

# **Die Bedeutung der Plasmaproteinbindung für die Pharmakodynamik von Antibiotika**

**Dissertation**

zur

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

der

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

**Christine Fuhst**

aus

**Bremerhaven**

**Bonn 2004**

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann
  2. Referent: Prof. Dr. Dr. H. G. Trüper
- Tag der Promotion: 27.07.2004

*...meinen Eltern*

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Pharmakologie der Antibiotika.....	2
1.2 Klinische Signifikanz der Proteinbindung.....	5
1.3 Physikochemische Grundlagen, Beeinflussbarkeit und Bestimmungsmethoden der Proteinbindung.....	11
1.4 Bakterien.....	14
<i>Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae</i>	
1.5 Antibiotika.....	16
1.5.1. Wirkmechanismus und Proteinbindung der $\beta$ -Laktame.....	16
<i>Meropenem, Cefotaxim, Cefoxitin und Faropenem</i>	
1.5.2. Wirkmechanismus und Proteinbindung der Chinolone.....	18
<i>Gatifloxacin, Moxifloxacin und Trovafloxacin</i>	
1.6 Eagle Effekt.....	20
1.7 Ziel der Arbeit.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Bakterienstämme.....	22
2.1.2 Antibiotika.....	22
2.1.3 Nährmedien und Lösungen.....	23
2.1.4 Geräte und sonstige Materialien.....	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Übernachtkultur.....	24
2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	25
2.2.3 Bestimmung der Proteinbindung eines Antibiotikums mit Hilfe der MHK.....	26
2.2.4 Konzentrationsbestimmung der Antibiotika im Agardiffusionstest.....	26
2.2.5 Keimzahlbestimmung.....	27
2.2.6 Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung.....	28
2.2.7 Absterbekinetik in der Batchkultur.....	28
2.2.8 <i>In-vitro</i> Modell nach Grasso.....	30
2.2.8.1.1 Versuchsaufbau des Modells zur Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung mit Resorption 0. Ordnung und anschließender Elimination.....	31
2.2.8.1.2 Versuchsaufbau des Modells zur Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung ohne Resorption und mit anschließender Elimination.....	32
2.2.8.2 Versuchsdurchführung im <i>in-vitro</i> Modell.....	33
2.2.8.3 Pharmakokinetische Parameter für das <i>in-vitro</i> Modell.....	34
2.2.8.4 Mathematische Korrektur von Verdünnungseffekten.....	35
2.2.8.5 Simulation des Konzentrations-Zeit-Verlaufes nach Einmaldosierung bei Resorption 0. Ordnung im <i>in-vitro</i> Modell.....	36
2.2.8.6 Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung ohne Resorption und mit anschließender Elimination.....	38
2.2.8.7 Einstellung der Peristaltikpumpe.....	38
2.2.9 Versuchsauswertung.....	39
2.2.9.1 Pharmakodynamische Parameter.....	39
2.2.9.1.1 Bestimmung des AAC-Wertes.....	39
2.2.9.1.2 Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung.....	40
2.2.9.1.3 Bestimmung von EC50 und Emax.....	41
2.2.9.1.4 Modifikation des AAC-Wertes.....	42
2.2.9.2 Pharmakokinetische Parameter.....	42

2.2.9.3 Pharmakologische Indizes.....	43
<b>3. Ergebnisse</b> .....	44
3.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	44
3.2 Bestimmung der Proteinbindung der $\beta$ -Laktame mit Hilfe der MHK.....	44
3.3 Untersuchung des Wachstums in der Batchkultur.....	45
3.4 Ermittlung des methodischen Fehlers der Keimzahlbestimmung.....	47
3.5 Der Einfluss der Proteinbindung der $\beta$ -Laktame auf deren Pharmakodynamik.....	48
3.5.1 Meropenem (PB 2%)	
3.5.1.1 Einfluss der Proteinbindung von Meropenem in der Batchkultur.....	48
3.5.1.2 Einfluss der Proteinbindung von Meropenem im <i>in-vitro</i> Modell.....	50
3.5.2 Cefotaxim (PB 37%)	
3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Cefotaxim in der Batchkultur.....	53
3.5.2.2 Einfluss der Proteinbindung von Cefotaxim im <i>in-vitro</i> Modell.....	55
3.5.2 Cefoxitin (70%)	
3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Cefoxitin in der Batchkultur.....	58
3.5.2.2 Einfluss der Proteinbindung von Cefoxitin im <i>in-vitro</i> Modell.....	60
3.5.2 Faropenem (94%)	
3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Faropenem in der Batchkultur.....	62
3.5.4.2 Einfluss der Proteinbindung von Faropenem im <i>in-vitro</i> Modell.....	65
3.6 Der Einfluss der Proteinbindung der Chinolone auf deren Pharmakodynamik.....	68
3.6.1 Gatifloxacin (PB 20%)	
3.6.1.1. Einfluss der Proteinbindung von Gatifloxacin in der Batchkultur.....	68
3.6.2 Moxifloxacin (PB 37%)	
3.6.2.1. Einfluss der Proteinbindung von Moxifloxacin in der Batchkultur...	69
3.6.3 Trovafloxacin (PB 76%)	
3.6.3.1. Einfluss der Proteinbindung von Trovafloxacin in der Batchkultur..	70
3.7 Grenzkonzentration in der Batchkultur, ab der die Proteinbindung einflusslos ist.....	71
3.8 Emax und EC <sub>50</sub> in der Batchkultur.....	71
3.9 Pharmakologische Indizes und Proteinbindung.....	75
<b>4. Diskussion</b> .....	78
4.1 Pharmakologische Indizes und Proteinbindung.....	86
4.2 Ausblick.....	87
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	90
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	91
<b>7. Anhang</b> .....	99
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	99
7.2 Eingesetzte Dosierungen der Antibiotika in der Batchkultur.....	101
7.2.1 Meropenem.....	101
7.2.2 Cefotaxim.....	101
7.2.3 Cefoxitin.....	102
7.2.4 Faropenem.....	102
7.2.5 Gatifloxacin, Moxifloxacin, Trovafloxacin.....	103
7.3 Simulierte Konzentrations-Zeit-Profile der $\beta$ -Laktame im <i>in-vitro</i> Modell.....	104
7.3.1 Meropenem.....	104
7.3.2 Cefotaxim.....	104

7.3.3 Cefoxitin.....	105
7.3.4 Faropenem.....	105
7.4 Experimentell in der Batchkultur ermittelte sowie rechnerisch modifizierte AAC-Werte.....	106
7.4.1 Meropenem.....	106
7.4.2 Cefotaxim.....	107
7.4.3 Cefoxitin.....	108
7.4.4 Faropenem.....	109
7.4.5 Gatifloxacin.....	110
7.4.6 Moxifloxacin.....	110
7.4.7 Trovafloxacin.....	111
7.5 Absterbekinetiken in der Batchkultur.....	112
7.5.1 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Meropenem.....	112
7.5.2 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Cefotaxim.....	113
7.5.3 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Cefoxitin.....	114
7.5.4 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Faropenem.....	115
7.5.5 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Gatifloxacin.....	116
7.5.6 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Moxifloxacin.....	116
7.5.7 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Trovafloxacin.....	117
7.6 Veröffentlichungen.....	118

## 1. Einleitung

Bis Mitte des 20. Jahrhunderts waren Infektionskrankheiten noch die Haupttodesursache in der Bevölkerung. Mit Entwicklung der Antibiotika begann ein unvergleichbarer Siegeszug in der Geschichte der Medizin und heute sind diese Substanzen aus unserem Leben nicht mehr wegzudenken. In der Vergangenheit erfolgte bei der Therapie von Infektionskrankheiten die Dosierung des Antibiotikums empirisch. Heute hingegen wird die Dosierung aufgrund der Kenntnisse über die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften des Antibiotikums bestimmt. Diesbezüglich sind jedoch viele Fragen ungeklärt, so dass es häufig zu fehlerhaften Dosierungen kommt. Mögliche Folgen sind eine Verlängerung der Therapiedauer und Therapieversagen, damit verbunden ein vermehrtes Auftreten von Nebenwirkungen sowie Resistenzentwicklungen. Diese negativen Auswirkungen einer Antibiotikatherapie können durch gezielteren Einsatz von Antibiotika verringert werden. Voraussetzung hierfür ist eine bessere Kenntnis der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften des jeweiligen Antibiotikums. Maßgeblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik eines Antibiotikums hat dessen Bindung an Plasmaproteine, durch die sich die Pharmakologie gravierend verändern kann. Bei diesem seit Einführung der Antibiotika in den 40er Jahren viel diskutiertem Thema ist die klinische Signifikanz allerdings bislang nicht abschließend und einvernehmend geklärt (Davis, 1942a, Davis, 1942b, Tompsett *et al.*, 1947, Goldstein, 1949). Heute wird überwiegend davon ausgegangen, dass nur der ungebundene, frei vorliegende Teil des Antibiotikums für die Wirkung verantwortlich sei (Liu *et al.*, 2002a, Theuretzbacher, 2003, Cars, 2001, Drusano, 2004). Eine hohe Proteinbindung eines Antibiotikums führe infolgedessen zu einer verminderten antibakteriellen Aktivität. Nach Wise und Kunin beeinflusst die Proteinbindung die Wirkung eines Antibiotikums erst dann, wenn die prozentuale Bindung an Proteine 80% überschreitet (Kunin *et al.*, 1973, Wise, 1985), nach Rolinson ist die Proteinbindung nur unterhalb einer Antibiotikumkonzentration von 100 µg/mL von Bedeutung (Rolinson, 1980). Diese diskutierten Punkte sind durch experimentelle Daten allerdings nur unzureichend belegt und basieren teilweise sogar nur auf theoretischen Überlegungen der Wissenschaftler.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die aktuellen Theorien zu der Frage des Einflusses der Plasmaproteinbindung auf die Wirkung von Antibiotika experimentell *in-vitro* überprüft werden.

### 1.1 Pharmakologie der Antibiotika

Die Pharmakologie untersucht die Wechselwirkung zwischen körperfremden Stoffen und Organismen (Forth *et al.*, 1998). Im engeren Sinne ist die Pharmakologie die Lehre von den Wechselwirkungen der Arzneimittel mit gesunden oder kranken Organismen.

Die Wirkung eines Antibiotikums ist eine Abfolge zahlreicher, meist sehr komplexer Vorgänge im Organismus, denen eine Reaktionskette zugrunde liegt, die in zwei Phasen unterteilt werden kann: die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik (Craig, 1995).

#### Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschreibt den Konzentrations-Zeit-Verlauf eines Antibiotikums im Organismus und kann mit Hilfe des sogenannten LADME Modells dargestellt werden (Jaehde *et al.*, 2003). Dieses unterteilt das Plasmakonzentrations-Zeit-Profil eines Antibiotikums in die Phase der **L**iberation aus der Darreichungsform, der **A**bsorption, der **D**istribution, der **M**etabolisierung und der **E**limination.

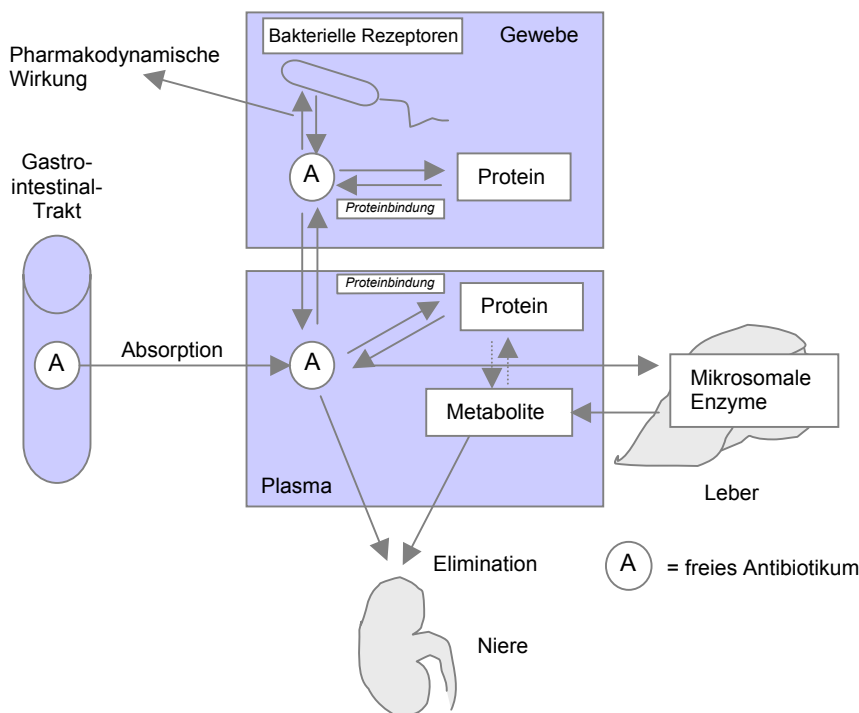


Abb. 1.1: Im Körper ablaufende pharmakokinetische und pharmakodynamische Prozesse (modifiziert nach Jaehde, 2004)

Viele endogene und exogene Faktoren üben Einfluss auf die Pharmakokinetik eines Antibiotikums aus. Zu den endogenen Faktoren zählt die Proteinbindung eines Antibiotikums an Plasmaproteine. Man unterscheidet zwischen Antibiotika mit hoher (>80%) mittlerer (50-80%) und niedriger Proteinbindung (<50%) (Bergogne-Bérézin, 2002). Die Abbildung 1.1 zeigt, welche pharmakokinetischen Prozesse die Proteinbindung beeinflusst. Sie kann maßgeblich zu



Veränderungen der Parameter Verteilung (sowohl im Plasma als auch im Gewebe), Metabolisierung und Elimination führen, und Einfluss auf die Clearance oder die Halbwertszeit einer Substanz haben. Durch die Größe des Proteins kann der gebundene Anteil eines Antibiotikums nicht aus dem Blut in die umliegenden Gewebe diffundieren. Dies bedingt, dass nur die freie Konzentration an die eigentlichen Wirkorte gelangt und damit wirksam ist. Andererseits stellt die gebundene Form eine Speicherform dar, aus der bei abnehmender Konzentration der freien Form (z.B. durch Metabolisierung oder Elimination) zur Wiederherstellung des Gleichgewichts Antibiotikummoleküle freigesetzt werden (Mutschler *et al.*, 2001). Der gebundene Anteil unterliegt in der Regel nicht der Metabolisierung und der Elimination. Bei der renalen Elimination wird die glomeruläre Filtration eines Antibiotikums durch die Bindung an Proteine verhindert, nur die freie Fraktion wird filtriert. Im Gegensatz dazu scheint Proteinbindung auf die tubuläre Sekretion keinen Einfluss auszuüben. Wie die Proteinbindung auf die hepatische-biliäre Elimination eines Antibiotikums einwirkt, ist nicht geklärt (Barza, 1981). Abhängig von der Eliminationsart des Antibiotikums verändert sich dementsprechend dessen Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ). Die Proteinbindung hat demnach nicht unbedingt Einfluss auf die Halbwertszeit. Bei Untersuchungen mit Chinolonen konnte gezeigt werden, dass es nicht zwangsläufig zu einer Verlängerung der Halbwertszeit aufgrund einer hohen Proteinbindung kommt. Im Gegensatz dazu korreliert bei  $\beta$ -Laktamen eine verlängerte Halbwertszeit gut mit einer erhöhten Proteinbindung (Bergogne-Bérézin, 2002).

Pharmakokinetische Parameter werden aus dem Plasmakonzentrations-Zeit-Profil des Antibiotikums ermittelt. Der Parameter AUC (**area-under-the-curve**) ist das Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 Stunden und stellt ein Maß für die im Körper vorliegende Substanzmenge dar. Der des weiteren häufig verwendeter Parameter  $C_{\max}$  ist die höchste Konzentration, die im Referenzkompartiment, üblicherweise im Blutserum, während des Applikationsintervalls erreicht wird (Mouton *et al.*, 2002). Bei Untersuchungen zum Einfluss der Proteinbindung auf die Kinetik und die Dynamik eines Antibiotikums wird häufig der Anteil der freien AUC und des freien  $C_{\max}$  berechnet und mit dem antibakteriellen Effekt korreliert (Tawara *et al.*, 1992a).

### *Pharmakodynamik*

Die Pharmakodynamik beschreibt die antibakterielle Wirkung des Antibiotikums. Im Gegensatz zu anderen Arzneimitteln, die an zelluläre Zielstrukturen des Wirtsorganismus binden, ist die Wirkung eines Antibiotikums von der Wechselwirkung zwischen Antibiotikum mit dem

bakteriellen Rezeptor und den daraus resultierenden Effekten abhängig (Wiedemann *et al.*, 1990).

Zu den für die Antibiotika wichtigen pharmakodynamischen Kenngrößen gehören vor allem die MHK (**minimale Hemmkonzentration**) und der AAC-Wert (**area-above-the-curve-Wert**), aber auch weitere Parameter wie beispielsweise der Rmax-Wert (Wert für die **maximale** Keimzahlreduktion) oder der Emax-Wert (Wert für den **maximal** erreichbaren antibakteriellen Effekt, vgl. 1.6).

Der am häufigsten zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung eines Antibiotikums herangezogene Parameter ist die MHK. Sie ist die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die ein sichtbares Wachstum eines Bakterienstammes verhindert. Die Bestimmung der MHK erfolgt nach einer 18-24stündigen Inkubationszeit bei 37°C und einem Inokulum von  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  KBE/mL (koloniebildende Einheiten/mL) (Deutsches Institut für Normung e.V. 2000, 2000). Demnach handelt es sich bei der MHK um eine Endpunktsbestimmung, die keine Aussage über das antibakterielle Geschehen während der 18-24stündigen Inkubationsphase zulässt. Bei gleicher MHK kann aber die Wirkung innerhalb einer Substanzklasse sehr unterschiedlich sein. Beispielsweise zeigt Erythromycin eine bakterio-statische und Telithromycin eine bakterizide Wirkung. Somit kann die MHK keine Auskunft über den Wirkungstyp einer Substanz geben (Wiedemann *et al.*, 2003).

Demgegenüber liefert die Analyse von Absterbekinetiken eine genauere Aussage über die antibakterielle Wirkung eines Antibiotikums. Hierbei wird die antibakterielle Wirkung eines Antibiotikums in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Dies kann zum einen bei konstanten Antibiotikumkonzentrationen in der „Batchkultur“ als auch bei sich definiert periodisch verändernden Konzentrationen im „pharmakologischen *in-vitro* Modell“ erfolgen (vgl. 2.2.7 und 2.2.8). Pharmakologische *in-vitro* Modelle ermöglichen die Simulation der humanen Pharmakokinetik bei gleichzeitiger Bestimmung des Absterbeverhaltens der Bakterien.

Bei der Analyse von Absterbekinetiken bedient man sich pharmakodynamischer Parameter, wie des Rmax-Wertes oder des AAC-Wertes. Der Rmax-Wert beschreibt die maximale Keimzahlreduktion, die zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des gemessenen Zeitraumes auftritt. Demgegenüber stellt der AAC-Wert ein relatives Maß für die Anzahl der abgestorbenen Bakterien während des gesamten Zeitraumes dar (Rustige *et al.*, 1990). Dazu wird das Integral oberhalb der Absterbekinetik berechnet. Flächen, die über der Inokulumlinie liegen, werden als negativ bewertet, da in diesem Fall die Bakterien anwachsen. Positive Werte deuten auf eine Abtötung der Bakterien hin (vgl. 2.2.9.1.1).

Mit Hilfe der Parameter AAC und Rmax ist die Interpretation der Absterbekinetiken aus der Batchkultur und dem *in-vitro* Modell in der Weise möglich, dass das Ergebnis dieses umfangreichen Versuchs auf einen objektiven Wert reduziert werden kann.

### *Pharmakologie*

Mit Hilfe sogenannter **pharmakologischer Indizes** wird versucht, den Heilungserfolg einer Therapie vorherzusagen. Ein für den jeweiligen Index festgelegter Grenzwert soll dem Therapeuten einen Anhaltspunkt darüber geben, ob eine Therapie unter den von ihm gewählten Bedingungen voraussichtlich einen Heilungserfolg bringen wird (Barger *et al.*, 2003).

Pharmakologische Indizes stellen eine Kombination aus einem pharmakokinetischen Parameter, wie beispielsweise  $C_{\max}$  oder AUC, und einem pharmakodynamischen Parameter, der fast immer die MHK ist, dar. Häufig benutzte pharmakologische Indizes sind für zeitabhängig wirkende Antibiotika, wie die  $\beta$ -Laktame, der Index  $T_{>MHK}$  (Mouton *et al.*, 2001) und für konzentrationsabhängig wirkende Antibiotika, wie die Chinolone, die Indizes  $C_{\max}/MHK$  oder  $AUC/MHK$  (Preston *et al.*, 1998, Drusano *et al.*, 1993, Craig *et al.*, 1991). Pharmakologische Indizes werden kontrovers diskutiert (Barger *et al.*, 2003). Dies nicht zuletzt auch wegen des Faktors Plasmaproteinbindung. So fordert die ISAP (International Society for Anti-infective Pharmacology) für die Berechnung der pharmakologischen Indizes die Proteinbindung eines Antibiotikums in der Weise mit einzubeziehen, dass bei der Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter lediglich der Anteil des Antibiotikums zu berücksichtigen ist, der frei im Plasma vorliegt (Mouton *et al.*, 2002).

### 1.2 Klinische Signifikanz der Proteinbindung

Seit Einführung der Antibiotika in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts ist kaum ein Thema so intensiv und kontrovers diskutiert worden wie die Proteinbindung. Als pharmakokinetischer Parameter hat sie unstreitig Einfluss auf die Verteilung, Metabolisierung und Elimination einer Substanz. Die damit direkt zusammenhängenden Auswirkungen auf die Pharmakodynamik bleiben allerdings häufig unklar.

Von Bedeutung ist die Plasmaproteinbindung vor allem wegen ihrer Auswirkungen auf die Fähigkeit des Antibiotikums zur Gewebepenetration. Der Ort der bakteriellen Infektion ist in den seltensten Fällen das Plasma. Nur „freies, nicht gebundenes Antibiotikum“ ist in der Lage, durch die Poren der vasalen Membranen in die peripheren Kompartimente zu diffundieren oder aktiv transportiert zu werden (Barza *et al.*, 1985). Nur so kann es an den Ort der Infektion vordringen,

um dort mit den bakteriellen Rezeptoren zu interagieren, und damit eine Heilung zu ermöglichen. Sowohl im Plasma, als auch im Gewebe und der menschlichen Zelle kommt es zu Proteinbindungen jeglicher Art (Abb. 1.2) (Cars, 1990). Diese Bindungen sind reversibel und stehen in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander. Welche Auswirkungen diese Bindungen nun auf die Pharmakodynamik des Antibiotikums haben, ist bislang im Einzelnen ungeklärt.

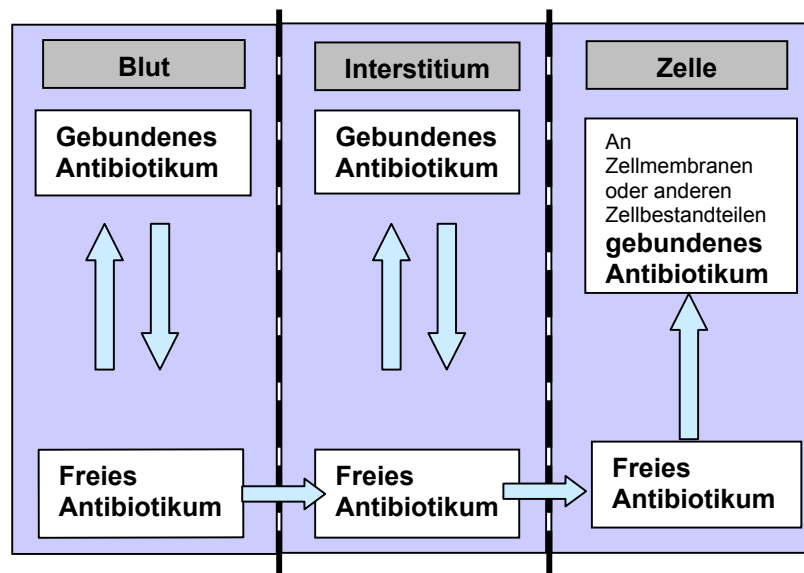


Abb 1.2: Gewebepenetration des freien, ungebundenen Antibiotikums vom Blut in die Zelle (nach Cars, 1990)

Im Folgenden sollen drei in der Literatur weit verbreitete Annahmen und Theorien zur Auswirkung der Proteinbindung auf die Wirkung eines Antibiotikums vorgestellt werden. Diese sollen in dieser Arbeit *in-vitro* experimentell überprüft werden.

1.) „Nur der frei vorliegende Anteil eines Antibiotikums ist antibakteriell aktiv, der gebundene hingegen inaktiv“

Eine in der Literatur fest verankerte und unbestrittene Annahme ist, dass nur frei vorliegendes Antibiotikum mit den bakteriellen Rezeptoren wechselwirken kann und so antibakteriell aktiv ist. Häufig wird daraus allerdings rückgeschlossen, dass der gebundene Anteil keinen Einfluss auf die Wirkung habe. Allerdings ist vorstellbar, dass durch den in Millisekunden vonstatten gehenden Austausch im dynamischen Gleichgewicht zwischen gebundener und ungebundener Form auch aus den Proteinbindungen freiwerdendes Antibiotikum antibakteriell wirksam wird. Sobald nämlich frei vorliegendes Antibiotikum durch Reaktion mit den Bakterien dem Gleichgewicht entzogen wird, diffundiert „gebundenes Antibiotikum“ aus den Proteinbindungen heraus und wird so wieder zum „freien“, also wirksamen, Antibiotikum. Das zunächst

gebundene Antibiotikum hat demnach möglicherweise eine Depotfunktion und letztlich doch Einfluss auf die antibakterielle Wirkung.

Der am häufigsten zitierte „Beweis“ für die Annahme, dass nur der freie Anteil des Antibiotikums wirksam sei, sind die Untersuchungen von Kunin *et al.*, welche einen Zusammenhang zwischen Proteinbindung und dem pharmakodynamischen Parameter MHK herstellten. Diese Autoren ermittelten die minimale Hemmkonzentration von Penicillinen mit ansteigender Proteinbindung gegenüber *Staphylococcus aureus* in Nährbouillon und in Serum und stellten fest, dass mit zunehmender Proteinbindung in Gegenwart der Serumproteine höhere Konzentrationen des Penicillins zum Abtöten der Bakterien nötig sind. Der Wirkungsverlust, der durch den Zusatz des Serumproteins stattfindet, ist direkt vom Ausmaß der Proteinbindung abhängig. Daraus schlossen sie, dass nur die ungebundene, zu berechnende Fraktion wirksam sei (Kunin *et al.*, 1973). Diese Methode wird seit Kunins durchschlagendem Erfolg Anfang der 70er Jahre fortwährend in Untersuchungen angewandt und gilt in der Antibiotikatherapie heute als *der* experimentelle Beweis dafür, dass nur der freie, berechnete Anteil des Antibiotikums für dessen antibakterielle Wirkung verantwortlich sei (Lee *et al.*, 1991, Nath *et al.*, 1994, Scaglione *et al.*, 1998). Außer Acht gelassen werden hier jedoch die unter 1.1 genannten Kritikpunkte an der MHK als Endpunktbestimmung. Unklar bleibt damit der Einfluss der Proteinbindung innerhalb der therapeutisch wichtigen initialen Abtötungsphase des Antibiotikums. Des Weiteren ist bei dieser Methode ungewiss, ob tatsächlich auch in Bereichen unter- bzw. oberhalb der MHK durch Proteinbindung Einflüsse auf die Wirkung zu erwarten sind. Die bei statischen Konzentrationen durchgeführte Untersuchung lässt zudem keine Aussagen über den Einfluss der Proteinbindung bei dem im menschlichen Körper sich periodisch verändernden Konzentrationen zu. Außerdem lassen sich keine Rückschlüsse auf die Wirkung der bei Standarddosierungen oftmals viel höher als die MHK liegenden Konzentrationen ziehen.

Den „*in-vivo* Beweis“ für die Befürworter der These, dass nur frei vorliegendes Antibiotikum antibakteriell aktiv ist, lieferten Merrikin *et al.* in einer 1983 publizierten Studie. Dabei untersuchten sie die Auswirkung der Proteinbindung von sieben Isoxazolympenicillinen mit ähnlicher Pharmakodynamik, ähnlicher Pharmakokinetik aber *unterschiedlicher* Proteinbindung (36-98%) auf eine mit *Staphylococcus aureus* infizierte Mäusepopulation. Sie stellten fest, dass die therapeutische Aktivität in Form des CD50-Wertes (die „kurative Dosis“, bei der 50% der Versuchstiere überlebten) direkt abhängig vom Ausmaß der Proteinbindung im Mäuseserum war. Je höher die Proteinbindung des Antibiotikums, desto höher musste also die Dosis gewählt werden, damit ein Heilungserfolg eintreten konnte (Merrikin *et al.*, 1983). Kritisch anzumerken

bei dieser Studie ist, dass die „ähnliche Pharmakodynamik“ der Penicillinderivate darin bestand, dass sie gegenüber *Staphylococcus aureus in-vitro* die gleiche MHK aufwiesen. Daraus schloss Merrikin, dass, wenn die Aktivität eines Antibiotikums im Vergleich zu einem anderen mit gleicher *in-vitro* MHK *in-vivo* niedriger sein sollte, dies allein auf eine höhere Proteinbindung zurückzuführen sei. Eine gleiche Aktivität *in-vitro* muss allerdings nicht gleichbedeutend mit einer gleichen Aktivität *in-vivo* sein. Zudem bedeutet gleiche MHK nicht zwangsläufig auch gleiche pharmakodynamische Potenz. Wie unter 1.1 bereits angemerkt, kann auch innerhalb einer Substanzklasse bei gleicher MHK die Wirkintensität anders ausfallen. Darüber hinaus trifft die in dieser Studie gemachte Annahme der „gleichen Pharmakokinetik“ nur bedingt zu. Ausgegangen von einer Dosis von 10 mg/kg wurden die AUC und  $C_{\max}$ -Werte ermittelt, die in dieser Studie teilweise um mehr als das Doppelte differierten. So ist fraglich, ob hier direkt der Schluss gezogen werden kann, dass nur das frei vorliegende Antibiotikum antibakteriell aktiv ist.

Mit der Mikrodialyse ist in jüngster Zeit eine Analytik entwickelt worden, die es ermöglicht, im Gegensatz zur herkömmlichen Bestimmung der Antibiotikumkonzentration im Plasma, den Anteil des *ungebundenen* Antibiotikums am Ort der Infektion, nämlich im Gewebe, bestimmen zu können (Muller, 2002). Hierzu wird eine Sonde in das zu untersuchende Gewebe gebracht. An der Spitze der Sonde befindet sich eine semipermeable Membran. Die Sonde wird kontinuierlich mit einer physiologischen Spülflüssigkeit mit bestimmten Flussrate durchspült. Nur der frei vorliegende Arzneistoff des extrazellulären Raumes des Gewebes kann die Membran durchdringen und wird mit der physiologischen Spüllösung abtransportiert. Außerhalb des Körpers wird dann mit analytischen Messmethoden die Arzneistoffkonzentration bestimmt (Müller *et al.*, 1998). Die Mikrodialyse als „schonende“ Methode löst andere, lange Zeit verwendete, häufig sehr invasive Methoden zur Untersuchung der Penetration von Antibiotika ab (beispielsweise „blister fluid“- oder „tissue cage fluid“-Untersuchungen, sowie Konzentrationsbestimmungen in homogenisiertem Gewebe (Cars, 2001)). Klinische Studien zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Cefpodoxim und Cefixim konnten zeigen, dass die Konzentrationen, die mit Hilfe der Mikrodialyse im Gewebe gemessen wurden, größtenteils mit dem prozentual berechneten frei vorliegenden Anteil des Antibiotikums im Plasma übereinstimmten (Liu *et al.*, 2002b). Dieses Ergebnis wird auch als Bestätigung dafür gewertet, dass nur der freie Anteil aktiv ist. Dieser Rückschluss geht allerdings einen Schritt zu weit: Bei der Mikrodialyse handelt es sich um eine Methode, die zur Bestimmung der Pharmakokinetik herangezogen wird. Aussagen über die Pharmakodynamik einer Substanz können damit nicht getroffen werden. Auch im

Gewebe gebundenes Antibiotikum könnte nämlich nach Freisetzung aus seinen Proteinbindungen zu einer Erhöhung der Wirkintensität führen.

Wise entwickelte 1985 ein theoretisches Modell, mit dem er die Auswirkung der Proteinbindung zu beschreiben versuchte. Ein Antibiotikum mit einer Bindung von 50% ist nach Wise nur halb so aktiv, wie ein Antibiotikum, welches zu 0% bindet. Die Aktivität eines zu 75% gebundenen Antibiotikums beträgt gegenüber dem gar nicht bindenden Antibiotikum nur noch ein Viertel. Bei einem zu 97% gebundenen Antibiotikum beträgt die Aktivität bei Fortführung dieses Rechenexempels nur noch  $1/32$  der Aktivität eines ungebundenen Antibiotikums (Abb. 1.3) (Wise, 1985). Diesen von Wise gemachten Überlegungen fehlen die experimentellen Grundlagen. Es ist höchst fraglich, ob sich der Einfluss der Proteinbindung mittels einer dermaßen simplen Formel darstellen lässt.

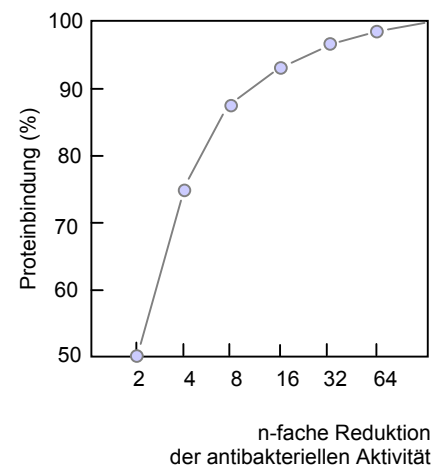


Abb. 1.3: Die Proteinbindung eines Antibiotikums verglichen mit dessen in-vitro Aktivität (nach Wise).

2.) „Proteinbindung beeinflusst erst ab einer Bindung von über 80% die Wirkung eines Antibiotikums“

Kunin *et al.* behaupten, dass ab einer Proteinbindung von über 80% bereits *kleine* Änderungen in der Bindung großen Einfluss auf den Anteil des frei vorliegenden Antibiotikums haben (Kunin *et al.*, 1973). Zum Beispiel würde eine Reduktion der Bindung von 98 auf 96% eine *Verdoppelung* der freien Fraktion von 2 auf 4% bedeuten, während bei einer 60%igen Bindung ( $\equiv$  40% freie Fraktion) eine Reduktion auf 20% ( $\equiv$  80% freie Fraktion) nötig wäre, um die freie Fraktion zu verdoppeln (Craig *et al.*, 1976). Zudem sei ab einer 80%igen Bindung mit einer verminderten Gewebepenetration zu rechnen (Wise, 1985). Hierbei handelt es sich jedoch um rein theoretische Überlegungen. Als „Beweis“ für die Richtigkeit dieser Annahme wird teilweise eine Studie von Craig *et al.* angesehen, in der festgestellt werden konnte, dass sowohl die AUC der freien als auch der gesamten Konzentration von verschiedenen gebundenen Antibiotika nach Penetration in die Flüssigkeit künstlich erzeugter „Hautblasen“ („Blister Fluids“) mit zunehmender Proteinbindung abnahm, und dies besonders stark ab einer Bindung von 80% (Craig *et al.*, 1984). Diese rein pharmakokinetische Untersuchung lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Pharmakodynamik einer Substanz zu.

3.) „Oberhalb einer Antibiotikumkonzentration von 100 µg/mL ist die Proteinbindung vernachlässigbar“

Rolinson ist der Meinung, dass bei stetiger Erhöhung der Konzentration eines Antibiotikums ab einer bestimmten Grenzkonzentration, bei der alle Bindestellen des Albuminmoleküls (vgl. Abschnitt 1.3) gesättigt sind, es zu einer schlagartigen Erhöhung der frei vorliegenden Substanz kommt, ab der dann die Proteinbindung einflusslos wird (Rolinson, 1980). Ausgehend von der Annahme, dass ein Molekül Antibiotikum an ein Molekül Albumin bindet, berechnete er für Penicilline eine derartige Grenzkonzentration von 200 µg/mL. Durch Anwesenheit verdrängender Substanzen (vgl. Abschnitt 1.3., Einflüsse auf die Proteinbindung) könne diese Grenzkonzentration allerdings noch auf 100 µg/mL reduziert werden. Experimentelle Untersuchungen mit den Antibiotika Dicloxacillin, Trimethoprim und Cephalothin bestätigen dieses Ergebnis (Craig *et al.*, 1986). Basierend auf der oben dargestellten Theorie kann diese genannte Konzentration allerdings aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Antibiotika (bspw. Teicoplanin mit ca. 1900 g/mol und Fosfomycin mit ca. 260 g/mol) nicht für jedes Antibiotikum gleich sein. Es ist daher möglich, dass bei Antibiotika mit niedrigem Molekulargewicht bereits schon bei viel niedrigeren Konzentrationen alle Proteinbindestellen besetzt sind und die Proteinbindung ab dieser Konzentration einflusslos ist. Zudem ist es theoretisch möglich, dass mehr als nur ein Molekül Antibiotikum an ein Albuminmolekül bindet (vgl. Abschnitt 1.3)

Wie oben dargelegt, sind die Auswirkungen der Plasmaproteinbindung auf die Wirkung von Antibiotika bis heute nicht grundlegend geklärt. Die vorgestellten theoretischen Überlegungen und Studien zum Einfluss der Proteinbindung weisen zum Teil Mängel und vorschnelle Schlüsse auf, es bedarf daher einer Klärung dieser Theorien durch systematische experimentelle Untersuchungen.

Demnach stellt sich die Frage, ob tatsächlich nur das „frei vorliegende“ Antibiotikum an der Wirkung beteiligt ist oder ob „frei werdendes“ Antibiotikum aus den Proteinbindungen zu einer Erhöhung der Wirkintensität führt. Darüber hinaus ist unklar, ob auch bei Proteinbindungen unterhalb 80% bereits Einflüsse auf die Wirkung zu erwarten sind. Auch ist es möglich, dass nicht erst ab einer Antibiotikumkonzentration von >100 µg/ mL die Proteinbindung keinen Einfluss mehr auf die Wirkung des Antibiotikums hat. Diese drei Überlegungen sollen in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig untersucht werden.

Um zu klären, ob tatsächlich nur frei vorliegendes Antibiotikum antibakteriell aktiv ist, soll in dieser Arbeit verglichen werden, ob der prozentuale Anteil des Antibiotikums, der frei vorliegt,



ebenso wirksam ist wie die Gesamtdosis, die mit einer physiologischen Konzentration an Albumin versetzt wurde. Dies bedeutet, dass bei einem zu 70% an Albumin bindenden Antibiotikum untersucht wird, ob der freie, berechnete Anteil (30%), genauso wirksam ist wie die Gesamtdosis des Antibiotikums mit Zusatz von Albumin.

Durch Vergleich des antibakteriellen Effektes von prozentual unterschiedlich gebundenen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Chinolon-Antibiotika mit Proteinbindungen im Bereich unter 80% sowie über 80% in Gegenwart von Human Albumin und ohne Zusatz von Human Albumin soll die Frage geklärt werden, ob auch unterhalb einer Proteinbindung von 80% bereits mit Änderungen in der Wirkung zu rechnen ist.

Außerdem soll ermittelt werden, ab welcher Konzentration die Proteinbindung nicht mehr zu einer Wirkungserniedrigung des entsprechenden Antibiotikums führt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit werden in der Batchkultur und im pharmakologischen *in-vitro* Modell durchgeführt. *In-vitro* Studien bieten dabei den Vorteil, dass sie im Vergleich zu Tiermodellen oder klinischen Studien reproduzierbare Ergebnisse unabhängig vom Immunsystem, dem Infektionsgeschehen des Einzelnen oder den individuellen Schwankungen im Proteinhaushalt von Tieren und Menschen liefern. Darüber hinaus wird Human Albumin anstelle des sonst oft verwendeten Rinder- oder Kaninchen Albumins verwendet. Antibiotika binden an nichthumanes Albumin häufig völlig anders. So beträgt die Bindung von Cefotaxim im Mittel an Human Albumin ca. 37%, an Rinder- und Kaninchen Albumin jedoch 63% bzw. 93% (Gerding *et al.*, 1982, Peterson *et al.*, 1984). Zudem wird auf den Einsatz kompletten Human Serums verzichtet. Es wird das daraus isolierte Albumin verwendet, da Serum „natürlich bakterizid“ ist und aufgrund des sogenannten „Komplementsystems“ bestimmte Keime unabhängig von einer Antibiotikumanwesenheit abtötet (Kayser *et al.*, 1998).

### 1.3 Physikochemische Grundlagen, Beeinflussbarkeit und Bestimmungsmethoden der Proteinbindung

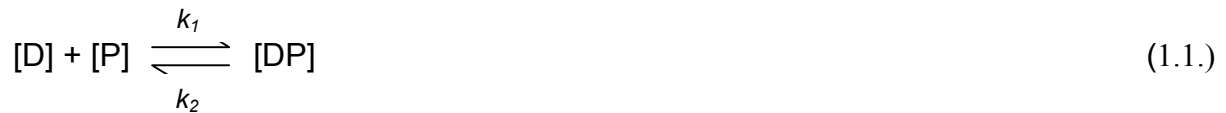
Im nachfolgenden Abschnitt werden die physiko-chemischen Grundlagen der Plasmaproteine und der Proteinbindung dargelegt, sowie die Beeinflussbarkeit der Bindung durch exogene und endogene Faktoren beschrieben. Darüber hinaus werden die unterschiedlichen Methoden für die Bestimmung der Proteinbindung und deren Varianz vorgestellt. Kenntnisse über diese Gebiete vermitteln ein Verständnis über die Komplexität der Proteinbindung und sind für die Interpretation der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unerlässlich.

Aus funktioneller Sicht betrachtet stellt Blut „flüssiges Körpergewebe“ dar. Es dient vor allem als Transportmittel innerhalb des Organismus und setzt sich aus Zellen und aus einer Flüssigkeit, dem Blutplasma, zusammen. Das Blutplasma ist der extrazelluläre Anteil des Blutes. Es enthält pro Liter 65-80 g Proteine. (Thews *et al.*, 1999). Die im Plasma gelösten Proteine lassen sich mittels Elektrophorese in eine Albumin, eine  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -, eine  $\gamma$ - Globulin und eine Fibrinogenfraktion auftrennen (Mutschler *et al.*, 2001). Albumin ist mit einem Anteil von ungefähr 56% das Protein mit dem quantitativ größten Anteil im Plasma. Es wird in der Leber synthetisiert, ist ein globuläres (MG ca. 66000 Da), gut wasserlösliches Protein mit einem hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren. Es ist von physiologischer Bedeutung zur Regelung des intravasalen Druckes und als Transportprotein für wasserunlösliche körpereigene Stoffe (bspw. Bilirubin, freie Fettsäuren) (Pschyrembel, 1998). Albumin spielt bei der Bindung von Antibiotika die größte Rolle (Craig *et al.*, 1978b), obwohl es auch zwischen anderen Proteinen und Antibiotika zu Bindungen kommen kann. So bindet Erythromycin beispielsweise an  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Globuline und Rifampicin an  $\gamma$ - Globuline und Fibrinogen (Peterson *et al.*, 1977, Boman *et al.*, 1974).

