte effizient minimiert, bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz.

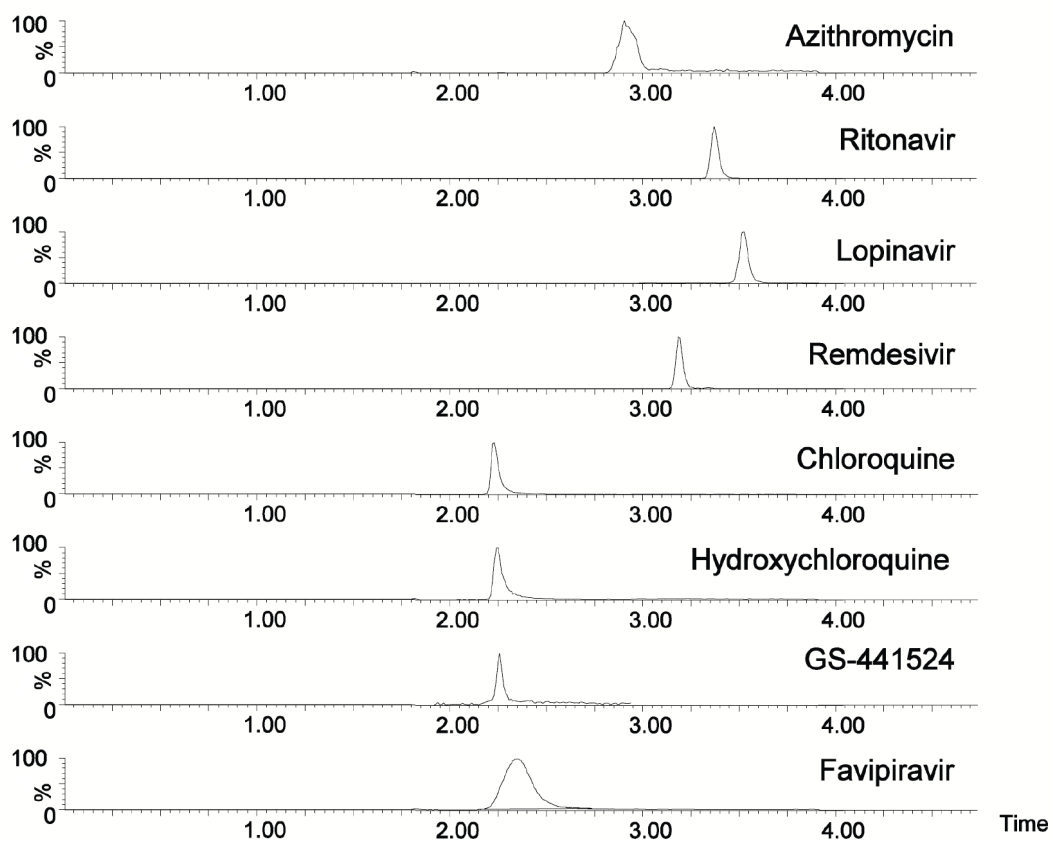


Abbildung 2. Chromatogramme der COVID-19-Medikamente eines Kalibrators mit geringer Konzentration. Die Retentionszeiten der Analyten sind in Minuten angegeben. Aus Habler et al., *J Pharm Biomed Anal* 2021;196:113935.

3.2 Klinischer Einsatz der LC-MS/MS im Antiinfektiva-TDM

3.2.1 TDM von Meropenem und Piperacillin in kritischer Erkrankung – Erfahrungen und Empfehlungen aus einem Jahr routinemäßiger klinischer Praxis

(*Antibiotics (Basel)* 2020;9(3):131)

Die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene LC-MS/MS Methode für das TDM von Antibiotika (Paal et al., 2018) wurde nach ihrer Entwicklung rasch in die routinemäßige Patientenversorgung integriert. In dieser Arbeit wurden nach einem Jahr Antibiotika-TDM auf den anästhesiologischen Intensivstationen der LMU München die Talspiegel für Meropenem und Piperacillin gemeinsam mit demographischen und klinischen Variablen statistisch ausgewertet (Scharf et al., 2020). Für einen maximalen antimikrobiellen Effekt wurde zuletzt als PK/PD-Index vorgeschlagen, dass die freie (Protein-ungebundene) Konzentration eines Beta-Laktam-Antibiotikums mindestens oberhalb der vierfachen minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines ursächlichen Pathogens liegen sollte (Guilhaumou et al., 2019). Für Meropenem wurde entsprechend den Grenzwerten des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) für Enterobakterien der Zielbereich mit ≥ 8 mg/L definiert, für Piperacillin lag dieser bei ≥ 22.5 mg/L unter Berücksichtigung einer durchschnittlichen Proteinbindung von 30 %. Toxische Talspiegel-Konzentrationen wurden für Meropenem mit > 45 mg/L (Imani et al., 2017) und für Piperacillin > 150 mg/L (Quinton et al., 2017) definiert.

Insgesamt wurden 289 Intensivpatienten in die Studie eingeschlossen. Entsprechend der Fachinformation erhielten 200 Patienten eine Standarddosierung mit Meropenem (3x täglich 1-2 g als Kurzinfusion über 30 Minuten) und 89 Patienten Piperacillin-Tazobactam (2-4x täglich mit 4.5 g als Kurzinfusion über 30 Minuten). Hierunter wurden 1832 Spiegelbestimmungen für Meropenem und 636 für Piperacillin durchgeführt. Von den Meropenem-Talspiegeln erreichten 39.3 % der Serumproben nicht den angestrebten Zielbereich, 2.1 % waren im toxischen Bereich. Eine deutliche inverse Korrelation zwischen der Meropenem-Konzentration und der Kreatinin-Clearance der Patienten wurde festgestellt (Korrelationskoeffizient 0.53) (siehe Abbildung 3). So zeigten sich bei Proben von Patienten mit erhaltener Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate nach CKD-EPI > 100 ml/min) in 69.4 % der Fälle subtherapeutische Konzentrationen, wohingegen diese bei Patienten mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie mit 12.4 % deutlich geringer ausfielen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Spiegelbestimmung von Piperacillin (siehe Abbildung 4). Insgesamt waren 33.6 % der Piperacillin-Proben im subtherapeutischen Bereich, 11.0 % hingegen überschritten die Toxizitätsgrenze. Auch hier zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation mit der Nierenfunktion (Korrelationskoeffizient 0.63).

