



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK



Forschungszentrum Borstel
Leibniz Lungenzentrum

Aus der Forschungsgruppe Klinische Infektiologie
Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum

und

dem Lehrstuhl für Respiratory Medicine & International Health
der Universität zu Lübeck

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christoph Lange

**Präzisionsmedizinische Verfahren in der Therapie
der antibiotikaresistenten Tuberkulose**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Niklas Köhler

aus Göttingen

Lübeck 2024

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Lange
Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl-Friedrich Klotz
2. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Dirk Hartwig
Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 22.11.2024
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Übersicht über die Publikationen der kumulativen Promotion	5
2. Einleitung	6
3. Zusammenfassung der Publikationen	10
4. Diskussion und Ausblick	21
5. Literaturverzeichnis	24
6. Ethikvotum	28
7. Publikationen	29
8. Danksagung	32
9. Gesamtpublikationsverzeichnis	33
10. Wissenschaftliche Vorträge im Rahmen der Dissertation	35
11. Lebenslauf	38

Abkürzungen

AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, engl. area under the concentration-time curve
BPaL(M)	Bedaquilin-Pretomanid-Linezolid(-Moxifloxacin)
C _{max}	Maximale Antibiotikakonzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
EMA	Europäische Arzneimittelagentur, engl. European Medicines Agency
FDA	United States Food and Drug Administration
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie, engl. hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, engl. high-performance liquid chromatography-mass spectrometry
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR/RR-TB	Sammelbegriff für rifampicinresistente und multiresistente Tuberkulose
MDR-TB	Multiresistente Tuberkulose, engl. multidrug-resistant tuberculosis
MGIT	mycobacterial growth indicator tube
MIC	Minimale Hemmkonzentration, engl. minimal inhibitory concentration
NGS	Next generation sequencing
NPV	Negativer Vorhersagewert, engl. negative predictive value
PAS	Paraaminosalicylsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
PPV	Positiver Vorhersagewert, engl. positive predictive value
Pre-XDR-TB	Prä-extensiv resistente Tuberkulose, engl. pre-extensively drug-resistant tuberculosis
RR-TB	Rifampicinresistente Tuberkulose, engl. rifampicin-resistant tuberculosis
TDM	Medikamentenspiegelbestimmung, engl. therapeutic drug monitoring
WGS	Gesamtgenomsequenzierung, engl. whole genome sequencing
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organization
XDR-TB	Extensiv resistente Tuberkulose, engl. extensively drug-resistant tuberculosis

1. Übersicht über die Publikationen der kumulativen Promotion

Grobbe HP*, Merker M*, Köhler N*, Andres S*, Hoffmann H*, Heyckendorf J, Reimann M, Barilar I, Dreyer V, Hillemann D, Kalsdorf B, Kohl TA, Sanchez Carballo P, Schaub D, Todt K, Utpatel C, Maurer FP, Lange C, Niemann S. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 2021; 73: 1194-1202.

*geteilte Erstautor*innenschaft, Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2020): 9.0. Beitrag (nach Contributor roles taxonomy, CRediT): Konzept, Methodik, Validierung, Formale Analyse, Untersuchung, Ressourcen, Datenpflege, Text: ursprünglicher Entwurf, Visualisierung, Projektverwaltung.

Mercier T, Desfontaine V, Cruchon S, Da Silva Pereira Clara JA, Briki M, Mazza-Stalder J, Kajkus A, Burger R, Suttels V, Buclin T, Opota O, Koehler N, Sanchez Carballo PM, Lange C, André P, Decosterd LA, Choong E. A battery of tandem mass spectrometry assays with stable isotope-dilution for the quantification of 15 anti-tuberculosis drugs and two metabolites in patients with susceptible-, multidrug-resistant- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Journal of Chromatography B* 2022; 1211: 123456.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2021): 3.3. Beitrag (CRediT): Validierung, Formale Analyse, Untersuchung, Datenpflege, Text: Überprüfung & Bearbeitung.

Hauptpublikation

Köhler N*, Karaköse H*, Grobbe H-P, Hillemann D, Andres S, König C, Kalsdorf B, Brehm TT, Böttcher L, Friesen I, Hoffmann H, Strelec D, Schaub D, Peloquin CA, Schmiedel S, Decosterd LA, Choong E, Wicha SG, Aarnoutse RE, Lange C, Sánchez Carballo PM. A Single-Run HPLC-MS Multiplex Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Relevant First- and Second-Line Antibiotics in the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmaceutics* 2023; 15: 2543.

*geteilte Erstautor*innenschaft, Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 5.4. Beitrag (CRediT): Konzept, Methodik, Validierung, Formale Analyse, Untersuchung, Ressourcen, Datenpflege, Text: ursprünglicher Entwurf, Visualisierung, Überwachung, Projektverwaltung.

2. Einleitung

Tuberkulose ist eine durch *Mycobacterium tuberculosis* ausgelöste Erkrankung und die häufigste zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit weltweit. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) sind im Jahr 2022 rund 10.6 Millionen Menschen an einer Tuberkulose erkrankt und 1.4 Millionen Menschen sind in dem Jahr an dieser Erkrankung verstorben [1]. Die WHO hat sich in ihrer endTB Strategy das Ziel gesetzt, bis zum Jahr 2035 eine Reduktion der Tuberkuloseinzidenz um 90% und der tuberkuloseassoziierten Mortalität um 95% im Vergleich zu 2015 zu erreichen [2]. Die Erreichung dieses Zieles wird jedoch durch die Verbreitung von antibiotikaresistenter Tuberkulose erschwert.

Die Therapie antibiotikaresistenter Tuberkulose ist komplex, teils langwierig, sowie kosten- und ressourcenintensiv [3]. Antibiotikasensible Tuberkulose wird mit einer Vierfachkombination aus Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid und Ethambutol über zwei Monate und einer anschließenden Zweifachkombination aus Rifampicin und Isoniazid über weitere vier Monate behandelt [4]. Sobald eine Resistenz gegen Rifampicin auftritt (rifampicinresistente Tuberkulose, RR-TB) muss in der Therapie auf Zweitlinienantibiotika zurückgegriffen werden [5]. Bei zusätzlicher Resistenz der Mykobakterien gegen Isoniazid spricht man von multiresistenter Tuberkulose (engl. multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB). MDR-TB und RR-TB werden von der WHO als MDR/RR-TB zusammengefasst. MDR/RR-TB wurden bis 2022 mit einer 18-monatigen Kombinationstherapie aus vier bis fünf Zweitlinienantibiotika behandelt, die nach WHO-Behandlungsschema entsprechend dem Antibiogramm hierarchisch aus drei Gruppen (A, B und C) ausgewählt wurden. Levofloxacin bzw. Moxifloxacin sowie Linezolid und Bedaquilin bilden die Gruppe A, Clofazimin und Cycloserin (bzw. das Cycloserin-Prodrug Terizidon) die Gruppe B. Wenn aus diesen beiden Gruppen kein effektives Therapieregime zusammengestellt werden kann, werden Medikamente der Gruppe C ergänzt: Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Meropenem plus Clavulansäure (wobei letzteres nur als Amoxicillin/Clavulansäure erhältlich ist) sowie Amikacin oder Streptomycin, Prothionamid oder Ethionamid, und Paraaminosalicylsäure (PAS) [6, 7]. Bei zusätzlicher Resistenz gegen Levofloxacin oder Moxifloxacin spricht man von prä-extensiv resistenter Tuberkulose (engl. pre-extensively drug-resistant tuberculosis, pre-XDR-TB) und bei weiterer Resistenz gegen Bedaquilin und/oder Linezolid von extensiv resistenter Tuberkulose (engl. extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB). Die Zulassung des neu entwickelten tuberkulosewirksamen Antibiotikums Pretomanid durch die Food and Drug Administration (FDA) 2019 und die European Medicines Agency (EMA) 2020 sowie groß angelegte klinische

Studien [8-10] haben die Therapie der antibiotikaresistenten Tuberkulose revolutioniert, sodass seit 2022 für MDR/RR-TB ein sechsmonatiges Regime aus Bedaquilin, Pretomanid, Linezolid und Moxifloxacin (BPaLM) empfohlen wird, bzw. für pre-XDR-TB ein sechsmonatiges Regime aus Bedaquilin, Pretomanid und Linezolid (BPaL) [5]. Im Falle von XDR-TB, Pretomanidresistenz oder Unverträglichkeit gegenüber einem der Medikamente des BPaL(M)-Regimes sind Patient*innen jedoch weiterhin auf eine 18-monatige Therapie nach oben beschriebenen WHO-Behandlungsschema angewiesen.

Die Resistenztestung bestimmt somit maßgeblich die Wahl der Kombinationstherapie. Sie erfolgt durch Methoden der Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) und der kulturellen Anzucht der Tuberkulosebakterien in Anwesenheit der Antibiotika [11]. Es stehen mehrere PCR-basierte Verfahren zur Verfügung, die resistenzvermittelnde Mutationen in bestimmten Genen von *M. tuberculosis* aus nativem Probenmaterial nachweisen und somit erste Ergebnisse bereits nach Stunden liefern können (genotypische Resistenztestung). Detektiert werden dabei resistenzvermittelnde Mutationen gegen Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid, Moxifloxacin, Levofloxacin, Prothionamid, Ethionamid und Amikacin. Damit erlauben diese Verfahren bereits eine grobe Stratifizierung in MDR/RR- und pre-XDR-TB und die Initiierung einer kalkulierten Therapie. Resistenzen gegen für die Therapie der antibiotikaresistenten Tuberkulose essenzielle Medikamente wie Bedaquilin, Pretomanid, Linezolid, Clofazimin, Cycloserin und Delamanid können jedoch routinemäßig bisher nur kulturell nachgewiesen werden (phänotypische Resistenztestung) [12]. Dazu erfolgt zuerst eine Anzucht der Mykobakterien in flüssigen oder auf festen Nährmedien. Anschließend wird geprüft, ob die Mykobakterien in antibiotikaversetzten Nährmedien Wachstum und somit Antibiotikaresistenz zeigen. Durch die niedrige Teilungsrate von *M. tuberculosis* (eine Teilung pro 18 bis 24 Stunden [13]) dauert die Anzucht bis zu sechs Wochen, die Resistenztestung nochmals bis zu zwei Wochen, sodass von der Probenentnahme bis zum Erhalt der Ergebnisse und dem Start einer antibiogrammgerechten Therapie bis zu acht Wochen vergehen [14]. Unerkannte Resistenzen können in dieser Zeit zu ineffektiver Therapie, Therapieversagen und zur Ausbildung weiterer Resistenzen führen.

Zusätzlich zeigen viele der eingesetzten Zweitlinienmedikamente eine hohe interindividuelle Variabilität in ihrer Pharmakokinetik, also eine hohe Variabilität der Antibiotikakonzentration von Person zu Person. Die therapeutische Breite vieler Antibiotika ist jedoch gering, das heißt der Korridor, in dem sich die Medikamentenkonzentration im Blut bewegen darf, ist schmal [15]. Zu hohe Konzentrationen erhöhen dabei das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwirkungen. So zeigt beispielsweise Linezolid einen ausgeprägten Zusammenhang zwischen der Talkonzentration im Blut (niedrigste Konzentration direkt vor der nächsten

Medikamenteneinnahme) und dem Auftreten von peripherer Polyneuropathie [16, 17]. Zu niedrige Antibiotikakonzentrationen führen wiederum zu ineffektiver Therapie und einem erhöhten Risiko für Therapieversagen und erworbene Antibiotikaresistenz [18]. Besonders oft unterdosiert sind dabei Levofloxacin und Moxifloxacin [19]. Dosisanpassungen erfolgen derzeit nur entsprechend des Körpergewichts oder der Nierenfunktion und nur für wenige Medikamente [5, 7].

Verfahren der Präzisionsmedizin haben das Potential, eine raschere Initiierung einer anti-biogrammgerichten Therapie zu erlauben, sowie eine effektive Antibiotikadosierung sicherzustellen und Nebenwirkungen zu vermeiden [20]. Präzisionsmedizin bedeutet dabei, dass Merkmale und Faktoren der erkrankten Personen bzw. ihrer Erkrankungen in die Beurteilung des Nutzens und der Risiken von Therapiemaßnahmen einfließen und einen maßgeblichen Einfluss auf die Therapieentscheidung haben [21]. Bei der antibiotikaresistenten Tuberkulose kommt hier vor allem genotypische Resistenztestung durch Next Generation Sequencing (NGS)-basierte Verfahren zum Einsatz. Dabei kann das gesamte mykobakterielle Genom sequenziert werden (Gesamtgenomsequenzierung, engl. whole genome sequencing, WGS). Eine ebenso wichtige Rolle spielt die Individualisierung der Medikamentendosis durch Medikamentenspiegelbestimmung (engl. therapeutic drug monitoring, TDM) [20].

