

Vorstellung zweier öffentlich geförderter humanmedizinischer Forschungsprojekte in Deutschland mit Phagen-Anwendung



20. BfR-Forum Verbraucherschutz
07. – 08.11.2019, Berlin



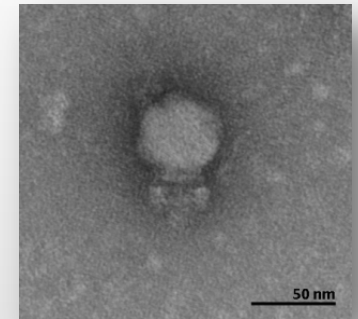
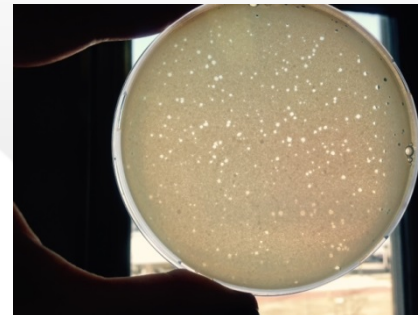
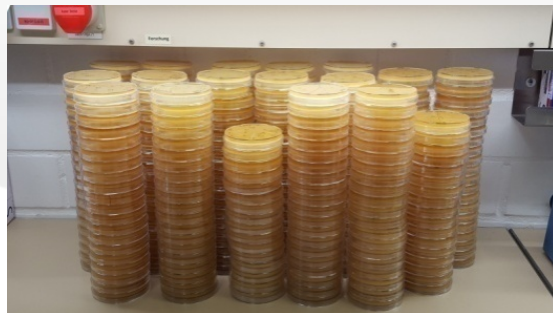
Christine Rohde



Natur – unerschöpfliche Quelle von Phagen

(auch für **ESKAPE***-Bakterien)

Phagen sind die häufigste Daseinsform der Biosphäre

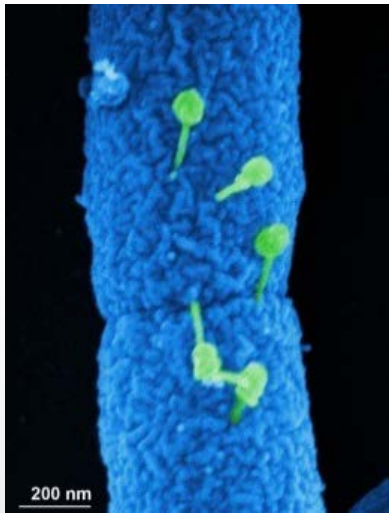


***ESKAPE:** Gruppe besonders abundanter, besorgniserregender Keime mit häufigen Multiresistenzen

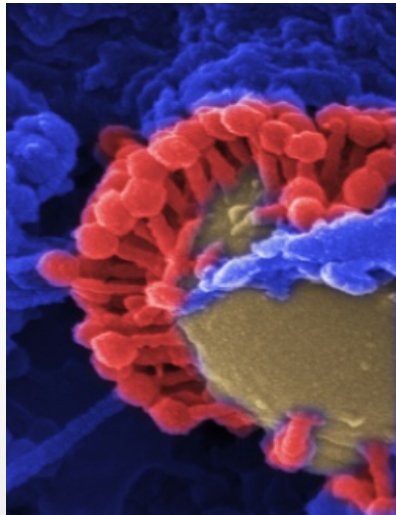
☐ Humanmedizin – Iytische Phagen als Antibacterials

- ☐ Therapie von Infektionen mit MRE (multiresistente Erreger)
- ☐ Gezielte Eradikation von MRE-Besiedlung
- ☐ Optimierung des (Darm-) Mikrobioms

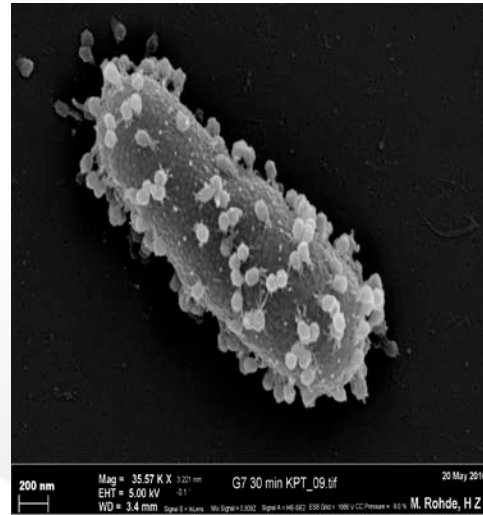
Voraussetzung: die Biologie der häufigsten Daseinsform (Phagen) zu verstehen