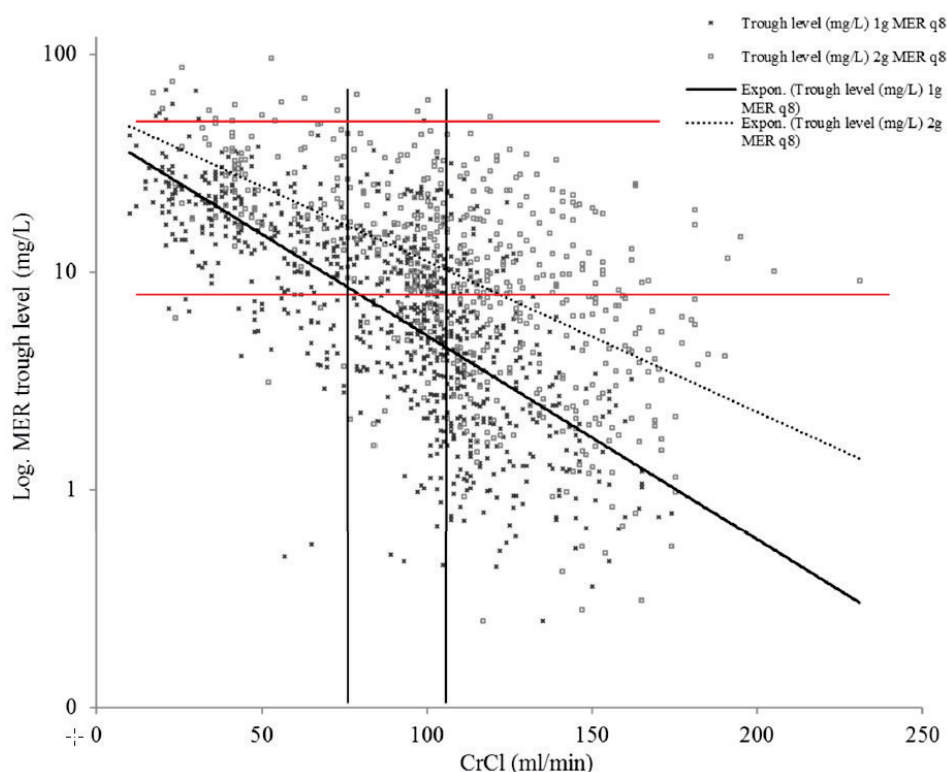


Abbildung 3. Semilogarithmische Darstellung der Meropenem(MER)-Talspiegel bei Gabe von 3x täglich 1 g und 2 g in Bezug zur Kreatinin-Clearance (CrCl). Die horizontalen roten Linien zeigen den therapeutischen Zielbereich an, die vertikalen schwarzen Linien die Gruppeneinteilung der Nierenfunktion (< 70 ml/min, 70 – 100 ml/min, > 100 ml/min). Aus Scharf, Paal et al., *Antibiotics (Basel)* 2020;9(3):131.

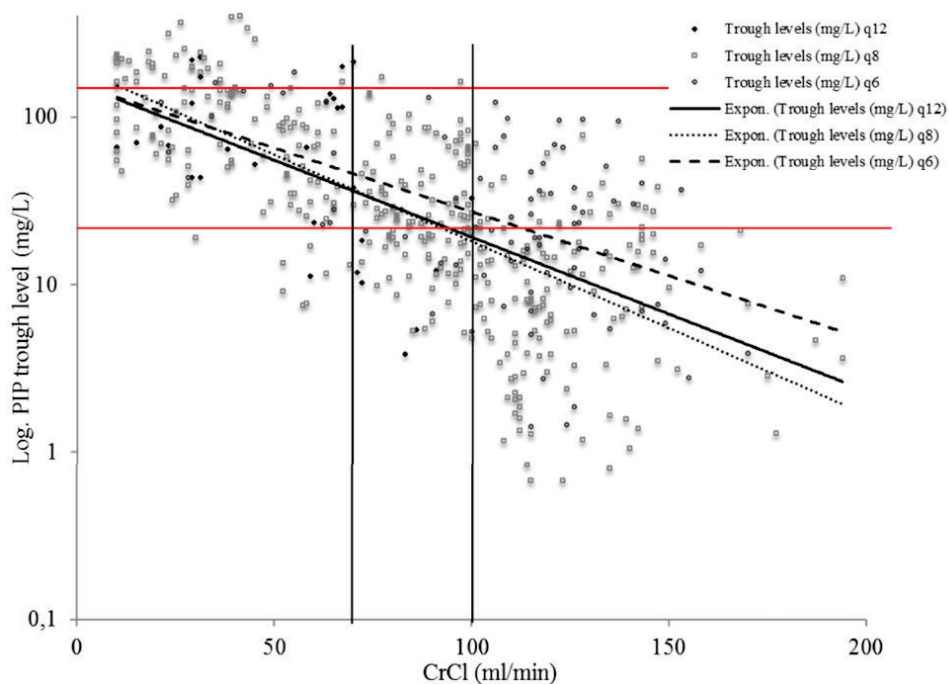


Abbildung 4. Semilogarithmische Darstellung der Piperacillin(PIP)-Talspiegel bei Gabe von 2x, 3x, und 4x täglich 4.5 g Piperacillin-Tazobactam in Bezug zur Kreatinin-Clearance (CrCl). Die horizontalen roten Linien zeigen den therapeutischen Zielbereich an, die vertikalen schwarzen Linien die Gruppeneinteilung der Nierenfunktion (< 70 ml/min, 70 – 100 ml/min, > 100 ml/min). Aus Scharf, Paal et al., *Antibiotics (Basel)* 2020;9(3):131.

Diese retrospektive Studie zur routinemäßige Bestimmung von Beta-Laktam-Antibiotika in der Intensivmedizin bestätigte, dass viele schwerkranke Patienten subtherapeutische Beta-Laktam-Antibiotika-Spiegel aufweisen. Da die Nierenfunktion die wichtigste Covariate für die Elimination von Beta-Laktamen ist, haben Patienten mit einer guten Nierenfunktion ein erhöhtes Risiko für eine Unterdosierung. Zudem zeigte die Studie, dass die mehrfache Gabe von Meropenem und Piperacillin als Kurzinfusion, trotz der Möglichkeit eines TDM, häufig zu unzureichenden Antibiotika-Konzentrationen führt. Aufgrund von PK/PD-Überlegungen ist daher eine prolongierte oder kontinuierliche Infusion von Beta-Laktam-Antibiotika der intermittierenden Gabe vorzuziehen, um des Therapieziels, die MHK eines Zielerregers dauerhaft zu überschreiten, zu erreichen (PEG-Leitlinie, 2018).