Die Proteinbindung ist eine schnelle (innerhalb von 20 msec) und reversible Wechselwirkung eines Antibiotikums mit Albumin (Wise, 1986). Die Bindung des kleinen Antibiotikumoleküls im Verhältnis zum Makromolekül Albumin kommt hauptsächlich durch vier Bindungsarten zustande: Ionische Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen spielen hierbei die wichtigste, hydrophile- (Wasserstoffbrückenbindungen) und van-der-Waals-Wechselwirkungen eine untergeordnetere Rolle. Im Albuminmolekül des Menschen sind mehrere Bindestellen nachgewiesen worden, so konnten Nerli *et al.* in einer Studie herausfinden, dass Cephalosporine neben Interaktion mit den sogenannten Bindungsstellen I und II zusätzlich mit der Bilirubin- und der Bindestelle für freie Fettsäuren interagieren können (Nerli *et al.*, 1997b). Darüber hinaus hat Albumin viele potentielle Bindungsstellen ionischer Art: bei einem pH von 7,4 liegen im Molekül ca. 100 saure und 86 basische Gruppen vor (Joos *et al.*, 1969). Aliphatische und aromatische unpolare Reste des Albuminmoleküls können mit Antibiotika hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Da 56% des Albuminmoleküls aus hydrophoben Resten bestehen, besteht eine enge Korrelation zwischen der Lipophile eines Antibiotikums und der Bindungswahrscheinlichkeit (Bird *et al.*, 1967). Für Chinolone konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht hergestellt werden (Zlotos *et al.*, 1998). Viele Untersuchungen sind durchgeführt worden, die einen Zusammenhang zwischen spezifischen Molekülstrukturen und starker bzw. schwacher Albuminbindung herstellen konnten (Nerli *et al.*, 1995, Nerli *et al.*, 1997a, Briand *et al.*, 1982, Tawara *et al.*, 1992b). Doch Antibiotika binden nicht nur an Albumin, auch nach

Verteilung aus den intravasalen Kompartiment heraus kommt es beispielsweise zu Bindungen an Proteine der interstitiellen Flüssigkeiten, an Zellmembranen, an lösliche intrazelluläre Proteine und an andere intrazelluläre Bestandteile.

Die Bindung eines Antibiotikums an Proteine gehorcht dem Massenwirkungsgesetz (Derendorf *et al.*, 2002):



wobei [D], [P] und [DP] die molaren Konzentrationen des freien Antibiotikums, des freien Proteins und des Antibiotikum-Protein-Komplexes sind.  $k_1$  und  $k_2$  sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation bzw. Dissoziation. Die Affinität eines Antibiotikums an Plasmaproteine kann daher folgendermaßen ausgedrückt werden (Craig *et al.*, 1986):

$$\frac{[DP]}{[D][P]} = \frac{k_1}{k_2} = k_a \quad (1.2.)$$

Je höher die Affinität eines Antibiotikums an Plasmaproteine ist, desto größer ist die Konstante  $k_a$ . Dies besagt, dass zwei Substanzen gleicher prozentualer Bindung unterschiedlich „fest“ an Plasmaproteine binden (Bergogne-Bérézin, 2002).

Die Proteinbindung kann von vielen äußeren Faktoren beeinflusst werden. Die Konzentration des Antibiotikums spielt hierbei eine große Rolle. Bei Konzentrationen unter 100 µg/mL liegt laut Craig und Rolinson ein Überschuss an Bindungsstellen des Albuminmoleküls gegenüber dem Antibiotikum vor (Craig *et al.*, 1977, Rolinson, 1980). Der Prozentsatz der Proteinbindung bleibt in diesem Bereich stabil. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer Absättigung der Bindungsstellen im Molekül, das Ausmaß der Bindung verringert sich (Rolinson *et al.*, 1965) (vgl. Abschnitt 1.2.). Andererseits kann es bei einer durch Krankheit (bspw. Urämie) stark verringerten Serumkonzentration (< 20 g/L) zu einer Reduktion des prozentualen Ausmaßes der Bindung kommen (Lichtenwalner *et al.*, 1982, Craig *et al.*, 1978a). Doch auch pH-Wert, Temperatur und die Gegenwart von divalenten Kationen können die Proteinbindung eines Antibiotikums beeinflussen (Dette, 1982, White *et al.*, 1990). *In-vivo* hat das Vorhandensein endogener und exogener Substanzen besonders großen Einfluss auf die Proteinbindung. So konnte festgestellt werden, dass Bilirubin Sulfonamide, Tetracycline, Penicilline und auch Cephalosporine aus den Albuminbindestellen verdrängt (Bratlid *et al.*, 1976) und freie Fettsäuren

durch Konformitätsänderung des Albuminmoleküls die Bindung von Antibiotika sowohl erhöhen, als auch erniedrigen können (Suh *et al.*, 1981).

Das Ausmaß der Proteinbindung eines Antibiotikums kann *in-vitro* bestimmt werden. Mehrere Methoden stehen hierbei zur Verfügung. Häufig verwendet werden Ultrafiltration und Ultrazentrifugation. Seltener verwendet wird die Equilibrium-Dialyse (Derendorf *et al.*, 2002). Des weiteren kann zur schnellen Bestimmung der Proteinbindung auch ein mikrobiologischer Assay in Form einer MHK-Bestimmung herangezogen werden (Craig *et al.*, 1986). Zur Ermittlung der Proteinbindung wird die MHK eines Erregers in Serum (oder Nährbouillon mit Albuminzusatz) mit der MHK des Erregers in reiner Nährbouillon verglichen und mit Hilfe von folgender Gleichung (1.3.) berechnet:

$$PB (\%) = \frac{MHK (\text{Serum}) - MHK (\text{Bouillon})}{MHK (\text{Serum})} \times 100 \quad (1.3.)$$

**Gleichung (1.3.): Bestimmung der Proteinbindung (PB) in Prozent; MHK = minimale Hemmkonzentration [mg/L]**

Gleich welche Methode verwendet wird, um die Proteinbindung eines Antibiotikums zu bestimmen, das Ergebnis ist immer sehr fehlerhaft. Dies nicht zuletzt auch wegen der Einflussfaktoren auf die Proteinbindung, die oben genannt worden sind. Für die prozentuale Bindung von Cefotaxim an Plasmaproteine werden in der Literatur beispielsweise Werte zwischen 25% (Fachinformation Cefotaxim Abbott®, 2000) und 70% (Hamada *et al.*, 2002) angeführt, im Mittel liegen die Werte allerdings um 37% (Patel *et al.*, 1995, Scaglione *et al.*, 1990, Craig *et al.*, 1976, Fontana *et al.*, 1998, Craig *et al.*, 1989).

#### 1.4 Bakterien

Der Einfluss der Proteinbindung auf die Wirkung von  $\beta$ -Laktamen wird mit Hilfe der Spezies *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* untersucht. Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* nach Einwirkung verschiedener Fluorchinolone sollen der Überprüfung dienen, ob die gewonnenen Ergebnisse innerhalb der  $\beta$ -Laktame auf die Klasse der Fluorchinolone übertragen werden können.

##### *Staphylococcus aureus*

Die Spezies *Staphylococcus aureus* der Gattung *Staphylococcus* gehört zur Familie Micrococcaceae. Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um grampositive, in Haufen oder

Trauben gelagerte, unbewegliche Kokken, die koagulase-positiv sind und auf gewöhnlichen Nährmedien kultiviert, gelbpigmentierte Kolonien ausbilden (Kayser *et al.*, 1998).

*S. aureus* ist natürlicher Besiedler von Haut und Schleimhäuten und häufiger Verursacher von Abszessen (häufig beginnend als Furunkel oder Karbunkel), Otitis media oder postoperativen Wundinfektionen. Bei resistenzgeschwächten Personen kann *S. aureus* vor allem nosokomial zur Sepsis führen. Die Häufigkeit von *S. aureus* bei Sepsis beträgt 20-40% (Simon *et al.*, 1997). Aufgrund der Bildung von Enterotoxinen kann *S. aureus* zu Lebensmittelvergiftungen und aufgrund des TSS-Toxins zum toxischen Schocksyndrom (TSS) führen (Pschyrembel, 1998). Klinische Bedeutsamkeit kommt dieser Spezies vor allem durch die methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme (MRSA) als Verursacher von nosokomialen Infektionen zu.

### *Haemophilus influenzae*

Die Spezies *Haemophilus influenzae* der Gattung *Haemophilus* gehört zur Familie der Pasteurellaceae. Es handelt sich hierbei um kleine, oft bekapselte, unbewegliche, gramnegative Stäbchen. *H. influenzae* wächst fakultativ anaerob, zum Wachsen im Medium müssen die Wachsfaktoren Hämin und NAD<sup>+</sup>/ NADP<sup>+</sup> angeboten werden (Kayser *et al.*, 1998). *H. influenzae* ist häufiger Besiedler des oberen Respirationstraktes und so Erreger von Meningitis, akuter Larynxstenose, Sinusitis, Otitis media, Pneumonie oder Osteomyelitis und Sepsis (Pschyrembel, 1998). Bei Erwachsenen ist *H. influenzae* häufiger Erreger der akuten Exazerbation einer chronischen Bronchitis

Die Inzidenz schwerer, invasiver Infekte (Meningitis, Sepsis, Epiglottitis) bei Kindern hat nach Einführung der Schutzimpfung gegen *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib) dramatisch abgenommen.

### *Streptococcus pneumoniae*

Die Spezies *Streptococcus pneumoniae* der Gattung *Streptococcus* gehört zur Familie der Streptococcaceae. Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um grampositive Diplokokken, die auf Blutplatten kultiviert, eine charakteristische mukoide Koloniemorphologie mit  $\alpha$ -Hämolyse aufweisen.

*S. pneumoniae* ist oft Teil der Normalflora im nasopharyngealen Bereich und als Erreger zahlreicher Infektionen bekannt, die häufig endogenen Ursprungs sind. Neben Meningitis und Sepsis verursacht *S. pneumoniae* vor allem Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes, insbesondere Otitis media, Sinusitis, Bronchitis und Pneumonie (Kayser *et al.*, 1998). Im ambulanten Bereich ist *S. pneumoniae* (gefolgt von *H. influenzae*,  $\beta$ -

hämolsierenden Streptokokken und Staphylokokken sowie *Moraxella catharrhalis*) häufigster Erreger bakterieller Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes (Vogel *et al.*, 2000).

### 1.5 Antibiotika

Die Untersuchungen sollen mit Antibiotika aus verschiedenen Klassen durchgeführt werden. Es werden die Antibiotika Meropenem, Cefotaxim, Cefoxitin und Faropenem aus der Klasse der  $\beta$ -Laktame sowie die Chinolone Gatifloxacin, Moxifloxacin und Trovafloxacin verwendet.

#### 1.5.1 Wirkmechanismus und Proteinbindung der $\beta$ -Laktame

Die Bakterienzellwand ist die Zielstruktur der  $\beta$ -Laktame. Sie ist eine komplex zusammengesetzte Struktur. Ihr Grundgerüst besteht aus einem Heteropolymer, dem Peptidoglykan (Murein). Dieses umgibt die Zytoplasmamembran sackförmig und verleiht der Zelle Rigidität und schützt sie vor osmotischen Angriffen.  $\beta$ -Laktame stören den komplexen Vorgang der Zellwandsynthese, indem sie an sogenannte Penicillin-Binde-Proteine (PBPs) binden. Die PBPs sind Enzyme (Trans-, DD-Carboxy- und DD-Endopeptidase), die an terminalen Schritten in der Peptidoglykansynthese beteiligt sind. Sie verknüpfen die Peptidseitenketten des Peptidoglykans und beeinflussen dadurch den Grad der Quervernetzung. Der für die  $\beta$ -Laktame charakteristische  $\beta$ -Laktamring ist strukturanalog zu den Zellwandbausteinen. Das Antibiotikum als Substrat blockiert das aktive Zentrum der PBPs. Durch diese Hemmung kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellwandsynthese und -abbau, welches zur Lyse der Zelle führt (Höltje *et al.*, 2001).

$\beta$ -Laktam Antibiotika wirken bakterizid und konzentrationsunabhängig, aber zeitabhängig, das heißt, dass ab einer bestimmten Konzentration keine Steigerung der Absterberate zu beobachten ist. Häufig ist schon bei einer Konzentration, die dem zwei- bis vierfachen der MHK entspricht, der maximale Effekt zu beobachten (Ambrose *et al.*, 2000). Es ist daher in der Therapie mit  $\beta$ -Laktamen eine konstante und mäßig hohe Wirkstoffkonzentration vorteilhaft.

In der Klasse der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika erstreckt sich die Proteinbindung über den gesamten Bereich, so gibt es Moleküle wie Meropenem mit einer äußerst geringen Proteinbindung von 2% oder hingegen Moleküle wie Ceftriaxon mit einer Bindung von bis zu 98% (konzentrationsabhängige Bindung) (Fachinformation Meronem®, 2002, Perry *et al.*, 2001). Für  $\beta$ -Laktame konnte eine gute Korrelation zwischen der Lipophilie des Moleküls und der Proteinbindung festgestellt werden. Hauptverantwortlich hierfür sind die unterschiedlichen Seitenketten des  $\beta$ -Laktam-Grundgerüsts (Craig *et al.*, 1977). Ebenso konnte eine gute

Korrelation zwischen dem Grad der Proteinbindung und der verstärkten Fähigkeit zur Penetration in periphere Gewebe festgestellt werden (Woodnutt *et al.*, 1995).

### *Meropenem*

Meropenem ist ein Breitspektrumantibiotikum der  $\beta$ -Laktam Unterklasse der Carbapeneme (Kelly *et al.*, 1995). Es ist hochaktiv gegenüber grampositiven und gramnegativen Erregern einschließlich Anaerobier (Drusano *et al.*, 1995). Aufgrund seines 1- $\beta$ -Methyl-Substituenten ist Meropenem im Gegensatz zu Imipenem relativ stabil gegen Hydrolyse durch die Dehydropeptidase I in der Niere (Sörgel *et al.*, 1996). Indikationsgebiete von Meropenem sind Pneumonien, intraabdominelle Infektionen, Sepsis, Infektionen von Haut u. Weichteilgewebe, gynäkologische Infektionen wie Endometritis und Pelveoperitonitis, Meningitis sowie Infektionen der Nieren und ableitenden Harnwege (Rote Liste, 2004)

Die Proteinbindung von Meropenem ist außerordentlich gering und beträgt ca. 2% (Fachinformation Meronem®, 2002a).

### *Cefotaxim*

Cefotaxim ist ein  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum der dritten Generation (Mutschler *et al.*, 2001). Es wird bei Infektionen der Atemwege, der Niere und ableitenden Harnwege, der Haut und des Weichteilgewebes, der Knochen und Gelenke, der Geschlechtsorgane, des Bauchraumes (einschließlich Peritonitis), des zentralen Nervensystems (einschließlich Meningitis und Ventriculitis), Borreliose, Sepsis, Endokarditis eingesetzt (Rote Liste, 2004). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine 37%ige Proteinbindung von Cefotaxim zugrunde gelegt (s.o.) (Craig *et al.*, 1989a)

### *Cefoxitin*

Bei Cefoxitin handelt es sich um ein Cephalosporin der zweiten Generation. Seine Verwendung ist insbesondere bei aerob/anaeroben Mischinfektionen, wie Peritonitis sowie anderen intraabdominalen und intrapelvischen Infektionen, bei Infektionen des weiblichen Genitaltraktes, der Harnwege, der Atemwege, der Knochen und Gelenke, der Haut- und Weichteilgewebe bei Septikämie und Endokarditis indiziert (Rote Liste, 2004). Cefoxitin bindet zu ca. 70% an Plasmaproteine (Fachinformation Mefoxitin®, 1994).

### *Faropenem*

Faropenem ist Carbapenemantibiotikum mit einem breiten Wirkungsspektrum gegenüber gramnegativen und grampositiven Erregern sowie einigen Anaerobiern (Woodcock *et al.*, 1997). Der Ester Faropenem-Daloxat wird als pro-drug appliziert. Faropenem hat im Gegensatz zu anderen Carbapenemantibiotika den Vorteil, dass es oral appliziert werden kann (Okuda *et al.*, 2000). Faropenem ist in Deutschland nicht zugelassen. Die Pharmakokinetik von Faropenem ist durch eine hohe Plasmaproteinbindung von ca. 94% charakterisiert (Dalhoff, 2001).

### 1.5.2 Wirkmechanismus und Proteinbindung der Chinolone

Die Chinolone sind eine hochwirksame Antibiotikumgruppe. Sie werden totalsynthetisch hergestellt und spielen sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin eine große Rolle (Petersen, 2001).

Der Hauptangriffsort der Chinolone ist bei gramnegativen Erregern die Gyrase ( $\equiv$  Topoisomerase II), bei grampositiven meistens die Topoisomerase IV (Belland *et al.*, 1994, Ferrero *et al.*, 1994, Hoshino *et al.*, 1994).

Die Gyrase katalysiert unter Verbrauch von ATP eine „negative Überspiralisierung“ (Verdrillung, „Supercoiling“) der beiden umeinandergewundenen DNA-Stränge, um das große DNA-Molekül so zu kompaktieren, dass es in die kleine Bakterienzelle hineinpasst. Eine weitere Topoisomerase, die Topoisomerase I, ermöglicht dann die Zugänglichkeit der DNA für Replikations-, Transkriptions- oder Rekombinationsvorgänge (Vosberg, 1985, Watt *et al.*, 1994). Die Topoisomerase IV übernimmt die Aufgabe der „Decatenierung“, der Trennung der replizierten Tochterchromosomenstränge, die nach der Replikation wie Kettenglieder ineinander hängen. Dazu führt sie einen temporären Doppelstrangbruch durch, um die DNA-Moleküle voneinander zu trennen (Khodursky *et al.*, 1995). Der Wirkmechanismus der Chinolone beruht auf der Bildung eines stabilen ternären Komplexes, bestehend aus Topoisomerase-DNA-Chinolon. Durch die irreversible Bildung des Gyrase-DNA-Chinolon-Komplexes verliert die Gyrase ihre Fähigkeit, den Doppelstrangbruch zu relegieren. Der Topoisomerase IV-DNA-Chinolon-Komplex verhindert die Decatenierung der Chromosomen. Die Folge dieser Prozesse ist der Untergang der Zelle (Ferrero *et al.*, 1994).

Chinolone wirken bakterizid und stark konzentrationsabhängig. Aufgrund dieser Tatsache ist bei der Erstellung eines Therapieregimes zu beachten, dass Chinolone am effektivsten sind, wenn sie kurzfristig hohe Konzentrationen erreichen (Mutschler *et al.*, 2001).

Die Proteinbindung der Chinolone wandelte sich mit der Entwicklung neuerer Moleküle in den 90er Jahren. Die vor 1989 erschienenen ersten Vertreter dieser Klasse sind durch eine niedrige



Proteinbindung gekennzeichnet. So liegt beispielsweise die Proteinbindung von Pefloxacin, Lomefloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin und Ofloxacin zwischen 10 und 25% (Bergogne-Bérézin, 2002). Die neueren Moleküle können dagegen durchaus eine höhere Bindung aufweisen, z.B. Trovafloxacin mit einer 76%igen oder Garenoxacin mit einer 87%igen Proteinbindung (Dalhoff *et al.*, 2003). Die bei den  $\beta$ -Laktamen auftretende Korrelation zwischen Lipophilie des Moleküls mit erhöhter Gewebepenetration sowie zwischen Lipophilie und Proteinbindung konnte bei den Chinolonen nicht beobachtet werden (Zlotos *et al.*, 1998).

### *Gatifloxacin*

Gatifloxacin ist ein Chinolon der Gruppe IV, wirksam gegenüber gramnegativen, grampositiven, atypischen Erregern (*Chlamydia*, *Mykoplasma*, *Legionella*) sowie Anaerobiern.

Aufgrund seiner guten Gewebepenetration liegt der Schwerpunkt in der Anwendbarkeit bei den Atemwegsinfektionen (akute Sinusitis, akute bakterielle Exazerbation einer chronischen Bronchitis) (Petersen, 2001). Gatifloxacin ist seit 2004 nicht mehr in Deutschland zugelassen. Es bindet zu ca. 20% an Plasmaproteine (Dalhoff *et al.*, 2003).

### *Moxifloxacin*

Moxifloxacin ist ein Chinolon der Gruppe IV mit gleichem Wirkspektrum und ähnlichem Indikationsgebiet wie Gatifloxacin. Es ist allerdings stärker wirksam gegenüber grampositiven Erregern und weist aufgrund seiner längeren Halbwertszeit (12h) eine günstigere Pharmakokinetik gegenüber Gatifloxacin auf (Petersen, 2001). Die Proteinbindung von Moxifloxacin beträgt ca. 37% (Dalhoff *et al.*, 2003).

### *Trovafloxacin*

Trovafloxacin ist wegen seiner Aktivität gegen anaerobe Bakterien in die Gruppe IV der Chinolone eingeordnet worden. Indikationsgebiete sind nosokomiale und ambulant erworbene Pneumonie, akute Exazerbation der chronischen Bronchitis, akute Sinusitis sowie komplizierte intraabdominale Infektionen. Aufgrund hepatotoxischer Nebenwirkungen wurde Trovafloxacin vom Markt genommen (Holzgrabe, 2001). Die Proteinbindung ist für die Klasse der Chinolone sehr hoch, sie beträgt ca. 76% (Dalhoff *et al.*, 2003).

## 1.6 Eagle Effekt

Generell wird angenommen, dass die antibakterielle Aktivität eines Antibiotikums proportional zu dessen eingesetzter Dosis ist. Doch schon kurz nach der Einführung des Penicillins

beobachteten Eagle sowie Eagle und Musselman bei *in-vitro* Untersuchungen zur Bakterizidie von  $\beta$ -Laktamen, dass bei niedrigen Antibiotikumkonzentrationen ein höherer antibakterieller Effekt als bei sehr hohen Konzentrationen auftrat (Eagle, 1948, Musselman *et al.*, 1948). Eagle nannte dies „paradoxical zone phenomenon“; heute wird dies in der Literatur als „Eagle-Effekt“ bezeichnet, obwohl bereits 1945 Kirby ähnliche Beobachtungen machen konnte (Kirby, 1945). Eagle Effekte sind häufig bei  $\beta$ -Laktamen und Staphylokokken sowie Streptokokken, sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, beobachtet worden (Odenholt *et al.*, 1987, Odenholt *et al.*, 1989, Odenholt, 1989, Griffiths L.R. *et al.*, 1985). Die Ursachen dieses Phänomens sind auch nach beinahe 60 Jahren nicht bekannt. Man vermutet, dass bei höheren Antibiotikumkonzentrationen die  $\beta$ -Laktame autolytische Enzyme der Bakterien, die den Zelltod herbeiführen, hemmen (Odenholt *et al.*, 1989, Kondo *et al.*, 2001, Holm *et al.*, 1990).

### 1.7 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll mit Hilfe von *in-vitro* Studien ein experimentell gestützter, quantitativer Zusammenhang zwischen Proteinbindung und antibakterieller Wirkung von Antibiotika hergestellt werden. Dies soll durch die Analyse von systematisch durchgeführten Absterbekinetiken geschehen. Verglichen werden dabei die Absterbekinetiken von vier verschiedenen  $\beta$ -Laktam- und drei Chinolon-Antibiotika mit einer Plasmaproteinbindung im Bindungsbereich von 2 bis 94 % gegenüber drei Bakterienstämmen unterschiedlicher Spezies. Dies sowohl bei geometrisch steigenden Antibiotikumkonzentrationen in der Batchkultur als auch bei Standarddosierungen im *in-vitro* Modell. Dabei wird bei jeder Konzentration in der Batchkultur und jeder eingesetzten Dosis im *in-vitro* Modell der antibakterielle Effekt eines Antibiotikums sowohl (1.) ohne Zusatz von Albumin, (2.) mit Zusatz einer physiologischen Konzentration humanen Albumins und (3.) ohne Zusatz von Albumin, jedoch lediglich unter Zugabe einer Antibiotikamenge, die dem freien Anteil bei Zusatz von Albumin entspräche, ermittelt. Durch diese „Dreifachbestimmung“ kann zum einen überprüft werden, ob und bei welchen prozentualen Plasmaproteinbindungen (80% oder niedriger) die Wirkung eines Antibiotikums herabgesetzt wird. Zum anderen kann durch Vergleich der Versuchsansätze (2.) und (3.) aufgezeigt werden, ob allein der „frei“ vorliegende Anteil des Antibiotikums für dessen Wirkung verantwortlich ist, oder ob „nachdiffundierendes“ Antibiotikum aus den Proteinbindungen an der Wirkung beteiligt ist. Abrundend sollen in der Batchkultur die Grenzkonzentrationen ermittelt werden, ab der die Proteinbindung keinen Einfluss mehr auf die Wirkung der Antibiotika hat.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen kann zu einer besseren Kenntnis über den Einfluss der Proteinbindung auf die Pharmakodynamik eines Antibiotikums verholfen werden. Dies ist von großer Bedeutung für die Optimierung von Dosierungen in der Antibiotikatherapie, da durch einen rationalen Einsatz von Antibiotika sowohl etwaige Kosten der aufgrund fehlerhafter Dosierung durchzuführenden Folgebehandlungen verringert werden, als auch der zunehmenden Resistenzentwicklung entgegen gewirkt werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind Bestandteil der Stammsammlung der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn.

Für die Untersuchung im *in-vitro* Modell und in der Batchkultur werden die Stämme *Staphylococcus aureus* III-3-35, *Haemophilus influenzae* III-10-02 und *Streptococcus pneumoniae* III-10-62 eingesetzt. Als Testorganismen für die Konzentrationsbestimmung der Antibiotika im Bioassay wird *Klebsiella pneumoniae* IV-02-03 (vgl. 2.2.4) und für die Bestimmung der Proteinbindung der Antibiotika wird *Escherichia coli* ATCC 25922 für (vgl. 2.2.3) verwendet.

Bis zu ihrem Gebrauch werden die Stämme in einem Gemisch aus Glycerol und N1-Nährmedium (2:1) bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach Entnahme aus dieser Dauerkulturform werden die Stämme auf Chinablau-Laktose-Agar (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*), Schoko-Agar (*Haemophilus influenzae*) bzw. auf Blut-Agar (*Streptococcus pneumoniae*) angezogen und bis zu ihrer Verwendung bei  $2-8^{\circ}\text{C}$  (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*) bzw. bei Raumtemperatur (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*) gelagert.

#### 2.1.2 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika wurden freundlicherweise von den Herstellern zur Verfügung gestellt (s. Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikaklasse	Antibiotikum	Hersteller
<u>Beta-Laktame</u>		
Carbapeneme	Meropenem	Astra Zeneca, Wilmington, DEL, USA
	Faropenem	Bayer AG, Wuppertal
Cephalosporine	Cefotaxim	Aventis, Frankfurt am Main
	Cefoxitin	MSD GmbH, Haar
<u>Flourchinolone</u>	Moxifloxacin	Bayer AG, Leverkusen
	Gatifloxacin	Grünenthal, Aachen
	Trovafoxacin	Pfizer, Groton, CT, USA

Für die Untersuchungen werden die Antibiotika in sterilem, demineralisiertem Wasser gelöst.

### 2.1.3 Nährmedien und Lösungen

Die Nährmedien werden nach Anweisung des Herstellers hergestellt und nachfolgend durch Autoklavieren sterilisiert (15 min bei 121°C).

Tabelle 2.2: Nährmedien und Chemikalien

Medium	Hersteller
Chinablau-Laktose-Agar	Oxoid, Wesel
Schoko-Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
Blut-Agar Base No. 2	Oxoid, Wesel
Defibriniertes Schafsblut	Elocin, Mühlheim a. d. Ruhr
Müller-Hinton Bouillon	Becton-Dickinson, Heidelberg
Standard-Medium Nr. 1	Merck, Darmstadt
Human Albumin 25%	Bayer AG, Leverkusen
Human Albumin 20%	Grifols, Langen
Hirn-Herz-Glucose Bouillon	Oxoid, Wesel
Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Wesel
Fildes-Extrakt	Oxoid, Wesel
Iso-Sensitest-Agar	Oxoid, Wesel
Haemophilus Test Medium Supplement	Oxoid, Wesel
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt granuliert	Merck, Darmstadt

Fildes Extrakt als Supplement für *Haemophilus influenzae* wird in 3%iger Konzentration (V/V) der Nährbouillon N1 nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt.

Haemophilus Test Medium Supplement und lysiertes Pferdeblut werden der Nährbouillon Müller-Hinton nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt. Albumin wird den entsprechenden Nährmedien nach dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 4% (V/V) steril hinzugefügt.

Die Nährlösungen für die Stämme bei den Untersuchungen in der Batchkultur und im *in-vitro* Modell (vgl. 2.2.7 und 2.2.8) sind Müller-Hinton Bouillon (für *Staphylococcus aureus*), Standard Medium Nr. 1 mit 3%igem Fildes Zusatz (für *Haemophilus influenzae*) sowie Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (für *Streptococcus pneumoniae*).

### 2.1.4 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 2.3: verwendete Geräte und Materialien

Geräte bzw. Materialien	Hersteller
Peristaltikpumpe IPN-8	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Peristaltikpumpe IPC N-8	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Pumpschläuche Tygon R 2607: Color-Code weiß-orange, ID 0,64 mm Color-Code rot-grau, ID 1,22 mm Color-Code violett-schwarz, ID 2,29 mm	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Laborflasche Schott mit GL 45 Gewinde	VWR International, Langenfeld
Glasgefäße mit GL 45 Gewinde, 70 mL	Glasbläser Eich, Bonn
Teflondeckel, Sonderanfertigung	Fa. Eich, Bonn
Rotilabo-Schlauch Teflon ID 0,8 mm	Roth, Karlsruhe
Silikonschlauch, ID 2mm	VWR International, Langenfeld
Auslaufstäbe, Glas	Glasbläser Eich, Bonn
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Heizwasserbad	Juchheim Labortechnik, Seelheim
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Vakuumfiltrationsgerät, Edelstahl	Sartorius, Göttingen
Filtereinheit Rotrand, FP/ 0,2 CA-S	Schleicher & Schüll, Dassel
Cellulose-Nitrat Filter, 0,45 µm, 47 mm	Sartorius, Göttingen
Kolbenhubpipetten, Gilson, variabel	Abimed, Langenfeld
Achtkanalpipette Titertek, Multistep	Labsystems, Helsinki, Finnland
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
CO <sub>2</sub> Inkubator Steri-Cycle T/C	Novodirekt, Kehl
Brutschrank	Heraeus, Düsseldorf

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Übernachtskultur

Zur Herstellung einer Übernachtskultur werden einzelne Kolonien des Teststammes auf eine entsprechende Nähragarplatte (Chinablau-Laktose-Agar bei *S. aureus*, Schoko-Agar bei *H. influenzae*, Blut-Agar bei *S. pneumoniae*) überimpft. Diese wird dann 12-16 h bei 37°C (*S. aureus*, *K.*

*pneumoniae*) bzw. bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Anreicherung der Luft (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*) inkubiert.

### 2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die geringste Konzentration eines antibiotischen Wirkstoffes, die ein sichtbares Wachstum im Kulturansatz gerade noch verhindert. Die minimale Hemmkonzentration stellt ein Maß für die Empfindlichkeit des Organismus dar.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgt mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode nach NCCLS.

Das Antibiotikum wird in sterilem, demineralisiertem Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung wird das Antibiotikum in Müller-Hinton Bouillon geometrisch verdünnt. 50 µL der Verdünnungen in abnehmender Konzentration sowie antibiotikumfreie Müller-Hinton Bouillon als Wachstumskontrolle werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nachfolgend werden 50 µL einer Bakteriensuspension des zu untersuchenden Organismus in diese Vertiefungen gegeben. Das entstehende Inokulum enthält  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  KBE/ mL. Die Mikrotiterplatten werden 18-24 h bei 37°C inkubiert, anschließend wird das Wachstum visuell bestimmt.

Die Bakteriensuspension wird wie folgt hergestellt:

*Staphylococcus aureus*, *E. coli*:

Eine Übernachtskultur wird auf Chinablau-Laktose-Agar herangezogen. Mehrere Kolonien werden in steriler, isotoner Kochsalzlösung zu einer Keimzahl von  $1 \times 10^8$  KBE/ mL suspendiert (entspricht McFarland Standard 0,5). Diese Suspension wird in Müller-Hinton Bouillon 1:100 verdünnt.

*Haemophilus influenzae*:

Eine Übernachtskultur wird auf Schoko-Agar herangezogen. Einzelne Kolonien werden in steriler, isotoner Kochsalzlösung zu einer Keimzahl von  $1 \times 10^8$  KBE/ mL suspendiert (entspricht McFarland Standard 0,5). Diese Suspension wird 1:100 in Müller-Hinton Bouillon mit zugesetztem Haemophilus Test Medium Supplement und 0,5% Hefe verdünnt.

*Streptococcus pneumoniae*:

Eine Übernachtskultur wird auf Blut-Agar Base No. 2 herangezogen. Einzelne Kolonien werden in steriler, isotoner Kochsalzlösung zu einer Keimzahl von  $1 \times 10^8$  KBE/ mL suspendiert (entspricht McFarland Standard 3). Diese Suspension wird 1:100 in Müller-Hinton Bouillon mit Zusatz von 4% defibriniertem und lysiertem Pferdeblut verdünnt.

### 2.2.3 Bestimmung der Proteinbindung eines Antibiotikums mit Hilfe der MHK

Die Proteinbindung eines Antibiotikums kann mit Hilfe der MHK bestimmt werden. Hierzu wird zum einen die MHK *ohne* Zusatz von Human Albumin (vgl. 2.2.2.) und zum anderen *mit* Zusatz von 4% Human Albumin ermittelt. Für den letzteren Fall werden zu der Bakteriensuspension 8% (V/V) Albumin hinzugefügt. Durch Pipettieren von 50 µL der mit Albumin angereicherten Bakteriensuspension in eine mit 50 µL Antibiotikumverdünnung gefüllte Kavität der Mikrotiterplatte enthält man eine Albuminkonzentration von 4% (V/V) pro Kavität (100 µL Gesamtvolumen). Pro Kavität entspricht dies 20 µL des 20%igen Human Albumins (Grifols®), bzw. 16 µL des 25%igen Human Albumins (Bayer®).

Zur Ermittlung der MHK wird wie unter 2.2.2. beschrieben weiter verfahren. Durch Einsetzen der ermittelten Konzentrationen für die MHK ohne und mit Albumin in nachfolgende Formel (2.1.) wird die prozentuale Proteinbindung berechnet.

$$PB(\%) = \frac{MHK[Bouillon + Alb.] - MHK[Bouillon]}{MHK[Bouillon + Alb.]} \cdot 100\% \quad (2.1.)$$

**Gleichung (2.1.): PB = Proteinbindung in %; MHK = minimale Hemmkonzentration [mg/L]**

Um den hohen Fehler dieser Methode zu minimieren, wird eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Das arithmetische Mittel der so bestimmten Proteinbindung des Antibiotikums wird berechnet.

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmung der Antibiotika im Agardiffusionstest („Bioassay“)

Die Überprüfung der eingesetzten Konzentrationen des Antibiotikums im *in-vitro* Modell erfolgt mit Hilfe des Agardiffusionstests. Die Proben, deren Antibiotikumkonzentration überprüft werden soll, werden bis zur Bestimmung bei -20°C gelagert.

Beim Agardiffusionstest werden 74 mL flüssigen Iso-Sensitest-Agars in sterile Glasschalen mit einer Grundfläche von 14 x 24 cm gegossen und erstarren gelassen. Nach dem Erkalten wird der Agar mit einer Bakteriensuspension des Indikatorstammes *K. pneumoniae* IV-02-03 überschichtet. Zur Herstellung dieser Suspension wird aus einzelnen Kolonien der Übernachtskultur ein McFarland Standard von 0,5 in 0,9%iger NaCl-Lösung eingestellt, der dann in 0,9%iger NaCl-Lösung 1:10 verdünnt wird. Nach dem Trocknen der Bakterienschicht werden 32 Löcher mit definierten Durchmessern (6 mm) in den Agar gestanzt, der Agar in den ausgestanzten Löchern wird mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. In neun der 32 Löcher werden je 30 µL eines internen Standards mit bekannten Konzentrationen des zu untersuchenden Antibiotikums pipettiert (Tab. 2.4.). Zur Herstellung dieses Standards wird das Antibiotikum mit derselben Nährlösung



verdünnt, die auch im *in-vitro* Modell eingesetzt wird, bei Modellen mit Albuminzusatz also auch mit der gleichen Menge an Albumin. In die übrigen Löcher werden nach einem randomisierten Schema die (z. T. verdünnten (Cefotaxim)) Untersuchungslösungen des Antibiotikums eingefüllt. Sowohl die Standardkonzentrationen als auch die Untersuchungskonzentrationen werden jeweils dreimal auf die Platte aufgetragen. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgt dann nach Inkubation bei 37°C über 18-24 h. Durch Diffusion des Antibiotikums aus den ausgestanzten Löchern in den Agar bilden sich während der Inkubation Hemmhöfe in dem sonst geschlossenen Bakterienrasen. Der Durchmesser dieser Hemmhöfe ist in einem linearen Bereich proportional zum Logarithmus der Antibiotikumkonzentration. Zur Ermittlung einer Kalibriergeraden werden die Logarithmen des internen Standards gegenüber den gemittelten Durchmessern der Hemmhöfe aufgetragen. Die Konzentrationen der Proben aus dem *in-vitro* Modell können dann mit Hilfe dieser Kalibriergeraden ermittelt werden. Dabei wird ein Grenzwert festgelegt, bei einer durchschnittlichen Abweichung von über 10% vom wird der Versuch wiederholt.

Tabelle 2.4: eingesetzte Standardkonzentrationen im Bioassay

Antibiotikum	Konzentrationen Standard ohne/ mit Albumin [mg/ L]	Konzentrationen Standard freier Anteil [mg/ L]
Meropenem	30; 15; 5; 0,5	--- <sup>1</sup>
Cefotaxim	0,5; 0,25; 0,1; 0,05	0,5; 0,25; 0,1; 0,05
Cefoxitin	250; 80; 20; 1,5	80; 40; 10; 1,5
Faropenem	2; 4; 8; 16	--- <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Freier Anteil wurde nicht simuliert

<sup>2</sup> Konzentrationen der Untersuchungslösungen aus dem *in-vitro* Modell liegen unterhalb der Nachweisgrenze im Bioassay

### 2.2.5 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung erfolgt über die Erfassung der Lebendzellzahl.

Hierzu wird die Probe je nach Erwartung der Zellzahl über mehrere Zehnerpotenzen in steriler, isotoner Kochsalzlösung verdünnt. 50 µL dieser Verdünnung werden auf eine entsprechende Nähragarplatte (Chinablau-Laktose-Agar bei *S. aureus*, Schoko-Agar bei *H. influenzae*, Blut-Agar bei *S. pneumoniae*) ausplattiert und 24 - 48 h bei 37°C (*S. aureus*) bzw. bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Anreicherung der Luft (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*) inkubiert. Die entstandenen Kolonien werden gezählt und die koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ mL) berechnet. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 200 KBE/ mL. Liegt die zu erwartende Keimzahl unterhalb dieser Nachweisgrenze, so werden 500 bis 1000 µL der unverdünnten oder verdünnten Probe filtriert (Membranfilter: Porendurchmesser 0,45 µm) und mit 50 mL steriler,

isotoner Kochsalzlösung nachgewaschen. Der Filter wird nun auf den entsprechenden Nähragar gelegt und ebenfalls inkubiert. Die Nachweisgrenze kann mit diesem Verfahren auf 1-2 KBE/ mL gesenkt werden.

### 2.2.6 Fehlerermittlung bei der Keimzahlbestimmung

Der experimentelle Fehler der Keimzahlbestimmung wird in einer Mehrfachbestimmung mit anschließender statistischer Auswertung ermittelt.

Hierzu wird zum einen das Wachstumsverhalten, zum anderen das Absterbeverhalten von *Staphylococcus aureus* während der Einwirkung der 4-fachen MHK von Faropenem bestimmt. 200 mL Müller-Hinton Bouillon und 0,5 mL (Wachstumskontrolle) bzw. 2 mL (4-fach MHK) eines McFarland Standards 0,5 werden in je einen Erlenmeyerkolben gegeben, so dass nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad ein Ausgangsinokulum von  $5 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^7$  KBE/ mL entsteht. Zum Zeitpunkt 0 werden in den Erlenmeyerkolben für die 4fach MHK Bestimmung 25 µg Faropenem zum Versuchsansatz gegeben, der Versuchsansatz der Kontrolle bleibt unbehandelt. Zur Stunde 0, 2 und 4 werden jeweils 10 Keimzahlbestimmungen (vgl. 2.2.5) durchgeführt. Die Wassertemperatur von 37°C bleibt über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. Die Anzahl der Kolonien, die gezählt werden, sollte zwischen 50 und 100 liegen. Ist dies nicht der Fall, werden für die Auswertung Koloniezahlen, die zwischen 20-200 liegen, herangezogen.

Die arithmetische Mittel der jeweils 10 ermittelten KBE/ ml pro Probenentnahme und die Standardabweichungen zum Mittel werden für die Kontrolle und für den Ansatz der 4-fachen MHK berechnet.

### 2.2.7 Absterbekinetik in der Batchkultur

In der Batchkultur wird das Absterbeverhalten des Testbakteriums bei konstanten Antibiotikumkonzentrationen über einen 6-stündigen Zeitraum untersucht.

Die Antibiotikumkonzentrationen, die dabei gewählt werden, liegen im Bereich von 0,5- bis 200-mal der MHK, wobei sich die Konzentrationen jeweils verdoppeln. Die dabei eingesetzten niedrigsten und höchsten Konzentrationen variieren bei den unterschiedlichen Antibiotika und Stämmen und können in den Tabellen im Anhang dieser Arbeit nachgelesen werden (Tabellen 7.1 bis 7.5).

Drei verschiedene Versuchsansätze werden in der Batchkultur simuliert (Abb. 2.1.). Dabei wird das Absterbeverhalten eines Stammes bei einer bestimmten Dosis zum einen ohne (1.) und zum anderen mit (2.) Zusatz von Albumin ermittelt. Sodann wird das Absterbeverhalten des Stammes ohne Albumin bei einer Dosis ermittelt, die dem berechneten freien Anteil des Antibiotikums entspricht (3.).

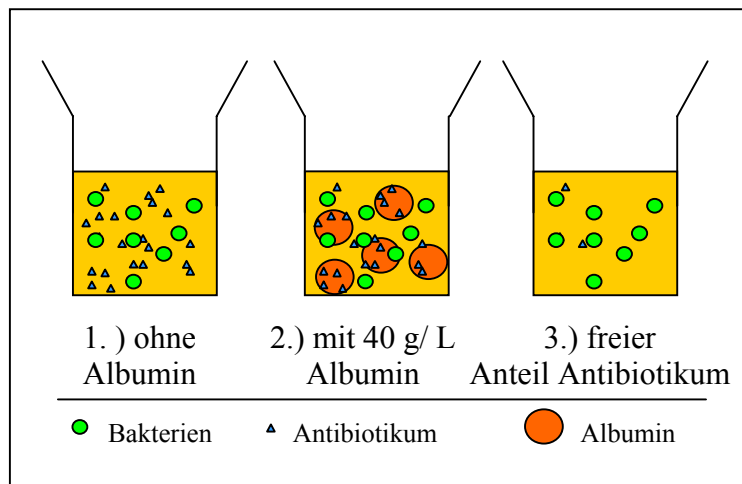


Abbildung 2.1.: Die drei verschiedenen Versuchsansätze in der Batchkultur

### 1.) Absterbekinetik mit Zusatz der Gesamtdosis des Antibiotikums und ohne Albumin ( $\equiv$ Bakterien + Gesamtdosis Antibiotikum)

Das Absterbeverhalten des Teststammes gegenüber einer Antibiotikumdosis wird in Nährbouillon *ohne* Zusatz von Albumin untersucht.