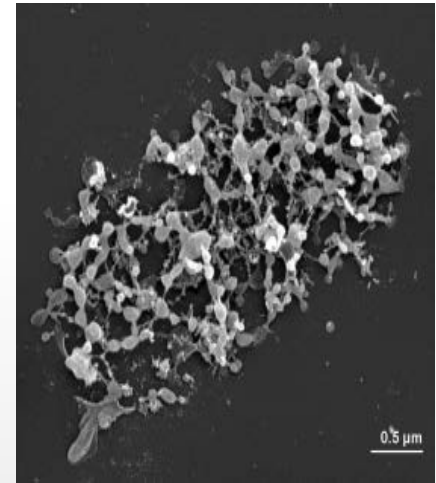
E. coli-Phage HASG4



S. aureus-Phage Sb-1
Phage überlassen von:
Eliava Institut, Tbilisi

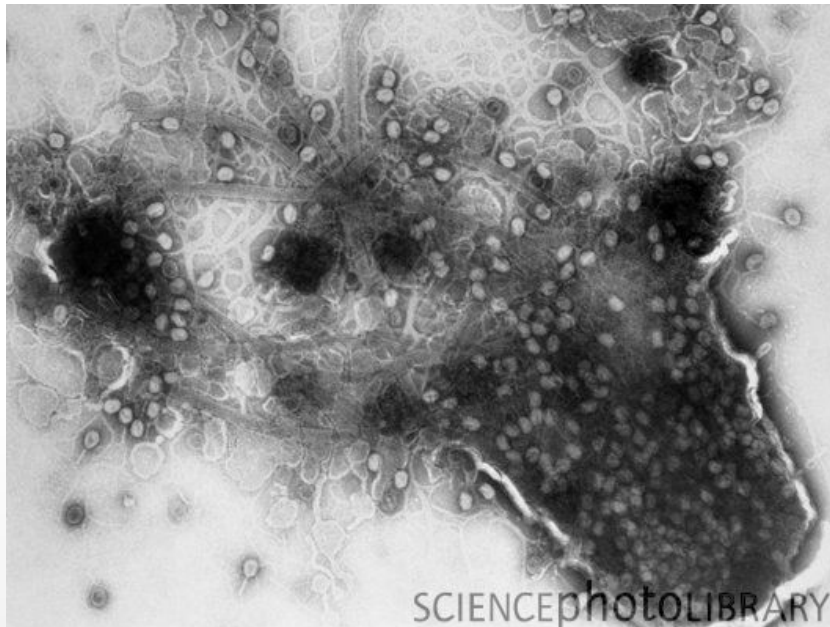


Phage vB_Ab-M-G7 adsorbiert an und lysiert
A. baumannii G7 (GC 2)
Phage und Stamm überlassen von:
Eliava Institut, Tbilisi

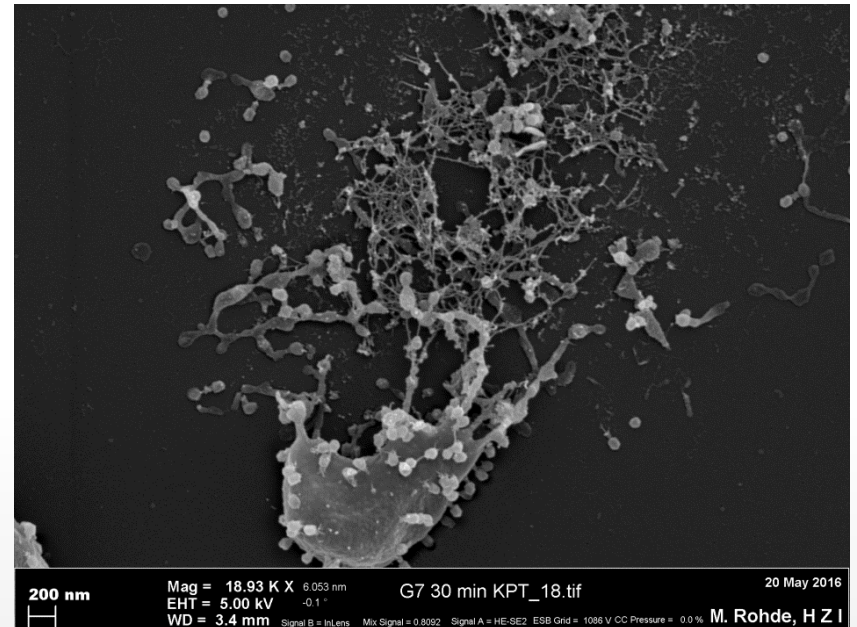


Lysis from „within“

Bakterielle Lyse durch Phagen ist ein komplexer enzymatisch gesteuerter Vorgang und mehr als nur Platzen



