universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Proteinbindung des Lipoglykopeptid-Antibiotikums Telavancin"

verfasst von / submitted by

Nicole Rammesmayer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit entstand an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien am Departement „Klinische Pharmazie und Diagnostik“.

Allen voran möchte ich Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Walter Jäger danken. Durch ihn wurde diese Arbeit ermöglicht, auch mit fachlichem Rat stand er mir stets zur Seite.

Ganz besonderer Dank gilt auch Frau Mag. Dr. Alexandra Maier-Salamon, ohne deren Engagement und Hilfe die Diplomarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Ihre Unterstützung reichte vom Erstellen des Themas, über die praktische Arbeit bis hin zum Verfassen der Diplomarbeit. In all diesen Bereichen bewies sie große Geduld und nahm sich stets Zeit für mich.

Natürlich darf ich auch meine Familie nicht vergessen. Allen voran meinen Mann Christopher, meine Mutter Petra, meine Großmutter Rosa und meinen Großvater Josef. Ohne sie hätte ich vermutlich nicht die Ausdauer gefunden, um dieses letzte Stück des Studiums doch so rasch zu beenden. Bei ihnen fand ich emotionalen Rückhalt, immer ein offenes Ohr und sie übernahmen die Betreuung meines Sohnes Gabriel während der Labor- und Studienzeiten. Auch mein Vater Erich unterstützte mich nicht nur finanziell, sondern hatte in schwierigen Phasen immer aufmunternde Worte für mich.

Dank gilt natürlich auch meinen Freunden und Kollegen, durch ihre Ermunterung und Unterstützung, wurden die zu nehmenden Hürden um einiges kleiner. Mit ihrer Hilfe habe ich nun auch diese letzte Etappe in Angriff genommen.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meinem Sohn Gabriel: „Du warst für mich der größte Ansporn in dieser finalen Phase des Studiums. Ohne dich wäre der Abschluss dieses Lebensabschnittes nicht einmal halb so schön.“

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten geschlechtsspezifischen Ausdrücke (wie zum Beispiel „der Patient“) sind geschlechtsneutral zu verstehen und werden lediglich aufgrund der besseren Lesbarkeit verwendet.

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 ABSTRACT 3

3 PROBLEMSTELLUNG 5

4 EINLEITUNG 7

4.1 Proteinbindung 7

4.1.1 Einfluss der Proteinbindung auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik 8

4.1.2 Plasmaproteine 9

4.1.3 Bestimmung der Proteinbindung 12

4.2 Telavancin 18

4.2.1 Chemische Charakteristik und Stuktur von Telavancin 18

4.2.2 Wirkmechanismus 21

4.2.3 Unerwünschte Nebenwirkungen 24

4.2.4 Indikationen von Telavancin und Resistenzentwicklung 26

4.2.5 Pharmakokinetik von Telavancin 27

5 EXPERIMENTELLER TEIL 30

5.1 Chemikalien 30

5.2 Geräte 30

5.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben 31

5.4 HPLC-Analyse 32

5.5 Auswertung der Daten 35

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 36

6.1 Bestimmung der unspezifischen Bindung von Telavancin 36

6.2 Bestimmung der Proteinbindung von Telavancin in HSA-hältigen PBS-Lösungen 40

6.3 Bestimmung der Proteinbindung von Telavancin in humanem Serum 44

7 LITERATURVERZEICHNIS 48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plasmaproteine und ihre prozentuale Mengenverteilung 10

Abbildung 2: Albumin 3D Struktur 11

Abbildung 3: Experimenteller Aufbau der Equilibrium Dialyse 13

Abbildung 4: Prinzip der Ultrafiltration 14

Abbildung 5: links: Probelösung vor der Ultrazentrifugation, rechts: schichtartiger Aufbau der Probelösung nach der Ultrazentrifugation. 15

Abbildung 6: Prinzip der Mikrodialyse, (A) Sonde, (B) die freien Wirkstoffmoleküle passieren die Membran und werden mit der Perfusionslösung abtransportiert. 17

Abbildung 7: Strukturvergleich Vancomycin und Telavancin 19

Abbildung 8: Wirkmechanismen von Telavancin 22

Abbildung 9: Gradientenverlauf für die HPLC Analyse von Telavancin 32

Abbildung 10: Chromatogramm einer Telavancin-Lösung (5 µg/ml) in PBS. 33

Abbildung 11: Chromatogramm eines Zentrifugates gewonnen aus einer Serumprobe (5µg/ml Telavancin). 34

Abbildung 12: Chromatogramm eines Zentrifugates gewonnen aus einer HSA-hältigen PBS- Lösung (5µg/ml Telavancin) 34

Abbildung 13: Eichkurve für Telavancin 35

Abbildung 14: Unspezifische Bindung von Telavancin (gelöst in PBS) bei pH 7.4 an Microcon® Zentrifugenfilter. 37

Abbildung 15: Unspezifische Bindung von Telavancin (gelöst in PBS) bei pH 6.0 an Microcon® Zentrifugenfilter. 38

Abbildung 16: Bindung von Telavancin(20 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Microcon®- Zentrifugenfilter 41

Abbildung 17: Bindung von Telavancin (20 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Centrifree®- Zentrifugenfilter 43

Abbildung 18: Bindung von Telavancin (5 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Centrifree®- Zentrifugenfilter 44

Abbildung 19: Vergleich der Bindung von Telavancin (20 µg/ml) an humanes Serum in Microcon® und Centrifree®- Zentrifugenfilter 45

Abbildung 20: Bindung von Telavancin an humanes Serum in Centrifree®- Zentrifugenfilter 46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MIC- Werte für Telavancin und Vancomycin gegen klinisch relevante Bakterien 23

Tabelle 2: häufigste Nebenwirkungen von Telavancin in klinischen Studien 25

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter von Telavancin in verschiedene Kompartimenten 29

1 ZUSAMMENFASSUNG

Telavancin ist ein Lipoglycopeptidantibiotikum, das bei nosokomialen Pneumonien und komplizierten Hautinfektionen eingesetzt wird. Es hat eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen zahlreiche grampositive Bakterienstämme inklusive *Methicillin- resistente Staphylococcus Aureus (*MRSA). Ein Merkmal dieses Antibiotikums ist seine hohe Plasmaproteinbindungsrate. Sie beeinflusst unter anderem die Verteilung des Wirkstoffs, seine Metabolisierung sowie seine Ausscheidung und ist maßgebend für die Dosierung. Bisher gibt es keine Standardisierung in der Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen. Im Fall von Telavancin führt dieser Umstand dazu, dass Plasmaproteinbindungswerte von 87% bis 95% in wissenschaftlichen Arbeiten zu finden sind.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Plasmaproteinbindung von Telavancin mittels Ultrafiltration untersucht und der freie Anteil des Arzneistoffes durch ein spezifisches HPLC System quantifiziert. Im ersten Schritt wurde zunächst das Ausmaß der unspezifischen Bindung von Telavancin an das Filtermaterial bestimmt. Weiters wurde der Einfluss relevanter Versuchsparameter auf das Ausmaß der Plasmaproteinbindung untersucht, indem Albuminkonzentration, pH-Wert und der molecular weigth cut off (MWCO) der Zentrifugenfilter verändert wurden. Für eine Filterart wurde dabei die unspezifische Bindung in den Versuchen minimiert durch Vorbehandlung mit den reinen Telavancinlösungen. Zusätzlich wurde die Plasmaproteinbindung in humanem Serum quantifiziert.

Die unspezifische Bindung lag in den Versuchen mit der 1µg/ml Telavancinlösung immer über 85%. Bei der Konzentration von 20µg/ml Telavancin konnte auch eine Absättigung der unspezifischen Bindung gezeigt werden, zunächst

lagen die Bindungsraten bei dieser Konzentration bei rund 98% und sanken am Ende auf 64% bei pH 6.0, beziehungsweise auf 53.96% bei pH 7.4. Generell ist anzumerken, dass die unspezifische Bindung in allen Versuchen bei p.H 6.0 deutlich höher war als bei pH 7.4. Die Steigerung der Albuminkonzentration in den Probelösungen führte in beinahe allen Versuchen zu einer leichten Erhöhung des Protein-gebundenen Wirkstoffanteils. Im Versuch mit den zuvor behandelten Filtern war die Proteinbindungsrate, trotz geringerem MWCO dieser Filter, deutlich geringer als im Versuch ohne Vorbehandlung und lag durchgehend unter 90%.

Zusammenfassend kann man sagen, Telavancin besitzt eine ausgesprochen hohe Affinität für Kunststoffoberflächen, welche man in Plasmaproteinbindungsstudien nicht vernachlässigen darf. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, welche Auswirkungen bereits kleine Veränderungen im Versuchsablauf zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung haben. Im Fall von Telavancin wären eventuell allgemein gültige Richtlinien zur Bestimmung dieser Bindung von Vorteil, um den Einfluss der unspezifischen Bindung so klein wie möglich zu halten und Ergebnisse besser vergleichbar zu machen.

.

2 ABSTRACT

Telavancin is a lipoglycopeptide antibiotic, used in the treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and skin- structure infections. It has a high antimicrobial activity against gram positive bacteria including *meticillin- resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). A characteristic of this antibiotic is his high plasma protein binding. This influences the distribution, metabolization, excretion of the drug and is crucial to determine dose ranging. Up to now, there is no standardization for the determination of the plasma protein binding rate. In case of Telavancin, this leads to plasma protein binding values from 87% to 95%.

In scope of this diploma thesis the plasma protein binding of Telavancin was examined using ultrafiltration and the free fraction of the drug was quantified by the use of a specific HPLC system. In the first step, the extent of the unspecific binding of Telavancin to the filter material was determined. Furthermore, the influence of relevant experimental parameters on the extend of plasma protein binding was tested by altering albumin concentration, pH-value and the molecular weight cut off (MWCO) of the spin filters. The unspecific binding was minimized for one type of spin filter by pretreatment with the pure Telavancin-solutions. In addition, we evaluated the plasma protein binding of human serum.

In the experimental setup, using the 1µg/ml Telavancin solution the unspecific binding rate was always above 85%. Tests with the 20 µg/ml Telavancin solution showed that the unspecific binding is saturable. First, binding rates at this concentration were at about 98%, in the end they sank to 64% at pH 6.0 and to 53.96% at pH 7.4. Generally, it should be noted that unspecific binding rates were higher in the experimental setup at pH 6.0 than at pH 7.4. The increase of the

albumin concentration in the test solutions, led to a slight increase of protein-bound drug in nearly all experiments. Using the pretreated spin filters led, to significant lower plasma protein binding rates, despite the smaller MWCO of these filters. Using the pretreated filters, the plasma protein binding rates were always under 90%.

In conclusion, it should be noted that Telavancin has a high affinity for synthetic surfaces, which should not be neglected in plasma protein binding studies. The outcomes of the experiments show that small changes in the experimental setup can have great influence on the results. In relation to Telavancin probably general guidelines for the determination of the plasma protein binding could be useful to minimize the effect of unspecific binding on the results and make them more comparable.

3 PROBLEMSTELLUNG

Telavancin (VIBATIV®) ist ein neues Antibiotikum aus der Klasse der Lipoglycolipide, welches sich von Vancomycin ableitet. Wie auch seine Muttersubstanz, kommt es zum Einsatz bei nosokomialen Infektionen mit Gram positiven Bakterien und ist vor allem ein wichtiger Vertreter im Einsatz gegen *Methicillin- resistente Staphylococcus Aureus* Stämme, die nicht mehr in ausreichendem Maße auf Vancomycin ansprechen. Um eine effektive antimikrobielle Behandlung zu gewährleisten, muss eine ausreichende Konzentration des Antibiotikums im Zielgewebe vorhanden sein. Arzneistoffkonzentrationen im Blutplasma sagen nur wenig über die Konzentration im Gewebeverband aus, denn nur Wirkstoff der ungebunden, also frei im Plasma vorliegt, kann zum Zielort zu diffundieren, Protein-gebundener Arzneistoff ist pharmakologisch inaktiv. Je größer der gebundene Wirkstoffanteil ist, desto größer sind die Auswirkungen auf das Verteilungsvolumen, die Metabolisierung und die Ausscheidung.

Telavancin ist zum überwiegenden Teil im Plasma an Albumin gebunden. In zahlreichen Studien wird die Problematik seiner hohen Plasmaeiweißbindung behandelt und in der Literatur werden Proteinbindungswerte im Bereich von 87% bis 95% genannt. Diese Werte stammen zum Großteil aus in vitro Untersuchungen, in denen vor allem das Ausmaß der Bindung von Telavancin an Serumalbumin getestet wurde.

Die Vielfalt an Bestimmungsmöglichkeiten für die Plasmaproteinbindung macht es schwierig Ergebnisse zu vergleichen, da eine allgemeine Standardisierung fehlt. Auch in Hinblick auf Testmedien, Zusatz von Proteinen, pH-Wert und vieles mehr gibt es keine verbindlichen Richtlinien. Die Problematik hierbei liegt darin, dass bereits

geringe Veränderungen in der Bestimmungsmethodik der Proteinbindung die Ergebnisse stark beeinflussen können.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde deshalb die Plasmaeiweißbindung von Telavancin an Serumalbumin und Serum unter verschiedenen Rahmenbedingungen mittels Ultrafiltration analysiert und verglichen. Dabei wurden 2 Arten von Membranfilter mit unterschiedlicher Porengröße verwendet. Eine Filterart wurde mit den verwendeten Telavancinlösungen vorkonditioniert, um die unspezifische Bindung des Antibiotikums an die Membran zu minimieren, bei dem anderen Filter wurde auf eine Vorkonditionierung verzichtet. Es wurden 3 unterschiedliche Konzentrationen des Antibiotikums bei 2 pH-Werten untersucht. Die gesammelten Filtrate wurden mittels HPLC analysiert, um die Bindungsrate zu quantifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es aufzuzeigen, welche Auswirkungen bereits geringe Veränderungen in der Testmethode auf die gemessenen Plasmaproteinbindungswerte haben können.

4 EINLEITUNG

Nach der Verabreichung eines Arzneistoffes wird dieser je nach seinen chemischen Eigenschaften gut oder schlecht resorbiert, ins Blutplasma aufgenommen und letztendlich zum Wirkort transportiert. Im Blut kann der Arzneistoff entweder frei vorliegen, oder an Trägermoleküle (vor allem Proteine) gebunden werden. Jener Anteil, der gebunden wird, ist pharmakologisch unwirksam. Durch die Bindung an Serumproteine kann keine Diffusion ins Zielgewebe stattfinden. Somit bildet die Plasmaproteinbindung einen wesentlichen Faktor für die Wirkung des Arzneistoffs und stellt einen wichtigen Parameter für die richtige Dosisfindung dar. Da keine Diffusion des Arzneistoff-Proteinkomplexes möglich ist, werden auch wichtige Parameter wie das Verteilungsvolumen, die Metabolisierung und folglich auch die Clearance beeinflusst. Im folgenden Kapitel werden deshalb die Relevanz der Proteinbindung sowie die beteiligten Proteingruppen genauer betrachtet und vor allem in Beziehung zum Lipoglycopeptidantibiotikum Telavancin genauer diskutiert.

4.1 Proteinbindung

Im Blut gibt es zahlreiche endogene Substanzen, die zu Interaktionen mit Wirkstoffen fähig sind. Am bedeutsamsten sind hierbei vor allem Proteine, da sie durch hohe Variablität in der chemischen Struktur, bedingt durch die Aminosäureseitenketten, Bindungspartner für zahlreiche Xenobiotika sein können. Die Bindung zwischen Wirkstoffen und den Plasmaproteinen ist dabei in der Regel immer reversibel und hängt unter anderem von den Eigenschaften des Arzneistoffs sowie vom Blut-pH Wert ab. Bei einigen Cytostatika kann es auch zur Ausbildung von irreversiblen, kovalenten Bindungen zwischen Protein und Arzneistoff kommen.