Hierzu wird aus einer Übernachtskultur des Testbakteriums ein McFarland Standard hergestellt, der die Ausgangskeimzahl  $1 \times 10^8$  KBE/ mL aufweist.  $62,5 \mu\text{L}$  (bzw.  $0,5 \text{ mL}$  bei *S. aureus*<sup>1</sup>) dieses Standards werden in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit  $25 \text{ mL}$  Nährbouillon gegeben und  $1 \text{ h}$  (*S. aureus*) bzw.  $2 \text{ h}$  (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*) im Schüttelwasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert, so dass nach diesem Zeitraum ein Ausgangsinokulum von ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ mL entsteht. Zu diesem Zeitpunkt ( $t = 0 \text{ h}$ ) wird die erste Probe gezogen und das Antibiotikum in der gewünschten Konzentration hinzugegeben. Zu den Zeitpunkten  $t = 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5$  und  $6 \text{ h}$  werden jeweils weitere Proben gezogen und deren Keimzahl bestimmt (vgl. 2.2.5.). Die Wassertemperatur im Schüttelwasserbad von  $37^\circ\text{C}$  wird über den gesamten Zeitraum des Versuches konstant gehalten. Die MHK wird für alle in der Batchkultur getesteten Bakterienstämme zum Zeitpunkt  $6 \text{ h}$  bestimmt.

<sup>1</sup> Das Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension von *Staphylococcus aureus* wurde im Vergleich zu *S. pneumoniae* und *H. influenzae* erhöht. Durch die „Haufenbildung“ der Staphylokokken lag die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bei  $62,5 \mu\text{L}$  in einem zu niedrigen Bereich.

### 2.) Absterbekinetik mit Zusatz der Gesamtdosis des Antibiotikums und mit Albumin

(≡ Bakterien + Gesamtdosis Antibiotikum + Albumin)

Das Absterbeverhalten des Teststammes gegenüber einer Antibiotikumdosis wird in Nährbouillon mit Zusatz von Albumin getestet. Dazu werden 20 bzw. 21 mL der entsprechenden Testbouillon (vgl. 2.2.7.1)) in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben. Nun fügt man 5 mL 20%iges Human Albumin der Fa. Grifols bzw. 4 mL 25%iges Human Albumin der Fa. Bayer hinzu. So entsteht ein Endvolumen von 4% humanen Albumin. In den Kolben wird der gleiche Teststamm sowie die gleiche Dosis Antibiotikum wie unter 1. beschrieben zugefügt. Fortgefahren wird wie unter 1. beschrieben.

### 3.) Absterbekinetik mit Zusatz der freien Konzentration und ohne Albumin:

(≡ Bakterien + freier Anteil Antibiotikum)

Das Absterbeverhalten des Teststammes wird in Nährbouillon gegenüber dem Anteil der berechneten freien Konzentration ohne Zusatz von Albumin getestet. Der Versuchsansatz 3. entspricht dabei dem Versuchsansatz 1. Allerdings wird nicht die Gesamtdosis Antibiotikum zugefügt, sondern eine Dosis, die dem berechneten freien Anteil des jeweiligen Antibiotikums entspricht. Nachfolgend sind diese berechneten Anteile aufgeführt:

Meropenem, Proteinbindung (PB) 2%: Da der freie Anteil 98% der Gesamtkonzentration beträgt, ist gegenüber der Gesamtdosis keine Veränderung zu erwarten, daher wird auf die Simulation dieser Konzentration verzichtet.

Cefotaxim, PB 37%.....	freier Anteil 63%
Cefoxitin, PB 70%.....	freier Anteil 30%
Faropenem, PB 94%.....	freier Anteil 6%
Gatifloxacin, PB 20%.....	freier Anteil 80%
Moxifloxacin, PB 37%.....	freier Anteil 63%
Trovafloracin, PB 76%.....	freier Anteil 24%

#### **2.2.8 *In-vitro* Modell nach Grasso**

Pharmakologische *in-vitro* Modelle ermöglichen die Bestimmung des Absterbeverhaltens von Bakterien in Abhängigkeit von der Zeit bei gleichzeitiger Simulation der humanen Pharmakokinetik eines Antibiotikums. Bei den in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro* Modellen handelt es sich um Modifikationen des Modells von Grasso *et al.*, mit denen es möglich ist, den im Plasma vorherrschenden Konzentrations-Zeit-Verlauf, der sich nach intravenöser Bolusgabe, Kurzinfusion oder per oraler Applikation im menschlichen Organismus ergibt, zu simulieren (Grasso *et al.*, 1978)

### 2.2.8.1.1 Versuchsaufbau des Modells zur Simulation der Pharmakokinetik nach Einmal-dosierung mit Resorption 0. Ordnung und anschließender Elimination

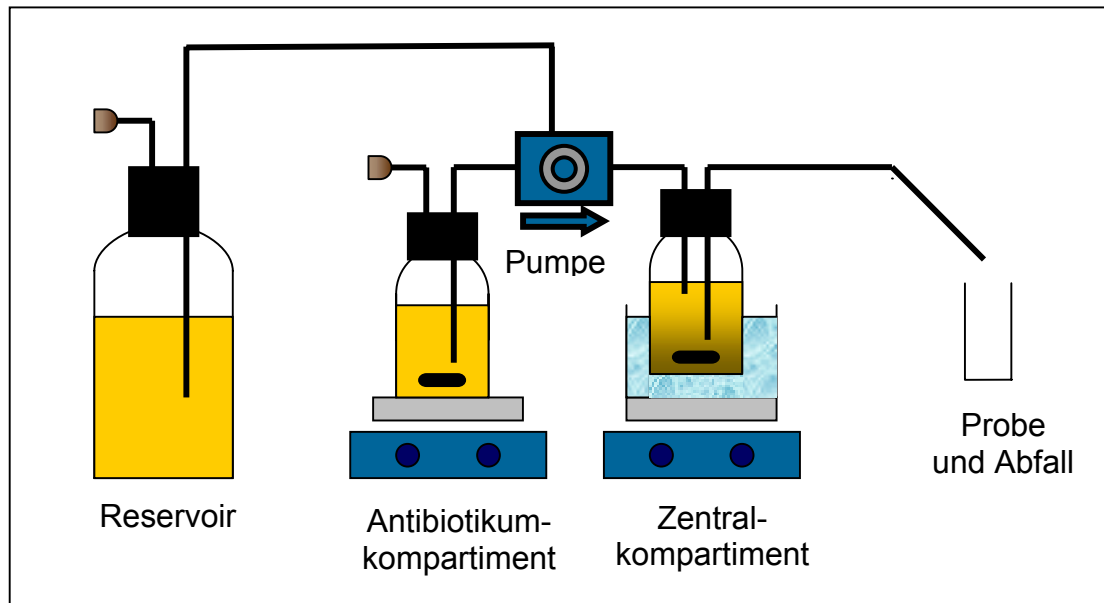


Abb. 2.2: Aufbau *in-vitro* Modell nach Grasso zur Simulation der PK mit Resorption 0. Ordnung und anschließender Elimination

Mit diesem Versuchsaufbau kann die Pharmakokinetik intravenöser Kurzinfusion (Resorption 0. Ordnung) simuliert werden, allerdings ist dieser Aufbau auch für die Simulationen per oraler Applikationen (Resorption 1. Ordnung) zu verwenden.

Das *in-vitro* Modell besteht aus einem Zentralkompartiment, einem Antibiotikumgefäß und einem Reservoirgefäß (Abb. 2.2). Zentralkompartiment und Antibiotikumgefäß sind bis zum Zeitpunkt  $t_{max}$  miteinander verbunden. Nach Erreichen des maximalen Plasmaspiegels wird das Zentralkompartiment vom Antibiotikumgefäß entkoppelt und anstelle dessen mit dem Reservoirgefäß verbunden.

Das Zentralkompartiment enthält Nährbouillon und Bakterien. In diesem werden die humanen Konzentrations-Zeit-Verläufe des Antibiotikums simuliert, indem Antibiotikum mit Hilfe einer Pumpe aus dem Antibiotikumgefäß bis zum Zeitpunkt  $t_{max}$  hinzugefügt wird. Ein Rührfisch im Zentralkompartiment sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung der Bakteriensuspension mit dem Antibiotikum. Nach Erreichen des maximalen Plasmaspiegels wird allein antibiotikumfreie Nährbouillon aus dem Reservoirgefäß in das Zentralkompartiment gepumpt. Das Antibiotikum wird durch den stetigen Zufluss reiner Bouillon nach einer Kinetik erster Ordnung aus dem Zentralkompartiment eliminiert.

Zu den entsprechenden Zeiten werden Proben entnommen und die Lebendkeimzahl sowie die Antibiotikumkonzentration bestimmt.

Das Zentralkompartiment befindet sich über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden in einem Wasserbad mit konstanter Wassertemperatur von 37°C.

### 2.2.8.1.2 Versuchsaufbau des Modells zur Simulation der Pharmakokinetik nach Einmal-dosierung ohne Resorption und mit anschließender Elimination

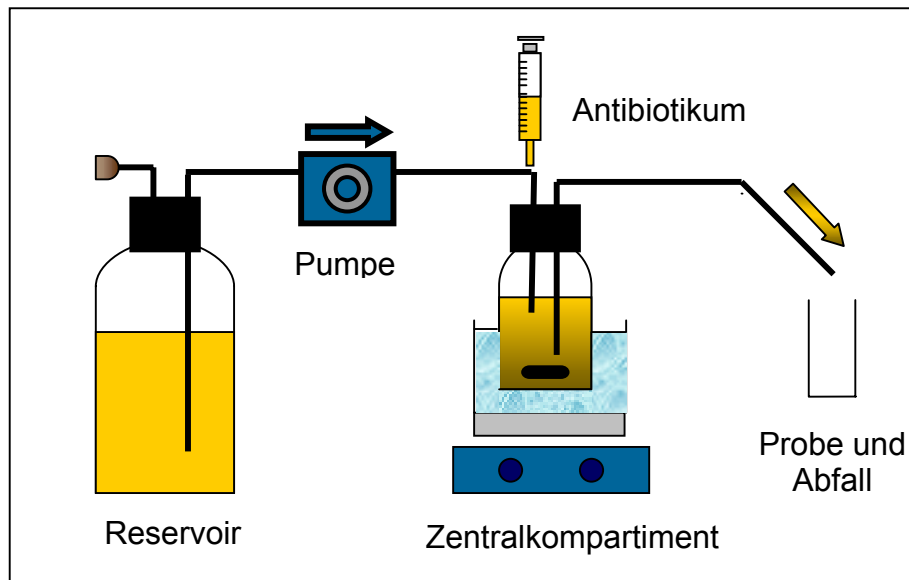


Abb. 2.3: Aufbau *in-vitro* Modell nach Grasso zur Simulation einer PK ohne Resorption mit anschließender Elimination

Das *in-vitro* Modell zur Simulation einer i.v. Bolus Applikation besteht aus einem Zentralkompartiment und einem Reservoirgefäß. Das Zentralkompartiment enthält Nährbouillon und Bakterien. In diesem werden die humanen Konzentrations-Zeit-Verläufe des Antibiotikums simuliert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wird die gesamte Dosis des Antibiotikums in das Zentralkompartiment injiziert. Ein Rührfisch im Zentralkompartiment sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung der Bakteriensuspension mit dem Antibiotikum. Durch kontinuierlichen Zufluss von reiner Nährbouillon aus dem Reservoirgefäß mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wird ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  h das Antibiotikum aus dem Zentralkompartiment nach einer Kinetik erster Ordnung eliminiert.

Zu den entsprechenden Zeiten werden Proben entnommen und die Lebendkeimzahl sowie die Antibiotikumkonzentration bestimmt.

Das Zentralkompartiment befindet sich über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden in einem Wasserbad mit konstanter Wassertemperatur von 37°C.

### 2.2.8.2 Versuchsdurchführung im *in-vitro* Modell

Vor Beginn des Experimentes werden alle Gefäße, Nährmedien, Schläuche, Schlauchverbundsysteme, Deckel, Abdichtungen und Glasstäbe durch Autoklavieren sterilisiert.

Wie auch in der Batchkultur werden im *in-vitro* Modell drei verschiedene Versuche pro Antibiotikum und pro Stamm durchgeführt. Dabei wird das Absterbeverhalten eines Stammes bei einer bestimmten Dosis zum einen ohne (1.) und zum anderen mit (2.) Zusatz von Albumin ermittelt. Sodann wird das Absterbeverhalten des Stammes ohne Albumin bei einer Dosis ermittelt, die dem berechneten freien Anteil des Antibiotikums entspricht (3.).

### 1.) Absterbekinetik mit Zusatz der Gesamtdosis des Antibiotikums und ohne Albumin

#### (≡ Bakterien + Gesamtdosis Antibiotikum)

Das Absterbeverhalten des Teststammes gegenüber einer Antibiotikumdosis wird in Nährbouillon *ohne* Zusatz von Albumin untersucht.

Zentral-, Reservoir- und Antibiotikumkompartiment werden mit entsprechenden Volumen (Tab. 2.5) der Nährbouillon unter aseptischen Bedingungen gefüllt. Dem Antibiotikumgefäß wird Antibiotikum zugefügt (Modell 2.2.8.1.1), bzw. das Antibiotikum wird zum Zeitpunkt  $t = 0$  h direkt ins Zentralkompartiment injiziert (Modell 2.2.8.1.2). Die Menge an zugesetztem Antibiotikum berechnet sich nach den Gleichungen 2.7 (mit Resorption) bzw. 2.10 (keine Resorption). In das Zentralkompartiment werden die Bakterien gegeben. Dabei wird das Volumen der einzusetzenden Bakteriensuspension so gewählt, dass nach einer Vorinkubationszeit von 1h (*Staphylococcus aureus*) bzw. 2h (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*) unter Rühren bei 37°C zum Zeitpunkt  $t = 0$ h ein Ausgangsinokulum von ca.  $1 \times 10^7$  KBE/mL entsteht. Durch diese Vorinkubationszeit ist ebenfalls gewährleistet, dass sich die Bakterien zu Versuchsbeginn in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Durch Aktivierung der Pumpen wird das Modell gestartet. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12$  und 24 Stunden wird aus dem Auslauf des Zentralkompartiments ein Probevolumen von ca. 0,5-1,5 mL entnommen. Aus diesem wird die Lebendkeimzahl und die Antibiotikumkonzentration bestimmt. Die MHK wird für alle im *in-vitro* Modell getesteten Bakterienstämme zum Zeitpunkt 0h und 24h bestimmt.

### 2.) Absterbekinetik mit Zusatz der Gesamtdosis des Antibiotikums und mit Albumin

#### (≡ Bakterien + Gesamtdosis Antibiotikum + Albumin)

Das Absterbeverhalten des Teststammes gegenüber einer Antibiotikumdosis wird in Nährbouillon *mit* Zusatz von 4% Human Albumin getestet.

Dazu werden Zentral-, Reservoir- und Antibiotikumkompartiment wie unter Nr. 1 beschrieben befüllt, allerdings mit der Besonderheit, dass in jedem der drei Kompartimente die Bouillon mit Albumin angereichert wird. Der Volumenanteil von humanem Albumin beträgt jeweils 4 %

(V/V). Aus ökonomischen Gründen soll nur wenig Albumin verbraucht werden, somit sind die Volumina des Zentral-, Reservoir- und Antibiotikumkompartiments entsprechend gering. Die Versuchsdurchführung wird wie 1. beschrieben fortgesetzt.

### 3.) Absterbekinetik mit Zusatz der freien Konzentration und ohne Albumin:

#### (≡ Bakterien + freier Anteil Antibiotikum)

Das Absterbeverhalten des Teststammes wird in Nährbouillon gegenüber dem Anteil der berechneten *freien* Konzentration *ohne* Zusatz von Albumin getestet.

Der Versuchsansatz Nr. 3 entspricht dabei dem Versuchsansatz Nr. 1. Allerdings wird nicht die Gesamtdosis Antibiotikum in das Antibiotikumgefäß gegeben, sondern eine Dosis, die dem berechneten freien Anteil des jeweiligen Antibiotikums entspricht. Nachfolgend aufgelistet sind die freien Anteile.

Meropenem, Proteinbindung (PB) 2%: Da der Anteil der freien Konzentration 98% der Gesamtkonzentration beträgt, ist gegenüber der Gesamtdosis keine Veränderung zu erwarten, daher wird auf die Simulation dieser Konzentration verzichtet.

Cefotaxim, PB 37%.....freier Anteil 63%

Cefoxitin, PB 70%.....freier Anteil 30%

Faropenem, PB 94%.....freier Anteil 6%

### **2.2.8.3 Pharmakokinetische Parameter für das *in-vitro* Modell**

Tab. 2.5: Pharmakokinetische Parameter

	Meropenem (PB 2%) <sup>1</sup>		Cefotaxim (PB 37%) <sup>2</sup>		
	ohne Albumin	mit Albumin	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
Dosis	500 mg	500 mg	2 g	2 g	63% von 2 g
Applikationsart	Kurzinfusion	Kurzinfusion	Kurzinfusion	Kurzinfusion	Kurzinfusion
C <sub>max</sub> [µg/mL]	26,00	26,00	125,86	125,86	75,52
t <sub>max</sub> [min]	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
AUC <sub>24</sub> [h.mg/L]	30,33	30,33	159,19	159,19	95,51
AUC <sub>12</sub> [h.mg/L]	30,33	30,33	158,73	158,73	95,24
t <sub>1/2</sub> [min]	115,50	115,50	80,60	80,60	80,60
k <sub>inf</sub> [µg/min]	0,143	0,201	0,694	0,160	0,417
ke <sub>1</sub> [1/min]	0,0210	0,0210	0,0183	0,0183	0,0183
ke <sub>2</sub> [1/min]	0,0120	0,0120	0,0086	0,0086	0,0086
ke <sub>3</sub> [1/min]	0,0060	0,0060	-	-	-
F [mL/ min]	1 (0-0,5h)	0,2 (0-0,5h)	1 (0-0,5h)	0,5 (0-0,5h)	1 (0-0,5h)
F <sub>1</sub> [mL/ min]	3,15 (0,5-2h)	0,42 (0,5-2h)	2,74 (0,5-3h)	0,55 (0,5-3h)	2,74 (0,5-3h)
F <sub>2</sub> [mL/ min]	1,8 (2-5h)	0,24 (2-5h)	1,3 (3-24h)	0,26 (3-24h)	1,3 (3-24h)
F <sub>3</sub> [mL/ min]	0,9 (5-24h)	0,12 (5-24h)	-	-	-
V(ZK) [mL]	150,00	20,00	150,00	30,00	150,00
V(AB) [mL]	100,00	20,00	100,00	50,00	100,00



Fortsetzung Tab. 2.5:

	Cefoxitin (PB 70%) <sup>3</sup>			Faropenem (PB 94%) <sup>4</sup>		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
Dosis	2 g	2 g	30% von 2 g	300 mg	300 mg	6% von 300 mg
Applikationsart	i.v. Bolus	i.v. Bolus	i.v. Bolus	per oral	per oral	per oral
Cmax [ $\mu\text{g/mL}$ ]	244,00	244,00	73,20	11,80	11,80	0,71
tmax [min]	0,00	0,00	0,00	60,00	60,00	60,00
AUC <sub>24</sub> [h.mg/L]	141,63	141,63	42,49	28,13	28,13	1,69
AUC <sub>12</sub> [h.mg/L]	141,63	141,63	42,49	28,13	28,13	1,69
t1/2 [min]	60,27	60,27	60,27	66,65	66,65	66,65
ka [1/min]	-	-	-	0,0868	0,0868	0,0868
ke1 [1/min]	0,0446	0,0446	0,0446	0,0104	0,0104	0,0104
ke1a [1/min] *)	0,0347	0,0347	0,0347	-	-	-
ke1b [1/min] *)	0,0255	0,0255	0,0255	-	-	-
ke2 [1/min]	0,0183	0,0183	0,0183	-	-	-
ke3 [1/min]	0,0115	0,0115	0,0115	-	-	-
F [mL/ min]	-	-	-	0,50 (0-1h)	0,2 (0-1h)	0,5 (0-1h)
F1 [mL/ min]	3,12 (0-20min)	0,89 (0-20min)	3,12 (0-20min)	1 (1-24h)	0,208 (1-24h)	1 (1-24h)
F1a [mL/ min] *)	2,43 (20-40min)	0,69 (20-40min)	2,43 (20-40min)	-	-	-
F1b [mL/ min] *)	1,79 (40-60min)	0,51 (40-60min)	1,79 (40-60min)	-	-	-
F2 [mL/ min]	1,28 (1-2h)	0,37 (1-2h)	1,28 (1-2h)	-	-	-
F3 [mL/ min]	0,81 (2-24h)	0,23 (2-24h)	0,81 (2-24h)	-	-	-
V(ZK) [mL]	70,00	20,00	70,00	100,00	20,00	100,00
V(AB) [mL]	-	-	-	50,00	20,00	50,00

**Tab. 2.5:** Cmax = maximale Plasmakonzentration; tmax = Zeit bis zum Erreichen des maximalen Plasmaspiegels; AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve nach 24 bzw. 12 Stunden; t1/2 = Eliminationshalbwertszeit; kinf = Infusionsgeschwindigkeitskonstante; ka = Absorptiongeschwindigkeitskonstante; ke1,2,3 = Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten; F = Flussrate während der Anflutungsphase; F1,2,3 = Flussraten während der Eliminationsphasen; V(ZK) = Volumen des Zentralkompartiments; V (AB) = Volumen des Antibiotikumkompartiments

\*) Zur Simulation der Kinetik von Cefoxitin musste die Eliminationsphase 1 in drei kurze Phase unterteilt, um sie den Probandendaten exakt anpassen zu können.

Quelle der pharmakokinetischen Daten: <sup>1</sup>Bax *et al.*, 1989 <sup>2</sup>Vallee *et al.*, 1991 <sup>3</sup>Ko *et al.*, 1989 <sup>4</sup>Dalhoff, 2001

Die Konzentrations-Zeit-Profile der Substanzen sind den Tabellen 7.6. bis 7.9. des Anhangs zu entnehmen.

#### 2.2.8.4 Mathematische Korrektur von Verdünnungseffekten

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten sogenannten „offenen“ *in-vitro* Modell, bei dem die Bakterien im Gegensatz zum „geschlossenen“ *in-vitro* Modell nicht durch einen Filter zurückgehalten werden (Löwdin *et al.*, 1996), wird die Keimzahl nicht nur aufgrund der Wirksamkeit des Antibiotikums verringert. Vielmehr führt der kontinuierliche Fluss von Nährmedium einschließlich Bakterien aus dem Zentralkompartiment zu einer Verringerung derselbigen. Aufgrund langer Versuchslaufzeit von 24 Stunden und hohen Flussraten führt dies zur Überbewertung des

antibakteriellen Effektes des Antibiotikums. Daher wird die experimentell ermittelte Keimzahl mit Hilfe nachfolgender Formel korrigiert (Keil *et al.*, 1995):

$$N'(t) = N(t) \times e^{f \times \Sigma (ke \times \Delta t)} \quad (2.2.)$$

$$N'(t) = N_{\max} \times N(t) / \{N(t) + [N_{\max} - N(t)] \times e^{-f \times \Sigma (ke \times \Delta t)}\} \quad (2.3.)$$

**Gleichungen (2.2.) und (2.3.):**  $N'(t)$  = korrigierte Keimzahl in KBE/mL zum Zeitpunkt  $t$ ;  $N(t)$  = Anzahl der KBE/ mL in einer zum Zeitpunkt  $t$  aus dem *in-vitro* Modell entnommenen Probe;  $N_{\max}$  = maximale Keimzahl;  $f$  = Korrekturfaktor (0,5 – 1);  $ke$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante;  $\Delta t$  = Zeitintervall zwischen  $t = 0h$  und der betrachteten Zeit, in dem die jeweilige  $ke$  konstant ist

Die Gleichung (2.2.) entspricht einer unbegrenzten Exponentialfunktion, die bei einem Wiederanwachsen der Bakterien im Modell nach 12 - 24 h zu korrigierten Keimzahlen führen würde, die oberhalb der maximal möglichen Keimzahl lägen. Daher wird zur Berechnung der Keimzahlen des 12 und 24 h Wertes die modifizierte Gleichung (2.3.) verwendet, die einen über  $N_{\max}$  liegenden Wert für die korrigierte Keimzahl ausschließt.

### 2.2.8.5 Simulation des Konzentrations-Zeit-Verlaufes nach Einmaldosierung bei Resorption 0. Ordnung im *in-vitro* Modell

Die Simulation des Konzentrations-Zeit-Verlaufes bei Verwendung der Modellanordnung 2.2.8.1.1 entspricht einer zeitabhängigen Entwicklung von Wirkstoffspiegeln *in-vivo* nach intravenöser Kurzinfusion. Diese ist bis Erreichen des maximalen Plasmaspiegels durch Gleichung 2.4. beschreibbar:

$$C = \frac{\text{kinf}}{ke \times Vd} (1 - e^{-ke \times t}) \quad (2.4.)$$

**Gleichung (2.4.):**  $C$  = Antibiotikumkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ];  $\text{kinf}$  = Infusionsgeschwindigkeitskonstante [ $\mu\text{g/min}$ ];  $ke$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [ $1/\text{min}$ ];  $Vd$  = Verteilungsvolumen [ $\text{mL}$ ] = Zeit [ $\text{min}$ ]

Nach Abbruch der Infusion wird das Antibiotikum nach einer Kinetik erster Ordnung aus dem Organismus eliminiert. Dies ist *in vivo* beschrieben durch Gleichung 2.5.:

$$C = C_{\max} \times e^{-k_e \times t} \quad (2.5.)$$

**Gleichung (2.5.):** C = Antibiotikumkonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ];  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [ $1/\text{min}$ ]; t = Zeit [ $\text{min}$ ]

Für die Simulation der Kinetik im *in-vitro* Modell werden diese Formeln modifiziert, um eine praktische Anwendung zu ermöglichen.

Im *in-vitro* Modell besteht eine proportionale Abhängigkeit zwischen der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante  $k_e$ , der Flussrate F sowie dem Volumen des Zentralkompartiments V. Diese ist durch folgende Formel beschrieben:

$$k_e = F / V \quad (2.6.)$$

**Gleichung (2.6.):**  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [ $1/\text{min}$ ]; V = Volumen des Zentralkompartiments [ $\text{mL}$ ]; F = Flussrate [ $\text{ml}/\text{min}$ ]

Durch Modifikation der Gleichung (2.4.) erhält man Gleichung (2.7.). Mit den durch die Probandendaten gegebenen Parameter  $C_{\max}$  und  $t_{\max}$  sowie ein vom Experimenteur frei gewähltes Volumen des Zentralkompartiments V und eine frei gewählte Flussrate F ist es möglich, die Konzentration  $C_x$  zu berechnen, die im Antibiotikumgefäß eingesetzt werden muss, um zum Zeitpunkt  $t_{\max}$  den Plasmaspiegel  $C_{\max}$  zu erhalten. Flussrate F und Volumen des Zentralkompartiments V können daher so gewählt werden, dass sowohl experimentelle als auch ökonomische Gründe berücksichtigt werden.

$$C_x = \frac{C_{\max}}{1 - e^{-F/V \times t_{\max}}} \quad (2.7.)$$

**Gleichung (2.7.):**  $C_x$  = Konzentration, die im Antibiotikumgefäß eingesetzt wird [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ];  $C_{\max}$  = maximale Plasmakonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]; t = Zeit [ $\text{min}$ ]; F = Flussrate [ $\text{mL}$ ]; V = Volumen des Zentralkompartiments [ $\text{mL}$ ]

Da Eliminationsgeschwindigkeitskonstante und das Volumen des Zentralkompartiments bekannt sind, kann mit Hilfe der Gleichung (2.8.) die Flussrate bestimmt werden, die nötig ist, um das Antibiotikum nach Erreichen des maximalen Plasmaspiegels aus dem Zentralkompartiment nach einer Kinetik erster Ordnung zu eliminieren. Sollten mehrere Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten vorliegen, so wird für jede einzelne eine Flussrate berechnet.

$$F = k_e \times V \quad (2.8.)$$

**Gleichung (2.8.):**  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/min];  $V$  = Volumen des Zentralkompartiments [mL];  $F$  = Flussrate [ml/ min]

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten der Eliminationsphase werden aus dem absteigenden Teil des halblogarithmisch aufgetragenen Konzentrations-Zeit-Verlaufs berechnet:

$$k_e = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1} \quad (2.9.)$$

**Gleichung (2.9.):**  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/min];  $\ln C$  = natürlicher Logarithmus der Antibiotikumkonzentration;  $t$  = Zeit [min]

#### **2.2.8.6 Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung ohne Resorption und mit anschließender Elimination**

Die Simulation des Konzentrations-Zeit-Verlaufes bei Verwendung der Modellanordnung 2.2.8.1.2 entspricht einer zeitabhängigen Entwicklung von Wirkstoffspiegeln *in-vivo* nach intravenöser Bolus Injektion. Die Menge Antibiotikum, die zum Zeitpunkt  $t = 0h$  in das Zentralkompartiment injiziert wird, berechnet sich aus dem Produkt des Volumen des Zentralkompartiments und der Konzentration  $C_0$ .

$$\text{Dosis} = C_0 \times V(\text{ZK}) \quad (2.10.)$$

Nachfolgend wird das Antibiotikum entsprechend der Gleichung (2.8.) aus dem Zentralkompartiment eliminiert.

#### **2.2.8.7 Einstellung der Peristaltikpumpe**

Vor Beginn der Experimente werden die zwei in dieser Arbeit verwendeten Peristaltikpumpen für die jeweils drei verwendeten Pumpschläuche kalibriert.

Dabei kann nach Bestimmung der Flussrate die Einstellung der jeweiligen Pumpe mit dem jeweiligen Schlauch nach folgenden Gleichungen berechnet werden:

Peristaltikpumpe IPN-8

Pumpschlauch Tygon R 2607 Color-Code	Flussraten von...bis... [mL/ min]	Einstellung der Pumpe (F = Flussrate)
weiß-orange	0 - 0,493	200,82 x F
rot-grau	0 - 1,653	59,875 x F
violett-schwarz	0 - 5,668	19,26 x F - 0,528

Peristaltikpumpe IPC N-8

Pumpschlauch Tygon R 2607 Color-Code	Flussraten von...bis... [mL/ min]	Einstellung der Pumpe (F = Flussrate)
weiß-orange	0 - 2,357	42,425 x F
rot-grau	0 - 7,993	12,511 x F
violett-schwarz	0 - 21,43	4,6658 x F

Durch Einsetzen der unterschiedlichen Pumpen und Pumpschläuche kann eine Vielzahl von Flussraten sehr genau simuliert werden.

**2.2.9 Versuchsauswertung****2.2.9.1 Pharmakodynamische Parameter****2.2.9.1.1 Bestimmung des AAC-Wertes**

Der AAC (area above the curve) -Wert ist die Fläche oberhalb der Absterbekinetik eines Erregers gegenüber einem Antibiotikum bei einer Dosierung. Dabei ist der AAC-Wert ein pharmakodynamischer Parameter und stellt ein relatives Maß für die Anzahl der abgestorbenen Bakterien dar (Rustige *et al.*, 1990).

Flächen, die oberhalb des Ausganginokulums liegen, werden als negativ bewertet, da in diesem Fall die Bakterien anwachsen. Positive Werte deuten auf eine Abtötung der Bakterien hin (Abb. 2.4).

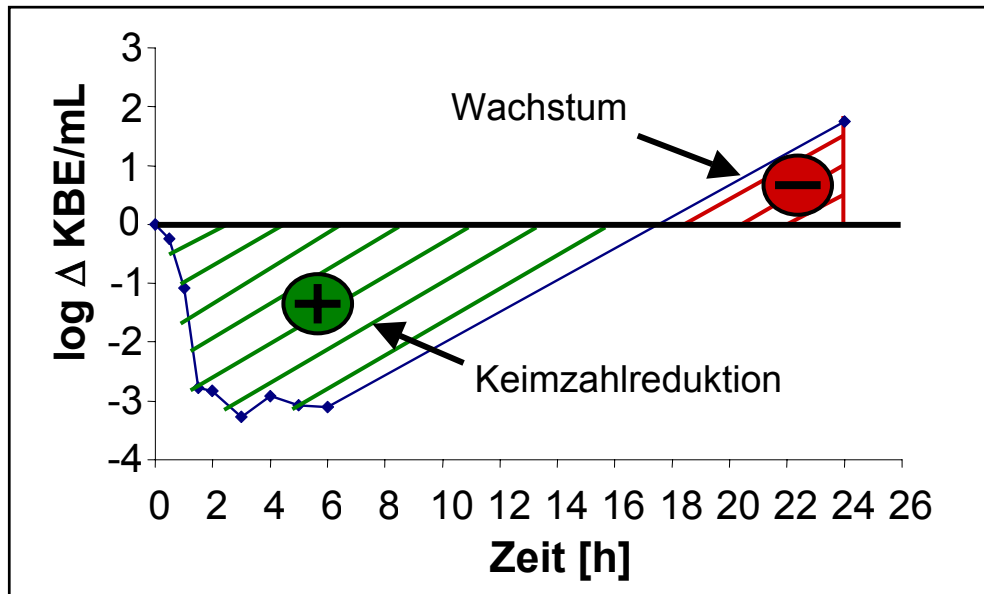


Abb. 2.4: Graphische Darstellung des AAC-Wertes (Fläche oberhalb der Absterbekinetik)

### 2.2.9.1.2 Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Die in der Batchkultur ermittelten Effekte in Form des AAC-Wertes werden in einem Diagramm gegenüber der eingesetzten Konzentration aufgetragen. Für jedes Antibiotikum, jeden Stamm und jeden Versuchsansatz (ohne Albumin, mit Albumin oder freier Anteil) erhält man dann jeweils eine sogenannte Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Dabei ist zu beachten, dass bei der Simulation des freien Anteils als Startkonzentration in der Batchkultur nur ein Bruchteil der Gesamtdosis eingesetzt wird (Abb. 2.5 a).

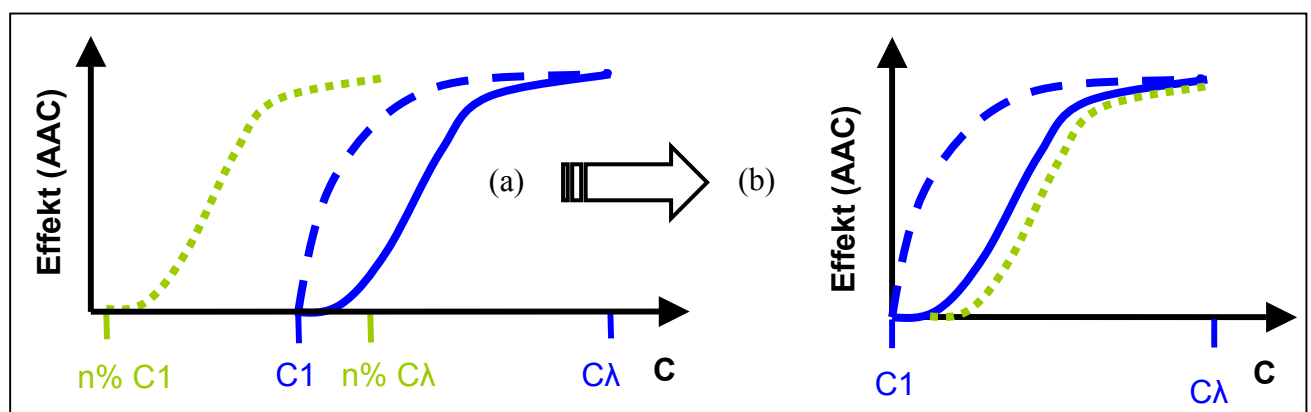


Abb. 2.5 a und b: grüne, gepunktete Kurve: Konzentrations-Wirkungskurve des freien Anteils; blaue, gestrichelte Kurve: Konzentrations-Wirkungskurve ohne Albumin; blaue, durchgehende Kurve: Konzentrations-Wirkungskurve mit Albumin

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen allerdings nicht die Darstellungsweise der Abb. 2.5 a gewählt. Die Konzentrations-Wirkungskurve des „freien Anteils“ wird in den Bereich verschoben, in dem auch die Kurven „ohne/ mit“ Albumin liegen (Abb.2.5 b)

### 2.2.9.1.3 Bestimmung von $EC_{50}$ und $E_{max}$

Jede Konzentrations-Wirkungsbeziehung lässt sich durch das sogenannte Emax-Modell beschreiben. Dazu werden die experimentell erhaltenen Daten an das Emax-Modell „gefittet“, das heißt, die Gleichung wird an die Daten angepasst. Das Computerprogramm GraFit® berechnet hierzu die Kurvenparameter  $EC_{50}$  (Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt erreicht ist) und  $E_{max}$  (maximaler Effekt), die charakteristisch für den Kurvenverlauf sind. Der Vergleich der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte liefert Aussagen über den „Abstand“ der erhaltenen Kurven. Ein niedriger  $EC_{50}$  Wert ( $EC_{50a}$ ) deutet darauf hin, dass „wenig“ Antibiotikum nötig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen. Ein im Vergleich höherer  $EC_{50}$  Wert ( $EC_{50b}$  oder  $EC_{50c}$ ) bedeutet, dass eine größere Menge des Antibiotikums nötig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen. Auf die Proteinbindung bezogen lässt ein höherer  $EC_{50}$ -Wert Rückschlüsse auf eine verminderte Aktivität zu, wenn beispielsweise Antibiotikum durch Bindung an Proteine nicht komplett aktiv ist.

$$E = \frac{E_{max} * C}{EC_{50} + C} \quad (2.11.)$$

Gleichung (2.11.): E = Effekt (hier in Form des AAC-Wertes); c = Konzentration;  $E_{max}$  = maximaler Effekt,  $EC_{50}$  = Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt erreicht ist

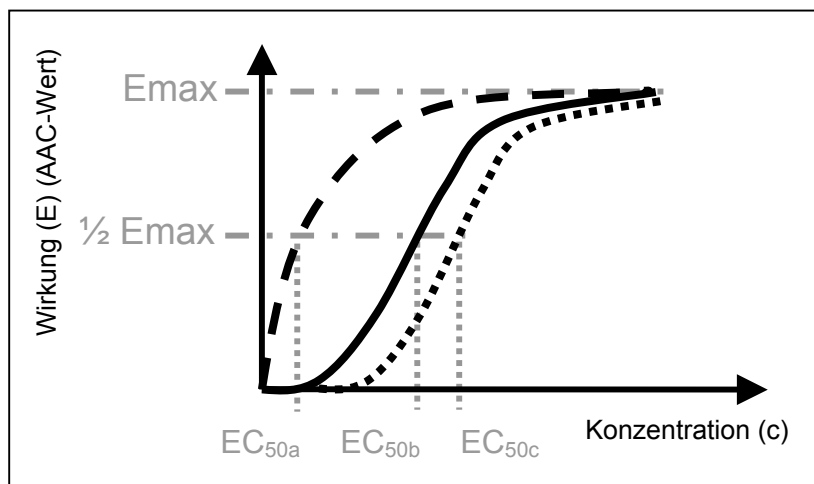


Abb. 2.6: Graphische Darstellung des  $E_{max}$ -Wertes und unterschiedlicher  $EC_{50}$ -Werte

#### 2.2.9.1.4 Modifikation des AAC-Wertes

Bei der Ermittlung der kurvenspezifischen Parameter  $EC_{50}$  und  $E_{max}$  mit Hilfe des Computerprogramms GraFit® können nur *positive* Werte in die Berechnung des Kurvenverlaufes mit einbezogen werden. Der Berechnung liegen allerdings AAC-Werte zugrunde, die *negative* Werte aufweisen können. Um diese negativen Werte nicht aus der Berechnung ausschließen zu müssen, werden die AAC-Werte „modifiziert“. Zu allen ermittelten (positiven und negativen) AAC-Werten wird der Betrag des AAC-Wertes der Wachstumskontrolle addiert. Dies führt zu einer Verschiebung der AAC-Werte in den positiven Bereich. Allerdings treten so vereinzelt immer noch Werte auf, die nach dieser Addition immer noch negativ sind (vgl. 7.4.). Diese werden dann gleich „Null“ gesetzt. Diese modifizierten AAC-Werte werden für die Bestimmung der  $E_{max}$  und  $EC_{50}$ -Werte eingesetzt.

Der AAC-Wert der Wachstumskontrolle wird wie folgt ermittelt:

Das Wachstumsverhalten der Stämme ohne und mit Zusatz von Human Albumin wird gemäß 2.2.7 Abschnitt 1 und 2 ermittelt. Die AAC-Werte werden für jeden Stamm ohne und mit Albumin berechnet, addiert und gemittelt (vgl. 3.3).

#### 2.2.9.2 Pharmakokinetische Parameter

Die AUC (area under the curve  $\equiv$  Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) nach 24 Stunden wird mit Hilfe der Trapezregel berechnet (2.12.).

$$AUC_{24} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{i-1} + C_i}{2} \cdot (t_i - t_{i-1}) + \frac{C_n}{\lambda_z} \quad (2.12.)$$

Gleichung (2.12.): AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve [mg.h/L]; c = Antibiotikumkonzentration [mg/L]; t = Zeit [h];  $\lambda_z$  = terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/h]

Die Fläche wird hierdurch in einzelne Trapeze eingeteilt, deren Flächen addiert werden (Bauer *et al.*, 1997).

Die Halbwertszeit ist die Zeitspanne, in der eine Konzentration auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abfällt und kann mit Hilfe der Gleichung 2.13. berechnet werden.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e = 0,693 / k_e \quad (2.13.)$$

Gleichung (2.13.):  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit [min];  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min]



### 2.2.9.3 Pharmakologische Indizes

Die drei in dieser Arbeit verwendeten pharmakologischen Indizes werden wie folgt berechnet:

#### **AUC/MHK [h]:**

Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 Stunden dividiert mit der MHK des Erregers. Wird ein Zeitraum abweichend von 24 Stunden gewählt, so wird dies durch einen Index gekennzeichnet (Mouton *et al.*, 2002).

#### **$C_{\max}$ /MHK [dimensionslos]:**

Die maximale Plasmakonzentration dividiert mit der MHK des Erregers (Mouton *et al.*, 2002).

#### **$T_{>MHK}$ [%]:**

Kumulativer Prozentsatz der Zeit über 24 Stunden, in der die Antibiotikumkonzentration oberhalb der MHK des Erregers liegt (Mouton *et al.*, 2002).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden gegenüber den Antibiotika auf ihre Empfindlichkeit getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: MHK-Werte der untersuchten Antibiotika

Antibiotikum	MHK	MHK	MHK
	<i>Staphylococcus aureus</i> III-3-35 [mg/L]	<i>Haemophilus influenzae</i> III-10-02 [mg/L]	<i>Streptococcus pneumoniae</i> III-10-62 [mg/L]
Meropenem	0,25	0,06	1
Cefotaxim	2	0,06	0,5
Cefoxitin	4	4	64
Faropenem	0,125	0,5	0,25
Gatifloxacin	0,0625	n.b.	n.b.
Moxifloxacin	0,0625	n.b.	n.b.
Trovafloracin	0,0625	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

#### 3.2 Bestimmung der Proteinbindung der $\beta$ -Laktame mit Hilfe der MHK

Mit dem unter 2.2.3. vorgestellten mikrobiologischen Assay wurde überprüft, ob die Proteinbindungen der Antibiotika mit den in der Literatur angegebenen Daten übereinstimmen. Die Proteinbindung von Meropenem beträgt dort 2%, von Cefotaxim 37%, von Cefoxitin 70% und von Faropenem 94% (vgl. 2.2.3).

Tabelle 3.2 zeigt die ermittelten MHK-Daten zum einen ohne, zum anderen mit Zusatz von 4% Albumin. Mit Hilfe der Gleichung 2.1. wurde sodann die Proteinbindungen für die  $\beta$ -Laktame berechnet. Die Mittelwerte der Proteinbindung der Antibiotika liegen für Meropenem bei  $0\% \pm 0$ , für Cefotaxim bei  $29,67\% \pm 25,08$ , für Cefoxitin bei  $56,25\% \pm 10,83$  und für Faropenem bei  $85,42\% \pm 7,80$ . Die mit dieser Methode erhaltenen Mittelwerte liegen unterhalb der in der Literatur angegebenen Werte. Aufgrund der Ungenauigkeit dieser Methode und der hohen Standardabweichungen wurden für die nachfolgenden Untersuchungen die in der Literatur angegebenen Werte verwendet.

