

Klassische therapeutische Konzepte- alternative Ansätze und deren Grenzen

Wolfgang Bäumer

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Klassische therapeutische Konzepte

Behandlung bakterieller Erkrankungen → für deren Therapie antibakteriell wirksame Arzneimittel seit den 1930er Jahren im Einsatz

Als alternativen Ansatz → Behandlung mit Bakteriophagen und deren Grenzen

Einige wichtige Begriffe vorweg

AUC: Area under the curve, Plasmakonzentrationskurve über einen spezifischen Zeitraum

MHK: Minimale Hemmkonzentration von Antibiotika gegen spezifischen Erreger. Häufig mit dem Mikrodilutionstest erhoben (in Nährbouillon)

AUIC: Area under the inhibitory curve: AUC/MHK → prädiktiver Wert für Wirksamkeit von z.B. Fluorchinolonen

Probability of target attainment: die wahrscheinliche Erfolgsrate (Erregereliminierung) bei einer definierten Dosierung/Konzentration eines Antibiotikums

Begriffsbestimmungen

Cut-off versus breakpoint

Verteilung der MHK bei den Bakterien ohne einen Resistenzmechanismus = Verteilung bei Wildtypstämmen “wild type distribution“

→ Epidemiological CutOFF

Für die klinischen Grenzwerte (clinical breakpoints) spielen weiterhin eine Rolle: Dosis des Antibiotikums, Konzentration in Plasma/Gewebe, klinisches Ansprechen in Abhängigkeit der gegebenen MHK

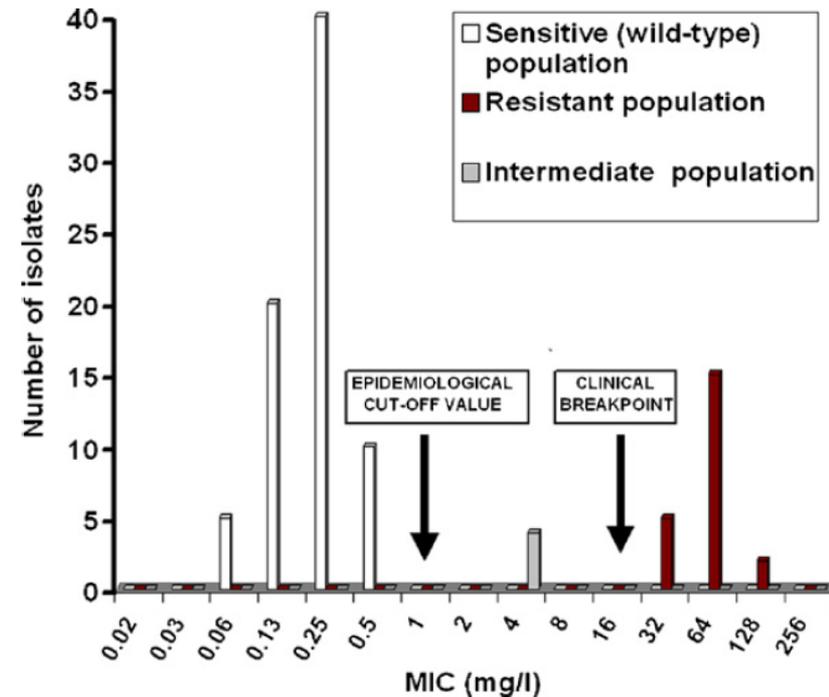
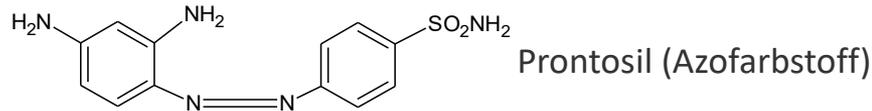


Fig. 1. Illustrative distribution showing wild-type (susceptible), intermediate and resistant bacterial sub-populations.

Klassische therapeutische Konzepte

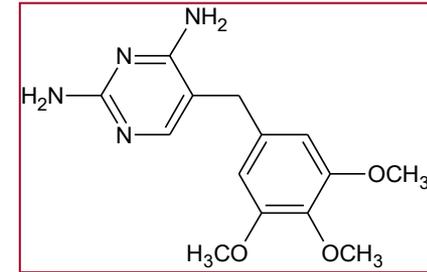
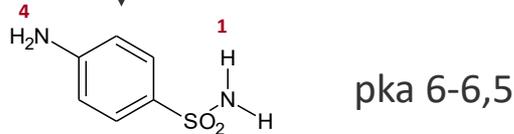
Anforderungen

- (1) hohe Wirkungspotenz gegen spezifisches Spektrum von Bakterien
- (2) bakterizide Wirkung (bakteriostatischer Wirkung vorzuziehen)
- (3) keine Resistenzentwicklung unter Behandlung
- (4) gute Resorption nach oraler Applikation (abgesehen von Präparaten, die zur lokalen Behandlung von Darminfektionen verwendet werden)
- (5) lange Halbwertszeit
- (6) gute Verteilung im Organismus (incl. ZNS, Euter, etc.)
- (7) Fehlen pharmakodynamischer Wirkungen \Rightarrow geringe Toxizität für Wirt



In vivo Abspaltung von Sulfanilamid

Freie Aminogruppe in
Stellung 4 Voraussetzung
Für Wirkung



Trimethoprim (kein Sulfonamid)
(häufig mit Sulfonamiden
kombiniert)

Durch synergistischen Effekt der Kombination teilweise bakterizider Effekt und Verzögerung der Resistenzentwicklung.

In vitro günstigstes Konzentrationsverhältnis TMP:SA 1:20

ist beim Menschen im Plasma bei Dosierungsverhältnis von 1:5 zu erreichen →

1:5- Verhältnis auch bei Tierpräparaten

aber: (1) aufgrund der unterschiedlichen Verteilung werden in Geweben oft andere Konzentrationsverhältnisse erreicht

(2) beim Menschen wird TMP (t_{0.5} ~10h) mit Sulfonamiden (Sulfadiazin) kombiniert, die eine ähnliche Halbwertszeit haben;

beim Tier hat TMP eine sehr kurze t_{0.5} (1-3 h) oft mit länger wirksamen Sulfonamiden kombiniert → synergistischer Effekt nur über wenige Stunden!

Re-Evaluierung (WHO-Kategorie D) für tierartspezifische Ratio/Dosierungsintervall dringend erforderlich

Durch *In-vitro*-Untersuchungen korreliert mit klinischen Beobachtungen entstand eine Unterscheidung in konzentrationsabhängig und zeitabhängig wirkende Antibiotika

konzentrationsabhängig (z.B. Fluorchinolone, Aminoglykoside)

- Wirksamkeit in erster Linie vom Erreichen einer ausreichend hohen Spitzenkonzentration abhängig

zeitabhängig (übrige derzeit verwendete Antibiotika)

- Zeitspanne entscheidend, innerhalb derer die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe ausreichend weit oberhalb der MHK des zu bekämpfenden bakteriellen Erregers liegt

Konzentrationsabhängig wirkende Antibiotika

Für Aminoglycoside

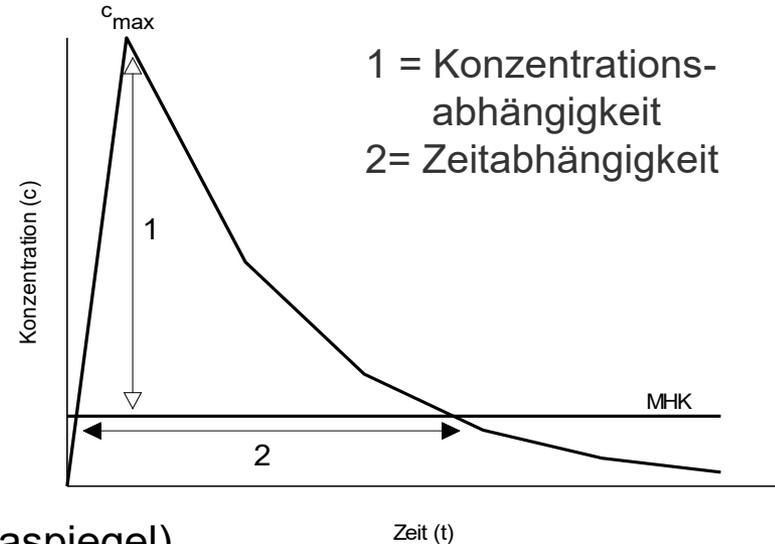
C_{\max}/MHK

- c_{\max} = maximale Konzentration
- Forderung: $c_{\max}/\text{MHK} > 10$

Für Fluorchinolone

Quotient $\text{AUC} = \text{AUC} / \text{MHK}$

- AUC = Fläche unter der Kurve (Plasmaspiegel)
- Forderung:
 - $\text{AUC} > 125$ (gramnegative Erreger)
 - $\text{AUC} > 30-40$ (grampositive Erreger)



2000er Jahre Zeitalter der Computermmodellrechnungen → Dosisoptimierung von Antibiotika durch Messungen in verschiedenen Kompartimenten (Serum, Gewebe, inflammatorisches Exsudat, interstitielle Flüssigkeit).