WGS ist ein Sequenzierungsverfahren, bei dem Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid, DNA), hier die mykobakterielle DNA, enzymatisch in kleine Fragmente gespalten wird. Die DNA-Fragmente werden dann millionenfach parallel sequenziert und die DNA-Sequenzen anschließend bioinformatisch an einem Referenzgenom ausgerichtet. Dadurch ermöglicht WGS eine schnelle und kostengünstige Sequenzierung des kompletten *M. tuberculosis*-Genoms binnen weniger Tage [22]. Indem Unterschiede zum Referenzgenom, z.B. Mutationen, identifiziert und mit einem Katalog von resistenzvermittelnden Mutationen abgeglichen werden können, ist WGS in der Lage, Antibiotikaresistenzen vorherzusagen [23, 24]. Für die Erstlinienantibiotika Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid konnte eine hohe Übereinstimmung von genotypischer Vorhersage und phänotypischer Testung gezeigt werden [25]. Die Übereinstimmung für Zweitlinienantibiotika wurde jedoch nur anhand weniger Stämme und nur für einige Medikamente untersucht [26-28].

Unter TDM wiederum versteht man die Messung von Arzneimittelkonzentrationen im Plasma oder Serum von Patient*innen, um die Dosis dieser Arzneimittel anhand von Referenzwerten individuell anpassen zu können [29]. So können sowohl zu niedrige als auch zu hohe Antibiotikakonzentrationen vermieden und unerwünschte Arzneimittelwirkungen, Therapieversagen und erworbene Antibiotikaresistenz verhindert werden. Hochleistungsflüssigkeits-

chromatographie-Massenspektrometrie (engl. high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) ist ein Standardverfahren im Rahmen von TDM zur Messung von Medikamentenkonzentrationen in Blutplasma. Dabei wird das Plasma extrahiert und die Medikamentenmoleküle an eine poröse Matrix in einer Chromatographiesäule gebunden. Durch verschiedene Lösemittel werden sie entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften nacheinander aus der Matrix ausgewaschen und in einem Massenspektrometer detektiert. So können die Konzentrationen mehrerer Arzneimittel gleichzeitig im selben Lauf, d. h. in einem Multiplexassay, bestimmt werden. Es gibt inzwischen zahlreiche Multiplexassays für Erstlinienantibiotika [30]. Ein umfassendes TDM für Zweitlinienantibiotika wird jedoch durch die physikalisch-chemische Vielfalt der Medikamente erschwert.

Ziel der vorgelegten Arbeiten war es daher, mit NGS-basiertem WGS und HPLC-MS-basiertem TDM zwei Verfahren aus dem Bereich der Präzisionsmedizin für die Behandlung der antibiotikaresistenten Tuberkulose zu evaluieren bzw. zu entwickeln, um die rasche Initiierung einer antibiogrammgerechten Therapie sowie eine effektive Antibiotikadosierung zu ermöglichen und unerwünschte Arzneimittelreaktionen zu vermeiden.

3. Zusammenfassung der Publikationen

3.1. Erstellung von Antibiotikaregimen gegen multiresistente Tuberkulose basierend auf DNA-Sequenzierung

Grobbe HP*, Merker M*, Köhler N*, Andres S*, Hoffmann H*, Heyckendorf J, Reimann M, Barilar I, Dreyer V, Hillemann D, Kalsdorf B, Kohl TA, Sanchez Carballo P, Schaub D, Todt K, Utpatel C, Maurer FP, Lange C, Niemann S. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 2021; 73: 1194-1202.

Einleitung

Ziel der Studie war es, die Übereinstimmung von genotypischer Resistenztestung durch NGS-basiertes WGS und phänotypischer Resistenztestung durch Flüssigkultur zu evaluieren unter Verwendung eines aktualisierten Mutationskatalogs für das *M. tuberculosis*-Genom. Die primäre Fragestellung war dabei, ob genotypische Resistenztestung allein als Grundlage für die Erstellung von wirksamen Therapieregimen gegen antibiotikaresistente Tuberkulose dienen kann.

Methoden

Die Testgüte von genotypischer Resistenztestung durch WGS sowie von mikrodilutionsbasierter Testung der minimalen Hemmkonzentration (engl. minimal inhibitory concentration, MIC) wurden gegen den Goldstandard der phänotypischen Resistenztestung in Flüssigkultur (Mycobacterial Growth Indicator Tube, MGIT) evaluiert.

Dazu wurden zwischen dem 1. Januar 2015 und dem 30. April 2019 *M. tuberculosis*-Stämme aller Patient*innen der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel gesammelt, die eine Therapie gegen MDR/RR-, prä-XDR- und XDR-TB erhielten. Rifampicinresistenz wurde dabei initial per PCR (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) oder in automatisierter Flüssigkultur (mycobacterial growth indicator tube, MGIT, BACTEC MGIT 960, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) nachgewiesen. Es wurden nur Resistenzdaten von Stämmen betrachtet, bei denen nicht mehr als ein MGIT-Ergebnis und nicht mehr als drei MIC-Ergebnisse fehlten.

WGS wurde auf einer Illumina-Plattform (MiSeq, NextSeq 500) mit Nextera XT Library Preparation Kits (beides Illumina, San Diego, CA) durchgeführt und die Ergebnisse mit der MTBseq-Pipeline analysiert. Die genotypische Resistenztestung wurde mit isolierten *M. tuberculosis*-Stämmen auf der Grundlage eines aktualisierten Mutationskatalogs am Nationalen Referenzlabor für Mykobakterien, Borstel, durchgeführt (Version vom 10.

Dezember 2019). Unbekannte Mutationen, die in Genen gefunden wurden, die typischerweise mit Resistenz assoziiert sind, wurden als unklares Ergebnis klassifiziert.

Für phänotypische Resistenztestung in MGIT wurden die von der WHO empfohlenen kritischen Konzentrationen verwendet, also die Hemmkonzentrationen, ab denen *M. tuberculosis* als resistent eingeschätzt wird. Die Aufreinigung der Sputumproben, die Speziesidentifizierung und die phänotypische Resistenztestung wurden unter Routinebedingungen durchgeführt.

MICs wurden per 96-Well-Mikrodilutionsassay bestimmt (TREK Sensititre MYCOTBI und UKMYC5 und UKMYC6, Thermofisher, Waltham, MA, USA), also indem das Wachstum in mehreren Ansätzen pro Antibiotikum mit aufsteigender Antibiotikakonzentration gemessen wurde. Die MICs von Pyrazinamid wurden in aufsteigender Konzentration in MGIT bestimmt, die MICs von Meropenem konnten aufgrund der geringen Stabilität von Meropenem nicht bestimmt werden. Die MIC-Werte wurden gemäß Clinical and Laboratory Standards Institute interpretiert.

Entsprechend der Ergebnisse von WGS, MGIT und MIC-Testung in Sensititre MYCOTBI/UKMYC wurden anhand des WHO-Behandlungsschemas von 2018 personalisierte Therapieschemata für die Patient*innen simuliert. Unklare Ergebnisse wurden dabei konservativ als resistent eingestuft und die Antibiotika entsprechend nicht berücksichtigt. Das Studienprotokoll wurde unter dem Aktenzeichen 15-195A von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck bestätigt.

Ergebnisse

Zwischen dem 1. Januar 2015 und dem 30. April 2019 wurden Stämme von 70 Patient*innen mit MDR/RR-, pre-XDR- und XDR-TB in die abschließende Analyse einbezogen. Für alle lagen WGS- und MGIT-Ergebnisse für 15 Antibiotika vor: Isoniazid, Rifampicin, Rifabutin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin, Cycloserin/Terizidon, Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Amikacin, Prothionamid und PAS. Nur zwei MGIT-Ergebnisse fehlten, sodass für die Evaluation der Testgüte 1048 Einzelergebnisse zur Verfügung standen. Von diesen Einzelergebnissen stimmten 904 (86,3 %) überein, 68 (6,5 %) zeigten ein unklares Ergebnis im WGS und wurden in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt, 76 Ergebnisse (7,2 %) stimmten nicht überein.

Die Gesamtsensitivität von WGS für die Vorhersage phänotypischer Resistenz lag bei 96,7 % (95 %-Konfidenzintervall: 94,2 – 98,2 %). Für Levofloxacin, Moxifloxacin, Ethambutol, Pyrazinamid, Prothionamid, Amikacin und PAS lagen genug resistente Ergebnisse vor, um

stratifizierte Sensitivitäten zu berechnen: 89,5 % für Levofloxacin (65,5 – 98,2 %), 88,2 % für Moxifloxacin (62,3 – 97,9 %), 100,0 % für Ethambutol (89,3 – 100,0 %), 93,8 % für Pyrazinamid (81,8 – 98,4 %), 100,0 % für Prothionamid (85,0 – 100,0 %), 87,5 % für Amikacin (46,7 – 99,3 %) und 77,8 % für PAS (40,2 – 96,1 %). Insgesamt gab es zwölf falsch negative Ergebnisse (1,1 %), also zwölf resistente Ergebnisse in der phänotypischen Testung, die vom WGS als sensibel klassifiziert wurden. Ohne Allelfrequenzfilter konnte bei vier der betroffenen Stämme eine resistenzvermittelnde Mutation mit niedriger Allelfrequenz gefunden werden. Eine gefundene Mutation wurde bisher nicht mit Resistenz assoziiert und sieben Diskrepanzen konnten nicht aufgeklärt werden. Der negative Vorhersagewert (engl. negative predictive value, NPV) für alle Ergebnisse war 97,9 % (96,2 – 98,8 %).

Die Gesamtspezifität für die Vorhersage phänotypischer Resistenz war 89,6 % (86,8 – 91,8 %), für die einzelnen Antibiotika: 91,8 % für Levofloxacin (79,5 – 97,4 %), 88,2 % für Moxifloxacin (75,4 – 95,1 %), 95,2 % für Pyrazinamid (74,1 – 99,8 %), 80,8 % für Prothionamid (60,0 – 92,7 %), 95,2 % für Amikacin (85,6 – 98,7 %), 90,6 % für PAS (78,6 – 96,5 %) und 30,4 % für Ethambutol (14,1 – 53,0 %). Insgesamt gab es 68 Ergebnisse, bei denen WGS Resistenz und MGIT Sensibilität anzeigte. Bei 27 dieser Ergebnisse (45,3 %) lagen Mutationen zugrunde, die zu einer niedrigen bis mittleren Erhöhung der MIC führen können. Der positive Vorhersagewert (engl. positive predictive value, PPV) für alle Ergebnisse war 84,7 % (80,0 – 88,0 %).

MIC-Testung in Sensititre MYCOTBI und UKMYC 96-Well-Platten zeigte eine Gesamtsensitivität von 68,3 % (62,9 – 73,3 %), eine Gesamtspezifität von 99,4 % (98,3 – 99,8 %), sowie NPV und PPV von 86,0 % (83,2 – 88,4 %) bzw. 98,2 % (95,2 – 99,4 %).

Simulierte Therapieregime auf der Basis von WGS stimmten zu 84,9 % mit auf der Basis von MGIT ausgewählten Medikamenten überein (248 von 292 Behandlungsentscheidungen). Achtunddreißig der 70 Patient*innen (54,3 %) hätten identische Medikamentenkombination auf der Basis von WGS und MGIT erhalten. Es gab keinen signifikanten Unterschied darin, wie häufig Antibiotika der WHO-Gruppen A, B und C in den simulierten Regimen eingesetzt wurden. Nur in drei von 292 Fällen (1,0 % der auf Basis von WGS ausgewählten Medikamente) bzw. bei 3 von 70 Patient*innen (4,3 %) wäre auf der Basis von WGS ein Antibiotikum zum Einsatz gekommen, das im MGIT als resistent getestet wurde.