3.2.2 Bedeutung der nicht-enzymatischen Degradation von Meropenem

(*Antibiotics (Basel)* 2021;10(6):715)

Wie frühere Studien gezeigt haben, ist bei Patienten mit schweren Erkrankungen eine Verabreichung als prolongierte oder kontinuierliche Infusion zu bevorzugen. Eine Verabreichung über einen längeren Zeitraum setzt eine ausreichende Stabilität des Antiinfektivums im Infusat voraus, welche nur dann gegeben ist, wenn dessen Konzentration den Ausgangswert von 90 % nicht unterschreitet (Pharmacopoeia, 2020). Beta-Laktam-Antibiotika sind jedoch in Lösung nur begrenzt stabil, und bezüglich ihrer Stabilität in Infusionslösungen gibt es teilweise widersprüchliche Angaben. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Stabilität von Meropenem-Infusionslösungen umfassend zu untersuchen (Liebchen et al., 2021). Für diese Fragestellung wurde eine eigens entwickelte LC-MS/MS-Methode verwendet, die neben Meropenem auch dessen Hauptabbauprodukt quantitativ erfasst, den offenen-Ring-Metaboliten (ORM), welcher durch Hydrolyse des Beta-Laktam-Ringes in wässriger Umgebung entsteht (siehe Abbildung 5) (Rakete et al., 2021). Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie stark der spontane Zerfall von Meropenem zur Gesamtelimination des Antibiotikums beiträgt.

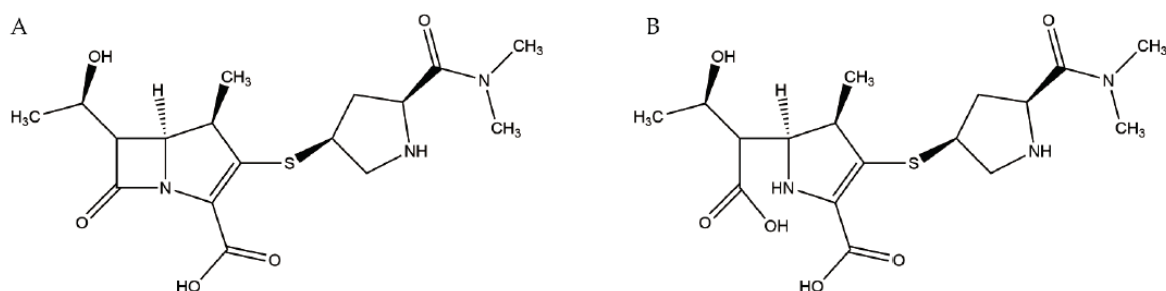


Abbildung 5. Chemische Struktur von Meropenem (A) und dessen Hauptabbauprodukt, dem offenen-Ring Metaboliten (B). Aus Liebchen et al., *Antibiotics (Basel)* 2021;10(6):715.

Die Stabilitätsstudie zeigte, dass 2% iges Meropenem in isotonem Kochsalz bei 22°C mit einer konstanten Zerfallsrate von 0.006/Stunde abgebaut wird. Nach etwa 18 Stunden wurde das Stabilitätslimit von 90 % der Ausgangskonzentration unterschritten (siehe Abbildung 6). In mit Puffer stabilisiertem Serum, welche als *in vitro* Modell für die Blutstrombahn dient, zeigte sich unabhängig von der getesteten Meropenem-Konzentration eine konstante Degradation von 0.025/Stunde, was einer Halbwertszeit von ca. 27.7 Stunden entspricht. Bei abnehmender Meropenem-Konzentration zeigte der Metabolit keinen äquimolaren Anstieg, was auf eine fortschreitenden Umwandlung von ORM zu nachfolgenden Abbauprodukten hindeutet (Mendez et al., 2008). Aus Gründen der Praktikabilität empfiehlt sich entsprechend den Daten dieser Stabilitätsstudie, das Infusat alle 12 Stunden zu tauschen.

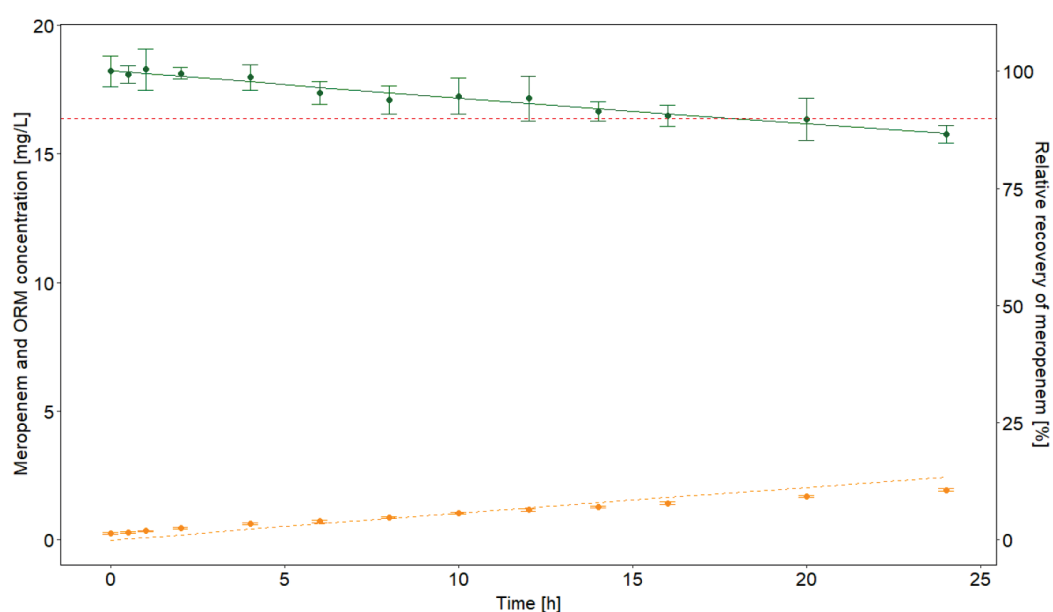


Abbildung 6. *In vitro* Abbau von 2% Meropenem in isotonem Kochsalz bei 22°. Grüne Punkte, Meropenem; orange Punkte, offener-Ring-Metabolit (ORM). Die Stabilitätsgrenze von 90 % der Ausgangskonzentration ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. Aus Liebchen et al., *Antibiotics (Basel)* 2021;10(6):715.