Pionierarbeit Peter Lees (RVC) in *Tissue-Cage*-Modellen wurde unter entzündlichen Bedingungen die Konzentration von Antibiotika in entzündlichem Exsudat gemessen und mit Serumwerten verglichen.



Festschrift in honour of Professor Peter Lees
PK/PD modelling of NSAIDs in domestic animals

The Royal Veterinary College Camden Campus: 22nd July 2010

Computer: The main limiting factors to conduct PK & PK/PD studies



From Lisboa (2003) to Toulouse (2009)

Standard PK/PD concepts can be applied to determine a dosage regimen for a macrolide: the case of tulathromycin in the calf

P.-L. TOUTAIN*
T. POTTER^{†,1}
L. PELLIGAND[†]
M. LACROIX*
J. ILLAMBAS^{†,2} &
P. LEES[†]

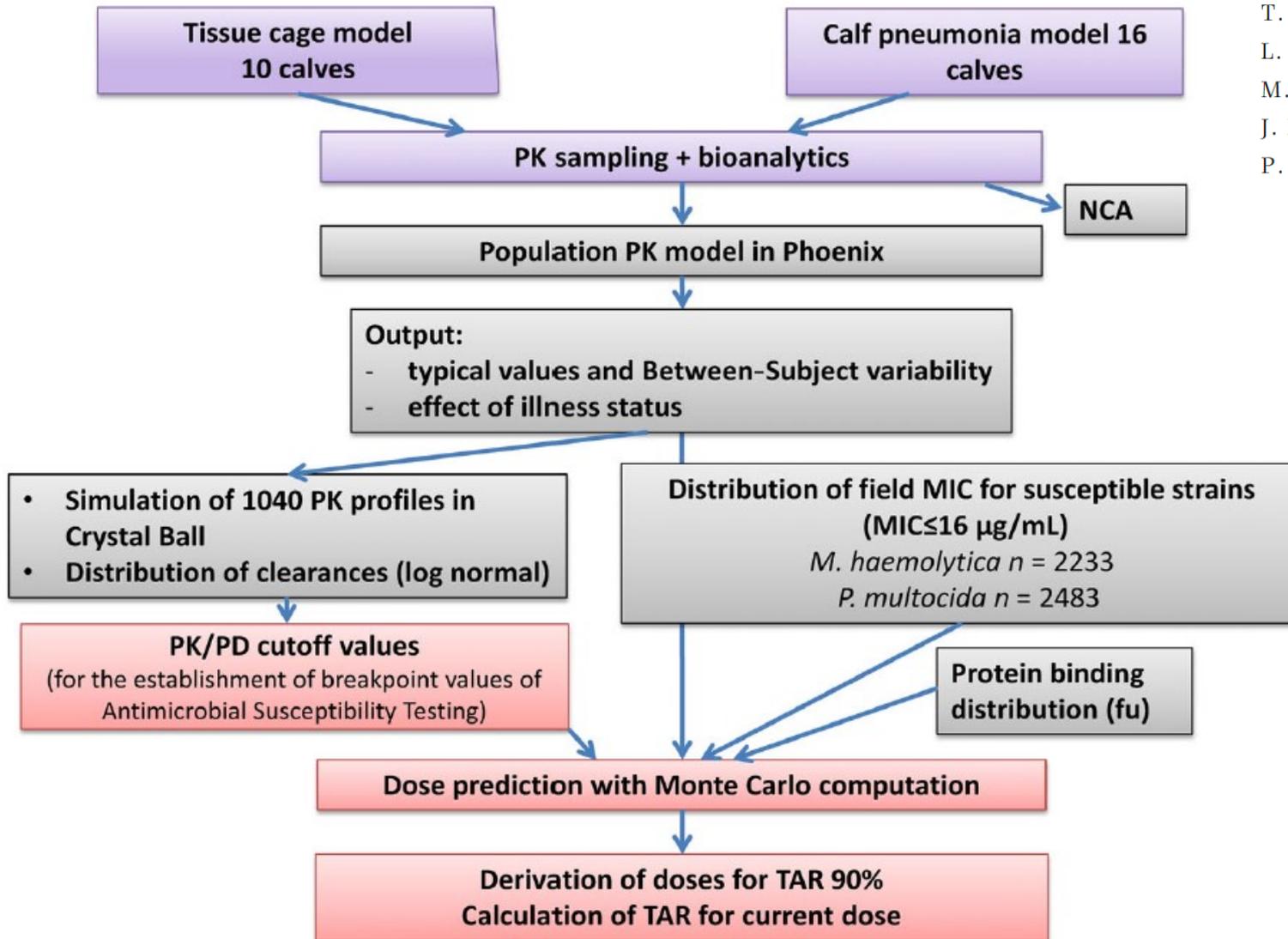


Fig. 1. Flowchart of the main steps of sample collection, data analysis, and results outputs for the PK/PD analysis of tulathromycin in calves.

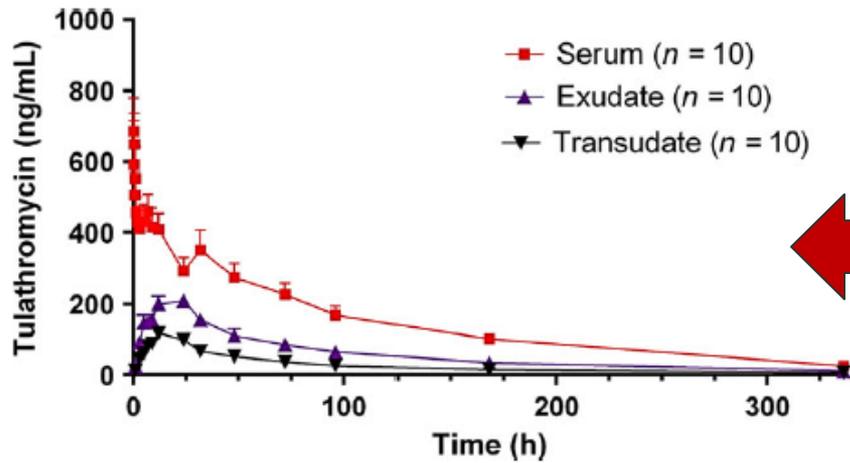


Fig. 3. Tulathromycin concentrations in serum, exudate, and transudate over 336 h after subcutaneous administration of tulathromycin in calves. Mean + SEM tulathromycin concentrations in serum, exudate, and transudate for calves after subcutaneous injection of tulathromycin at a dosage of 2.5 mg/kg.

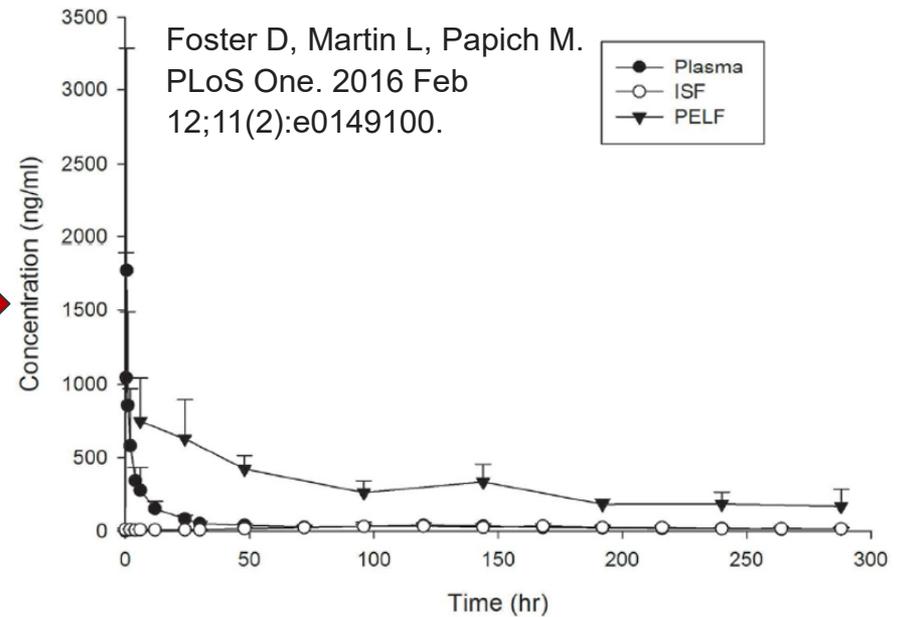


Fig 4. Tulathromycin Concentrations. Plasma, interstitial fluid (ISF), and pulmonary epithelial lining fluid (PELF) concentrations of tulathromycin in cattle (n = 6) after administration of tulathromycin (2.5 mg/kg s.c.). Data are presented as mean +/- standard deviation.

