

УДК 579.861.2.044+[615.33:577.182.82].015.44

Сравнительная фармакодинамика антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина в динамической системе *in vitro*

М.В. Смирнова, И.В. Алферова, С.Н. Востров, И.Ю. Лубенко, Ю.А. Портной, А.А. Фирсов

Лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики
НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

С целью сравнения фармакодинамики антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина с помощью динамической системы моделировали *in vitro* их фармакокинетику в широком диапазоне концентраций, включающем терапевтические значения. Для фармакодинамических исследований были выбраны два клинических штамма – *Staphylococcus aureus* 866 и *S. aureus* 10, различающихся степенью чувствительности к обоим антибиотикам. Значения МПК составляли в случае даптомицина 0,35 мкг/мл (в отношении *S. aureus* 866) и 1,1 мкг/мл (*S. aureus* 10), а в случае ванкомицина – 0,7 и 1,3 мкг/мл соответственно. Моноэкспоненциальные фармакокинетические профили даптомицина и ванкомицина, реализуемые у человека, воспроизводили с периодом полувыведения, равным 9 ч и 6 ч соответственно. Даптомицин вводили однократно, ванкомицин – два раза с интервалом в 12 ч.

Значения моделируемого отношения площади под фармакокинетической кривой к МПК (ПФК/МПК) для даптомицина варьировали в пределах 43–970 ч, для ванкомицина – в пределах 33–1150 ч. Антистафилококковый эффект антибиотиков оценивали при помощи интегрального параметра АВВС, т. е. площади между кривыми контрольного роста и роста (или гибели) бактерий в присутствии антибиотика. Полученные зависимости АВВС от ПФК/МПК были специфичны для каждого штамма и антибиотика. При одном и том же значении ПФК/МПК антистафилококковый эффект у даптомицина был выше, чем у ванкомицина, в том числе и при терапевтических значениях ПФК/МПК, соответствующих клиническим дозам (4 мг/кг для даптомицина и 2×1 г для ванкомицина).

Ключевые слова: даптомицин, ванкомицин, фармакодинамика, *Staphylococcus aureus*, динамическая система *in vitro*.

Контактный адрес:
Александр Алексеевич Фирсов
119021, Москва, Большая Пироговская ул., д. 11
Тел.: (495) 708-3341
Факс: (495) 245-0295
Эл. почта: kindyn@gmail.com

Comparative Pharmacodynamics of Daptomycin and Vancomycin with *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* Dynamic Model

M.V. Smirnova, I.V. Alferova, S.N. Vostrov, I.Yu. Lubenko, Yu.A. Portnoy, A.A. Firsov

Department of Pharmacokinetics & Pharmacodynamics,
Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

To compare the pharmacodynamics of daptomycin (DAP) and vancomycin (VAN) as well as killing kinetics of *S. aureus* with different MICs were studied at widely ranged AUC/MIC ratios. Two clinical isolates, *S. aureus* 866 (MIC_{DAP} 0.35 µ/ml and MIC_{VAN} 0.70 µ/ml) and *S. aureus* 10 (MIC_{DAP} 1.1 µ/ml and MIC_{VAN} 1.3 µ/ml) were exposed to DAP (as a single dose) and VAN (as two 12-h doses). Mono-exponential concentration decay was simulated with half-lives of 9 h (DAP) and 6 h (VAN) and AUC/MIC ratio varied from 43 to 970 h and from 33 to 1150 h respectively. Anti-staphylococcal effects of DAP and VAN depended on the simulated AUC/MICs: the higher

the AUC/MIC, the lower numbers of surviving organisms and the later regrowth. Despite pronounced variability of the time-kill curves, AUC/MIC relationships of the ABBC were specific for DAP and VAN. Based on the ABBC-AUC/MIC relationships, the effects of DAP (4 mg/kg – proposed therapeutic dose) on *S. aureus* may be greater than those of two 1-g doses of VAN given with a 12-h interval. These findings predict greater anti-staphylococcal effects of clinically achievable AUC/MICs of DAP relative to VAN.