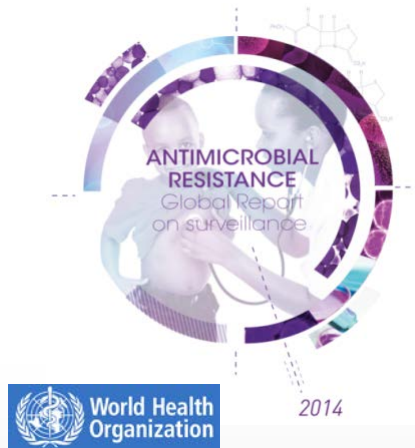
Phage T4 lysiert *E. coli* (Druck im Zellinneren ca. 3-5 atm
(V. Fischetti))



Phage G7 lysiert *A. baumannii*
(M. Rohde)
Präklinisches Kooperationsprojekt mit Charité-
Universitätsmedizin Berlin, AG Prof. M. Witzenrath
(2015/2016)

Siehe auch S.T. Abedon (2011). Lysis from without. Bacteriophage 1(1)

WHO Global Surveillance Report 2014, G7/G20, WHO Summit 2016, Berlin AMR Conference 2019, Zehn-Punkte-Plan der Bundesregierung / DART 2020



Ziel der DSMZ in beiden öffentlich
geförderten Projekten:

ESKAPE

ESKAPE:

Enterokokken (VRE)

S. aureus (MRSA)

K. pneumoniae (Carbapenem resistant)

A. baumannii (oft intrinsisch resistant)

P. aeruginosa

Enterobacteriaceae (ESBL)

VRE: Vancomycin resistente Enterokokken

MRSA: Methicillin resistente *S. aureus*

ESBL: Extended Spectrum β Lactamase

Gram-negative:

3MRGN, 4MRGN



Globale Herausforderung AMR / MDR / MRE


WHO-Ziel: Strategien bis Mai 2017 vorzulegen

- Eines der größten Public Health Probleme
- Problembewusstsein ist in der Politik



DART 2020 (2015) Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie, 6 Ziele:

- ✓ One-Health Ansatz national & international stärken
- ✓ Resistenzentwicklungen frühzeitig erkennen
- ✓ Therapieoptionen erhalten und verbessern
- ✓ Infektionsketten frühzeitig unterbrechen und Infektionen vermeiden
- ✓ Bewusstsein fördern und Kompetenzen stärken
- ✓ Forschung und Entwicklung unterstützen

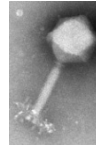
4. DART 2020 Zwischenbericht Juli 2019 „Antibiotikaresistenzen vermeiden“: 

zu jedem Ziel: * Was wurde erreicht * Nationale & internationale Aktivitäten * Ausblick

DART 2020 – Deutsche Antibiotikaresistenz-Strategie

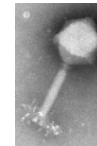
Wo finden Phagen ihren Platz?

Ziel 1: One-Health-Ansatz stärken

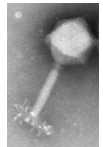


Ziel 2: Resistenz-Entwicklungen frühzeitig erkennen

Ziel 3: Therapie-Optionen erhalten und verbessern

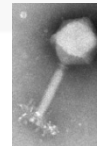


Ziel 4: Infektionsketten frühzeitig unterbrechen und Infektionen vermeiden



Ziel 5: Bewusstsein fördern und Kompetenzen stärken

Ziel 6: Forschung und Entwicklung unterstützen



Bekämpfung resistenter Erreger: 10-Punkte-Plan des BMG, Punkt 8.:

Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika ermöglichen (Pharmadialog):

Bei der Entwicklung neuer Antibiotika und alternativer Behandlungsmethoden kommt der Wissenschaft und der pharmazeutischen Industrie eine große Verantwortung zu.

Re-estimating annual deaths due to multidrug-resistant organism infections

Jason P. Burnham et al. (2018) The Society for Healthcare Epidemiology of America
Washington University School of Medicine

Oft zitiert: > 2 Mio Erkrankungen und 23.000 Todesfälle/Jahr in den USA
(CDC-Zahlen)

Neue Schätzung Mortalitätszahl für 2010 durch J. P. Burnham et al.:
153.113 Tote, damit ca. **siebenfach höher** und dritthäufigste Todesursache!