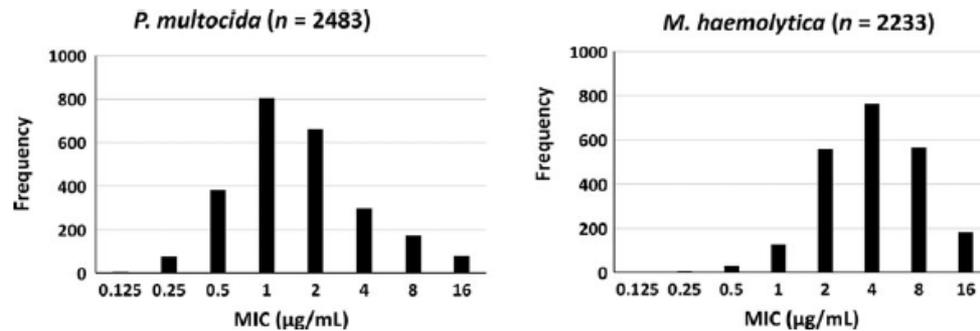
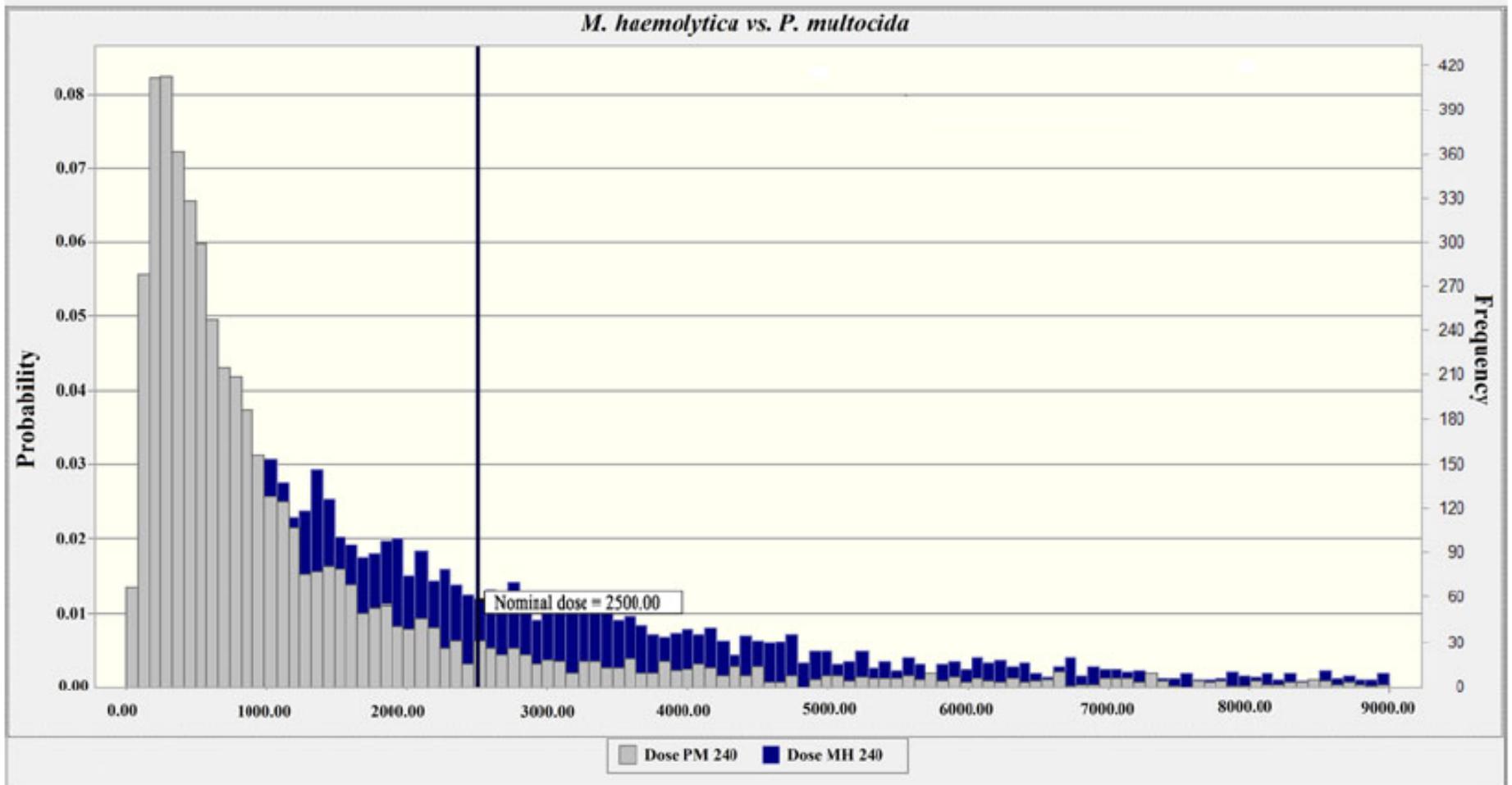
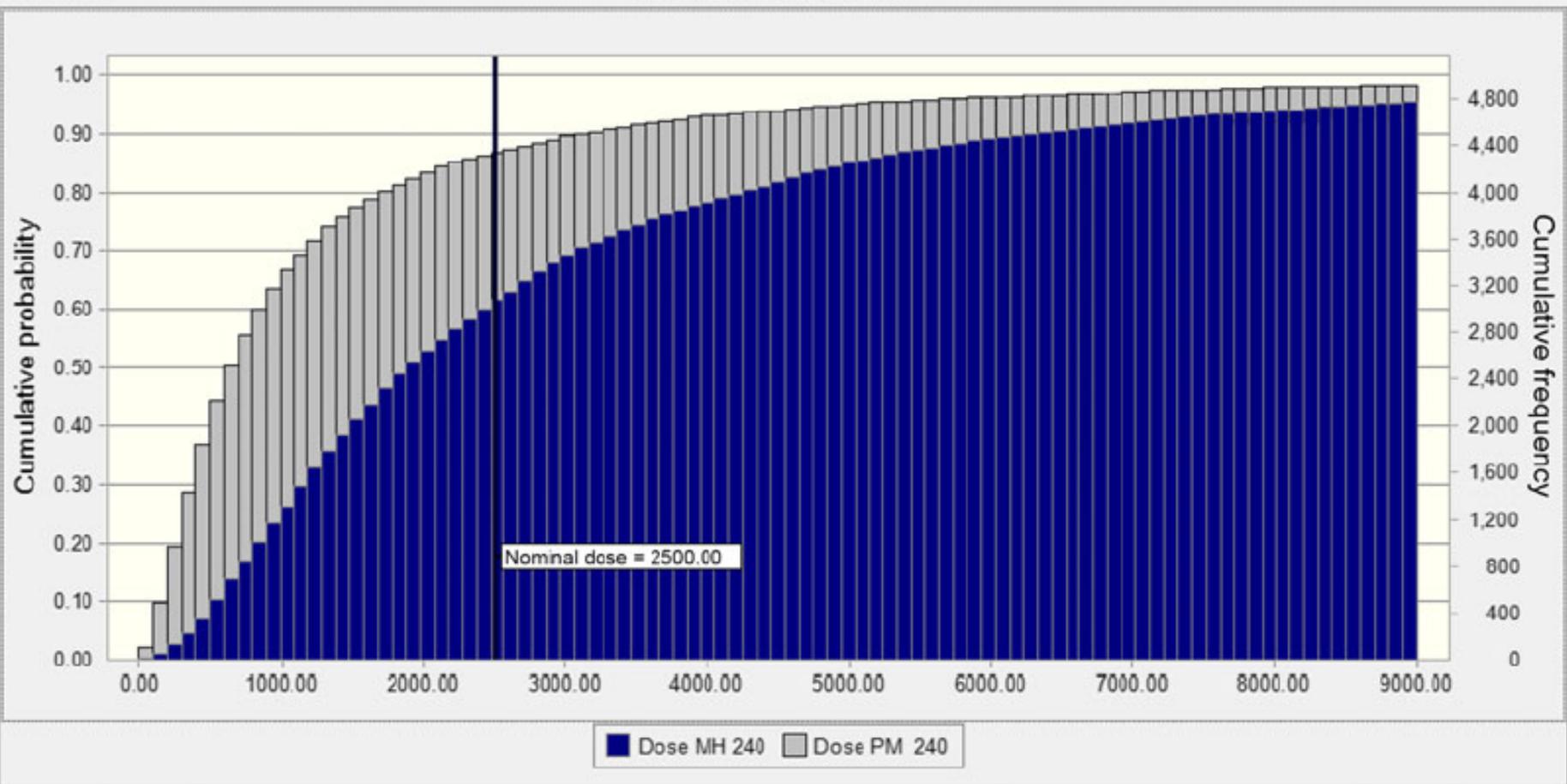


Fig. 5. MIC distribution of *M. haemolytica* and *P. multocida*. Frequency of minimum inhibitory concentrations (MICs) for tulathromycin against bovine respiratory pathogens *P. multocida* (n = 2483) and *M. haemolytica* (n = 2233). The isolates were from the Zoetis surveillance program and were isolated from years 2004 to 2010. MICs (µg/mL) were obtained in Mueller–Hinton broth; results are given for only susceptible strains according to the CLSI clinical breakpoint (MICs ≤ 16 µg/mL).