Tabelle 3.2: Bestimmung der Proteinbindung der  $\beta$ -Laktame mit Hilfe der MHK  
 Legende: PB (%)= Proteinbindung in Prozent; - = ohne Albumin; + = mit Albumin

	MEROPENEM			CEFOTAXIM			CEFOXITIN			FAROPENEM		
	-	+	PB (%)	-	+	PB (%)	-	+	PB (%)	-	+	PB (%)
<i>S. aureus</i> III-3-35	0,25	0,25	0	1	2	50	2	4	50	0,25	4	93,75
<i>S. aureus</i> III-3-35	0,25	0,25	0	2	2	0	2	4	50	0,25	4	93,75
<i>S. aureus</i> III-3-35	0,25	0,25	0	2	2	0	2	4	50	0,25	4	93,75
<i>S. pneumoniae</i> III-10-62	0,5	0,5	0	1	1	0	64	128	50	0,5	4	87,5
<i>S. pneumoniae</i> III-10-62	0,5	0,5	0	1	2	50	64	128	50	0,25	2	87,5
<i>S. pneumoniae</i> III-10-62	0,5	0,5	0	1	2	50	64	128	50	0,5	2	75
<i>H. influenzae</i> III-10-02	0,125	0,125	0	0,03	0,03	0	2	8	75	1	8	87,5
<i>H. influenzae</i> III-10-02	0,125	0,125	0	0,03	0,03	0	2	8	75	1	8	87,5
<i>H. influenzae</i> III-10-02	0,125	0,125	0	0,015	0,03	50	2	8	75	0,5	8	93,75
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,5	0,5	0	0,06	0,125	52	2	4	50	2	8	75
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,5	0,5	0	0,06	0,125	52	2	4	50	2	8	75
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,5	0,5	0	0,06	0,125	52	2	4	50	2	8	75
<b>mittlere PB (%)</b>	<b>0,00</b>			<b>29,67</b>			<b>56,25</b>			<b>85,42</b>		
<b>Standardabweichung:</b>	<b>0,00</b>			<b>25,08</b>			<b>10,83</b>			<b>7,80</b>		

### 3.3 Untersuchung des Wachstums der Stämme in der Batchkultur

Die Bestimmung des Wachstums der Bakterien dient zur Berechnung der unter 3.7. aufgeführten Emax- und EC<sub>50</sub>-Werte (vgl. Methode 2.2.9.1.3). Die Bestimmung des Wachstums wurde in der Batchkultur über einen Zeitraum von 6 Stunden ohne und mit Zusatz von 4% Albumin in einem Drei- (*S. pneumoniae*), Fünf- (*S. aureus*), bzw. Sechsfachansatz (*H. influenzae*) ermittelt (Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3). In den Abbildungen 3.1 bis 3.3 ist die Standardabweichung der einzelnen Zeitdaten durch die Balken gekennzeichnet. Die AAC-Werte für die Untersuchungen ohne und mit Albumin wurden für jeden Stamm berechnet und das arithmetische Mittel bestimmt (vgl. Tabelle 3.2).

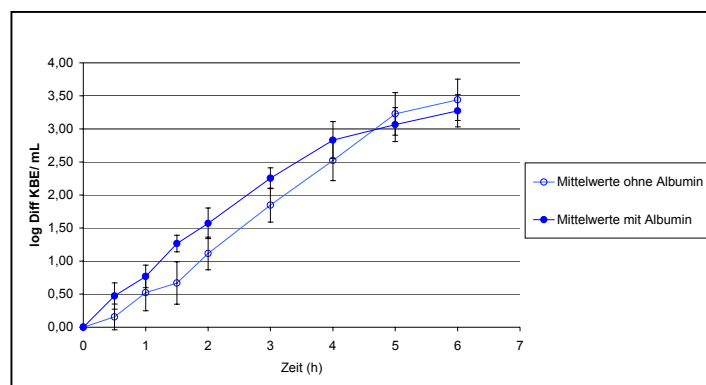


Abbildung 3.1: Fünffachbestimmung des Wachstums von *S. aureus* (ohne und mit Albumin)

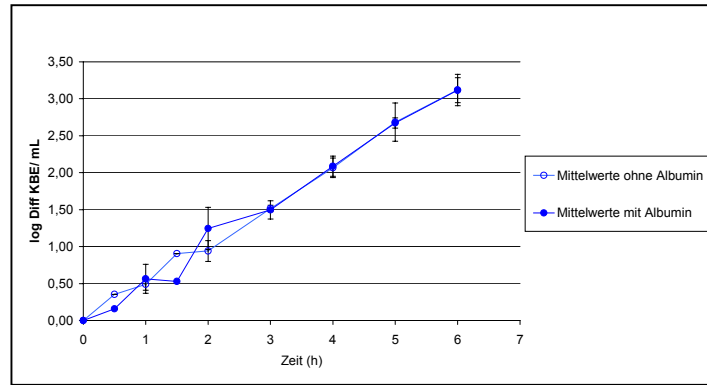


Abbildung 3.2: Dreifachbestimmung des Wachstums von *S. pneumoniae* (ohne und mit Albumin)

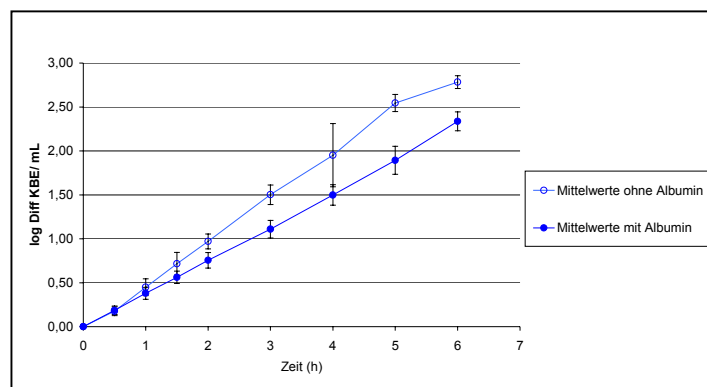


Abbildung 3.3: Sechsfachbestimmung des Wachstums von *H. influenzae* (ohne und mit Albumin)

Bei den Stämmen *S. aureus* und *S. pneumoniae* ist das Wachstumsverhalten ohne und mit Albumin fast gleich. Bei *H. influenzae* zeigt sich bei Zusatz von Albumin ein vermindertes Wachstum. Die Untersuchung ohne Albumin zeigt nach 6 Stunden eine maximale Keimzahl von 2,78 im Vergleich zu 2,34  $\Delta$  log KBE/ mL beim Ansatz mit Albumin.

Tabelle 3.3: Die AAC-Werte der Wachstumskontrollen der Stämme *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* jeweils ohne und mit Albumin sowie die daraus berechneten arithmetischen Mittel

	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
ohne Albumin	-10,68 $\pm$ 0,74	-9,27 $\pm$ 0,75	-8,79 $\pm$ 0,49
mit Albumin	-12,16 $\pm$ 1,05	-9,62 $\pm$ 0,58	-6,80 $\pm$ 0,47
<b>Mittelwert</b>	<b>-11,42</b>	<b>-9,445</b>	<b>-7,795</b>

Tabelle 3.3 zeigt die in den Wachstumsversuchen ermittelten AAC-Werte, jeweils für die Simulation ohne und mit Albumin. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Der Betrag des Mittelwertes dient zur Modifikation der in den Tabellen 7.10 bis 7.23

aufgeführten AAC-Werte aus den Absterbekinetiken der  $\beta$ -Laktame und Chinolone in der Batchkultur zur Berechnung der Parameter  $E_{max}$  und  $EC_{50}$  mit Hilfe des  $E_{max}$ -Modells. (vgl. 2.2.9.1.4) (vgl. Tabellen 3.4 und 3.5).

### 3.4 Ermittlung des methodischen Fehlers der Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung des Fehlers der Keimzahlbestimmung ermöglicht eine Aussage über die Präzision der experimentellen Daten. Ausgehend von der unter 2.2.6 vorgestellten Methode zeigt Abbildung 3.4 die Abweichung bei einer zehnfachen Bestimmung der Keimzahl von *S. aureus* in Gegenwart von Faropenem (Konzentration: 4-fache MHK) und in Abwesenheit eines Antibiotikums.

Die Standardabweichungen der Keimzahlbestimmungen liegen zwischen 0,4 log KBE/mL im günstigstem Fall und 0,71 log KBE/mL, also fast einer Dreiviertel Zehnerpotenz, im ungünstigsten Fall. Im Mittel liegt die Abweichung der Keimzahlbestimmung bei 0,54 log KBE/mL. Dieses Ergebnis gibt Aufschluss darüber, wie groß die Schwankungsbreite der Keimzahlbestimmung ist.

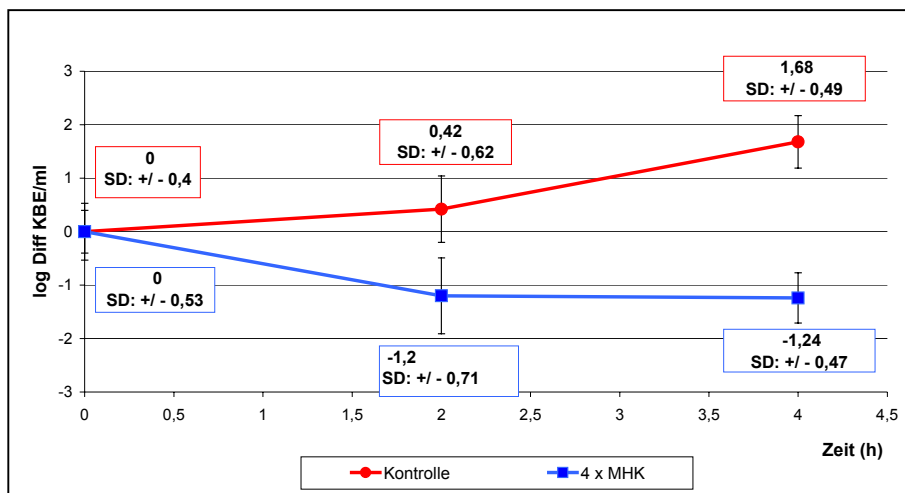


Abbildung 3.4: Ermittlung des methodischen Fehlers bei einer zehnfachen Bestimmung der Keimzahl von *S. aureus*. Legende: SD: Standardabweichung vom Mittelwert

### 3.5 Bestimmung des Einflusses der Proteinbindung der $\beta$ -Laktame auf deren Pharmakodynamik

Im nachfolgenden Abschnitt wird der Einfluss der Proteinbindung in der Batchkultur und im *in-vitro* Modell auf die Wirkung der Antibiotika Meropenem, Cefotaxim, Cefoxitin und Faropenem untersucht. Es wird zunächst jeweils die Auswirkung der Proteinbindung auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur und sodann bei Standarddosierungen im *in-vitro* Modell näher untersucht.

Die einzelnen Absterbekinetiken der Batchkultur, die die Grundlage für die Berechnung der AAC-Werte und somit für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven herangezogen werden, sind im Anhang dieser Arbeit in den Tabellen 7.24 bis 7.27 aufgeführt.

#### 3.5.1 Meropenem (PB 2%)

##### 3.5.1.1 Einfluss der Proteinbindung von Meropenem auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

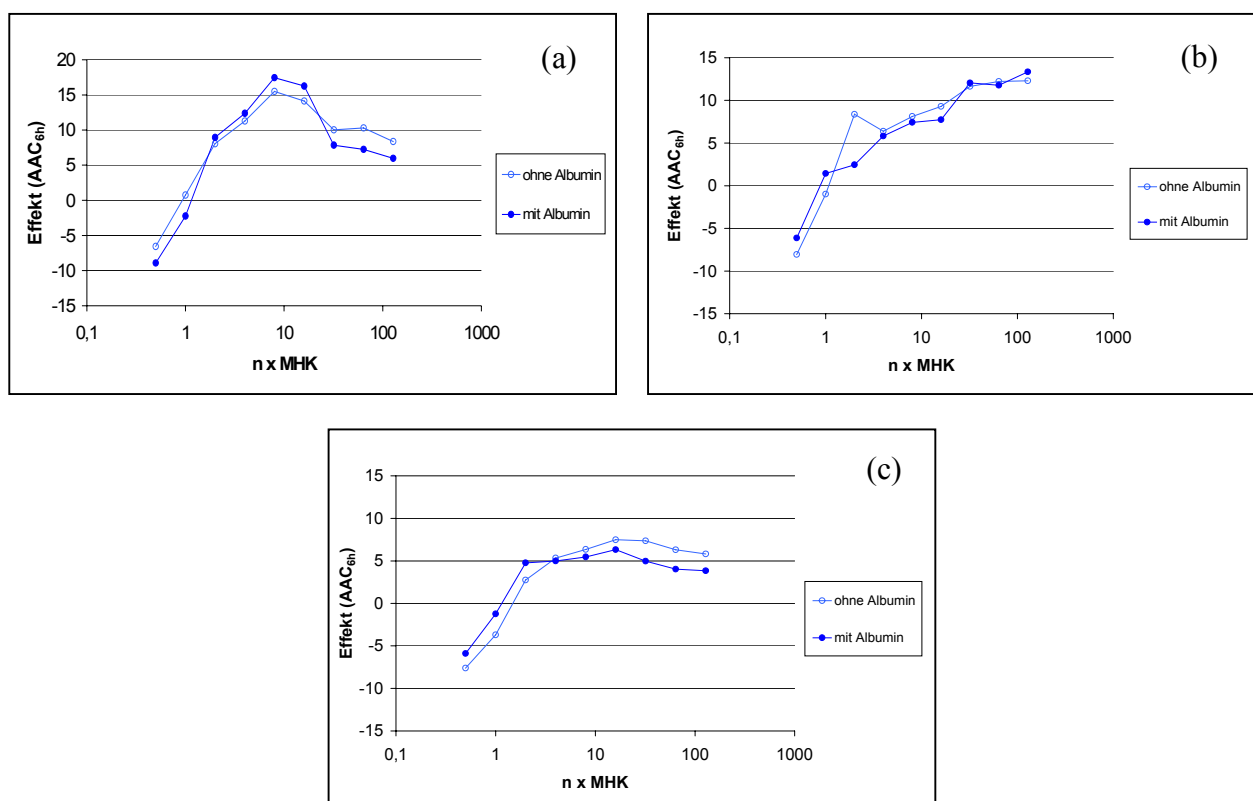


Abb. 3.5: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Meropenem gegenüber *S. aureus* (a), *S. pneumoniae* (b) sowie *H. influenzae* (c), mit und ohne Zusatz von Albumin in der Batchkultur

In der Batchkultur wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* bei unterschiedlichen Meropenemkonzentrationen (0,5-128-fache MHK) über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Dies zum einen ohne Zusatz von Albumin in reiner Nährbouillon,

zum anderen mit Albumin. Die AAC-Werte der so erhaltenen Absterbekinetiken wurden berechnet und gegenüber der eingesetzten Meropenemkonzentration in einem Diagramm aufgetragen (vgl. 2.2.7).

#### **Meropenem - *Staphylococcus aureus***

Sowohl die Versuchsansätze ohne als auch mit Zusatz von Albumin zeigen zunehmende antibakterielle Aktivität von Meropenem bei zunehmender Konzentration. Dabei ist festzustellen, dass bis zum 8-fachen der MHK eine Wirkungssteigerung zu beobachten ist, der antibakterielle Effekt danach allerdings mit steigender Dosis wieder abnimmt. Des Weiteren ist kein Unterschied im Absterbeverhalten von *S. aureus* gegenüber Meropenem ohne und mit Albuminzusatz zu erkennen, beide Kurven sind deckungsgleich (Abb. 3.5 (a)).

#### **Meropenem - *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* zeigt bei zunehmender Meropenemkonzentration in den Versuchsansätzen ohne als auch mit Zusatz von Albumin eine Steigerung des antibakteriellen Effektes bis zur 32-fachen MHK. Darüber hinaus ist keine Erhöhung der Wirkung mehr erkennbar. Da beide Kurven größtenteils kongruent sind, ist eine Änderung in der antibakteriellen Aktivität Meropenems bei zugesetztem Albumin nicht feststellbar (Abb. 3.5 (b)).

#### **Meropenem - *Haemophilus influenzae***

Bei der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Meropenem gegenüber *H. influenzae* zeigt ohne als auch mit Zusatz von Albumin eine Zunahme des antibakteriellen Effekts bis zum 2-fachen der MHK, ab dem 4-fachen der MHK ist nur noch eine bedingte Effektivitätssteigerung erkennen. Wie bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* bereits festgestellt, sind auch bei *H. influenzae* die Unterschiede der antibakteriellen Wirkung Meropenems ohne und mit Albuminzusatz marginal (Abb. 3.5 (c)).

### 3.5.1.2 Einfluss der Proteinbindung von Meropenem auf die Pharmakodynamik im *in-vitro* Modell

Die humane Pharmakokinetik einer 30-minütigen Kurzinfusion einer 500 mg Dosis von Meropenem wurde über den Zeitraum von 24 Stunden im pharmakologischen *in-vitro* Modell simuliert. Parallel dazu wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* ohne und mit Zusatz von Albumin ermittelt (vgl. 2.2.8). Die simulierten Kinetikdaten dieser Applikation sind in der Tabelle 7.6 im Anhang dargestellt.

#### Meropenem - *Staphylococcus aureus*

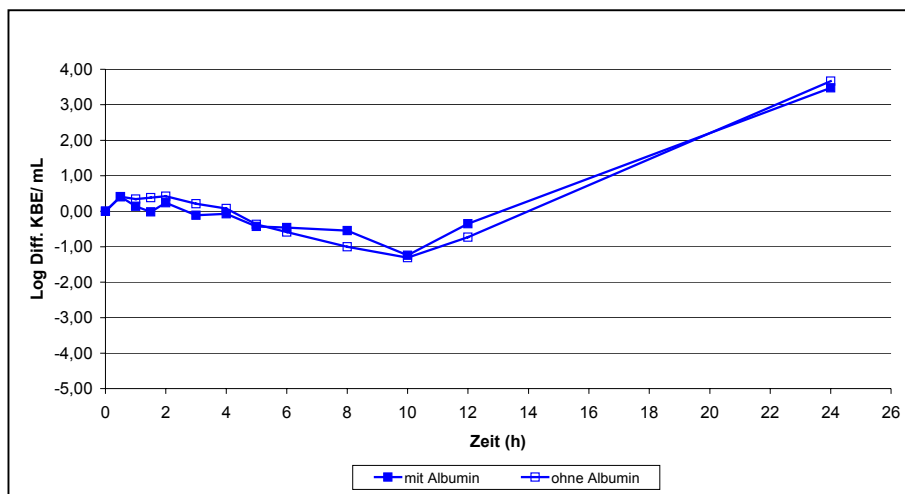


Abbildung 3.6: Absterbekinetik von *S. aureus* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 500 mg Dosis Meropenem als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Die Wirkung von Meropenem wird durch den Zusatz von Albumin nicht verändert, beide Absterbekinetiken zeigen den gleichen Kurvenverlauf. Die maximale Keimzahlreduktion von  $-1,3 \log \Delta$  KBE/mL tritt nach 10 Stunden auf. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einem Wiederauwachen der Zellen (vgl. Abb. 3.6).



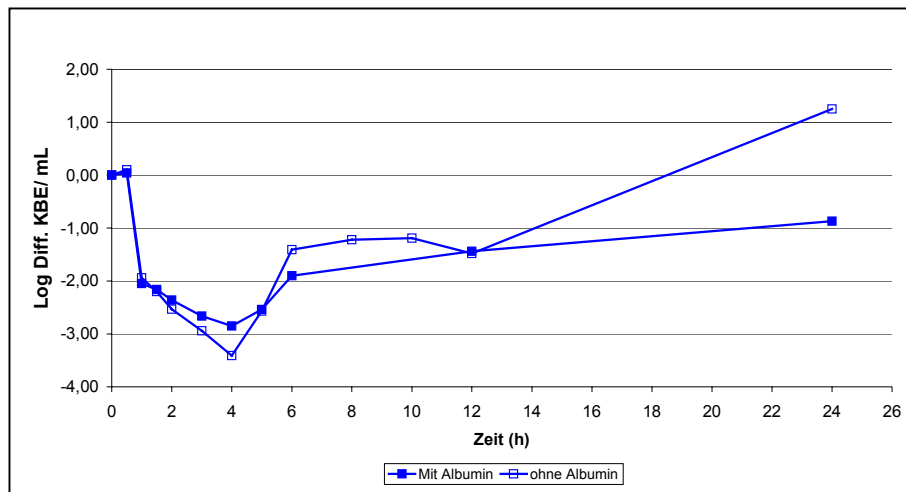
**Meropenem - *Streptococcus pneumoniae***

Abbildung 3.7: Absterbekinetik von *S. pneumoniae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 500 mg Dosis Meropenem als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Die Absterbekinetiken von *S. pneumoniae* ohne und mit Albumin weisen bis zum Zeitpunkt von 12 Stunden einen relativ einheitlichen Verlauf mit einer maximalen Keimzahlreduktion zum Zeitpunkt von 4 Stunden auf ( $R_{max}$ :  $-3,41 \log \Delta$  KBE/mL). Hiernach kommt es zu einem Wiederauwachsen der Zellen. Auffällig ist die Diskrepanz zwischen dem 24 Stunden-Wert ohne und mit Zusatz von Albumin: bei dem Versuchsansatz ohne Albumin wachsen die Zellen nach 24 Stunden über das Ausgangsinokulum hinaus wieder an ( $1,25 \log \Delta$  KBE/mL), währenddessen ist bei dem Versuchsansatz mit Albumin auch nach 24 Stunden eine im Vergleich zum Ausgangsinokulum um  $-0,87 \log \Delta$  KBE/mL reduzierte Keimzahl zu beobachten (vgl. Abb. 3.7).

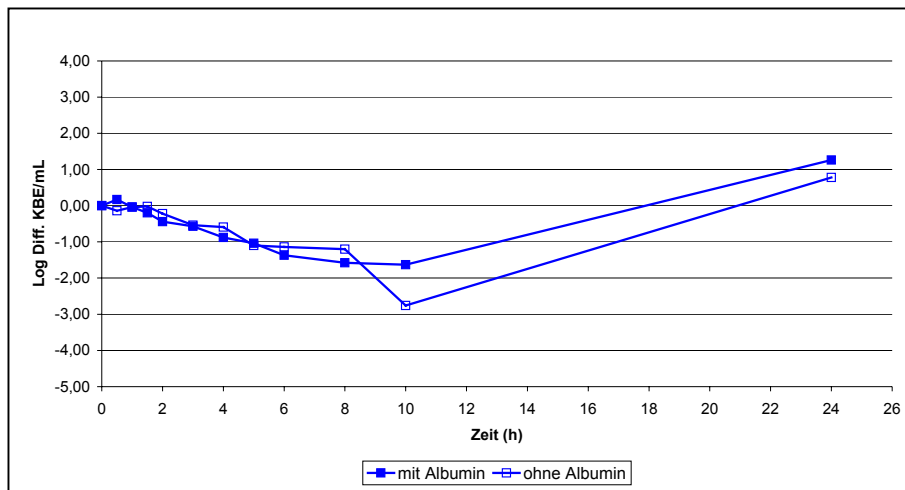
**Meropenem - *Haemophilus influenzae***

Abbildung 3.8: Absterbekinetik von *H. influenzae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 500 mg Dosis Meropenem als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Wie bei den gram-positiven Erregern kann auch bei *H. influenzae* kein Unterschied im Absterbeverhalten ohne und mit Albuminzusatz erkannt werden, die Absterbekinetiken sind bis auf die im Fehlerbereich liegenden Unterschiede gleich. Bis Stunde 10 ist eine kontinuierliche Keimzahlreduktion bis  $-2,76 \log \Delta \text{ KBE/mL}$  zu beobachten. Danach kommt es zu einem Wiederanwachsen der Zellen (vgl. Abb. 3.8).

### 3.5.2 Cefotaxim (PB 37%)

#### 3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Cefotaxim auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

In der Batchkultur wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* bei unterschiedlichen Cefotaximkonzentrationen (0,5-128-fache MHK bei *S. aureus*, 0,5 bis 64-fachen MHK bei *S. pneumoniae* und *H. influenzae*) über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Dies erfolgte zum einen nach Zugabe der Gesamtkonzentration des Antibiotikums ohne als auch mit Zusatz von Albumin. Zum anderen wurde das Absterbeverhalten der Stämme nach Gabe des Anteils an Antibiotikum bestimmt, der der berechneten frei vorliegenden Fraktion entspricht (vgl. 2.2.7). Aus den gewonnenen Daten wurden nach Methode 2.2.9.1.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen erstellt.

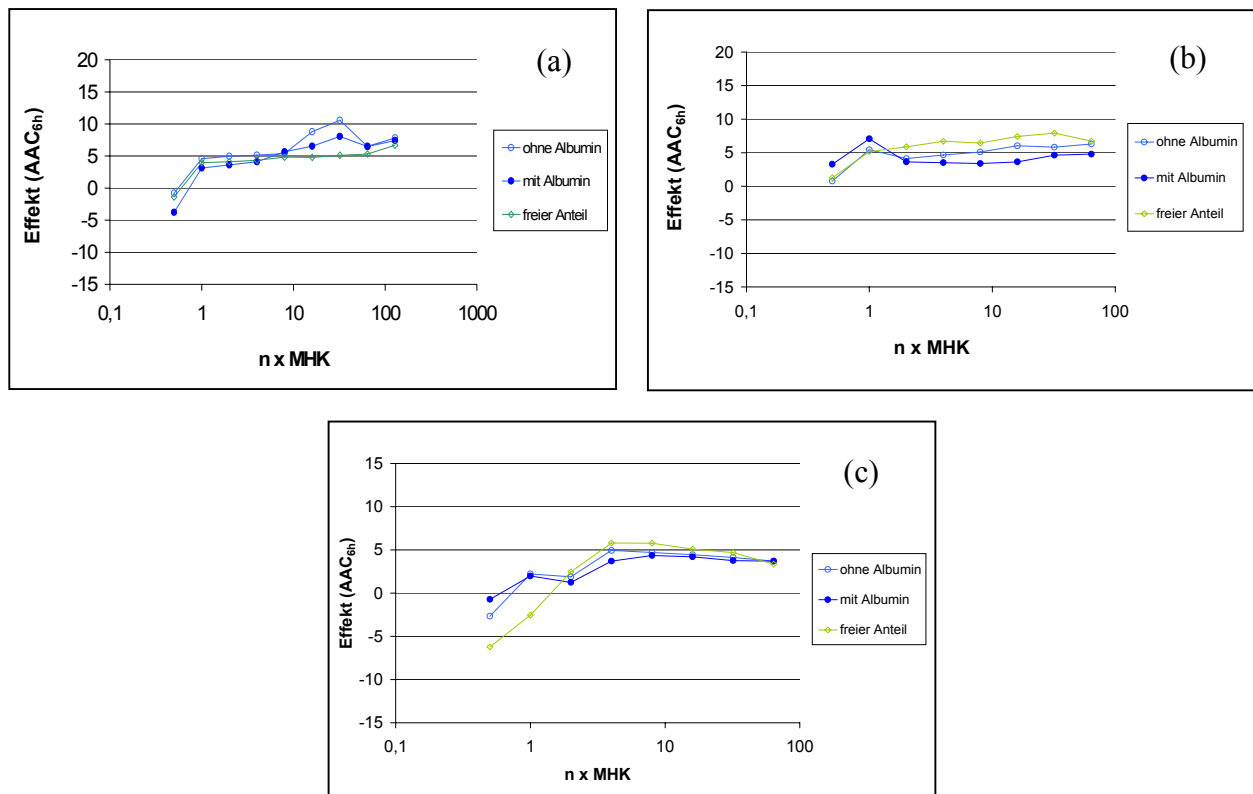


Abb. 3.9: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Cefotaxim gegenüber *S. aureus* (a), *S. pneumoniae* (b) sowie *H. influenzae* (c) ohne und mit Zusatz von Albumin, als auch bei Zugabe des berechneten freien Anteils in der Batchkultur

#### Cefotaxim - *Staphylococcus aureus*

Betrachtet man die Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen Cefotaxim und *S. aureus*, so sieht man im Vergleich zu Meropenem deutlich flacher verlaufende Kurven. Der maximale antibakterielle Effekt ist hier schon bei 1-facher MHK zu beobachten, eine leichte

Effektivitätssteigerung ist nur bei höheren Konzentrationen zu sehen. Der in diesen Kurven maximal erreichte Effekt liegt bei einem AAC-Wert von 10,56. Alle drei Kurven sind über einen weiten Konzentrationsbereich deckungsgleich, bei der 16- und 32-fachen MHK kommt es allerdings zu Unterschieden im Verlauf. Betrachtet man hier allerdings die Absterbekinetiken der drei Simulationen über den 6-stündigen Zeitraum, so ist ersichtlich, dass die Kurven innerhalb ihrer Fehlerbreiten als gleich zu betrachten sind (siehe Tabelle 7.25: Cefotaxim – *S. aureus* im Anhang) (Abb. 3.9 (a)).

#### **Cefotaxim - *Streptococcus pneumoniae***

Auch *S. pneumoniae* zeigt nach Einwirkung von Cefotaxim im Vergleich zu Meropenem deutlich flacher verlaufende Kurven. Der maximale Effekt ist bei allen Versuchsansätzen bereits bei der 1-fachen MHK zu beobachten, ab dieser Konzentration nehmen die AAC-Werte nur noch marginal zu. Die Kurvenverläufe sind im Rahmen ihrer Fehlerbreite deckungsgleich (vgl. Abb. 3.9 (b)).

#### **Cefotaxim - *Haemophilus influenzae***

Das Konzentrations-Wirkungsprofil zwischen Cefotaxim und *H. influenzae* zeigt sehr flach verlaufende Kurven. Der maximale Effekt ist bei allen drei Versuchsansätzen ab dem 4-fachen der MHK mit einem AAC-Wert von 4,93 ermittelt worden. Auffällig ist, dass die Versuchsansätze, denen der berechnete, frei vorliegende Anteil Cefotaxims zugesetzt wurde, bei der 0,5- und 1-fachen MHK deutlich geringere Effekte zeigen, als die Ansätze ohne und mit Albuminzusatz. Ab einer Konzentration, die der 1-fachen MHK entspricht, sind die Kurven deckungsgleich (vgl. Abb. 3.9 (c)).

### 3.5.2.2 Einfluss der Proteinbindung von Cefotaxim auf die Pharmakodynamik im *in-vitro* Modell

Die humane Pharmakokinetik einer 30-minütigen Kurzinfusion einer 2 g Dosis von Cefotaxim wurde über den Zeitraum von 24 Stunden im pharmakologischen *in-vitro* Modell simuliert, dies sowohl ohne als auch mit Zusatz von Albumin. Parallel dazu wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* ermittelt. Des weiteren wurde der Konzentrations-Zeitverlauf des berechneten frei vorliegenden Anteils dieser Dosis (63% von 2 g  $\equiv$  1,26 g) simuliert und das Absterbeverhalten der Stämme bestimmt (vgl. 2.2.8). Die simulierten Kinetikdaten dieser Applikationen sind in der Tabelle 7.7 des Anhangs dargestellt.

#### Cefotaxim - *Staphylococcus aureus*

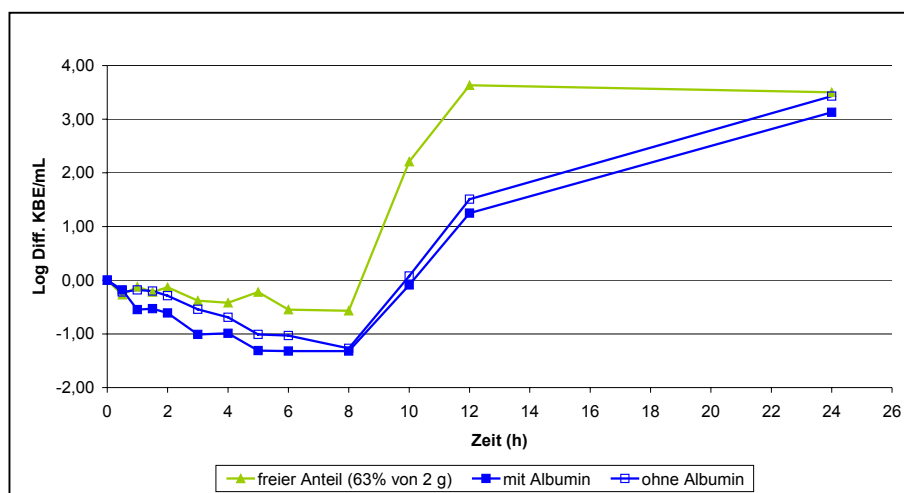


Abbildung 3.10: Absterbekinetik von *S. aureus* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 2 g Dosis Cefotaxim sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (63% von 2 g  $\equiv$  1,26 g Cefotaxim) als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Nach der Exposition einer 2 g Dosis Cefotaxim kommt es bei den Simulationen ohne und mit Albumin zu ähnlichen Absterbekinetiken von *S. aureus*, die maximale Keimzahlreduktion wird nach 8 Stunden bei  $-1,32 \log \Delta$  KBE/mL erreicht. Hiernach wachsen die Zellen stetig wieder an.

Anders stellt sich das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Applikation einer 1,26 g, also der freien, Dosis von Cefotaxim dar. Zwar kommt es ebenfalls zu einer Keimzahlreduktion bis zur Stunde 8, jedoch ist etwas schwächer ausgeprägt. Die maximale Reduktion beträgt nach 8 Stunden nur  $-0,57 \log \Delta$  KBE/mL (vgl. Abb. 3.10).

### Cefotaxim - *Streptococcus pneumoniae*

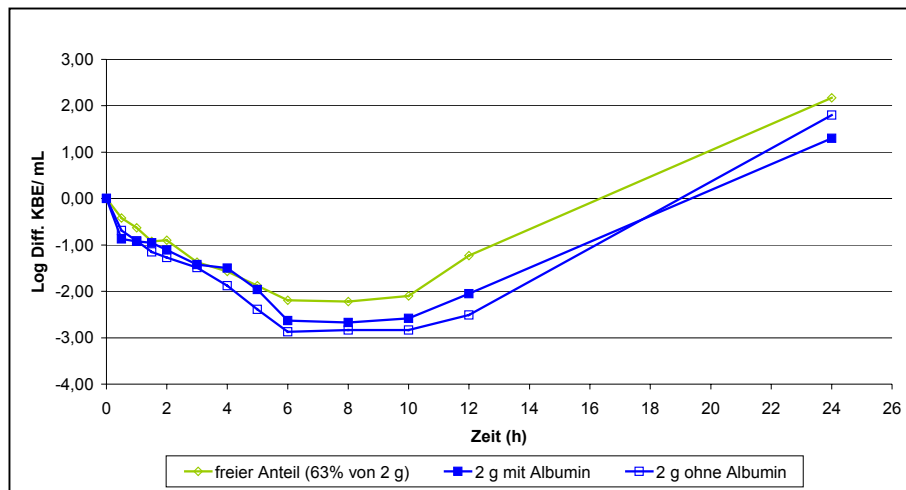


Abbildung 3.11: Absterbekinetik von *S. pneumoniae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 2 g Dosis Cefotaxim sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (63% von 2 g  $\equiv$  1,26 g Cefotaxim) als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Nach Exposition einer 2 g intravenösen Dosis von Cefotaxim kommt es bei der Simulation ohne und mit zugesetztem Albumin zu einem Absterben von *S. pneumoniae* bis zur Stunde 6. Die maximale Keimzahlreduktion beträgt  $-2,87$  (ohne Albumin) bzw.  $-2,67$  (mit Albumin)  $\log \Delta$  KBE/mL. Anschließend verlaufen die Kurven in einer Art Plateauphase bis zur Stunde 10 weiter, danach kommt es zu einem Anwachsen der Zellen. Die Kurven der Simulationen ohne und mit Albuminzusatz verlaufen kongruent.

Die Absterbekinetik der Simulation des freien Anteils zeigt ebenfalls ein antibakterielles Maximum zur Stunde 6 ( $R_{\max}$ :  $-2,22 \log \Delta$  KBE/mL), eine Plateauphase bis zur Stunde 10 und danach ein Anwachsen der Zellen. Die Kurve der Simulation des freien Anteils ist im Rahmen der Messungenauigkeit deckungsgleich mit den Kurvenverläufen der Simulationen ohne und mit Albuminzusatz (vgl. Abb. 3.11).

### Cefotaxim - *Haemophilus influenzae*

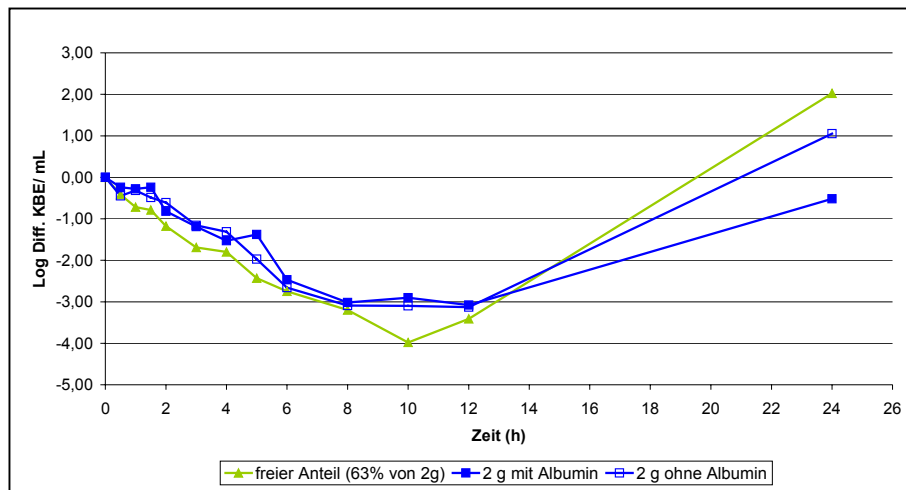


Abbildung 3.12: Absterbekinetik von *H. influenzae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 2 g Dosis Cefotaxim sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (63% von 2 g  $\equiv$  1,26 g Cefotaxim) als 30minütige Kurzinfusion im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Abb. 3.12 zeigt drei fast deckungsgleiche Kurvenverläufe der Absterbekinetiken mit einer maximalen Keimzahlreduktionen nach 12 (Rmax ohne Albumin: -3,13; Rmax mit Albumin: -3,08 log  $\Delta$  KBE/mL) bzw. nach 10 (Rmax freier Anteil: -3,98 log  $\Delta$  KBE/mL) Stunden. Nach dem jeweiligem Maximum kommt es zu einem Anwachsen der Zellen bis zum Zeitpunkt 24 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt weichen die Keimzahlen der drei Simulationen allerdings voneinander ab. So beträgt der Wert beim Versuchsansatz mit Albumin -0,52, beim Ansatz ohne Albumin 1,05, und bei dem Versuchsansatz der simulierten freien Fraktion 2,02 log  $\Delta$  KBE/mL.

### 3.5.2 Cefoxitin (PB 70%)

#### 3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Cefoxitin auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

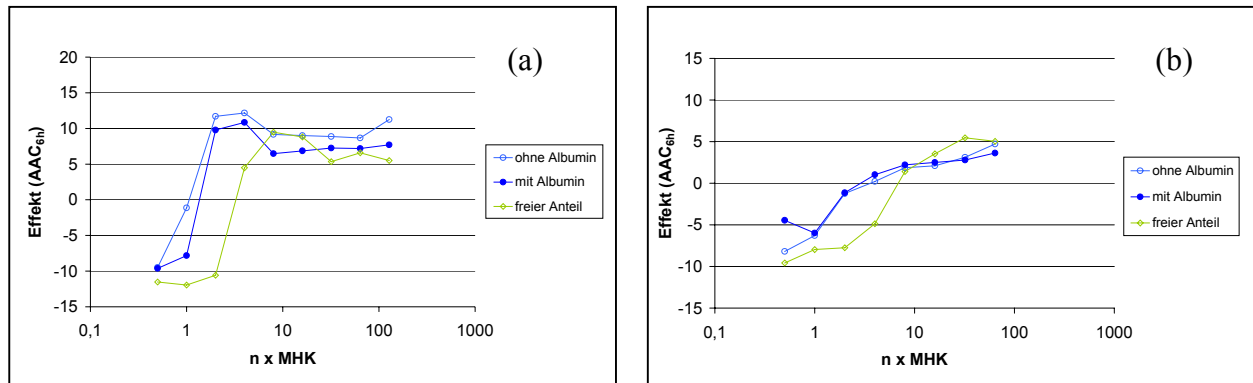


Abb. 3.13 (a) und (b): Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Cefoxitin gegenüber *S. aureus* (a) sowie *H. influenzae* (b) ohne und mit Zusatz von Albumin, als auch nach Zugabe des berechneten freien Anteils in der Batchkultur

In der Batchkultur wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus* und *H. influenzae* bei unterschiedlichen Cefoxitinkonzentrationen (0,5-128-fache MHK bei *S. aureus*, 0,5-64-fache MHK bei *H. influenzae*) über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Dies erfolgte zum einen nach Zugabe der Gesamtkonzentration des Antibiotikums ohne als auch mit Zusatz von Albumin. Zum anderen wurde das Absterbeverhalten der Erreger nach Gabe des Anteils an Antibiotikum bestimmt, der der berechneten frei vorliegenden Fraktion entspricht (vgl. 2.2.7). Aus den gewonnenen Daten wurden nach Methode 2.2.9.1.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen erstellt.

#### Cefoxitin - *Staphylococcus aureus*

Abbildung 3.13 (a) zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung der drei unterschiedlichen Versuchsansätze von Cefoxitin mit *S. aureus*. Die Kurvenverläufe ohne und mit Albuminzusatz verlaufen fast deckungsgleich. Der maximale Effekt der beiden Kurven wird bei der 4-fachen MHK erreicht. Auffällig ist allerdings, dass bei einer Konzentration, die dem 1-fachen MHK entspricht, noch ein deutliches Wachstum von *S. aureus* im Versuchsansatz mit Albumin zu erkennen ist (AAC-Wert: -7,82), im Gegensatz dazu liegt der Effekt des Ansatzes ohne Albumin mit einem AAC-Wert von -1,13 im bakteriostatischen Bereich (in diesem Fall liegt der AAC-Wert um den Wert 0).

Die Kurve der Konzentrations-Wirkungsbeziehung des freien, berechneten Anteils von Cefotaxim verläuft bis zur 8-fachen MHK deutlich unterhalb der Kurven ohne und mit



Albuminzusatz. So ist beispielsweise bei der 2-fachen MHK nach Gabe des freien Anteils noch ein starkes Wachstum der Zellen zu verzeichnen (AAC-Wert:-10,59), während hingegen die Gesamtdosis ohne als auch mit Albuminzusatz eine deutliche Bakterienreduktion herbeiführen (AAC-Wert ohne Albumin: 11,68, mit Albumin: 9,78). Ab der 8-fachen MHK ist fast kein Unterschied zwischen den Kurven der drei Versuchsansätze zu beobachten.

### **Cefoxitin - *Haemophilus influenzae***

Abbildung 3.13 (b) zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zwischen Cefoxitin und *H. influenzae*. Die Kurvenverläufe ohne und mit zugesetztem Albumin sind nahezu kongruent. Allerdings zeigt sich bei Einsatz der 0,5-fachen MHK beim Versuchsansatz mit zugesetztem Albumin ein vermindertes Anwachsen der Bakterien im Vergleich zum Ansatz ohne Albumin (AAC-Wert ohne Albumin: -8,20, mit Albumin: -4,45). Das antibakterielle Maximum ist für die Untersuchungen ohne und mit Albuminzusatz bei dem 8-fachen der MHK erreicht, eine Konzentrationserhöhung führt nur noch zu einer sehr schwachen Wirkungsverstärkung. Die Kurve des freien, berechneten Anteils verläuft bis zur 8-fachen MHK deutlich unterhalb der Kurven der Gesamtdosis mit und ohne Albuminzusatz. Ab einer Konzentration, die dem 8-fachen der MHK entspricht, ist nur ein geringer Unterschied im Verlauf der drei Kurven zu erkennen.