Weiterer Anstieg der MDR-Infektionen prognostiziert

Autoren fordern bessere Surveillance und Reportmechanismen bei MDR-Infektionen
sowie mehr Forschungsförderung

Der lange Weg von der Wasserprobe zum Phagenprodukt als Arzneimittel

Das Arzneimittelgesetz darf nicht umgangen werden



Wir nutzen die Phagen in ihrer natürlichen Daseinsform zur Entwicklung neuer Antibacterials:

- F & E-Arbeit in der Mikrobiologie
- Phagen unter GMP* vermehren und gereinigt in Arzneimittelqualität herstellen
- In der klinischen Studie: Tests in der Präklinik, *in vivo* am Tier, *ex vivo* z. B. am Gewebe und im gesunden Probanden
- Anwendung am Patienten



Zunächst: IMP

Investigational Medicinal Product

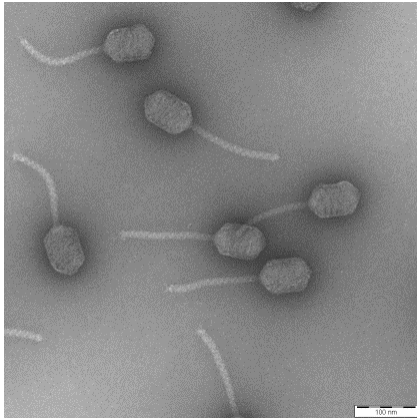
Später: API

Active Pharmaceutical Ingredient

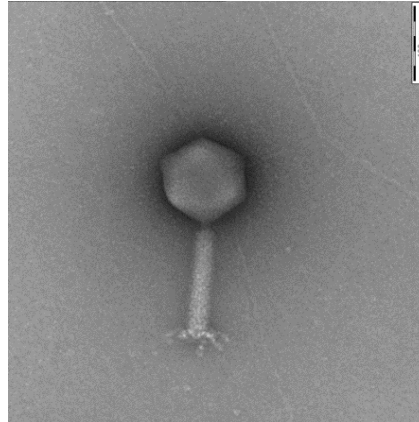
Pharmazeutischer Inhaltsstoff

*GMP = Good Manufacturing Practices

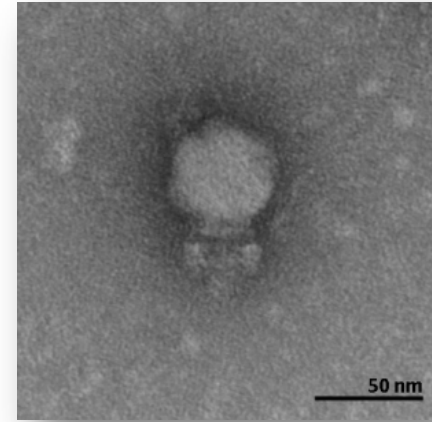
Auch Phagen gegen „Non ESKAPE“ Bakterien sind wichtig



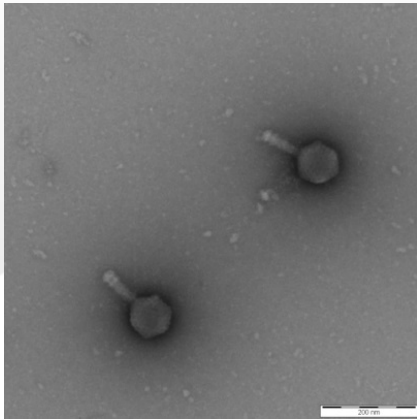
Bordetella bronchiseptica



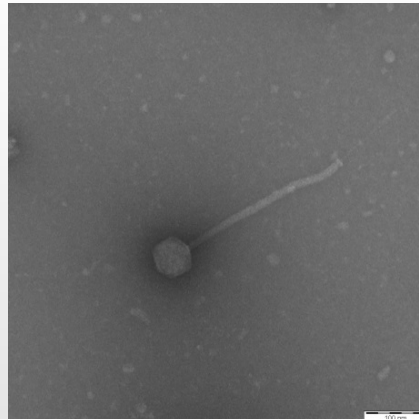
Burkholderia cepacia



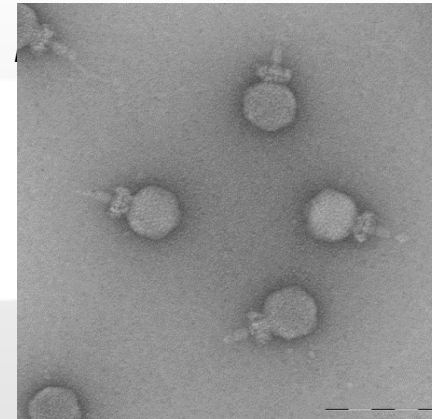
Achromobacter xylosoxidans



Mycobacterium abscessus



Serratia marcescens



Staphylococcus epidermidis

Klinische Studien und „magistraler“ Weg

In Deutschland werden aktuell beide Wege beschritten

Bundesoberbehörde für Beratung und Zulassung:
BfArM, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