Population distributions of tulathromycin doses. Comparison of the two population distributions of tulathromycin doses, as predicted by a population PK/PD model for *P. multocida* (gray) and *M. haemolytica* (blue) for duration of action of 240 h. The vertical bar indicates the nominal dose of 2.5 mg/kg. Dose (0 to 9000 lg/kg) is indicated on the x-axis.



Cumulative population distributions of tulathromycin doses. Comparison of the two cumulative distributions of doses of tulathromycin, as predicted by a population PK/PD model for *P. multocida* (gray) and *M. haemolytica* (blue) for a duration of action of 240 h in terms of target attainment rate (y-axis: 0–100%). The vertical bar indicates the nominal dose of 2.5 mg/kg. Dose (0 to 9000 lg/kg) is indicated on the x-axis

A mixed treatment meta-analysis of antibiotic treatment options for bovine respiratory disease – An update



A.M. O'Connor^{a,*}, C. Yuan^b, J.N. Cullen^a, J.F. Coetzee^a, N. da Silva^b, C. Wang^{a,b}

^a Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA 50010, United States

^b Department of Statistics, College of Agriculture and Life Sciences, Iowa State University, Ames, IA 50010, United States

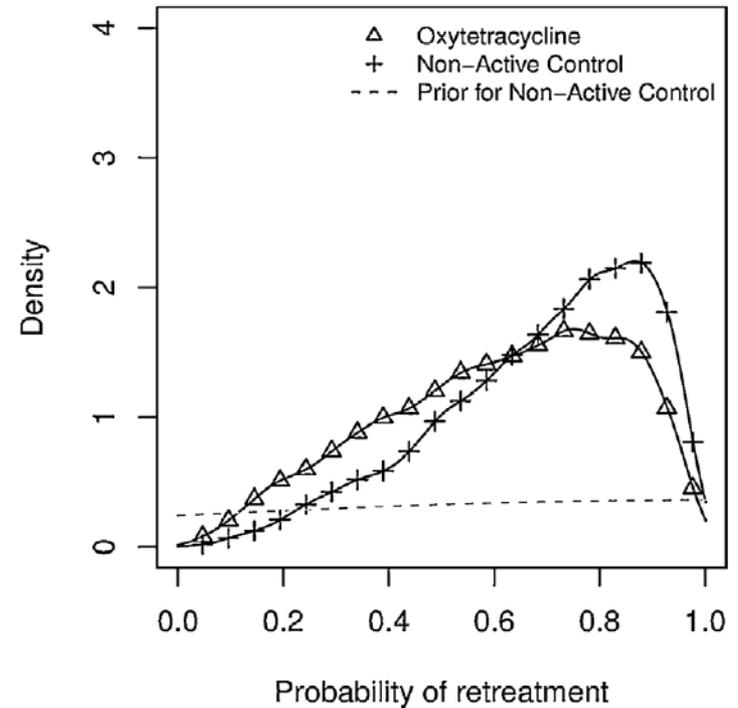
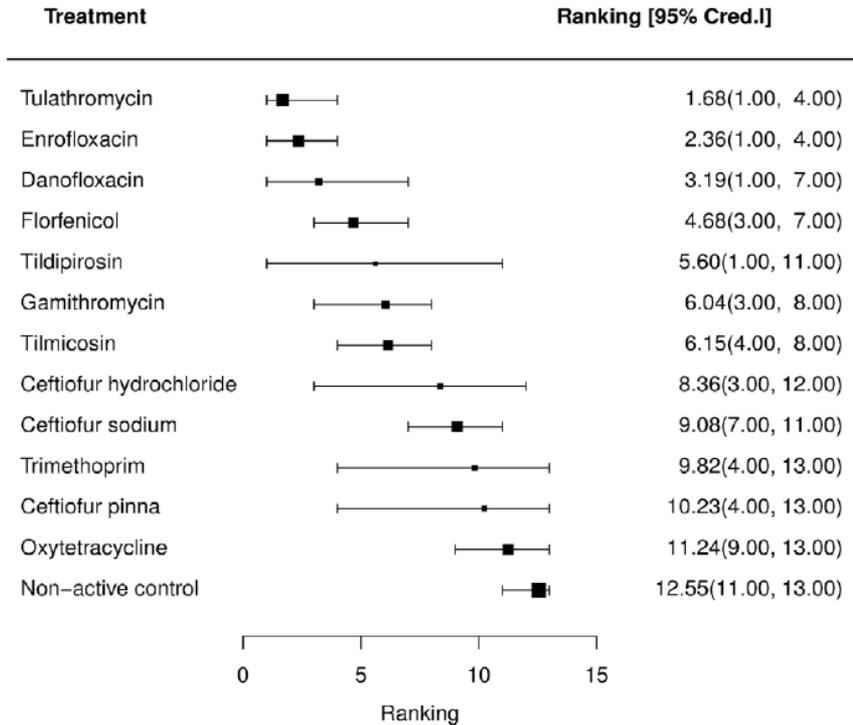


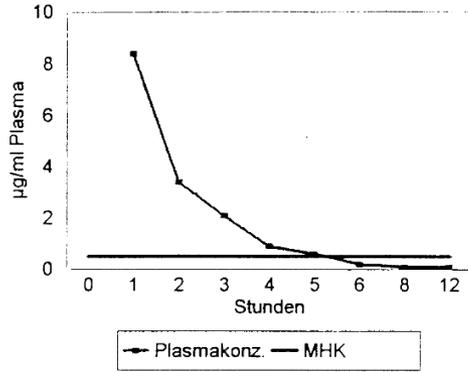
Fig. 3. Ranking forest plot for treatment arms in mixed treatment comparison meta-analysis of antibiotic protocols for BRD (mean rank and 95 credibility interval).

**Bioverfügbarkeit von Amoxicillin bei
Absetzferkeln nach parenteraler und peroraler
Applikation über Futter und Trinkwasser
unter verschiedenen Bedingungen**

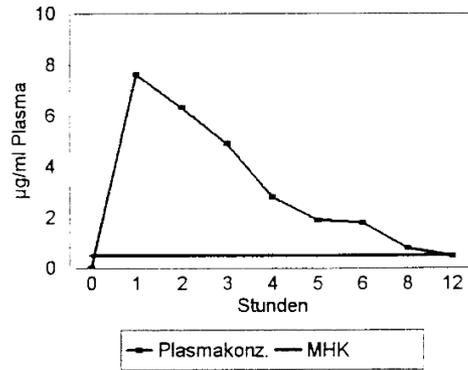
- -
Dirk Morthorst
aus Bersenbrück

Hannover 2002

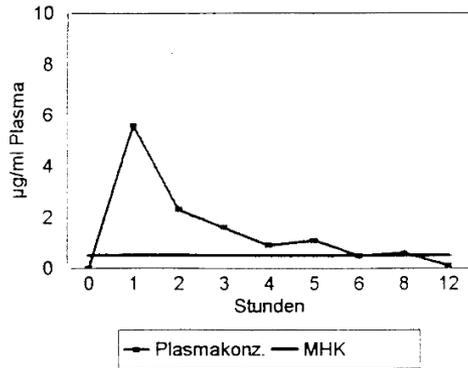
Beispiel Amoxicillin, Schwein



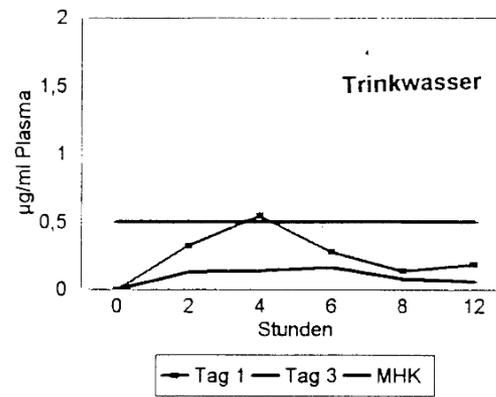
intravenöse Behandlung mit 20 mg/kg



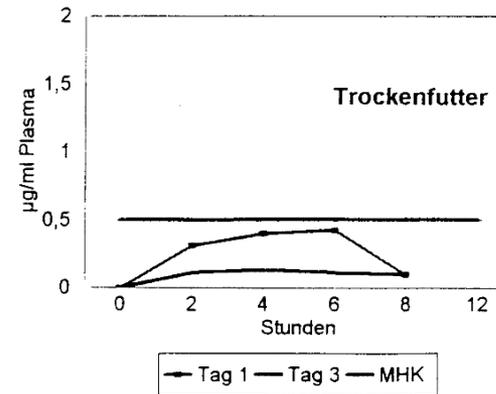
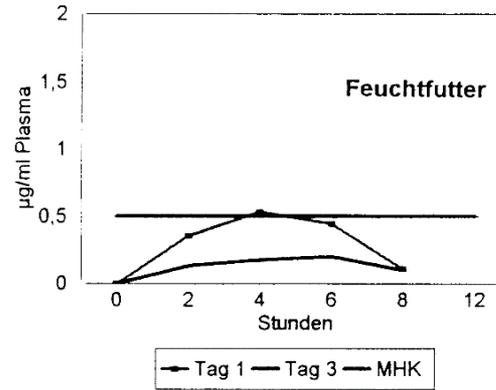
intramuskuläre Behandlung mit 20 mg/kg