Diskussion

Anhand einer Kohorte von 70 Patient*innen mit antibiotikaresistenter Tuberkulose konnte gezeigt werden, dass WGS zur Erstellung effektiver personalisierter Therapieregime eingesetzt werden kann. Die Übereinstimmung zwischen WGS- und MGIT-Ergebnissen war insgesamt sehr hoch. Falsch resistente Vorhersagen durch WGS basierten hauptsächlich auf

Mutationen, die mit leicht- bis mittelgradig erhöhten MIC-Werten assoziiert werden. Das unterstreicht das bekannte Problem von MGIT mit der korrekten Identifizierung von niedrigschwelligen Antibiotikaresistenzen, da die Testung nur bei den von der WHO empfohlenen kritischen Konzentrationen stattfindet. Nur 1 % der Antibiotika, die auf der Basis von WGS ausgewählt wurden, waren in MGIT als resistent getestet worden und hätten daher wahrscheinlich keinen Effekt auf den jeweiligen *M. tuberculosis*-Stamm. Davon wären nur 4,3 % der Patient*innen betroffen und auch nur bis zum Erhalt der MGIT-Ergebnisse. Somit bietet WGS ein hohes Maß an Sicherheit bei der Erstellung von Therapieregimen für antibiotikaresistente Tuberkulose. Die diagnostische Testgüte von WGS für Zweitlinienantibiotika hat jedoch noch nicht die WHO-Zielproduktspezifikationen von 95 % Spezifität und 90 % Sensitivität erreicht. Die Hauptgründe dafür sind aktuell noch Wissenslücken in den Mutationskatalogen, Grenzwertartefakte und eine verringerte Reproduzierbarkeit einzelner MGIT-Ergebnisse. WGS kann außerdem Mutationen erkennen, die nur eine geringe oder mäßige MIC-Erhöhung vermitteln, oft als phänotypisch sensibel getestet werden und zum Teil mit einem schlechteren klinischen Ergebnis verbunden sein können.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde erstmalig an einer repräsentativen Anzahl von Patient*innen mit einer antibiotikaresistenten Tuberkulose und einem breiten Spektrum an *M. tuberculosis*-Resistenzprofilen gezeigt, dass WGS-basierte genotypische Vorhersagen von Antibiotikaresistenzen eine präzise Wahl adäquater Antibiotika für eine Kombinationstherapie erlauben. Praktisch alle auf der Basis von WGS ausgewählten Antibiotika (99,0 %), wurden durch MGIT als sensibel bestätigt. WGS stellt ein leistungsfähiges Werkzeug für die rechtzeitige Einleitung von effektiven, individualisierten Therapieregimen gegen antibiotikaresistente Tuberkulose dar.

3.2. Eine Serie von Tandem-Massenspektrometrie-Assays zur Quantifizierung von 15 Antibiotika und zwei Metaboliten bei Patient*innen mit sensibler, multi-resistenter und extensiv resistenter Tuberkulose.

Mercier T, Desfontaine V, Cruchon S, Da Silva Pereira Clara JA, Briki M, Mazza-Stalder J, Kajkus A, Burger R, Suttels V, Buclin T, Opota O, Koehler N, Sanchez Carballo PM, Lange C, André P, Decosterd LA, Choong E. A battery of tandem mass spectrometry assays with stable isotope-dilution for the quantification of 15 anti-tuberculosis drugs and two metabolites in patients

with susceptible-, multidrug-resistant- and extensively drug-resistant tuberculosis. Journal of Chromatography B 2022; 1211: 123456.

Einleitung

TDM für Zweitlinienantibiotika ist komplex und wird daher nur von sehr wenigen Laboren angeboten. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methodik zur schnellen Bestimmung der Blutplasmakonzentrationen aller wichtigen Erst- und Zweitlinienantibiotika mittels HPLC-MS zu entwickeln und zu implementieren. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die neuesten Therapieregime gegen MDR- und pre-XDR-TB gelegt.

Methoden

Die Methodenentwicklung umfasste 15 Antibiotika, die entsprechend den wahrscheinlichsten Kombinationen, dem Lösemittel für die Probenextraktion und den Bindungseigenschaften an Chromatographiesäulen in drei Gruppen eingeteilt wurden: Gruppe 1 umfasste Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid sowie den Isoniazidmetaboliten N-Acetylisoniazid, Gruppe 2 Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimine, Delamanid und Pretomanid sowie den Delamanidmetaboliten M1, Rifampicin und die seltener eingesetzten Rifamycine Rifabutin und Rifapentin, sowie das noch nicht zugelassene Sutezolid. Cycloserin als aktivem Metaboliten des Prodrugs Terizidon wurde separat analysiert.

Proben für Gruppe-1-Analysen wurden initial in hochreinem Wasser verdünnt und anschließend mit einer acetonitrilbasierten Proteinfällung extrahiert. Die gesamte Probenverarbeitung fand dabei auf Eis statt. Die Antibiotika wurden anschließend auf einer Xbridge BEH Amide hydrophilen Interaktionschromatographiesäule (engl. Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC, Dimensionen: 2,1 × 150 mm, 2,5 µm Partikelgröße, Waters, Milford, MA, USA) getrennt. Proben für Gruppe-2-Analysen wurden einer methanolbasierten Proteinfällung unterzogen und auf einer XSelect HSS T3 Reversen-Phase-Säule (2,1 × 75 mm, 3,5 µm, Waters, Milford, MA, USA) getrennt. Proben für die Analyse der Cycloserinkonzentration wurden initial mit Natriumborat und Benzylchlorid derivatisiert und anschließend mit einer acetonitrilbasierten Proteinfällung extrahiert. Zur Chromatographie wurde hier die gleiche Säule benutzt wie für Gruppe 2. Die Laufzeit einer Messung betrug 5 min für Gruppe 1 sowie 7 bzw. 6 min für Gruppe 2 und Cycloserin. Die HPLC-MS-Plattform bestand dabei aus einer Vanquish HPLC und einem Triple Stage Quadrupole Massenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mit schweren Isotopen markierte Antibiotika dienten als interne Standards. Die Methode wurde nach den Leitlinien

der FDA zur bioanalytischen Methodvalidierung und Analyse von Studienproben validiert und die Validität in einem internationalen Ringversuch geprüft.

Die Anwendung der Methode für TDM im klinischen Kontext wurde exemplarisch beschrieben: Eine Patientin mit antibiotikasensibler Tuberkulose und extremem Untergewicht hatte unter Therapie an Gewicht zugenommen, sodass die Antibiotikadosis angepasst werden musste. Ein Patient mit pre-XDR-TB und verzögertem Therapieansprechen wurde am Forschungszentrum Borstel entsprechend der erhöhten MIC seines *M. tuberculosis*-Stamms für Moxifloxacin in einem individuellen Heilversuch mit einer Hochdosis-Moxifloxacintherapie (1200 mg / Tag) behandelt.

Ergebnisse

Alle Antibiotika konnten in einem breiten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Es wurden keine Interferenzen zwischen den analysierten Antibiotika beobachtet. Eine Verschleppung von Antibiotikamolekülen in den nächsten Messdurchlauf konnte nur in geringem Umfang für Ethambutol und Delamanid beobachtet werden, sodass nach hochkonzentrierten Proben zusätzliche Leerproben programmiert wurden. Signalveränderungen durch Humanplasma wurden nicht beobachtet, wenn das Messsignal der Antibiotika auf das Messsignal des korrespondierenden isotoopenmarkierten internen Standards normalisiert wurde (rel. Signalstärke im Lösemittel vs. im Humanplasma: 92,6 – 108,8 %). Die Signalvariabilität zwischen Humanplasma von verschiedenen Personen betrug weniger als 9,8 %. Die Extraktionseffizienz, also die prozentuale Wiederfindungsrate der Antibiotika nach der Extraktion, lag zwischen 79,4 % für Delamanid M1 und 98,9 % für Rifabutin.

Alle Kalibrierkurven hatten einen Regressionskoeffizienten von $> 0,99$. Richtigkeit (Abweichung von der tatsächlichen Konzentration) und Präzision (Streuung um die mittlere Konzentration) waren innerhalb der FDA-empfohlenen Grenzwerte von ± 15 %. Berechnungen des prädizierten 80 %-Betaintervalls (der Konzentrationsbereich um eine tatsächliche Konzentration, in dem voraussichtlich 80 % der durch die Methode gemessenen Konzentrationen liegen) lagen deutlich innerhalb der Zielgröße für das Betaintervall von ± 30 %. Die hohe Richtigkeit und Präzision wurde auch durch ein gutes Abschneiden im Ringversuch gezeigt. Das untere Limit des Messbereichs der Gruppe-1-Antibiotika lag bei 0,02 mg/L für Isoniazid, N-Acetylisoniazid und Ethambutol, für Rifampicin bei 0,06 mg/L und für Pyrazinamid bei 0,12 mg/L. Für Gruppe 2 bei 0,02 mg/L (außer für Rifapentin bei 0,1 mg/L) und für Cycloserin bei 0,08 mg/L.

Konzentrationen von Isoniazid, N-Acetylisoniazid, Rifabutin, Clofazimin, Cycloserin und Delamanid waren bei Raumtemperatur weniger als 48 Stunden, alle anderen Antibiotika mehr

als 48 Stunden stabil. Die Wahl des Antikoagulans hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Antibiotikakonzentrationen.

Die Patientin mit antibiotikasensibler Tuberkulose zeigte maximale Antibiotikakonzentrationen (C_{max}) im Referenzbereich für Rifampicin (C_{max} : 13,3 mg/L, Referenzbereich: 8 - 24 mg/L), Isoniazid (5,95 mg/L, 3 - 6 mg/L), Pyrazinamid (49,1 mg/L, 20 - 60 mg/L) und Ethambutol (5,2 mg/L, 2 - 6 mg/L), zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme. Isoniazid lag dabei am oberen Ende des Referenzbereichs. In Zusammenschau mit einem N-Acetylisoniazid/Isoniazid-Verhältnis von 0.3 spricht dieser Befund für eine genetisch bedingte langsamere Verstoffwechslung von Isoniazid. Um hepatotoxische unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu vermeiden, wurde hier eine engmaschige Kontrolle der Transaminasen empfohlen. Eine Dosisanpassung war hier nicht indiziert. Der Patient mit pre-XDR-TB zeigte unter 1200 mg Moxifloxacin eine hohe Moxifloxacinkonzentration von 6,0 mg/L. Alle anderen Antibiotikakonzentrationen waren innerhalb oder knapp unterhalb des Referenzbereichs. Zwei Wochen nach dem Start der Moxifloxacin-Hochdosistherapie waren erstmal keine Mykobakterien mehr im Sputum des Patienten nachweisbar. Die Moxifloxacin-Dosis wurde zwei Monate später auf 800 mg pro Tag deeskaliert, worunter der Patient seine 20-monatige Therapie ohne unerwünschte Arzneimittelwirkungen beenden konnte.

Diskussion

Es wurde eine Serie von HPLC-MS-Assays entwickelt, mit denen in maximal drei Messläufen von maximal sieben Minuten 15 Erst- und Zweitlinienantibiotika sowie zwei Metabolite bestimmt werden können. Mit wenigen, einfachen Extraktionsschritten konnte eine genaue und präzise Quantifizierung der Plasmakonzentrationen aller wichtigen, klinisch eingesetzten Erst- und Zweitlinienantibiotika erreicht und für klinisch effizientes TDM zur Verfügung gestellt werden. Die Nutzung von isotopenmarkierten internen Standards erlaubte dabei die robuste Messung der Antibiotikakonzentrationen in einem komplexen und hochvariablen Probenmaterial wie Humanplasma mit verschiedenen Antikoagulantien sowie in Serum. Durch das niedrige untere Limit des Messbereichs konnte der Assay den kompletten Bereich der klinisch relevanten Konzentrationen von Erst- und Zweitlinienantibiotika abdecken. Durch die Teilnahme an einem Ringversuch konnte die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des Assays belegt werden.