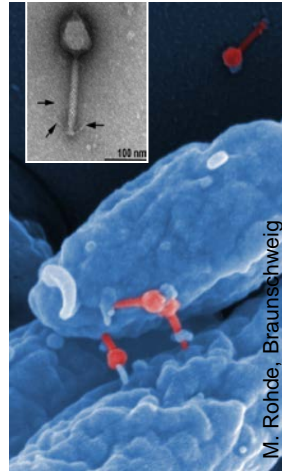
- **Phage4Cure** Start Sept. 2017; **Förderung: BMBF**
Systematische klinische Studie. Wenige Phagen gegen *P. aeruginosa* wurden ausgewählt (DSMZ) und werden gem. GMP aufgereinigt (Fh ITEM) für Therapie von Bronchiektasepatienten-Kohorte mit vorheriger Präklinik an Fh ITEM Hannover und Charité Universitätsmedizin Berlin. Phase I: Test an gesunden Probanden mit inhalativer Anwendung (Charité / Charité Research Organisation CRO). Phase II geplant: Bronchiektasepatienten-Kohorte mit passender *P. aeruginosa*-Besiedlung der Lunge, inhalative Anwendung. Phage4Cure beinhaltet **Etablierung einer Prozess-Plattform** am Fh ITEM sowie Studie der **Sicherheit & Effizienz von Phagenpräparaten** am Patienten.
- **PhagoFlow** Start April 2019; **Förderung: Innovationsausschuss des g-BA**
Praktikabilitätstestung magistraler Ansatz zur individuellen Behandlung von Infektionen v.a. der unteren Extremität. Patienten sollen von Phagen der DSMZ profitieren, die nach GMP-Aufreinigung (Fh ITEM) zu individuell zusammengestellten Cocktails in der Klinikapotheke (Bundeswehr-KH Berlin) auf ärztl. Anordnung nach Phagogramm gemischt werden. Erreger: ESKAPE. PhagoFlow beinhaltet **Etablierung einer Phagenbank nach GMP-Kriterien, Entwicklung eines Routine-geeigneten Phagogramms und den Machbarkeitsnachweis individueller Phagentherapie am Bundeswehr-KH.**