### 3.5.2.2 Einfluss der Proteinbindung von Cefoxitin auf die Pharmakodynamik im *in-vitro* Modell

Die humane Pharmakokinetik einer iv-Bolus Injektion einer 2 g Dosis von Cefoxitin wurde über den Zeitraum von 24 Stunden im pharmakologischen *in-vitro* Modell simuliert, dies sowohl ohne als auch mit Zusatz von Albumin. Parallel dazu wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus* und *H. influenzae* ermittelt. Des weiteren wurde der Konzentrations-Zeitverlauf des berechneten frei vorliegenden Anteils dieser Dosis (30% von 2 g  $\equiv$  0,6 g) simuliert und das Absterbeverhalten der Erreger bestimmt (vgl. 2.2.8). Die Kinetikdaten dieser Applikationen sind in der Tabelle 7.8 des Anhangs aufgeführt.

#### Cefoxitin - *Staphylococcus aureus*

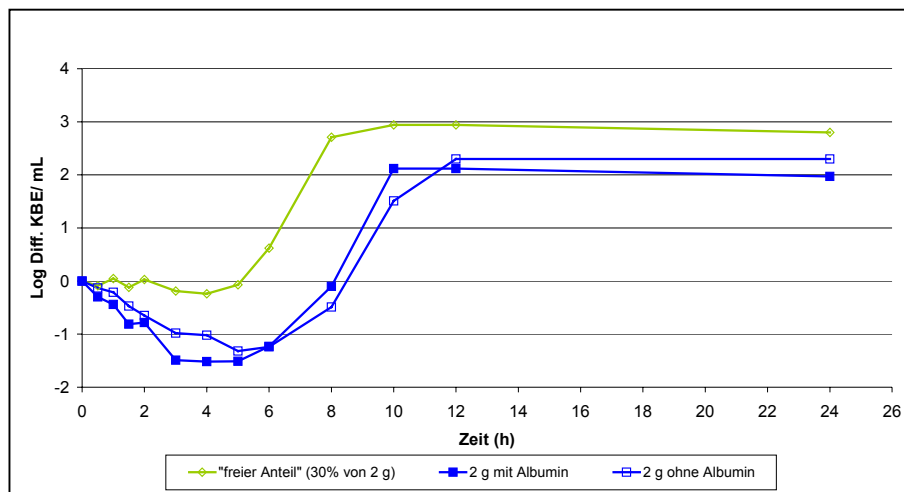


Abbildung 3.14: Absterbekinetik von *S. aureus* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 2 g Dosis Cefoxitin sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (30% von 2 g  $\equiv$  0,6 g Cefoxitin) als iv-Bolus Applikation im pharmakologischen *in-vitro* Modell

In der Abbildung 3.14 ist der Verlauf der Absterbekinetiken von *S. aureus* nach Simulationen der Pharmakokinetik einer 2 g Dosis von Cefoxitin ohne und mit Albuminzusatz identisch. Die maximale Keimzahlreduktion ist bei der Simulation mit Albumin mit einem  $R_{max}$ -Wert von -1,52 nach 4 Stunden, bei der Simulation ohne Albumin mit  $-1,32 \log \Delta$  KBE/mL nach 5 Stunden zu beobachten. Nach diesen Maxima kommt es zum Anwachsen von *S. aureus*. Nach 10 (ohne Albumin) bzw. 12 (mit Albumin) Stunden wird die maximale Keimzahl von 2,3 (ohne Albumin) bzw. 2,12 (mit Albumin) erreicht.

Hingegen zeigt das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Exposition des Anteils von Cefoxitin, der der berechneten freien Fraktion entspricht, keine nennenswerte Keimzahlreduktion. Bis zum Zeitpunkt 4 Stunden sterben die Zellen nur um einen Wert von  $-0,24 \log \Delta$  KBE/mL ab, nach

diesem Zeitpunkt kommt es zu einem Anwachsen der Zellen. Die maximale Keimzahl ist bereits nach 10 Stunden erreicht.

### Cefoxitin - *Haemophilus influenzae*

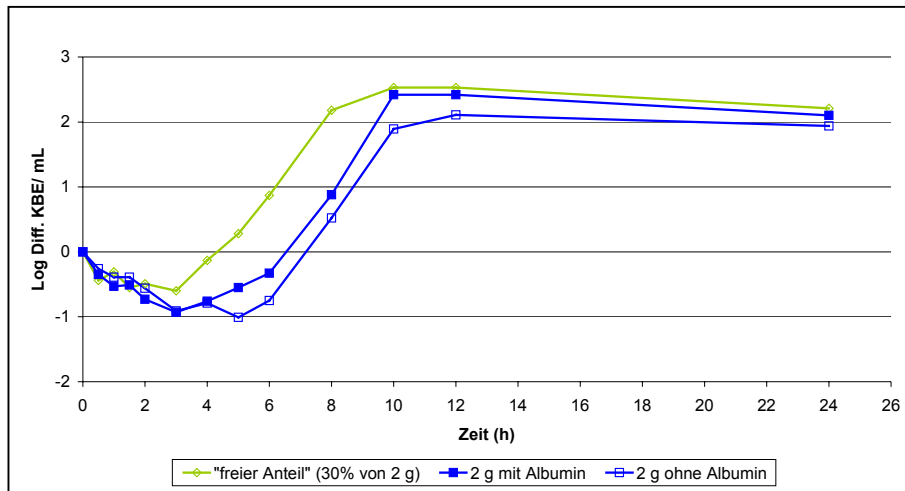


Abbildung 3.15: Absterbekinetik von *H. influenzae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 2 g Dosis Cefoxitin sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (30% von 2 g  $\equiv$  0,6 g Dosis Cefoxitin) als iv-Bolus Applikation im pharmakologischen *in-vitro* Modell

*H. influenzae* zeigt nach Exposition einer 2 g Dosis von Cefoxitin bei der Simulation ohne Albumin eine maximale Keimzahlreduktion von  $-1,01 \log \Delta$  KBE/mL nach 5 Stunden, mit Albuminzusatz wird ein  $R_{max}$ -Wert von  $-0,93 \log \Delta$  KBE/mL nach bereits 3 Stunden erreicht. Danach wachsen die Zellen an, bis nach 10 Stunden die maximale Keimzahl erreicht ist. Die Absterbekinetiken ohne und mit Albuminzusatz sind aufgrund des methodischen Fehlers als identisch zu betrachten.

Nach Simulation des freien, berechneten Anteils von Cefoxitin zeigt *H. influenzae* eine Keimzahlreduktion mit einem  $R_{max}$ -Wert von  $-0,6 \log \Delta$  KBE/mL nach 3 Stunden. Hiernach wachsen die Zellen an, zur Stunde 10 ist dann bereits die maximale Keimzahl erreicht. Im Vergleich zu den Simulationen der Gesamtdosis ohne und mit Albuminzusatz kommt es nach Simulation der freien Fraktion zu einem stärkeren Anwachsen von *H. influenzae*. Dies zeigt sich besonders im Kurvenverlauf zwischen der 4. und 10. Stunde. Hier liegt die Absterbekinetik von *H. influenzae*, die nach Simulation des freien Anteils erhalten wurde, weit oberhalb der Absterbekinetiken, die nach Gabe der Gesamtkonzentration ohne und mit Albuminzusatz bestimmt wurden (vgl. Abb. 3.15).

### 3.5.2 Faropenem (PB 94%)

#### 3.5.2.1 Einfluss der Proteinbindung von Faropenem auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

In der Batchkultur wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* bei unterschiedlichen Faropenemkonzentrationen (0,5-128-fache MHK) über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Dies erfolgte zum einen nach Zugabe der Gesamtkonzentration des Antibiotikums ohne als auch mit Zusatz von Albumin. Zum anderen wurde das Absterbeverhalten der Erreger nach Gabe des Anteils an Antibiotikum bestimmt, der der berechneten frei vorliegenden Fraktion entspricht (vgl. 2.2.7). Aus den gewonnenen Daten wurden nach Methode 2.2.9.1.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen erstellt.

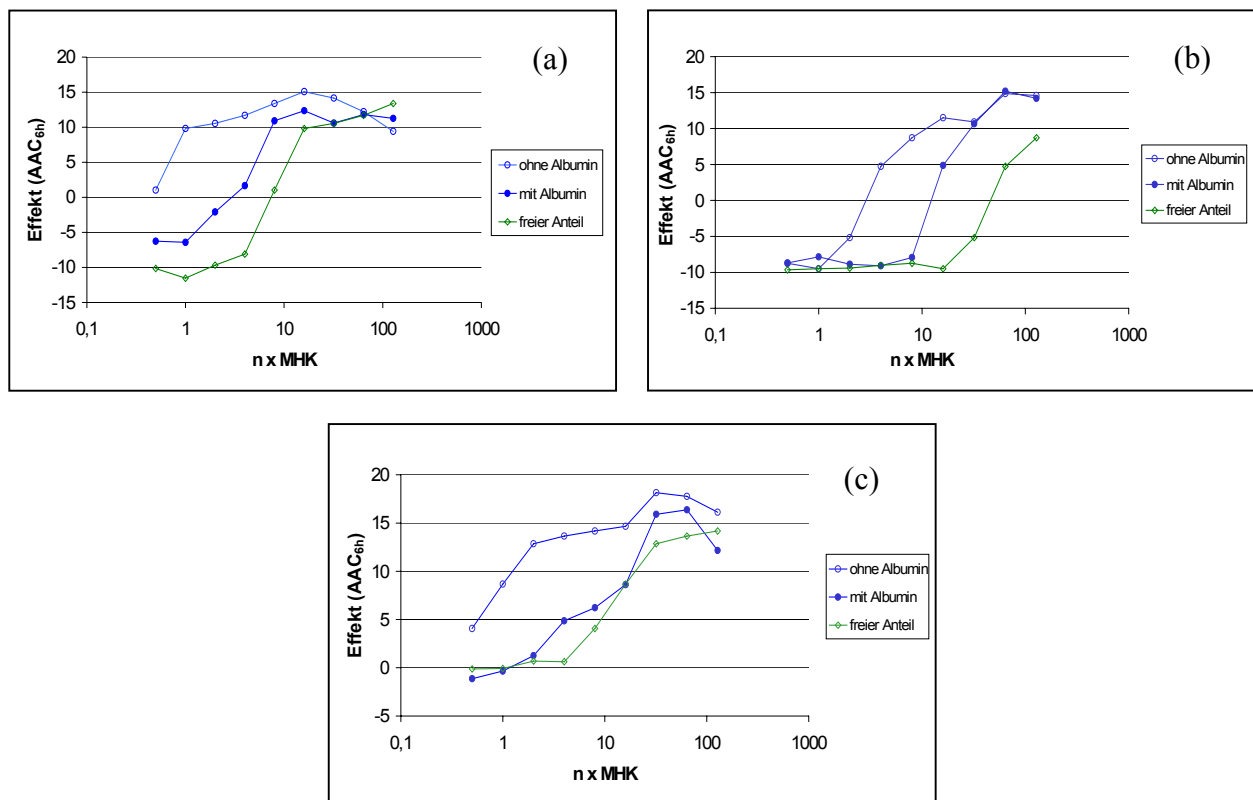


Abb. 3.16 a-c: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Faropenem gegenüber *S. aureus* (a), *S. pneumoniae* (b) sowie *H. influenzae* (c) ohne und mit Albumin, als auch bei Zugabe des berechneten freien Anteils in der Batchkultur

#### Faropenem - *Staphylococcus aureus*

Abbildung 3.16 (a) zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Faropenem und *S. aureus*. Betrachtet man die Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Untersuchungen ohne Albumin, so erkennt man eine kontinuierliche Wirkungszunahme bei zunehmender Faropenemkonzentration bis zum Maximum bei einer Konzentration, die dem 16-fachen der MHK entspricht. Nach

diesem Maximum ist keine Wirkungssteigerung mehr möglich, es kommt bei einer Erhöhung der Dosis zu einer Verringerung des Effektes.

Bei Zusatz von Albumin im Versuchsansatz sind deutlich geringere Effekte im Vergleich zu den Untersuchungen ohne Albumin zu beobachten. Allerdings nähern sich beide Kurven bei steigender Konzentration, so dass ab dem 64-fachen der MHK kein Unterschied mehr im antibakteriellen Effekt von Faropenem ohne und mit Albuminzusatz zu erkennen ist.

Die Effekte, die bei den Ansätzen des freien Anteils von Faropenem erreicht werden, liegen klar unterhalb der Effekte, die durch die Versuchsansätze der Gesamtdosis *mit* Albumin erhalten werden. Allerdings kommt es auch hier bei steigender Konzentration zu einer Annäherung der Kurven. So ist ab dem 64-fachen der MHK nahezu kein Unterschied im Absterbeverhalten von *S. aureus* aller drei Versuchsansätze feststellbar.

#### **Faropenem - *Streptococcus pneumoniae***

Abbildung 3.16 (b) zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zwischen Faropenem und *S. pneumoniae*. Betrachtet man die Kurve der Untersuchungen ohne Albuminzusatz so ist bei steigender Faropenemkonzentration eine Zunahme des Effektes zu beobachten. Der maximale Effekt liegt bei einer Konzentration, die dem 64-fachen der MHK entspricht. Im Vergleich zum Versuchsansatz ohne Albumin führt der Zusatz von Albumin zu weitaus geringeren Effekten. Dies wird besonders deutlich in einem Konzentrationsbereich, der zwischen dem 2- und dem 16-fachen der MHK liegt. Bei steigenden Konzentrationen nähern sich allerdings die Kurven einander an, so dass ab dem 32-fachen der MHK kein Unterschied im Absterbeverhalten von *S. pneumoniae* ohne und mit Albuminzusatz mehr feststellbar ist.

Im Konzentrationsbereich zwischen dem 0,5- und dem 8-fachen der MHK wächst *S. pneumoniae* in dem Versuchsansatz mit Albumin, als in den Versuchsansätzen, in denen sich der freie, berechnete Anteil von Faropenem befindet, maximal an. Ab dem 8-fachen der MHK wird in den Versuchsansätzen *mit* Albumin allerdings ein höherer Effekt im Vergleich zum „freien Anteil“ erkennbar. Die Kurven nähern sich bei steigenden Konzentrationen einander an.

#### **Faropenem - *Haemophilus influenzae***

Abbildung 3.16 (c) zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zwischen Faropenem und *H. influenzae*. Bei den Versuchsansätzen ohne Zusatz von Albumin kommt es bei Erhöhung der Faropenemkonzentration zu einer Wirkungsverstärkung bis zum maximalen Effekt bei der 32-fachen MHK. Darüber hinaus kommt es bei weiterer Dosiserhöhung sogar zu einer leichten Verringerung des Effektes. Setzt man hingegen zu diesen Dosierungen Albumin hinzu, so sind

bis zum 64-fachen der MHK die Effekte im Vergleich zu den Versuchsansätzen ohne Albumin deutlich geringer, erst ab einer Konzentration, die dem 64-fachen der MHK entspricht, nähern sich die Kurven einander an.

Die Kurve der Konzentrations-Wirkungsbeziehung des freien, berechneten Anteils von Faropenem und *H. influenzae* verläuft im Bereich zwischen der 0,5- und der 2-fachen MHK deckungsgleich mit der Kurve der Versuchsansätze mit Albuminzusatz. Bei höheren Konzentrationen verläuft die Kurve des „freien Anteils“ dann unterhalb der Kurve der Gesamtdosis mit Albuminzusatz. Ab der 128-fachen MHK nähern sich die Kurven ohne und mit Albuminzusatz sowie die Kurve des „freien Anteils“ einander an.

### 3.5.4.2: Einfluss der Proteinbindung von Faropenem auf die Pharmakodynamik im *in-vitro* Modell

Die humane Pharmakokinetik einer per oralen Applikation einer 300 mg Dosis von Faropenem wurde über den Zeitraum von 24 Stunden simuliert, dies sowohl ohne als auch mit zugesetztem Albumin. Parallel dazu wurde das Absterbeverhalten von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* ermittelt. Des weiteren wurde der Konzentrations-Zeitverlauf des frei vorliegenden Anteils dieser Dosis (6% von 300 mg  $\equiv$  18 mg) simuliert und das Absterbeverhalten der Erreger bestimmt (vgl. 2.2.8). Die Kinetikdaten dieser Applikationen sind in der Tabelle 7.9 des Anhangs dargestellt.

#### Faropenem - *Staphylococcus aureus*

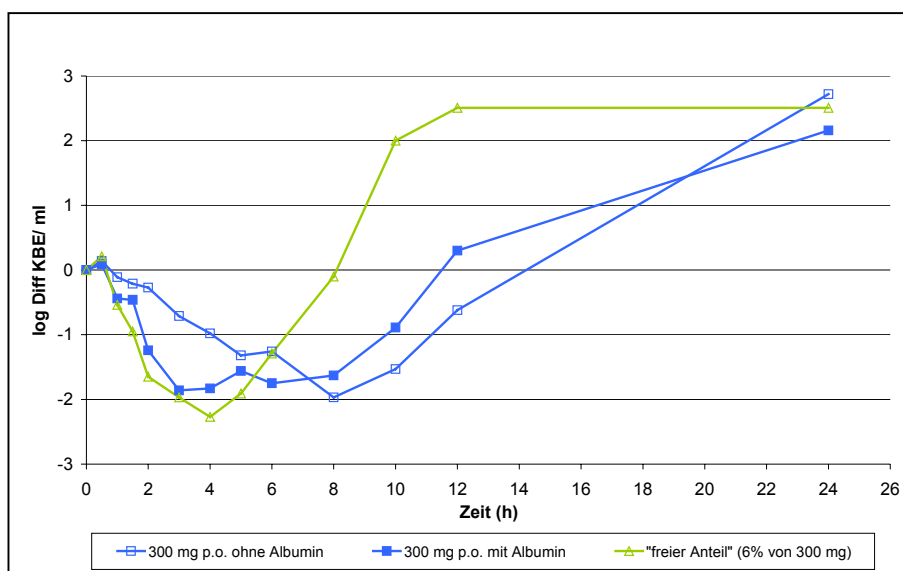


Abbildung 3.17: Absterbekinetik von *S. aureus* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 300 mg Dosis Faropenem, sowie die Absterbekinetik nach Simulation des freien, berechneten Anteils (6% von 300 mg  $\equiv$  18 mg Faropenem) als per orale Gabe im pharmakologischen *in-vitro* Modell

*S. aureus* zeigt in Abbildung 3.17 nach Exposition einer 300 mg per oralen Dosis von Faropenem ohne Albuminzusatz eine kontinuierliche Abnahme der Keimzahl bis zur Stunde 8,  $R_{max}$  beträgt hier  $-1,97 \log \Delta \text{KBE/mL}$ . Danach wachsen die Zellen bis zur Stunde 24 an. Im Vergleich dazu kommt es bei der Zugabe von Albumin zur Gesamtdosis zu einer höheren initialen Abtötung der Bakterien. Die maximale Keimzahlreduktion von  $-1,86 \log \Delta \text{KBE/mL}$  ist hier bereits nach 3 Stunden erreicht. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einem leichten Wiederanwachsen der Zellen, die Kurve der Absterbekinetik nähert sich nach 8 Stunden der Absterbekinetik ohne Albumin an.

Die Simulation der berechneten freien Dosis von Faropenem führt ebenfalls zu einer hohen initialen Abtötung von *S. aureus*. Hier ist das Maximum nach 4 Stunden bei einem Rmax-Wert von  $-2,27 \log \Delta \text{KBE/mL}$  erreicht. Nach diesem Maximum kommt es jedoch im Gegensatz zur Simulation der Gesamtdosis *mit* Albumin zu einem stärkeren Anwachsen der Zellen, nach bereits 12 Stunden ist die maximale Keimzahl von  $2,51 \log \Delta \text{KBE/mL}$  erreicht.

### Faropenem - *Streptococcus pneumoniae*

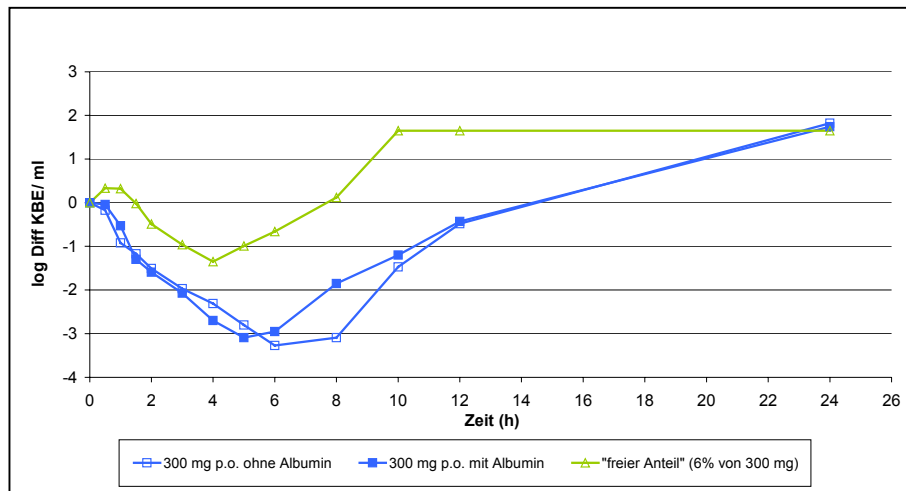


Abbildung 3.18: Absterbekinetik von *S. pneumoniae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 300 mg Dosis Faropenem, sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (6% von 300 mg  $\equiv$  18 mg Faropenem) als per orale Gabe im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Die Simulation einer 300 mg per oralen Applikation ohne Albuminzusatz führt bei *S. pneumoniae* zu einer Keimzahlreduktion von  $-3,27 \log \Delta \text{KBE/mL}$  nach 6 Stunden. Danach wachsen die Zellen bis zu einem Maximum nach 24 Stunden stetig wieder an. Das Absterbeverhalten von *S. pneumoniae* mit Zusatz von Albumin resultiert in einem vergleichbaren Kurvenverlauf. Die maximale Keimzahlreduktion von  $-3,09 \log \Delta \text{KBE/mL}$  wird nach 5 Stunden erreicht. Hiernach wachsen die Zellen ebenfalls kontinuierlich bis zum Maximum nach 24 Stunden an. Im Gegensatz zur Simulation der Gesamtdosis mit Albumin ist die maximale Keimzahlreduktion der Simulation des freien, berechneten Anteils weniger als halb so hoch, der Rmax-Wert liegt nur bei  $-1,35 \log \Delta \text{KBE/mL}$  und ist bereits nach 4 Stunden erreicht. Die Zellen wachsen hiernach stetig wieder an. Nach 10 Stunden ist bereits die maximale Keimzahl von  $1,65 \log \Delta \text{KBE/mL}$  erreicht (vgl. Abb. 3.18).



### Faropenem - *Haemophilus influenzae*

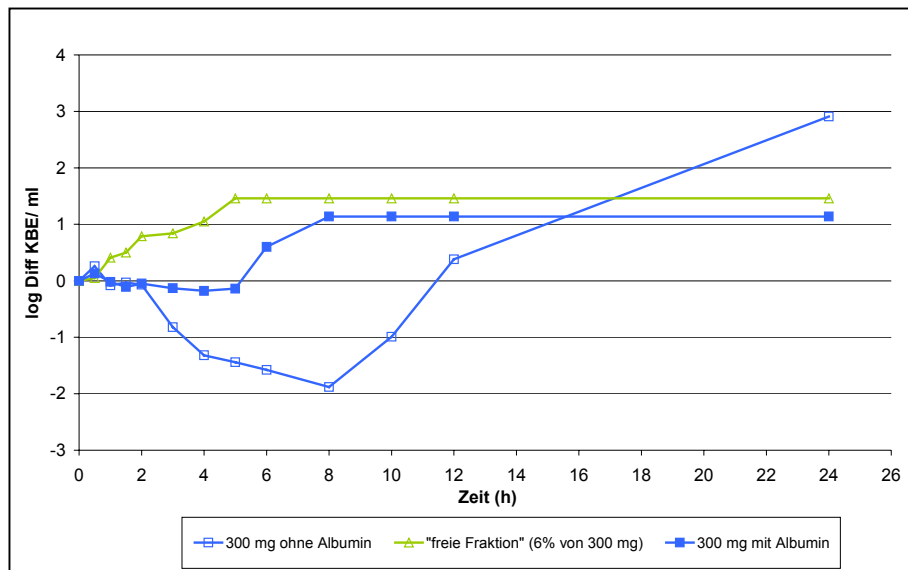


Abbildung 3.19: Absterbekinetik von *H. influenzae* ohne und mit Albuminzusatz nach Applikation einer 300 mg Dosis Faropenem sowie die Absterbekinetik nach Simulation des berechneten freien Anteils (6% von 300 mg  $\equiv$  18 mg Faropenem) als per orale Gabe im pharmakologischen *in-vitro* Modell

Abbildung 3.19 zeigt bei der Simulation von Faropenem gegenüber *H. influenzae* ohne Albuminzusatz eine maximale Keimzahlreduktion von  $-1,88 \log \Delta$  KBE/mL nach 8 Stunden. Die Zellen wachsen hiernach stetig bis zum Maximum nach 24 Stunden an. Hingegen führt die Zugabe von Albumin zur Gesamtdosis Faropenem zu keiner nennenswerten Keimzahlreduktion, der  $R_{max}$ -Wert beträgt  $-0,18 \log \Delta$  KBE/mL nach 4 Stunden. Nach 5 Stunden kommt es zu einem Wiederanwachsen der Zellen, und nach 8 Stunden ist bereits die maximale Keimzahl mit  $1,14 \log \Delta$  KBE/mL erreicht. Die Simulation des freien Anteils resultiert in einem Anwachsen von *H. influenzae* nach bereits einer halben Stunde. Die maximale Keimzahl ist nach 5 Stunden erreicht.

### 3.6 Der Einfluss der Proteinbindung der Chinolone auf deren Pharmakodynamik

Im nachfolgenden Abschnitt wird der Einfluss der Proteinbindung auf die Wirkung der Antibiotika Gatifloxacin, Moxifloxacin und Trovafloxacin auf den Erreger *Staphylococcus aureus* in der Batchkultur untersucht. Die einzelnen Absterbekinetiken der Batchkultur, die die Grundlage für die Berechnung der AAC-Werte und somit für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven herangezogen werden, sind im Anhang dieser Arbeit in den Tabellen 7.28 bis 7.30 aufgeführt.

#### 3.6.1 Gatifloxacin (PB 20%)

##### 3.6.1.1 Der Einfluss der Proteinbindung von Gatifloxacin auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

###### Gatifloxacin – *Staphylococcus aureus*

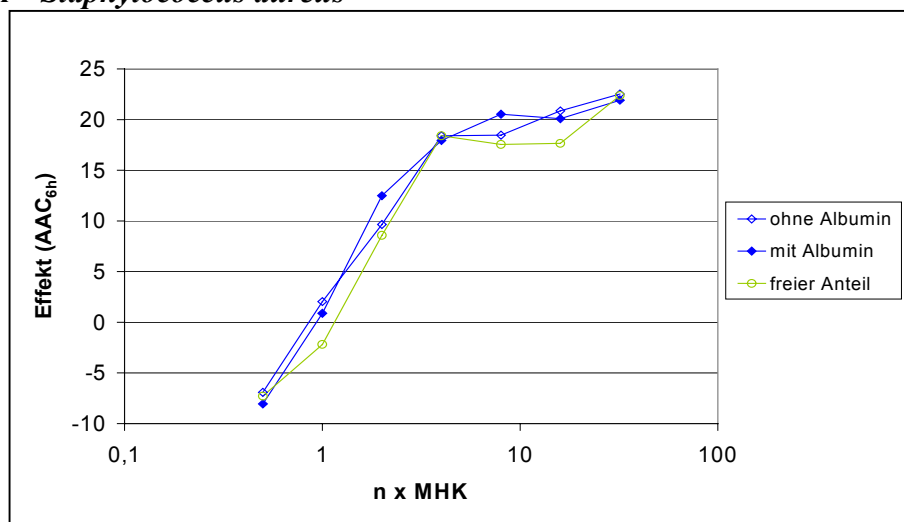


Abb. 3.20: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Gatifloxacin gegenüber *S. aureus* ohne Albumin und mit Albumin, als auch bei Simulation des berechneten freien Anteils von Gatifloxacin in der Batchkultur

Die Abbildung 3.20 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von dem Chinolon Gatifloxacin (PB 20%) und *S. aureus*. Alle drei Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zeigen im Vergleich zu den Untersuchungen mit den  $\beta$ -Laktamen einen „steilen“ Kurvenverlauf mit Anstieg des antibakteriellen Effektes bei steigenden Konzentrationen, also eine deutlich konzentrationsabhängige Wirkung. Ab der 8-fachen MHK kommt es zu einer Sättigung des Effektes. Alle Kurven sind aufgrund des methodischen Fehlers als deckungsgleich zu betrachten.

### 3.6.2 Moxifloxacin (PB 37%)

#### 3.6.2.1 Der Einfluss der Proteinbindung von Moxifloxacin auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

##### Moxifloxacin – *Staphylococcus aureus*

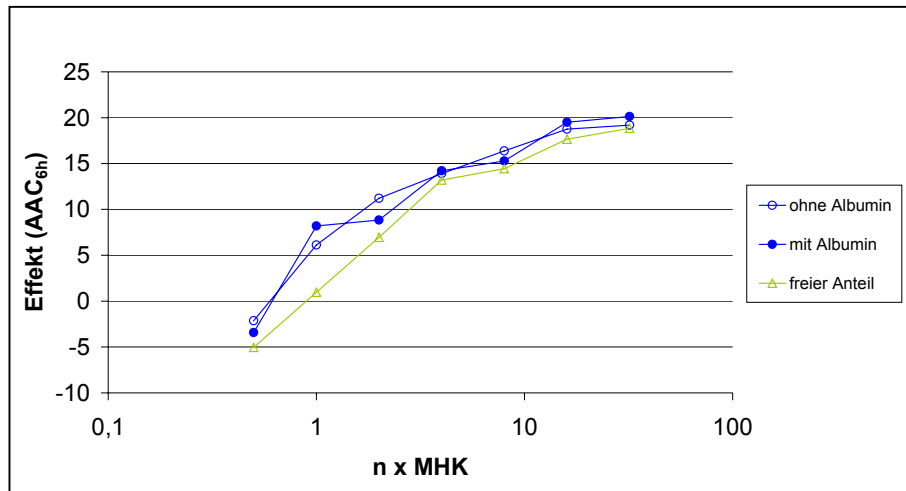


Abb. 3.21: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Moxifloxacin und *S. aureus* ohne und mit Albumin als auch bei Simulation des berechneten freien Anteils in der Batchkultur

Die Abbildung 3.21 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven des zu 37% an Plasmaproteine bindenden Moxifloxacin mit *S. aureus*. Bei allen drei Versuchsansätzen ist eine deutliche konzentrationsabhängige Wirkung zu beobachten, und bei einer Konzentration, die dem 16-fachen der MHK entspricht, wird der maximale Effekt erreicht. Alle drei Kurven sind weitestgehend deckungsgleich.

### 3.6.3 Trovafloxacin (PB 76%)

#### 3.6.3.1 Der Einfluss der Proteinbindung von Trovafloxacin auf die Pharmakodynamik in der Batchkultur

##### Trovafloxacin – *Staphyococcus aureus*

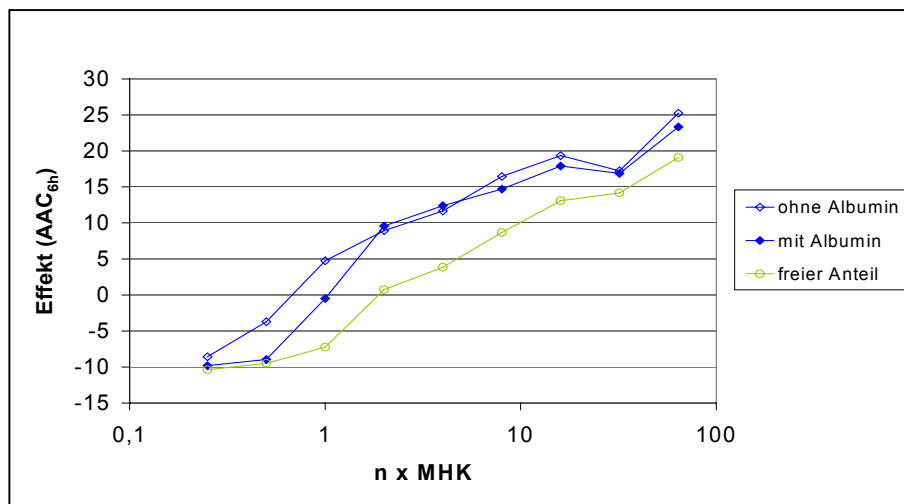


Abb. 3.22: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Trovafloxacin und *S. aureus* ohne und mit Albumin als auch bei Simulation des berechneten freien Anteils in der Batchkultur

Abbildung 3.22 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven von Trovafloxacin (PB 76%) mit *S. aureus*. Bei allen drei Versuchsansätzen führt eine Erhöhung der Trovafloxacinkonzentration zu einer Erhöhung des antibakteriellen Effektes. Ein maximaler Effekt ist allerdings auch bei der 64-fachen MHK nicht zu erkennen.

Vergleicht man die Konzentrations-Wirkungskurven der Versuchsansätze *ohne* und *mit* Albuminzusatz, so sind diese sowohl bei der Konzentration, die dem 0,25-fachen der MHK entspricht als auch bei Konzentrationen oberhalb der 2-fachen MHK nahezu deckungsgleich. Bei der 0,5-fachen und der 1-fachen MHK ist allerdings ein deutlicher Unterschied zu erkennen, die AAC-Werte differieren nicht nur bei der 0,5- sondern auch bei der 1-fachen MHK um den Wert 5,2. So kommt es bei Gabe der 1-fachen MHK bei Zusatz von Albumin zu Wachstum (AAC-Wert mit Albumin: -0,5), bei gleicher Dosis ohne Albumin zum Absterben der Bakterien (AAC-Wert ohne Albumin: 4,75).

Bei Konzentrationen, die dem 0,25- und 0,5-fachen der MHK entsprechen, wächst *S. aureus* sowohl nach Exposition des frei vorliegenden Anteils als auch nach Exposition der Gesamtdosis mit Albuminzusatz gleich stark an. Bei Konzentrationen oberhalb der einfachen MHK ist allerdings ein deutlicher Unterschied im Absterbeverhalten von *S. aureus* zu erkennen: der

Effekt, der durch die frei vorliegende Fraktion von Trovafloxacin erreicht wird, ist stets niedriger als der Effekt, der durch die Gesamtdosis mit Albumin entsteht.

### 3.7 Grenzkonzentration in der Batchkultur, ab der die Proteinbindung einflusslos ist

Wie in den Abschnitten 3.5 und 3.6 ermittelt worden, ist in der **Batchkultur** nur bei den hoch bindenden Antibiotika Cefoxitin, Faropenem und Trovafloxacin durch Zusatz von Albumin im Vergleich zu den Untersuchungen ohne Albumin eine verminderte Wirkung erkennbar. Dies allerdings auch nur bis zu einer bestimmten Konzentration.

Tabelle 3.4. zeigt für diese Antibiotika ermittelte „Grenzkonzentrationen“, ab denen der Einfluss der Proteinbindung vernachlässigt werden kann. Der frei vorliegende Anteil der „Grenzkonzentration“ wurde berechnet (letzte Spalte Tabelle 3.4) und mit der MHK des Erregers verglichen. Es fällt auf, dass der frei vorliegende Anteil von Faropenem leicht oberhalb (Faktor 2-4) der MHK von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* liegt. Bei Cefoxitin und Trovafloxacin liegt der frei vorliegende Anteil knapp unterhalb der MHK von *S. aureus*.

Tabelle 3.4: Ermittelte Grenzkonzentrationen in der Batchkultur, ab der die Proteinbindung keinen Einfluss mehr auf die Pharmakodynamik einer Substanz zeigt

Stamm	Antibiotikum	PB (%)	MHK (mg/L)	Grenzkonzentration (mg/L)	Konz. des frei vorliegenden Anteils (mg/L)
<i>S. aureus</i>	Cefoxitin	70	4	8	2,40
<i>S. aureus</i>	Faropenem	94	0,125	8	0,48
<i>S. pneumoniae</i>	Faropenem	94	0,25	8	0,48
<i>H. influenzae</i>	Faropenem	94	0,5	32	1,92
<i>S. aureus</i>	Trovafloxacin	76	0,0625	0,125	0,03

### 3.8 Emax und EC<sub>50</sub> in der Batchkultur

Um einen objektiven Vergleich der durch die Untersuchungen in der **Batchkultur** erhaltenen Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu ermöglichen, wurden mit Hilfe des **Emax-Modells** die kurvenspezifischen Parameter Emax und EC<sub>50</sub> ermittelt (vgl. Methode 2.2.9.1.3). Die EC<sub>50</sub>- und Emax-Werte, sowie die Quotienten<sup>1</sup> der EC<sub>50</sub>-Werte zeigt Tabelle 3.5. für die β-Laktame sowie Tabelle 3.6 für die Chinolone. Die für diese Berechnungen zugrunde liegenden modifizierten AAC-Werte sind in den Tabellen 7.10 bis 7.23 im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Die Analyse der Emax- und EC<sub>50</sub>-Werte der Versuchsansätze der einzelnen Antibiotika wird im nachfolgenden Abschnitt wie folgt systematisiert: zuerst wird untersucht, ob sich durch die verschiedenen Versuchsansätze eines Antibiotikums (ohne Albumin/ mit Albumin/ freier Anteil) die maximal erreichten Effekte unterscheiden.

<sup>1</sup> Quotienten:  $\frac{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}{EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}}$   
 $\frac{EC_{50_{\text{freier Anteil}}}}{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}$

Als zweites werden die  $EC_{50}$ -Werte der Untersuchungen **mit Albumin** und **ohne Albumin** verglichen. Dieser Vergleich gibt Aufschluss darüber, ob durch Bindung des Antibiotikums an Albumin mehr Antibiotikum eingesetzt werden muss, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen. In einem solchen Fall wäre der  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$  höher als der  $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ . Der berechnete Quotient ( $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}/EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ ) gibt dabei an, um welchen Faktor die  $EC_{50}$ -Werte differieren. Der Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte ohne und mit Albumin lässt demnach rückschließen, welche Auswirkung die Zugabe von Albumin im untersuchten Konzentrationsbereich auf die Pharmakodynamik hat.

Als drittes werden die  $EC_{50}$ -Werte der Untersuchungen des **frei vorliegenden Anteils** mit den  $EC_{50}$ -Werten der Untersuchungen **mit Albumin** verglichen. Durch diesen Vergleich lässt sich feststellen, ob tatsächlich nur frei vorliegendes Antibiotikum für die Wirkung verantwortlich ist (hier wären die  $EC_{50}$ -Werte der freien Fraktion und der Untersuchungen mit Albumin gleich), oder ob gebundenes Antibiotikum, welches aus den Proteinbindungen nachdiffundiert, zu einer Wirkverstärkung führt (hier wäre der  $EC_{50}$ -Wert aus den Untersuchungen mit Albumin niedriger als der  $EC_{50}$ -Wert der Untersuchungen, die die berechnete freie Fraktion enthalten). Der berechnete Quotient ( $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}/EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ ) stellt dabei wieder den Unterschied der  $EC_{50}$ -Werte dar.

Tabelle 3.5.: Emax- und  $EC_{50}$ -Werte sowie die Quotienten<sup>1</sup> der  $EC_{50}$ -Werte für die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aus den Untersuchungen in der Batchkultur

	Meropenem 2%			Cefotaxim 37%			Cefoxitin 70%			Faropenem 94%		
	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient
<b>S. aureus</b>												
ohne Albumin	24,19	0,82	1,07	19,45	0,36	1,42	22,72	0,82	1,26	24,82	0,33	8,21
mit Albumin	23,61	0,88		18,68	0,51		20,50	1,03		24,86	2,71	
freier Anteil	n.b.	n.b.		17,09	0,26	0,51	19,20	2,77	2,69	28,59	11,63	4,29
<b>S. pneumoniae</b>												
ohne Albumin	21,83	1,42	1,14	15,42	0,19	1,00	n.b.	n.b.		25,83	5,11	4,07
mit Albumin	21,58	1,62		14,34	0,19		n.b.	n.b.		27,53	20,78	
freier Anteil	n.b.	n.b.		16,96	0,24	1,26	n.b.	n.b.		25,93	83,62	4,02
<b>H. influenzae</b>												
ohne Albumin	15,66	1,61	0,52	12,62	0,46	0,70	12,61	2,99	0,63	16,05	1,23	9,50
mit Albumin	13,56	0,83		11,97	0,32		11,77	1,89		16,65	11,68	
freier Anteil	n.b.	n.b.		13,68	1,07	3,34	15,51	7,77	4,11	16,90	24,71	2,12

Betrachtet man in der Tabelle 3.5. die Emax-Werte des Antibiotikums **Meropenem** (PB 2%) für die Versuchsansätze ohne und mit Albumin, so fällt auf, dass die berechneten Werte von allen Erregern ähnlich sind. Die Zugabe von Albumin verändert demnach nicht den maximal erreichbaren Effekt.

Die  $EC_{50}$ -Werte für *S. aureus* zeigen, dass der halbmaximale Effekt der Ansätze ohne als auch mit Albuminzusatz bei den gleichen Konzentrationen erreicht wird ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 0,82 x

<sup>1</sup> Quotienten:  $\frac{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}{EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}}$   
 $\frac{EC_{50_{\text{freier Anteil}}}}{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}$

MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 0,88 x MHK). Dies trifft auch für *S. pneumoniae* zu ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 1,42 bzw.  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,62 x MHK).

Bei *H. influenzae* ist auffällig, dass sich bei Zugabe von Albumin der  $EC_{50}$ -Wert verringert. Der Wert mit Albumin ist ungefähr halb so hoch wie ohne Albumin (Quotient: 0,52).

Bei **Cefotaxim** (PB 37%) liegen die  $E_{\text{max}}$ -Werte als auch die  $EC_{50}$ -Werte der drei unterschiedlichen Versuchsansätze und Erreger im gleichen Bereich. Eine Ausnahme bildet jedoch der  $EC_{50}$ -Wert des freien Anteils von Cefotaxim bei *H. influenzae*. Dieser ist im Vergleich zum  $EC_{50}$ -Wert der Gesamtdosis mit Albumin 3,34-x höher.

Bei **Cefoxitin** (PB 70%) liegen die Werte für den maximalen Effekt ( $E_{\text{max}}$ ) bei allen Versuchsansätzen für die jeweiligen Erreger in einem ähnlichen Bereich.

Bei *S. aureus* führt die Zugabe von Albumin zu keiner nennenswerten Veränderung der  $EC_{50}$ -Werte. Die Werte liegen im gleichen Konzentrationsbereich ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 0,82 x MHK bzw.  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,03 x MHK).

Die Untersuchungen, die den freien Anteil von Cefoxitin enthalten, zeigen im Vergleich zu den Untersuchungen der Gesamtdosis mit Albumin eine Verschiebung des  $EC_{50}$ -Wertes in den höheren Konzentrationsbereich ( $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}$ : 2,77 x MHK anstelle von  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,03 x MHK ( $\equiv$  Quotient 2,69)). Somit müssen in den Untersuchungen, in denen nur der freie Anteil eingesetzt wurde, höhere Konzentrationen von Cefoxitin eingesetzt werden, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen.

Das Absterbeverhalten von *H. influenzae* zeigt, dass durch den Zusatz von Albumin bereits bei niedrigeren Konzentrationen der halbmaximale Effekt erreicht wird als bei den Untersuchungen ohne Albumin ( $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,89 x MHK;  $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 2,99 x MHK).

