

Phagen – Viren gegen Bakterien



BAKT Interdisziplinäres Symposium Antibiotikaresistenz
Erlangen, 19.09.2016

Christine Rohde, Leibniz-Institut DSMZ



Die DSMZ – Auftrag und Schwerpunkte



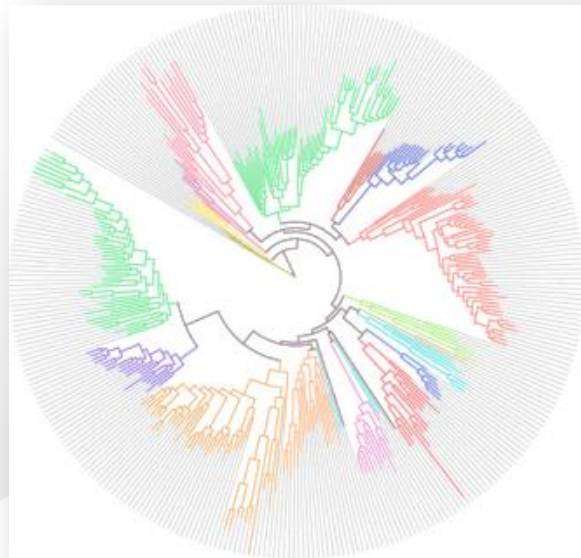
Sektion Lebenswissenschaften:
24 unabhängige Institute

Schlüsselprofil: Gesundheit & Biodiversität

Auftrag: Gesellschaftliche Relevanz

Die DSMZ als forschendes Bioressourcenzentrum

- Über 40.000 versch. Bioressourcen in 5 Abteilungen
- Sammlung, Service, Forschung
- Ökologie, Evolution, Wirkstoffforschung
- Medizinisch relevanter Schwerpunkt in Sammlung & Forschung



Maximum-likelihood phylogenetic tree of the bacterial domain. D.Y. Wu et al.: NATURE 462 (2009)



Mikroorganismensammlung der DSMZ

Bioressourcen für Forschung, Industrie, Lehre



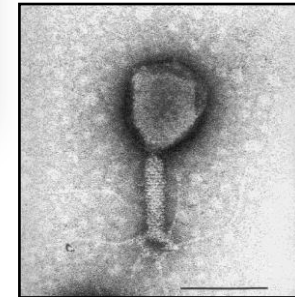
Mehr als 350.000 Ampullen
gefriergetrockneter Mikroorganismen

Phagensammlung expandiert mit
anwendungsbezogenen Vorhaben, **Sammlung**
& **Forschung** gehen Hand in Hand, **DZIF***-
Ressourcen werden genutzt

*DZIF Deutsches Zentrum für Infektionsforschung



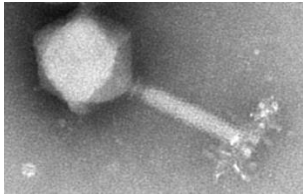
Alle Stämme – auch
Phagen – werden
für die Langzeit in
LN aufbewahrt



Phage T4



Was sind Bakteriophagen (Phagen)?



Phage CBA 120
(E. Kutter)