Auch individuelle Faktoren, wie das Alter und die Leberfunktion, können indirekt Einfluss auf das Ausmaß der Plasmaproteinbindung nehmen, da sie die Synthese der Proteine beeinflussen.(1,2) In folgendem Kapitel werden die wichtigsten Plasmaproteine sowie die klinische Relevanz der Plasmaproteinbindung besprochen.

4.1.1 Einfluss der Proteinbindung auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Wirkstoff der an Plasmaproteine gebunden ist, kann nicht durch Biomembranen diffundieren und bildet somit ein Depot im Plasma. Bakterielle Infektionen betreffen meist die interstitielle Flüssigkeit, oder bestimmte Gewebestrukturen, deshalb stellt hier eine hohe Plasmaproteinbindung ein großes Problem dar, da nur ein geringer Anteil im Zielgewebe zur Verfügung steht. Durch das fehlende Diffusionsvermögen dieses Wirkstoffanteils, kommt es auch zu keiner Metabolisierung in der Leber oder zur renalen Ausscheidung des Arzneistoffes, somit werden sowohl die hepatische als auch die renale Clearance beeinflusst. Das Verteilungsvolumen ist bei hohen Plasmaproteinbindungswerten dementsprechend klein, da sich der Großteil des Wirkstoffs nicht ins Gewebe umverteilen kann und im Plasma „gefangen“ ist. Durch diese Einflüsse auf die Clearance und auf das Verteilungsvolumen, steigt auch die Eliminationshalbwertszeit des Fremdstoffes an. Diese Veränderung der Halbwertszeit kann bei Antibiotika die Zeit über der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) beeinflussen. Die MHK ist jene Antibiotikakonzentration, bei der eine Vermehrung der Bakterien mit freiem Auge nicht mehr wahrnehmbar ist, sie ist eine wichtige Kenngröße von Antibiotika und wird im Englischen als *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) bezeichnet.(3)

Da die Plasmaeiweißbindung, wie erwähnt, auch von zahlreichen endogenen Faktoren, wie Leberfunktion oder inflammatorischen Prozessen abhängt, stellen vor

allem Arzneistoffe mit hoher Proteinbindung und geringer therapeutische Breite eine Herausforderung in Hinsicht auf die Dosisfindung dar. Verschiedene Xenobiotika können auch um Bindungsstellen an Plasmaproteinen miteinander konkurrieren und sich gegenseitig aus der Bindung verdrängen. Dadurch kommt es zur Erhöhung des freien, pharmakologisch wirksamen Anteils des verdrängten Wirkstoffs und gegebenenfalls zu einer unerwünschten Wirkungssteigerung.

Falls die Arzneistoffkonzentration im Blut in Relation zu den verfügbaren Bindungsstellen der Proteine vergleichsweise hoch ist, kann es auch zu einer Absättigung der Proteinbindung kommen. Dadurch ist ab einer gewissen Dosis ein rapider Anstieg des ungebundenen Anteils an Arzneistoff zu bemerken, die Bindungskapazität der Proteine für den Arzneistoff ist in diesen Fällen erschöpft.(4)

4.1.2 Plasmaproteine

Die Eiweißkonzentration des Plasmas liegt zwischen 65 und 80 g/l (1) und somit machen die Plasmaproteine den größten Anteil der im Plasma gelösten Stoffe aus. Es gibt über 100 verschiedene Proteine im Blutplasma, die meisten davon sind Glykoproteine. Mit Hilfe der Elektrophorese kann man sie in verschiedene Fraktionen einteilen, je nach Wandergeschwindigkeit unterscheidet man dabei Albumine, Alpha-1-Globuline, Alpha-2-Globuline, Betaglobuline und Gammaglobuline.(5) In Abbildung 1 ist zu sehen, dass lediglich 10 verschiedene Proteine 90% der Gesamteiweißmenge des Plasmas ausmachen.

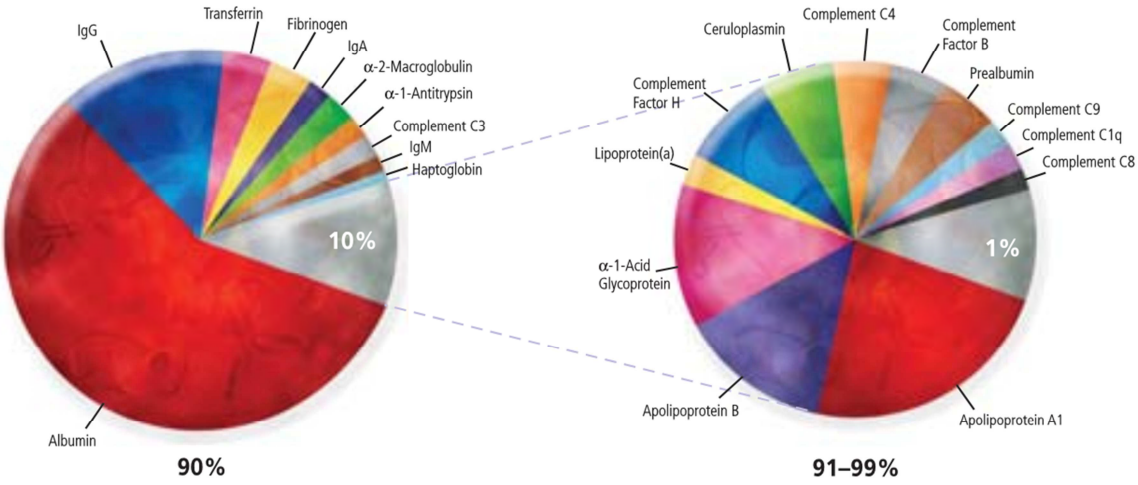

Abbildung 1: Plasmaproteine und ihre prozentuale Mengenverteilung (6)

Zu den wichtigsten arzneistoffbindenden Proteinen im Plasma gehört zunächst das Serumalbumin, welches den größten Anteil der Proteinmenge des Plasmas ausmacht. Im Humanserumalbumin (HSA) gibt es insgesamt 8 Bindungsstellen von denen vor allem 2 von großer Bedeutung sind für die Interaktion mit Wirkstoffmolekülen.(4) Auch die Plasmaproteinbindung der meisten Antibiotika kann zum Großteil dem Albumin zugeschrieben werden.(3) Mit einem Molekulargewicht von ca 66200 Da, zählt es zwar zu den kleinsten Eiweißkörpern, besitzt aber dadurch eine hohe Gesamtoberfläche, die für mögliche Interaktionen mit Bindungspartnern zur Verfügung steht. HSA ist nicht glykosyliert und besteht aus einer Kette von 585 Aminosäuren, dabei ist der hohe Anteil an schwefelhältigen Aminosäuren hervorzuheben. Insgesamt gliedert sich das Protein in 3 homologe Domänen mit ähnlichen 3D Strukturen (I-III). Jede Domäne gliedert sich dabei wieder in die Subdomänen a und b, wie in Abbildung 2 zu sehen ist.(2)

Eine Besonderheit des Albumins liegt in der Vielfältigkeit der möglichen Interaktionen mit diesem Protein. Wie bereits erwähnt, spielen dabei 2 wichtige

spezifische Bindungsstellen eine große Rolle: Binding Site I (= Warfarin Binding Site) und Site II (= Benzodiazepin Binding Site). Sie sind beide lokalisiert in den Albumin Domänen 2 und 3, der Großteil der Arzneistoffe bindet an eine dieser 2 Stellen. Vor allem ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol Interaktionen und hydrophobe Wechselwirkungen führen zu einem breiten Spektrum an möglichen Interaktionen zwischen Arzneistoffen und diesem Protein.(1,2,3)

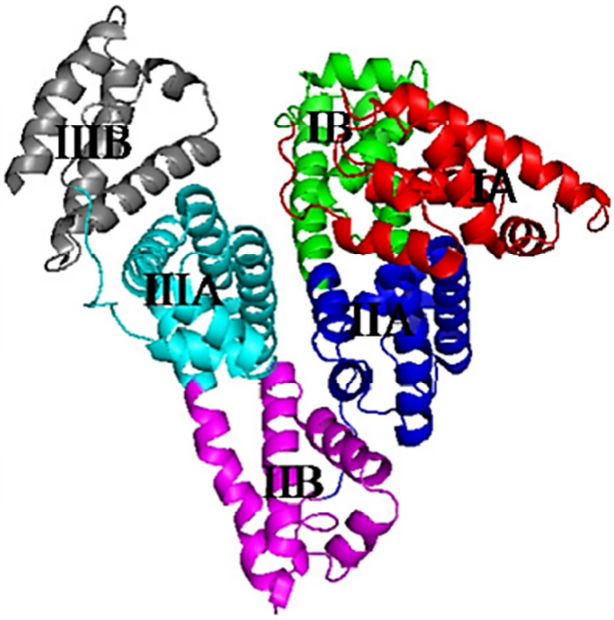

Abbildung 2: Albumin 3D Struktur (2)

Neben Albumin, zählt auch das saure α_1- Glycoprotein (AAG) zu den Plasmaproteinen, die häufig eine Bindung mit Arzneistoffen eingehen. Es wird in der Leber synthetisiert und ist vor allem von Bedeutung, wenn es um die Bindung von basischen oder neutralen Arzneistoffen geht. Abbildung 1 zeigt, dass dieses Protein im Normalfall nur einen sehr kleinen Bruchteil der Plasmaeiweiße ausmacht, jedoch gehört es zu den sogenannten Akut-Phase-Proteinen. Das bedeutet, dass die

Konzentration des AAG bei Entzüngungsprozessen ansteigt und deshalb auch als Entzündungsmarker herangezogen wird.(4)

Für bestimmte Arzneistoffe, wie zum Beispiel Felodipin, stellen Lipoproteine die wirkstoffbindende Komponente dar. Die Bindung an Lipoproteine kommt jedoch eher seltener vor und ist somit eher von untergeordneter Bedeutung.(3) Zusätzlich zu den erwähnten Proteinen können auch andere Plasmabestandteile, wie zum Beispiel Erythrozyten oder Hämoglobin, eine Bindung mit Arzneistoffen eingehen.(3,4)

4.1.3 Bestimmung der Proteinbindung

Wie bereits erwähnt, gibt es zahlreiche Möglichkeiten zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung. Grundsätzlich kann man hierbei zunächst *in vitro* und *in vivo* Methoden unterscheiden.

In vitro Methoden:

Sie werden vor allem verwendet, um einen Wirkstoff zu charakterisieren und das Hauptbindungsprotein zu identifizieren. Meist werden diese Untersuchungen im Rahmen einer Sicherheitsebeurteilung, oder Pharmakokinetik/Pharmakodynamik-Evaluierung durchgeführt. Zum Gold Standard zählen hierbei die Equilibrium Dialyse, die Ultrafiltration und die Ultrazentrifugation.(4,7,8)

Am häufigsten verwendet wird die ***Equilibrium Dialyse***, deren Prinzip darauf beruht, dass sich ein Gleichgewicht zwischen einer Arzneistoff-Proteinlösung und einem Puffer einstellt, welche durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Der in Abbildung 3 dargestellte Versuchsablauf ist sehr einfach und leicht an individuelle Ansprüche anzupassen. PBS ist dabei in den meisten Fällen der Standard Dialysis Puffer.(8) Wie auch im Blut können dabei nur freie Arzneistoffmoleküle durch die

Membran diffundieren. Die Ergebnisse sind aufgrund der gängigen Verwendung gut vergleichbar und verlässlich. Wenn jedoch ein Arzneisstoff nicht für mindestens 3 bis 5 Stunden im Plasma stabil bleibt, siehe Abbildung 3, so kann diese Technik nicht angewandt werden.(8)

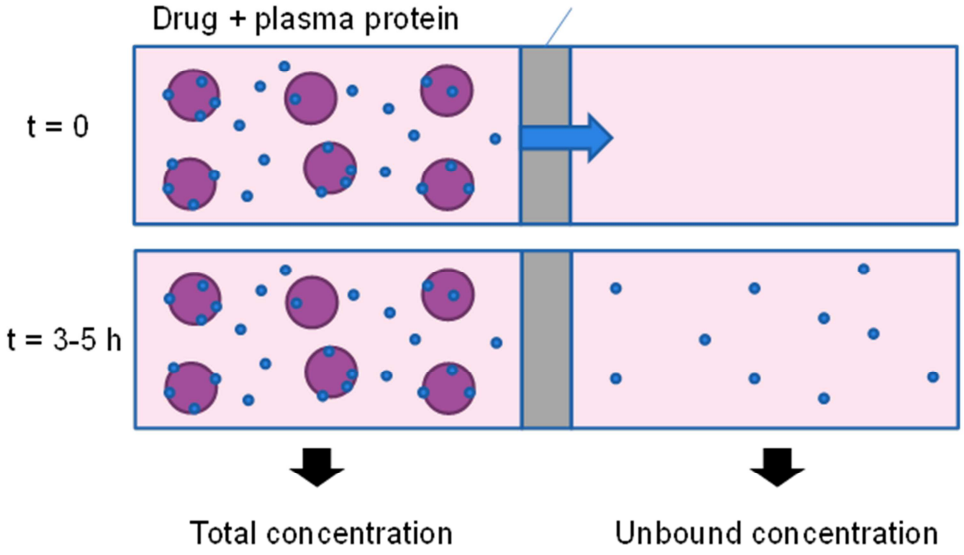

Abbildung 3: Experimenteller Aufbau der Equilibrium Dialyse (9)

In Abbildung 4 ist erkennbar, dass auch bei der **Ultrafiltration** mit einer semipermeablen Membran gearbeitet wird, diese besteht in der Regel aus regenerierter Cellulose.(8) Im Unterschied zur Equlibriumsdialyse, wird bei dieser Methode ein Filtrationdsdruck angelegt, der dem der Niere entspricht.(4) Der Vorteil dieser Technik ist, dass durch den angelegten Druck die Zeit für die Membranpassage verkürzt wird. Problematisch dabei sind jedoch Siebeffekte, die dazu führen, dass Wirkstoffmoleküle langsamer wandern als das Plasmawasser. Dadurch besteht die Gefahr den freien Anteil zu unterschätzen. Sowohl bei der Equilibrium Dialyse als auch bei der Ultrafiltration gibt es außerdem den Nachteil der unspezifischen Bindung von freiem Arzneistoff an die verwendeten Membranen.