Schlussfolgerungen

Es konnte erfolgreich eine Serie von hochpräzisen HPLC-MS-Assays für TDM für die Therapie von antibiotikasensibler und -resistenter Tuberkulose entwickelt werden, die aktuell zu den

leistungsfähigsten und präzisesten Messungen für TDM bei Tuberkulose gehören. Diese Methode ist einzigartig um TDM für alle Komponenten des aktuellen BPaL(M)-Regimes durchzuführen. Die Entwicklung solcher flexiblen Assays ist vor allem für TDM von individualisierten Therapieregimen von großer Bedeutung, weil hier verschiedenste Kombinationen von Zweitlinienantibiotika aus einer einzelnen Blutprobe bestimmt werden müssen. TDM spielt eine wichtige Rolle in der Therapie von antibiotikaresistenter Tuberkulose und sollte aufgrund der Häufigkeit von Toxizität, Intoleranz, Therapieversagen und erworbener Antibiotikaresistenz energisch gefördert werden.

3.3. Ein single-run-HPLC-MS-Multiplexassay für Therapeutisches Drug Monitoring von relevanten Erst- und Zweitlinienantibiotika in der Behandlung von resistenter Tuberkulose

Köhler N, Karaköse H*, Grobbel H-P, Hillemann D, Andres S, König C, Kalsdorf B, Brehm TT, Böttcher L, Friesen I, Hoffmann H, Strelec D, Schaub D, Peloquin CA, Schmiedel S, Decosterd LA, Choong E, Wicha SG, Aarnoutse RE, Lange C, Sánchez Carballo PM. A Single-Run HPLC-MS Multiplex Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Relevant First- and Second-Line Antibiotics in the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmaceutics* 2023; 15: 2543.*

Einleitung

Umfassendes TDM für Zweitlinienantibiotika wird durch die chemische Vielfalt der Antibiotika erschwert. Es wird daher derzeit nur von sehr wenigen Laboren angeboten, die dieses Problem lösen, indem sie – wie in der vorhergehenden Arbeit – die Medikamente entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften gruppieren und die Gruppen in separaten HPLC-MS-Assays entweder nacheinander auf derselben Geräteplattform oder gleichzeitig auf mehreren Plattformen analysieren. Die Etablierung und der Betrieb mehrerer Assays und/oder Instrumente ist jedoch ressourcenintensiv und übersteigt die Kapazitäten vieler Labors. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen umfassenden, in einem einzigen Durchlauf durchführbaren (single-run-)Multiplexassay zu entwickeln und zu validieren sowie die Anwendbarkeit des Assays in der klinischen Versorgung von Patienten mit antibiotikaresistenter Tuberkulose zu zeigen.

Methoden

Ein single-run-Multiplexassay muss analytische Kompromisse eingehen. Es wurde daher ein Zielprofil für ausreichende Analyseleistung einer HPLC-MS-Methode für TDM bei antibiotikaresistenter Tuberkulose definiert. Pharmakokinetische Zielwerte und C_{\max} -Werte wurden in der Literatur recherchiert. Von hoher Priorität waren dabei solche Antibiotika, bei denen TDM

klinisch empfohlen war und die mehr als 10 % der Patient*innen verschrieben wurden (Patient*innen mit MDR/RR- pre-XDR- und XDR-TB in der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel, Leibniz Lungenzentrum, von August 2018 bis August 2021). Von mittlerer Priorität waren solche Antibiotika, für die TDM empfohlen wurde oder deren Verschreibungshäufigkeit $\geq 10\%$ war. Ausreichende Sensitivität wurde erreicht, wenn die Antibiotikakonzentrationen über fünf Halbwertszeiten ab C_{\max} beobachtet werden konnten (97 % des jeweiligen Antibiotikums sind zu diesem Zeitpunkt ausgeschieden). Hohe Konzentrationen sollten bis zum Zweifachen von C_{\max} gemessen werden können. Ziel war eine Validierung gemäß den EMA- und FDA-Richtlinien zur bioanalytischen Methoden-validierung und Analyse von Studienproben. Der Assay wurde jedoch als ausreichend valide angesehen, wenn die erwartete Abweichung der gemessenen Konzentrationen von den wahren Konzentrationen klinische Entscheidungsfindung ermöglichte. Spezifisch wurde eine geringe Abweichung der gemessenen Konzentrationen von den tatsächlichen Konzentrationen für das Monitoring von Toxizität bei Linezolid und Amikacin angestrebt sowie eine moderate Abweichung für das Monitoring von Effektivität, wenn TDM-Ergebnisse mit MIC-Daten kombiniert wurden (MIC-Daten werden semiquantitativ bei exponentiellen Konzentrationen bestimmt).

Zur Probenverarbeitung wurde das EDTA-Vollblut abzentrifugiert und das Plasma mittels acetonitrilbasierter Proteinfällung extrahiert. Dafür wurden 100 μl der Plasmaproben mit 700 μl Extraktionsmedium gemischt und 100 μl 1%ige Ameisensäure hinzugefügt. Die Proben wurden 10 min bei $15\,000 \times g$, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert, 700 μl klarer Überstand abgenommen und bis zur Messung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Die Messung erfolgte mit einer Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit einer SeQuant ZIC-HILIC HPLC-Säule ($2.1 \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) und einem Waters Micromass Quattro Premier XE Massenspektrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Als Lösemittel dienten Acetonitril und 1%ige Ameisensäure in Wasser. Ein Messdurchlauf dauerte 30 min. Um den Assay so schnell wie möglich klinisch anwenden zu können, wurden Richtigkeit und Präzision in einem beschleunigten Verfahren mit Daten aus Wiederfindungs- und Matrixeffektexperimenten berechnet.

Anhand der Proben von zwei Patienten der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel wurde der Assays im Rahmen individueller Heilversuche angewendet. Beide Patienten wurden mit einer Hochdosistherapie behandelt und in Zusammenarbeit mehreren Laboren ausführlich beschrieben (vorhergehende Publikation sowie [31]): Zusätzlich zum oben

beschriebenen Patienten mit pre-XDR-TB (Patient 1) wurde ein Patient mit XDR-TB am Forschungszentrum Borstel behandelt (Patient 2), dessen *M. tuberculosis*-Stamm nur gegenüber Delamanid und Pretomanid vollständig sensibel war. Beide Patienten wurden mit ≥ 800 mg Moxifloxacin und intensiviertem Meropenemschema therapiert, Patient 2 erhielt zusätzlich eine Hochdosistherapie mit ≥ 250 mg Bedaquilin dreimal pro Woche, 200 mg Clofazimin und ≥ 1000 mg Terizidon pro Tag.

Ergebnisse

Entsprechend den Empfehlungen und der Verschreibungshäufigkeit wurden Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin und Linezolid als Antibiotika mit hoher Priorität für TDM angesehen, Rifampicin, Rifabutin, Isoniazid, Pretomanid, Clofazimin, Ethambutol, Delamanid, Meropenem und Clavulansäure, Amikacin und Prothionamid wurden als mittlerer Priorität eingestuft.

Ein Messlauf dauerte 30 min. Eine vollständige chromatographische Trennung aller Antibiotika konnte nicht erreicht werden, die Trennung war jedoch ausreichend für die Messkapazität des Massenspektrometers. Alle Antibiotika konnten über den angestrebten Konzentrationsbereich kalibriert werden. Die Wiederfindungsrate lag zwischen 47,8 % für Amikacin und 105,6 % für Pyrazinamid und der Matrixeffekt reichte von 96,6 % für Bedaquilin bis 139,8 % für Amikacin (Antibiotika, die ab 2018 nicht mehr benutzt wurden, sind hier nicht dargestellt).

Linezolid, Delamanid, Meropenem und Prothionamid lagen strikt innerhalb des von der EMA und FDA empfohlenen Bereichs für Richtigkeit und Präzision. Die erwartete Abweichung von der tatsächlichen Konzentration als 80 %-Betaintervall betrug bis zu ± 30 % bei Meropenem und bis zu ± 40 % bei Linezolid, Delamanid und Prothionamid. Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Clofazimin, Cycloserin, Ethambutol, Pyrazinamid, Amikacin und PAS sowie Rifampicin und Rifabutin lagen außerhalb des EMA/FDA-Bereichs für Richtigkeit und Präzision, das 80 %-Betaintervall betrug jeweils ca. ± 40 % mit stärkeren Abweichungen bei niedrigen Konzentrationen. Isoniazid, Pretomanid und Streptomycin zeigten insgesamt sehr starke Abweichungen.

Alle in den Therapieregimen verwendeten Antibiotika konnten quantifiziert werden. Patient 1 erhielt zum Zeitpunkt der Messung täglich 1200 mg Moxifloxacin, 600 mg Linezolid, 100 mg Clofazimin, 750 mg Terizidon, 3 \times 2 g Meropenem plus 850 mg Amoxicillin/150 mg Clavulansäure sowie 200 mg Bedaquilin dreimal pro Woche. Darunter zeigte TDM eine effektive Exposition gegenüber Bedaquilin, Linezolid, Cycloserin und Meropenem. Die Clofaziminkonzentrationen lagen unter dem Referenzbereich (0,25 – 0,52 $\mu\text{g/ml}$, Referenz-

bereich: 0,52 – 0,79 g/ml) und die Moxifloxacinexposition unterhalb der Effektivitätsgrenze (Area under the concentration-time curve [AUC]/MIC = 21,26, Ziel: > 53). Patient 2 erhielt 1600 mg Moxifloxacin, 200 mg Clofazimin, 1000 mg Terizidon, 2 × 100 mg Delamanid, 3 × 2 g Meropenem plus 850 mg Amoxicillin/150 mg Clavulansäure und 11.82 g PAS täglich sowie dreimal pro Woche 300 mg Bedaquilin. Darunter zeigte TDM eine zu geringe Dosierung von Moxifloxacin, Bedaquilin und Meropenem, reguläre Konzentrationen von Clofazimin und PAS, eine ausreichende Exposition von Cycloserin und hohe Konzentrationen von Delamanid.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Zielprofile für ausreichende Analyseleistung einer HPLC-MS-Methode für TDM bei antibiotikaresistenter Tuberkulose definiert und dementsprechend ein TDM-Multiplexassay entwickelt, der die Quantifizierung von Erst- und Zweitlinienantibiotika aus Blutplasma in einem einzigen Durchlauf ermöglicht. Der Assay wurde validiert und zusätzlich im Rahmen von individuellen Heilversuchen angewendet. Insgesamt ist die Methode ausreichend sensitiv, genau und präzise, um die klinische Entscheidungsfindung in der Toxizitätsüberwachung von Linezolid und der Überwachung der Wirksamkeit von Rifampicin, Rifabutin, allen WHO-Gruppe-A- und -B-Medikamenten (Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin, Cycloserin) sowie den Gruppe-C-Medikamenten Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Meropenem, Prothionamid und PAS zu unterstützen. Es konnten damit alle Antibiotika gemessen werden, die als von hoher Priorität identifiziert wurden, sowie sechs von zehn Medikamenten mittlerer Priorität. Bisher gibt es eine vergleichbare Methode, die Moxifloxacin, Levofloxacin, Linezolid und Cycloserin umfasst, jedoch kein Bedaquilin, Clofazimin und Delamanid.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig klinisch orientierte Zielprofile für TDM bei antibiotikaresistenter Tuberkulose definiert. Der dementsprechend entwickelte single-run-Multiplexassay erlaubt TDM für die relevanten Erst- und Zweitlinienantibiotika Rifampicin, Rifabutin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin, Terizidon/Cycloserin, Ethambutol, Delamanid, Meropenem, Pyrazinamid, Prothionamid und PAS.

4. Diskussion und Ausblick

In den vorgelegten Arbeiten wurden mit NGS-basiertem WGS und zwei HPLC-MS-Methoden für TDM von Erst- und Zweitlinienantibiotika Verfahren aus dem Bereich der Präzisionsmedizin für die Behandlung der antibiotikaresistenten Tuberkulose evaluiert bzw. entwickelt, die die rasche Initiierung einer effektiven, antibiogrammgerichten Therapie erlauben und eine sichere und effektive Antibiotikadosierung sicherstellen.