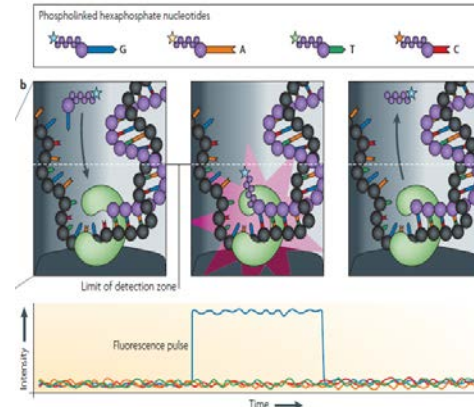
Establishing a phage therapy



Sewage water sample



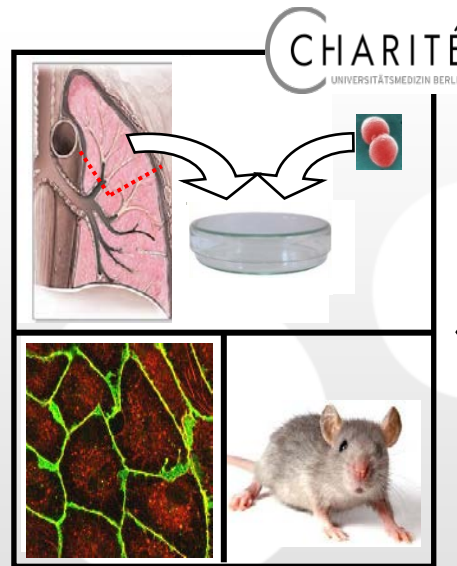
Phage isolation



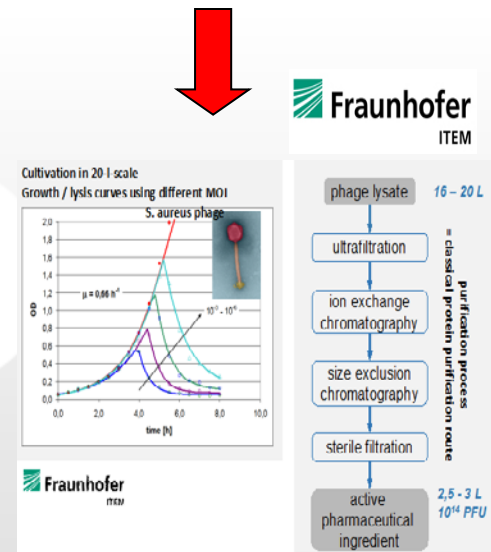
Genome sequencing



„first in man“



Preclinical evaluation



GMP production



Clinical trial of a phage therapy



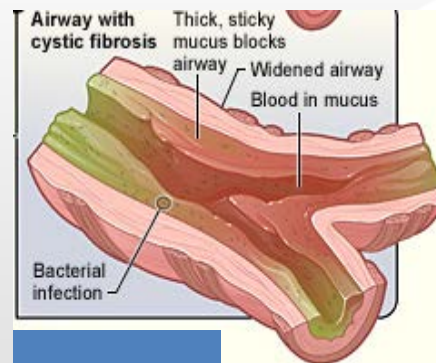
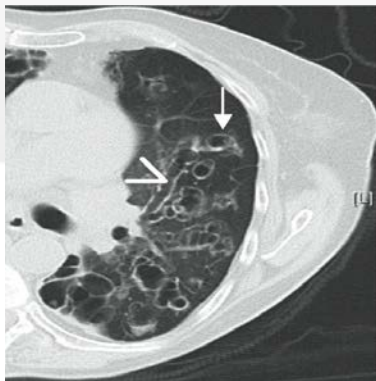
Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

(100% funding)

Experience &
Enthusiasm

~ €5 Mio.

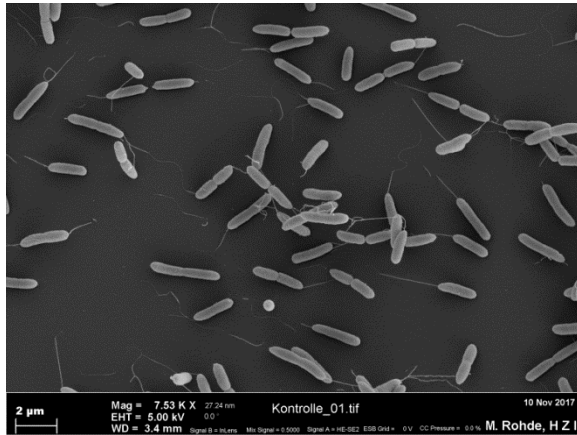
Patients with bronchiectasis and MDR *Pseudomonas* colonization



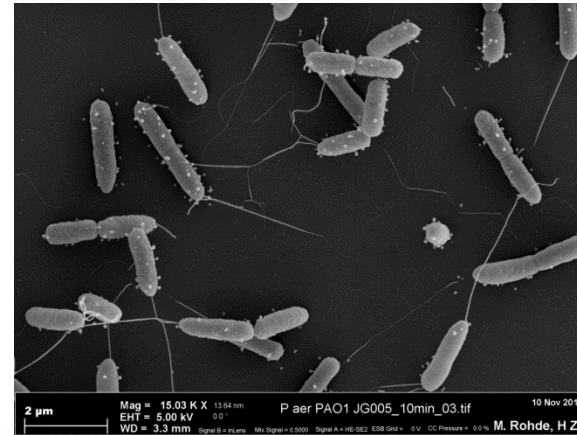
bronchiectasis



P. aeruginosa mit Phage

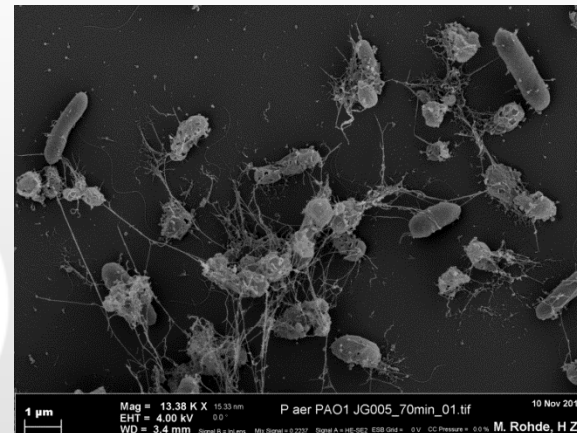


Kontrolle



Adsorption

Zellen in Kultur platzen und entlassen hohe Endotoxinmengen. Diese müssen für Therapiezwecke stark reduziert werden



Lyse

Klinische Studie *Phage4Cure*

<http://phage4cure.de/>

Partner: DSMZ, Fraunhofer ITEM Braunschweig & Hannover, Charité-Univ.-Medizin Berlin, Charité Research Organisation GmbH (CRO), Berlin

Förderung: BMBF

Projektlaufzeit: 3 Jahre plus Phase II

Start: September 2017 (DSMZ-Anteil 1 Jahr ab Feb 2018)