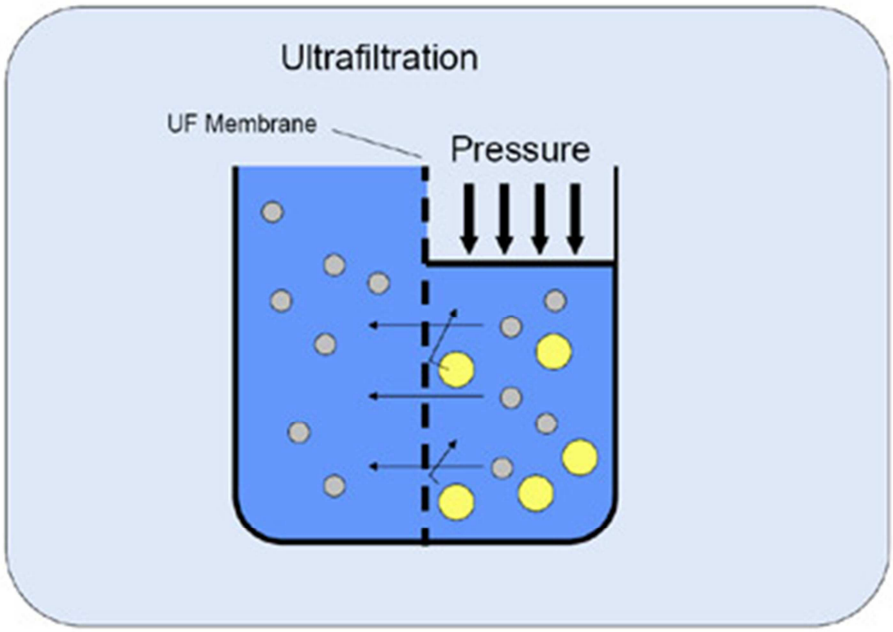

Abbildung 4: Prinzip der Ultrafiltration (10)

Die **Ultrazentrifugation** hingegen, umgeht das erwähnte Problem der unspezifischen Bindung von Arzneistoffmolekülen an Membranmaterialien. Hier wird die wirkstoffhältige Probelösung, für eine längere Zeintspanne von 10 bis 24 Stunden ohne Membran, bei bis zu 500000 G zentrifugiert, dabei kommt es zu einer schichtartigen Auftrennung, die rechts in Abbildung 5 zu sehen ist.(4,8) Die oberste Schicht ist eine Lipidschicht aus Chylomikronen und LDL, ganz unten sammeln sich HDL, AAG und Albumin. In der Mitte findet man den proteinfreien, wirkstoffhältigen Plasmaanteil. Dieser schichtartige Aufbau bringt vor allem den Nachteil der aufwendigen Aufreinigung mit sich, außerdem kann es, vor allem bei einem Molekulargewicht >400g/mol, zur Sedimentation von Arzneistoffmolekülen kommen,. Generell wird für stark lipophile Arzneistoffe mit hoher Plasmaproteinbindung meistens die Equilibrium- Dialyse eingesetzt.(4,8)

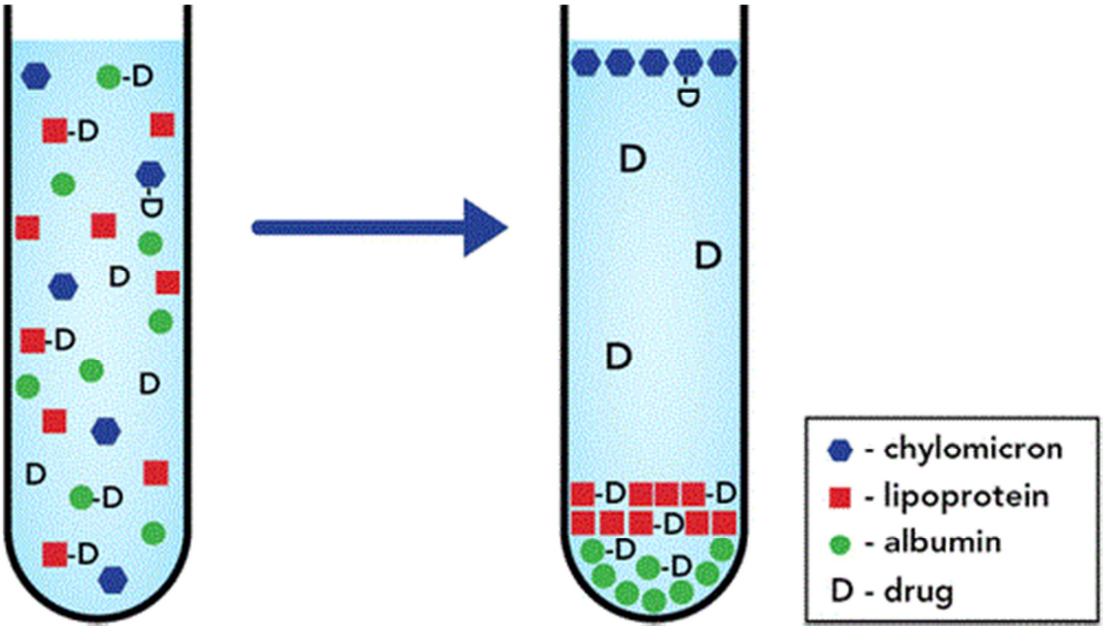

Abbildung 5: links: Probelösung vor der Ultrazentrifugation, rechts: schichtartiger Aufbau der Probelösung nach der Ultrazentrifugation.(11)

Wichtig ist bei allen in vitro- Bestimmungen der Proteinbindung unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Um diesen Verhältnissen möglichst nahe zu kommen, wäre es logisch mit 100% Serum zu arbeiten. Doch es hat sich im Versuch mit Antibiotika gezeigt, dass dieser Ansatz nicht optimal ist. Setzt man Bakterienstämme einem Antibiotikum in aktiven Serum aus, zeigen bereits subinhibitorische Konzentrationen einen antimikrobiellen Effekt. Außerdem gibt es bereits beim Bakterienwachstum in Serum einen inhibierenden Effekt auf die Mikroorganismen, wodurch es eine Wachstumshemmung noch vor der Antibiotikazugabe gibt. Um diese Einflüsse auf Bakterien so klein wie möglich zu halten, wurde in vielen Proteinbindungsstudien mit Antibiotika die Serumkonzentration in den Testmedien auf maximal 70% beschränkt.(3)

Eine Alternative zur Verwendung von Serum, stellen Versuchslösungen mit Albuminzusatz dar. Hierbei wird eine Konzentration von 4g/dl als äquivalent zum

humanern Serum angesehen. Das Problem dabei ist, dass die Bindungskapazität von Proteinen in vitro, nicht unbedingt der Bindungskapazität in vivo entsprechen muss. Viele Faktoren spielen in dieser Hinsicht eine wichtige Rolle, da diese Kapazität nämlich von Konformationsänderungen beeinflusst wird, die abhängig von der An- bzw. Abwesenheit von endogenen Stoffen, wie Fettsäuren oder Elektrolyten, passieren. Auch pH-Wert- Schwankungen haben hier großen Einfluss: Im pH-Wertbereich von 6-9 kann es zu einer sogenanten N-B Transition von Albumin kommen. N und B sind dabei 2 Isoformen des Moleküls. Je nachdem in welcher Isoform das Protein vorliegt, werden die Binding Sites in ihrer Konformation verändert, wodurch sich auch die Affinität von bestimmten Arzneistoffen für das Protein ändert. In Gegenwart von physiologischen Calciumspiegeln passiert diese Tranformation bereits bei niedrigeren pH-Werten und könnte somit auch im Serum stattfinden und Einfluss auf die Arzneistoffbindung nehmen.(3)

In vivo Methoden:

Generell werden Proteinbindungsbestimmungen, die in menschlichem Plasma durchgeführt werden, in diesem Zusammenhang als solche bezeichnet. Auch hierzu zählen somit Equlibriumsdialyse, Ultrafiltration und Ultrazentrifugation, sofern sie mit Plasmaproben durchgeführt werden. Dabei ist das Hauptbindungsprotein meist bereits aus vorhergehenden in-vitro Versuchen bekannt.(8) Eine Methode nimmt jedoch eine Sonderstellung ein, da sie den freien Anteil eines Arzneistoffs direkt im Zielgewebe des Patienten messen kann.

Dabei handelt es sich um die sogenannte ***Mikrodialyse***. In Abbildung 6 ist ihr Aufbau schematisch dargestellt. Ihr Prinzip basiert auf der Diffusion von Wirkstoffen

über eine semipermeable Membran an der Spitze einer Mikrodialysesonde, die direkt ins Zielgewebe des Patienten implantiert und kontinuierlich mit isotoner Perfusionsflüssigkeit durchspült wird.

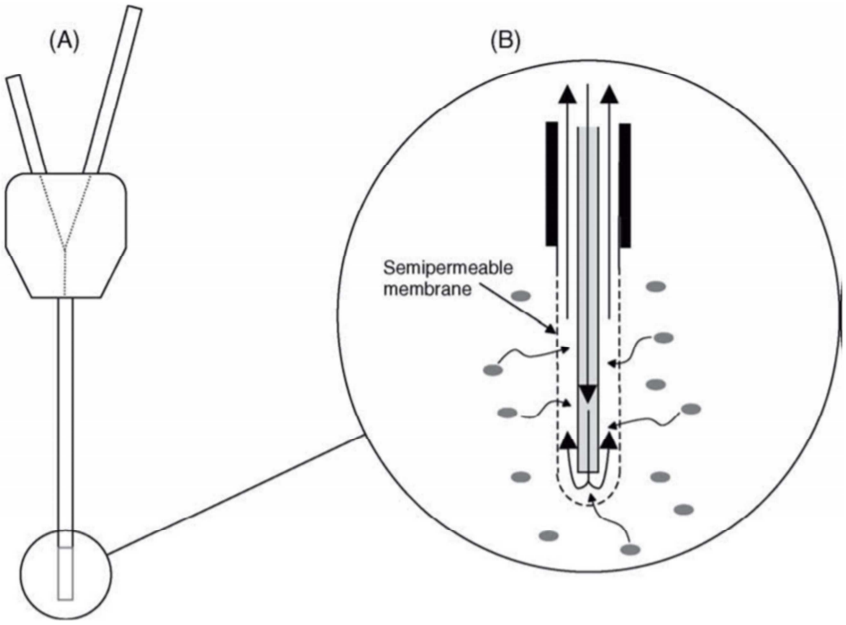

Abbildung 6: Prinzip der Mikrodialyse, (A) Sonde, (B) die freien Wirkstoffmoleküle passieren die Membran und werden mit der Perfusionslösung abtransportiert.(12)

Über die Membran kann dabei der ungebundene Teil des Arzneistoffes in die Sonde übertreten und spiegelt den Arzneispiegel zu diesem Zeitpunkt wieder.(7,13,14) So wird es möglich, den ungebundenen Anteil eines Antibiotikums direkt am Infektionsort zu messen. Der große Vorteil liegt darin, dass man eine direkte Messung im Zielgewebe durchführen kann, denn nicht immer korreliert die Arneistoffkonzentration im Blutplasma mit jener im Gewebeverband.

4.2 Telavancin

Nosokomiale Infektionen sind ein großes Problem bei der stationären Behandlung von Patienten. Vor allem *Methicillin resistente Staphylococcus aureus Stämme* (MRSA) gehören zu den Verursachern dieser lebensbedrohliche Infekte. In diesem Bereich gilt seit langem Vancomycin als ein Mittel der Wahl. Vancomycin kam in den 1950er Jahren auf den Markt und wurde seither häufig, zur Behandlung von Infektionen mit grampositiven Keimen verwendet. Die Problematik der Resistenzentwicklung blieb aber leider nicht aus, erste Berichte über Vancomycin resistente Bakterien gab es in den späten 80er Jahren.(15) Die Anzahl der Stämme die nicht mehr in ausreichendem Maße auf Vancomycin ansprechen steigen weiterhin, unter anderem zählen dazu *VISA (Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus), VRSA (Vancomycin resistant Staphylococcus aureus)* und *VRE (Vancomycin resistant enterococcus faecium)*. Die steigende Resistenzrate, sowie die teilweise bescheidenen Eigenschaften von Vancomycin, wie zum Beispiel die schlechte Penetration in die Lunge, oder die langsame Wirkung, betonen die Notwendigkeit von neuen, besser wirksamen Antibiotika, wie Telavancin.

4.2.1 Chemische Charakteristik und Stuktur von Telavancin

Telavancin wurde im Jahr 2000 zum ersten Mal synthetisiert und ähnelt in seiner Struktur sehr seiner Muttersubstanz Vancomycin, wie in Abbildung 7 ersichtlich. Vancomycin selbst ist ein Produkt von Streptomyces orientalis.(16) Das Grundgerüst ist aus 7 modifizierten Aminosäuren aufgebaut, die linear angereiht sind. Die phenolische OH-Gruppe eines Aminosäurerestes ist dabei mit einem Disaccharid verknüpft aus D-Glucose und Vancosamin. Durch die räumliche Struktur

kommt es im Bakterium zur Bindung zwischen dem N-Terminus des Heptapeptids und einem freien, endständigen D-Alanyl-D-Alaninrestes der bakteriellen Zellwand.(16)

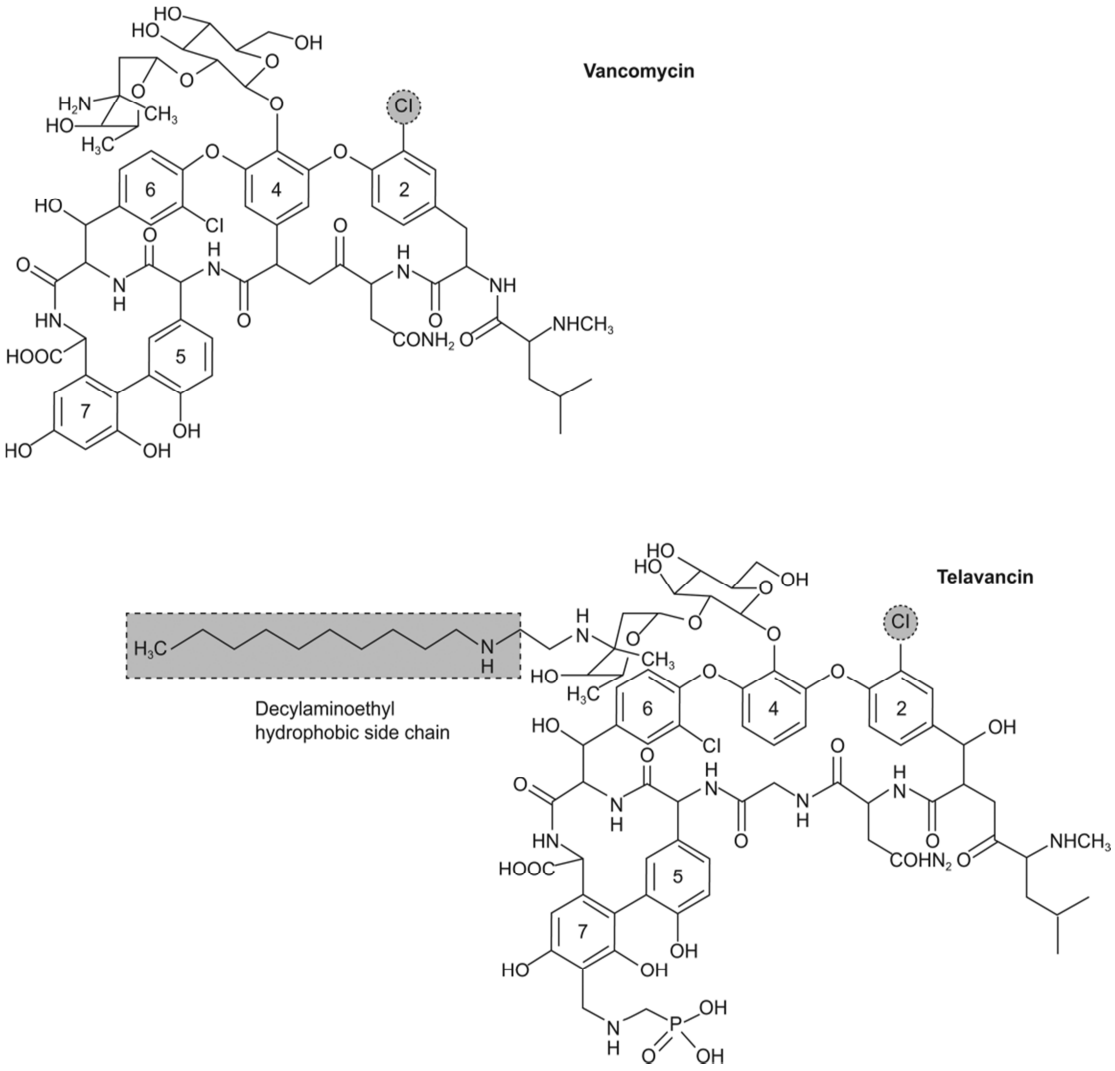

Abbildung 7: Strukturvergleich Vancomycin und Telavancin (24)

Um die Wirkung von Vancomycin auch gegenüber reisistenten Stämmen zu konservieren und zu verstärken, wurde zunächst eine hydrophobe Decylaminoethyl-Seitenkentte an den Vancosaminzucker angehängt. Diese Seitenkette identifiziert

das Antibiotikum als LIPOglykolipid und führt zu gesteigerter Membrangängigkeit. Dadurch verbessert sie zwar die antimikrobielle Aktivität von Telavancin, da sie mit der bakteriellen Zellwand interagiert, jedoch führt sie auch zu unerwünschter Adsorption, schlechter Verteilung, verzögerter Exkretion, langer Eliminationshalbwertszeit und hoher Gewebeakkumulation.(17,18) Aus diesem Grund wurde eine weitere Gruppe eingeführt, um die Gesamtlipophilie zu vermindern. Eine negativ geladene Phosphonomethylaminomethyl- Gruppe wurde in der Resorcinol-ähnlichen 4‘ Position der 7. Aminosäure des Heptapeptidkerns angefügt.(18,19) Durch diesen hydrophilen Substituenten konnten die unerwünschte Anreicherung in der Leber und der Niere reduziert, und die renale Ausscheidung gesteigert werden. Allgemein konnte in vitro eine gesteigerte antimikrobiologische Aktivität, bei geringerer Resistenzrate im Vergleich mit Vancomycin, nachgewiesen werden.(20)

Telavancin hat ein sehr hohes Molekulargewicht von 1755.652 g/mol (21) und ist schlecht wasserlöslich. Aufgrund dieser Eigenschaften gibt es nur eine Form, die intravenös verabreicht werden kann. VIBATIV® enthält das Hydrochlorid von Telavancin.(21) Um die Löslichkeit zu verbessern, wurde der Formulierung Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Hydroxypropylbetadex) und Mannitol zugefügt.(22) Telavancin zur Injektion wird als weißes bis rosafarbenes, lyophilisiertes Pulver bereitgestellt zu 250 und 750mg pro Ampulle.(22,23) Das Pulver besitzt eine Haltbarkeit von 4 Jahren und ist im Kühlschrank bei 2-8℃ zu lagern.(23) Laut einer Studie (22) beträgt die Haltbarkeit nach Herstellung der Infusionslösung 12 Stunden unter Raumbedingungen bei 20-25℃ und 7 Tage unter Kühlung bei 2-8℃.