Viren, die nur Bakterien artspezifisch befallen und lysieren



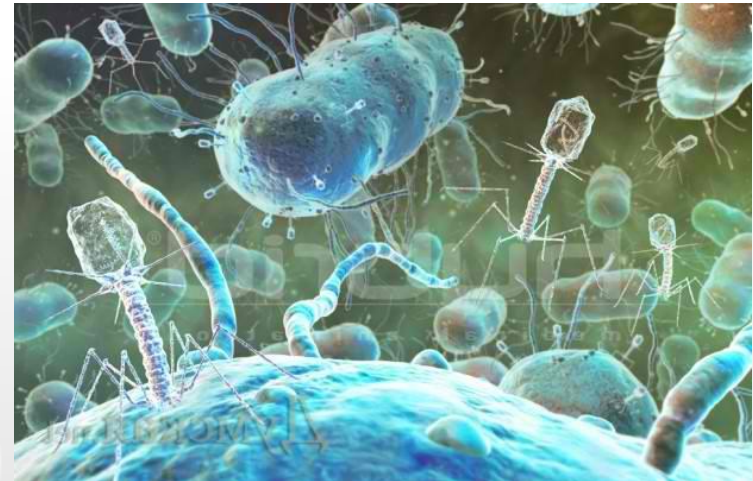
bbc.com

**Video auf DSMZ-Homepage:
<https://www.dsmz.de/catalogues/>**

In den globalen biogeochemischen Zyklen dominieren Prokaryonten die Eukaryonten. Phagen als auf ein Minimum reduzierte Lebensform sind im prosperierenden Mikrobemix seit Urzeiten die stärksten evolutiven Kräfte in Co-Evolution mit ihren Wirtsbakterien.

Zum Verstehen ihrer Rolle ist es nötig, die Prinzipien der **Phage-Bakterium-Beziehung** zu kennen.

A. Buckling & P.B. Rainey (2002); M. Clokie et al., Phages in nature (2011); C. Rohde & J. Sikorski, Nat. Rundschau 64 (2011)



phages.org



10³¹ Phagen in der Biosphäre

Phagen sind die häufigsten lebenden Einheiten und ein Kennzeichen prokaryotischer Existenz. Die häufigsten Viren sind Phagen.

Phagen kommen in allen Habitaten vor, inkl. des menschlichen und tierischen Mikrobioms

Mtkvari (Kura)

Tbilisi, Georgien, Quelle vieler Phagen des bekannten ELIAVA Instituts



Oker

Braunschweig, Quelle vieler neuer Phagen für Forschung und Anwendung

Wir leben in einem Ozean von Viren!

(J.S. Weitz & S.W. Wilhelm, *The Scientist*, 2013)

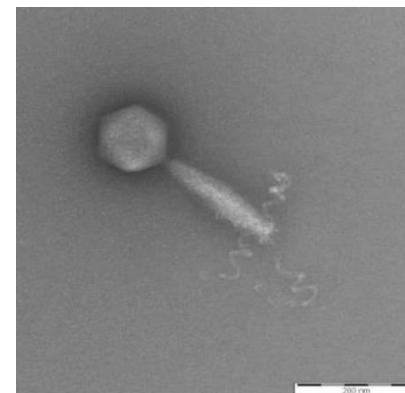
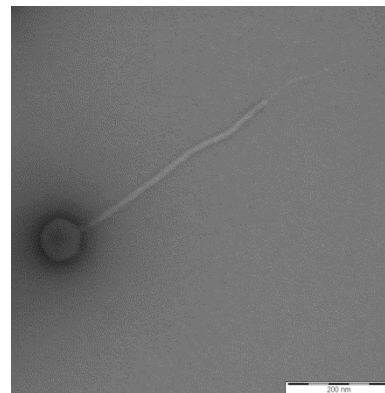
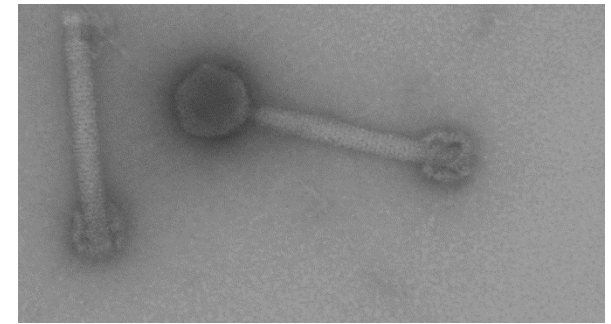
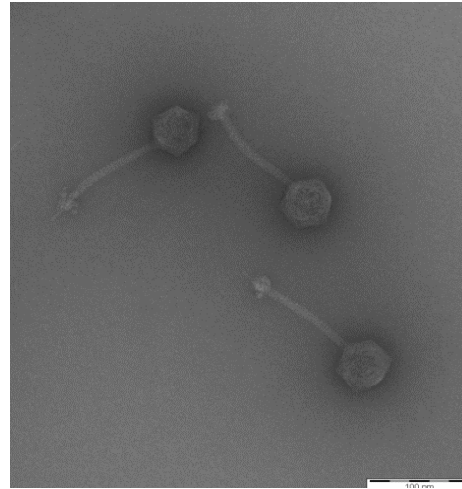
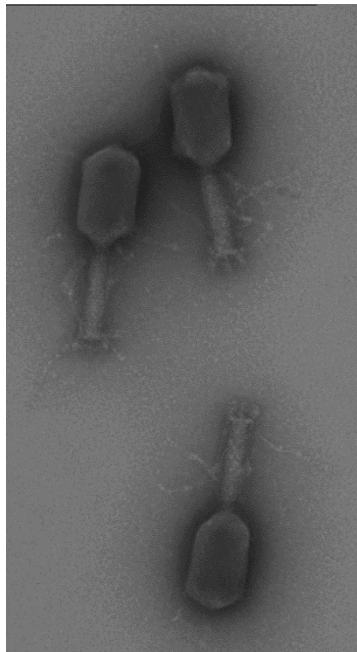