WGS wurde aus der ersten positiven *M. tuberculosis*-Kultur durchgeführt. Eine Verwendung von nativem Probenmaterial ist noch keine gängige Praxis, WGS ist jedoch auch direkt aus Sputum möglich [32, 33]. Es konnte gezeigt werden, dass WGS eine phänotypische Resistenz für Levofloxacin, Moxifloxacin, Pyrazinamid, Prothionamid, Amikacin und Ethambutol mit hoher Sensitivität vorhersagen kann. Die WHO-Zielproduktspezifikationen von 95 % Spezifität sowie 90 % Sensitivität wurden dabei in der vorliegenden Studie noch nicht erreicht. Die Ergebnisse decken sich jedoch weitestgehend mit einer größeren Studie an 900 *M. tuberculosis*-Stämmen [34]. Dies deutet darauf hin, dass zugrundeliegende Mutationskataloge weiterhin nicht vollständig sind. Gleichzeitig müssen erst zahlreiche Fälle von Resistenz vorliegen, um sicher von einzelnen Mutationen auf phänotypische Resistenzen schließen zu können. Weder die vorliegende noch eine andere aktuelle Studie konnte daher die Testgüte von WGS zur Vorhersage von Bedaquilin-, Linezolid- oder Pretomanidresistenz evaluieren [27, 28, 34-36]. Vor dem Hintergrund des neuen BPaL(M)-Regimes wird die Verfügbarkeit von genotypischer Resistenztestung gerade für Bedaquilin, Linezolid und Pretomanid jedoch umso wichtiger [37]. Eine Erzeugung von antibiotikaresistenten Mutanten *in-vitro* kann hier die Charakterisierung von Mutationen stark beschleunigen [38].

In der vorliegenden Studie wurden Mutationen mit unklarem Effekt konservativ als resistenz-auslösend gewertet und die jeweiligen Antibiotika aus den simulierten Regimen ausgeschlossen. Dadurch konnte eine hohe Sicherheit der simulierten Regime erzielt werden: 99 % der auf der Basis von WGS ausgewählten Antibiotika wurden in der phänotypischen Resistenztestung in MGIT als effektiv bestätigt. Basierend auf einem Regime aus vier Antibiotika erhielten 95.7 % der Patient*innen in der Simulation vier effektive Medikamente. Mit Erhalt der Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung könnte das Regime bei den übrigen 4.3 % angepasst und eine langfristige ineffektive Therapie verhindert werden. Es konnte daher gezeigt werden, dass WGS als Grundlage für die Erstellung effektiver Therapieregime für Patient*innen mit antibiotikaresistenter Tuberkulose genutzt werden kann.

Die Konzentrationen aller relevanten Antibiotika der initiierten Therapieregime können mit den entwickelten Multiplex-HPLC-MS-Methoden aus Blutplasma bestimmt und im Rahmen von TDM adjustiert werden. Dadurch kann die Dosierung der Antibiotika an die Variabilität von Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Person zu Person, an Komorbiditäten und Komedikationen sowie an die MIC des *M. tuberculosis*-Stamms angepasst werden. Indem zu hohe und zu niedrige Dosierungen vermieden werden, kann das Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen sowie für Therapieversagen und erworbene Resistenz reduziert werden. Hier konnten erfolgreich sowohl eine Serie von drei sehr genauen Assays für die Anwendung in einem spezialisierten Labor sowie einen ausreichend genauen single-run-Assay für Labore mit geringeren HPLC-MS-Kapazitäten entwickelt werden. Die Assayserie hat dabei den Vorteil einer sehr hohen Genauigkeit, kurzer Laufzeiten, robuster Analyseleistung unabhängig vom Antikoagulans der Probe, sowie einer praktischen Kombination der Antibiotika außer Cycloserin in einen Erstlinien- und einen Zweitlinienassay. Alle drei Assays sind nach EMA/FDA-Kriterien validiert. Ähnlich umfassende Assayserien basieren auf deutlich komplexeren Extraktionsverfahren und decken einen schmaleren Messbereich ab [39].

Die Entwicklung des single-run-Assays stellte eine Herausforderung aufgrund der hohen chemischen Diversität der Antibiotika dar. Dieser Herausforderung wurde mit einer möglichst genauen Differenzierung seiner analytischen Nische begegnet, indem Mindestanforderungen für einen Einsatz bei klinischen Dosierungsentscheidungen definiert wurden. Die Toxizität von Linezolid wird hauptsächlich über den Talspiegel vermittelt [16, 17], sodass hier eine hohe Richtigkeit und Präzision erzielt werden musste. TDM-Zielwerte für die Effektivität der Antibiotika werden häufig relativ zur semiquantitativen MIC angegeben (Testung bei exponentiellen Konzentrationen). Dadurch reichte für das Monitoring der Effektivität eine geringere Richtigkeit und Präzision aus. Der dementsprechend entwickelte Assay erfüllt teilweise die EMA/FDA-Kriterien und ist in der Lage, Dosierungsentscheidungen in Bezug auf die Effektivität von Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin, Cycloserin, Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Meropenem, Prothionamid und PAS sowie in Bezug auf die Toxizität von Linezolid mit klinisch ausreichender Analyseleistung zu unterstützen. Ähnlich umfassende single-run-Assays decken weder Bedaquilin noch Clofazimin ab oder befinden sich noch in der Entwicklung [40, 41]. Bei der Vorhersage und Prävention der Toxizität von Linezolid wird neben der Pharmakokinetik in Form der Talkonzentration zukünftig auch die Pharmakogenetik in Form der Aktivierung bestimmter Gene bei Patient*innen eine große Rolle spielen [42].

WGS und TDM wurden in der präzisionsmedizinischen Behandlung von zwei komplexen Fällen von antibiotikaresistenter Tuberkulose im Rahmen von individuellen Heilversuchen eingesetzt, bei denen multiple Resistenzen des *M. tuberculosis*-Stamms keine adäquate Therapie mehr erlaubten. WGS wurde genutzt, um Mutationen zu finden, die nur eine geringe Erhöhung der MIC und so eine niedrigschwellige Resistenz hervorrufen. Wiederholtes WGS ermöglicht außerdem eine longitudinale Kontrolle auf neuerworbene Resistenzen. Niedrigschwellige Resistenzen wurden anschließend mit Hochdosis-Antibiotikatherapie unter TDM zu überwinden versucht. Bei einem Patienten mit pre-XDR-TB gelang es so, nach 13 Wochen die Mykobakterienlast im Sputum unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Bei einem Patienten mit XDR-TB wurde eine Kulturkonversion nach 44 Wochen unter TDM-gesteuerter Hochdosistherapie mit vierfach erhöhter Moxifloxacinosis sowie erhöhten Bedaquilin-, Terizidon-, und Clofazimindosierungen erzielt. Es wird davon ausgegangen, dass die Hochdosistherapie einen entscheidenden Effekt auf die Krankheitsprogression hatte. Ein Rezidiv der Tuberkulose und erworbene Antibiotikaresistenz konnten jedoch nicht unterbunden werden: Im Verlauf zeigte WGS eine neue Pretomanidresistenz an, weitere Therapieeskalationen blieben daraufhin ohne klinischen Effekt. Der Patient verstarb schließlich nach mehr als drei Jahren intensiver Antibiotikatherapie an einer Gram-negativen Sepsis [31]. Zukünftige Projekte müssen daher unter anderem darauf abzielen, Pharmakokinetik und Effektivität von Zweitlinienantibiotika besser zu verstehen [43], vor allem im Rahmen einer Hochdosistherapie [44].

Kaum eine andere Infektionskrankheit eignet sich für die Entwicklung präzisionsmedizinischer Anwendungen so, wie die Tuberkulose. In dieser Arbeit wurde der Stellenwert molekularbiologischer Vorhersagen für das individuelle Design von Therapieregimen bei der antibiotikaresistenten Tuberkulose überprüft und belegt. Außerdem wurden zwei HPLC-MS-basierte Methoden für TDM von Grund auf bis zur ersten klinischen Anwendung entwickelt. Beide Verfahren haben das Potential, zukünftig die Behandlung von Tuberkulosepatient*innen zu optimieren und die Behandlungsergebnisse zu verbessern.

5. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, *Global tuberculosis report 2023*. 2023, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/373828>.
2. World Health Organization, *The end TB strategy*. 2015, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331326>.
3. Günther, G., L. Guglielmetti, C. Leu, C. Lange, and F. van Leth, *Availability and costs of medicines for the treatment of tuberculosis in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2023. **29**(1): p. 77-84 DOI: 10.1016/j.cmi.2022.07.026.
4. World Health Organization, *WHO operational handbook on tuberculosis: module 4: treatment: drug-susceptible tuberculosis treatment*. 2022, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/354548>.
5. World Health Organization, *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment*. 2022 update ed. 2022, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/365308>.
6. World Health Organization, *Rapid communication: key changes to treatment of multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB)*. 2018, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/275383>.
7. World Health Organization, *WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*. 2019, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/311389>.
8. Conradie, F., A.H. Diacon, N. Ngubane, P. Howell, D. Everitt, A.M. Crook, C.M. Mendel, E. Egizi, J. Moreira, J. Timm, T.D. McHugh, G.H. Wills, A. Bateson, R. Hunt, C. Van Niekerk, M. Li, M. Olugbosi, M. Spigelman, and T.B.T.T. Nix, *Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis*. N Engl J Med, 2020. **382**(10): p. 893-902 DOI: 10.1056/NEJMoa1901814.
9. Conradie, F., T.R. Bagdasaryan, S. Borisov, P. Howell, L. Mikiashvili, N. Ngubane, A. Samoilova, S. Skorniykova, E. Tudor, E. Variava, P. Yablonskiy, D. Everitt, G.H. Wills, E. Sun, M. Olugbosi, E. Egizi, M. Li, A. Holsta, J. Timm, A. Bateson, A.M. Crook, S.M. Fabiane, R. Hunt, T.D. McHugh, C.D. Tweed, S. Foraida, C.M. Mendel, M. Spigelman, and T. ZeNix Trial, *Bedaquiline-Pretomanid-Linezolid Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis*. N Engl J Med, 2022. **387**(9): p. 810-823 DOI: 10.1056/NEJMoa2119430.
10. Nyang'wa, B.T., C. Berry, E. Kazounis, I. Motta, N. Parpieva, Z. Tigay, V. Solodovnikova, I. Liverko, R. Moodliar, M. Dodd, N. Ngubane, M. Rassool, T.D. McHugh, M. Spigelman, D.A.J. Moore, K. Ritmeijer, P. du Cros, K. Fielding, and T.-P.S. Collaborators, *A 24-Week, All-Oral Regimen for Rifampin-Resistant Tuberculosis*. N Engl J Med, 2022. **387**(25): p. 2331-2343 DOI: 10.1056/NEJMoa2117166.
11. Lange, C., W.A. Alghamdi, M.H. Al-Shaer, S. Brighenti, A.H. Diacon, A.R. DiNardo, H.P. Grobbel, M.I. Groschel, F. von Groote-Bidlingmaier, M. Hauptmann, J. Heyckendorf, N. Köhler, T.A. Kohl, M. Merker, S. Niemann, C.A. Peloquin, M. Reimann, U.E. Schaible, D. Schaub, V. Schleusener, T. Thye, and T. Schön, *Perspectives for personalized therapy for patients with multidrug-resistant tuberculosis*. J Intern Med, 2018. **284**: p. 163–188 DOI: 10.1111/joim.12780.
12. World Health Organization, *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection*. 2021 update ed. 2021, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/342331>.