4.2.2 Wirkmechanismus

In vitro besitzt Telavancin einen schnellen, konzentrations-abhängigen, bakteriziden Effekt, im Unterschied zu Vancomycin, welches nur langsam wirkt. Ausschlaggebend ist hierbei der duale Wirkmechanismus dieses Antibiotikums (siehe Abbildung 8). Der erste Mechanismus ist derselbe wie bei Vancomycin und wird über den Glycopeptidkern vermittelt. Dieses bindet über 5 Wasserstoffbrücken an endständige D-Alanyl-D-Alanin- Reste von Zellwandvorläufern und führt somit zur Inhibierung der Polymerisation sowie Vernetzung von Peptidoglycan, aus welchem die bakterielle Zellwand aufgebaut ist. Während Vancomycin hier vor allem die Transpeptidation (=Quervernetzung) hemmt, wirkt Telavancin vor allem bei der Transglycosylierung (=Polymerisation) von Peptidoglycanbausteinen.(18,19,21,24)

Der zweite Mechanismus über den Telavancin wirkt, induziert in der Bakterienzelle eine Depolarisation der Zellmembran, die zum Verlust von intrazellulärem Kalium und ATP führt. Da in Bakterien ein Protonengradient für die ATP- Synthese und für den Import von Nährstoffen notwendig ist, sind die Bakterienzellen nicht mehr lebensfähig. Der Grad der Depolarisation steigt dabei mit der Zeit.(25) Es wird vermutet, dass eine Interaktion der lipophilen Decylaminoethyl Seitenkette, mit der Phospholipiddoppelschicht der bakteriellen Zellmembran bei diesem Mechanismus eine Rolle spielt. Der lipophile Rest des Telavancins hat dabei eine hohe Affinität für das bakterielle Peptidoglycan Lipid II, welches in der bakteriellen Zellmembran verankert ist. Eine Insertion des lipophilen Decylaminoethylrestes in die Lipiddoppelschicht der Bakterienzelle und daraus resultierende Membrankrümmung werden in diesem Zusammenhang diskutiert.(25)

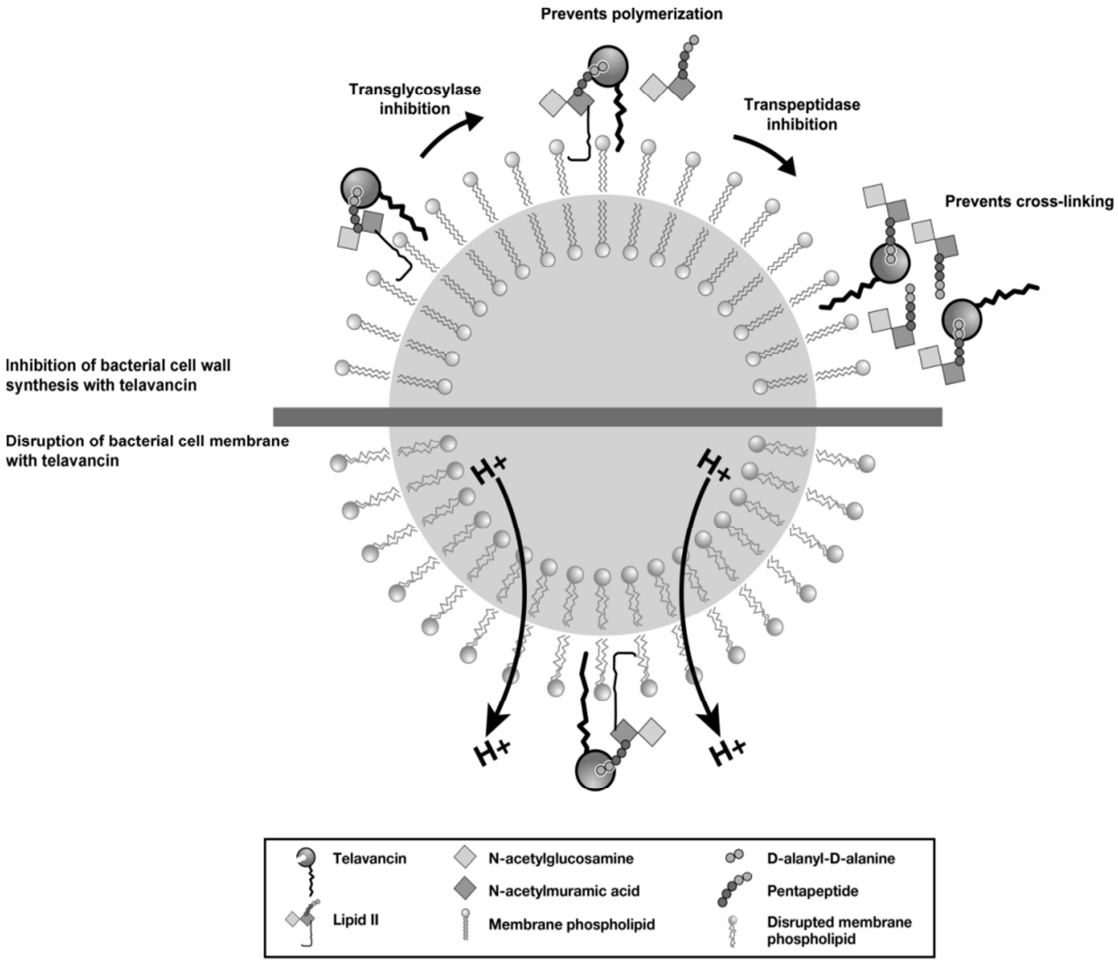

Abbildung 8: Wirkmechanismen von Telavancin (24)

Lipid II findet man auch im sogenannten Zellteilungsseptum, wo die Zellmembransynthese für eine bevorstehende Teilung der Bakterienzelle passiert.(18,26) Inhibiert man die Lipid II Synthese der Bakterien kann man eine Suppression der Telavancin-induzierten-Depolarisation beobachten.(25) Hierin liegt auch ein wesentlicher Unterschied zwischen Vancomycin und Telavancin. Telavancin bindet bevorzugt D-Alanyl-D-Alaninreste des Lipid II vor allem im Zellteilungsseptum. In einer Studie mit fluoreszenzmarkiertem Telavancin und Vancomycin konnte beobachtet werden, dass in 61% der verwendeten Bakterienpopulationen, Telavancin vor allem im Septum gebunden wurde, während nur in 13 % der Zellen

Septum-gebundenes Vancomycin detektierbar war. Vancomycin wurde vorwiegend an D-Alanyl-D-Alaninreste der ursprünglichen Zellwand gebunden. Dieser Umstand erklärt auch die Unterschiede in Hinsicht auf die MIC- Werte von Telavancin und Vancomycin.(26)

Die Minimale Inhibitorische Konzentration (MIC) kann dabei je nach Bakterium stark variieren. Die Bestimmungsmethode für die MIC- Werte von Telavancin wurden 2014 vom CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) überarbeitet, um die Löslichkeit zu verbessern und die unspezifische Bindung an Plastikoberflächen zu minimieren. Die früheren Bestimmungen unterschätzten die antimikrobielle Aktivität von Telavancin, deshalb resultieren die neuen Testmethoden in wesentlich geringeren MIC's.(20,27) Die Empfindlichkeitsgrenze, die dabei für *Staphylococcus aureus* gilt, wurde von ≤ 1µg/ml auf ≤0.12µg/ml gesenkt.(28)

Tabelle 1: MIC- Werte für Telavancin und Vancomycin gegen klinisch relevante Bakterien (20)

Organism (number tested)/antimicrobial agent	MIC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)	% Susceptible[a]	% Intermediate	% Resistant
Staphylococcus aureus, MSSA (4230)					
Telavancin	0.03	0.06	100	0	0
S. aureus, MRSA (2613)					
Telavancin	0.03	0.06	100	0	0
Vancomycin	1	1	100	0	0
Enterococcus faecalis (702)					
Telavancin	0.12	0.12	98.4		
Vancomycin	1	2	98.4	0.2	1.4
E. faecium, vancomycin susceptible (228)					
Telavancin	≤ 0.015	0.03			
Vancomycin	1	1	100	0	0
S. pneumoniae (1878)					
Telavancin	≤ 0.015	≤ 0.015			
Vancomycin	0.25	0.5	100	0	0

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, sind die Minimalen Inhibitorischen Konzentrationen um 50% bzw 90% der Organismen in ihrem Wachstum zu hemmen (MIC_{50} bzw MIC_{90}) für Telavancin wesentlich geringer als für Vancomycin.

4.2.3 Unerwünschte Nebenwirkungen

Telavancin zählt zu den Reseveantibiotika und sollte nur in Ausnahmefällen eingesetzt werden, um Resistenzen vorzubeugen. Bei 1680 Patienten aus Phase 3 Studien wurden bei 47.3% Nebenwirkungen beschrieben, bei 5 % waren sie der Grund für einen Behandlungsabbruch.(23) Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Telavancin zählen Geschmacksstörungen, vor allem metallischer Geschmack, Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerzen, schaumiger Urin, Nierenfunktionsstörungen und leichte QT-Verlängerung. Die Herkunft des schaumigen Urins wurde dabei dem in der Formulierung enthaltenen Cyclodextrin zugeschrieben.(18) Bei einer zu schnellen Infusion von Telavancin kann es außerdem zum sogenannten „Red-Man-Syndrom“ kommen, deshalb wird empfohlen das Antibiotikum über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde zu verabreichen.(18,29,30)

Ernste Nebenwirkungen die aus Studien bekannt sind, betreffen vor allem die Niere, Lunge und das Herz.(28) In Tabelle 2 sind die wichtigsten Nebenwirkungen aus Studien aufgelistet. Telavancin kann außerdem mit Koagulationsassays interferieren und zu einer erhöhten *International Normalized Ratio* (INR) sowie Prothrombinzeit führen. Dieser Umstand ist bedingt durch eine Bindung des Telavancin an künstliche Phospholipide, die in manchen Koagulationstests zugefügt werden. Die Blutgerinnungsparameter sollten deshalb vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie mit Telavancin bestimmt werden.(29,31)

Tabelle 2: häufigste Nebenwirkungen von Telavancin in klinischen Studien (18)

	Frequency (%)							
	FAST I		FAST 2		ATLAS 1 & 2		ASSURE	
	Telavancin	Standard therapy	Telavancin	Standard therapy	Telavancin	Standard therapy	Telavancin	Standard therapy
Nausea	15	13	16	6	27	15	3	10
Vomiting	10	4	8	6	14	7	3	10
Headache	11	10	8	4	14	13	10	10
Foamy urine	NR	NR	NR	NR	13	3	NR	NR
Insomnia	NR	NR	13	3	10	9	7	3
Constipation	4	6	5	7	10	7	NR	NR
Diarrhea	NR	NR	6	5	7	8	0	7
Pruritus	NR	NR	6	8	3	6	3	7
Dizziness	NR	NR	NR	NR	6	6	NR	NR
Psychiatric disorders	12	10	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Dyspnea	8	1	NR	NR	NR	NR	3	7
Paresthesia	5	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Taste disturbance	NR	NR	14	0	33	7	10	0
Chills	NR	NR	6	2	4	2	NR	NR
Rash	NR	NR	NR	NR	4	5	7	10
Infusion site pain	NR	NR	NR	NR	4	4	NR	NR
Fatigue	NR	NR	NR	NR	4	3	NR	NR
Infusion site erythema	NR	NR	NR	NR	3	3	7	3
Decreased appetite	NR	NR	NR	NR	3	2	NR	NR
Anxiety	NR	NR	NR	NR	3	2	NR	NR
Renal dysfunction	NR	NR	NR	NR	3	1	NR	NR
Acute renal failure	NR	NR	NR	NR	NR	NR	7	0
Urinary tract infection	NR	NR	NR	NR	NR	NR	14	0
Abdominal pain	NR	NR	NR	NR	2	3	NR	NR
Pyrexia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	14	7
Anemia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	10	7
Deep vein thrombosis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	10	3
Hypokalemia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	10	3
Agitation	NR	NR	NR	NR	NR	NR	7	3
Hematuria	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3	7
Atelectasis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	7	3
Phlebitis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3	7
Blood urea increased	NR	NR	NR	NR	NR	NR	7	0
Eosinophilia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	14
Catheter site infection	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	7

ATLAS, Assessment of Telavancin in Complicated Skin and Skin Structure Infections; ASSURE, Telavancin for Treatment of Uncomplicated *S. aureus* Bacteremia; NR, not reported.

Telavancin gilt in Hinsicht auf die Teratogenität als Arzneistoff der Klasse C, deshalb muss vor einer Anwendung bei schwangeren Frauen eine genaue Nutzen-Risiko Abwägung erfolgen.(18) Besondere Vorsicht gilt auch bei der Anwendung von

Telavancin bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Bei schwerer Niereninsuffizienz und akutem Nierenversagen ist die Anwendung von Telavancin kontraindiziert. In Studien wurde gezeigt, dass das Serumkreatinin steigt und ein nephrotoxisches Potential vorhanden ist. Auch bei leichter Niereninsuffizienz ist deshalb eine Dosisanpassung notwendig.(20).