Key words: daptomycin, vancomycin, pharmacodynamics, *Staphylococcus aureus*, *in vitro* dynamic model.

Введение

Появление стафилококков и энтерококков, устойчивых к ванкомицину, стимулировало поиск новых антимикробных средств, активных в отношении грамположительных бактерий. Одним из таких антибиотиков является даптомицин (LY146032) – новый циклический липопептид, продукт ферментации *Streptomyces roseosporus*. В отличие от гликопептидов, подавляющих синтез пептидогликана клеточной стенки бактерии, в химической структуре даптомицина имеется липидный фрагмент, который в присутствии ионов кальция встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки грамположительной бактерии. В результате образуется ион-проводящая структура, которая быстро деполяризует клеточную мембрану вследствие утечки ионов калия (возможно и других ионов), нарушая синтез макромолекул, в частности ДНК, РНК и белков, что и приводит к разрушению бактериальной клетки [1, 2].

Даптомицин высокоактивен в отношении грамположительных бактерий, в частности *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp.: значения его МПК для этих микроорганизмов, по меньшей мере, вдвое ниже, чем МПК ванкомицина [3–14]. Это обстоятельство в сочетании с близкими значениями площади под фармакокинетической кривой (ПФК) при введении даптомицина в терапевтических дозах [15, 16] обусловило его более выраженный антимикробный эффект (АМЭ) по

сравнению с таковым ванкомицина в динамических системах, моделирующих *in vitro* фармакокинетику антибиотиков [17–21]. Вместе с тем, это сравнение трудно считать исчерпывающим, поскольку оно не опиралось на зависимость АМЭ от отношения ПФК к МПК, ни в одном случае такую зависимость установить не удалось. Более того, в одном из исследований [22] эквивалентные значения ПФК/МПК, обеспечивающие 80%-ный АМЭ даптомицина в отношении метициллинорезистентных и промежуточно-устойчивых к гликопептидам стафилококков, а также ванкомицинорезистентных энтерококков, уменьшаются по мере повышения МПК.

В настоящей работе проведено сравнение даптомицина и ванкомицина на основе зависимости их АМЭ в отношении *S. aureus* от значения ПФК/МПК в динамической системе, моделирующей фармакокинетику антибиотиков у человека.

Материал и методы исследования

Антибиотики и бактериальные штаммы. Даптомицин был любезно предоставлен компанией Cubist Pharmaceuticals, Inc. (Лексингтон, США), ванкомицин был приобретен у компании MP Biomedicals, Inc. (Солон, США).

Для фармакодинамических исследований были выбраны два клинических штамма – *Staphylococcus aureus* 866 и *S. aureus* 10, различающихся по степени чувствительности к каждому из антибиотиков. Значения МПК, установленные методом серийных

разведений в бульоне Мюллера – Хинтона (МХБ), обогащенном катионами кальция (50 мг/л) [23], составляли для даптомицина 0,35 мкг/мл (в отношении *S. aureus* 866) и 1,1 мкг/мл (*S. aureus* 10), а для ванкомицина – 0,7 и 1,3 мкг/мл соответственно.

Моделируемые фармакокинетические профили. Моноэкспоненциальные фармакокинетические профили даптомицина и ванкомицина, реализуемые у человека, воспроизводили с периодом полувыведения, равным 9 ч [1, 2, 15] и 6 ч [17] соответственно. Даптомицин вводили однократно, ванкомицин – два раза с интервалом в 12 ч.

Значения моделируемого отношения ПФК/МПК для даптомицина варьировали в пределах 43–970 ч, для ванкомицина – в пределах 33–1150 ч.