Besonders auffällig ist zudem der enorme Unterschied zwischen dem  $EC_{50}$ -Wert der freien Fraktion und dem  $EC_{50}$ -Wert der Gesamtdosis mit Albumin: die Werte differieren um den Wert 7,77, das heißt, dass mit der freien Fraktion erst mit einer ca. 8x höheren Konzentration der halbmaximale Effekt erreicht wird.

Auch beim **Faropenem** (PB 94%) liegen die Werte für den maximalen Effekt bei den drei unterschiedlichen Untersuchungsansätzen innerhalb einer Spezies im gleichen Bereich.

Bei *S. aureus* beeinflusst die Zugabe von Albumin die Wirkung von Faropenem in der Weise, dass im Vergleich zu den Versuchsansätzen ohne Albumin eine 8,21-x so hohe Konzentration

nötig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 0,33 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 2,71 x MHK).

Der  $EC_{50}$ -Wert der Versuchsansätze mit frei vorliegendem Faropenem differiert zum  $EC_{50}$ -Wert der Versuchsansätze mit Albumin um den Faktor 4,29 ( $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}$ : 11,63 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 2,71x MHK).

Bei *S. pneumoniae* wird der antibakterielle Effekt von Faropenem durch Albuminzusatz verringert. Anstelle der 5,11-fachen MHK in den Ansätzen ohne Albumin ist bei Albuminzugabe die 20,78-fache MHK nötig, um den halbmaximalen Effekt zu erhalten. Vergleicht man die  $EC_{50}$ -Werte des freien Anteils mit den  $EC_{50}$ -Werten, die bei Albuminzusatz berechnete werden, so wird deutlich, dass bei der freien Fraktion eine 4,02-mal höhere Konzentrationen eingesetzt werden muss, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen ( $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}$ : 83,62 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 20,78 x MHK).

Bei Faropenem und *H. influenzae* wird bei zugesetztem Albumin im Vergleich zum Ansatz ohne Albumin erst bei 9,5-fach höherer Dosierung der halbmaximale Effekt erreicht ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 1,23 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 11,68 x MHK).

Im Vergleich zum Ansatz mit Albumin muss bei der freien Fraktion eine mehr als doppelt so hohe Konzentrationen eingesetzt werden, um den halbmaximalen Effekt zu erhalten ( $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}$ : 24,71 x MHK; Quotient 2,12).

Tabelle 3.6: Emax- und  $EC_{50}$ -Werte sowie die Quotienten<sup>1</sup> der  $EC_{50}$ -Werte für die Chinolone aus den Untersuchungen in der Batchkultur

	Gatifloxacin 20%			Moxifloxacin 37%			Trovafoxacin 76%		
	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient	Emax	EC50 (nx MHK)	Quotient
<b>S. aureus</b>									
ohne Albumin	36,64	1,64	} 0,96	31,64	0,93	} 1,09	33,56	1,46	} 1,32
mit Albumin	36,65	1,58		32,02	1,01		33,34	1,93	
freier Anteil	35,77	1,87	} 1,18	31,95	1,55	} 1,53	31,05	4,27	} 2,21

Tabelle 3.6 stellt die Emax- und  $EC_{50}$ -Werte sowie die Quotienten<sup>1</sup> der  $EC_{50}$ -Werte der Antibiotika Gatifloxacin, Moxifloxacin und Trovafoxacin gegenüber dem Erreger *Staphylococcus aureus* dar.

Ebenso wie bei den  $\beta$ -Laktamen wird bei den Chinolonen durch die unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen und durch die Zugabe von Albumin der maximale Effekt nicht beeinflusst. Die Emax-Werte liegen für die einzelnen Antibiotika im ähnlichen Wirkungsbereich. Differenzen zeigen sich jedoch in den  $EC_{50}$ -Werten. Bei **Gatifloxacin** (PB 20%) sind diese jedoch nur marginal. Sowohl zugesetztes Albumin als auch nur frei vorliegendes Antibiotikum

<sup>1</sup> Quotienten:  $\frac{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}{EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}}$   
 $\frac{EC_{50_{\text{freier Anteil}}}}{EC_{50_{\text{mit Albumin}}}}$



führen im Vergleich zur Gesamtdosis ohne Albumin zu keiner nennenswerten Änderung der  $EC_{50}$ -Werte ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 1,64 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,58 x MHK;  $EC_{50_{\text{freier Anteil}}}$ : 1,87 x MHK).

Bei Zusatz von Albumin zu **Moxifloxacin** (PB 37%) verändern sich im Vergleich zum Ansatz ohne Albumin die  $EC_{50}$ -Werte nicht ( $EC_{50_{\text{ohne Albumin}}}$ : 0,93 x MHK;  $EC_{50_{\text{mit Albumin}}}$ : 1,01 x MHK).

Beim Vergleich des  $EC_{50}$ -Wertes der freien Moxifloxacinfraktion mit dem  $EC_{50}$ -Wert bei Zusatz von Albumin ist allerdings eine Abweichung zu beobachten: der Quotient beträgt 1,53.

Bei **Trovafloxacin** (PB 76%) kommt es durch die Zugabe von Albumin im Vergleich zum Ansatz ohne Albumin zu einer Verringerung des  $EC_{50}$ -Wertes, die  $EC_{50}$ -Werte differieren um den Faktor 1,32. Auffällig ist weiterhin der Unterschied zwischen dem  $EC_{50}$ -Wert der freien Fraktion und dem  $EC_{50}$ -Wert, der aus dem Ansatz mit Albumin ermittelt wurde: hier ist eine 2,21-fache Erhöhung der Konzentration nötig, um den gleichen halbmaximalen Effekt zu erreichen.

### 3.9. Pharmakologische Indizes und Proteinbindung

Mit Hilfe der pharmakologischen Indizes wird versucht, den Heilungserfolg einer Therapie vorherzusagen. Ein für den jeweiligen Index festgelegter Grenzwert soll dem Therapeuten einen Anhaltspunkt darüber geben, ob eine Therapie unter den von ihm gewählten Bedingungen voraussichtlich einen Heilungserfolg bringen wird.

Die Tabellen 3.7 (a) bis (c) zeigen die pharmakodynamischen Parameter MHK und  $AAC_{12}$ , die pharmakokinetischen Parameter  $AUC_{12}$  und  $C_{\text{max}}$ , sowie die kalkulierten Pharmakologischen Indizes  $AUC_{12}/\text{MHK}$ ,  $C_{\text{max}}/\text{MHK}$  und  $T_{>\text{MHK}}$  für die unterschiedlichen Simulationen der  $\beta$ -Laktame im *in-vitro* Modell für die Erreger *S. aureus* (Tab. 3.7 (a)), *S. pneumoniae* (Tab. 3.7 (b)) und *H. influenzae* (Tab. 3.7 (c)).

In die Berechnung der Pharmakologischen Indizes dieser Tabelle wurde –wie von der ISAP gefordert– die Proteinbindung eines Antibiotikums mit einbezogen. Für die Berechnung der Indizes  $C_{\text{max}}/\text{MHK}$  und  $AUC_{12}/\text{MHK}$  der Simulationen *mit* Albumin wurde dementsprechend nur der  $C_{\text{max}}$ - und  $AUC_{12}$ -Wert des theoretisch frei vorliegenden Antibiotikums in die Berechnung einbezogen, diese Werte entsprechen denen der Simulation des berechneten freien Anteils. Für die graphische Ermittlung des Index  $T_{>\text{MHK}}$  bei der Simulation *mit* Albumin wurde die Konzentrations-Zeit-Kurve des theoretisch frei vorliegenden Antibiotikums herangezogen, die wiederum der Konzentrations-Zeit-Kurve der simulierten freien, berechneten Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht.

Gemäß Schentag und Forrest ist ab einem Wert von 125 für den Index  $AUC/MHK$ , einem Wert von 8-12 für den Index  $C_{max}/MHK$ , sowie einem Wert von 50-60% für den Index  $T_{>MHK}$  einen Heilungserfolg zu erwarten (Schentag *et al.* 1991, Forrest *et al.* 1993).

Die in der Tabelle 3.7 (a)-(c) grau unterlegten Felder zeigen die *in-vitro* Modell Studien, bei denen die oben genannten Grenzwerte der jeweiligen Pharmakologischen Indizes überschritten wurden und somit ein Heilungserfolg eintreten sollte.

Tabelle 3.7 (a), (b) und (c): PD- und PK-Parameter sowie Pharmakologische Indizes für die  $\beta$ -Laktame im *in-vitro* Modell

Tabelle 3.7. a		Pharakodynamische Parameter		Pharmakokinetische Parameter		Pharmakologische Indizes		
		MHK (mg/L)	Effekt (AAC <sub>12</sub> -Wert)	AUC <sub>12</sub> (mg/L.h)	C <sub>max</sub> (mg/L)	AUC <sub>12</sub> /MHK (h)	C <sub>max</sub> /MHK	T <sub>&gt;MHK</sub> (12h) (%)
<b>Staphylococcus aureus</b>								
Meropenem (2%)	(1) 500 mg ohne Albumin	0,25	5,4	30,3	26,0	121,3	104,0	54,2
	(2) 500 mg mit Albumin		4,8	29,7	25,5	118,9	101,9	54,2
Cefotaxim (37%)	(1) 2 g ohne Albumin	2	5,2	158,7	125,9	79,4	62,9	50,0
	(2) 2 g mit Albumin		8,0	100,0	79,3	50,0	39,6	41,7
	(3) 1,26 g ohne Albumin (freier Anteil)		4,6	100,0	79,3	50,0	39,6	41,7
Cefoxitin (70%)	(1) 2 g ohne Albumin	4	1,7	141,6	244,0	35,4	61,0	29,2
	(2) 2 g mit Albumin		1,6	42,5	73,2	10,6	18,3	15,0
	(3) 0,6 g ohne Albumin (freier Anteil)		-14,6	42,5	73,2	10,6	18,3	15,0
Faropenem (94%)	(1) 300 mg ohne Albumin	0,125	12,8	28,1	11,8	225,0	94,4	67,0
	(2) 300 mg mit Albumin		14,0	1,7	0,7	13,5	5,7	33,0
	(3) 18 mg ohne Albumin (freier Anteil)		3,7	1,7	0,7	13,5	5,7	33,0

Bei *S. aureus* fällt für den Index  $AUC_{12}/MHK$  auf, dass nur für die Simulation „Faropenem ohne Albumin“ ein Heilungserfolg zu erwarten wäre, da allein hier der Index oberhalb von 125 liegt. Betrachtet man allerdings für die Simulation ohne und mit Albumin die AAC<sub>12</sub>-Werte als Maß für den Effekt von Faropenem, so stellt man fest, dass diese trotz unterschiedlicher Pharmakologischen Indizes denselben Wert liefern, also die Wirkung gleich ist. Ähnliches lässt sich auch am Beispiel von *S. pneumoniae* zeigen (Tab. 3.7 b).

Hier ist für das Antibiotikum Faropenem nur bei der Simulation ohne Albumin ein Therapieerfolg zu erwarten, da nur hier der Index  $T_{>MHK}$  oberhalb von 50% liegt. Allerdings sind auch in diesem Fall die AAC<sub>12</sub>-Werte der Simulation ohne und mit Albumin in einem ähnlichen Bereich.

Tabelle 3.7. b									
<b>Streptococcus pneumoniae</b>									
Meropenem (2%)	(1) 500 mg ohne Albumin	1	21,3	30,3	26,0	30,3	26,0	33,3	
	(2) 500 mg mit Albumin		19,8	29,7	25,5	29,7	25,5	33,3	
Cefotaxim (37%)	(1) 2 g ohne Albumin	0,5	26,2	158,7	125,9	317,5	251,7	70,8	
	(2) 2 g mit Albumin		23,6	100,0	79,3	200,0	158,6	62,5	
	(3) 1,26 g ohne Albumin (freier Anteil)		19,7	100,0	79,3	200,0	158,6	62,5	
Faropenem (94%)	(1) 300 mg ohne Albumin	0,25	26,3	28,1	11,8	112,5	47,2	63,0	
	(2) 300 mg mit Albumin		21,0	1,7	0,7	6,8	2,8	21,0	
	(3) 18 mg ohne Albumin (freier Anteil)		-0,8	1,7	0,7	6,8	2,8	21,0	

Zudem ist am Beispiel von *H. influenzae* (Tab. 3.7 c) deutlich zu erkennen, dass trotz gleicher Pharmakologischer Indizes bei der Simulation von Faropenem mit Albumin und der Simulation des frei vorliegenden Anteils (beide  $C_{\max}$ /MHK-Werte liegen bei 1,4) eine Diskrepanz in der antibakteriellen Wirkung zu beobachten ist, die AAC<sub>12</sub>-Werte differieren um den Wert 7,82.

Tabelle 3.7. c

		Pharakodynamische Parameter		Pharmakokinetische Parameter		Pharmakologische Indizes			
		MHK (mg/L)	Effekt (AAC <sub>12</sub> -Wert)	AUC <sub>12</sub> (mg/L.h)	C <sub>max</sub> (mg/L)	AUC <sub>12</sub> /MHK (h)	C <sub>max</sub> /MHK	T <sub>&gt;MHK</sub> (12h) (%)	
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>									
	Meropenem (2%)	(1) 500 mg ohne Albumin	0,06	9,39	30,3	26,0	505,4	433,3	41,7
		(2) 500 mg mit Albumin		11,66	29,7	25,5	495,3	424,7	41,7
Cefotaxim (37%)	(1) 2 g ohne Albumin	0,06	25,04	158,7	125,9	2645,5	2097,7	100,0	
	(2) 2 g mit Albumin		23,74	100,0	79,3	1666,7	1321,5	95,8	
	(3) 1,26 g ohne Albumin (freier Anteil)		29,69	100,0	79,3	1666,7	1321,5	95,8	
Cefoxitin (70%)	(1) 2 g ohne Albumin	4	-2,14	141,6	244,0	35,4	61,0	29,2	
	(2) 2 g mit Albumin		-5,03	42,5	73,2	10,6	18,3	12,5	
	(3) 0,6 g ohne Albumin (freier Anteil)		-11,78	42,5	73,2	10,6	18,3	12,5	
Faropenem (94%)	(1) 300 mg ohne Albumin	0,5	11,29	28,1	11,8	56,3	23,6	54,2	
	(2) 300 mg mit Albumin		-6,11	1,7	0,7	3,4	1,4	0	
	(3) 18 mg ohne Albumin (freier Anteil)		-13,93	1,7	0,7	3,4	1,4	0	

Wie im Abschnitt 3.5 bereits ermittelt, zeigt *H. influenzae* als einziger Erreger im *in-vitro* Modell einen Unterschied im Absterbeverhalten bei der Simulation der Gesamtdosis mit und ohne Albuminzusatz. Bei der Simulation ohne Albumin kommt es zu einem Absterben der Bakterien, bei der mit Albumin zum Anwachsen der Zellen (AAC<sub>12</sub> ohne Albumin: 11,29; AAC<sub>12</sub> mit Albumin: -6,11). Auffällig ist hierbei, dass sich die MHK von *H. influenzae* mit 0,5 mg/L gegenüber Faropenem im Bereich der freien Konzentration des maximalen Plasmaspiegels ( $C_{\max}$ =0,7 mg/L) befindet.

## 4. Diskussion

Die Diskussionen über die rationale Dosierung von Antibiotika sind auch heute, beinahe 60 Jahre nach Einführung des Penicillins, noch nicht abgeschlossen. Gegenwärtig wird versucht, die Dosierung unter Einbeziehung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des jeweiligen Antibiotikums zu optimieren. Angewandte Methoden sind dabei unter anderem das PK/PD-modeling und die Berechnung der Dosis mit Hilfe pharmakologischer Indizes. Dabei gibt es jedoch noch viele ungelöste Fragen. Insbesondere sind die Auswirkungen der Plasmaproteinbindung auf die Pharmakodynamik von Antibiotika bislang nicht hinreichend untersucht.

Das Ziel jeder Antibiotikatherapie ist eine effektive und sichere Behandlung. Dabei bewirkt eine bestimmte Dosis einen bestimmten Konzentrations-Zeit-Verlauf des Antibiotikums im Organismus (Pharmakokinetik). Die Konzentration des Antibiotikums am Ort der Infektion ist indes verantwortlich für die Wirkung (Pharmakodynamik) (Abb. 4.1). Veränderungen in der Pharmakodynamik eines Antibiotikums sind infolgedessen das Resultat von Veränderungen in der Dosis und/ oder der Pharmakokinetik.



Abbildung 4.1: Darstellung der Zusammenhänge zwischen Dosis, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (Schaubild nach Mück, 2004)

Durch Bindung des Antibiotikums an Plasmaproteine kommt es zu einer solchen Veränderung der Pharmakokinetik, also auch der Pharmakodynamik. Dass eine Bindung an Plasmaproteine die Wirkung eines Antibiotikums herabsetzen kann, ist unumstritten. Fraglich ist allerdings, wie der Zusammenhang zwischen Proteinbindung und Herabsetzung der Wirkung quantifiziert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, diesen quantitativen Zusammenhang zwischen Proteinbindung und Pharmakodynamik mit Hilfe von *in-vitro* Studien zu ermitteln.

Die Pharmakodynamik eines Antibiotikums kann mittels Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt werden. Charakteristisch hierbei ist, dass die Wirkintensität zunächst in einem ausgeprägten Maß zunimmt, jedoch bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration keine wesentliche Erhöhung der Wirkintensität mehr möglich ist. Zur Analyse von Konzentrations-Wirkungskurven eignen sich die Parameter  $E_{max}$ ,  $EC_{100}$  und  $EC_{50}$ . Dabei beschreibt der  $E_{max}$ -Wert die maximal erreichbare Wirkungsintensität. Der  $EC_{100}$ -Wert ist die

Antibiotikumkonzentration, bei der der maximale Effekt erreicht wird. Entsprechend ist der  $EC_{50}$ -Wert die Konzentration, bei der 50% der Wirkungsintensität erreicht sind.

In Abbildung 4.2 werden die Zusammenhänge zwischen Proteinbindung und Pharmakodynamik verdeutlicht. Dabei zeigt die durchgezogene Konzentrations-Wirkungskurve schematisch die Pharmakodynamik eines Antibiotikums ohne Einfluss der Proteinbindung, das heißt ohne Zusatz von Albumin. Bei Zugabe von Albumin kann es nun durch Bindung zu einer Verschlechterung der Wirkung kommen. Es sind also höhere Konzentrationen des Antibiotikums nötig, um den gleichen Effekt wie bei Nicht-Zugabe von Albumin zu erhalten. Diese Herabsetzung der Pharmakodynamik durch Bindung an Plasmaproteine wird graphisch durch die „rechtsverschobene“, gestrichelte Kurve dargestellt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass nur bis zu einer bestimmten Konzentration, nämlich  $EC_{100}$  mit Albumin („2“), die Wirkung herabgesetzt wird. Ab dieser Grenzkonzentration (gekennzeichnet durch den weißen Kreis) ist aufgrund der Sättigung des Effekts die Wirkung ohne und mit Albuminzusatz wieder identisch.

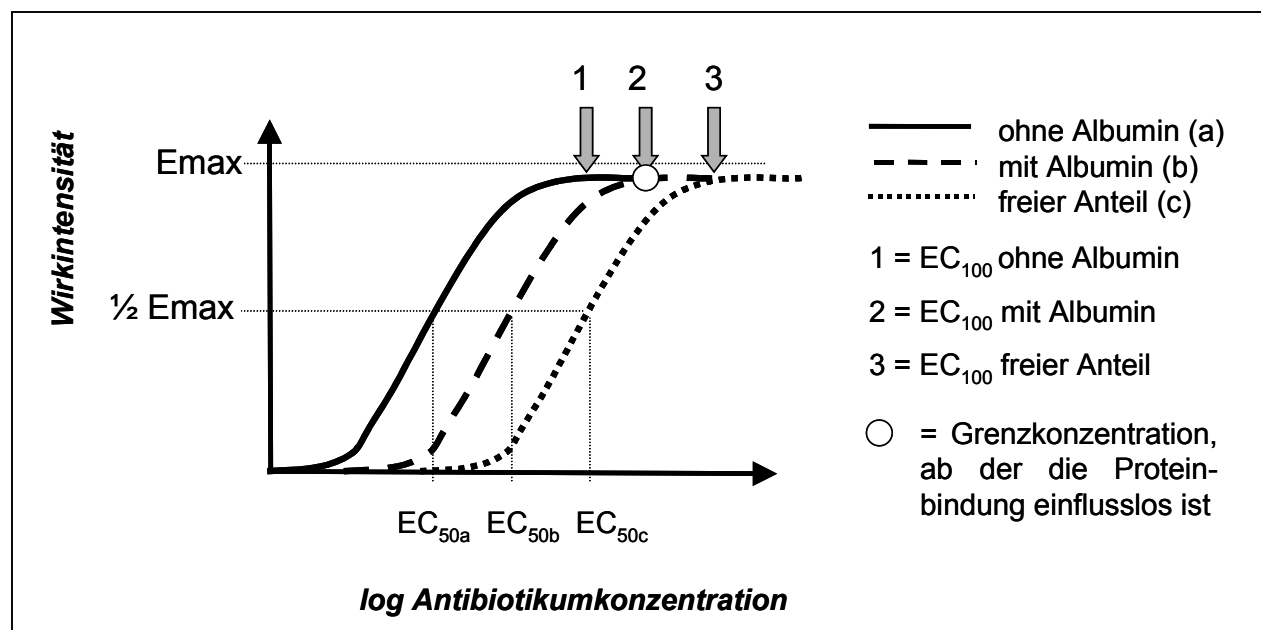


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurven ohne Albumin, mit Albumin und des freien Anteils. Eingezeichnet sind die Parameter  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  und  $EC_{100}$ .

Unklar ist nun, **ab welchem Prozentsatz der Bindung** es zu einer Verringerung der Wirkung, also zu einer „Rechtsverschiebung“ der Kurve, kommt. Falls es dann durch Bindung an Proteine zu einer Herabsetzung der Wirkung kommt, ist fraglich, wie stark dieser Wirkverlust ausgeprägt ist, welchen **Abstand** also die Kurven ohne und mit Albuminzusatz zueinander aufweisen. Dieser Abstand lässt sich dabei gut durch Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte ohne und mit Albumin charakterisieren ( $EC_{50a}$  und  $EC_{50b}$ ). Wie in der Einleitung bereits dargestellt, gehen viele Autoren

davon aus, dass die Bindung an Plasmaproteine die Wirkung soweit herabsetzt, dass diese mit der Wirkung der berechneten freien Fraktion identisch ist (vgl. 1.2; Kunin *et al.* 1973, Merrikin *et al.*, 1983, Wise, 1985). Bei Zutreffen dieser Annahme müsste - auf Abbildung 4.2 bezogen - die Kurve mit Albumin soweit in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben werden, bis sie der Konzentrations-Wirkungskurve des berechneten freien Anteils (gepunktete Kurve) entspricht, somit die  $EC_{50b}$ - und  $EC_{50c}$ -Werte identisch sind.

Nach Kunin, Wise und Craig kommt es ab einer prozentualen Bindung eines Antibiotikums von über 80% zu einem Einfluss auf die Wirkung (also zu einer „Rechtsverschiebung“ der Kurve mit Albumin). Die Begründung hierfür ist - nach Kunin -, dass eine Proteinbindung von unter 80% nur einen sehr geringen Einfluss auf den frei vorliegenden, also wirksamen Anteil des Antibiotikums haben dürfte. Hingegen sei ab einer Bindung von über 80% mit zunehmenden Auswirkungen auf den frei vorliegenden Anteil zu rechnen (Kunin *et al.*, 1973b). Wise behauptet, dass ab 80% zudem die Gewebepenetration des Antibiotikums vermindert sei (Wise, 1985). Gestützt werden diese Überlegungen auch durch eine, allerdings rein pharmakokinetische, Studie von Craig *et al.* (Craig *et al.*, 1984).

Darüber hinaus nimmt Rolinson an, dass ein Einfluss auf die Wirkung nur unterhalb einer Antibiotikumkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zu beobachten, also bei dieser Konzentration die „Grenzkonzentration“ anzusiedeln sei (Rolinson, 1980).

Eigene Untersuchungen zur Überprüfung dieser Annahmen konnten zeigen, dass bei den weit unterhalb von 80% bindenden Antibiotika Meropenem, Cefotaxim, Gatifloxacin und Moxifloxacin sowohl bei konstant steigenden Antibiotikumkonzentration in der Batchkultur als auch im *in-vitro* Modell die Wirkung durch Bindung an Albumin *nicht* herabgesetzt wird. Insoweit ist die Theorie von Kunin, Wise und Craig also zutreffend.

Bei den Untersuchungen in der Batchkultur mit dem zu über 80% an Albumin bindenden Antibiotikum Faropenem (PB 94%) konnte indes festgestellt werden, dass durch Proteinbindung die Wirkung zwar signifikant herabgesetzt wird, allerdings nur in einem kleinen Konzentrationsbereich zwischen „keinem Effekt“ und dem „ $EC_{100}$  mit Albumin“. Dieser Bereich kann aus den experimentellen Daten abgeschätzt werden und liegt bei Faropenem mit *S. aureus* zwischen 0,0625 und 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mit *S. pneumoniae* zwischen 0,5 und 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und mit *H. influenzae* zwischen 0,25 und 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (vgl. Abb. 3.16 a-c). Oberhalb dieser Konzentrationen spielt die Proteinbindung keine Rolle mehr. So sind beispielsweise bei Faropenem und *S. aureus*

ab  $8 \mu\text{g/mL}$  die  $E_{\text{max}}$ -Werte ohne und mit Zusatz von Albumin gleich ( $E_{\text{max}}$  ohne Albumin: 24,82;  $E_{\text{max}}$  mit Albumin: 24,86) (vgl. Tab. 3.5).

Doch nicht allein bei Faropenem, auch bei den knapp unterhalb von 80% bindenden Antibiotika Trovafloxacin (76%) und Cefoxitin (70%) kommt es bei Zusatz von Albumin zu einer Reduktion der Wirkung. Dies jedoch nur bei einer Konzentration, die der MHK entspricht. Abbildung 4.3 stellt diesen Wirkunterschied bei 1-facher MHK dar, der sich auch in stark differierenden AAC-Werten<sup>1</sup> ausdrückt.

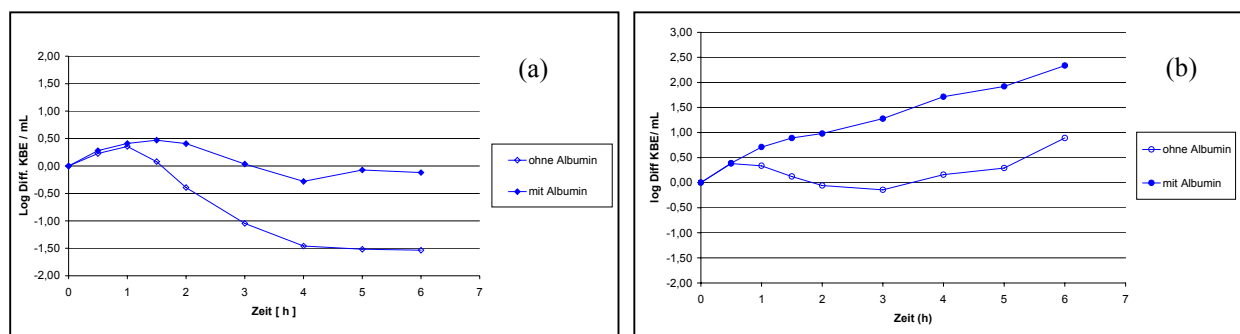


Abbildung 4.3.: Absterbekinetiken von *S. aureus* nach Exposition von Trovafloxacin (a) und Cefoxitin (b) bei einer Konzentration, die dem 1-fachen der MHK entspricht, mit und ohne Albuminzusatz in der Batchkultur über einen Zeitraum von 6 Stunden.

Bei Erhöhung der Cefoxitin bzw. Trovafloxacinkonzentration minimiert sich hingegen dieser Unterschied. Bereits ab einer Konzentration, die dem 2-fachen der MHK entspricht, sind bei beiden Antibiotika die AAC-Werte mit und ohne Albumin deckungsgleich. Der Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung durch Plasmaproteinbindung herabgesetzt ist, liegt bei Trovafloxacin zwischen  $0,03125$  und  $0,125 \mu\text{g/mL}$ , bei Cefoxitin mit *S. aureus* zwischen  $2$  und  $8 \mu\text{g/mL}$  (vgl. Abb. 3.13 a und 3.22).

Die Grenzkonzentration, ab der die Proteinbindung die Wirkung einer Substanz nicht mehr beeinflusst, liegt also nicht - wie von Rolinson angenommen - bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/mL}$ . Bei Faropenem, Trovafloxacin und Cefoxitin liegt sie zwischen  $0,125$  und  $32 \mu\text{g/mL}$ . Es gibt also keine einheitliche Grenzkonzentration, die für jedes Antibiotikum und jeden Erreger gleich ist. Eigene Untersuchungen konnten vielmehr zeigen, dass die Grenzkonzentration dann

<sup>1</sup> Trovafloxacin- *S. aureus*:  $AAC_{\text{mit Albumin}}$ : -0,5, also Wachstum,  $AAC_{\text{ohne Albumin}}$ : 4,75, also Absterben der Zellen, vgl. Tab. 7.23

Cefoxitin- *S. aureus*:  $AAC_{\text{ohne Albumin}}$ : -1,13,  $AAC_{\text{mit Albumin}}$ : -7,82, vgl. Tab. 7.16

erreicht ist, wenn die *theoretisch frei* vorliegende Konzentration im Bereich der MHK des Erregers liegt, bzw. diese um den Faktor 2-4 überschreitet (vgl. 3.7, Tab. 3.4).

Bei Kenntnis der Grenzkonzentration erklärt sich auch, warum bei therapeutisch relevanten Dosierungen im *in-vitro* Modell die Zugabe von Albumin auch bei Antibiotika mit höherer Proteinbindung nicht zwangsläufig zu einer Reduzierung der Wirkung führt.

Bei Cefoxitin und *S. aureus* beträgt die Grenzkonzentration – wie bereits gezeigt - 8 µg/mL. Hingegen liegt der maximale Plasmaspiegel einer 2 g intravenösen Bolus Gabe von Cefoxitin bei 244 µg/mL und somit weit oberhalb dieser Grenzkonzentration. Es ist daher nicht verwunderlich, dass im *in-vitro* Modell keine Reduktion der Wirkung aufgrund der Proteinbindung zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.14).

Auch bei Faropenem und den Stämmen *S. aureus* und *S. pneumoniae* ist ebenfalls im *in-vitro* Modell bei therapeutisch relevanten Dosierungen kein Unterschied im Absterbeverhalten ohne und mit Zusatz von Albumin zu erkennen. Hier liegt der maximale Plasmaspiegel einer 300 mg Faropenem Dosis bei 11,8 µg/mL und damit um 50 % höher als die Grenzkonzentration (8 µg/mL) beider Erreger (vgl. Abb. 3.17 und 3.18).

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung kommt es bei Faropenem mit *H. influenzae* bei Simulation mit Albumin nur zu einem bakteriostatischen, bei Simulation ohne Albumin dagegen zu einem bakteriziden Effekt (vgl. Abb. 3.19). Die Grenzkonzentration, ab der die Proteinbindung bei Faropenem und *H. influenzae* keine Auswirkung mehr auf die Wirkung der Substanz hat, liegt bei 32 µg/mL (vgl. Tab. 3.4) und damit weit oberhalb des  $C_{\max}$  (11,8 µg/mL) der eingesetzten 300 mg Dosis Faropenem. Demzufolge befindet sich das gesamte Konzentrations-Zeit-Profil dieser Simulation unterhalb der Grenzkonzentration. Daher ist bei *H. influenzae*, dessen MHK (0,5 mg/L) im Bereich des theoretisch frei vorliegenden  $C_{\max}$  (0,7 mg/L) von Faropenem bei Albuminzusatz anzusiedeln ist, die Faropenemkonzentration nicht ausreichend, um zu einer Keimzahlreduktion zu führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Theorie von Kunin, Wise und Craig nur bedingt zutrifft. Zwar wird bei dem zu über 80% an Albumin bindenden Antibiotikum Faropenem die Wirkung verringert, allerdings nur in einem kleinen Konzentrationsbereich. Bei therapeutisch relevanten Dosierungen oberhalb der Grenzkonzentration kommt es hingegen nicht notwendigerweise zu einer Verminderung des Effektes.

Unterhalb einer Bindung von 80% beeinflusst die Proteinbindung die Wirkung von Antibiotika nicht (Ausnahme: 1 x MHK).



Darüber hinaus liegt die Grenzkonzentration nicht zwangsläufig, wie von Rolinson angenommen, bei 100 µg/mL, sondern durchaus auch bei geringeren Konzentrationen.

Nachdem dargestellt wurde, ab welcher Bindungshöhe die Wirkung eines Antibiotikums durch Proteinbindung beeinflusst wird, soll im folgenden geklärt werden, wie ein solcher Wirkerlust quantifiziert werden kann.

Oft wird angenommen, dass Plasmaproteinbindung die Wirkung soweit herabsetze, bis diese identisch mit der Wirkung der berechneten freien Fraktion sei (vgl. Abb. 4.2). So gehen einige Autoren davon aus, dass sich der wirksame Anteil relativ einfach ermitteln lasse, und zwar durch „subtrahieren“ des prozentualen Anteils der Proteinbindung von den pharmakokinetischen Parametern (wie bspw.  $C_{max}$ , AUC oder dem gesamten Konzentrations-Zeit-Profil). In diesem Zusammenhang gilt beispielsweise bei der Durchführung von *in-vitro* Modellen die ungeschriebene Vorschrift, dass Ergebnisse nur dann als korrekt angesehen werden können, wenn diese „Subtraktion der Proteinbindung“ im Vorfeld vorgenommen wird. Also nur der Anteil des bei dieser Bindung theoretisch frei vorliegenden Antibiotikums simuliert wird (Lubenko *et al.*, 2003). Auch sollen laut ISAP bei der Kalkulierung der pharmakologischen Indizes die pharmakokinetischen Parameter auf die „ungebundene Fraktion bezogen“, bzw. es sollte der Grad der Proteinbindung angegeben werden, damit eine Berechnung der freien Fraktion möglich sei (Mouton *et al.*, 2002) (vgl. 4.1).

Durch die vorgelegten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die komplexen Vorgänge im Zusammenhang mit der Proteinbindung nicht auf eine solch einfache Formel reduziert werden können. Auch schon aufgrund theoretischer Überlegungen kann eine solche Berechnung angezweifelt werden. Es ist davon auszugehen, dass der freie Anteil variabel ist, was unter anderem mit der Sättigung der Albuminbindung zusammenhängt. Die Zahl der Bindestellen des Albuminmoleküls ist begrenzt. Nach Absättigung der Bindestellen sinkt bei Konzentrationssteigerung der Prozentsatz der Proteinbindung. Dementsprechend erhöht sich der Anteil der freien Fraktion, so dass dieser im Extremfall nahezu der Gesamtmenge des Antibiotikums entspricht. Dies führt auch zu einer Verringerung des Wirkungsunterschieds zwischen der Konzentration des frei vorliegenden Antibiotikums und der Gesamtkonzentration (Perry *et al.*, 2001). Die Höhe der Proteinbindung und somit auch des freien Anteils ist also variabel, demnach nicht einfach berechenbar. Gut untersucht ist dieses Phänomen für Ceftriaxon. Dessen konzentrationsabhängige Bindung variiert zwischen 95% bei niedrigen (<100 µg/mL), und 60% bei hohen (>400 µg/mL) Konzentrationen (Popick *et al.*, 1987).

Unterhalb der Sättigungskonzentration wird überwiegend angenommen, dass der Prozentsatz der Bindung stabil bleibt und der Anteil des frei vorliegenden Antibiotikums nicht variiert. Demnach könnte davon ausgegangen werden, dass zumindest unterhalb der Sättigungskonzentration die freie Fraktion einfach berechnet werden könnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass aufgrund des sich binnen Millisekunden einstellenden dynamischen Gleichgewichts (Massenwirkungsgesetz) zwischen ungebundener und gebundener Form freies, „verbrauchtes“ (entweder durch Elimination oder durch Bindung an bakterielle Rezeptoren) Antibiotikum durch aus den Proteinbindungen „nachdiffundierendes“ Antibiotikum ersetzt wird. Letzteres würde dann wirksam, also eine „Depotfunktion“ ausüben. Auch unterhalb der Sättigungskonzentration bestünde daher eine Variabilität des frei vorliegenden Anteils, außerdem wäre „mehr“ als nur der theoretisch frei vorliegende Anteil wirksam.

Eigene Untersuchungen konnten diese Überlegungen bestätigen und zeigen, dass die Herabsetzung der Wirkung durch Proteinbindung geringer ist als bislang angenommen.

Am Beispiel der Untersuchung von Faropenem und *S. aureus* in der Batchkultur soll dies erläutert werden (vgl. hierzu Tab. 3.5). Der  $EC_{50}$ -Wert ohne Zusatz von Albumin liegt bei 0,3 x MHK, bei dieser Konzentration ist also der halbmaximale Effekt erreicht. Würde sich aufgrund der 94%igen Proteinbindung von Faropenem die Wirkung auf 6% der Gesamtmenge beschränken, so müsste in diesem Fall der  $EC_{50}$ -Wert mit Albumin identisch mit dem der berechneten freien Fraktion sein und somit bei 11,8 x MHK liegen. Die Untersuchungen zeigen allerdings, dass der  $EC_{50}$ -Wert mit Albumin bei einer viel niedrigeren Konzentration, nämlich nur bei 2,7 x MHK liegt. Dies ist zwar höher als der  $EC_{50}$ -Wert ohne Zusatz von Albumin aber dennoch 4,3 x geringer als der  $EC_{50}$ -Wert des berechneten freien Anteils. Übertragbar ist diese Beobachtung auf Faropenem mit den Erregern *S. pneumoniae* und *H. influenzae* sowie auf die Antibiotika Cefoxitin (vgl. Abb. 3.13 a und b) und Trovafloxacin (vgl. Abb. 3.22). Auch im *in-vitro* Modell wirkt bei diesen Substanzen die freie Fraktion schwächer als die Gesamtdosis mit Albumin (vgl. Abb. 3.14, 3.17, 3.18, 3.19)

Bei den schwächer bindenden Antibiotika Cefotaxim, Moxifloxacin und Gatifloxacin, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Proteinbindung die Wirkung des Antibiotikums ohnehin nicht beeinflusst, ist sowohl im *in-vitro* Modell als auch in der Batchkultur die Wirkung der Gesamtdosis mit Albumin mit der Wirkung der berechneten freien Fraktion identisch.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass der gebundene Anteil eine Art „Depoteffekt“ ausübt und wirksam wird, sobald der frei vorliegend Anteil dem dynamischen Gleichgewicht entzogen wird. Die Wirkung höher bindender Antibiotika durch Proteinbindung wird zwar herabgesetzt, jedoch bei weitem nicht so stark wie man dies bislang angenommen hat. Die berechnete freie Fraktion wirkt wesentlich schwächer als die tatsächlich vorliegende Gesamtkonzentration mit Albumin.

Die Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit zur Auswirkung der Proteinbindung gewonnen wurden, könnten in Zukunft zur Optimierung der Dosierung von Antibiotika mit hoher Proteinbindung (>80%) genutzt werden.

So wäre im Einzelfall zu ermitteln, ob die Konzentration am Ort der Infektion oberhalb der Konzentration liegt, bei der der  $EC_{100}$ -Wert mit Albumin erreicht wird. Ist dies der Fall, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinbindung keinen Effekt auf die Wirkung des hoch gebundenen Antibiotikums hat und bei der Dosierung nicht berücksichtigt werden muss.

Darüber hinaus sind die hier gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von potenten Substanzen mit sehr hoher Proteinbindung von Bedeutung. Deren Entwicklung wird aufgrund der hohen Proteinbindung oftmals nicht weiterverfolgt. Es besteht indes die Möglichkeit, dass die Proteinbindung bei Dosierungen im therapeutisch relevanten Bereich keinerlei negativen Einfluss auf die Wirkung hat. Gerade im Hinblick auf die weltweit zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika ist die Erforschung neuer Substanzen außerordentlich wichtig. Antibiotika sollten daher nicht *allein* aufgrund ihrer hohen Proteinbindung aus der präklinischen und klinischen Entwicklung ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit zwei Beobachtungen gemacht, die zum einen im Zusammenhang mit der Pharmakodynamik der  $\beta$ -Laktame stehen und zum anderen einen weiteren, bislang nicht dargestellten Einfluss von Proteinen aufzeigen.

So konnte bei der Analyse der Absterbekinetiken in der Batchkultur festgestellt werden, dass es bei Untersuchungen von *S. aureus* mit den Antibiotika Meropenem und Faropenem bei Einsatz von *höheren* Konzentrationen zu *niedrigeren* Effekten kommt. Dieses paradoxe Phänomen wird als „Eagle-Effekt“ bezeichnet (vgl. Abschnitt 1.6). Ebenso wie in der Batchkultur ist auch im *in-vitro* Modell das verminderte Absterben von *S. aureus* bei höheren Faropenemkonzentrationen zu beobachten (vgl. Abb 3.17).

Die zweite Beobachtung ist die des untypischen Wachstums von *H. influenzae*. Es konnte festgestellt werden, dass *H. influenzae* allein durch Albuminzusatz abstirbt. So wuchs er ohne Albumin stets besser als mit Albumin (vgl. Abb 3.3). Ähnliche Ergebnisse erhielten auch MacGowan *et al.*, die dies auf die Anwesenheit von Komplement zurückführten (vgl. 1.2) (MacGowan *et al.*, 2004). Diese Tatsache führt nun dazu, dass ein synergistischer Effekt zwischen Antibiotikum und Albumin nicht ausgeschlossen werden kann. Untersuchungen zur Proteinbindung setzen jedoch voraus, dass die Zugabe von Protein weder das Wachstum noch das Absterben eines Erregers beeinflusst. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Stamm *H. influenzae* sind daher kritisch zu betrachten.

#### 4.1. Pharmakologische Indizes und Proteinbindung

In ihrer Veröffentlichung zur Standardisierung der PK/PD Terminologie verlangt die International Society of Anti-Infective Pharmacology (ISAP), dass bei der Berechnung der Pharmakologischen Indizes diese auf die berechnete freie Fraktion bezogen werden müssen (Mouton *et al.*, 2002). Laut ISAP setzt die Proteinbindung die Wirkung eines Antibiotikums soweit herab, dass sie der Wirkung der berechneten freien Substanz entspricht. Die Einbeziehung der *kompletten* Fraktion in die Berechnung der Indizes würde daher nach Vorstellung der ISAP zu „falsch-hohen“ Werten und im ungünstigsten Fall zu der fehlerhaften Schlussfolgerung führen, dass die Grenzwerte für einen Therapieerfolg bereits erreicht seien.

Durch eigene Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass trotz der identischen Indizes der Gesamtdosis mit Albumin (nach Abzug der gebundenen Fraktion) und der freien Fraktion die AAC-Werte, die den tatsächlich vorherrschenden Effekt widerspiegeln, keinesfalls immer identisch sind. Vor allem bei den hoch bindenden Antibiotika Cefoxitin und Faropenem ergeben sich erhebliche Unterschiede. Bei Cefoxitin (vgl. Tab. 3.7 a) liegen beispielsweise für *S. aureus* die  $C_{\max}$ /MHK-Werte der **freien Fraktion** und der **Gesamtdosis mit Albumin** (nach Abzug der gebundenen Fraktion) beide bei 18,3. Demnach müsste davon ausgegangen werden, dass auch der Effekt bei beiden Simulationen ähnlich ist. Die AAC-Werte differieren allerdings enorm (AAC<sub>mit Albumin</sub>: 1,6, die Zellen sterben also ab; AAC<sub>freie Fraktion</sub>: -14,6, hier wachsen die Zellen an). Dieses Beispiel zeigt, dass gleiche Indizes nicht zwangsläufig gleiche Effekte zur Folge haben und somit für die Vorhersage der antibakteriellen Wirkung nicht geeignet sind.