13. Logsdon, M.M. and B.B. Aldridge, *Stable Regulation of Cell Cycle Events in Mycobacteria: Insights From Inherently Heterogeneous Bacterial Populations*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 514 DOI: 10.3389/fmicb.2018.00514.
14. World Health Organization, *Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis*. 2018, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/275469>.
15. Alffenaar, J.W.C., S.L. Stocker, L.D. Forsman, A. Garcia-Prats, S.K. Heysell, R.E. Aarnoutse, O.W. Akkerman, A. Aleksa, R. van Altena, W.A. de Onata, P.K. Bhavani, N. Van't Boveneind-Vrubleuskaya, A.C.C. Carvalho, R. Centis, J.M. Chakaya, D.M. Cirillo, J.G. Cho, D.A. L, M.P. Dalcolmo, P. Denti, K. Dheda, G.J. Fox, A.C. Hesselting, H.Y. Kim, C.U. Koser, B.J. Marais, I. Margineanu, A.G. Martson, M.M. Torrico, H.M. Nataprawira, C.W.M. Ong, R. Otto-Knapp, C.A. Peloquin, D.R. Silva, R. Ruslami, P. Santoso, R.M. Savic, R. Singla, E.M. Svensson, A. Skrahina, D. van Soolingen, S. Srivastava, M. Tadolini, S. Tiberi, T.A. Thomas, Z.F. Udwadia, D.H. Vu, W. Zhang, S.G. Mpagama, T. Schon, and G.B. Migliori, *Clinical standards for the dosing and management of TB drugs*. Int J Tuberc Lung Dis, 2022. **26**(6): p. 483-499 DOI: 10.5588/ijtld.22.0188.
16. Song, T., M. Lee, H.S. Jeon, Y. Park, L.E. Dodd, V. Dartois, D. Follman, J. Wang, Y. Cai, L.C. Goldfeder, K.N. Olivier, Y. Xie, L.E. Via, S.N. Cho, C.E. Barry, 3rd, and R.Y. Chen, *Linezolid Trough Concentrations Correlate with Mitochondrial Toxicity-Related Adverse Events in the Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. EBioMedicine, 2015. **2**(11): p. 1627-33 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.09.051.
17. Eimer, J., M. Frechet-Jachym, D. Le Du, E. Caumes, N. El-Helali, D. Marigot-Outtandy, F. Mechai, G. Peytavin, V. Pourcher, C. Rioux, Y. Yazdanpanah, J. Robert, L. Guglielmetti, and L. group, *Association Between Increased Linezolid Plasma Concentrations and the Development of Severe Toxicity in Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment*. Clin Infect Dis, 2023. **76**(3): p. e947-e956 DOI: 10.1093/cid/ciac485.
18. Srivastava, S., J.G. Pasipanodya, C. Meek, R. Leff, and T. Gumbo, *Multidrug-resistant tuberculosis not due to noncompliance but to between-patient pharmacokinetic variability*. J Infect Dis, 2011. **204**(12): p. 1951-9 DOI: 10.1093/infdis/jir658.
19. Davies Forsman, L., K. Niward, J. Kuhlin, X. Zheng, R. Zheng, R. Ke, C. Hong, J. Werngren, J. Paues, U.S.H. Simonsson, E. Eliasson, S. Hoffner, B. Xu, J.W. Alffenaar, T. Schon, Y. Hu, and J. Bruchfeld, *Suboptimal moxifloxacin and levofloxacin drug exposure during treatment of patients with multidrug-resistant tuberculosis: results from a prospective study in China*. Eur Respir J, 2021. **57**(3) DOI: 10.1183/13993003.03463-2020.
20. Lange, C., R. Aarnoutse, D. Chesov, R. van Crevel, S.H. Gillespie, H.P. Grobbel, B. Kalsdorf, I. Kontsevaya, A. van Laarhoven, T. Nishiguchi, A. Mandalakas, M. Merker, S. Niemann, N. Köhler, J. Heyckendorf, M. Reimann, M. Ruhwald, P. Sanchez-Carballo, D. Schwudke, F. Waldow, and A.R. DiNardo, *Perspective for Precision Medicine for Tuberculosis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 566608 DOI: 10.3389/fimmu.2020.566608.
21. Dietel, M., K. Grandt, M. Hallek, G. Jonitz, R. Jütte, R. Kreienberg, H. Kroemer, G. Matheis, W.-B. Niebling, H. Rebscher, P. Scriba, M. Wenker, and F. Zepp, *Beschluss der Bundesärztekammer über die Stellungnahme "Präzisionsmedizin: Bewertung unter medizinisch-wissenschaftlichen und ökonomischen Gesichtspunkten"*. Deutsches Ärzteblatt Online, 2020 DOI: 10.3238/baek_sn_praezision_2020.
22. Domínguez, J., M.J. Boeree, E. Cambau, D. Chesov, F. Conradie, V. Cox, K. Dheda, A. Dudnyk, M.R. Farhat, and S. Gagneux, *Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a 2023 TBnet/RESIST-TB consensus statement*. The Lancet Infectious Diseases, 2023. **23**(4): p. e122-e137
23. Kohl, T.A., C. Utpatel, V. Schleusener, M.R. De Filippo, P. Beckert, D.M. Cirillo, and S. Niemann, *MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of*

- Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. PeerJ, 2018. **6**: p. e5895 DOI: 10.7717/peerj.5895.
24. World Health Organization, *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance*. 2021, Geneva: World Health Organization. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: <https://iris.who.int/handle/10665/341981>.
 25. CRyPTIC Consortium and the 100 000 Genomes Project, *Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing*. New England Journal of Medicine, 2018. **379**(15): p. 1403-1415 DOI: 10.1056/NEJMoa1800474.
 26. Heyckendorf, J., S. Andres, C.U. Köser, I.D. Oлару, T. Schön, E. Sturegård, P. Beckert, V. Schleusener, T.A. Kohl, and D. Hillemann, *What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi- and extensively drug-resistant tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2018. **62**(2): p. e01550-17 DOI: 10.1128/AAC.01550-17.
 27. Ruesen, C., A.L. Riza, A. Florescu, L. Chaidir, C. Editoiu, N. Aalders, D. Nicolosu, V. Grecu, M. Ioana, R. van Crevel, and J. van Ingen, *Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from Romania*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 9676 DOI: 10.1038/s41598-018-27962-5.
 28. Gygli, S.M., P.M. Keller, M. Ballif, N. Blochliger, R. Homke, M. Reinhard, C. Loiseau, C. Ritter, P. Sander, S. Borrell, J. Collantes Loo, A. Avihingsanon, J. Gnokoro, M. Yotebieng, M. Egger, S. Gagneux, and E.C. Bottger, *Whole-Genome Sequencing for Drug Resistance Profile Prediction in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(4) DOI: 10.1128/AAC.02175-18.
 29. Salzer, H.J., N. Wassilew, N. Kohler, I.D. Oлару, G. Gunther, C. Herzmann, B. Kalsdorf, P. Sanchez-Carballo, E. Terhalle, T. Rolling, C. Lange, and J. Heyckendorf, *Personalized Medicine for Chronic Respiratory Infectious Diseases: Tuberculosis, Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases, and Chronic Pulmonary Aspergillosis*. Respiration, 2016. **92**(4): p. 199-214 DOI: 10.1159/000449037.
 30. Raju, K.S.R., M. Gundeti, M.Y. Malik, N. Kadian, M. Rashid, I. Taneja, S.P. Singh, and M. Wahajuddin, *Bioanalysis of antitubercular drugs using liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 2017. **134**: p. 295-309 DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.006.
 31. Koehler, N., S. Andres, M. Merker, V. Dreyer, A. John, M. Kuhns, D. Krieger, E. Choong, N. Verougstraete, P.A. zur Wiesch, S.G. Wicha, C. König, B. Kalsdorf, P.M. Sanchez Carballo, D. Schaub, J. Werngren, T. Schön, C.A. Peloquin, N. Schönfeld, A.G. Verstraete, L.A. Decosterd, R. Aarnoutse, S. Niemann, F.P. Maurer, and C. Lange, *Pretomanid-resistant tuberculosis*. Journal of Infection, 2023. **86**(5): p. 520-524 DOI: 10.1016/j.jinf.2023.01.039.
 32. Nimmo, C., R. Doyle, C. Burgess, R. Williams, R. Gorton, T.D. McHugh, M. Brown, S. Morris-Jones, H. Booth, and J. Breuer, *Rapid identification of a Mycobacterium tuberculosis full genetic drug resistance profile through whole genome sequencing directly from sputum*. Int J Infect Dis, 2017. **62**: p. 44-46 DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.007.
 33. Doyle, R.M., C. Burgess, R. Williams, R. Gorton, H. Booth, J. Brown, J.M. Bryant, J. Chan, D. Creer, J. Holdstock, H. Kunst, S. Lozewicz, G. Platt, E.Y. Romero, G. Speight, S. Tiberi, I. Abubakar, M. Lipman, T.D. McHugh, and J. Breuer, *Direct Whole-Genome Sequencing of Sputum Accurately Identifies Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Faster than MGIT Culture Sequencing*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(8) DOI: 10.1128/jcm.00666-18.
 34. Finci, I., A. Albertini, M. Merker, S. Andres, N. Bablishvili, I. Barilar, T. Caceres, V. Crudu, E. Gotuzzo, N. Hapeela, H. Hoffmann, C. Hoogland, T.A. Kohl, K. Kranzer, A. Mantsoki, F.P. Maurer, M.P. Nicol, E. Noroc, S. Plesnik, T. Rodwell, M. Ruhwald, T. Savidge, M. Salfinger, E. Streicher, N. Tukvadze, R. Warren, W. Zemanay, A. Zurek, S. Niemann, and C.M. Denking, *Investigating resistance in clinical Mycobacterium*

- tuberculosis complex isolates with genomic and phenotypic antimicrobial susceptibility testing: a multicentre observational study.* Lancet Microbe, 2022. **3**(9): p. e672-e682 DOI: 10.1016/S2666-5247(22)00116-1.
35. Wu, X., G. Tan, W. Sha, H. Liu, J. Yang, Y. Guo, X. Shen, Z. Wu, H. Shen, and F. Yu, *Use of Whole-Genome Sequencing to Predict Mycobacterium tuberculosis Complex Drug Resistance from Early Positive Liquid Cultures.* Microbiol Spectr, 2022. **10**(2): p. e0251621 DOI: 10.1128/spectrum.02516-21.
 36. Liu, D., F. Huang, G. Zhang, W. He, X. Ou, P. He, B. Zhao, B. Zhu, F. Liu, Z. Li, C. Liu, H. Xia, S. Wang, Y. Zhou, T.M. Walker, L. Liu, D.W. Crook, and Y. Zhao, *Whole-genome sequencing for surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China.* Clin Microbiol Infect, 2022. **28**(5): p. 731 e9-731 e15 DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.014.
 37. Lange, C., N. Köhler, and G. Günther, *Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis.* N Engl J Med, 2023. **388**(2): p. 190 DOI: 10.1056/NEJMc2213970.
 38. Sonnenkalb, L., J.J. Carter, A. Spitaleri, Z. Iqbal, M. Hunt, K.M. Malone, C. Utpatel, D.M. Cirillo, C. Rodrigues, K.S. Nilgiriwala, P.W. Fowler, M. Merker, S. Niemann, and C. Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: an International, *Bedaquiline and clofazimine resistance in Mycobacterium tuberculosis: an in-vitro and in-silico data analysis.* Lancet Microbe, 2023. **4**(5): p. e358-e368 DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00002-2.
 39. Kim, H.J., K.A. Seo, H.M. Kim, E.S. Jeong, J.L. Ghim, S.H. Lee, Y.M. Lee, D.H. Kim, and J.G. Shin, *Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.* J Pharm Biomed Anal, 2015. **102**: p. 9-16 DOI: 10.1016/j.jpba.2014.08.026.
 40. Han, M., S.H. Jun, J.H. Lee, K.U. Park, J. Song, and S.H. Song, *Method for simultaneous analysis of nine second-line anti-tuberculosis drugs using UPLC-MS/MS.* J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(9): p. 2066-73 DOI: 10.1093/jac/dkt154.
 41. Bolhuis, M.S., E.M. Jongedijk, O.W. Akkerman, D.J. Touw, and M.G.G. Sturkenboom, *Seventeen drugs, one sample: analyzing multiple anti-TB drugs simultaneously using one method.* European Respiratory Journal, 2023. **62**(suppl 67): p. PA4551 DOI: 10.1183/13993003.congress-2023.PA4551.
 42. Zielinski, N., D. Baiceanu, E. Ibrahim, N. Köhler, C. Popa, J. Sachsenweger, C. Lange, and M. Reimann. *TBS2E-25 Prediction of baseline linezolid neurotoxicity of multidrug-resistant TB treatment.* in *Union Conference 2023.* 2023. Paris: International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: https://documents.theunion.org/web-uploads/UNION2023_Abstracts.pdf.
 43. Köhler, N., A.L. Leonhardt, H.-P. Grobbel, N. Zielinski, D. Schaub, M. Reimann, L.A. Decosterd, E. Choong, P.M. Sanchez Carballo, R.E. Aarnoutse, S.G. Wicha, and C. Lange. *P-2-47 Is today's TDM still valid tomorrow? – Assessment of the inter-occasional variability of second-line TB drugs (IOVA-TB).* in *DZIF Annual Meeting 2023.* 2023. Hannover. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: https://dzif-annual-meeting.de/fileadmin/media/dzif/2023/docs/DZIF2023_Abstract_booklet.pdf.
 44. Macholz, M., N. Köhler, S. Kalbitz, S. Zegarek, I. Friesen, M. Kuhns, C. Lange, and C. Lübbert. *P-009 Individualisierte Therapie bei XDR-Tuberkulose: Fallbericht einer 37-jährigen Ukrainerin.* in *Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin.* 2023. Leipzig: Deutsche Gesellschaft für Infektiologie. Zuletzt aufgerufen am 20.12.2023 von: https://kit-kongresse.de/kitpress/wp-content/uploads/KIT2023_Abstractbook.pdf.