K. Schneider, *The Scientist*

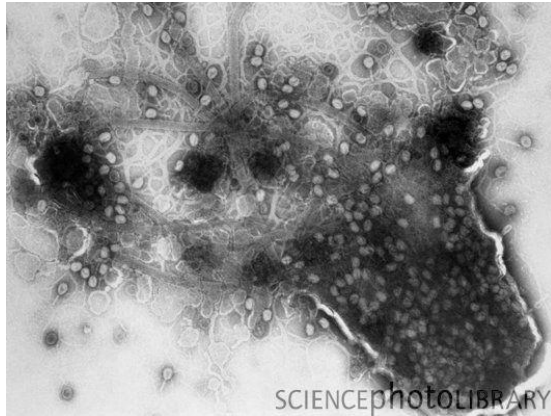
Einige Phagen-Morphotypen

Lake Elmenteita, Kenia

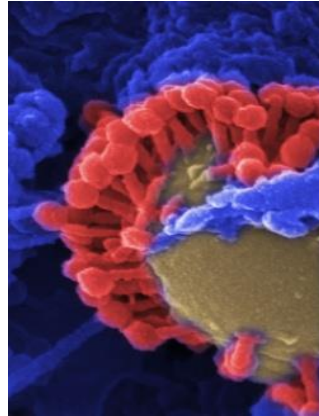
(J. Khayeli, Diss., DSMZ 2014)



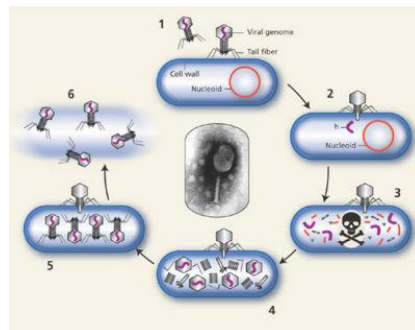
Wirkung lytischer Phagen: die lysierte Bakterienzelle wird zur Phagenfabrik - Beispiele