Eingangs wurde dargelegt, dass oberhalb der Grenzkonzentration die Proteinbindung keinen Einfluss mehr auf die Wirkung des Antibiotikums hat. Bei Standarddosierungen im *in-vitro* Modell werden diese Grenzkonzentrationen beim maximalen Plasmaspiegel ( $C_{\max}$ ) mindestens

erreicht, vielfach sogar überschritten. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die AAC-Werte bei den Simulationen der Gesamtdosis **ohne** und **mit Albumin** im *in-vitro* Modell in fast allen Fällen nahezu gleich sind. Dies spiegelt sich allerdings bei „ordnungsgemäßer, ISAP-konformer“ Einbeziehung der Proteinbindung nicht in den Pharmakologischen Indizes wieder. Die Indizes „mit Albumin“ liegen - je nach Höhe der Proteinbindung- um ein Vielfaches niedriger als die Indizes „ohne Albumin“. So liegt der  $AUC_{12}/MHK$ -Wert von Faropenem und *S. pneumoniae* ohne Albumin bei 112,5, mit Albumin (nach Abzug der gebundenen Fraktion) nur bei 6,8. Die AAC-Werte und auch die eigentlichen Absterbekinetiken hingegen sind nahezu gleich ( $AAC_{\text{ohne Albumin}}$ : 26,3;  $AAC_{\text{mit Albumin}}$ : 21,0) (vgl. Abb. 3.18). Aufgrund der niedrigeren Indizes der Gesamtdosis mit Albumin könnte also irrtümlich der Eindruck entstehen, dass die Substanz unwirksam ist. Demnach führt die Berechnung der Pharmakologischen Indizes unter ausschließlicher Zugrundelegung der frei vorliegenden Fraktion zu einer Unterschätzung der antibakteriellen Potenz eines Antibiotikums.

#### 4.2 Ausblick

Das Thema „Proteinbindung“ spaltet die Mikrobiologen in zwei Lager. Eine Gruppe vertritt die seit Jahrzehnten in der Literatur vorherrschende Annahme, dass Proteinbindung die Wirkung einer Substanz soweit herabsetzt, bis sie der Wirkung der berechneten freien Fraktion entspricht. Eine kleinere Gruppe ist der Ansicht, dass sich die im Zusammenhang mit der Proteinbindung ablaufenden komplexen Vorgänge nur unzureichend mit dieser verhältnismäßig einfachen Formel darstellen lassen und versucht, dieses Dogma zu durchbrechen. Ansätze für ein Umdenken in dieser Frage bieten dabei Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen sowie Verbesserungen der Versuchsanordnungen nötig, um vertiefte Kenntnisse über die Auswirkungen der Plasmaproteinbindung zu erhalten.

Im folgenden sollen daher sowohl Möglichkeiten zur Verbesserung der Versuchsanordnungen aufgezeigt, als auch die bislang durchgeführten Experimente kritisch betrachtet werden.

*In-vitro* Modelle bieten zwar den Vorteil der Reproduzierbarkeit und der weitest gehenden Unabhängigkeit von Einflussfaktoren (wie beispielsweise dem Immunsystem oder interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik), können jedoch nicht die Komplexität von *in-vivo* Untersuchungen widerspiegeln. So konnte aufgrund von technischen Limitationen bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro* Modell der wichtige Faktor der Gewebepenetration (vgl. Abschnitt 1.2) nicht berücksichtigt werden, welcher maßgeblichen

Einfluss auf die Menge des Antibiotikums am Infektionsort im Gewebe hat und selbst wiederum von dem Grad der Proteinbindung eines Antibiotikums abhängig ist.

Es ist daher wünschenswert, bei zukünftigen Untersuchungen durch technische Verbesserungen die Möglichkeit zu schaffen, den Faktor „Gewebepermeation“ in den Versuchsaufbau zu integrieren und so die *in-vitro* Versuchsanordnungen besser den *in-vivo* Bedingungen anzupassen. Denkbar wäre hier beispielsweise der Einsatz von Dialysemembranen im Modell, um die „Barriere“ der körpereigenen Membranen zu simulieren.

Durch den Einsatz von Albumin bei den hier verwendeten *in-vitro* Methoden kann *keine* Aussage darüber getroffen werden, ob Antibiotika noch an weitere Plasmaproteine, wie beispielsweise  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein, binden. Es ist denkbar, dass sich durch zusätzliche Bindungen an andere Plasmaproteine weitere Auswirkungen auf die Pharmakodynamik ergeben. Der Gebrauch von komplettem Serum anstelle von Albumin könnte insoweit Abhilfe schaffen, jedoch bestünde dann vermehrt die Gefahr, dass die Erreger durch das im Serum enthaltene Komplementsystem absterben.

Um keine „Grobabschätzungen“ über den prozentualen Anteil der freien Fraktion abgeben zu müssen, ist für weitere Untersuchungen eine exakte Bestimmung der Proteinbindung der Substanzen unerlässlich. Hierbei müsste die Bestimmung der Proteinbindung genau bei den im *in-vitro* Modell oder in der Batchkultur vorherrschenden Bedingungen erfolgen. Im Gegensatz zur gängigen Bestimmung der Proteinbindung mit Albumin und einer physiologischen Lösung (z.B. Kochsalz- oder Ringerlösung) hieße dies, dass die Proteinbindung mit Albumin und der entsprechenden Nährbouillon, wie sie auch in der *in-vitro* Methode verwandt wird, bestimmt werden müsste. Dies ist wichtig, da die unterschiedlichen Peptidbestandteile der Nährbouillon Auswirkungen auf die Proteinbindungen haben könnten.

Des Weiteren müssten auch Parameter wie die so genannte Bindungskonstante genauer untersucht werden (vgl. Abschnitt 1.3). So besteht die Möglichkeit, dass zwei Antibiotika zwar prozentual gleich hoch, jedoch unterschiedlich „fest“ binden. Es ist gut vorstellbar, dass sich - trotz gleicher prozentualer Bindung - aufgrund der unterschiedlichen Bindungsfestigkeit unterschiedliche Auswirkungen auf die Pharmakodynamik ergeben könnten.

Viele Aussagen dieser Arbeit stützen sich auf die Untersuchungen mit dem hoch bindenden Antibiotikum Faropenem (PB 94%). Es wäre daher interessant zu erfahren, ob die Proteinbindung auch bei anderen, sehr hoch bindenden Substanzen (>90%) ähnliche Auswirkungen auf die Pharmakodynamik hat. In der Praxis oft verwendete Antibiotika wie beispielsweise Ceftriaxon (PB 95%) oder Daptomycin (PB 90 %) wären geeignete Substanzen (Safdar *et al.*, 2004, Scaglione *et al.*, 1990). Besonders gute Untersuchungsmöglichkeiten dürften auch Antimykotika bieten, da es sich dabei häufig um Substanzen handelt, die sich durch eine sehr hohe Proteinbindung auszeichnen (z.B. Itraconazol (PB 99,8%) oder Caspofungin (PB 96,5%) (Fachinformation Sempera®, 2004, Fachinformation Cancidas®, 2004).

## 5. Zusammenfassung

Proteinbindung beeinflusst die Pharmakodynamik eines Antibiotikums nur in einem kleinen Konzentrationsbereich, nämlich zwischen „keinem Effekt“ und „EC<sub>100</sub> mit Albumin<sup>1</sup>“. Ist die Konzentration, die für das Erreichen dieses maximalen Effekts nötig ist, überschritten, so wird durch die Bindung an Albumin die Wirkung nicht beeinträchtigt. Dies ist oftmals bei therapeutisch genutzten Dosierungen der Fall.

Unterhalb von 80% wird die Wirkung eines Antibiotikums durch Proteinbindung nicht beeinflusst. Eine Ausnahme bildet lediglich der Einsatz einer Konzentration, die der MHK entspricht. Diese Konzentration ist allerdings therapeutisch nicht relevant.

Zwar wird die Wirkung bei Antibiotika durch Bindung an Plasmaproteine in einem kleinen Konzentrationsbereich herabgesetzt, dies jedoch in einem geringeren Ausmaß als bislang angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass keinesfalls zur Ermittlung der wirksamen, also freien Fraktion, diese einfach (durch Subtraktion des gebundenen Anteils von der eingesetzten Dosis) berechnet werden sollte. Ebenso ist in diesem Zusammenhang bei der Ermittlung der pharmakologischen Indizes unter Einbeziehung des berechneten freien Anteils eine optimale Prognose für die Wirkung eines hoch gebundenen Antibiotikums nicht gegeben.

Zudem gibt es keinen absoluten, für jedes Antibiotikum und jeden Erreger einheitlichen Wert für die Grenzkonzentration, ab der die Proteinbindung vernachlässigbar ist.

---

<sup>1</sup> Konzentration, bei der der maximale Effekt bei Zugabe von Albumin erreicht ist



## 6. Literatur

- Ambrose P. G. J., Owens R. C. und Grasela D. 2000.** Antimicrobial pharmacodynamics; *Med. Clin. North Am.* 2000. Nov.; 84. (6.): 1431-1446
- Andrews J. M., Boswell F. J., Ashby J. P. und Wise R. 2002.** Bactericidal activity and post-antibiotic effect of faropenem against anaerobic pathogens; 12th Eccmid, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23-27 April, 2002, Milan, Italy
- Barger A., Fuhst C. und Wiedemann B. 2003.** Pharmacological indices in antibiotic therapy; *J. Antimicrob. Chemother.* 2003 Dec; 52: 893-898
- Barza M. 1981.** Principles of tissue penetration of antibiotics; *J. Antimicrob. Chemother.* 8, Suppl. C, 7-28
- Barza M. und Cuchural G. 1985.** General principles of antibiotic tissue penetration; *J. Antimicrob. Chemother.* 1985 Jan; 15 Suppl A: 59-75
- Bauer K. H., Frömmling K.-H. und Führer C. 1997.** Pharmazeutische Technologie; 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Bax R. P., Bastain W., Featherstone A., Wilkinson D. M., Hutchison M. und Haworth S. J. 1989.** The pharmacokinetics of meropenem in volunteers; *J. Antimicrob. Chemother.* 24 Suppl A: 311-320
- Belland R.J., Morrison S.G., Ison C. und Huang W.M. 1994.** Neisseria gonorrhoeae acquires mutations in analogous regions of gyrA and parC in fluroquinolone-resistant isolates; *Mol. Microbiol.* 14 (2): 371-380
- Bergogne-Bérézin E. 2002.** Clinical Role of Protein Binding of Quinolones; *Clin. Pharmacokinet.* 41 (10): 741-750
- Bird A. E. und Marshall A. C. 1967.** Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficient; *Biochem. Pharmacol.* 16: 2275-2290
- Boman G. und Ringerberger V.-A. 1974.** Binding of rifampicin by human plasma proteins; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7: 369-373
- Bratlid D. und Bergan T. 1976.** Displacement of albumin-bound antimicrobial agents by bilirubin; *Pharmacology* 14: 464-472
- Briand C., Sarrazin M., Peyrot V., Gilli R., Bourdeaux M. und Sari J. C. 1982.** Study of the interaction between human serum albumin and some cephalosporins; *Mol. Pharmacol.* 21: 92-99
- Cars O. 1990.** Pharmacokinetics of antibiotics in tissues and tissue fluids: a review; *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74: 23-33
- Cars O. 2001.** Protein binding and tissue concentrations-do they matter? 7th ISAP Educational Workshop, official workshop of the 42nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Diego, 26.Sept. 2001

**Craig W. A. und Suh B. 1986.** Protein binding and the antimicrobial effects: Methods for the determination of protein binding; In Lorian III (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore, Williams and Wilkins 367-402.

**Craig W. A. 1995.** Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins; *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 89-96

**Craig W. A. und Ebert S. C. 1989.** Protein binding and its significance in antibacterial therapy; *Infect. Dis. Clin. North Am.* 3: 407-414

**Craig W. A. und Kunin C. M. 1976.** Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents; *Annu. Rev. Med.* 27: 287-300

**Craig W. A., Redington J. und Ebert S. C. 1991.** Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections; *J. Antimicrob. Chemother.* 27 Suppl. C: 29-40

**Craig W. A. und Suh B. 1978a.** Changes in protein binding during disease; *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 239-244

**Craig W. A. und Suh B. 1978b.** Theory and practical impact of binding of antimicrobials to serum proteins and tissue; *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1978; 92-99

**Craig W. A. und Vogelmann B. 1984.** Changing patterns of hospital infections: implications for therapy. Changing concepts and new applications of antibiotic pharmacokinetics; *Am. J. Med.* 77: 24-28

**Craig W. A. und Welling P. G. 1977.** Protein binding of antimicrobials: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications; *Clin. Pharmacokinet.* 2: 252-268

**Dalhoff A. 2001.** Untersuchungen der Proteinbindung von Faropenem durch die Bayer AG; A. Dalhoff, persönliche Mitteilung, Bayer AG Wuppertal

**Dalhoff A. und Schmitz F. J. 2003.** In Vitro Antibacterial Activity and Pharmacodynamics of New Quinolones; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 203-221

**Davis B. 1942a.** The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body; *Journal of clinical investigation* 753-762

**Davis B. 1942b.** The binding of sulfonamides by plasma proteins; *Science* 95: 78

**Derendorf H., Gramatté T. und Schäfer H.G. 2002.** Pharmakokinetik: Einführung in die Therapie und Relevanz der Arzneimitteltherapie; 2. Auflage, WVG Stuttgart

**Dette G. A. 1982.** Bindung, Verteilung und Wirksamkeit des Erythromycins; *Infection* 10 (Suppl.): S92-S98

**Deutsches Institut für Normung e.V. 2000.** Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika; Deutsche Norm 2000; DIN 58940 (Teil 4):4

**Drusano G. L. 2004.** Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of "bug and drug"; Nat. Rev. Microbiol. Apr; 2 (4): 289-300

**Drusano G. L. und Hutchison M. 1995.** The pharmacokinetics of Meropenem; Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 96: 11-16

**Drusano G. L., Johnson D. E., Rosen M. und Standiford H. C. 1993.** Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis; Antimicrob. Agents Chemother. 37: 483-490

**Eagle H. 1948.** A paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro; Science 107: 44-45

**Fachinformation Cancidas® 2004.** Fa. MSD, Haar

**Fachinformation Cefotaxim Abbott® 2000.** Fa. Abbott, Wiesbaden, [www.abbott.de](http://www.abbott.de), letzter Zugriff 15.03.2004

**Fachinformation Mefoxitin® 1994.** Fa. MSD, Haar

**Fachinformation Meronem® 2002.** Fa. Astra Zeneca, Wedel, [www.astrazeneca.com](http://www.astrazeneca.com), letzter Zugriff 23.10.2002

**Fachinformation Rocephin® 1999.** Fa. Hoffmann- La Roche AG, Grenzbach-Wyhlen

**Fachinformation Sempera® 2004.** Fa. Janssen-Cilag, Neuss

**Ferrero L., Cameron B., Manse B., Lagneaux D., Crouzet J., Famechon A. und Blanche F. 1994.** Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones; Mol. Microbiol. 13 (4): 653

**Fontana R., Aldegheri M., Ligozzi M., Lo Cascio G. und Cornaglia G. 1998.** Interaction of ceftriaxone with penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* in the presence of human serum albumin; J. Antimicrob. Chemother. 42: 95-98

**Forth W., Henschler D., Rummel W. und Starke K. 1998.** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

**Gerding D. N., Van Etta L. L. und Peterson L. R. 1982.** Role of serum protein binding and multiple antibiotic doses in the extravascular distribution of ceftizoxime and cefotaxime; Antimicrob. Agents Chemother. Nov. 22 (5): 844-847

**Goldstein A. 1949.** The interactions of drugs and plasma proteins; Pharmacol.Rev. 1: 102-165

**Grasso S., Meinardi G., de Carneri I. und Tamassia V. 1978.** New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity; Antimicrob. Agents Chemother. 13: 570-576

**Griffiths L.R. und Green H. T. 1985.** Paradoxical effect of penicillin in vivo; J. Antimicrob. Chemother. 15: 507-508

**Gustafsson I. und Cars O. 2002.** Kill kinetics, effect of albumin, inactive and active serum; 12th Eccmid, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23-27 April, 2002, Milan, Italy

**Hamada T., Ueta E., Kodama H. und Osaki T. 2002 .** The excretion of cephem antibiotics into saliva is inversely associated with their plasma protein-binding activities; J. Oral Pathol. Med. 31 (2): 109-116

**Holm S. E., Tornqvist I. O. und Cars O. 1990.** Paradoxical effects of antibiotics; Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 74: 113-7

**Höltje JV. und Heidrich C. 2001.** Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*; Biochemie 83 (1): 103-108

**Holzgrabe U. 2001.** Editorial: Gyrasehemmstoffe; Pharmazie in unserer Zeit 30 (5): 367

**Hoshino K., Kitamura A., Morrissey I., Sato K., Kato J. und Ikeda H. 1994.** Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition; Antimicrob. Agents Chemother. 38 (11): 2623-2627

**Jaehde U., Radziwill R., Mühlebach S., and Schunack W. 2003.** Lehrbuch der klinischen Pharmazie; 2. Auflage, WVG Stuttgart

**Jaehde U. 2004.** PK/PD-Workshop: Einführung in die pharmakokinetische und pharmakodynamische Datenanalyse; Graduiertenkolleg 677, Struktur und molekulare Interaktionen als Basis der Arzneimittelwirkung, Universität Bonn, 05./06.02.2004

**Joos R. W. und Hall W. H. 1969.** Determinants of binding constants of serum albumin for penicillin; J. Pharmacol. Exp. Ther. Mar; 166 (1): 113-118

**Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J. und Zinkernagel R. M. 1998.** Medizinische Mikrobiologie; 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

**Keil S. und Wiedemann B. 1995.** Mathematical corrections for bacterial loss in pharmacodynamic in vitro dilution models; Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1054-1058

**Kelly H. C., Hutchison M. und Haworth S. J. 1995.** A comparison of the pharmacokinetics of meropenem after administration by intravenous injection over 5 min and intravenous infusion over 30 min; J. Antimicrob. Chemother. 36 Suppl A: 35-41

**Khodursky, AB., Zechiedrich EL. und Cozzarelli NR. 1995.** Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Dec 5; 92 (25): 11801-5

**Kirby W. M. 1945.** Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci; J. Clin. Invest. 24: 165-169

**Ko H., Cathcart K. S., Griffith D. L., Peters G. R. und Adams W. J. 1989.** Pharmacokinetics of intravenously administered cefmetazole and cefoxitin and effects of probenecid on cefmetazole elimination; Antimicrob. Agents Chemother. 33: 356-361

- Kondo N., Kuwahara-Arai K., Kuroda-Murakami H., Tateda-Suzuki E. und Hiramatsu K. 2001.** Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under mec regulator gene control; *Antimicrob. Agents Chemother.* Mar.; 45.(3.): 815.-24
- Kunin C. M., Craig W. A., Kornguth M. und Monson R. 1973.** Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 226: 214-24
- Lee B. L., Sachdeva M. und Chambers H. F. 1991.** Effect of protein binding of daptomycin on MIC and antibacterial activity; *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2505-2508
- Lichtenwalner D. M., Suh B., Lorber B., Rudnick M. R. und Craig W. A. 1982.** Correction of drug binding defects in uremia in vitro by anion exchange resin treatment; *Biochem. Pharmacol.* 1982 Nov; 1; 31: 3483-3487
- Liu P., Müller M. und Derendorf H. 2002a.** Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations; *Int. J. Antimicrob. Agents* 19. (4.): 285.-90
- Liu P., Müller M., Grant M., Webb A. I., Obermann B. und Derendorf H. 2002b.** Interstitial tissue concentrations of cefpodoxime; *J. Antimicrob. Chemother.* Jul; 50 Suppl: 19-22
- Löwdin E., Odenholt I., Bengtsson S. und Cars O. 1996.** Pharmacodynamic effect of sub-MICs of benzylpenicillin against *Streptococcus pyogenes* in a new developed in vitro kinetic model; *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2478-2482
- Lubenko I., Vostrov S., Portnoy Y., Zinner S. H. und Firsov A. A. 2003.** Diskussion im Anschluss des Vortrages "Comparative pharmacodynamics of ABT492 and levofloxacin with *Staphylococcus aureus* in an in-vitro dynamic model"; 13th Eccmid, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 May, 2003, Glasgow, UK
- MacGowan A. und K. Bowker. 2004.** In vitro studies on the impact of human serum on the antibacterial effect of faropenem; *J. Chemother.* 16 (1): 23-29
- Merrikin D. J., Briant J. und Rolinson G. N. 1983.** Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo; *J. Antimicrob. Chemother.* 1983 Mar; 11: 233-238
- Mouton J. W., Dudley M. N., Cars O., Derendorf H. und Drusano G. L. 2002.** Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs; *Int. J. Antimicrob. Agents* 2002. Apr.; 19. (4.): 355-358
- Mouton J. W. und Punt N. 2001.** Use of the  $t > MIC$  to choose between different dosing regimens of beta-lactam antibiotics; *J. Antimicrob. Chemother.* 2001. Apr.; 47. (4.): 500-501
- Mück W. 2004.** PK/PD-Workshop: Einführung in die pharmakokinetische und pharmakodynamische Datenanalyse; Graduiertenkolleg 677, Struktur und molekulare Interaktionen als Basis der Arzneimittelwirkung, Universität Bonn, 05./06.02.2004
- Müller M. 2002.** Science, medicine, and the future: Microdialysis; *BMJ* 2002 Mar; 9; 324: 588-591
- Müller M., Brunner M., Schmid R., Putz E. M., Schmiedberger A., Wallner I. und Eichler H. G. 1998.** Comparison of three different experimental methods for the assessment of

peripheral compartment pharmacokinetics in humans; Life Sci. 62:L227-L234

**Musselman A. D. und Eagle H. 1948.** The rate of bacterial action of penicillin in vitro as a function of its concentration and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms; J. Exp. Med. 88: 99-131

**Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K. und Schäfer-Korting M. 2001.** Arzneimittelwirkungen; 8. Auflage, WVG Stuttgart

**Nath S. K., Foster G. A., Mandell L. A. und Rotstein C. 1994.** Antimicrobial activity of ceftriaxone versus cefotaxime: negative effect of serum albumin binding of ceftriaxone; J. Antimicrob. Chemother. 33: 1239-1243

**Nerli B., Garcia F., Ballan C. und Pico G. 1995.** Cephalosporin binding sites to human serum albumin and the relation with the N-B transition of this protein; Biochem. Mol. Biol. Int. 36: 177-184

**Nerli B., Romanini D. und Pico G. 1997.** Structural specificity requirements in the binding of beta lactam antibiotics to human serum albumin; Chem. Biol. Interact. 104: 179-202

**Odenholt I. 1989.** Pharmacodynamics of Beta-Lactam Antibiotics: Studies on the Paradoxical and Postantibiotic Effects in Vitro and in Animal Model; Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 58: 2-55

**Odenholt I., Holm S. E. und Cars O. 1987.** Effect of antibiotic protein binding on the killing rate of *Staphylococcus aureus* and on the paradoxical phenomenon; Chemotherapy 33: 331-339

**Odenholt I., Holm S. E. und Cars O. 1989.** Paradoxical effect of cloxacillin and benzylpenicillin against clinical isolates in *Staphylococcus aureus*; Chemotherapy 35: 345-350

**Okuda J., Otsuki M., Oh T. und Nishino T. 2000.** In vitro activity of DU-6681a, an active form of the new oral carbapenem compound DZ-2640, in comparison with that of R-95867, faropenem and oral cephalosporins; J. Antimicrob. Chemother. Jul.; 46.(1.): 101-108

**Patel K. B., Nicolau D. P., Nightingale C. H. und Quintiliani R. 1995.** Pharmacokinetics of cefotaxime in healthy volunteers and patients; Diagn Microbiol Infect Dis 1995 May-Jun;22:49-55.

**Perry T. R. und Schentag J. J. 2001.** Clinical use of ceftriaxone: a pharmacokinetic-pharmacodynamic perspective on the impact of minimum inhibitory concentration and serum protein binding; Clin. Pharmacokinet. 40. (9.): 685-694

**Petersen U. 2001.** Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation; Pharmazie in unserer Zeit 30 (5.): 376-381

**Peterson L. R., Hall W. H., Zinneman H. H. und Gerding D. N. 1977.** Standardization of a preparative ultracentrifuge method for quantitative determination of protein binding of seven antibiotics; J. Infect. Dis. 136: 778-783

**Peterson L. R., Van Etta L. L., Fasching C.E. und Gerding D. N. 1984.** Effect of protein binding on simulated intravascular and extravascular kinetics of cefotaxime in an in vitro model; Antimicrob. Agents Chemother. Jan. 25 (1): 58-61

- Popick A.C., Crouthamel W.G., Bekersky I. 1987.** Plasma protein binding of ceftriaxone; *Xenobiotica*. Oct; 17 (10): 1139-45
- Preston S. L., Drusano G. L., Berman A. L., Fowler C. L., Chow A. T., Dornseif B., V. Reichl, J. Natarajan und M. Corrado. 1998.** Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials; *JAMA* 279: 125-129
- Pschyrembel 1998.** Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch; de Gruyter Verlag, Berlin, New York.
- Rolinson G. N. 1980.** The significance of protein binding of antibiotics in antibacterial chemotherapy; *J. Antimicrob. Chemother.* 1980 May; 6: 311-317
- Rolinson G. N. und R. Sutherland 1965.** The binding of antibiotics to serum proteins; *Br. J. Pharmacol.* 1965 Dec; 25: 638-650
- Rote Liste 2004.** Online Version der Roten Liste; [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de) letzter Zugriff: 29.02.2004
- Rustige C. und Wiedemann B. 1990.** Antibacterial activity of lomefloxacin in pharmacodynamic in vitro model; *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 (6): 1107-1111
- Safdar N., Andes D. und Craig W. 2004.** In Vivo Pharmacodynamic Activity of Daptomycin; *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. 49, No. 1: 63-68
- Scaglione F., Demartini G., Arcidiacono M. M., Dugnani S. und Frascini F. 1998.** Influence of protein binding on the pharmacodynamics of ceftazidime or ceftriaxone against gram-positive and gram-negative bacteria in an in vitro infection model; *J. Chemother.* 10: 29-34
- Scaglione F., Raichi M. und Frascini F. 1990.** Serum protein binding and extravascular diffusion of methoxyimino cephalosporins. Time courses of free and total concentrations of cefotaxime and ceftriaxone in serum and pleural exudates; *J. Antimicrob. Chemother.* 26 Suppl A:1-10
- Simon C. and Stille W. 1997.** Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis; 9. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart
- Sörgel F., Kinzig M. und Rüsing G. 1996.** Pharmakokinetik von Meropenem; *Krankenhauspharmazie*, 17. Jahrgang, Nr.5 210-219
- Suh B., Craig W., England A. C. und Elliot R. L. 1981.** Effect of free fatty acids on protein binding of antimicrobial agents; *J. Infect. Dis.* 143: 609-616
- Tawara S., Matsumoto S., Kamimura T. und Goto S. 1992.** Effect of Protein Binding in Serum on Therapeutic Efficacy of Cephem Antibiotics; *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (1): 17-24
- Tawara S., Matsumoto S., Matsumoto Y., Kamimura T. und Goto S. 1992b.** Structure-binding relationship and binding sites of cephalosporins in human serum albumin; *J. Antibiot. (Tokyo)* 45: 1346-1357

**Theuretzbacher U. 2003.** Protein binding and tissue concentrations-do they matter? 8th ISAP Educational Workshop (in cooperation with the 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)), Glasgow, 10.05.2003

**Thews und Mutschler 1999.** Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen; 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 109-113

**Tompsett R., Shultz S. und McDermott W. 1947.** The relation of protein binding to the pharmacology and antibacterial activity of penicillins X, G, dihydro F, and K.; J. Bacteriol 53: 581-595

**Vallee F. und LeBel M. 1991.** Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activity of ceftizoxime and cefotaxime; Antimicrob. Agents Chemother. 35: 2057-2064

**Vogel F., Worth H., Adam D., Elies W., Ewig S., Höffken G., Lode H., Lorenz J., Scholz H., Stille W., Unertl K. und Wiedemann B. 2000.** Rationale Therapie bakterieller Atemwegsinfektionen; Chemotherapie Journal, 9. Jahrgang, 1/2000: 3-23

**Vosberg H. P. 1985.** DNA topoisomerases: enzymes that control DNA confirmation; Curr. Top. Microbiol. Immunol. 114: 19-102

**Watt P. M. und Hickson I.D. 1994.** Structure and function of type II DNA topoisomerases; Biochem. J. 303 (Pt 3): 681-695

**White R. L., Kays M. B., Armstrong T. A. und Friedrich L. V. 1990.** Effects of Supraphysiologic Temperature and Broth Dilution on Serum Protein Binding; Antimicrob. Agents Chemother. June: 1257-1258

**Wiedemann B., Fuhst C. und Barger A. 2003.** Pharmakologische Indizes in der Antibiotika-Therapie; Chemotherapie Journal, 12. Jahrgang, 2/2003: 45-50

**Wiedemann B., Lode H. und Naber K. 1990.** Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie: Parameter für die Beurteilung der Erregerempfindlichkeit; Futuramed Verlag GmbH, München Editorial, VII p

**Wise R. 1985.** The relevance of pharmacokinetics to in-vitro models: protein binding--does it matter? J. Antimicrob. Chemother. 15 Suppl A:77-83

**Wise R. 1986.** The clinical relevance of protein binding and tissue concentrations in antimicrobial therapy; Clin. Pharmacokinet. 1986 Nov-Dec; 11:470-482

**Woodcock J. M., Andrews J. M., Brenwald N. P., Ashby J. P. und Wise R. 1997.** The in-vitro activity of faropenem, a novel oral penem; J. Antimicrob. Chemother. 39: 35-43

**Woodnutt G., Berry V. und Mizen L. 1995.** Effect of Protein Binding on Penetration of  $\beta$ -Lactams into Rabbit Peripheral Lymph; Antimicrob. Agents Chemother. 39 (12): 2678-2683

**Zlotos G., Bücker A., Kinzig-Schippers M., Sörgel F. und Holzgrabe U. 1998.** Plasma Protein Binding of Gyrase Inhibitors; Journal of Pharmaceutical Sciences 87, No. 2: 215-220



## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAC	Fläche oberhalb der Absterbekurve
AB	Antibiotikumkompartiment
Abb.	Abbildung
Alb.	Albumin
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
$C_{\max}$	maximaler Plasmaspiegel
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
DIN	Deutsches Institut für Normung
EC <sub>100</sub>	Konzentration, bei der der maximale Effekt erreicht ist
EC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50% des maximalen Effekts erreicht werden
E <sub>max</sub>	maximal erreichbarer Effekt
f. An.	freier Anteil
FR oder F	Flussrate
h	Stunde
ISAP	International Society of Anti-Infective Pharmacology
i.v.	intravenös
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBE/mL	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
ka	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
k <sub>inf</sub>	Infusionsgeschwindigkeitskonstante
ke	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
k <sub>1</sub>	Assoziationskonstante
k <sub>2</sub>	Dissoziationskonstante
ka	Affinitätskonstante
kg	Kilogramm
L	Liter
log Δ KBE/ mL	Differenz zwischen dem Logarithmus der ermittelten Keimzahl und dem Logarithmus der Ausgangskeimzahl
m.A.	mit Albumin

MHK	minimale Hemmkonzentration
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minuten
mod.	modifiziert
NaCl	Natriumchlorid
n.a.	nicht auswertbar
n.b.	nicht bestimmt
N	Keimzahl
N <sub>max</sub>	maximale Keimzahl
N'	korrigierte Keimzahl
o.A.	ohne Albumin
PB	Proteinbindung
PBPs	Penicillin-Binde-Proteine
PD	Pharmakodynamik
PI	Pharmakologische Indizes
PK	Pharmakokinetik
p.o.	per oral
R <sub>max</sub>	maximale Keimzahlreduktion
SD	Standardabweichung
t	Zeit
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
T <sub>&gt;M<sub>HK</sub></sub>	kumulativer Zeitraum, während dem der simulierte Plasmaspiegel oberhalb der MHK des Erregers liegt
Tab.	Tabelle
t <sub>max</sub>	Zeit, bei der der maximale Plasmaspiegel des Antibiotikums erreicht ist
ÜN	Übernachtskultur
V	Volumen
V <sub>d</sub>	Verteilungsvolumen
WK	Wachstumskontrolle
ZK	Zentralkompartiment
+	mit Albumin
-	ohne Albumin

## 7.2 Eingesetzte Dosierungen der Antibiotika in der Batchkultur

Die Tabellen des Abschnitts 7.2 zeigen die in der Batchkultur eingesetzten Antibiotikakonzentrationen für die jeweiligen Simulation (ohne/ mit Albumin; freier Anteil) und Erreger (*S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*).

### 7.2.1 Meropenem

Tabelle 7.1: Eingesetzte Konzentrationen von Meropenem in der Batchkultur

n x MHK	<i>S. aureus</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
	ohne/ mit Albumin	ohne/ mit Albumin	ohne/ mit Albumin
	Konz. [mg/L]	Konz. [mg/L]	Konz. [mg/L]
0,5	0,125	0,03	0,5
1	0,25	0,06	1
2	0,5	0,125	2
4	1	0,25	4
8	2	0,5	8
16	4	1	16
32	8	2	32
64	16	4	64
128	32	8	128

### 7.2.2 Cefotaxim

Tab. 7.2: Eingesetzte Konzentrationen von Cefotaxim in der Batchkultur

n x MHK	<i>S. aureus</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil
	Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]	
0,5	1	0,63	0,03	0,019	0,25	0,151
1	2	1,26	0,06	0,038	0,5	0,302
2	4	2,52	0,125	0,076	1	0,63
4	8	5,04	0,25	0,151	2	1,26
8	16	10,08	0,5	0,302	4	2,52
16	32	20,16	1	0,63	8	5,04
32	64	40,32	2	1,26	16	10,08
64	128	80,64	4	2,52	32	20,16
128	256	161,28	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

### 7.2.3 Cefoxitin

Tab. 7.3: Eingesetzte Konzentrationen von Cefoxitin in der Batchkultur

n x MHK	<i>S. aureus</i>		<i>H. influenzae</i>	
	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil
	Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]	
0,5	2	0,6	2	0,6
1	4	1,2	4	1,2
2	8	2,4	8	2,4
4	16	4,8	16	4,8
8	32	9,6	32	9,6
16	64	19,2	64	19,2
32	128	38,4	128	38,4
64	256	76,8	256	76,8
128	512	153,6	n.b.	n.b.

### 7.2.4 Faropenem

Tab. 7.4: Eingesetzte Konzentrationen von Faropenem in der Batchkultur

n x MHK	<i>S. aureus</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil
	Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]	
0,5	0,06	0,004	0,25	0,015	0,125	0,0072
1	0,125	0,0072	0,5	0,03	0,25	0,015
2	0,25	0,015	1	0,06	0,5	0,03
4	0,5	0,03	2	0,125	1	0,06
8	1	0,06	4	0,25	2	0,125
16	2	0,125	8	0,5	4	0,25
32	4	0,25	16	1	8	0,5
64	8	0,5	32	2	16	1
128	16	1	64	4	32	2
200	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	50	3

n.b.: nicht bestimmt

### 7.2.5 Gatifloxacin, Moxifloxacin, Trovafloxacin

Tab. 7.5: Eingesetzte Konzentrationen von Gatifloxacin, Moxifloxacin und Trovafloxacin gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

n x MHK	<b>GATI - <i>S. aureus</i></b>		<b>MOXI - <i>S. aureus</i></b>		<b>TROVA - <i>S.aureus</i></b>	
	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil	ohne/ mit Albumin	freier Anteil
	Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]		Konz. [mg/L]	
0,5	0,03	0,024	0,03	0,019	0,03	0,0072
1	0,06	0,048	0,06	0,038	0,06	0,0144
2	0,125	0,096	0,125	0,076	0,125	0,029
4	0,25	0,19	0,25	0,151	0,25	0,058
8	0,5	0,38	0,5	0,302	0,5	0,115
16	1	0,77	1	0,63	1	0,23
32	2	1,54	2	1,26	2	0,46

### 7.3 Simulierte Konzentrations-Zeit-Profile der $\beta$ -Laktame im *in-vitro* Modell

Im Abschnitt 7.3 sind die Konzentrations-Zeit-Profile der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika über einen Zeitraum von 24 Stunden für die Simulation im *in-vitro* Modell vorzufinden.

#### 7.3.1 Meropenem

Tabelle 7.6: Konzentrations-Zeit-Profil über 24 h im *in-vitro* Modell nach einer 500 mg Kurzinfusion (30 min) von Meropenem (Daten nach Bax et al., 1989)

Zeit [h]	Konz. [mg/L]
0	0
0,5	26
1	13,9
1,5	7,4
2	3,9
3	1,9
4	0,9
5	0,5
6	0,3
8	0
10	0
12	0
24	0

#### 7.3.2 Cefotaxim

Tabelle 7.7: Konzentrations-Zeit-Profil über 24 h im *in-vitro* Modell nach einer 2 g bzw. einer 1,26 g (63% von 2 g) Kurzinfusion (30 min) von Cefotaxim (Daten nach Vallee et al., 1991)

Zeit [h]	Konz. [mg/L]	Konz. [mg/L]
	Dosis: 2 g	Dosis: 1,26 g
0	0,00	0,00
0,5	125,83	79,27
1	72,76	45,84
1,5	42,07	26,51
2	24,33	15,33
3	8,13	5,12
4	4,84	3,05
5	2,88	1,82
6	1,72	1,08
8	0,61	0,38
10	0,22	0,14
12	0,08	0,05
24	0,00	0,00

### 7.3.3 Cefoxitin

Tabelle 7.8: Konzentrations-Zeit-Profil über 24 h im *in-vitro* Modell nach einer 2 g bzw. einer 0,6 g (30% von 2 g) iv Bolus Applikation von Cefoxitin (Daten nach Ko et al., 1989)

Zeit [h]	Konz. [mg/L]	
	Dosis: 2 g	Dosis: 0,6 g
0	244	73,2
0,5	70,71	21,213
1	32,86	9,858
1,5	18,97	5,691
2	10,95	3,285
3	5,49	1,647
4	2,75	0,825
5	1,38	0,414
6	0,69	0,207
8	0,17	0,051
10	0,04	0,012
12	0,01	0,003
24	0	0

### 7.3.4 Faropenem

Tabelle 7.9: Konzentrations-Zeit-Profil über 24 h im *in-vitro* Modell nach einer 300 mg bzw. einer 18 mg (6% von 300 mg) per oralen Applikation von Faropenem (Daten nach Dalhoff, 2001)

Zeit [h]	Konz. [mg/L]	
	Dosis: 300 mg	Dosis: 18 mg
0	0	0
0,5	9,8	0,588
1	11,8	0,708
1,5	9,5	0,57
2	6,4	0,384
3	3,5	0,21
4	1,85	0,111
5	1	0,06
6	0,55	0,033
8	0	0
10	0	0
12	0	0
24	0	0

### 7.4 Experimentell in der Batchkultur ermittelte sowie rechnerisch modifizierte AAC-Werte

Im den Tabellen des Abschnitts 7.4 sind die in der Batchkultur experimentell ermittelten AAC-Werte aufgeführt. Aus diesen Werten wurden die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in den Abschnitten 3.5 und 3.6 erstellt. Zudem zeigen die farbig unterlegten Teile der Tabellen die nach Methode 2.2.9.1.4 modifizierten AAC-Werte für die Berechnung der Parameter im Emax-Modell herangezogen wurden.

#### 7.4.1 Meropenem

Tabelle 7.10: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Meropenem gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<b>S. aureus</b>	<b>experimentell ermittelte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>		<b>modifizierte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>	
	n x MHK	ohne Albumin	mit Albumin	ohne Albumin
0,5	-6,57	-8,93	4,85	2,49
1	0,75	-2,24	12,17	9,18
2	8,05	8,95	19,47	20,37
4	11,27	12,37	22,69	23,79
8	15,49	17,44	26,91	28,86
16	14,12	16,25	25,54	27,67
32	10,03	7,84	21,45	19,26
64	10,29	7,25	21,71	18,67
128	8,36	5,97	19,78	17,39

Tabelle 7.11: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Meropenem gegenüber *S. pneumoniae* in der Batchkultur

<b>S. pneumoniae</b>	<b>experimentell ermittelte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>		<b>modifizierte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>	
	n x MHK	ohne Albumin	mit Albumin	ohne Albumin
0,5	-8,07	-6,13	1,375	3,315
1	-0,99	1,44	8,455	10,885
2	8,37	2,46	17,815	11,905
4	6,40	5,83	15,845	15,275
8	8,12	7,43	17,57	16,875
16	9,30	7,74	18,745	17,185
32	11,65	12,06	21,095	21,505
64	12,23	11,78	21,675	21,225
128	12,30	13,36	21,745	22,805



Tabelle 7.12: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Meropenem gegenüber *H. influenzae* in der Batchkultur

<i>H. influenzae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte		modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte	
	ohne Albumin	mit Albumin	ohne Albumin	mit Albumin
n x MHK				
0,5	-7,60	-5,89	0,195	1,905
1	-3,70	-1,23	4,095	6,565
2	2,76	4,77	10,56	12,565
4	5,34	4,99	13,135	12,785
8	6,35	5,47	14,145	13,265
16	7,48	6,33	15,275	14,125
32	7,37	4,97	15,165	12,765
64	6,30	4,03	14,095	11,825
128	5,82	3,84	13,615	11,635

### 7.4.2 Cefotaxim

Tabelle 7.13: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Cefotaxim gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<i>S. aureus</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-0,78	-3,77	-1,39	10,64	7,65	10,03
1	4,60	3,13	3,95	16,02	14,55	15,37
2	4,96	3,63	4,10	16,38	15,05	15,52
4	5,13	4,10	4,33	16,55	15,52	15,75
8	5,37	5,66	4,82	16,79	17,08	16,24
16	8,78	6,53	4,78	20,20	17,95	16,20
32	10,56	8,06	5,11	21,98	19,48	16,53
64	6,50	6,49	5,30	17,92	17,91	16,72
128	7,82	7,42	6,69	19,24	18,84	18,11

Tabelle 7.14: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Cefotaxim gegenüber *S. pneumoniae* in der Batchkultur

<i>S. pneumoniae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	0,77	3,29	1,27	10,22	12,74	10,72
1	5,43	7,08	5,15	14,88	16,53	14,60
2	4,13	3,64	5,89	13,58	13,09	15,34
4	4,66	3,52	6,71	14,11	12,97	16,16
8	5,11	3,39	6,43	14,56	12,84	15,88
16	6,03	3,65	7,42	15,48	13,10	16,87
32	5,83	4,63	7,91	15,28	14,08	17,36
64	6,30	4,79	6,74	15,75	14,24	16,19

Tabelle 7.15: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Cefotaxim gegenüber *H. influenzae* in der Batchkultur

<i>H. influenzae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-2,66	-0,72	-6,22	5,14	7,08	1,58
1	2,22	1,98	-2,55	10,02	9,78	5,25
2	1,88	1,25	2,47	9,68	9,05	10,27
4	4,93	3,71	5,79	12,73	11,51	13,59
8	4,70	4,36	5,78	12,50	12,16	13,58
16	4,43	4,20	5,10	12,23	12,00	12,90
32	4,13	3,75	4,68	11,93	11,55	12,48
64	3,71	3,71	3,34	11,51	11,51	11,14

### 7.4.3 Cefoxitin

Tabelle 7.16: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Cefoxitin gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<i>S. aureus</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-9,48	-9,62	-11,52	1,94	1,8	-0,10
1	-1,13	-7,82	-11,95	10,29	3,6	-0,53
2	11,69	9,78	-10,59	23,11	21,2	0,83
4	12,17	10,85	4,49	23,59	22,27	15,91
8	9,17	6,47	9,47	20,59	17,89	20,89
16	9,00	6,86	8,82	20,42	18,28	20,24
32	8,87	7,26	5,35	20,29	18,68	16,77
64	8,67	7,18	3,82	20,09	18,6	15,24
128	11,25	7,7	4,94	22,67	19,12	16,36

Anmerkung: Die weiß unterlegten negativen modifizierten Werte wurden für die Berechnung des Emax-Modells gleich „Null“ gesetzt (vgl. 2.2.9.1.4)

Tabelle 7.17: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Cefoxitin gegenüber *H. influenzae* in der Batchkultur

<i>H. influenzae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-8,20	-4,45	-9,58	-0,40	3,35	-1,79
1	-6,28	-5,98	-7,97	1,52	1,82	-0,18
2	-1,23	-1,14	-7,75	6,57	6,66	0,04
4	0,22	1,03	-4,86	8,02	8,83	2,94
8	1,86	2,21	1,41	9,66	10,01	9,21
16	2,10	2,50	3,54	9,90	10,30	11,34
32	3,11	2,79	5,46	10,91	10,59	13,26
64	4,71	3,63	5,04	12,51	11,43	12,84

Anmerkung: Die weiß unterlegten negativen modifizierten Werte wurden für die Berechnung des Emax-Modells gleich „Null“ gesetzt (vgl. 2.2.9.1.4)

## 7.4.4 Faropenem

Tabelle 7.18: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Faropenem gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<i>S. aureus</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	1,02	-6,27	-10,16	12,44	5,15	1,26
1	9,82	-6,43	-11,55	21,24	4,99	-0,13
2	10,54	-2,09	-9,68	21,96	9,33	1,74
4	11,68	1,64	-8,10	23,1	13,06	3,32
8	13,37	10,91	1,02	24,79	22,33	12,44
16	15,07	12,35	9,82	26,49	23,77	21,24
32	14,15	10,58	10,54	25,57	22	21,96
64	12,21	11,79	11,68	23,63	23,21	23,10
128	9,40	11,25	13,37	20,82	22,67	24,79

Anmerkung: Die weiß unterlegten negativen modifizierten Werte wurden für die Berechnung des Emax-Modells gleich „Null“ gesetzt (vgl. 2.2.9.1.4)

Tabelle 7.19: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Faropenem gegenüber *S. pneumoniae* in der Batchkultur

<i>S. pneumoniae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-8,74	-8,69	-9,66	0,71	0,76	-0,22
1	-9,51	-7,84	-9,50	-0,06	1,61	-0,05
2	-5,17	-8,87	-9,41	4,28	0,58	0,04
4	4,73	-9,08	-9,02	14,18	0,37	0,43
8	8,71	-7,94	-8,74	18,16	1,51	0,71
16	11,51	4,86	-9,51	20,96	14,31	-0,06
32	10,91	10,65	-5,17	20,36	20,10	4,28
64	14,86	15,18	4,73	24,31	24,63	14,18
128	14,58	14,19	8,71	24,03	23,64	18,16
264	n.b.	12,30	n.b.	n.b.	21,75	n.b.