Die Untersuchung von Serumproben von sechs Patienten zeigte stabile intraindividuelle Steady-State-Verhältnisse von ORM/(Meropenem+ ORM), die einen Zusammenhang zur Nierenfunktion zeigten ($R^2 = 0.46$, $p < 0.001$). Zwischen den Patienten unterschieden sich die Verhältnisse jedoch deutlich. In Zusammenschau aller Meropenem-Messdaten ergab das populationspharmakokinetische ein-Kompartiment Modell, dass der spontane Zerfall von Meropenem mit lediglich 6 % zur Gesamtelimination beiträgt. Etwa 62 % der Clearance erfolgen über die glomeruläre Filtration, während die restlichen 32 % auf renale tubuläre Sekretion und den enzymatischen Abbau durch Dehydropeptidase-1 zurückzuführen sind.

3.2.3 Etablierung eines TDM für Meropenem aus Lungengewebe

(*Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421)

Für die antimikrobielle Wirksamkeit eines Antiinfektivums ist die freie Konzentration am Ort der Infektion ausschlaggebend. Im klinischen Alltag wird jedoch aus Gründen der Praktikabilität die Konzentration von Medikamenten und deren Metaboliten fast ausschließlich aus der Blutstrombahn (in Form von Vollblut, Plasma oder Serum) als Surrogatparameter bestimmt. Selbst bei einer optimalen Konzentration im Blut kann aufgrund der stark veränderten Pharmakokinetik insbesondere bei schwer kranken Patienten nicht zwangsläufig von einer adäquaten Exposition im Effektkompartiment ausgegangen werden. Daher gibt es Bestrebungen, Antiinfektiva unmittelbar am Ort der Infektion zu quantifizieren.

Bei einer Lungeninfektion durchdringt die Infektion über den Flüssigkeitsfilm an der Lungenschleimhaut, den sogenannten epithelial lining fluid (ELF), die Alveolarwand und breitet sich in Folge in das tiefere Kompartiment, den interstitiellen Raum, aus. Antiinfektiva aus dem Blutkreislauf nehmen hingegen den entgegengesetzten Weg und gelangen über die Kapillarwand, den interstitiellen Raum und die Alveolarepithelzellen schließlich in den ELF (siehe Abbildung 7).

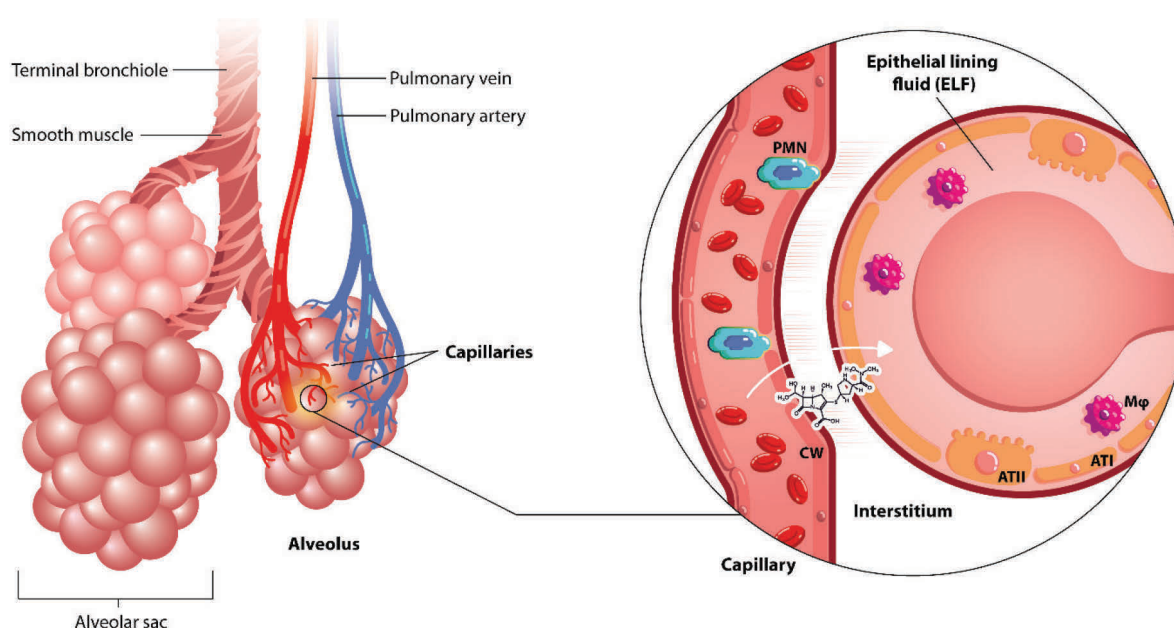


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Blut-Alveolar-Schranke. ATI/ATII, Typ I und II-Epithelzellen; Mw, Alveolarmakrophage; CW, Kapillarwände; PMN, wandernde polymorphkernige Leukozyten. Aus Paal et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus explantierten Lungen von zehn Patienten, die eine perioperativer Antibiotika-Prophylaxe mit 1 oder 2 g Meropenem erhielten, unterschiedliche Effektkompartimente gewonnen, einem TDM unterzogen und im Vergleich mit Serum-

Messungen die Penetrationsraten aus dem Blut ermittelt (Paal et al., 2021). Der ELF wurde durch bronchoalveolärer Lavage (BAL) entnommen, wohingegen die interstitielle Flüssigkeit (IF) durch das innovative Verfahren der Mikrodialyse gewonnen wurde. Zusätzlich wurde aus exzidierten, tiefgefrorenen Gewebeblöcken ein Homogenisat gefertigt, welches die Kompartimente ELF, IF und die Blutstrombahn zusammenfasst. Zu Kontrollzwecken erfolgte die Entnahme von IF und Gewebsblöcken an zwei unterschiedlichen Stellen.