Динамическая система *in vitro*. Для моделирования фармакокинетических профилей и изучения фармакодинамики даптомицина и ванкомицина использовали динамическую систему, описанную ранее [24]. Она представляет собой два сосуда, один со свежим МХБ, другой с МХБ, содержащим бактериальную культуру (контрольный опыт) или бактериальную культуру с антибиотиком. При помощи одного перистальтического насоса МХБ из 1-го сосуда поступает во 2-й (объем – 60 мл), а при помощи другого насоса раствор из 2-го сосуда удаляется с той же скоростью. Скорость потока составляла 4,6 мл/ч для даптомицина, 6,9 мл/ч для ванкомицина, что обеспечивало моноэкспоненциальную элиминацию антибиотиков и бактериальной культуры из системы с константой скорости, равной 0,08 и 0,12 ч⁻¹ соответственно. Надежность воспроизведения фармакокинетических профилей антибиотиков в описанной динамической системе была подтверждена ранее [25].

Перед началом опыта систему заполняли свежим МХБ и термостатировали при 37 °С. Во 2-й сосуд вносили 18-часовую бактериальную культуру (около 10⁶ КОЕ/мл), а затем, после получасовой инкубации, вводили антибиотик.

Оценка кривых зависимости гибели/роста клеток от времени. В течение эксперимента из 2-го сосуда отбирали пробы объемом 100 мкл, которые последовательно разводили стерильной дистиллированной водой и высевали на чашки Петри, содержащие агар Мюллера – Хинтона (МХА). Длительность экспериментов в каждом конкретном случае определялась временем, в течение которого численность бактерий, подвергавшихся действию антибиотика, достигала, по крайней мере, 10⁷ КОЕ/мл. Нижний предел определения составлял 10 КОЕ/мл.

Количественная оценка антимикробного эффекта. Для оценки АМЭ антибиотиков рассчитывали площадь между кривой контрольного роста

и кривыми зависимости скорости гибели/роста клеток от времени – АВВС [26]. Величину АВВС оценивали в интервале времени от начала опыта до достижения бактериями численности 10⁷ КОЕ/мл, но в любом случае в пределах 48 ч (рис. 1).

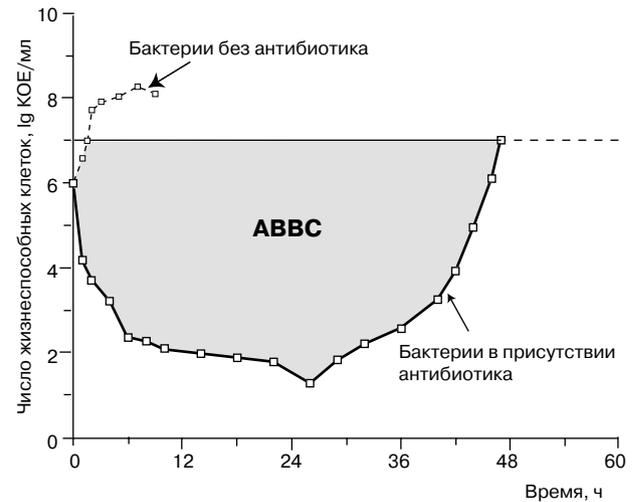


Рис. 1. Определение АМЭ с помощью параметра АВВС (кинетика гибели *S. aureus* 10 под действием даптомицина при ПФК/МПК = 340 ч).

Большинство экспериментов были проведены в двух и более повторностях.

Результаты исследования

Кинетические кривые гибели/роста бактерий.

На рис. 2 показаны кинетические кривые, сгруппированные по одинаковым или сопоставимым значениям ПФК/МПК даптомицина и ванкомицина для штаммов *S. aureus* 866 и *S. aureus* 10. Характер кривых во всех случаях был сходным. Под влиянием антибиотиков происходило сокращение численности жизнеспособных клеток, а затем их рост возобновлялся. По мере повышения ПФК/МПК даптомицина и ванкомицина минимальная численность жизнеспособных клеток уменьшалась, а время возобновления их роста увеличивалось. Например, при значении ПФК/МПК, равном 67 ч, число КОЕ *S. aureus* 866 под действием даптомицина снижалось на 2, а при ПФК/МПК, равном 270 ч, снижалось на 3 порядка. Соответственно вторичный рост в первом случае начинался уже через 12 ч, а во втором – через 40 ч.