orale Behandlung mit 20 mg/kg

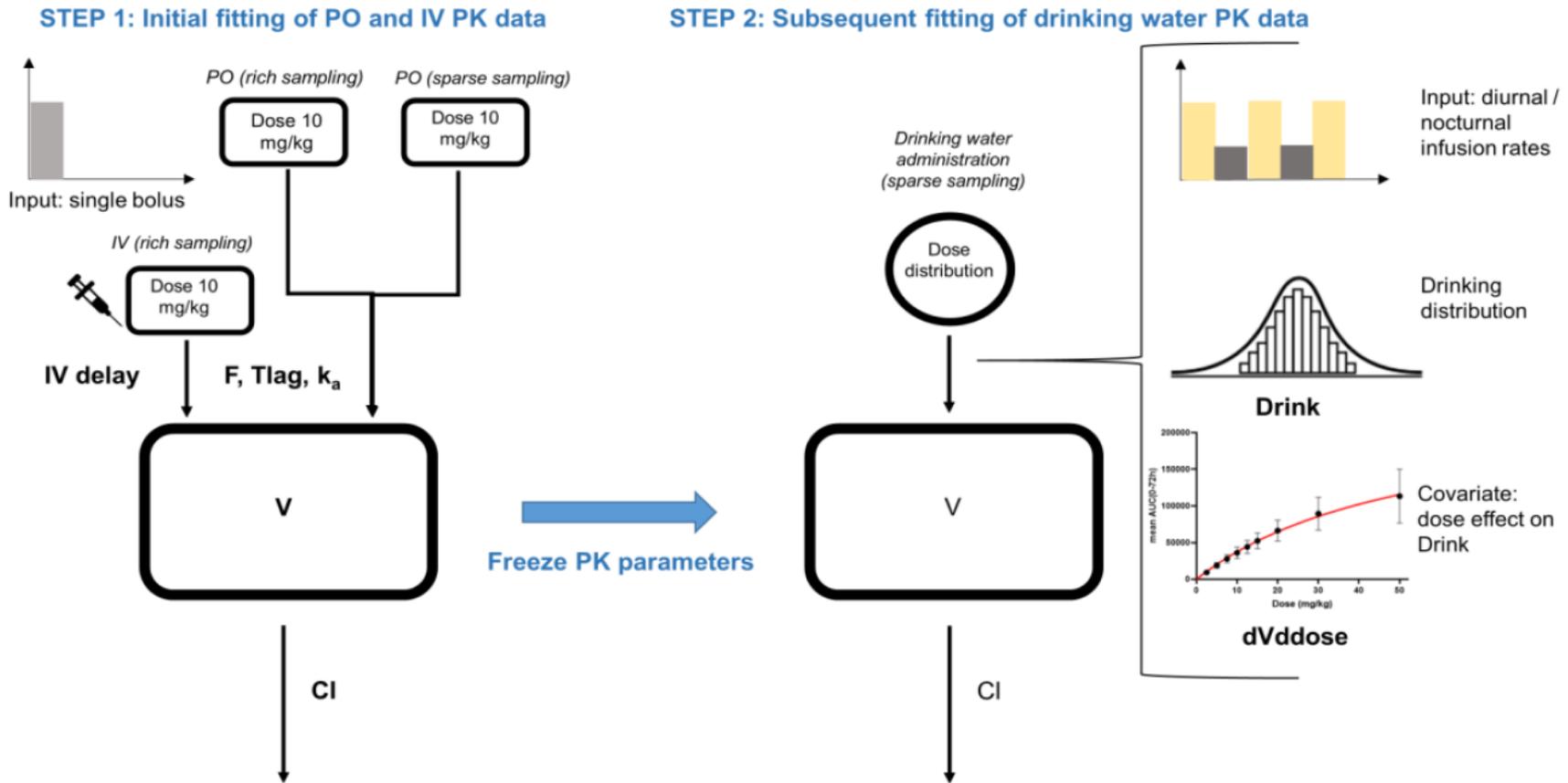


orale Behandlung mit 20 mg/kg



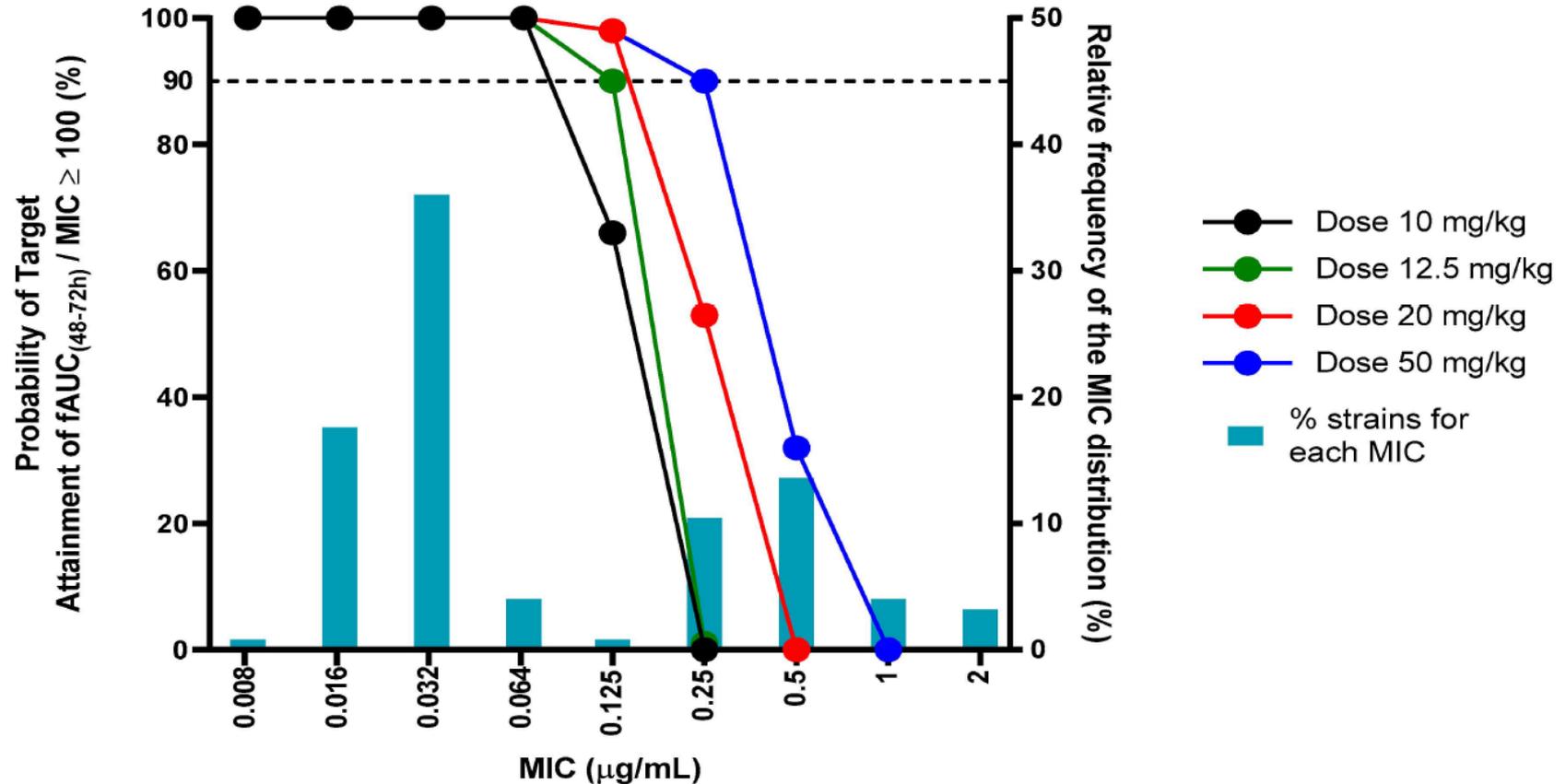
Enrofloxacin Dose Optimization for the Treatment of Colibacillosis in Broiler Chickens Using a Drinking Behaviour Pharmacokinetic Model

Robin Temmerman¹ , Ludovic Pelligand², Wim Schelstraete¹, Gunther Antonissen^{1,3} , An Garmyn³ and Mathias Devreese^{1,*} 



Enrofloxacin Dose Optimization for the Treatment of Colibacillosis in Broiler Chickens Using a Drinking Behaviour Pharmacokinetic Model

Robin Temmerman¹, Ludovic Pelligand², Wim Schelstraete¹, Gunther Antonissen^{1,3}, An Garmyn³ and Mathias Devereese^{1,*}