Für die quantitative Bestimmung von Meropenem aus BAL und Homogenisat musste zunächst eine LC-MS/MS Methode für einen deutlich niedrigeren Messbereich (0.01 – 2.0 mg/L) entwickelt und auf Matrixeffekte getestet werden. Durch die Bestimmung von Harnstoff, welcher sich im Körper gleichmässig verteilt, wurde der Meropenem-Gehalt um die bei der BAL-Gewinnung hinzugefügte arzneimittelfreie Kochsalzlösung korrigiert und auf den ELF-Wert rückgerechnet, basierend auf der nachfolgenden Formel: $\text{Meropenem}_{\text{ELF}} = (\text{Meropenem}_{\text{BAL}} \times \text{Harnstoff}_{\text{SERUM}}) / \text{Harnstoff}_{\text{BAL}}$ (Kiem and Schentag 2008). In den Untersuchungen zeigten sich erhebliche interindividuelle Unterschiede zwischen der Meropenem-Konzentration im Blut und den Kompartimenten ELF, IF, und den Penetrationsraten, wohingegen die intraindividuelle Variabilität aus den zwei unterschiedlichen IF-Entnahmestellen mit 8.7 % vergleichsweise gering war (siehe Abbildungen 8 und 9).

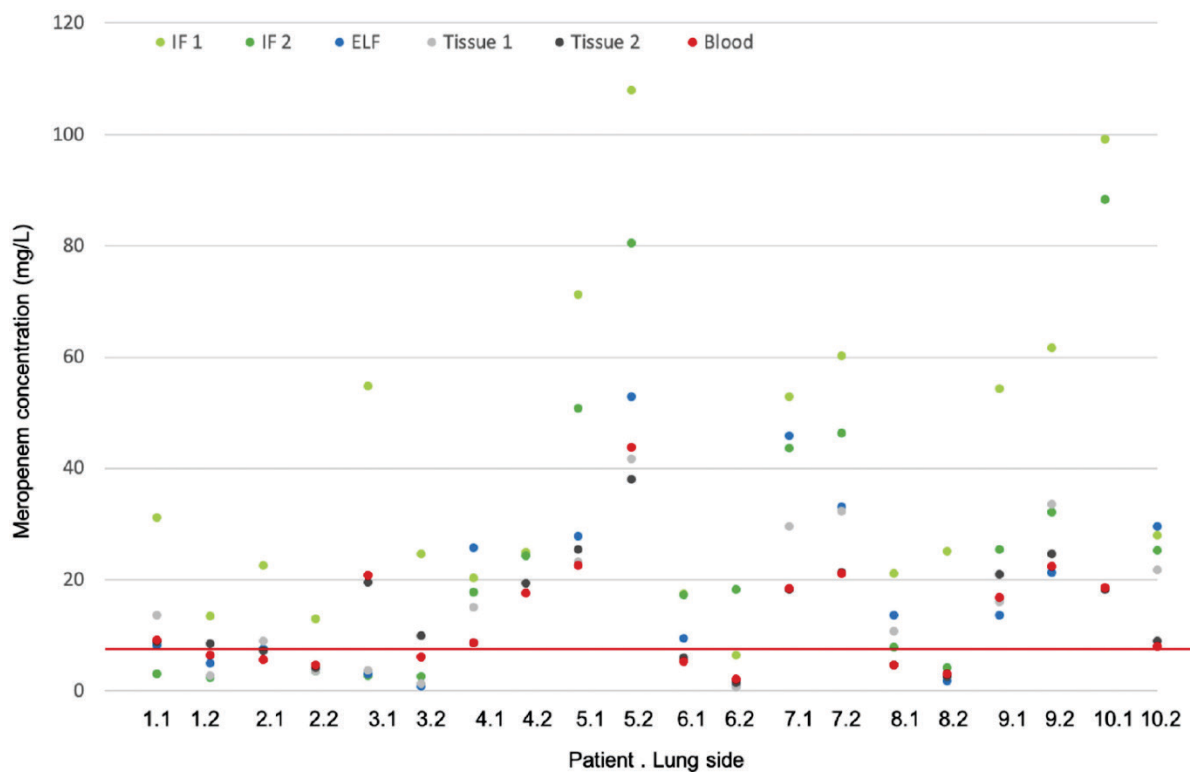


Abbildung 8. Meropenem-Konzentration in den unterschiedlichen Kompartimenten in Bezug zur Zielkonzentration von 8 mg/L. IF, interstitielle Flüssigkeit; ELF, epithelial lining fluid. Aus Paal et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421.

Die medianen Meropenem-Konzentrationen in Blut, ELF, interstitieller Flüssigkeit und Gewebshomogenisat betrugen 26.8, 18.0, 12.1 und 9.1 mg/L. Für 40 % der ELF-, 39 % der IF- und 35 % der Gewebeproben ergaben sich subtherapeutische Meropenem-Konzentrationen mit < 8 mg/L entsprechend den klinischen Vorgaben der EUCAST. Die medianen Penetrationsraten von Serum in die Kompartimente ELF und IF betrugen 0.61 und 0.35.