Как видно на рисунке 2, при одинаковых или сопоставимых значениях ПФК/МПК даптомицин оказался эффективнее ванкомицина. Например, при отношении ПФК/МПК, равном 130 ч, минимальная численность жизнеспособных клеток *S. aureus* 866 при воздействии даптомицина была

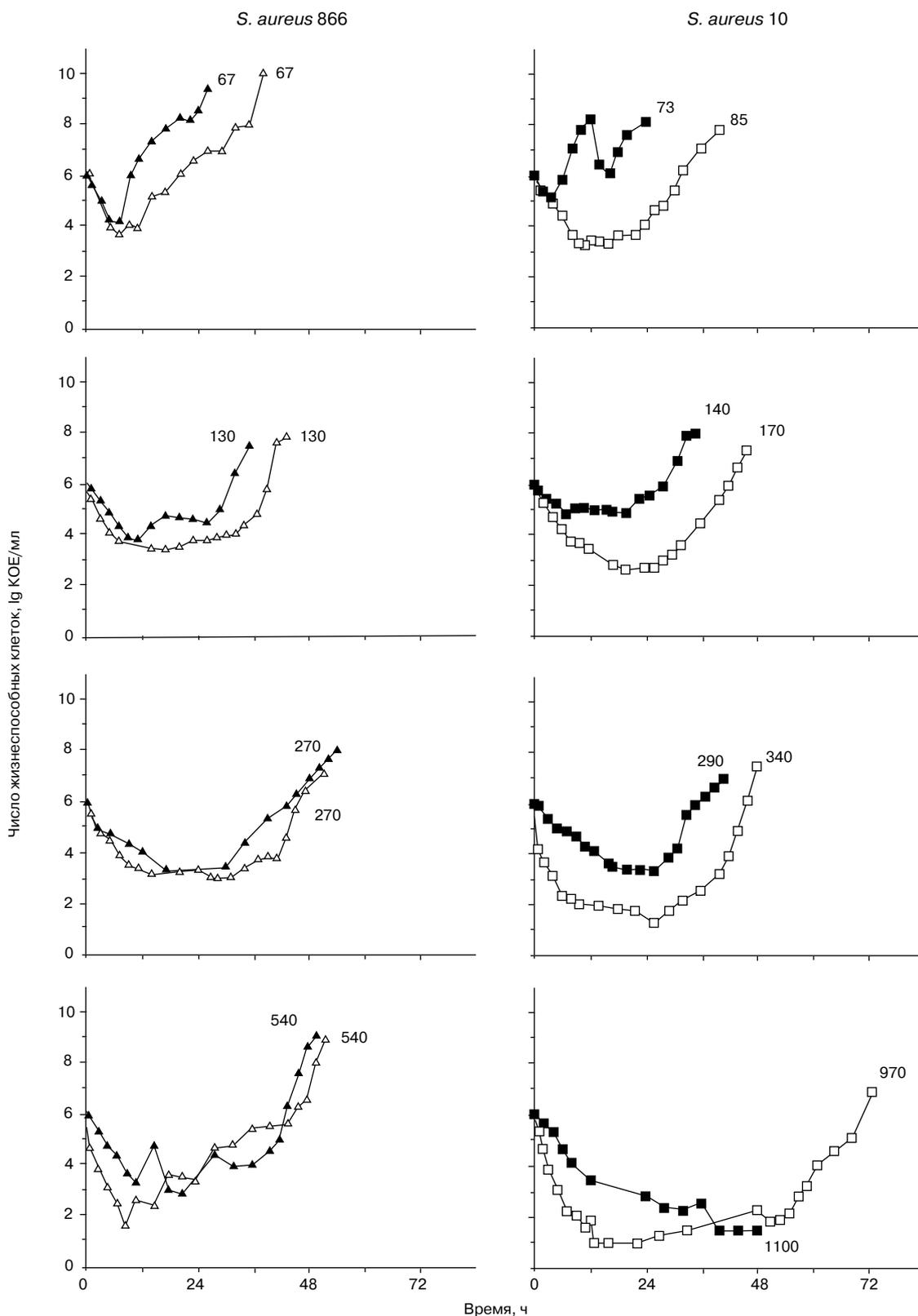


Рис. 2. Кинетика гибели/вторичного роста *S. aureus* под действием даптомицина и ванкомицина. Цифрами на кривых обозначены значения ПФК/МПК антибиотиков. \triangle , \square – даптомицин, \blacktriangle , \blacksquare – ванкомицин.