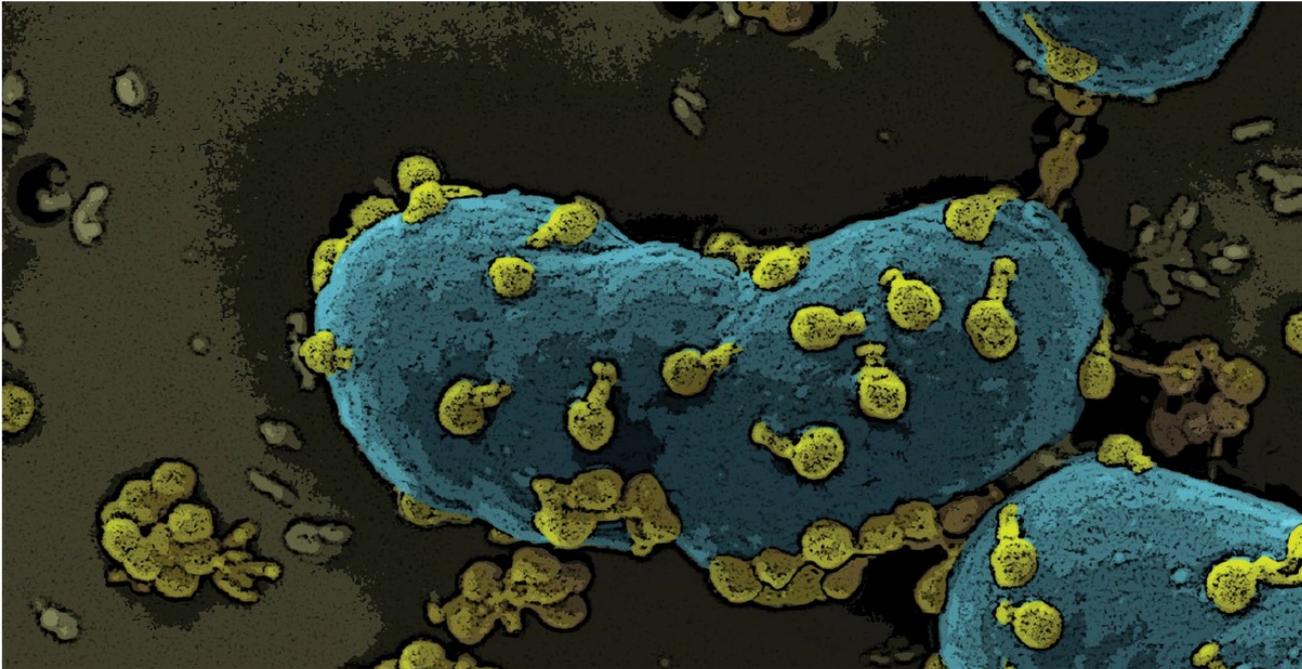
Probability of target attainment (PTA) for $fAUC_{(48-72h)}/MIC_{100h}$ in 75 simulated broiler chickens for four doses of enrofloxacin (10, 12.5, 20 and 50 mg/kg) administered via drinking water (five other simulated doses are omitted). The horizontal dotted line signifies the PTA of 90%. The relative frequency of the MIC distribution of APEC strains is taken from a recent study from Flanders (Belgium) [24].

Zusammenfassung

- neue Instrumente wie Kombination aus dem Feld erhobene Pharmakokinetikuntersuchungen mit komplexen Computersimulationen
→ verbesserte Dosisempfehlungen für jeweilige Zieltierarten und Erregerspektren
- Besonders wichtig für Antibiotika, die schon lange in Gebrauch und Studienlage veraltet
- in Zusammenarbeit mit praktizierenden Tierärzten eine Re-Evaluierung für die Erkrankungen → zunehmend Therapieversagen mit herkömmlichen Antibiotika und Dosisschemata beobachtet
- Therapieversagen unter Dosierung nach Packungsbeilage/Fachinformation als unerwünschte Arzneimittelwirkung dem BVL melden → Aufforderung an den pharmazeutischen Unternehmer Studien für eine Dosisanpassung durchzuführen

Die neue EU Verordnung 2019/6
über Tierarzneimittel

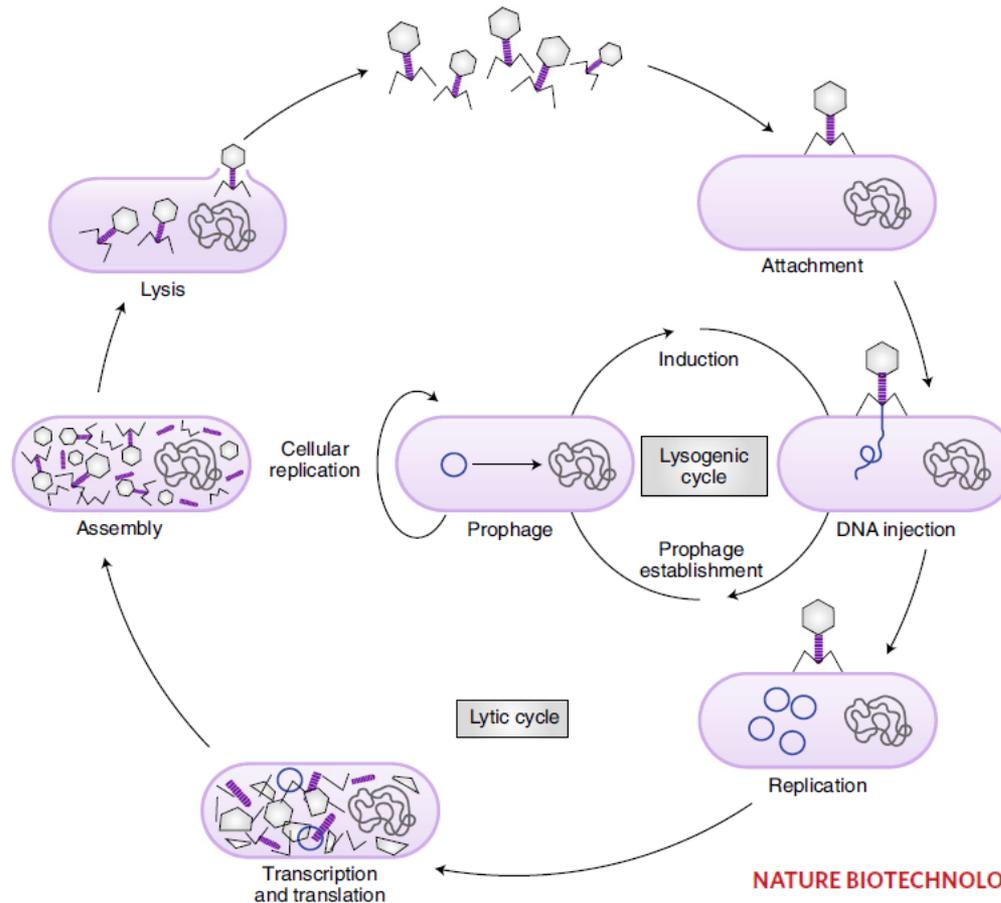
- zurzeit intensiv diskutierte Alternative für die lokale als auch die systemische Therapie: lytische Bakteriophagen (oder kurz Phagen)
- Behandlung von schwer therapierbaren bakteriellen Infektionen
- Phagen sind spezialisierte Viren, die sich auf Bakterien als Wirtszellen spezialisiert haben



Credit: Dr. Robert Pope, National Biodefense Analysis & Countermeasures Center

Phage therapy's latest makeover

As issues of product consistency, standardization and specificity are being tackled, can phage therapeutics—long oversold and overhyped—finally realize their antibacterial potential?

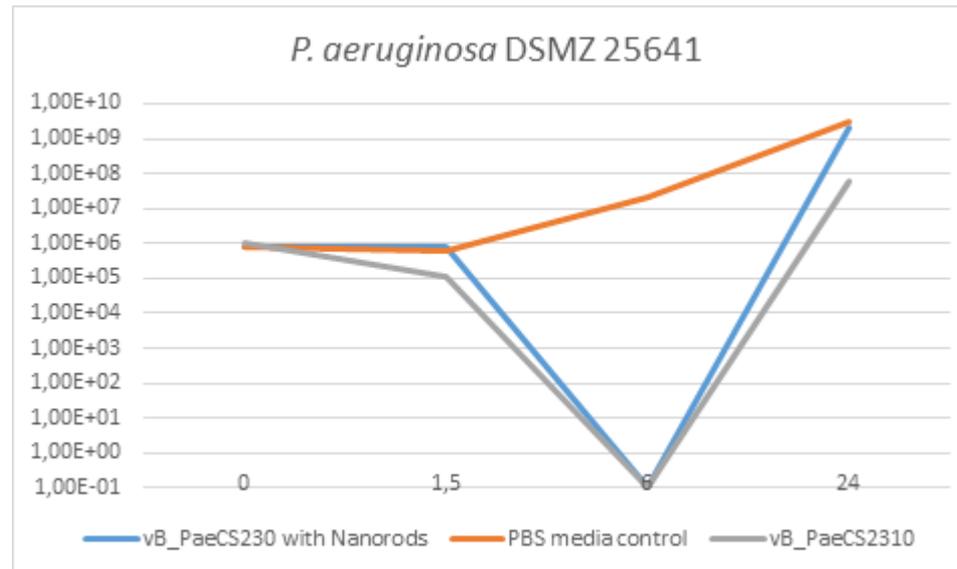


Nachdem Phagen sich an Bakterienoberfläche anheften, injizieren Sie ihre DNA in die Bakterien woraufhin die Bakterien mit der Transkription und Translation des Virusgenoms beginnen. Die Freisetzung der fertigen Viruspartikel geschieht dann durch Lysis des Bakteriums.