6. Ethikvotum

Die Studie zum Manuskript „Design of multidrug-resistant tuberculosis treatment regimens based on DNA sequencing“, wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck per Schreiben vom 03. Juli 2015 bestätigt (Aktenzeichen 15-195A). Für die übrigen Studien (Methodenentwicklung) war kein Ethikvotum notwendig.

7. Publikationen

7.1. Grobbel HP*, Merker M*, Köhler N*, Andres S*, Hoffmann H*, Heyckendorf J, Reimann M, Barilar I, Dreyer V, Hillemann D, Kalsdorf B, Kohl TA, Sanchez Carballo P, Schaub D, Todt K, Utpatel C, Maurer FP, Lange C, Niemann S. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 2021; 73: 1194-1202. DOI: [10.1093/cid/ciab359](https://doi.org/10.1093/cid/ciab359)

Abstract

Background: Comprehensive and reliable drug susceptibility testing (DST) is urgently needed to provide adequate treatment regimens for patients with multidrug-resistant/rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB). We determined whether next-generation sequencing (NGS) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates and genes implicated in drug resistance can guide the design of effective MDR/RR-TB treatment regimens.

Methods: NGS-based genomic DST predictions of *M. tuberculosis* complex isolates from MDR/RR-TB patients admitted to a TB reference center in Germany between 1 January 2015 and 30 April 2019 were compared with phenotypic DST results of mycobacteria growth indicator tubes (MGIT). Standardized treatment algorithms were applied to design individualized therapies based on either genomic or phenotypic DST results, and discrepancies were further evaluated by determination of minimal inhibitory drug concentrations (MICs) using Sensititre MYCOTBI and UKMYC microtiter plates.

Results: In 70 patients with MDR/RR-TB, agreement among 1048 pairwise comparisons of genomic and phenotypic DST was 86.3%; 76 (7.2%) results were discordant, and 68 (6.5%) could not be evaluated due to the presence of polymorphisms with yet unknown implications for drug resistance. Importantly, 549 of 561 (97.9%) predictions of drug susceptibility were phenotypically confirmed in MGIT, and 27 of 64 (42.2%) false-positive results were linked to previously described mutations mediating a low or moderate MIC increase. Virtually all drugs (99.0%) used in combination therapies that were inferred from genomic DST were confirmed to be susceptible by phenotypic DST.

Conclusions: NGS-based genomic DST can reliably guide the design of effective MDR/RR-TB treatment regimens.

7.2. **Mercier T, Desfontaine V, Cruchon S, Da Silva Pereira Clara JA, Briki M, Mazza-Stalder J, Kajkus A, Burger R, Suttels V, Buclin T, Opota O, Koehler N, Sanchez Carballo PM, Lange C, André P, Decosterd LA, Choong E. A battery of tandem mass spectrometry assays with stable isotope-dilution for the quantification of 15 anti-tuberculosis drugs and two metabolites in patients with susceptible-, multidrug-resistant- and extensively drug-resistant tuberculosis. Journal of Chromatography B 2022; 1211: 123456. DOI: [10.1016/j.jchromb.2022.123456](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123456)**

Abstract

Objective: Anti-tuberculosis (antiTB) drugs are characterized by an important inter-individual pharmacokinetic variability poorly predictable from individual patients' characteristics. Therapeutic drug monitoring (TDM) may therefore be beneficial for patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection, especially for the management of multidrug/extensively drug resistant- (MDR/XDR)-TB. Our objective was to develop robust HPLC-MS/MS methods for plasma quantification of 15 antiTB drugs and 2 metabolites, namely rifampicin, isoniazid plus N-acetyl-isoniazid, pyrazinamide, ethambutol (the conventional quadritherapy for susceptible TB) as well as combination of agents against MDR/XDR-TB: bedaquiline, clofazimine, delamanid and its metabolite M1, levofloxacin, linezolid, moxifloxacin, pretomanid, rifabutin, rifapentine, sutezolid, and cycloserine.

Methods: Plasma protein precipitation was used for all analytes except cycloserine, which was analyzed separately after derivatization with benzoyl chloride. AntiTB quadritherapy drugs (Pool1) were separated by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (column Xbridge BEH Amide, 2.1 × 150 mm, 2.5 µm, Waters®) while MDR/XDR-TB agents (Pool 2) and cycloserine (as benzoyl derivative) were analyzed by reverse phase chromatography on a column XSelect HSS T3, 2.1 × 75 mm, 3.5 µm (Waters®). All runs last <7 min. Quantification was performed by selected reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry, using stable isotopically labelled internal standards.

Results: The method covers the clinically relevant plasma levels and was extensively validated based on FDA recommendations, with intra- and inter-assay precision (CV) < 15% over the validated ranges. Application of the method is illustrated by examples of TDM for two patients treated for drug-susceptible- and MDR-TB.

Conclusion: Such convenient extraction methods and the use of stable isotope-labelled drugs as internal standards provide an accurate and precise quantification of plasma concentrations of all major clinically-used antiTB drugs regimens and is optimally suited for clinically efficient TDM against tuberculosis.

7.3. **Köhler N***, Karaköse H*, Grobbel H-P, Hillemann D, Andres S, König C, Kalsdorf B, Brehm TT, Böttcher L, Friesen I, Hoffmann H, Strelec D, Schaub D, Peloquin CA, Schmiedel S, Decosterd LA, Choong E, Wicha SG, Aarnoutse RE, Lange C, Sánchez Carballo PM. **A Single-Run HPLC-MS Multiplex Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Relevant First- and Second-Line Antibiotics in the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis.** *Pharmaceutics* 2023; 15: 2543. DOI: [10.3390/pharmaceutics15112543](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112543)

Abstract

The treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* relies on complex antibiotic therapy. Inadequate antibiotic exposure can lead to treatment failure, acquired drug resistance, and an increased risk of adverse events. Therapeutic drug monitoring (TDM) can be used to optimize the antibiotic exposure. Therefore, we aimed to develop a single-run multiplex assay using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) for TDM of patients with multidrug-resistant, pre-extensively drug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. A target profile for sufficient performance, based on the intended clinical application, was established and the assay was developed accordingly. Antibiotics were analyzed on a zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography column and a triple quadrupole mass spectrometer using stable isotope-labeled internal standards. The assay was sufficiently sensitive to monitor drug concentrations over five half-lives for rifampicin, rifabutin, levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline, linezolid, clofazimine, terizidone/cycloserine, ethambutol, delamanid, pyrazinamide, meropenem, prothionamide, and para-amino salicylic acid (PAS). Accuracy and precision were sufficient to support clinical decision making ($\leq \pm 15\%$ in clinical samples and $\pm 20\text{-}25\%$ in spiked samples, with 80% of future measured concentrations predicted to fall within $\pm 40\%$ of nominal concentrations). The method was applied in the TDM of two patients with complex drug-resistant tuberculosis. All relevant antibiotics from their regimens could be quantified and high-dose therapy was initiated, followed by microbiological conversion. In conclusion, we developed a multiplex assay that enables TDM of the relevant first- and second-line anti-tuberculosis medicines in a single run and was able to show its applicability in TDM of two drug-resistant tuberculosis patients.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Mentor Christoph Lange und meiner wissenschaftlichen Betreuerin Patricia Sánchez Carballo für ihre klare und starke Führung, ihre Unterstützung, Zuverlässigkeit und Geduld bedanken.

Von unschätzbarem Wert waren die Hilfe und Unterstützung meiner Kolleg*innen aus der Forschungsgruppe Klinische Infektiologie am Forschungszentrum Borstel im Labor, bei meinen Experimenten, bei der Datensammlung, Datenverarbeitung und -auswertung, bei der Administration meiner Arbeit sowie als erfahrene Kolleg*innen und Mitdotorand*innen.

Weiterhin möchte ich mich bei Hande Karaköse, Rob Aarnoutse, Sebastian Wicha, Matthias Merker, Sönke Andres, Doris Hillemann, Eva Choong, Laurent Decosterd, Inna Friesen, Martin Kuhns, Harald Hoffmann, Florian Maurer, Stefan Schmiedel, Thomas Brehm, Pia Abel zur Wiesch, Nick Verougstraete und Jan Heyckendorf für Beratung, Unterstützung und Supervision bedanken, ohne die solch multidisziplinäre Projekte niemals möglich gewesen wären.

Das Team der Infektionsstation der Medizinischen Klinik am Forschungszentrum Borstel, sowie das Team des Emil-von-Behring-Krankenhauses in Berlin haben die in dieser Arbeit vorgestellten Patienten kompetent betreut und die Einbettung meiner Forschung in den Klinikalltag ermöglicht und unterstützt.

Für finanzielle Unterstützung danke ich dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung, das mich mit Projektmitteln und einem Doktorand*innen-Stipendium unterstützt hat, sowie dem Team der Forschungsgruppe Bioanalytischen Chemie am Forschungszentrum Borstel für technische Unterstützung.

9. Gesamtpublikationsverzeichnis

9.1. Originalarbeiten

Grobbe HP*, Merker M*, Köhler N*, Andres S*, Hoffmann H*, Heyckendorf J, Reimann M, Barilar I, Dreyer V, Hillemann D, Kalsdorf B, Kohl TA, Sanchez Carballo P, Schaub D, Todt K, Utpatel C, Maurer FP, Lange C, Niemann S. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 2021; 73: 1194-1202.

*geteilte Erstautor*innenschaft, Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2020): 9.0]

Mercier T, Desfontaine V, Cruchon S, Da Silva Pereira Clara JA, Briki M, Mazza-Stalder J, Kajkus A, Burger R, Suttels V, Buclin T, Opota O, Koehler N, Sanchez Carballo PM, Lange C, André P, Decosterd LA, Choong E. A battery of tandem mass spectrometry assays with stable isotope-dilution for the quantification of 15 anti-tuberculosis drugs and two metabolites in patients with susceptible-, multidrug-resistant- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Journal of Chromatography B* 2022; 1211: 123456.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2021): 3.3.

Köhler N*, Karaköse H*, Grobbe H-P, Hillemann D, Andres S, König C, Kalsdorf B, Brehm TT, Böttcher L, Friesen I, Hoffmann H, Strelec D, Schaub D, Peloquin CA, Schmiedel S, Decosterd LA, Choong E, Wicha SG, Aarnoutse RE, Lange C, Sánchez Carballo PM. A Single-Run HPLC-MS Multiplex Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Relevant First- and Second-Line Antibiotics in the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmaceutics* 2023; 15: 2543. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112543

*geteilte Erstautor*innenschaft, Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 5.4.

Vasiliu A*, Köhler N*, Altpeter E, AEgisdottir TR, Amerali M, de Onate WA, Bakos A, D'Amato S, Cirillo DM, van Crevel R, Davidaviciene E, Demuth I, Dominguez J, Duarte R, Gunther G, Guthmann JP, Hatzianastasiou S, Holm LH, Herrador Z, Hribar U, Huberty C, Ibraim E, Jackson S, Jensenius M, Josefsdottir KS, Koch A, Korzeniewska-Kosela M, Kuksa L, Kunst H, Lienhardt C, Mahler B, Makek MJ, Muylle I, Normark J, Pace-Asciak A, Petrovic G, Pieridou D, Russo G, Rzhepishevska O, Salzer HJF, Marques MS, Schmid D, Solovic I, Sukholytka M, Svetina P, Tyufekchieva M, Vasankari T, Viiklepp P, Villand K, Wallenfels J, Wesolowski S, Mandalakas AM, Martinez L, Zenner D, Lange C, Tbnnet. Tuberculosis incidence in foreign-born people residing in European countries in 2020. *Euro Surveill* 2023; 28. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.42.2300051 (*geteilte Erstautor*innenschaft)

*geteilte Erstautor*innenschaft, Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 19.0.