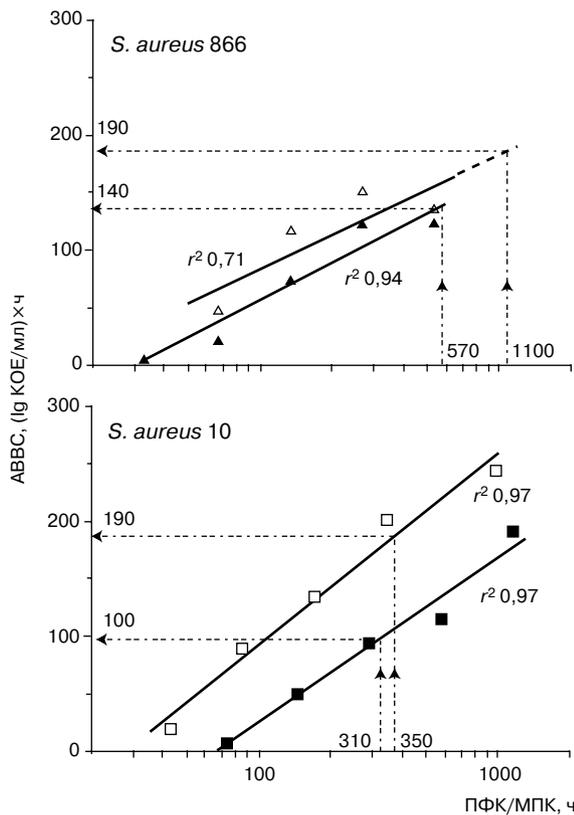


Рис. 3. Зависимость АМЭ даптомицина и ванкомицина в отношении *S. aureus* от значения ПФК/МПК. Δ , \square – даптомицин, \blacktriangle , \blacksquare – ванкомицин.

на порядок ниже, чем в случае с ванкомицином. Последующее увеличение численности популяции в системе с даптомицином наблюдалось через 36 ч, а с ванкомицином – через 30 ч. Вместе с тем, подобные различия не выявлялись при более высоких значениях ПФК/МПК.

Зависимость «концентрация – эффект». Зависимость АМЭ даптомицина и ванкомицина от моделируемых значений ПФК/МПК показана на рис. 3. Как видно на рис. 3, величина АВВС коррелирует с логарифмом ПФК/МПК для обоих штаммов *S. aureus*, как в случае даптомицина, так и ванкомицина. Графики зависимости АВВС от ПФК/МПК для даптомицина располагаются выше, чем для ванкомицина, поэтому при одном и том же значении ПФК/МПК АМЭ первого антибиотика выражен сильнее, чем АМЭ второго. Тот же вывод можно сделать и применительно к терапевтическим значениям ПФК/МПК, создающимся при клинических дозах даптомицина (4 мг/кг [1, 2]) и ванкомицина (2×1 г) – соответственно 1100 и 570 ч для *S. aureus* 866 и 350 и 310 ч для *S. aureus* 10. Например, при соответствующих значениях ПФК/МПК величина АВВС в отношении *S. aureus* 866 для даптомицина

в 1,5 раза выше, чем для ванкомицина. Еще резче выражено преимущество первого антибиотика перед вторым для *S. aureus* 10 – 2-кратное различие между значениями АВВС.