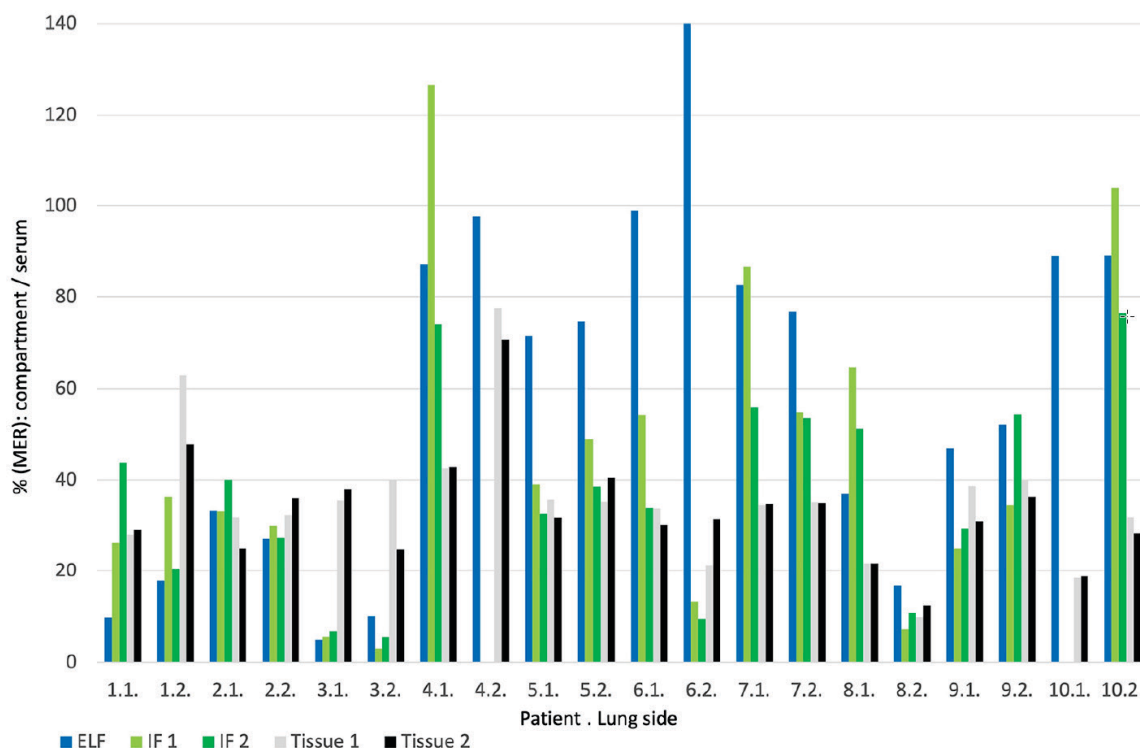


Abbildung 9. Verteilung von Meropenem in den unterschiedlichen Kompartimenten im Verhältnis zur Serum-Konzentration im Sinne einer Penetrationsrate. MER, Meropenem; IF, interstitielle Flüssigkeit; ELF, epithelial lining fluid. Aus Paal et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um die umfassendste Vergleichsmessung von Meropenem in unterschiedlichen Lungenkompartimenten. Die ermittelten Penetrationsraten in dieser Arbeit sind vereinbar mit den Ergebnissen verschiedener wissenschaftlichen Vorarbeiten, zeigen jedoch eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität. Diese Studie bestätigt, dass die Arzneimittelkonzentration im Blut die Konzentration im Lungenkompartiment unzureichend widerspiegelt und dass weitere Forschungsansätze, wie die pharmakometrische Modellierung erforderlich sind, um komplexe Einflussfaktoren in der antimikrobiellen Therapie besser berücksichtigen zu können.

3.2.4 Quantifizierung von Linezolid aus endotrachealem Aspirat (ENTA)

(Intensive Care Med Exp 2024;12:47)

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wird als Goldstandard für die Bestimmung der intrapulmonalen Konzentration von Antiinfektiva betrachtet. Allerdings handelt es sich dabei um eine invasive Methode, die für ein regelmäßiges TDM nicht geeignet ist. Zudem ist die Bestimmung von Antiinfektiva aus BAL-Proben sehr anfällig für methodische Einflüsse, wie benutzer- und instrumentenabhängiger Instillation von isotoner Kochsalzlösung zur Gewinnung der ephithelialen Lungenflüssigkeit (EFL), welche zu einer uneinheitlichen Equilibrierungszeit mit der Auswaschung von Harnstoff aus ELF führt und (rechnerisch ermittelte) Antibiotika-Konzentrationen erheblich verfälschen kann.

In dieser Machbarkeitsstudie wurde untersucht, ob das häufig bei pulmonalen Infektionen eingesetzte Antibiotikum Linezolid, das eine hohe Penetrationsrate in die Lunge aufweist (Roger et al., 2018), verlässlich aus endotrachealem Aspirat (ENTA) quantifiziert werden kann (Rebholz et al., 2024). ENTA ist ein schleimiges Sekret, welches bei mechanisch beatmeten Patienten zur Freihaltung der Atemwege regelmäßig abgesaugt und üblicherweise sofort verworfen wird. Ziel dieser Studie war es daher zu prüfen, ob das leicht zu gewinnende 'Abfallprodukt' ENTA als intrapulmonales Kompartiment für ein Antibiotika-TDM genutzt werden kann.

In Vorversuchen wurde zunächst ein Protokoll zur Probenaufarbeitung entwickelt, um ENTA zu verflüssigen und dieses hochvisköse Material für ein Antibiotika-TDM nutzbar zu machen. Unterschiedliche Agenzien, darunter Dithiothreitol und Proteasen, wurden getestet. Eine zufriedenstellende Verflüssigung von ENTA konnte bereits nach 20-minütiger Inkubation mit einer gepufferten Proteinase-K Lösung bei 37°C erreicht werden. Zur Bestimmung von Linezolid wurde die in Kapitel 3.1.1 beschriebene Antibiotika LC-MS/MS Methode herangezogen (Paal et al., 2018). Verschneidungsexperimente mit Linezolid-haltiger, verflüssigter ENTA und Serum zeigten, dass Serum bzw. Plasmakalibratoren für das TDM dieser unterschiedlichen Probenmaterialien geeignet sind.

Insgesamt wurden neun intubierte Patienten der anästhesiologischen Intensivstationen der LMU München, welche die Standarddosierung Linezolid als 2x 600 mg intravenös erhielten, in die Studie eingeschlossen. Linezolid wurde im zeitlichen Verlauf sowohl aus simultan gewonnener ENTA als auch aus arteriellem Plasma quantifiziert (siehe Abbildung 10). Die durchschnittlichen Tal- und Spitzenspiegel von Linezolid in ENTA betrugen 1.6 und 4.7 mg/L mit einer ENTA/Plasma-Ratio von 104.2 % und 47.7 %. Bei nicht-viskösen ENTA-Proben mit sehr geringem Volumen (< 0.5 mL) lagen die Linezolid-Konzentrationen deutlich unterhalb der Nachweisgrenze der LC-MS/MS Methode und waren somit nicht quantifizierbar, was mit einer Aspiration von rein wässrigem Kondensat aus dem Beatmungssystem vereinbar ist.

Zusammenfassend war es möglich, Linezolid aus endotrachealen Aspirat zuverlässig zu quantifizieren und es ergaben sich vergleichbare Penetrationsraten zum Goldstandard BAL (Wu et al., 2022). Die Verwendung von ENTA zum TDM ließe sich gegenüber BAL wesentlich einfacher in eine klinische Anwendung integrieren, da die Gewinnung keine zusätzliche Ausrüstung erfordert und für den Patienten kein erhöhtes Risiko einer Infektion oder eines Druckverlustes während der Beatmungstherapie birgt. Ausserdem entfällt, im Gegensatz zur BAL, eine starke Probenverdünnung, wodurch auch kein TDM-Assay mit angepasstem Kalibrationsbereich oder eine Normierung der Antiinfektiva-Konzentrationen mittels Harnstoff-Methode notwendig ist.