Patienten: Bronchiectase

Zielkeim: *P. aeruginosa*

Phagen: möglichst wenige synergistisch wirkende, „schmaler“ Cocktail

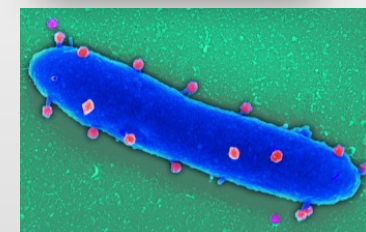
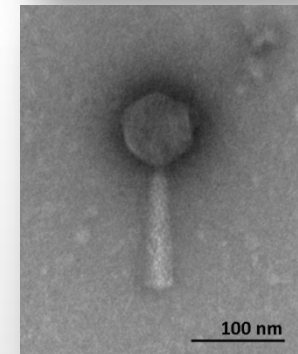
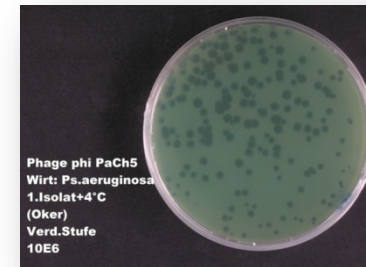
Darreichungsform: inhalativ

F & E Aufgaben DSMZ im Projekt (Feb 2019 abgeschlossen):

Charakterisierte respiratorische Klinik-Isolate breiten Ursprungs

(Prof. S. Häußler, HZI) zum Phagen-Screenen genutzt, 70 Phagen vs. 150 Isolate

- Quantitative Wirtsspektren-Vergleiche/EOP
- Lyseverhalten/-Kinetik & burst size, bakterielle Resistenzentwicklung
- Elektronenmikroskopie
- Effizienztestung Phagen einzeln, paarweise bzw. alle (Cocktail)
- Genomik: Bioinformatische Auswertung Phagen- & Produktionsstammgenome



PhagoFlow

Praktikabilitätstestung der magistralen Herstellung von Bakteriophagen zur Therapie septischer Infektionen an der unteren Extremität

www.Phagoflow.de

Partner: DSMZ, Fraunhofer ITEM Braunschweig, Bundeswehrkrankenhaus Berlin

Förderung: Innovationsausschuss g-BA

Projektlaufzeit: 3 Jahre

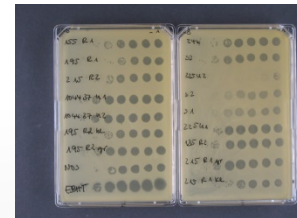
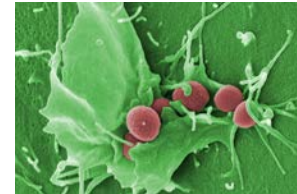
Start: April 2019 (DSMZ-Anteil 2 Jahre ab April 2019)

Patienten: septische Infektionen

Zielkeime: ESKAPE, nach Priorisierung

Phagen: möglichst viele gereinigte Monopräparate

Darreichungsform: lokal (und ggf. oral)

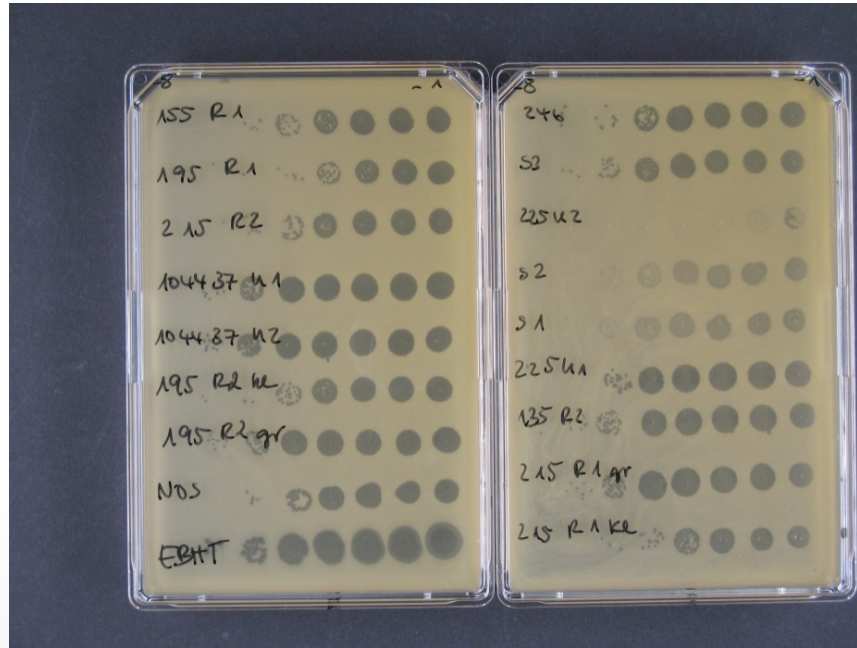


F & E Aufgaben DSMZ im Projekt (2 Jahre)

- Anlegen umfangreicher ESKAPE-Isolate-Sammlungen des Bundeswehr-KH Berlin an der DSMZ
- Isolierung neuer Phagen für PhagoFlow, Auswahl Produktionsstamm je Phage
- Quantitative Wirtsspektren-Vergleiche/EOP
- Lyseverhalten/-Kinetik & burst size, bakterielle Resistenzentwicklung
- Elektronenmikroskopie
- Genomik: Bioinformatische Auswertung Phagen- & Produktionsstammgenome
- Entwicklung Phagogramm-Prinzip



Phagogramm: wie und warum?