4.2.4 Indikationen von Telavancin und Resistenzentwicklung

Seit 2009 ist Telavancin in den Vereinigten Staaten auf dem Markt, eingesetzt wird es gehen cSSSI's = *comlplicated skin and skin-structure infections* sowie auch seit 2013 gehen HABP = *hospital acquired bacterial pneumonia* inklusive VABP= *ventilator- associated bacterial pneumonia*.(18,20) Auch in Kanada wird das Antibiotikum in der Therapie von komplizierten Hautinfektionen eingesetzt.(22) In der EU ist Telavancin seit 2014 zugelassen. Die Indikationen sind ähnlich, auch hier kommt es zum Einsatz bei nosokomialen Lungenentzündungen, die durch *MRSA* hervorgerufen wurden. Die ASSURE-Studie untersuchte außerdem den Einsatz von Telavancin bei Bakteriämie und konnte hohe Heilungsraten in der Telavancingruppe aufweisen. Auch gibt es Studien zur Anwendung bei Endocarditis, Meningitis, Osteomyelitis und in Biofilmen. Bisher gibt es in diesen Bereichen jedoch keine Zulassung.(18,32,33)

Um Resistenzentwicklungen vorzubeugen, sollte dieses Antibiotikum erst eingesetzt werden, wenn die Standardtherapie nur unzulängliche bis keine Wirkung zeigt.(34) Für die Resistenzen gegenüber der Muttersubstanz Vancomycin spielt dabei vor allem die Plasmid-vermittelte Expression von so genannten Van-Operons eine große Rolle. Die Expression dieser Operons (vor allem VanA aus *E.faecium*) führt zur Veränderung der Targetstruktur D-Ala-D-Ala in D-Ala-D-Lac. Diese

strukturelle Veränderung führt dazu, dass eine H-Brücke zwischen Vancomycin und dem Target verloren geht und somit die Affinität des Antibiotikums stark sinkt.(20,24,25) In-vitro-Versuche suggerieren für Telavancin jedoch ein niedriges Resistenzentwicklungspotential gegenüber gram-positiven Bakterien.(24)

4.2.5 Pharmakokinetik von Telavancin

Die Pharmakokinetik von Telavancin ist linear im Dosisbereich von 0,25mg/kg bis 15mg/kg, es wird hauptsächlich unverändert über die Niere ausgeschieden. Die Clearance des Antibiotikums hängt von der Nierenfunktion ab, dabei sinkt sie parallel mit der Glomerulären Filtrationsrate. Die durchschnittliche Clearance von Telavancin ist bei Patienten mit moderater und schwerer Nierenfunktionsstörung um 15-30%, bzw. um 35-50% reduziert.(35,36) Das Verteilungsvolumen ist indirekt proportional zur Creatininclearance und somit bei gestörter Nierenfunktion höher. Dieser Umstand erklärt sich auch dadurch, dass diese Patienten zu Ödemen und Wasserretention neigen, welche zu einem Anstieg der Extrazellulärflüsigkeit führt. Bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen wird Telavancin, anders als bei Patienten mit uneingeschränkter Nierenleistung, vorwiegend in hydroxylierter Form ausgeschieden.(35)

Das in der fertigen Formulierung enthaltene Hydroxypropylbetadex steigert das nephrotoxische Potential und kann selbst zu Nierenschäden führen.(30) Die Clearance des Cyclodextrins ist bei milder bis schwerer Nierenfunktionsstörung um 38-82% erniedrigt.(29) Das empfohlene Dosierschema richtet sich deshalb bei Telavancin nach der Nierenfunktion. Bei einer Kreatinin- Clearance > 50ml/min wird eine Dosis von 10mg/kg alle 24 Stunden empfohlen. Sinkt die Kreatinin- Clearance auf 30-50ml/min reduziert sich die Dosis auf 7.5mg/kg, in Patienten mit Kreatinin-

Clearance- Werten von 10-30ml/min sinkt die empfohlene Dosis auf 10mg/kg alle 48 Stunden.(30,35) In Europa ist die Anwendung des Antibiotikums bei einer Kreatinin-Clearance <30 ml/min kontraindiziert.(23) Es wird empfohlen die renale Funktion während der ersten 3-5 Tage nach Therapiestart und 2-3 Tage nach Therapieende zu überwachen.

Der Metabolismus von Telavancin wird nicht beeinflusst von Enzyminhibitoren oder Enzyminduktoren, da es kein Substrat der CYP 450 Familie ist und nur minimal metabolisiert wird. C14- markiertes Telavancin in gesunden männlichen Probanden war zu 76% im Urin detektierbar, 82% davon als unverändertes Telavancin. THRX-651540, ein Oxidationsprodukt der Alkylseitenkette von Telavancin, war der mengenmäßig häufigste, von insgesamt 3 Metaboliten. Alle 3 zusammen machten in etwa 9% des im Urin detektierbaren Telavancins aus.(29,30,37)

Wie bereits beschrieben, weist Telavancin eine sehr hohe Proteinbindungsrate im Plasma auf, diese reicht von 87%, bestimmt in gesunden Patienten mit Nierenfunktionsstörungen (36) bis 95% im Mausplasma.(38) Zum Großteil werden in der Literatur jedoch Werte zwischen 90 und 93% beschrieben. (18,29,30,31) Die Auswirkung der hohen Proteinbindung auf die MIC- Werte gegenüber 50 *Staphylococcen Stämme* war eher gering. Nach Zusatz von 4g/dl Albumin, 50% Humanserum oder 100% Mausserum betrug die Veränderung der MIC 62-70%.(39)

Studien in Mäusen haben gezeigt, dass der pharmakokinetische Parameter der am besten mit der konzentrationsabhängigen, bakteriziden Aktivität von Telavancin korreliert, das Verhältnis zwischen AUC_{24} und MIC ist. Dabei beträgt der Zielwert 219 für Telavancin- empfindliche Organismen. Das bereits genannte Dosierschema führt dabei zum Erreichen dieses Ziels in mehr als 90% der Studienteilnehmer für MIC Werte ≤ 2mg/l.(36,40)

Da Telavancin als Infusion zur Anwendung kommt, liegt die Bioverfügbarkeit bei 100%. Nach Administration von 10mg/kg einmal täglich für 3 Tage in gesunden Erwachsenen liegt die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) bei 116±30 mg/l und die AUC_{24} bei 785±111 mg× h/l. Großer Vorteile von Telavancin gegenüber anderen Antibiotika mit ähnlichen Indikationen sind der lange postantibiotische Effekt von mehr als 4 h sowie gute Penetration in die Lunge und in andere Gewebe, wie anhand Tabelle 3 ersichtlich.(28,41) Das durchschnittliche Verteilungsvolumen ist wie bereits beschrieben eher klein und liegt bei 122±22 ml/kg. Die Halbwertszeit beträgt 7.41 ±1,08 Stunden und die Clearance 13.0±1.9 ml/h/kg.(20)

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter von Telavancin in verschiedenen Kompartimenten (20)

Dose	Administration	Compartment	*N*	C_{max} (mg/L)	AUC_{24} (mg·h/L)	AUC ratio	$t_{½}$ (h)
10 mg/kg	Single, IV	Muscle	8	4.3 ± 1.5	61.5 ± 27.1	0.93 ± 0.60[a,**]	57.0 ± 46.7
10 mg/kg	Single, IV	Subcutis	8	3.8 ± 1.6	57.5 ± 24.3	0.51 ± 0.22[a,**]	24.0 ± 6.3
7.5 mg/kg	od, 3 days, IV	Blister fluid	8	16.0 ± 2.0		0.403[b,*]	6.91 ± 0.53
10 mg/kg	od, 3 days, IV	ELF	5	3.7	45	0.0932[c,*]	

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Chemikalien

Telavancin und humanes Serum wurde von der Universitätsklinik für Klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Wien, zur Verfügung gestellt. Human Albumin (HSA) „CSL Behring“ 20% Infusionslösung wurde von der Firma CSL Behring, Marburg, Deutschland, bezogen. Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma, Wien gekauft und waren von analytischer Reinheit.

5.2 Geräte

- HPLC-Anlage
  - MERCK-HITACHI, Chrommaster 5260, Autosampler (Deutschland)
  - MERCK-HITACHI, Chrommaster 5410, UV-Detektor (Deutschland)
  - MERCK-HITACHI, Chrommaster 5160, Pumpe (Deutschland)
  - MERCK-HITACHI, Chrommaster 5310, Säulenofen (Deutschland)
- pH-Meter, Orion 250A+, Orion Research Inc. (MA, USA)
- Magnetrührer, IKA-Combimag Ret mit Heizung, Janke & Kunkel, IKA Werke (Deutschland)
- Minishaker, Vortex Wizard with infrared Detector, VELP Scientifica (Italien)
- Mikropipette, Eppendorf Research, 100-1000 µl, Eppendorf AG (Deutschland)
- Waage, Satorius, Bauart H51-A1, Satorius Intruments (Deutschland)
- Ultraschallbad, Starsonic 60, PMT (Österreich)
- Zentrifuge, Biofuge 13, Heraeus Instruments GmbH (Deutschland)

5.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Vor Beginn der jeweiligen Experimente wurden folgende Basislösungen hergestellt. Ein Teil der jeweiligen Lösung wurde bei einem pH Wert von 7.4 belassen, der andere Teil mit HCl auf pH 3.0 eingestellt. Zu diesen Basislösungen, bzw. zum Serum wurde anschließend Telavancin (in DMSO gelöst; Konzentration = 2 mg/ml) zugesetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 1, 5 oder 20 µg/ml Telavancin ergab.

Lösung	Albuminlösung (HSA) (ml)	Phosphate buffered saline (PBS) (ml)
0 % HSA	x	10 ml
4% HSA	2	8
8 %HSA	4	6
12 % HSA	8	2

Zur Abtrennung von proteingebundenem Telavancin aus den Lösungen wurden Microcon®-10 Zentrifugenfilter mit einer Ultracel®-Membran aus regenerierter Cellulose; MWCO 10 kDa (Fa Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Cork) und Centrifree® mit einer Ultracel®-Membran aus regenerierter Cellulose; MWCO 30 kDa (Fa Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Cork) verwendet. Je nach Experiment wurden die Zentrifugenfilter mit je 300 µl proteinfreier Telavancin-Lösung mehrmals vorbehandelt, um die Membran mit Wirkstoff zu sättigen. Hierbei wurde bei der vom Hersteller empfohlenen Umdrehungszahl (13 500 g – Microcon, bzw. 3 500 g – Centrifree) bis zur Trockenen der Membran zentrifugiert und die Zentrifugate quantitativ abgenommen. Nach dem Vorkonditionieren der Membranen wurde

Telavancin in HSA-hältiger Lösung, bzw. Serum aufgetragen und erneut zentrifugiert. Die proteinfreien Zentrifugate wurden unmittelbar vor der HPLC-Analyse in einem Verhältnis 1:1 mit Eluent A, der mit Phosphorsäure (Endkonzentration = 0,1%) versetzt wurde, verdünnt.

5.4 HPLC-Analyse

Um die Telavancin-Konzentration in den Zentrifugaten zu bestimmen, wurde ein neues und selektives HPLC-System erstellt. Die Trennung aus den unterschiedlichen Matrices erfolgte auf einer Hypersil BDS-C_{18} Säule; 5 µm, 250 x 4.6 mm I.D. (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) ausgerüstet mit einer Vorsäule (Hypersil BDS-C_{18}; 5 µm, 10 x 4.6mm I.D), termperiert auf 45℃. Telavancin wurde bei einer Wellenlänge von 230 nm detektiert.

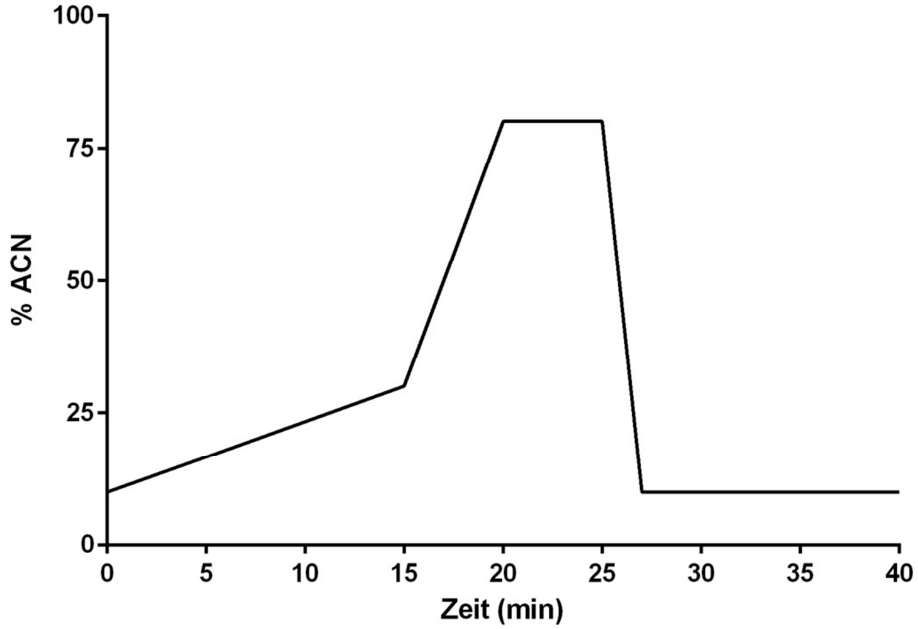

Abbildung 9: Gradientenverlauf für die HPLC Analyse von Telavancin

Das Verhältnis Eluent A (50 mM Phosphatpuffer+ 1 g/L Heptansulfonsäure (pH3) + 10% Acetonitril) zu Eluent B (Acetonitril; ACN) wurde entlang eines zeitlichen Gradienten verändert (flow rate = 1 ml/min) (Abbildung 9). Innerhalb von 15 Minuten wurde der Anteil an ACN von 10 auf 30% gesteigert und anschließend innerhalb von 5 Minuten weiter auf 80% erhöht, um lipophile Verunreinigungen von der Säule zu spülen. Dieses Mischungsverhältnis wurde für 5 Minuten beibehalten. Um ein Equlibrieren der Säule zu ermöglichen, wurden innerhalb von 2 Minuten wieder die Ausgangsbedingungen hergestellt Zur Bestimmung der Retentionszeit wurden Standardlösungen von Telavancin (Konzentration: 5 µg/ml) analysiert. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde Telavancin mit einer Retentionszeit von 17,5 min (Abbildung 10) störungsfrei eluiert. In den untersuchten Proben konnten ebenfalls keine störenden Peaks beobachtet werden (Abbildung 11, Abbildung 12).

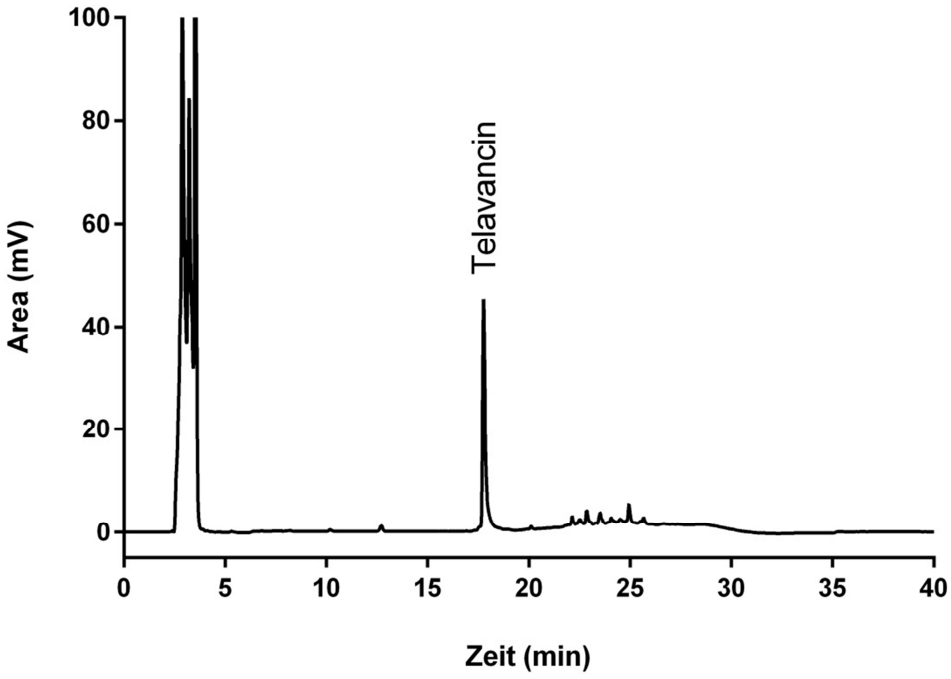

Abbildung 10: Chromatogramm einer Telavancin-Lösung (5 µg/ml) in PBS.