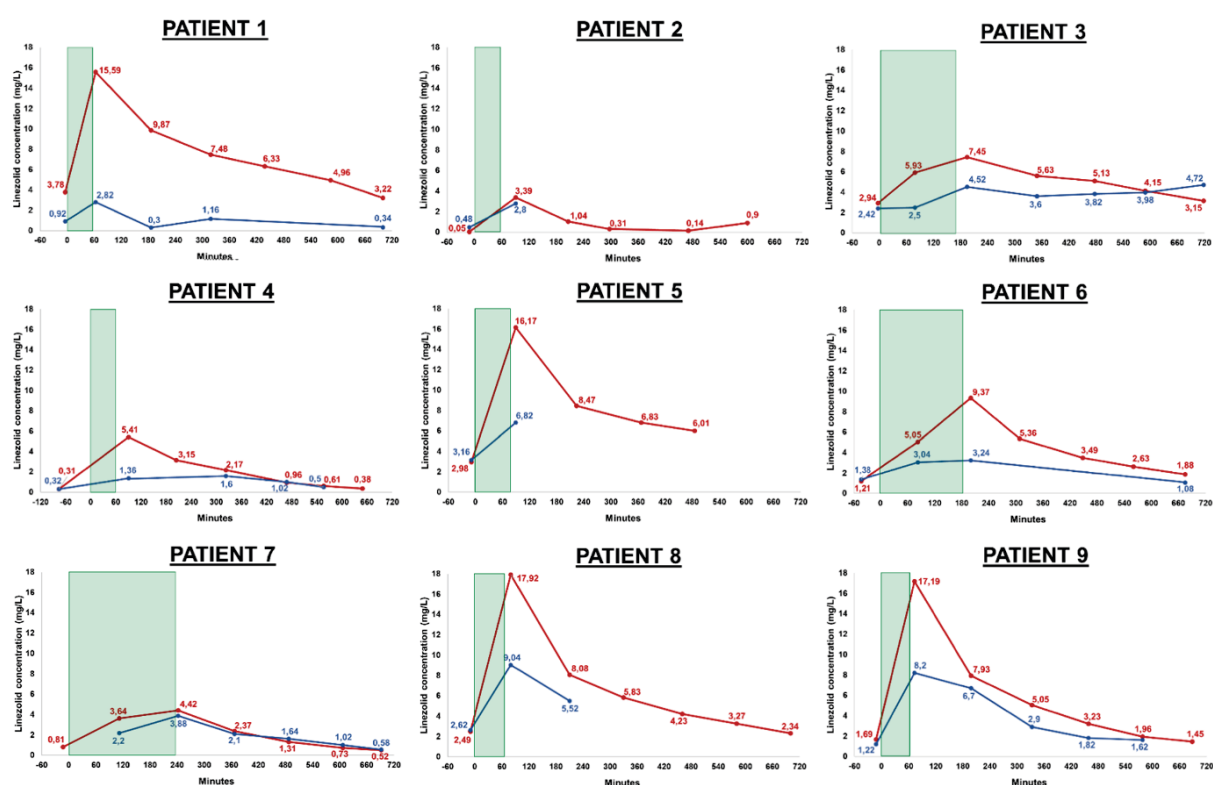


Abbildung 10. Linezolid-Konzentrationen in Plasma (rot) und ENTA (blau) über das 12-stündige Dosierungsintervall. Der grüne Kasten zeigt die Verabreichungszeit von Linezolid an. Aus Rebholz et al., *Intensive Care Med Exp* 2024;12:47.

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Antinfektiva-Therapie in kritischer Erkrankung durch den Einsatz der diagnostischen Massenspektrometrie umfassend zu untersuchen. In einem ersten Schritt wurden daher Multi-Analyt-LC-MS/MS Methoden entwickelt, welche ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) der bedeutendsten Antiinfektiva in kritischer Erkrankung ermöglichen.

In der klinischen Anwendung der selbst entwickelten massenspektrometrischen Antibiotika-TDM Methode zeigte sich, dass die intermittierende Verabreichung von Meropenem und Piperacillin entsprechend der Fachinformation bei vielen schwer kranken Patienten zu subtherapeutischen Konzentrationen in der Blutstrombahn führt. Besonders betroffen waren Patienten mit guter Nierenfunktion. Obwohl die Möglichkeit eines TDM im klinischen Alltag bestand, wurden trotz höherer Dosierung bei den Kurzinfusionen weiterhin unzureichende Antibiotika-Konzentrationen erzielt, weshalb in kritischer Erkrankung einer antiinfektiven Therapie mit kontinuierlicher Infusion generell Vorzug zu geben ist.

Eine solche parenterale Verabreichung über einen längeren Zeitraum setzt jedoch eine ausreichende Stabilität des Antiinfektivums voraus, weshalb für das als relativ instabil beschriebene Beta-Laktam-Antibiotikum Meropenem Stabilitätsmessungen durchgeführt wurden. Dabei sollte die Degradation vom Infusat bis zur Situation *in vivo* abgebildet werden. Zum Einsatz kam eine zuvor mitentwickelte LC-MS/MS-Methode, die simultan Meropenem und dessen durch spontane Hydrolyse gebildetes Hauptabbauprodukt verlässlich quantifiziert. Pragmatisch kann empfohlen werden, das Meropenem-Infusat im 12-Stunden-Takt zu wechseln. Eine weiterführende pharmakokinetische Analyse ergab, dass der spontane Zerfall von Meropenem nur einen geringen Anteil an der Gesamtelimination hat.

Da die Antiinfektiva-Konzentration in der Blutstrombahn lediglich einen Surrogatparameter für die Konzentrationen am Infektionsort darstellt, wurde in klinischen Studien ein massenspektrometrisches TDM für den Wirkungsort Lunge realisiert. Für das Antibiotikum Meropenem wurden in den intrapulmonalen Kompartimenten epithelial lining fluid (ELF) und Interstitium häufig subtherapeutische Wirkstoffspiegel festgestellt, begleitet von einer insgesamt hohen interindividuellen Variabilität. Die Quantifizierung von Antiinfektiva aus ELF ist jedoch methodisch äußerst aufwendig und fehleranfällig, und die Gewinnung interstitieller Flüssigkeit nur im Rahmen thorakaler Eingriffe möglich. Daher wurde in einer Machbarkeitsstudie ein Protokoll zur Quantifizierung von Antiinfektiva aus dem einfach zu gewinnenden intrapulmonalen Kompartiment endotracheales Aspirat (ENTA) erarbeitet, und Messungen für das Antibiotikum Linezolid erfolgreich realisiert.