Обсуждение результатов исследования

В результате изучения фармакодинамики *in vitro* даптомицина и ванкомицина установлена зависимость их антистафилококкового эффекта от отношения ПФК/МПК. Указанная зависимость была лог-линейна и специфична для каждого антибиотика и штамма *S. aureus*. Повышение моделируемого значения ПФК/МПК влекло за собой увеличение АМЭ, выраженного величиной интегрального параметра АВВС. Показано, что при одном и том же отношении ПФК/МПК эффект даптомицина выше эффекта ванкомицина, в том числе и при терапевтических значениях ПФК/МПК, что согласуется с полученными ранее результатами сравнения тех же антибиотиков [17–21].

Как уже отмечалось во введении к данной статье, прежние попытки установить зависимость АМЭ даптомицина от его концентрации [18, 22] оказались безуспешными. Наиболее вероятной причиной этих неудач является неадекватная схема эксперимента: моделирование одной и той же терапевтической дозы (концентрации) антибиотика для каждого из изучаемых микроорганизмов [17–21]. Известно, что при такой схеме диапазон значений ПФК/МПК может оказаться слишком узким, чтобы зависимость эффекта от ПФК/МПК могла стать заметной [27]. Вместе с тем, этого объяснения недостаточно для понимания парадоксальных результатов (чем выше МПК, тем меньше эффективное значение ПФК/МПК), полученных со стафилококками и энтерококками при варьировании дозы даптомицина в весьма широком диапазоне [22]. Другой причиной упомянутых неудач может быть использование в качестве меры величины АМЭ численности жизнеспособных клеток к концу эксперимента (N_t) [17, 18, 20, 22]. Например, несмотря на очевидные различия в действии даптомицина и ванкомицина на промежуточно-устойчивый к гликопептидам штамм *S. aureus* на протяжении первых 24 ч, значения N_t при $t = 48$ ч оказались практически одинаковыми [18].

Следует отметить, что, в отличие от других фармакодинамических исследований с даптомицином [18, 22, 28], в настоящей работе не учитывалось возможное влияние белкового связывания на эффективность антибиотика, хотя степень его весьма высока – 92–96 % [1, 2, 18, 29]. Это обусловлено тем, что корректного способа учета этого фактора пока нет. Во всяком случае, рассматривать

моделируемые *in vitro* фармакокинетические профили как профили изменения концентрации не связанного белками антибиотика [18, 22, 28] вряд ли допустимо. Так, добавление в динамическую систему альбумина не влияло на кинетические кривые гибели *S. aureus* и, в особенности, *S. pneumoniae* под действием 7 антибиотиков, связываемых в различной степени (от 0 до 94%) [30]. Более того, при моделировании фармакокинетики «свободных» антибиотиков антимикробный эффект оказался гораздо слабее, чем при воспроизведении их общей концентрации в присутствии альбумина. Таким образом, ориентация на фармакокинетику «свободного» антибиотика чревата переоценкой фактора

белкового связывания и недооценкой эффективности. Косвенно о том же свидетельствуют и меньшие различия в значениях МПК даптомицина в отношении стафилококков в среде, содержащей и не содержащей альбумин [17, 19–21], чем можно было бы ожидать исходя из 93%-ного связывания: 4–8-кратные вместо 13-кратных различий. В связи с этим разработка корректных приемов учета фактора связывания по-прежнему остается актуальной.

Благодарность. Данное исследование было поддержано компанией Cubist Pharmaceuticals.