Anmerkung: Die weiß unterlegten negativen modifizierten Werte wurden für die Berechnung des Emax-Modells gleich „Null“ gesetzt (vgl. 2.2.9.1.4)

Tabelle 7.20: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Faropenem gegenüber *H. influenzae* in der Batchkultur

<i>H. influenzae</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-4,91	-9,15	-9,11	2,885	-1,355	-1,32
1	-0,31	-8,36	-9,06	7,485	-0,565	-1,27
2	3,88	-6,77	-8,29	11,675	1,025	-0,49
4	4,67	-3,15	-8,35	12,465	4,645	-0,56
8	5,19	-1,80	-4,91	12,985	5,995	2,89
16	5,68	0,6	-0,31	13,475	8,395	7,49
32	9,17	7,89	3,88	16,97	15,685	11,68
64	8,79	8,35	4,67	16,585	16,145	12,47
128	7,14	4,14	5,19	14,935	11,935	12,99

Anmerkung: Die weiß unterlegten negativen modifizierten Werte wurden für die Berechnung des Emax-Modells gleich „Null“ gesetzt (vgl. 2.2.9.1.4)

#### 7.4.5 Gatifloxacin

Tabelle 7.21: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Gatifloxacin gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<i>S. aureus</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-6,93	-8,06	-7,29	4,49	3,36	4,13
1	2,04	0,88	-2,20	13,46	12,3	9,22
2	9,65	12,48	8,58	21,07	23,9	20,00
4	18,40	17,94	18,40	29,82	29,36	29,82
8	18,47	20,54	17,54	29,89	31,96	28,96
16	20,86	20,09	17,65	32,28	31,51	29,07
32	22,53	21,92	22,37	33,95	33,34	33,79

#### 7.4.6 Moxifloxacin

Tabelle 7.22: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Moxifloxacin gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<i>S. aureus</i>	experimentell ermittelte AAC <sub>6h</sub> -Werte			modifizierte AAC <sub>6h</sub> -Werte		
	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil
n x MHK						
0,5	-2,14	-3,42	-5,04	9,28	8	6,38
1	6,12	8,19	0,98	17,54	19,61	12,40
2	11,22	8,85	6,96	22,64	20,27	18,38
4	13,89	14,21	13,21	25,31	25,63	24,63
8	16,39	15,28	14,44	27,81	26,70	25,86
16	18,75	19,49	17,65	30,17	30,91	29,07
32	19,19	20,12	18,84	30,61	31,54	30,26

## 7.4.7 Trovafloxacin

Tabelle 7.23: Experimentell ermittelte sowie die rechnerisch modifizierten AAC<sub>6h</sub>-Werte von Trovafloxacin gegenüber *S. aureus* in der Batchkultur

<b>S. aureus</b>	<b>experimentell ermittelte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>			<b>modifizierte AAC<sub>6h</sub>-Werte</b>		
	n x MHK	ohne Albumin	mit Albumin	freier Anteil	ohne Albumin	mit Albumin
0,25	-8,6	-9,82	-10,38	2,82	1,6	1,04
0,5	-3,72	-8,96	-9,49	7,7	2,46	1,93
1	4,75	-0,50	-7,26	16,17	10,92	4,16
2	8,93	9,56	0,75	20,35	20,98	12,17
4	11,65	12,39	3,84	23,07	23,81	15,26
8	16,45	14,69	8,68	27,87	26,11	20,10
16	19,34	17,89	13,09	30,76	29,31	24,51
32	17,24	16,87	14,17	28,66	28,29	25,59
64	25,24	23,34	19,09	36,66	34,76	30,51

## 7.5 Absterbekinetiken in der Batchkultur

Die im Abschnitt 7.5 aufgeführten Tabellen zeigen die in der Batchkultur bei unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen ermittelten logarithmierten und vom Logarithmus des Ausgangsinokulums subtrahierten Zeitwerte ( $\equiv \log \Delta$  KBE/mL-Werte) für die Stunden 0-6 der einzelnen Antibiotika gegenüber den einzelnen Erregern.

### 7.5.1 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Meropenem

Tabelle 7.24: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Meropenemkonzentrationen (0,5-128x MHK) sowohl ohne als auch mit Albumin gegenüber den Erregern *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* in der Batchkultur

#### Meropenem gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,5 x MHK		1 x MHK		2 x MHK		4 x MHK		8 x MHK		16 x MHK		32 x MHK		64 x MHK		128 x MHK		
	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,16	0,49	0,21	0,18	0,17	-0,05	0,19	0,25	0,06	0,09	-0,10	0,12	-0,09	0,01	-0,41	-0,11	-0,25	-0,30	
1	0,42	0,62	0,37	0,34	0,33	-0,10	-0,45	-0,25	-1,41	-1,59	-1,07	-0,67	-0,56	-0,45	-0,86	-0,66	-0,75	-0,47	
1,5	0,71	0,74	0,41	0,46	-0,06	0,01	-1,56	-1,80	-2,32	-2,79	-2,02	-2,43	-1,08	-0,64	-1,09	-0,88	-0,94	-0,51	
2	0,78	0,77	0,47	0,69	-0,61	-0,70	-1,87	-2,33	-2,66	-3,17	-2,59	-3,00	-1,80	-0,94	-1,34	-1,22	-1,11	-0,73	
3	1,05	1,68	-0,16	0,60	-1,72	-1,89	-2,28	-2,83	-3,16	-3,38	-2,74	-3,52	-2,10	-1,57	-1,79	-1,27	-1,56	-0,91	
4	1,55	2,13	-0,62	0,31	-2,28	-2,45	-2,65	-2,87	-3,38	-3,45	-3,07	-3,49	-2,38	-1,69	-2,11	-1,44	-1,70	-1,44	
5	1,82	2,38	-0,53	0,17	-2,53	-2,68	-2,78	-2,77	-3,37	-4,01	-3,18	-3,57	-2,19	-2,07	-2,80	-1,72	-2,12	-1,54	
6	1,84	2,44	-0,55	0,28	-2,55	-2,68	-2,50	-2,51	-3,53	-4,17	-3,18	-3,84	-2,31	-2,55	-2,82	-2,12	-2,37	-1,77	

#### Meropenem gegenüber *S. pneumoniae*

Zeit (h)	0,5 x MHK		1 x MHK		2 x MHK		4 x MHK		8 x MHK		16 x MHK		32 x MHK		64 x MHK		128 x MHK		
	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,29	0,15	0,03	0,38	0,09	0,03	-0,20	0,15	-0,28	-0,13	-0,64	-0,26	-0,44	-0,54	-0,26	-0,51	-0,56	-0,66	
1	0,50	0,22	0,07	0,33	-0,26	-0,18	-0,30	-0,18	-0,56	-0,42	-0,83	-0,49	-0,88	-0,94	-0,92	-1,02	-0,96	-1,23	
1,5	0,77	0,45	0,00	0,26	-0,54	0,34	-0,47	-0,42	-0,81	-0,71	-1,01	-0,73	-1,10	-1,10	-1,47	-1,35	-1,44	-1,69	
2	0,98	0,61	-0,08	0,34	-0,84	0,21	-0,72	-0,52	-0,90	-0,86	-1,13	-0,99	-1,48	-1,60	-1,76	-1,61	-1,82	-1,97	
3	1,29	0,89	0,15	0,31	-1,44	-0,30	-1,05	-0,92	-1,43	-1,27	-1,55	-1,37	-2,29	-2,22	-2,18	-2,06	-2,19	-2,27	
4	1,77	1,28	0,44	0,02	-2,26	-0,70	-1,40	-1,40	-1,71	-1,66	-1,94	-1,59	-2,56	-2,66	-2,72	-2,58	-2,65	-2,81	
5	2,15	1,82	0,30	0,19	-2,26	-1,06	-1,89	-1,79	-2,21	-2,04	-2,35	-2,08	-2,88	-3,02	-2,97	-2,87	-2,98	-3,22	
6	2,67	2,56	0,18	0,40	-2,84	-1,29	-2,08	-2,19	-2,54	-2,39	-2,72	-2,41	-3,22	-3,34	-3,42	-3,25	-3,28	-3,58	

#### Meropenem gegenüber *H. influenzae*

Zeit (h)	0,5 x MHK		1 x MHK		2 x MHK		4 x MHK		8 x MHK		16 x MHK		32 x MHK		64 x MHK		128 x MHK		
	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	o.A.	m.A.	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,35	0,24	0,32	0,05	0,19	0,15	0,01	0,07	-0,04	0,17	0,00	0,05	-0,15	-0,20	-0,07	n.a.	-0,19	0,01	
1	0,40	0,53	0,47	0,25	0,28	0,07	-0,31	0,05	-0,33	0,10	-0,69	-0,04	-0,09	-0,12	-0,33	-0,07	-0,25	-0,28	
1,5	0,55	0,44	0,64	0,42	0,12	0,11	-0,52	-0,14	-0,67	-0,03	-0,92	-0,31	-0,59	-0,26	-0,68	-0,40	-0,50	-0,43	
2	0,78	0,63	0,59	0,47	-0,06	-0,25	-0,76	-0,65	-1,07	-0,31	-1,22	-0,52	-0,96	-0,53	-0,95	-0,43	-0,71	-0,40	
3	1,15	0,93	0,78	0,22	-0,14	-0,99	-1,03	-1,28	-1,18	-1,19	-1,51	-1,31	-1,67	-0,80	-1,20	-0,65	-1,08	-0,67	
4	1,65	1,31	0,62	0,19	-0,77	-1,43	-1,19	-1,36	-1,28	-1,48	-1,56	-1,56	-1,75	-1,34	-1,42	-0,85	-1,09	-0,95	
5	2,35	1,64	0,71	0,06	-1,22	-1,45	-1,37	-1,21	-1,64	-1,77	-1,75	-1,90	-1,87	-1,34	-1,57	-1,26	-1,69	-0,92	
6	2,43	1,88	0,83	0,09	-1,77	-1,74	-1,54	-1,29	-1,86	-1,81	-1,90	-2,03	-1,89	-1,61	-1,71	-1,36	-1,90	-1,28	

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; n.a.= nicht auswertbar

7.5.2 Log  $\Delta$  KBE/ mL –Werte für Cefotaxim

Tabelle 7.25: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Cefotaximkonzentrationen (0,5-128 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber den Erregern *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* in der Batchkultur

Cefotaxim gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	MHK																										
	f.An.																										
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
0,5	0,23	0,31	0,13	0,20	0,08	0,01	0,05	0,13	0,20	0,04	-0,18	0,18	0,11	-0,40	-0,12	-0,21	-0,40	0,04	-0,61	-0,47	-0,01	-0,08	-0,08	-0,22	-0,19	-0,07	0,05
1	0,20	0,28	0,43	0,19	-0,01	-0,02	-0,17	-0,04	0,08	-0,40	-0,31	-0,02	-0,13	-0,62	-0,16	-0,73	-0,60	-0,14	-1,04	-1,00	-0,24	-0,41	-0,21	-0,33	-0,60	-0,41	-0,24
1,5	0,17	0,41	0,30	-0,07	0,01	0,00	-0,24	-0,21	0,03	-0,40	-0,38	0,03	-0,61	-0,76	-0,30	-1,01	-0,95	-0,27	-1,37	-0,96	-0,43	-0,87	-0,84	-0,57	-0,75	-1,08	-0,43
2	0,15	0,41	0,27	-0,28	-0,18	-0,31	-0,53	-0,37	-0,19	-0,80	-0,68	-0,07	-0,81	-0,89	-0,60	-1,26	-0,90	-0,54	-1,54	-1,30	-0,66	-0,67	-0,78	-0,71	-1,08	-1,38	-0,70
3	0,03	0,60	0,15	-0,75	-0,51	-0,64	-1,00	-0,67	-0,61	-1,04	-0,65	-0,74	-1,00	-0,96	-0,86	-1,63	-1,15	-0,85	-1,85	-1,22	-0,91	-1,29	-1,25	-0,90	-1,32	-1,42	-1,45
4	0,31	0,85	0,22	-1,25	-0,82	-1,04	-1,11	-0,85	-1,13	-1,10	-0,93	-1,02	-1,15	-1,18	-1,02	-1,91	-1,37	-1,18	-2,16	-1,69	-1,18	-1,40	-1,43	-0,94	-1,84	-1,43	-1,47
5	0,03	0,93	0,28	-1,59	-1,08	-1,26	-1,47	-1,14	-1,51	-1,31	-1,04	-1,63	-1,30	-1,32	-1,42	-2,10	-1,55	-1,42	-2,47	-1,87	-1,40	-1,60	-1,71	-1,53	-2,06	-1,78	-1,90
6	-0,01	1,18	0,25	-1,94	-1,27	-1,55	-1,61	-1,27	-1,72	-1,41	-1,06	-1,93	-2,00	-1,30	-1,57	-2,44	-1,62	-1,45	-2,82	-2,14	-1,61	-2,07	-1,92	-1,70	-2,03	-1,93	-2,06

Cefotaxim gegenüber *S. pneumoniae*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,07	0,03	-0,01	-0,04	-0,13	-0,13	-0,10	-0,05	-0,07	-0,11	-0,12	-0,40	-0,17	-0,06	-0,04	-0,38	-0,07	-0,34	-0,49	-0,06	-0,39	-0,56	-0,31	-0,51	n.b.	n.b.	n.b.
1	0,19	0,02	-0,17	-0,33	-0,65	-0,33	-0,16	-0,16	-0,49	-0,28	-0,25	-0,57	-0,26	-0,13	-0,43	-0,53	-0,27	-0,56	-0,62	-0,28	-0,62	-0,61	-0,34	-0,70	n.b.	n.b.	n.b.
1,5	0,13	-0,22	-0,22	-0,57	-0,90	-0,51	-0,25	-0,54	-0,62	-0,34	-0,27	-0,69	-0,39	-0,28	-0,64	-0,55	-0,36	-0,71	-0,54	-0,58	-0,85	-0,73	-0,49	-0,83	n.b.	n.b.	n.b.
2	0,08	-0,49	-0,33	-0,73	-1,07	-0,86	-0,47	-0,39	-0,65	-0,48	-0,34	-0,67	-0,71	-0,36	-0,92	-0,93	-0,28	-0,93	-0,76	-0,57	-1,12	-0,85	-0,46	-0,96	n.b.	n.b.	n.b.
3	-0,06	-0,79	-0,40	-0,97	-1,33	-1,03	-0,78	-0,61	-0,96	-0,91	-0,60	-1,17	-0,95	-0,57	-1,01	-0,96	-0,62	-1,39	-1,03	-0,93	-1,30	-1,07	-0,60	-1,14	n.b.	n.b.	n.b.
4	-0,38	-0,85	-0,40	-1,19	-1,60	-1,03	-0,97	-0,83	-1,23	-1,10	-0,82	-1,39	-1,09	-0,76	-1,43	-1,20	-0,77	-1,52	-1,15	-0,88	-1,63	-1,26	-0,88	-1,31	n.b.	n.b.	n.b.
5	-0,39	-0,79	-0,11	-1,42	-1,60	-1,19	-1,09	-0,94	-1,71	-1,20	-0,94	-1,83	-1,33	-0,97	-1,73	-1,50	-1,04	-1,87	-1,54	-1,15	-2,07	-1,54	-1,52	-1,61	n.b.	n.b.	n.b.
6	-0,38	-0,81	0,17	-1,65	-1,81	-1,56	-1,37	-1,21	-1,81	-1,43	-1,18	-2,03	-1,60	-1,17	-2,00	-1,87	-1,32	-2,23	-1,41	-1,59	-2,36	-1,68	-1,75	-1,91	n.b.	n.b.	n.b.

Cefotaxim gegenüber *H. influenzae*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,09	0,21	0,10	0,11	-0,05	0,03	0,16	-0,07	0,03	0,11	0,03	-0,10	-0,02	-0,06	0,06	0,00	-0,19	0,10	-0,11	-0,13	-0,07	-0,14	-0,09	-0,07	n.b.	n.b.	n.b.
1	0,00	0,15	0,16	0,20	-0,11	0,19	0,10	-0,06	0,00	0,11	0,04	-0,26	-0,06	-0,02	0,02	-0,15	-0,24	-0,03	-0,16	-0,25	-0,21	-0,09	-0,13	-0,13	n.b.	n.b.	n.b.
1,5	0,06	0,23	0,32	0,13	-0,14	0,23	0,06	0,01	0,11	-0,11	-0,06	-0,31	-0,18	-0,05	-0,02	-0,26	-0,55	-0,28	-0,29	-0,08	-0,20	-0,32	-0,06	-0,19	n.b.	n.b.	n.b.
2	0,09	0,16	0,43	0,00	-0,08	0,25	0,10	-0,03	0,02	-0,16	0,00	-0,42	-0,32	-0,07	-0,39	-0,56	-0,33	-0,43	-0,43	-0,21	-0,49	-0,40	-0,35	-0,40	n.b.	n.b.	n.b.
3	0,33	0,13	1,05	-0,13	-0,16	0,36	-0,06	0,01	-0,09	-1,23	-0,49	-1,19	-1,04	-0,75	-1,24	-0,71	-0,38	-1,17	-0,78	-0,46	-0,92	-0,61	-0,59	-0,62	n.b.	n.b.	n.b.
4	0,76	0,09	1,46	-0,47	-0,31	0,56	-0,36	-0,28	-0,59	-1,12	-0,94	-1,10	-1,14	-1,03	-1,93	-1,15	-1,14	-1,21	-1,07	-1,06	-1,18	-0,93	-1,07	-0,88	n.b.	n.b.	n.b.
5	0,88	0,05	1,92	-1,08	-0,67	0,81	-0,96	-0,43	-1,11	-1,51	-1,42	-1,84	-1,33	-1,63	-1,43	-1,20	-1,20	-1,45	-1,07	-1,15	-1,29	-0,98	-1,01	-0,83	n.b.	n.b.	n.b.
6	1,10	0,06	2,36	-1,65	-1,26	0,80	-1,46	-0,90	-1,55	-2,03	-1,74	-1,93	-1,66	-1,67	-1,82	-1,50	-1,47	-1,69	-1,21	-1,39	-1,34	-1,21	-1,27	-1,03	n.b.	n.b.	n.b.

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; f. An.= freier Anteil; n.b.= nicht bestimmt

7.5.3 Log  $\Delta$  KBE/ mL –Werte für Cefoxitin

Tabelle 7.26: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Cefoxitin-konzentrationen (0,5-128 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber den Erregern *S. aureus* und *H. influenzae* in der Batchkultur

Cefoxitin gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,43	0,36	0,10	0,38	0,39	0,23	0,19	0,37	0,24	-0,07	0,10	0,34	0,07	0,03	0,02	-0,18	-0,20	0,03	0,10	-0,11	-0,62	0,01	-0,14	-0,32	-0,29	-0,25	-0,09
1	0,86	0,64	0,44	0,34	0,71	0,47	-0,87	-0,02	0,40	-1,02	-0,94	0,57	-0,42	-0,35	0,09	-0,63	-0,54	-0,24	-0,57	-0,56	-0,14	-0,63	-0,40	-0,46	-0,67	-0,60	-0,40
1,5	1,02	1,12	0,87	0,12	0,89	0,93	-1,86	-1,37	0,81	-1,88	-1,55	0,24	-1,18	-0,62	-1,09	-1,11	-0,81	-0,80	-0,86	-0,65	-0,44	-1,04	-0,67	-0,68	-0,98	-0,68	-0,44
2	1,33	1,47	1,34	-0,06	0,98	1,43	-2,02	-1,97	1,33	-2,00	-1,85	-0,39	-1,27	-0,89	-1,46	-1,13	-0,78	-1,33	-1,17	-1,08	-0,75	-1,14	-0,67	-0,97	-1,32	-0,89	-0,68
3	1,69	1,90	2,25	-0,14	1,28	2,11	-2,34	-2,27	2,03	-2,34	-2,07	-0,96	-1,62	-1,28	-1,75	-1,39	-1,15	-1,77	-1,78	-1,55	-0,95	-1,86	-1,67	-1,25	-2,24	-1,83	-1,12
4	2,32	2,00	2,82	0,16	1,71	2,95	-2,63	-2,52	2,52	-2,49	-2,23	-1,42	-2,09	-1,20	-2,34	-2,09	-1,16	-2,04	-2,05	-1,69	-1,21	-1,88	-1,74	-1,44	-2,68	-1,70	-1,20
5	2,14	2,37	3,11	0,29	1,92	3,33	-2,63	-2,63	2,80	-2,84	-2,63	-1,54	-2,45	-1,63	-2,52	-2,39	-1,52	-2,30	-2,19	-1,61	-1,29	-1,89	-1,67	-1,51	-2,81	-1,74	-1,40
6	2,33	2,37	3,26	0,89	2,34	3,35	-2,61	-2,75	3,03	-3,00	-2,69	-1,70	-2,56	-2,44	-2,54	-2,66	-1,82	-2,43	-2,62	-1,88	-1,44	-2,73	-1,93	-1,87	-3,10	-2,00	-1,64

Cefoxitin gegenüber *H. influenzae*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.b.	n.b.	n.b.
0,5	0,22	0,04	0,41	0,07	-0,11	0,10	0,14	0,21	0,13	-0,03	0,02	0,18	0,05	-0,01	-0,08	0,02	0,08	-0,30	0,01	-0,04	-0,05	-0,25	-0,17	-0,16	n.b.	n.b.	n.b.
1	0,45	0,17	0,47	0,28	0,33	0,33	0,26	0,09	0,29	-0,07	-0,06	0,16	-0,03	-0,02	-0,25	-0,15	0,04	-0,17	-0,15	-0,01	-0,14	-0,23	-0,09	-0,20	n.b.	n.b.	n.b.
1,5	0,61	0,27	0,81	0,47	0,47	0,46	0,11	0,17	0,60	-0,34	-0,07	0,40	-0,05	-0,13	-0,19	-0,04	0,03	-0,41	-0,06	-0,02	-0,47	-0,44	-0,23	-0,35	n.b.	n.b.	n.b.
2	0,78	0,31	1,14	0,61	0,54	0,92	0,20	0,14	0,75	-0,19	-0,09	0,58	-0,18	-0,27	-0,05	-0,07	0,15	-0,57	-0,38	-0,08	-0,72	-0,73	-0,34	-0,48	n.b.	n.b.	n.b.
3	1,35	0,81	1,67	1,20	1,10	1,42	0,24	0,38	1,31	-0,05	-0,14	0,97	-0,37	-0,16	-0,15	0,02	-0,07	-0,45	-0,46	-0,29	-0,99	-0,80	-0,63	-0,90	n.b.	n.b.	n.b.
4	2,25	1,12	2,26	1,69	1,43	2,02	0,18	0,30	1,85	0,05	-0,37	1,14	-0,42	-0,49	-0,26	0,24	0,03	-0,82	-0,64	-0,76	-1,32	-1,03	-0,85	-1,10	n.b.	n.b.	n.b.
5	2,22	1,21	2,58	1,69	1,72	2,15	0,26	0,03	2,30	0,03	-0,55	1,32	-0,61	-0,78	-0,48	0,18	-0,02	-0,91	-1,02	-1,08	-1,42	-1,17	-1,04	-1,51	n.b.	n.b.	n.b.
6	2,33	1,65	2,74	1,85	1,94	2,47	0,29	0,19	2,44	0,22	0,31	1,27	-0,63	-1,00	-0,44	0,33	-0,21	-1,02	-1,20	-1,13	-1,71	-1,38	-1,22	-1,63	n.b.	n.b.	n.b.

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; f. An.= freier Anteil; n.b.= nicht bestimmt



7.5.4 Log  $\Delta$  KBE/ mL –Werte für Faropenem

Tabelle 7.27: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Faropenemkonzentrationen (0,5-128 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber den Erregern *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* in der Batchkultur

Faropenem gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	-0,17	0,12	0,50	0,18	0,23	0,26	0,01	0,37	0,37	0,05	0,22	0,60	-0,10	0,18	-0,17	-0,26	-0,12	0,18	-0,27	0,09	0,01	0,02	-0,18	0,05	0,52	-0,79	-0,10
1	0,11	0,41	0,70	0,07	-0,12	0,51	-0,03	-0,08	0,74	0,00	0,10	0,83	-0,71	0,11	0,11	-0,83	-0,42	0,07	-0,75	-0,14	-0,03	-0,33	-0,27	0,00	-0,14	-1,58	-0,71
1,5	0,08	0,45	1,07	-0,06	0,49	0,79	-0,70	0,04	1,02	-1,18	0,35	0,92	-1,47	-1,56	0,08	-2,16	-1,75	-0,06	-2,27	-0,83	-0,70	-1,82	-1,34	-1,18	-0,51	-1,93	-1,47
2	0,29	1,11	1,54	-0,84	0,75	1,19	-1,57	0,02	1,81	-2,01	0,50	1,18	-2,35	-1,84	0,29	-2,48	-1,68	-0,84	-2,60	-1,58	-1,57	-2,04	-2,11	-2,01	-1,25	-1,96	-2,35
3	0,24	1,19	1,86	-2,60	1,06	1,82	-2,25	0,31	2,08	-2,58	0,32	1,70	-2,84	-2,30	0,24	-2,99	-1,68	-2,60	-2,53	-2,29	-2,25	-2,58	-2,64	-2,58	-1,51	-1,74	-2,84
4	-0,49	1,75	2,37	-2,70	1,71	2,27	-2,51	0,60	2,74	-2,67	0,18	2,48	-2,94	-2,56	-0,49	-3,37	-3,29	-2,70	-2,90	-2,16	-2,51	-2,54	-2,45	-2,67	-2,46	-2,06	-2,94
5	-0,52	1,08	3,27	-2,63	1,87	2,89	-2,78	0,52	2,89	-2,83	0,56	2,05	-3,02	-2,56	-0,52	-3,32	-3,18	-2,63	-3,37	-2,85	-2,78	-2,86	-2,69	-2,83	-2,81	-2,63	-3,02
6	-0,93	1,83	3,50	-2,69	1,83	2,96	-2,90	0,93	2,21	-3,01	-0,27	2,31	-3,30	-2,95	-0,93	-3,78	-3,56	-2,69	-3,45	-3,29	-2,90	-3,25	-3,05	-3,01	-3,23	-2,39	-3,30

Faropenem gegenüber *S. pneumoniae*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,25	0,18	0,40	0,26	n.a.	0,22	0,56	0,40	0,17	0,47	0,51	0,02	0,11	0,44	0,25	-0,52	n.a.	0,26	-0,50	-0,17	0,56	-0,81	n.a.	0,47	-1,00	-1,14	0,11
1	0,47	0,43	0,52	0,57	0,47	0,45	0,84	0,56	0,47	0,33	0,73	0,41	0,80	0,59	0,47	-1,00	-0,12	0,57	-0,81	-0,72	0,84	-1,69	-1,59	0,33	n.a.	-1,52	0,80
1,5	0,61	0,60	0,87	0,83	0,54	0,73	0,89	0,87	n.a.	0,16	1,03	0,64	0,28	0,82	0,61	-1,43	-0,41	0,83	-1,34	-1,14	0,89	-1,93	-2,05	0,16	-1,94	-2,04	0,28
2	0,99	0,95	1,17	1,15	0,70	1,03	0,95	1,19	1,02	-0,23	1,14	0,85	-0,18	0,96	0,99	-1,61	-0,53	1,15	-1,56	-1,52	0,95	-2,22	-2,28	-0,23	-2,19	-2,29	-0,18
3	1,54	1,72	1,41	1,65	1,23	1,52	1,27	1,32	1,46	-0,67	1,44	n.a.	-2,02	1,30	1,54	-2,15	-0,81	1,65	-2,05	-1,97	1,27	-2,50	-2,58	-0,67	-2,55	-2,67	-2,02
4	1,98	2,00	1,95	2,31	1,63	1,91	0,95	1,95	1,98	-1,45	1,87	1,96	-2,69	1,62	1,98	-2,53	-1,14	2,31	-2,39	-2,40	0,95	-3,30	-3,34	-1,45	-3,26	-2,75	-2,69
5	2,37	2,30	2,77	2,52	2,40	2,96	0,78	2,40	2,85	-1,87	2,45	2,85	-2,86	2,17	2,37	-2,85	-1,41	2,52	-2,61	-2,71	0,78	-3,37	-3,52	-1,87	-3,14	-3,07	-2,86
6	2,91	2,69	3,51	2,68	2,85	3,29	0,64	2,75	3,34	-2,09	2,67	3,27	-3,21	2,39	2,91	-2,60	-1,62	2,68	-2,70	-2,79	0,64	-3,60	-3,64	-2,09	-3,56	-3,26	-3,21

Faropenem gegenüber *H. influenzae*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK			128 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,27	0,18	0,03	-0,02	0,19	0,22	0,08	0,24	0,25	-0,10	0,13	0,30	-0,18	0,00	0,27	0,00	0,42	-0,02	-0,34	-0,32	0,08	-0,51	-0,22	-0,10	-0,21	0,17	-0,18
1	0,42	0,53	0,61	0,43	0,78	0,32	0,09	0,37	0,14	-0,32	0,43	0,69	-0,28	-0,20	0,42	-0,19	0,62	0,43	-0,67	-0,67	0,09	-0,69	-0,34	-0,32	-0,26	0,47	-0,28
1,5	0,34	0,96	0,82	0,29	0,75	0,79	0,03	0,81	0,58	-0,48	0,46	0,79	-0,45	0,43	0,34	-0,51	-0,18	0,29	-0,96	-0,76	0,03	-0,99	-0,75	-0,48	-0,45	-0,27	-0,45
2	0,56	1,02	1,26	0,35	0,85	1,35	-0,08	0,83	0,97	-0,55	0,67	0,93	-0,58	0,78	0,56	-0,64	-0,11	0,35	-1,10	-1,04	-0,08	-1,14	-0,86	-0,55	-0,84	-0,33	-0,58
3	1,06	1,65	1,48	0,23	1,35	1,52	-0,25	1,14	1,43	-0,68	0,74	1,46	-0,87	0,46	1,06	-0,95	-0,37	0,23	-1,24	-1,20	-0,25	-1,32	-1,39	-0,68	-1,07	-0,14	-0,87
4	0,98	2,00	2,37	0,02	1,93	2,29	-1,18	1,42	1,84	-0,96	0,71	1,84	-0,95	0,32	0,98	-1,07	-0,27	0,02	-2,24	-1,80	-1,18	-1,67	-1,93	-0,96	-1,79	-1,03	-0,95
5	1,19	2,46	2,41	-0,22	2,25	2,32	-1,62	1,80	2,55	-1,29	0,47	2,23	-1,72	0,33	1,19	-1,86	-0,14	-0,22	-2,40	-1,98	-1,62	-2,50	-2,48	-1,29	-1,99	-1,90	-1,72
6	1,47	2,84	2,32	-0,66	2,66	2,43	-1,72	2,14	2,49	-1,70	0,42	2,43	-1,47	-0,03	1,47	-1,90	-0,33	-0,66	-2,94	-2,50	-1,72	-2,67	-2,48	-1,70	-2,39	-1,98	-1,47

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; f. An.= freier Anteil; n.a.= nicht auswertbar

### 7.5.5 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Gatifloxacin

Tabelle 7.28: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Gatifloxacin-konzentrationen (0,5-32 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber dem Erreger *S.aureus* in der Batchkultur

Gatifloxacin gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,10	0,16	0,06	0,13	0,22	0,19	0,17	0,18	0,05	-0,32	-0,18	-0,14	-0,80	-1,12	-0,48	-0,49	-2,52	-1,92	-2,54	-2,76	-2,62
1	0,33	0,47	0,33	0,21	0,42	0,22	-0,03	-0,06	0,07	-2,01	-1,54	-1,54	-2,64	-2,90	-2,18	n.a.	-3,39	-3,16	-3,52	-3,00	-3,42
1,5	0,53	0,76	0,51	0,29	0,41	0,34	-0,63	-0,60	-0,27	-2,74	-2,54	-2,45	-2,86	-3,34	-2,66	-1,35	-3,37	-3,37	-3,74	-3,51	-3,76
2	0,83	0,95	0,79	0,12	0,21	0,37	-1,64	-1,76	-1,12	-3,19	-3,12	-3,02	-3,20	-3,53	-2,87	-1,35	-3,50	-3,42	-3,90	-3,58	-3,75
3	1,18	1,35	1,22	-0,39	-0,25	0,43	-2,19	-2,76	-2,39	-3,46	-3,47	-3,35	-3,48	-3,80	-3,42	-1,44	-3,66	-3,74	-4,00	-4,02	-4,02
4	1,47	1,89	1,70	-0,27	-0,52	0,65	-2,43	-3,11	-1,96	-3,87	-3,76	-3,67	-3,58	-4,07	-3,65	-2,14	-3,93	-3,69	-4,15	-4,07	-4,20
5	2,03	2,21	2,13	-1,24	-0,55	0,93	-2,47	-3,36	-2,15	-4,05	-4,12	-4,02	-3,84	-4,20	-3,85	-2,13	-4,05	-3,89	-4,40	-4,38	-4,37
6	2,28	2,39	2,39	-1,08	-0,49	1,25	-2,17	-3,42	-2,30	-4,16	-4,23	-4,08	-4,04	-4,30	-3,61	-2,42	-3,90	-3,95	-4,37	-4,24	-4,13

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; f. An.= freier Anteil; n.a.= nicht auswertbar

### 7.5.6 Log $\Delta$ KBE/ mL –Werte für Moxifloxacin

Tabelle 7.29: Log  $\Delta$  KBE/mL–Werte für die unterschiedlichen Moxifloxacin-konzentrationen (0,5-32 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber dem Erreger *S.aureus* in der Batchkultur

Moxifloxacin gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	-0,03	0,26	0,01	0,03	0,16	-0,06	-0,01	0,40	0,10	-0,16	-0,15	-0,02	-0,99	-1,13	-0,32	-1,92	-2,04	-1,12	-2,33	-2,30	-2,25
1	-0,01	0,52	0,07	0,08	0,05	0,08	-0,39	0,03	-0,19	-1,45	-2,07	-0,93	-2,45	-2,59	-1,93	-2,32	-2,29	-1,93	-2,69	-2,09	-2,37
1,5	0,15	0,56	0,11	-0,38	-0,81	-0,01	-1,87	-1,07	-1,07	-2,25	-2,27	-1,99	-2,59	-2,81	-2,36	-2,85	-2,91	-2,89	-2,97	-2,56	-2,89
2	0,16	0,53	0,11	-1,16	-1,46	-0,18	-2,21	-1,51	-1,09	-2,41	-2,53	-2,24	-2,68	-2,82	-2,51	-3,01	-2,94	-2,80	-2,99	-2,93	-2,92
3	0,22	0,35	0,69	-1,28	-2,11	-0,38	n.a.	-1,71	-1,16	-2,67	-2,74	-2,70	-3,04	-3,12	-2,77	-3,42	-3,81	-3,39	-3,15	-3,90	-3,45
4	0,54	0,55	1,12	-1,50	-2,09	-0,27	-2,46	-2,13	-1,51	-2,74	-2,74	-2,84	-3,20	-2,64	-2,79	-3,62	-3,73	-3,47	-3,76	-4,09	-3,60
5	0,72	0,94	1,70	-1,54	-1,85	-0,40	-2,76	-2,30	-1,95	-3,12	-3,02	-2,91	-3,36	-2,73	-3,07	-3,90	-4,05	-3,80	-3,99	-4,22	-3,88
6	0,96	1,03	2,70	-1,57	-1,49	n.a.	-3,08	-2,52	-1,87	-3,24	-3,17	-3,03	-3,51	n.a.	-3,25	-4,00	-4,14	-3,87	-4,10	-4,46	-3,95

Legende: o.A.= ohne Albumin; m.A.= mit Albumin; f. An.= freier Anteil; n.a.= nicht auswertbar

7.5.7 Log  $\Delta$  KBE/ mL –Werte für Trovafloxacin

Tabelle 7.30: Log  $\Delta$  KBE/ mL–Werte für die unterschiedlichen Trovafloxacin-konzentrationen (0,25-64 x MHK) sowohl ohne und mit Albumin als auch für die Konzentrationen des freien Anteils gegenüber dem Erreger *S.aureus* in der Batchkultur

Trovafloxacin gegenüber *S. aureus*

Zeit (h)	0,25 x MHK			0,5 x MHK			1 x MHK			2 x MHK			4 x MHK			8 x MHK			16 x MHK			32 x MHK			64 x MHK		
	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.	o.A.	m.A.	f.An.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,25	0,38	0,28	0,33	0,36	0,32	0,23	0,28	0,17	0,25	0,32	-0,04	-0,10	-0,79	0,02	-1,19	-0,45	0,23	-1,21	-0,77	0,18	-1,22	-1,44	-0,72	-2,92	-2,56	-1,64
1	0,45	0,55	0,50	0,39	0,58	0,55	0,36	0,41	0,39	-0,40	0,20	-0,11	-1,31	-0,84	0,18	-2,36	-2,04	-0,44	-2,46	-2,37	-0,88	-2,41	-2,46	-1,99	-3,34	-3,30	-2,47
1,5	0,59	0,81	0,75	0,55	0,87	0,69	0,08	0,47	0,49	-1,37	-0,57	0,06	-1,88	-1,88	-0,19	-2,58	-2,28	-1,13	-3,10	-2,76	-1,82	-2,75	-2,59	-2,18	-3,51	-3,56	-2,89
2	0,86	1,18	1,18	0,54	1,17	0,98	-0,39	0,41	0,69	-1,58	-1,21	0,09	-1,90	-2,21	-0,45	-2,71	-2,51	-1,66	-3,15	-2,95	-2,37	-3,13	-3,07	-2,33	-4,07	-4,05	-3,29
3	1,39	1,74	1,80	0,48	1,64	1,65	-1,05	0,04	1,33	-1,87	-2,24	-0,25	-2,20	-2,68	-1,36	-3,06	-2,86	-1,90	-3,59	-3,48	-2,79	-3,06	-3,13	-2,62	-4,27	-4,06	-3,43
4	2,08	2,30	2,36	0,72	1,92	2,32	-1,46	-0,28	1,72	-2,53	-2,39	-0,11	-2,37	-2,81	-1,47	-3,14	-2,79	-1,59	-3,85	-3,50	-2,91	-3,43	-3,09	-2,81	-4,96	-4,44	-3,73
5	2,44	2,63	3,03	0,81	2,26	2,53	-1,52	-0,07	2,36	-1,54	-2,64	-0,27	-2,63	-2,92	-1,36	-3,52	-3,13	-2,00	-4,05	-3,74	-2,89	-3,46	-3,40	-3,03	-5,33	-4,61	-3,90
6	2,79	2,81	3,09	1,34	2,70	2,90	-1,53	-0,12	1,65	-2,07	-2,77	-0,28	-2,77	-3,12	-1,44	-3,23	-3,28	-2,54	-4,21	-4,02	-2,92	-3,50	-3,40	-3,06	-5,42	-5,02	-4,12

## 7.6 Veröffentlichungen

Wiedemann, B.; Barger, A.; Fuhst, C. 2003.

„Pharmakologische Indizes in der Antibiotikatherapie“  
Chemotherapie Journal; Band 12: 45-50

Wiedemann, B.; Barger, A.; Fuhst, C. 2003.

„Pharmakologische Indizes in der Antibiotikatherapie“  
Arzneimitteltherapie; Heft 5: 134-140

Barger, A.; Fuhst, C.; Wiedemann, B. 2003.

„Pharmacological indices in antibiotic therapy“  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003 Dec; 52 (6):893-898

Barger, A.; Fuhst, C.; Wiedemann, B. 2002

„Korrelation zwischen Pharmakologischen Indices und der Absterbekinetik in „*in-vitro* Modellen“

Bad Honnef Symposium der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Königswinter  
18.-19.März 2002

Barger, A.; Fuhst, C.; Wiedemann, B. 2003.

„Are AUC/ MIC and Cmax/ MIC predicting Pharmacological Indices for the activity of Ciprofloxacin against *Escherichia coli*?“

13<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow 10. – 13. Mai 2003

Fuhst, C.; Barger, A.; Wiedemann, B. 2003

“How does protein binding influence the activity of beta-lactam antibiotics on *Staphylococcus aureus* ?”

Post-ICAAC Treffen der ISAP, International Society of Anti-infective Pharmacology, Chicago, Sept. 14<sup>th</sup>, 2003

Fuhst, C.; Barger, A.; Wiedemann, B. 2002.

“The impact of protein binding of faropenem on its antibiotic activity”

12<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Mailand 24. – 27. April 2002; Poster P1395

Fuhst, C.; Barger, A.; Wiedemann, B. 2003.

„The effect of protein binding on the activity of Faropenem against *Staphylococcus aureus*“  
13<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow 10. – 13. Mai 2003

Fuhst, C.; Barger, A.; Wiedemann, B. 2004

„Influence of protein binding on the activity of beta-lactam antibiotics on *Haemophilus influenzae*“

14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prag 1. – 4. Mai 2004

Fuhst, C.; Barger, A.; Wiedemann, B. 2004

„PK/PD Indices: good predictors for highly protein bound drugs?“

14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prag 1. – 4. Mai 2004

Barger, A.; Fuhst, C.; Wiedemann, B.; Alt, W.; Kreft, J. 2004

„A new pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) model to characterize the antibacterial effect of antibiotics against *Escherichia coli*“

14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prag 1. – 4. Mai 2004