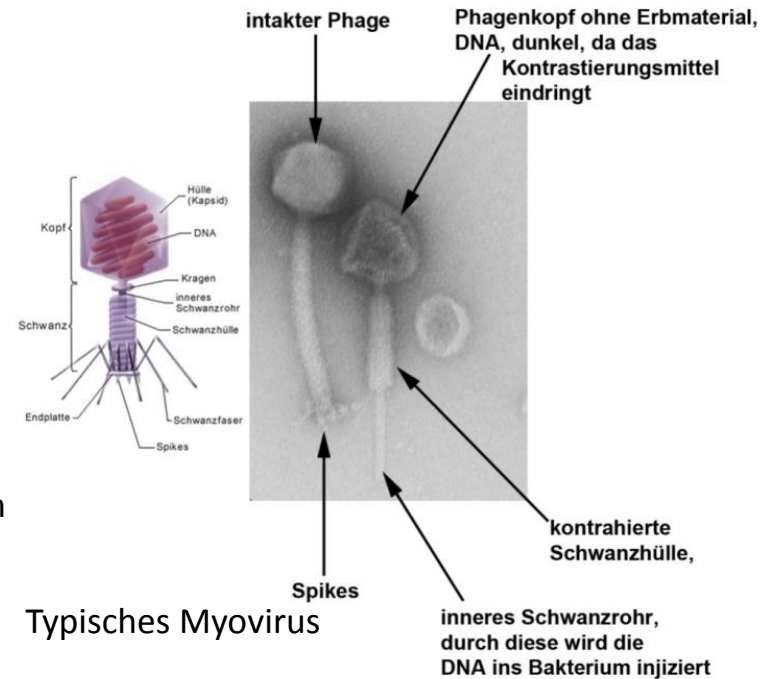
Phage T4 lysiert mit eskalierender Zahl eine *E. coli* Zelle. Interner Druck von 3-5 atm (V. Fischetti) führt zum Platzen.



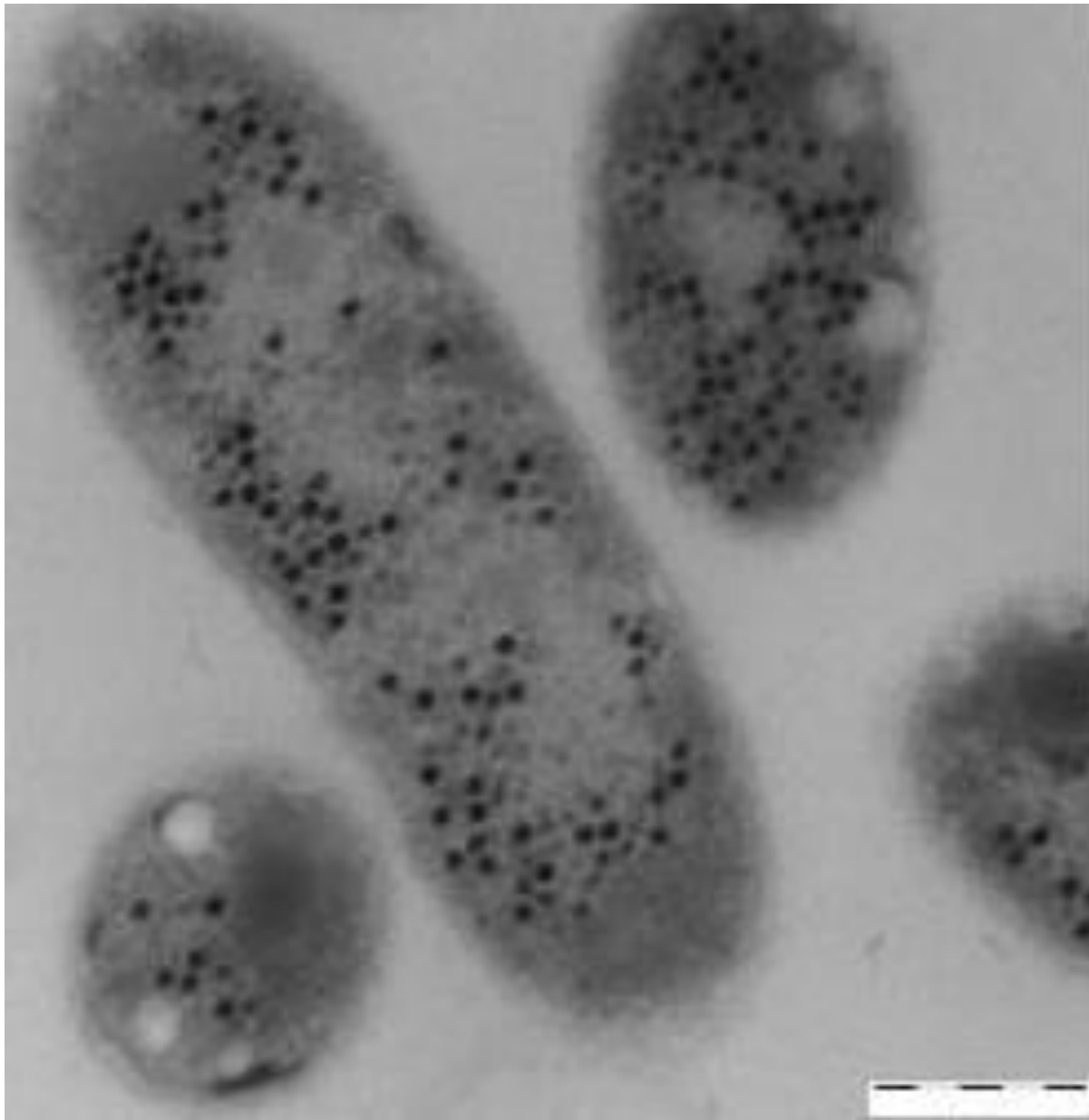
SEM: Phage Sb-1 auf MRSA-Zelle nach 5 Min. Inkubation (Sb-1, ELIAVA Inst.)