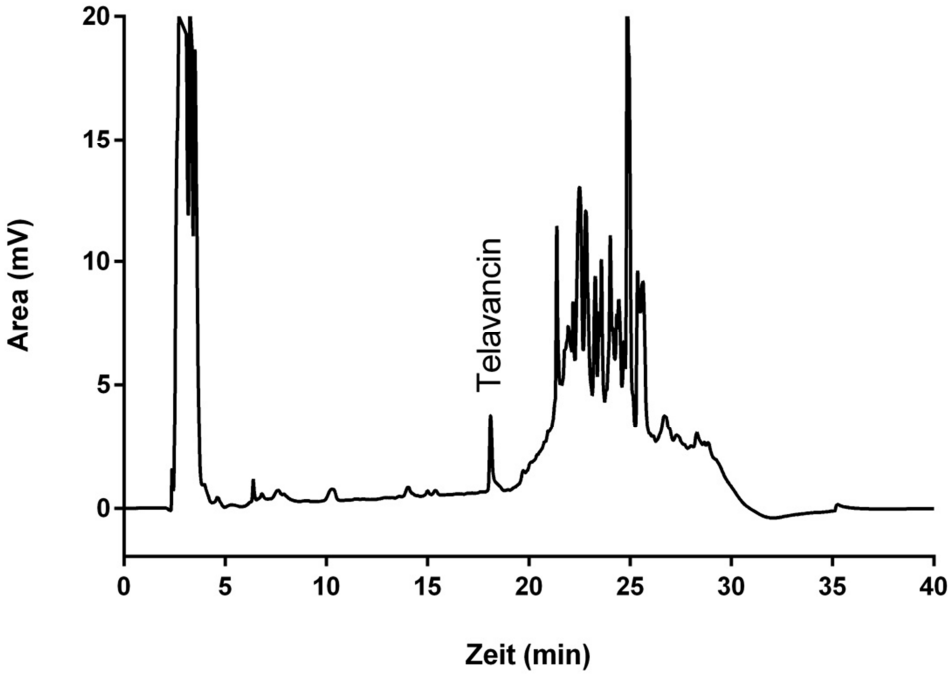

Abbildung 11: Chromatogramm eines Zentrifugates gewonnen aus einer Serumprobe (5µg/ml Telavancin)

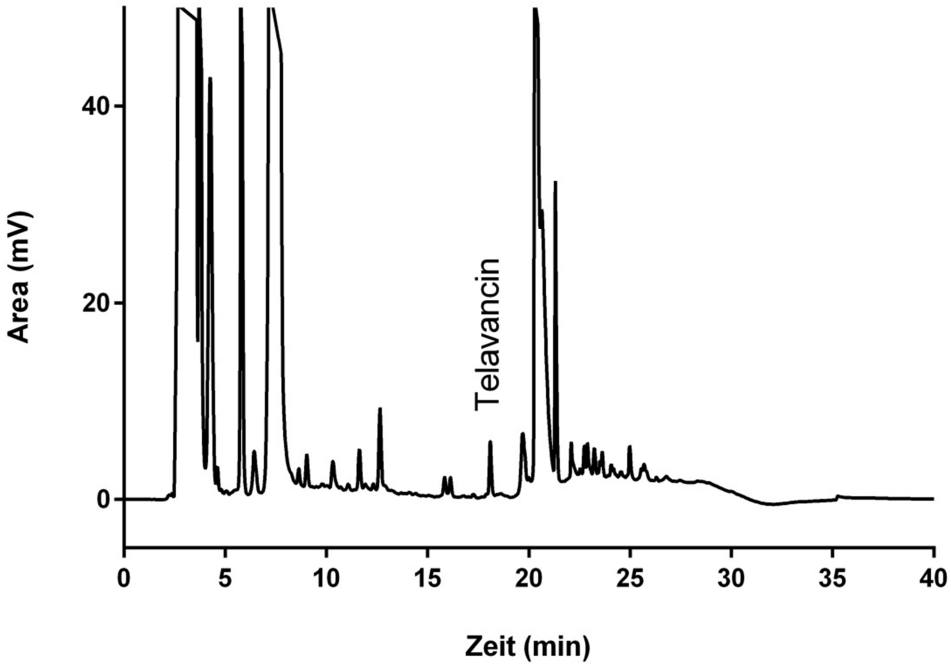

Abbildung 12: Chromatogramm eines Zentrifugates gewonnen aus einer HSA-hältigen PBS-Lösung (5µg/ml Telavancin)

5.5 Auswertung der Daten

Der Gehalt an Telavancin in den Proben wurde mittels externer Kalibrierung ermittelt. Dazu wurden Standardlösungen mit folgenden Telavancin-Konzentrationen mittels HPLC analysiert: 0.05 µg/ml, 0.10 µg/ml, 0.50 µg/ml, 1.00 µg/ml, 5.00 µg/ml, 10.00 µg/ml und 20.00 µg/ml und die Kalibiergeraden unter Verwendung des Computer-Programms Prism 6.00 (GraphPad Software Inc. CA, USA) erstellt. Abbildung 13 zeigt die Korrelation zwischen den gemessenen Peakflächen und der Konzentrationen von Telavancin.

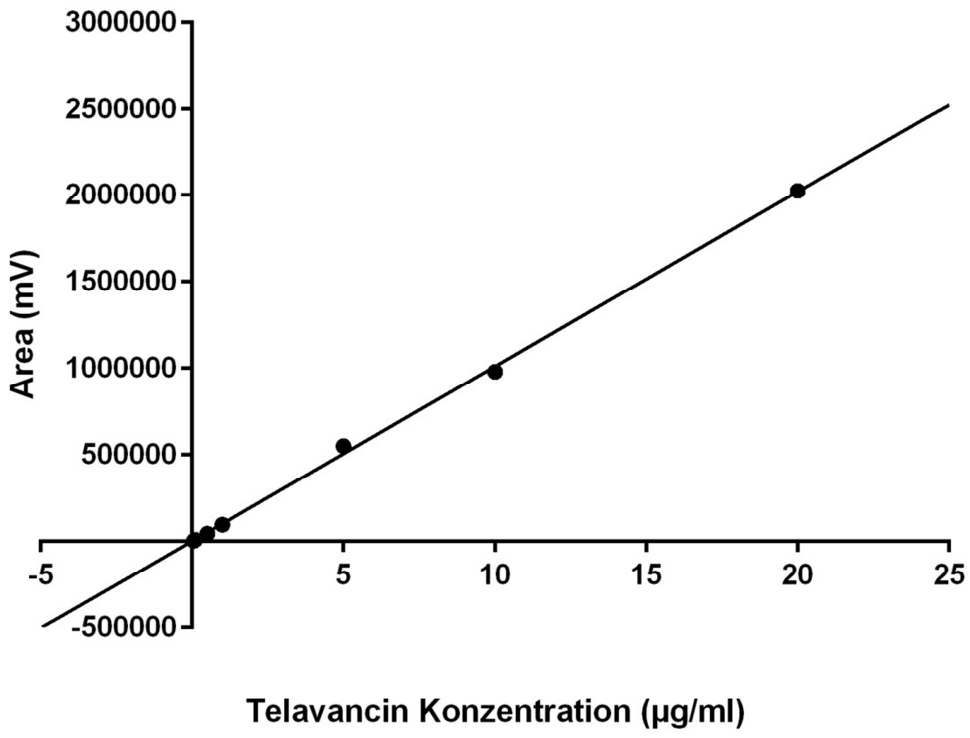

Abbildung 13: Eichkurve für Telavancin

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In dieser Diplomarbeit wurde die Plasmaproteinbindung von Telavancin in Serumproben und in PBS-Lösungen mit unterschiedlichen Albuminkonzentrationen, bei verschiedenen pH-Werten mittels Ultrafiltration bestimmt. Es wurden 2 unterschiedliche Membranfilterarten verwendet, davon wurde eine mit den reinen Telavancinlösungen vorkonditioniert. Ziel der Arbeit war es darzustellen, welche Auswirkungen bereits kleine Modifizierungen im Versuchsablauf (in Bezug auf Vorkonditionierung, pH-Wert, etc.) auf die Plasmaproteinbindung haben. Die Ergebnisse der einzelnen Durchläufe wurden dazu miteinander verglichen und im folgenden Kapitel diskutiert.

6.1 Bestimmung der unspezifischen Bindung von Telavancin

Im ersten Schritt wurde die unspezifische Bindung von Telavancin an das Material der Gefäße und der Membran bestimmt. Hierzu wurden je 300 µl der jeweiligen Telavancin-Lösung (1 µg/ml und 20 µg/ml in proteinfreiem PBS) auf Microcon®-10 Zentrifugenfilter mit einer Ultracel®-Membran aus regenerierter Cellulose (molecular weigth cut off = 10 kDa) aufgetragen und bei 13 500 x bis zur Trockenen zentrifugiert. Die Zentrifugate wurden mit Eluent A (+ 0.1% Phosphorsäure) verdünnt und analysiert.

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, ist die unspezifische Bindung von Telavancin an das verwendete Material bei pH 7.4 prinzipiell relativ hoch. Von der 1 µg/ml-Telavancin- Lösung wurden in allen 5 Durchläufen der Vorkonditionierung rund 85% des Telavancins gebunden. Im ersten Vorkonditionierungsschritt lag die Bindung bei 85.15 ± 1.56%, danach bei 87.85 ± 0.88%, 87.47 ± 1.25%, 87.46 ± 1.71% und im letzten Durchlauf bei 86 ± 1.87%. Eine Abnahme der unspezifischen Bindung war in

diesem Konzentrationsbereich also nicht festzustellen. Anders verhielt es sich bei der Telavancinlösung mit der Konzentration von 20 µg/ml. Hier wurden bei der ersten Vorkonditionierung 97 ± 0.36% des Telavancins gebunden. Im zweiten Durchgang sank der gebundene Prozentsatz auf 81.53 ± 0.88%. Auch in den 3 weiteren Schritten war eine Abnahme der unspezifischen Bindung, auf 69.76 ± 1.57%, 61.92 ± 0,76% und zuletzt auf 53.96 ± 1.83% zu beobachten.

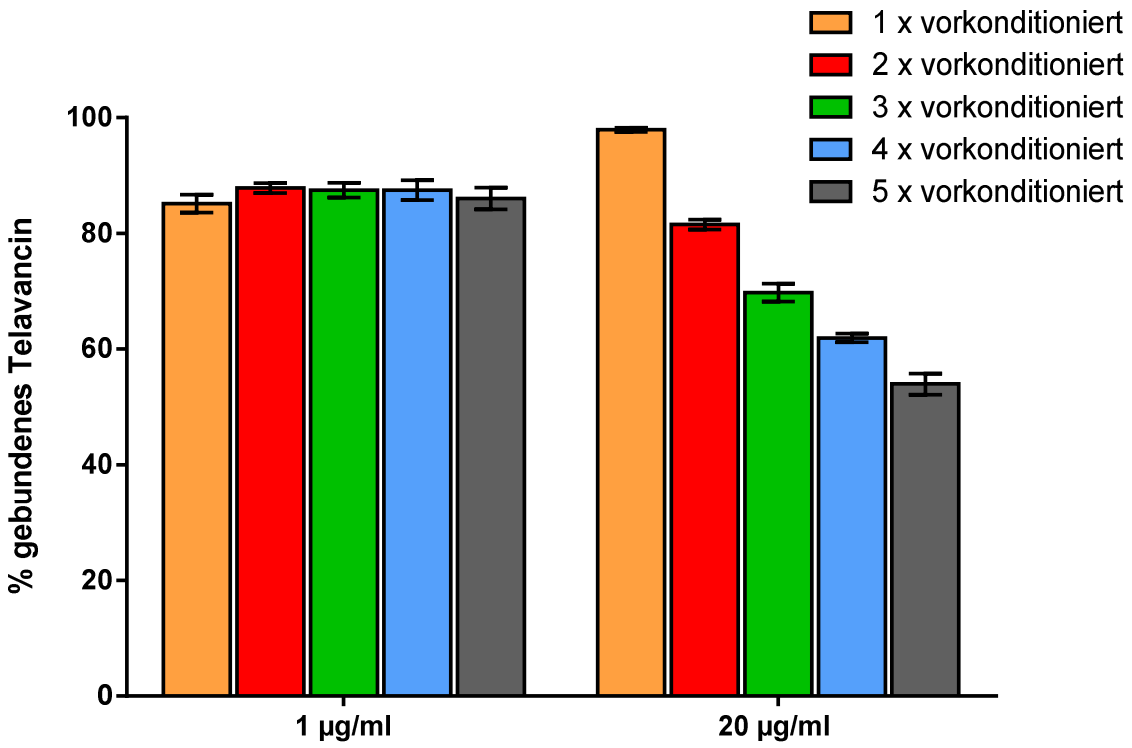

Abbildung 14: Unspezifische Bindung von Telavancin (gelöst in PBS) bei pH 7.4 an Microcon® Zentrifugenfilter.

Dieser Versuchsablauf wurde noch einmal wiederholt, diesmal bei pH-Wert 6. Hier lag die unspezifische Bindung von Telavancin 1 µg/ml in allen 5 Durchgängen sogar bei über 90%, wie in Abbildung 15 zu erkennen. Die genauen Werte der 5 Vorkonditionierungsdurchläufe waren 92.60 ± 2.33%, 93.80 ± 0,79%, 94.34 ± 1.66%, 92.46 ± 0.98% und 91.84 ± 3.27%. Auch bei der 20 µg/m Telavancin Lösung ist der

Prozentsatz an Telavancin, der bei der Vorkonditionierung gebunden wurde, bei pH 6 durchgehend höher als bei pH 7.4. Im ersten Durchlauf wurden 97.90 ± 0.36% des Antibiotikums gebunden. Danach nahm die unspezifische Bindung, wie bereits im ersten Versuchsaufbau, mit jeder Wiederholung ab und lag ab der zweiten Vorkonditionierung bei 89.59 ± 0.89%, 71.78 ± 2.09%, 68.47 ± 0.97% und zuletzt bei 64.63 ±1.67%.