5 Literaturverzeichnis

- Abdul-Aziz MH, Alffenaar JC, Bassetti M, Bracht H, Dimopoulos G, Marriott D, et al. Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper. *Intensive Care Med* 2020;46:1127-1153.
- Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, Preissing F, Stiefel J, Adam D. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2020;24:239.
- Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Agoramoorthy G, Lee SS. The Drug Repurposing for COVID-19 Clinical Trials Provide Very Effective Therapeutic Combinations: Lessons Learned From Major Clinical Studies. *Front Pharmacol* 2021;12:704205.
- European Medicines Agency, Guideline on Bioanalytical Method Validation, London, UK, 2011.
- Guilhaumou R, Benaboud S, Bennis Y, Dahyot-Fizelier C, Dailly E, Gandia P, et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients-guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Societe Francaise de Pharmacologie et Therapeutique-SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Societe Francaise d'Anesthesie et Reanimation-SFAR). *Crit Care* 2019;23:104.
- Habler K, Brugel M, Teupser D, Liebchen U, Scharf C, Schonermarck U, et al. 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. *J Pharm Biomed Anal* 2021;196:113935.
- Imani S, Buscher H, Marriott D, Gentili S, Sandaradura I. Too much of a good thing: a retrospective study of beta-lactam concentration-toxicity relationships. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2891-2897.
- Kiem S, Schentag JJ. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:24-36.
- Liebchen U, Rakete S, Vogeser M, Arend FM, Kinast C, Scharf C, et al. The Role of Non-Enzymatic Degradation of Meropenem-Insights from the Bottle to the Body. *Antibiotics (Basel)* 2021;10(6):715.
- Maslove DM, Tang B, Shankar-Hari M, Lawler PR, Angus DC, Baillie JK, et al. Redefining critical illness. *Nat Med* 2022;28:1141-1148.
- Mendez A, Chagastelles P, Palma E, Nardi N, Schapoval E. Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity. *Int J Pharm* 2008;350:95-102.
- Paal M, Zoller M, Schuster C, Vogeser M, Schutze G. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC-MS/MS method. *J Pharm Biomed Anal* 2018;152:102-110.
- Paal M, Scharf C, Denninger AK, Ilia L, Kloft C, Kneidinger N, et al. Target Site Pharmacokinetics of Meropenem: Measurement in Human Explanted Lung Tissue by Bronchoalveolar Lavage, Microdialysis, and Homogenized Lung Tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421.
- Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Infektionstherapie e.V. (PEG). S2k Leitlinie Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen - Update 2018. 2. aktualisierte Version, erstellt am 25. Juli 2019.
- Pharmacopoeia JEP, 10th ed.; Supplement 10.1, 10.2 and 10.3; Council of Europe: Strasbourg, Frankreich, 2020.
- Quinton MC, Bodeau S, Kontar L, Zerbib Y, Maizel J, Slama M, et al. Neurotoxic Concentration of Piperacillin during Continuous Infusion in Critically Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61.
- Rakete S, Schuster C, Paal M, Vogeser M. An isotope-dilution LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of meropenem and its open-ring metabolite in serum. *J Pharm Biomed Anal* 2021;197:113944.

- Rebholz D, Liebchen U, Paal M, Vogeser M, Starp J, Grafe C, et al. Can linezolid be validly measured in endotracheal aspiration in critically ill patients? A proof-of-concept trial. *Intensive Care Med Exp* 2024;12:47.
- Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, et al. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current beta-lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis* 2014;58:1072-83.
- Roger C, Roberts JA, Muller L. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxazolidinones. *Clin Pharmacokinet* 2018;57:559-575.
- Scharf C, Paal M, Schroeder I, Vogeser M, Draenert R, Irlbeck M, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Meropenem and Piperacillin in Critical Illness-Experience and Recommendations from One Year in Routine Clinical Practice. *Antibiotics (Basel)* 2020;9(3):131.
- Schuster C, Sterz S, Teupser D, Brugel M, Vogeser M, Paal M. Multiplex Therapeutic Drug Monitoring by Isotope-dilution HPLC-MS/MS of Antibiotics in Critical Illnesses. *J Vis Exp* 2018; (1389):58148.
- Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers* 2022;2:96.
- Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. *Intensive Care Med* 2013;39:2070-82.
- Wu C, Zhang X, Xie J, Li Q, He J, Hu L, et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters of Linezolid in the Epithelial Lining Fluid of Patients With Sepsis. *J Clin Pharmacol* 2022;62:891-897.

6 Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift*** ... geteilte Autorenschaft**

Paal M, Zoller M, Schuster C, Vogeser M, Schutze G. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC-MS/MS method. *J Pharm Biomed Anal* 2018;152:102-110. Impact factor (2018): 2.983

Habler K, Brügel M, Teupser D, Liebchen U, Scharf C, Schönermarck U, Vogeser M, **Paal M**. 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. *J Pharm Biomed Anal* 2021;196:113935. Impact factor (2021): 3.571

Scharf C *, **Paal M ***, Schroeder I, Vogeser M, Draenert R, Irlbeck M, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Meropenem and Piperacillin in Critical Illness-Experience and Recommendations from One Year in Routine Clinical Practice. *Antibiotics (Basel)* 2020;9(3):131. Impact factor (2020): 4.639

Liebchen U, Rakete S, Vogeser M, Arend FM, Kinast C, Scharf C, Zoller M, Schönermarck U, **Paal M**. The Role of Non-Enzymatic Degradation of Meropenem-Insights from the Bottle to the Body. *Antibiotics (Basel)* 2021;10(6):715. Impact Factor (2021): 5.222

Paal M*, Scharf*, Denninger A K, Ilia L, Kloft C, Kneidinger N, Liebchen U, Michel S, Schneider C, Schröpf S, Schuster C, Vogeser M, Weinelt F, Zander J, Zoller M, Schroeder I. Target Site pharmacokinetics of meropenem: Measurement in human explanted lung tissue by bronchoalveolar lavage, microdialysis and homogenized lung tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0156421. Impact factor (2021): 5.938

Rebholz D, Liebchen U, **Paal M**, Vogeser M, Starp J, Grafe C, et al. Can linezolid be validly measured in endotracheal aspiration in critically ill patients? A proof-of-concept trial. *Intensive Care Med Exp* 2024;12:47. Impact factor (2022): 3.000