Der lytische Zyklus



Typisches Myovirus



Ultradünnschnitt, TEM:
Achromobacter xylosoxidans 90 Min.
nach Infektion mit Phage JWAlpha

Phagen: 10^{31} global players - Phagenwelt in Zahlen

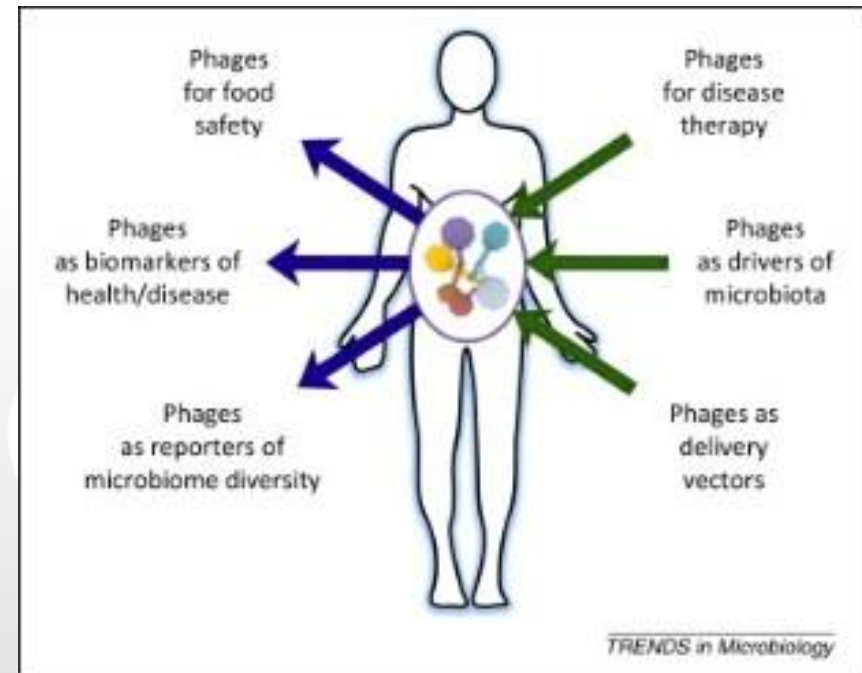
- Die Mehrheit aller viralen aktiven Einheiten befallen Bakterien
- 1 mL Ozeanwasser enthält bis 10^8 Viren, meist Phagen
- Phagen lysieren laufend 20-40% der Bakterien in diversen Habitaten
- Die globale Rate viralen Genaustausches wird auf 20×10^{15} /Sekunde geschätzt (S.C. Jiang & J.H. Paul, 1998)

Das **humane Mikrobiom** ein komplexes Habitat.

Sein **Phageom** reguliert die mikrobielle Balance. Der Mensch hat ständigen Kontakt zu Phagen (Wasser, Nahrung, Umwelt).