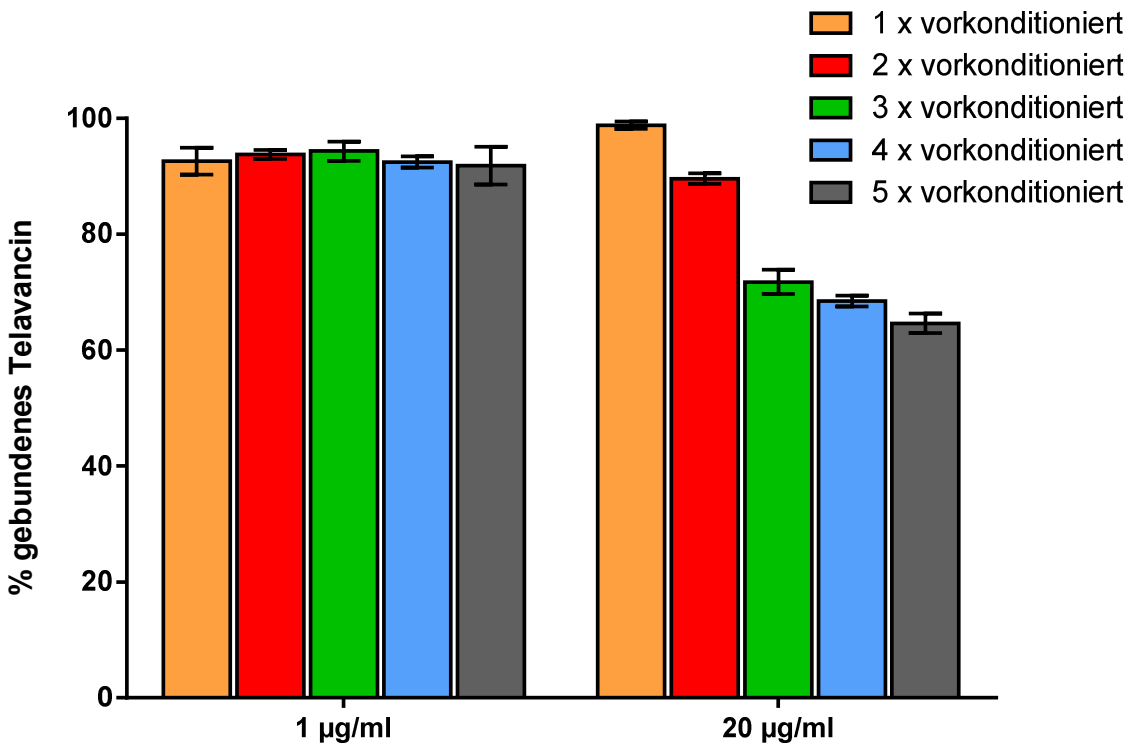

Abbildung 15: Unspezifische Bindung von Telavancin (gelöst in PBS) bei pH 6.0 an Microcon® Zentrifugenfilter.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Konzentration von 1 µg/ml Telavancin zu niedrig war, um die vorhandenen Bindungsstellen an der Membran des Zentrifugenfilters abzusättigen. Aus diesem Grund wurde durchgehend ein hoher Prozentsatz des Antibiotikums, unabhängig vom pH- Wert, gebunden. Bei der 20 µg/ml Lösung konnte man am Ende der Vorkonditionierung eine deutliche Abnahme

der unspezifischen Bindung feststellen, vor allem beim pH- Wert von 7.4 sank sie zuletzt auf knapp 54%, während sie beim pH-Wert 6.0 auf ca. 65% sank. Aufgrund dieser Werte ist anzunehmen, dass der niedrigere pH- Wert die unspezifische Bindung eher begünstigt.

Aus der Literatur geht hervor, dass diese hohe unspezifische Bindung an das Versuchsmaterial eine Gemeinsamkeit der Vertreter der Lipoglycolipide, Dalbavancin, Oritavancin und Telavancin ist. Alle 3 zeigen in in-vitro Versuchen eine hohe Affinität für Plastikoberflächen.(42) Für Oritavancin fand man heraus, dass diese Bindung durch Zugabe von 0.002% Polysorbat 80 oder 2% lysiertes Pferdeblut in die Versuchslösungen minimiert wird. Durch diesen Zusatz, konnte die Wiederfindungsrate der eingesetzten Antibiotikamenge in Empfindlichkeitsprüfungen stark gesteigert werden und betrug nach 24 Stunden 80-100%.(43)

Der hohe Verlust an Antibiotika durch diese Adsorption, spiegelte sich auch in den MIC- Werten der Lipoglycolipide wieder. Deshalb wurde die Mikrodilutionstechnik für Telavancin zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration überarbeitet. Seit 2014 ist vorgesehen, dass dabei Dimethylsulfoxid (DMSO), mit Zusatz von 0.002% Polysorbat 80, als Lösungsmittel für die Stammlösungen verwendet wird. Diese neue Vorgehensweise resultierte, wie bereits in einem anderen Kapitel erwähnt, in wesentlich geringeren MIC- Werten. Ähnliche überarbeitete Vorschriften gibt es auch für Dalbavancin und Oritavancin.(24,42)

Das Problem der hohen unspezifischen Bindung betrifft dabei jedoch nicht nur in-vitro Bestimmungen. Auch bei der Anwendung von Telavancin in Krankenhäusern ist die hohe Affinität an Plastikoberflächen nicht zu vernachlässigen. Falsches Material könnte zu einem Verlust an bioverfügbaren Telavancin führen. In einer in vivo Mikrodialysestudie zur Bestimmung der Gewebekonzentration wurde zu den

Kalribrations- und Perfusionslösungen 1%Albumin zugefügt um das Problem der unspezifischen Bindung so klein wie möglich zu halten.(14) Ob, und in welchem Ausmaß diese hohe Adsorption der Lipoglycolipide tatsächlich Auswirkungen auf die Anwendung im Krankenhaus haben kann, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

6.2 Bestimmung der Proteinbindung von Telavancin in HSA-hältigen PBS-Lösungen

Zur Bestimmung der Proteinbindung wurden auf vorbehandelte Microcon®-10 Zentrifugenfilter je 300 µl Telavancin-hältige (1 µg/ml, bzw. 20 µg/ml) PBS-Lösungen mit 4, 8 oder 12 % HSA-Gehalt aufgetragen, zentrifugiert und die Zentrifugate, wie oben beschrieben und auf freies Telavancin untersucht.

1 µg/ml wurde so stark gebunden, dass der freie Anteil unter der Nachweisgrenze lag. Dieser Umstand muss nicht ausschließlich durch die Bindung an HSA bedingt sein. Da bei der fünften Wiederholung der Vorkonditionierung bei dieser Konzentration immer noch 86.03% bei pH 7.4, bzw 91.84% bei pH6 von Telavancin gebunden wurden, könnte noch ein weiterer Anteil des Antibiotikums an den Filtrationsmembranen verlorengegangen sein, da nicht alle unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt waren.

Mit 4% HSA gab es bei pH 7.4 mit der 20 µg/ml Telavancinlösung eine Plasmaproteinbindungsrate von 74.61 ± 3.08%, mit 8% bzw. 12% HSA war die Proteinbindung beinahe identisch und lag bei 86.86 ± 1.09% und 86.67 ± 2.11%.

Bei pH 6 war hingegen eine durchgehende Steigung der Plasmaproteinbindung mit steigender Albuminkonzentration zu beobachten. Mit 4% HSA lag die Bindung bei

80.39 ± 1.68%, mit 8% bei 86.85 ± 0.31% und mit 12% HSA bei 89.91 ± 1.90%, wie aus Abbildung 16 zu erkennen. Interessant hierbei wäre eventuell der Vergleich mit einer vierten höher konzentrierten HSA-Konzentration, um zu sehen ob die Bindungsrate bei pH 7.4 dennoch gleichbleibend ist, und ob es eine weitere Steigung bei pH 6.0 gibt.

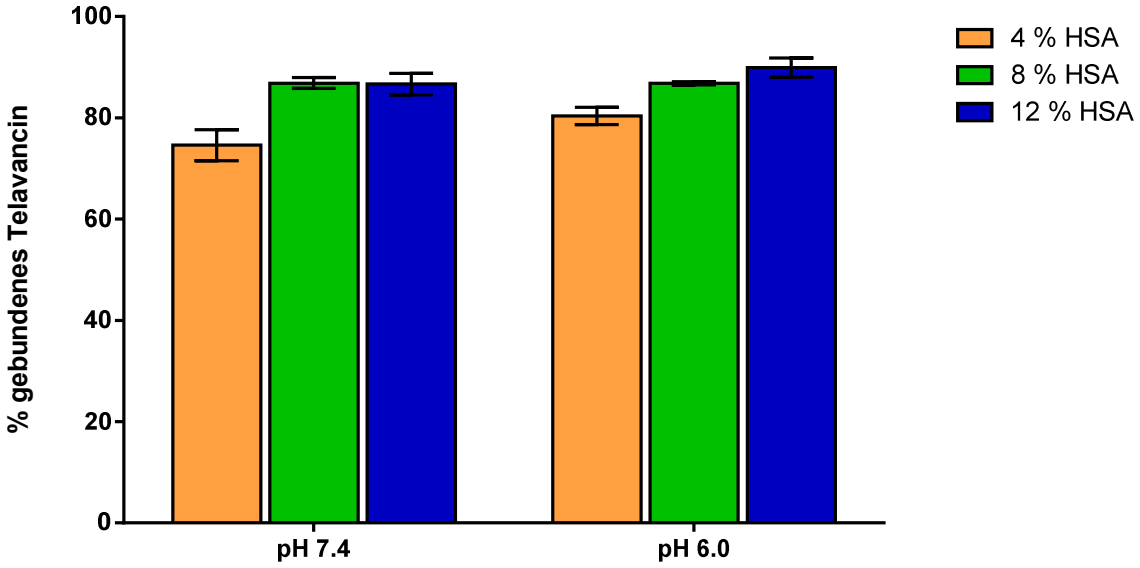

Abbildung 16: Bindung von Telavancin(20 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Microcon®- Zentrifugenfilter

Der Einfluss des pH- Wertes ist bei der Bindung von Telavancin an Albumin scheinbar geringer, als bei unspezifischen Bindung von Telavancin an den Zentrifugenfilter. Dort lag der Unterschied des Bindungsausmaßes zwischen Antibiotikum und Filtermaterial bei den unterschiedlichen pH- Werten bei rund 10%. Daher liegt die Annahme nahe, dass der pH- Wert die unspezifische Bindung in größerem Ausmaß beeinflusst als die Bindung an Albumin.

Prinzipiell ist jedoch festzuhalten, dass die bestimmten Proteinbindungswerte allesamt niedriger sind, als in der Literatur beschrieben. In den meisten

wissenschaftlichen Arbeiten finden sich Plasmaproteinbindungswerte von >90%, jedoch meist leider keine Angaben darüber, welche Bestimmungsart gewählt wurde und ob es eine Vorkonditionierung des verwendeten Materials gab. (18,29,30,31,41)

In einer österreichischen Studie wurde die Proteinbindung und Gewebekonzentrationen in vivo mit Mikrodialyse bestimmt.(14) Hier lag die Plasmaproteinbindung im Bereich zwischen 75.2% und 86.8%, also weit unter der häufig genannten 90% Grenze. Diese Werte legen die Annahme nahe, dass die bisherigen in-vitro Plasmaproteinbindungsbestimmungen den ungebundenen, wirksamen Anteil von Telavancin deutlich unterschätzen.

Analog zu der Versuchsreihe in den Microcon® Zentrifugenfiltern wurde die Bindung von Telavancin an humanes Albumin auch in Centrifree® Zentrifugenfiltern (MWCO = 60 kDa) untersucht. Hier wurden die Membranen allerdings nicht vorgesättigt. Die erhaltenen Proteinbindungswerte für die 20 µg/ml Telavancinlösung lagen bei pH 6 mit 4% HSA bei 92.40 ± 0.46%, mit 8% HSA bei 95.15 ± 0.15% und mit 12% HSA bei 99.09 ± 0.20%. Der pH- Einfluss auf die Ergebnisse war hier eher gering, die Werte bei pH 7.4 lagen bei 91.25 ± 1.69% mit 4% Albumin, 93.03 ± 1.06% mit 8% Albumin und 98.98 ± 0.07 % mit 12% Albumin.

Die Porengröße der Centrifree® Zentrifugenfilter ist deutlich größer als die der Microcon® Filter (MWCO = 10 kDa vs. MWCO = 60 kDa). Größere Poren verstopfen nicht so schnell und der ungebundene Anteil an Telavancin sollte den Filter schneller und leichter passieren. Trotzdem liegen die Werte deutlich über den Ergebnissen, die mit den Microcon® Filtern erhalten wurden, siehe Abbildung 17.

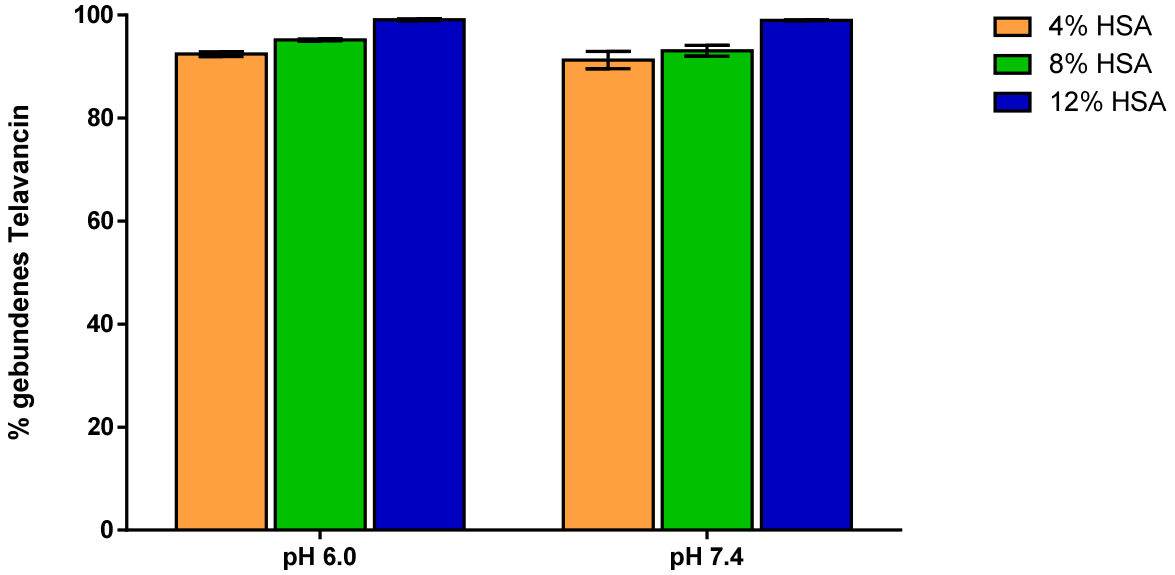

Abbildung 17: Bindung von Telavancin (20 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Centrifree®- Zentrifugenfilter

Dieser Umstand unterstreicht die Bedeutung der Vorkonditionierung und macht deutlich, welchen Einfluss die unspezifische Bindung auf die erhaltenen Werte hat.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Telavancinkonzentration 5 µg/ml mit den Centrifree® Filtern erhalten, grafisch dargestellt in Abbildung 18. Auch hier waren die Unterschiede der Plasmaproteinbindung zwischen den beiden pH- Werten nur minimal. Mit 4% HSA gab es bei pH 6 eine Bindungsrate von 94.94 ± 0.23%, mit 8% HSA 95.67 ±0.17% und mit 12% HSA sogar 99.50 ± 0.04%. Sehr ähnlich waren auch die Werte bei pH 7.4. Mit 4% HSA lag sie bei 94.23 ± 0.47%, mit 8% bei 94.91 ± 0.72% und mit 12% bei 98.59 ± 0.06%. Die pH- Wert- Änderung scheint die Bindungsraten in diesen Versuchen nicht zu beeinflussen.

Prinzipiell stimmen die aus dem Versuch erhaltenen Werte mit den Centrifree® Zentrifugenfiltern besser mit den in der Literatur erwähnten Werten, von über 90%,

überein als die Ergebnisse aus dem Versuch mit vorkonditionierten Microcon® Zentrifugenfiltern.