- hohe Wirtsspezifität zur Vermeidung von Dysbiose in der behandelten Umgebung
- keine toxischen Nebenwirkungen, wenn Phagen ausreichend aufgereinigt
- Selbstreplikation/Selbstlimitierung da nach Eradikation der Bakterien kein weiteres Wachstum
- Auftreten einer Resistenz gegen einen Phagen bewirkt nicht automatisch eine Resistenz gegen einen anderen Phagen
- phagenresistente Bakterien stellen sich oft als weniger virulent dar
- Bakteriophagen stellen nahezu unerschöpfliche Reserve dar
- zeigen sich auch gegen multiresistente Bakterien wirksam
- Herstellung von „Phagencocktails“ kann vergleichsweise kostengünstig erfolgen
- Verfügbarkeit von maßgeschneiderten Phagenpräparaten realistisch
- Herstellung innerhalb einer relativ kurzen Zeit

Bakteriophagen the cons

- für eine erfolgreiche Therapie muss der ursächliche bakterielle Erreger eindeutig identifiziert werden
- dies gilt auch bei Mischinfektionen.
- Phagen erreichen kaum intrazelluläre Erreger
- Es gibt Zielgewebe, die für die Anwendung von Phagen schwer erreichbar sein können, z. B. Knochen/Gelenke, tiefe Wunden
- Die Haltbarkeit/Stabilität kann von Phage zu Phage variieren → regelmäßige Kontrolle
- Phagentherapie erfordert generell ein spezifisches Know-how des therapierenden Tierarztes



- Bislang wenige publizierte Arbeiten zum klinischen Einsatz von Phagen spezifisch gegen *Pseudomonas aeruginosa*
- Experimentelle Arbeiten an Mäusen in Modellen von infektiösen Atemwegserkrankungen sind sehr vielversprechend
- deutliche Effekte von Phagen gegen *Pseudomonas aeruginosa* im Mausmodell der Sepsis
- Lokal appliziert zeigt sich gute Wirksamkeit bei Modellen infizierter Wunden nach Verbrennungen
- Infizierte Wunden an einzelnen humanen Patienten bestätigt → Phagen als experimentelle Therapiemöglichkeit eingesetzt
- Auch bei Patienten mit zystischer Fibrose und *Pseudomonas aeruginosa* – Infektion bereits experimentell eingesetzt → klinische Phase 1/2 in Vorbereitung (AP-PA02, Armata Pharmaceuticals)

Cystic fibrosis

outlook

Phages could help when antibiotics fail

Bacteria-eating viruses are broadening the treatment landscape for people with drug-resistant infections. By Elizabeth Svoboda

S8 | Nature | Vol 583 | 30 July 2020

- Aber es gibt auch **Einschränkungen** bezüglich des Einsatzes von Bakteriophagen
- Grundsätzlich können Pseudomonaden durch Mutationen und Resistenzentwicklungen (unter der Therapie) dem tödlichen Mechanismus der Phagen entkommen
- Resistenzentwicklung:

SCIENCE VOL 315 23 MARCH 2007

CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

Rodolphe Barrangou,¹ Christophe Fremaux,² H el ene Deveau,³ Melissa Richards,¹ Patrick Boyaval,² Sylvain Moineau,³ Dennis A. Romero,¹ Philippe Horvath^{2*}

Thus, CRISPR, together with associated *cas* genes, provided resistance against phages, and resistance specificity is determined by spacer-phage sequence similarity.

Bacteriophage resistance mechanisms

Simon J. Labrie*, Julie E. Samson^{†§||} and Sylvain Moineau^{†§||}

NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY

VOLUME 8 | MAY 2010 | 317

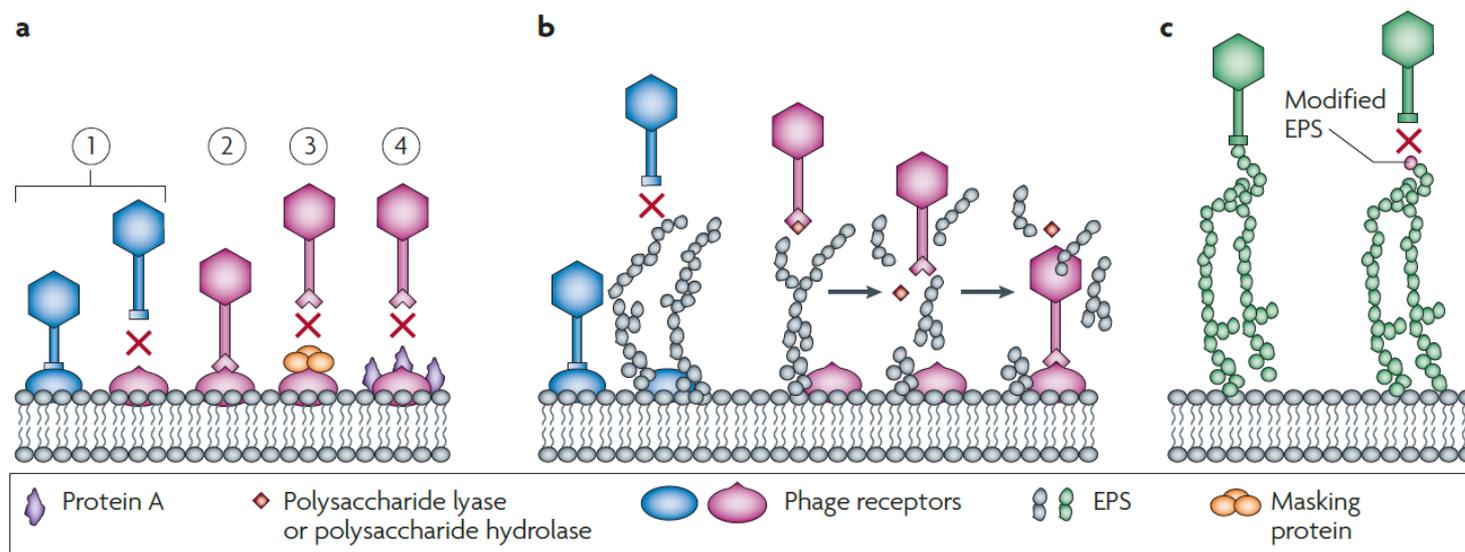


Figure 2 | **Different strategies used by bacteria to block phage adsorption.** **a** | Escaping phage infection at the adsorption step. Phage adsorption to the bacterial cell surface occurs through recognition of a phage receptor on the surface. Bacteria can become resistant to phages by modifying these cell surface receptors (step 1); phages can adapt to recognize these new receptors (step 2). Bacteria can also produce proteins that mask the phage receptor (step 3). *Staphylococcus aureus* produces protein A, which reduces phage adsorption (step 4). **b** | Phage adsorption can also be blocked by the production of exopolysaccharide (EPS), but phages overcome the EPS layer by producing a polysaccharide lyase or a polysaccharide hydrolase to cleave EPS. **c** | Phages have also evolved to specifically recognize polysaccharides such as O antigens and K antigens.