Phagen gestalten unser individuelles Mikrobiom. Wir tragen ca. 100 x mehr Phagen mit uns als eigene Körperzellen.

K. Califf et al.: The Human Microbiome: Getting Personal, *Microbe* 9, 2014



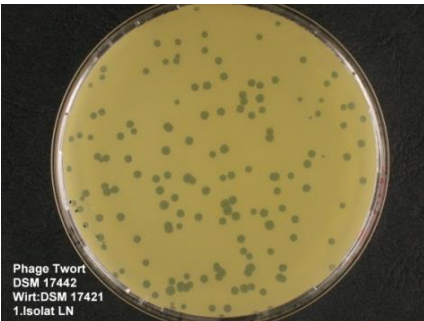
Phagenanwendung in der Humanmedizin

Der Beginn



1915: Frederick W. Twort, Arzt, London (sgm.ac.uk), erkannte ein übertragbares Prinzip:

„The bacteria appeared to be afflicted with some disease“
(LANCET 11, 1915)



Staphylococcus-Phage „TWORT“, 1948 > Inst. Pasteur, Paris > Félix d’Hérelle Collection, Univ. Laval, Quebec > DSMZ



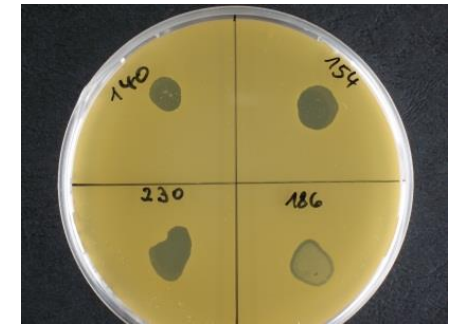
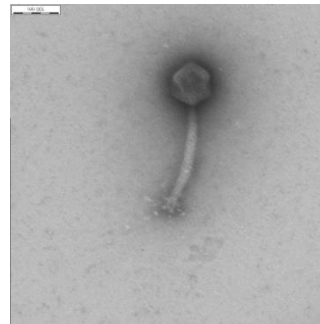
1917: Felix d’Hérelle , Mikrobiologe, Frankreich/Kanada: erste Phagenanwendungen gegen Cholera und Pest in Indien ab 1917. Namensgeber der „Phagen“
(*The bacteriophage inquiry of 1927-1936*; J. of the History of Medicine & Allied Sciences, 1993)

ELIAVA-Institut IBMV, gestern & heute



George Eliava & Felix d'Hérelle: gründeten 1923 das **ELIAVA Institut (später IBMV)**, Tbilisi, Georgien, wo seither lytische Phagen routinemäßig als Monopräparate & Cocktails für Therapiezwecke hergestellt werden.

Phagenpräparat „Staphage“ (Apotheke, Tbilisi) mit Phagen des Typ Sb-1 (weites Wirtsspektrum) gegen *S. aureus*, hochgereinigt; TEM-Foto; 4 Phagen im Wirtsspektrum-Test gegen klinische *S. aureus* (u.a. Isolate der MHH, durchgeführt in DSMZ)



- <http://www.phagetherapycenter.com>: *Scientific literature: Human trials* (chronolog. Überblick)
- *A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research* (IBMV, 2009)
- Kontakt: mailbox@phagetherapycenter.com





Originalampullen (1930er), Phagenpräparationen gegen *C. perfringens*,
C. histolyticum und Bacté-Coli-Phage, Bacté-Pyo-Phage

- Der DSMZ freundlich überlassen vom ELIAVA Institut -

Frankreich's Phagenhistorie und Félix d'Hérelle

Daten: S.T. Abedon et al. (2011), Bacteriophage 1

1919: d'Hérelle begann, Dysenterie-erkrankte Kinder im Krankenhaus zu behandeln (Paris)

Wenige Jahre später: Phagenpräparate produziert von Laboratoire du Bactériophage, Paris:

Bacté-coli-phage,
Bacté-intesti-phage,
Bacté-pyo-phage,
Bacté-rhino-phage,
Bacté-staphy-phage



FIGURE 14.2 Advertisement for phage preparations from *Laboratoire du Bactériophage* in Paris, France, 1936. (Photograph from Dr. William Summers' archives)

1939: Monographie von *La Médecine* berichtete von erfolgreichen Behandlungen von Dysenterie, Typhus, akuter Kolitis, Peritonitis, Prostata und UTI Infektionen, Furunkulose, Sepsis, Ohr- und Halsinfektionen.