Beispiel:

18 verschiedene Phagen in Verdünnungsreihe im Test gegen klinisches Isolat von *S. aureus*

Das Phagogramm identifiziert geeignete Phagen für ein Patienten-Isolat und ist dem Antibiotogramm vergleichbar, hier mit Agar-Overlay-Assay. Eine Phagogramm-Technik wird für die Routine im Diagnostiklabor des Bundeswehr-Krankenhauses Berlin für **PhagoFlow** etabliert, um die bestgeeigneten Phagen für individuelle Therapie-Zusammenstellungen durch die Klinik-Apotheke zu kombinieren. Die ärztliche Entscheidung legt die individuelle magistrale Phagenmischung fest.

Womit wir uns zur Zeit beschäftigen – *in vitro*

Phage4Cure

- Entwicklung, Ursache und Häufigkeit bakterieller Phagenresistenz und Untersuchung der resistenten Mutanten (veränderte/zurückgewonnene AB-Suszeptibilität? Schlechteres Wachstum etc.?)



C. Rohde, G. Resch, J.-P. Pirnay, B. G. Blasdel et al., *Viruses* 2018; [10](#)

PhagoFlow

- Entwicklung eines nachhaltigen Phagogrammprinzips in der medizinischen Diagnostik gegen ESKAPE Bakterien
- Adaptierte Phagen-Isolierungsmethoden aus Wasserproben nach *Appelmans Protocol* (gerichtete *in vitro* Evolution) zur Phagen-Adaptation



B. H. Burrowes et al., *Viruses* 2019; [11](#)



Phagen-Sicherheit vs. „small molecules“

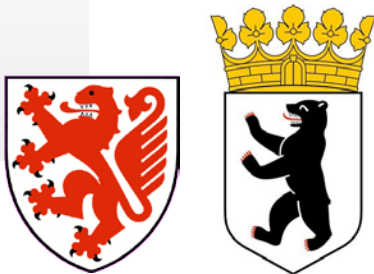
- Keine Toxizität bekannt
- Keine Phagengene in humanem Genom gefunden
- Degradation von Phagen nach Therapie vermutlich nach 2-3 Tagen
 - Überdosierung ohne Konsequenzen
 - Kein allergenes Potential bekannt

Beginn der Phagentherapie einst ... und 100 Jahre später in Deutschland



1919, Paris:

Félix d'Hérèle führt erstmals individuelle Heilversuche bei Kindern mit Ruhr / Diarrhoe im Kinderhospital Necker durch

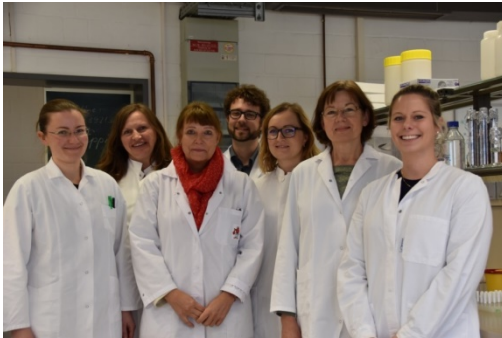


2019, Braunschweig-Berlin:

Das erste Projekt mit Ziel einer systematischen klinischen Studie startete 2017; die Praktikabilitätstestung magistraler Phagenanwendung startete 2019



Danke:



AG Phagen DSMZ:

Dr. Imke Korf, Stephanie Peter, Bettina Henze,
Dr. Johannes Wittmann, Dr. Lenka Tisakova, Susanne Schertler
sowie Prof. Manfred Rohde, ZEIM, HZI Braunschweig

Danke auch an alle Kooperationspartner:



Fraunhofer ITEM Braunschweig
Fraunhofer ITEM Hannover
Charité Universitätsmedizin Berlin, Med. Klinik mit Schwerpunkt
Infektiologie und Pneumologie
Charité Research Organisation GmbH Berlin



Fraunhofer ITEM Braunschweig
Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie,
Septisch-Rekonstruktive Chirurgie, Forschungs- und Behandlungszentrum
Septische Defektwunden



Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Klinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Klinikapotheke



Leibniz-Institut • DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!



„Turning a new phage“
L. Gravitz, Nature Medicine 18 (2012)