Bacteriophage resistance mechanisms

Simon J. Labrie*, Julie E. Samson^{†§||} and Sylvain Moineau^{†§||}

NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY

VOLUME 8 | MAY 2010 | 317

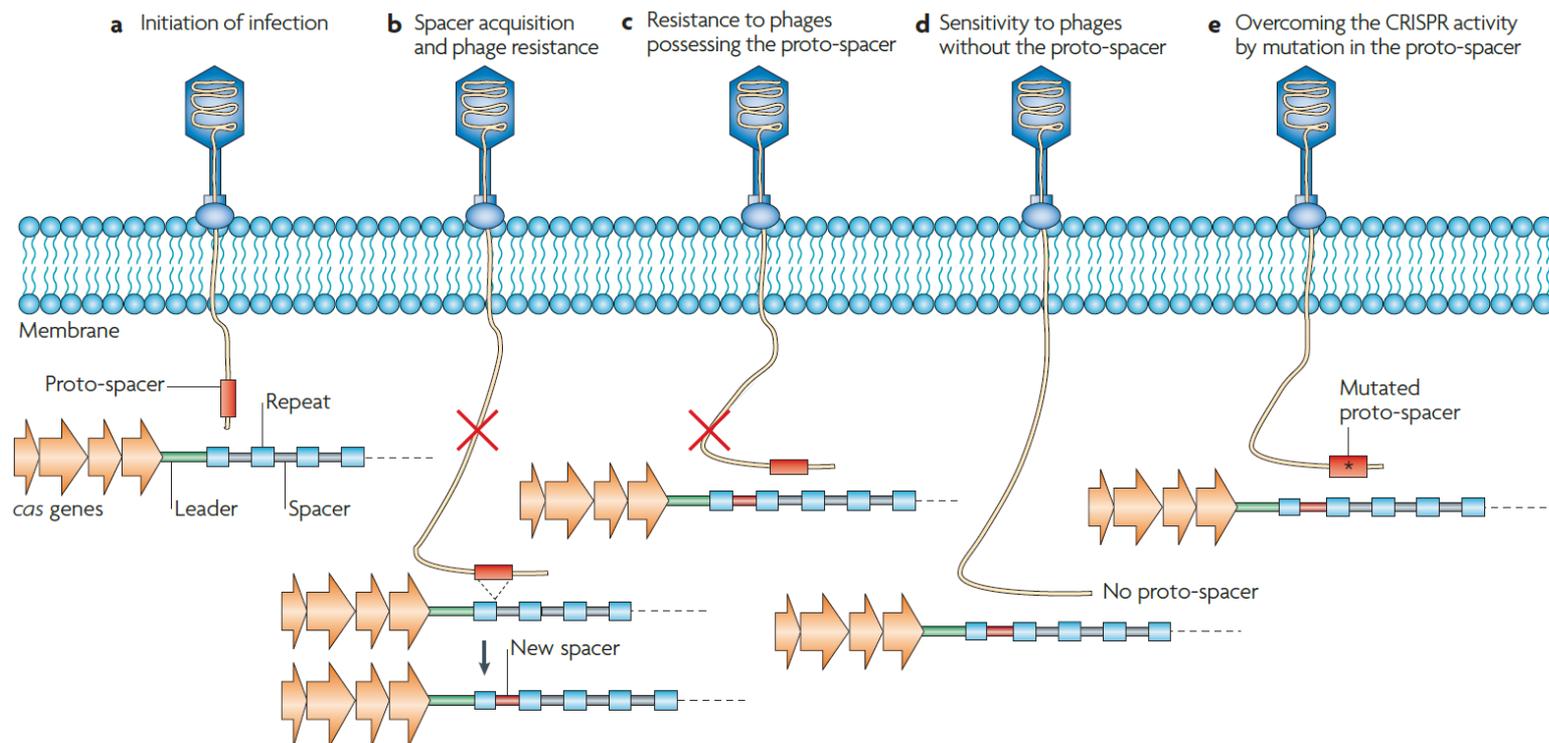


Figure 5 | The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) mode of action. a | Phage DNA enters the bacterial cell and the lytic cycle of the phage initiates. Most bacterial cells will undergo lysis on completion of the phage lytic cycle. **b** | A small portion of phage-infected cells (approximately 1×10^{-6}) will survive the infection. The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) locus of such a phage-insensitive mutant contains an additional repeat (duplicated from the CRISPR locus) and a new spacer (which is 30 nucleotides long in *Streptococcus thermophilus*) that has been acquired from the infecting phage genome. **c** | The newly acquired repeat-spacer unit is responsible for the phage resistance of these phage-insensitive mutants. Any incoming phage genome carrying a proto-spacer with 100% nucleotide

- besonders erschwert wird ein erfolgreicher Einsatz durch Biofilmbildung → schleimartige Matrix, die nicht nur Zugang von Antibiotika erschwert, sondern auch Zugang der Phagen zu den Bakterien behindern kann.

World J Microbiol Biotechnol (2016) 32:67
DOI 10.1007/s11274-016-2009-4



REVIEW

Biofilm control with natural and genetically-modified phages

Amir Mohaghegh Motlagh¹ · Ananda Shankar Bhattacharjee¹ · Ramesh Goel¹

- Spezifische Zucht oder genetische Modifikation von Phagen, um biofilmlösende Eigenschaften zu stärken
- Dispersin B als eine extrazelluläre Polysaccharide-Depolymerase und degradierendes Enzym

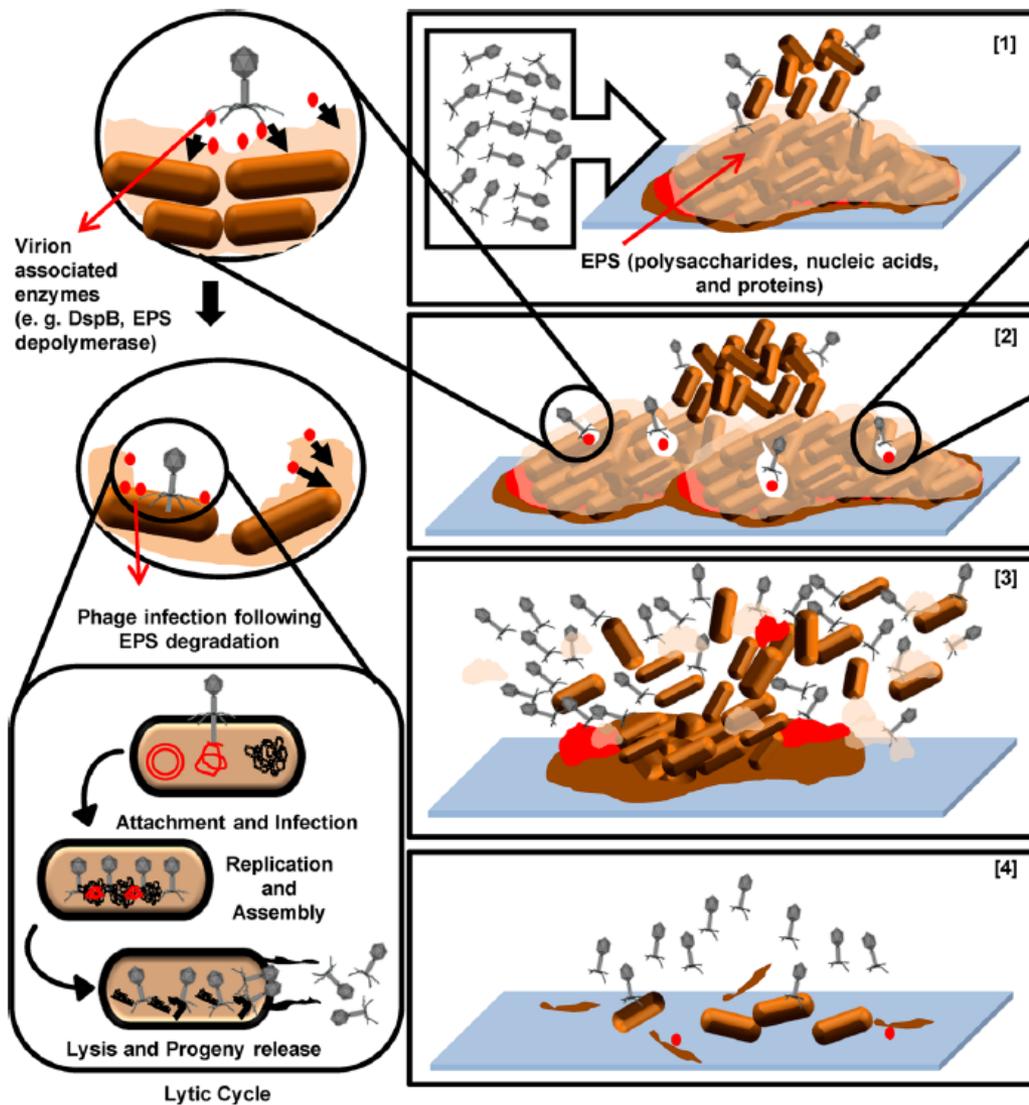


Fig. 1 Phage therapy mechanisms to control bacterial biofilm through phage mediated disruption. As labeled in the figure, the steps of biocontrol of biofilm using bacteriophages include: 1 application of phages, 2 initiation of biofilm EPS disruption through virion associated enzymes such as dispersin B (DspB) or EPS

depolymerases, 3 biofilm disruption through disintegration of EPS networks and exposing the bacteriophage infection, and 4 complete disintegration of biofilm and bacterial cell lysis. ABX stands for antibiotics

- Es ist auch von ausgesprochener Wichtigkeit, eine optimierte **galenische Formulierung** zu entwickeln, die auch Biofilme durchdringt
- In einer ausführlichen Übersichtsarbeit ist zusammengestellt worden, wie wichtig eine optimierte galenische Formulierung für den Erfolg einer Phagentherapie ist.
- Explizit für die lokale Applikation (Haut/Ohr) darauf hingewiesen → bisherige Untersuchungen keine Mühen in optimierte galenische Formulierungen gesteckt → klinische Wirksamkeit häufig wahrscheinlich suboptimal
- Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch eine **Kombination** von **Phagentherapie** und **Antibiotikatherapie** angedacht werden kann, da diese Kombination die Resistenzbildung gegen beide Therapieoptionen deutlich verlangsamen kann