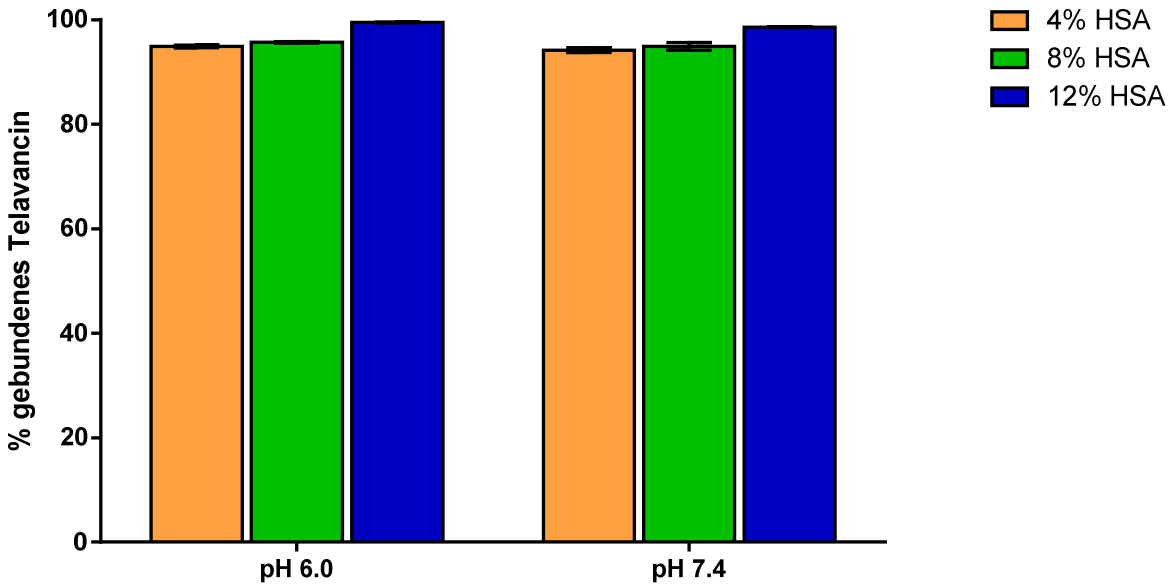

Abbildung 18: Bindung von Telavancin (5 µg/ml) an humanes Serum Albumin (HSA) in Centrifree®- Zentrifugenfilter

Leider gibt es, wie bereits erwähnt, in den meisten Fällen keine genaue Angabe über die Bestimmung der Plasmaproteinbindung, eventuell wurde in manchen Fällen die unspezifische Bindung von Telavancin dabei unterschätzt

6.3 Bestimmung der Proteinbindung von Telavancin in humanem Serum

Zuletzt wurden die Versuche mit den unterschiedlichen Membranfiltern auch mit humanem Serum durchgeführt. Hierzu ist zu sagen, dass humane Plasmaproben eine weitaus größere Variabilität in Hinsicht auf Matrixeffekte zeigen. Das bedeutet, weitere Probenbestandteile können einen Einfluss auf die Messung des Analyten haben. Häufige Gründe für diese Matrixeffekte sind dabei zum Beispiel bestimmte

Co-Medikationen oder Ernährungseinflüsse.(8) Die Versuche wurden mit Konzentrationen von 20 µg/ml und 5 µg/ml Telavancin durchgeführt.

In Abbildung 19 sieht man den direkten Vergleich der erhaltenen Plasmaproteinbindungsraten mit verschiedenen Zentrifugenfiltern. Auch hier ist die Plasmaproteinbindung an den vorkonditionierten Microcon®- Filtern scheinbar niedriger und liegt bei 77.84 ± 0.69%. Im Vergleich dazu liegt der Wert mit den Centrifree®- Filtern bei 93.22 ± 0.404%, trotz größerer Porenweite.

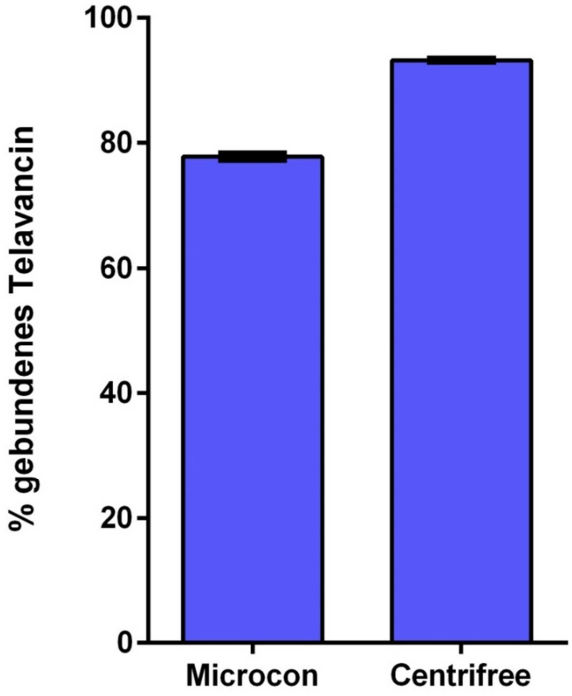

Abbildung 19: Vergleich der Bindung von Telavancin (20 µg/ml) an humanes Serum in Microcon® und Centrifree®- Zentrifugenfilter

Der Wert von 77.84% der Microconfilter passt auch zu den Ergebnissen der erwähnten Mikrodialysestudie, bei der die Plasmaproteinbindung von Telavancin zum ersten Mal direkt in vivo im Patienten gemessen wurde.(14) Dieses Ergebnis spricht

wiederum für eine Unterschätzung des Anteils an freiem Telavancin in der bisherigen wissenschaftlichen Literatur über dieses Antibiotikum.

In Abbildung 20 ist zu guter Letzt noch der Vergleich der Plasmaproteinbindung der 5 µg/ml und 20 µg/ml Telavancinlösungen im humanem Serum, analysiert mit Centrifree®- Zentrifugenfiltern, zu sehen. Das Bindungsausmaß beträgt bei der Konzentration von 5 µg/ml Telavancin 94.40 ± 0.08%, der Wert für die 20 µg/ml Lösung liegt bei 93.22 ± 0.40%, also nur etwas niedriger. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die unspezifische Bindung einen großen Anteil der hohen Bindungswerte ausmacht.

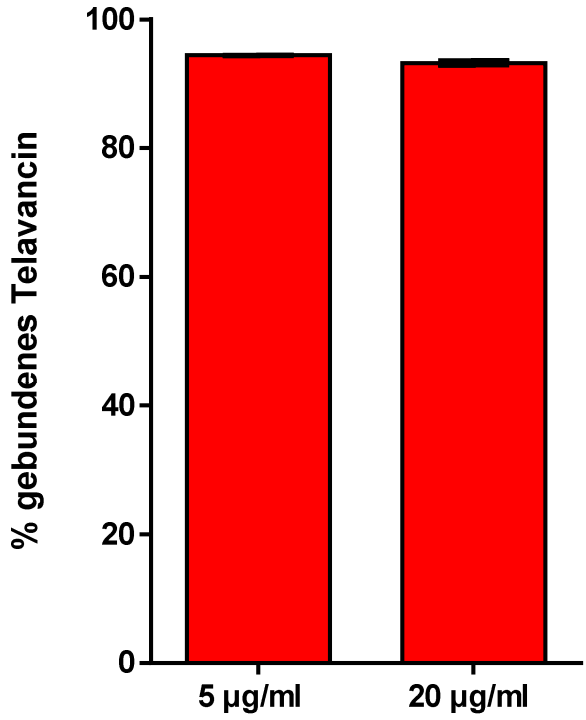

Abbildung 20: Bindung von Telavancin an humanes Serum in Centrifree®- Zentrifugenfilter

Alles in Allem deuten die Ergebnisse dieser Diplomarbeit auf eine Unterschätzung des freien Anteils von Telavancin in Plasmaproteinbindungsassays

hin, die eventuell durch Vernachlässigung der unspezifischen Bindung zustande kommt. Eventuell wäre es bei Arzneistoffen mit hoher unspezifischer Bindung an das Versuchsmaterial sinnvoll, allgemein gültige Guidelines für Proteinbindungsstudien aufzustellen. In der MIC- Evaluierung wurden die Richtlinien zur Bestimmung der MIC bereits aktualisiert, um dort die unspezifische Bindung zu minimieren und die Löslichkeit zu verbessern.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1 Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Menzel, S. and Ruth, P. (2012). *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie, Klinishe Pharmakologie, Toxikologie.* 10th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, pp. 19-20,40-42,464.

2 Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. Int J Mol Sci. 2014 Feb 27;15(3): 3580-95.

3 Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig WA, Andes D, Theuretzbacher U. Protein binding: do we ever learn? Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3067-74.

4 Bohnert T, Gan LS. Plasma protein binding: from discovery to development. J Pharm Sci. 2013 Sep;102(9):2953-94.

5 Pschyrembel, W. (2004). *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch.* 260th ed. Berlin: Walter de Gruyter, pp. 394-395, 703-704, 1275-1281.

6 Abbildung abgerufen am 17.05.2018 von https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/mass-spectrometry/protein-aqua/absolute-quantification-of-serum-proteome.html

7 Derendorf H., Gramatté T., Schäfer H. (2002) Pharmakokinetik- Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie 2nd ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, pp. 156-157.

8 Buscher B, Laakso S, Mascher H, Pusecker K, Doig M, Dillen L, Wagner-Redeker W, Pfeifer T, Delrat P, Timmerman P. Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum. Bioanalysis. 2014 Mar;6(5):673-82.

9 Abbildung abgerufen am 17.05.2018 von: https://bioduro.com/adme-plasma-protein-binding-assay/

10 Abbildung abgerufen am 17.05.2018 von: https://greendotbd.com/article/about-ultrafiltration-uf/#

11 Brockman AH, Oller HR, Moreau B, Kriksciukaite K, Bilodeau MT. Simple method provides resolution of albumin, lipoprotein, free fraction, and chylomicron to enhance the utility of protein binding assays. J Med Chem. 2015 Feb 12;58(3):1420-5.

12 Plock N, Kloft C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. Eur J Pharm Sci. 2005 May;25(1):1-24.

13 Müller M, dela Peña A, Derendorf H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Distribution in Tissue. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(5):1441-1453.

14 Matzneller P, Österreicher Z, Reiter B, Lackner E, Stimpfl T, Zeitlinger M. Tissue pharmacokinetics of telavancin in healthy volunteers: a microdialysis study. J Antimicrob Chemother. 2016 Nov;71(11):3179-3184.

15 Corey GR, Stryjewski ME, Weyenberg W, Yasothan U, Kirkpatrick P. Telavancin. Nat Rev Drug Discov. 2009 Dec;8(12):929-30.

16 Roth H. J., Fenner H. (2000) Arzneistoffe Sturktur- Bioreaktivität-Wirkungsbezogene Eigenschaften 3rd ed. Stuttgart. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, pp. 35-37.

17 Leadbetter MR, Adams SM, Bazzini B, Fatheree PR, Karr DE, Krause KM, Lam BM, Linsell MS, Nodwell MB, Pace JL, Quast K, Shaw JP, Soriano E, Trapp SG, Villena JD, Wu TX, Christensen BG, Judice JK. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). J Antibiot. 2004 May;57(5):326-36.

18 Das B, Sarkar C, Das D, Gupta A, Kalra A, Sahni S. Telavancin: a novel semisynthetic lipoglycopeptide agent to counter the challenge of resistant Gram-positive pathogens. Ther Adv Infect Dis. 2017 Mar;4(2):49-73.

19 Higgins DL, Chang R, Debabov DV, Leung J, Wu T, Krause KM, Sandvik E, Hubbard JM, Kaniga K, Schmidt DE Jr, Gao Q, Cass RT, Karr DE, Benton BM, Humphrey PP. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Mar;49(3):1127-34.

20 Al Jalali V, Zeitlinger M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Telavancin Compared with the Other Glycopeptides. Clin Pharmacokinet. 2018 Jan 13.

21 Pubchem, FDA Medication Guide abgerufen am 19.03.2018: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Telavancin#section=Chemical-and-Physical-Properties

22 Gu Z, Parra C, Wong A, Nguyen A, Cheung R, Catalano T. Post-reconstitution Stability of Telavancin with Commonly Used Diluents and Intravenous Infusion Solutions. Curr Ther Res Clin Exp. 2015 Nov 5;77:105-10.

23 Europäische Kommission- public health abgerufen am 19.03.2018: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160526134749/anx_134749_de.pdf

24 Karlowsky JA, Nichol K, Zhanel GG. Telavancin: mechanisms of action, in vitro activity, and mechanisms of resistance. Clin Infect Dis. 2015 Sep 15;61 Suppl 2:58-68.

25 Lunde CS, Hartouni SR, Janc JW, Mammen M, Humphrey PP, Benton BM. Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor lipid II. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Aug;53(8):3375-83.

26 Lunde CS, Rexer CH, Hartouni SR, Axt S, Benton BM. Fluorescence microscopy demonstrates enhanced targeting of telavancin to the division septum of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May;54(5):2198-200.

27 Adamantia L, Antoni T. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and clinical efficacy of telavancin in the treatment of pneumonia. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2016 Jul;12(7):803-12.

28 Corey GR, Rubinstein E, Stryjewski ME, Bassetti M, Barriere SL. Potential role for telavancin in bacteremic infections due to gram-positive pathogens: focus on Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2015 Mar 1;60(5):787-96.

29 Nnedu ON, Pankey GA. Update on the emerging role of telavancin in hospital-acquired infections. Ther Clin Risk Manag. 2015 Apr 13;11:605-10.

30 Lyseng-Williamson KA, Blick SK. Telavancin. Drugs. 2009;69(18):2607-20.

31 Masterton R, Cornaglia G, Courvalin P, Lode HM, Rello J, Torres A. The clinical positioning of telavancin in Europe. Int J Antimicrob Agents. 2015 Mar;45(3):213-20.

32 Reyes N, Skinner R, Benton BM, Krause KM, Shelton J, Obedencio GP, Hegde SS. Efficacy of telavancin in a murine model of bacteraemia induced by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 2006 Aug;58(2):462-5.

33 Abdelhady W, Bayer AS, Gonzales R, Li L, Xiong YQ. Telavancin Is Active against Experimental Aortic Valve Endocarditis Caused by Daptomycin- and Methicillin-

Resistant Staphylococcus aureus Strains. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jan 24;61(2). pii: e01877-16.

34 Vibativ.com abgerufen am 19.03.2018:
https://www.vibativ.com/public/pdf/PrescribingInformation.pdf

35 Worboys PD, Wong SL, Barriere SL. Pharmacokinetics of intravenous telavancin in healthy subjects with varying degrees of renal impairment. Eur J Clin Pharmacol. 2015 Jun;71(6):707-714.

36 Samara E, Shaw JP, Barriere SL, Wong SL, Worboys P. Population pharmacokinetics of telavancin in healthy subjects and patients with infections. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr;56(4):2067-73.

37 Yim J, Smith JR, Barber KE, Hallesy JA, Rybak MJ. Evaluation of Pharmacodynamic Interactions Between Telavancin and Aztreonam or Piperacillin/Tazobactam Against Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Infect Dis Ther. 2016 Sep;5(3):367-77.

38 Hegde SS, Reyes N, Wiens T, Vanasse N, Skinner R, McCullough J, Kaniga K, Pace J, Thomas R, Shaw JP, Obedencio G, Judice JK. Pharmacodynamics of telavancin (TD-6424), a novel bactericidal agent, against gram-positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Aug;48(8):3043-50.

39 Tsuji BT, Leonard SN, Rhomberg PR, Jones RN, Rybak MJ. Evaluation of daptomycin, telavancin, teicoplanin, and vancomycin activity in the presence of albumin or serum. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Apr;60(4):441-4.

40 Lodise TP, Butterfield JM, Hegde SS, Samara E, Barriere SL. Telavancin pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with complicated skin and skin structure infections and various degrees of renal function. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr;56(4):2062-6.

41 Sun HK, Duchin K, Nightingale CH, Shaw JP, Seroogy J, Nicolau DP. Tissue penetration of telavancin after intravenous administration in healthy subjects. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Feb;50(2):788-90.

42 Farrell DJ, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. Revised reference broth microdilution method for testing telavancin: effect on MIC results and correlation with other testing methodologies. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5547-51.

43 Arhin FF, Sarmiento I, Belley A, McKay GA, Draghi DC, Grover P, Sahm DF, Parr TR Jr, Moeck G. Effect of polysorbate 80 on oritavancin binding to plastic surfaces:

implications for susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2008 May;52(5):1597-603.