Литература

1. Carpenter C.F., Chambers H.F. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis* 2004; 38:994–1000.
2. Schriever C.A., Fernandez C., Rodvold K.A., Danziger L.H. Daptomycin: a novel cyclic lipopeptide antimicrobial. *Am J Health-Syst Pharm* 2005; 62:1145–58.
3. Critchley I.A., Blosser-Middleton R.S., Jones M.E., Thornsberry C., Sahn D.F., Karlowsky J.A. Baseline study to determine *in vitro* activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000–2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1689–93.
4. Critchley I.A., Draghi D.C., Sahn D.F., Thornsberry C., Jones M.E., Karlowsky J.A. Activity of daptomycin against susceptible and multidrug-resistant gram-positive pathogens collected in the SECURE study (Europe) during 2000–2001. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:639–49.
5. Fass R.J., Helsel V.L. *In vitro* activity of LY146032 against staphylococci, streptococci, and enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:781–4.
6. Fluit A.C., Schmitz F.-J., Verhoef J., Milatovic D. *In vitro* activity of daptomycin against gram-positive European clinical isolates with defined resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1007–11.
7. Fuchs P.C., Barry A.L., Brown S.D. *In vitro* bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:467–70.
8. Huovinen P., Kotilainen P. *In vitro* activity of a new cyclic lipopeptide antibiotic, LY146032, against gram-positive clinical bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:455–7.
9. Jones R.N., Barry A.L. Antimicrobial activity and spectrum of LY146032, a lipopeptide antibiotic, including susceptibility test recommendations. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:625–9.
10. King A., Phillips I. The *in vitro* activity of daptomycin against 514 gram-positive aerobic clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:219–23.
11. Knapp C.C., Washington II J.A. Antistaphylococcal activity of a cyclic peptide, LY146032, and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:938–9.
12. Rybak M.J., Hershberger E., Moldovan T., Grucz R.G. *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin–dalfopristin against staphylococci and enterococci, include vancomycin-intermediate and -resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1062–6.
13. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Lonks J.R., Boyce J.M. Comparative *in vitro* activities of daptomycin and vancomycin against resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3447–50.
14. Stratton C.W., Liu C., Weeks L.S. Activity of LY146032 compared with that of methicillin, cefazolin, cefamandole, cefuroxime, ciprofloxacin, and vancomycin against staphylococci as determined by kill-kinetic studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1210–5.
15. Woodworth J.R., Nyhart Jr. E.H., Brier G.L., Wolny J.D., Black H.R. Single-dose pharmacokinetics and antibacterial activity of daptomycin, a new lipopeptide antibiotic, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:318–25.
16. Rybak M.J., Bailey E.M., Lamp K.C., Kaatz G.W. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for gram-positive endocarditis and bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1109–14.
17. Cha R., Rybak M.J. Daptomycin against multiple drug-resistant staphylococcus and enterococcus isolates in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47:539–46.
18. Akins R.A., Rybak M.J. *In vitro* activities of daptomycin, arbekacin, vancomycin, and gentamycin alone and/or in combination against glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in an infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1925–9.
19. Cha R., Brown W.J., Rybak M.J. Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin–dalfopristin, and linezolid

- against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3960–3.
20. Akins R.L., Rybak M.J. Bactericidal activities of two daptomycin regimens against clinical strains of glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococcus faecium, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:454–9.
 21. Tsuji B.T., Rybak M.J. Short-course gentamicin in combination with daptomycin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2735–45.
 22. Cha R., Grucz Jr. R.G., Rybak M. J. Daptomycin dose–effect relationship against resistant gram–positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1598–1603.
 23. Hanberger H., Nilsson L.E., Maller R., Isaksson B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1710–6.
 24. Firsov A.A., Vostrov S.N., Shevchenko A.A., Cornaglia G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration–time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1281–7.
 25. Firsov A.A., Shevchenko A.A., Vostrov S.N., Zinner S.H. Inter- and intraquinolones predictors of antimicrobial effect in an *in vitro* dynamic model: new insight into a widely used concept. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:659–65.
 26. Firsov A.A., Lubenko I.Y., Portnoy Y.A., et al. Relationships of the area under the curve/MIC ratio to different integral endpoints of the antimicrobial effect: gemifloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:927–31.
 27. Фирсов А.А., Назаров А.Д., Черных В.М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии. *Итоги науки и техники. ВИНТИ, Москва*. 1989; 17:1–228.
 28. Huang V., Rybak M.J. Pharmacodynamics of cefepime alone and in combination with various antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 44:1925–9.
 29. Kaatz G.W., Seo S.M., Reddy V.N., et al. Daptomycin compared with teicoplanin and vancomycin for therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2081–5.
 30. Wiedemann B., Fuhst C. Revising the effect of protein binding on the pharmacodynamics of antibiotics. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., USA, 2004. Abstr. A-1466.