9.2. Letter to the Editor - Originaldaten

Koehler N, Andres S, Merker M, Dreyer V, John A, Kuhns M, Krieger D, Choong E, Verougstraete N, zur Wiesch PA, Wicha SG, König C, Kalsdorf B, Sanchez Carballo PM, Schaub D, Werngren J, Schön T, Peloquin CA, Schönfeld N, Verstraete AG, Decosterd LA, Aarnoutse R, Niemann S, Maurer FP, Lange C. Pretomanid-Resistant Tuberculosis. *Journal of Infection* 2023. DOI: 10.1016/j.jinf.2023.01.039.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 28.2.

Köhler N, Vasiliu A, Mandalakas AM, Martinez L, Lange C. Tuberculosis screening in migrants to the EU/EEA and UK. *European Respiratory Journal* – in press.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 24.9.

9.3. Reviews und Kommentare

Lange C, Köhler N, Günther G. Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* 2023; 388: 190. DOI: 10.1056/NEJMc2213970

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 158.5.

Brehm TT, Köhler N, Schmiedel S, Terhalle E, Martensen J, Kalsdorf B, Kandulla J, Heyckendorf J, Kuhns M, Friesen I, Lange C. Treatment of tuberculosis: what is new?.. *Innere Medizin (Heidelb)* 2023. DOI: 10.1007/s00108-023-01523-z

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2022): 0.6.

Lange C, Aarnoutse R, Chesov D, van Crevel R, Gillespie SH, Grobbel HP, Kalsdorf B, Kontsevaya I, van Laarhoven A, Nishiguchi T, Mandalakas A, Merker M, Niemann S, Köhler N, Heyckendorf J, Reimann M, Ruhwald M, Sanchez-Carballo P, Schwudke D, Waldow F, DiNardo AR. Perspective for Precision Medicine for Tuberculosis. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 566608. DOI: 10.3389/fimmu.2020.566608.eCollection 2020.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2019): 4.2.

Lange C, Alghamdi WA, Al-Shaer MH, Brighenti S, Diacon AH, DiNardo AR, Grobbel HP, Groschel MI, von Groote-Bidingmaier F, Hauptmann M, Heyckendorf J, Köhler N, Kohl TA, Merker M, Niemann S, Peloquin CA, Reimann M, Schaible UE, Schaub D, Schleusener V, Thye T, Schon T. Perspectives for personalized therapy for patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Internal Medicine* 2018. DOI: 10.1111/joim.12780.

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2017): 6.7.

Salzer HJ, Wassilew N, Köhler N, Olaru ID, Günther G, Herzmann C, Kalsdorf B, Sanchez-Carballo P, Terhalle E, Rolling T, Lange C, Heyckendorf J. Personalized Medicine for Chronic Respiratory Infectious Diseases: Tuberculosis, Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases, and Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Respiration* 2016. DOI: 10.1159/000449037

Journal Impact Factor im Vorjahr der Veröffentlichung (2015): 2.6.

10. Wissenschaftliche Vorträge im Rahmen der Dissertation

Nov. 2023	Vortrag: “Long-term self-administered i.v.-antibiotic therapy in outpatient treatment of drug-resistant TB”; Union Conference 2023, Paris; 18.11.2023
Sept. 2023	Poster: “Is today’s TDM still valid tomorrow? Assessment of the inter-occasional variability of second-line TB drugs - IOVA-TB”; DZIF Annual Meeting 2023, Hannover; 26.09.2023
Jun. 2023	Vortrag: “TB and Migration in Europe”; Tuberculosis in the Baltic region 2023, Visby, Schweden; 19.06.2023
Mai 2023	Vorträge: “Keynote Lecture: Therapeutic Drug Monitoring” und “How to give a winning presentation”; TBnet-Academy 2023, Riga, Lettland; 23.05.2023 und 24.05.2023.
Feb. 2023	Vortrag: “Precision medicine against Tuberculosis”; DANGERous Mycobacteria Meeting 2023, Borstel; 03.02.2023
Dez. 2022	Vortrag: “A new Method for the Quantification of TB Drugs in Patient-Plasma”; Borstel schafft Wissen, Borstel, 15.12.2022
Mai 2022	Vortrag: “How to give a winning presentation“; TBnet Academy 2022, Tbilisi, Georgien; 18.05.2022
Nov. 2021	Poster: “PK/PD-guided high-dose second-line therapy of patients with advanced level drug-resistant TB”; International Workshop on Pharmacology of Tuberculosis Drugs 2021, online; 11.11.2021
Sept. 2021	Vortrag: “TDM - Bedside to Bench to Bedside”; Journal Club Ben Taub Hospital Texas; 07.09.2021

- Aug. 2021 Poster: Therapeutic drug monitoring in a patient with very advanced XDR-TB"; European Respiratory Society Congress 2022, online; 22.08.2021
- Juni 2021 Poster: "Therapeutic Drug Monitoring in a patient with advanced-level XDR-TB"; Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2021; 02.06.2021
- Juni 2021 Vortrag: "Anti-TB drugs and their mode of action"; European Advanced Course on Clinical Tuberculosis, Borstel; 09.06.2021
- Feb. 2021 Vortrag: "Therapeutic Drug Monitoring in a patient with advanced-level XDR-TB"; DANGEROUS Mycobacteria Meeting 2021, Kopenhagen; 21.02.2021
- Nov. 2019 Poster: "A new therapeutic drug monitoring platform for patients with MDR-TB"; DZIF Annual Meeting 2019, Bad Nauheim; 21.11.2019
- Dez. 2018 Poster: "Therapeutic Drug Monitoring Platform for Patients with MDR-TB"; DZIF Annual Meeting 2018, Heidelberg; 03.12.2018
- Okt. 2018 Poster: "Development of a Therapeutic Drug Monitoring platform for personalized treatment of patients with M/XDR-TB"; International Workshop on Pharmacology of Tuberculosis Drugs 2018, Den Haag, Niederlande; 23.10.2018
- Nov. 2017 Vortrag: "Bacterial Pneumonia"; REACH-4-Moldova Programms des Deutschen Akademischen Austauschdienstes und der Universität zu Lübeck an der Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu, Chisinau, Moldawien; 17.11.2017
- Feb. 2017 Vortrag: "Therapeutic Drug Monitoring"; Grundlagenkurs Mykobakterien-Diagnostik Thermo Fisher, Darmstadt; 02.02.2017
- Nov. 2016 Poster: "Development of a Therapeutic Drug Monitoring platform for personalized treatment of patients with M/XDR-TB"; DZIF Annual Meeting 2016, Köln; 24.11.2016

- Nov. 2016 Vorträge: “Tuberculosis and Non-Tuberculous Mycobacteria“ und “How to give a winning presentation“; REACH-4-Moldova Programm des Deutschen Akademischen Austauschdienstes und der Universität zu Lübeck an der Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu, Chisinau, Moldawien; 09.11.2016
- Juni 2016 Vortrag: “Therapeutic Drug Monitoring“; Klinische Tuberkulose 2016, Borstel; 10.06.2016
- Mai 2016 Vortrag: “Research Priorities“; TBnet-Academy 2016, Odessa, Ukraine; 17.05.2016
- Nov. 2015 Vortrag: “Critical appraisal: Diagnosis of Childhood Tuberculosis and Host RNA Expression in Africa“; REACH-4-Moldova Programm des Deutschen Akademischen Austauschdienstes und der Universität zu Lübeck an der Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu, Chisinau, Moldawien

11. Lebenslauf

Niklas Köhler

Ausbildung

seit Jan2024	Weiterbildung Infektiologie und Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Juni 2022 – Dez. 2023	Arzt und klinischer Wissenschaftler, FG Klinische Infektiologie, Forschungszentrum Borstel – Leibniz Lungenzentrum <ul style="list-style-type: none">• Wissenschaftlicher Schwerpunkt: Therapeutic Drug Monitoring• Klinische Beratungstätigkeit: DZIF-ClinTB: TB-Informationsdienst
Jan. 2022 – Juni 2022	Medizinischer Projektkoordinator für das BMG-RoGer-TB Projekt, FG Klinische Infektiologie, Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum
Sept. 2021	Approbation als Arzt
Mai 2021	Drittes Staatsexamen (Gesamtnote: 2,0)
Mai 2020 – Mai 2021	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck: <ul style="list-style-type: none">• Abteilung für Viszeralchirurgie und chirurgische Notaufnahme, Klinik für Chirurgie, Prof. Tobias Keck• Klinik für Rheumatologie, Prof. Gabriela Riemekasten; Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Prof. Jan Rupp; internistische Notaufnahme, Dr. Sebastian Wolfrum• Pädiatrische Onkologie, -Neurologie, -Infektiologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Prof. Egbert Herting
April 2020	Zweites Staatsexamen

Okt. 2019 – Nov. 2019	Teilnahme am International Visiting Observers Program <ul style="list-style-type: none"> • Pädiatrische Infektiologie, Texas Children’s Hospital, Houston, Texas, Dr. Jeffrey R. Starke • Infektiologie bei Immunsuppression, Ben Taub Hospital, Houston, Texas, Dr. Jennifer A. Whitaker
Okt. 2015 – April 2020	Klinischer Teil des Studiums, insgesamt 5 Forschungssemester
Aug. 2014	Erstes Staatsexamen
Okt. 2012	Beginn des Medizinstudiums, Universität zu Lübeck
Sept. 2011 – Juli 2012	Freiwilliges Soziales Jahr, Krankenhaus Neu Bethlehem, Göttingen
Juni 2011	Abitur am Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen (Note: 1,0) <ul style="list-style-type: none"> • Karl-von-Frisch-Abitur-Preis durch den Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland

Projekte, Förderungen

seit März 2023	AccessTDMetrics-Projekt: Entwicklung von App-Bausteinen zur modellgestützten Vorhersage der Pharmakokinetik von Gruppe A / B Zweitlinien-Tuberkulostatika und zur Transkriptom-basierten Risikoabschätzung von Linezolid-Nebenwirkungen. Gefördert mit 70 000 € durch die Schleswig-Holsteinische Gesellschaft zur Verhütung und Bekämpfung der Tuberkulose und der Lungen-krankheiten e.V.
seit Feb. 2023	Retrospektive Analyse der Therapieergebnisse von ambulanter i.V.-Antibiotika-Therapie an der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel von 2015 bis 2021
Okt. 2017 – Okt. 2021	Forschung über den Zusammenhang von Ergebnissen genotypischer und phänotypischer Antibiotika-Resistenztestung bei der M/XDR Tuberkulose und der Erstellung von Therapie-regimen

seit Dez. 2015 IOVA-TB-Projekt (Interoccasional Variability Assessment of TB drugs, DRKS00009869): Planung, Organisation und Umsetzung einer klinischen Beobachtungsstudie am Forschungszentrum Borstel über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Zweitlinien-Tuberkulostatika. Gefördert mit 40 000 € durch die Schleswig-Holsteinische Gesellschaft zur Verhütung und Bekämpfung der Tuberkulose und der Lungenkrankheiten e.V.

Okt. 2015 – Okt.2023 Entwicklung einer HPLC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung der Blutplasmakonzentration aller essenziellen Tuberkulose Medikamente im Kontext von Therapeutic Drug Monitoring. Promotionsprojekt bei Prof. Christoph Lange, FG Klinische Infektiologie, Forschungszentrum Borstel – Leibniz Lungenzentrum

Stipendien

Okt. 2015 – Okt. 2016 MD-Stipendium des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF)

April 2014 – Dez. 2020 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Fortbildungen

März 2023 Scientific Writing: Project Proposals; Dr. Christina Schütte, ProSciencia Beratungs-GmbH; Center for Doctoral Studies Lübeck (CDSL); 23.-24.01./13.03.2023

Jan. 2023 Gute Wissenschaftliche Praxis; Sascha Vogel, Science birds, Frankfurt; Center for Doctoral Studies Lübeck (CDSL); 28.01.2023

Mai 2018 Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of anti-infective agents, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF); 03.-05.05.2018

Fremdsprachen

Französisch Diplôme d'études en langue française (DELF) B2

Weitere Interessen

März 2022 - Mai 2022 Mitbegründer von "Ukraine Couch", einer studentischen Initiative zur Vermittlung von Privatunterkünften an ukrainische Geflüchtete

Mai 2014 – Sept. 2021 Betreuung einer Greenpeace Kinder- bzw. Jugendgruppe

- Projekte zu mariner Plastikverschmutzung in Kooperation mit dem GEOMAR Institut, Kiel, dem Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Universität Hamburg und dem Museum für Natur und Umwelt, Lübeck