1961 / 1976: Reviews von J. F. Vieu (Pasteur bacteriophage service) über Phagentherapie in Frankreich, bes. gegen *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* und Coliforme.

1976: Inst. Pasteur, Lyon, produzierte > 60 Therapie-Phagenpräparate

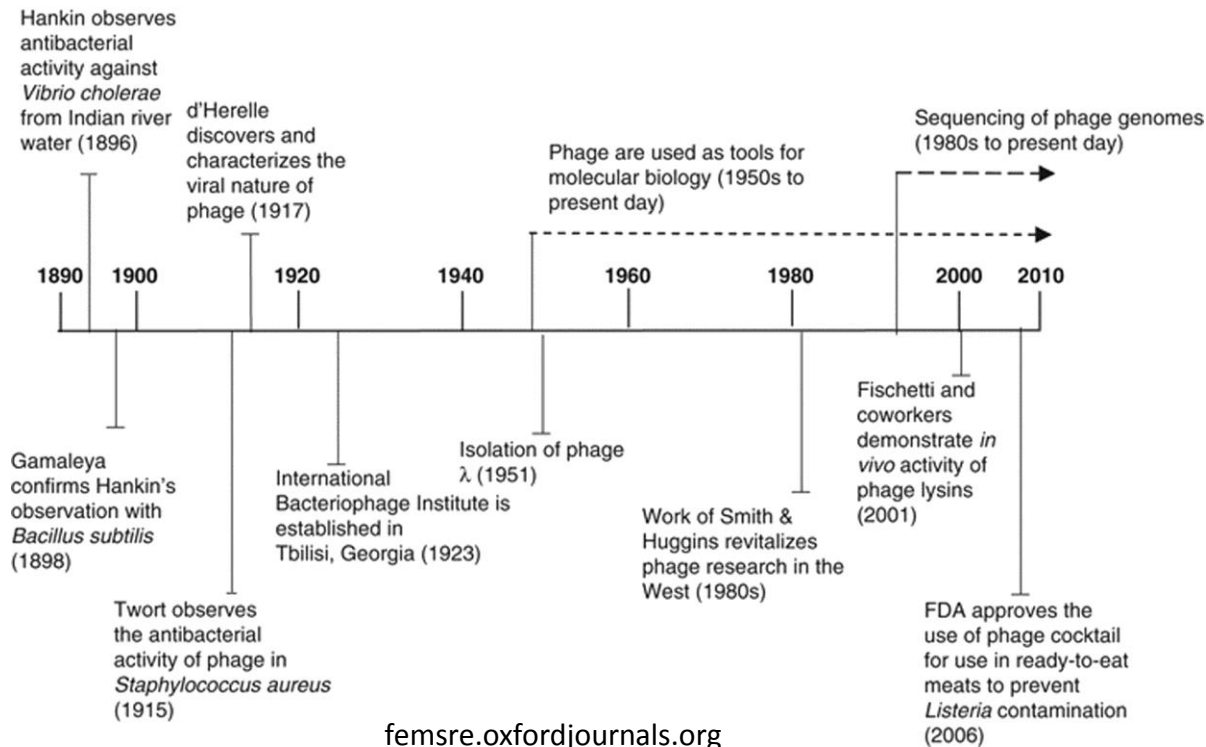
Phagentherapie

PERSPECTIVES, a century of the phage: past, present & future

G. Salmond & P. Fineran: Nature Reviews (2015)

- 100 jährige Zeitgeschichte -

Phagenvielfalt, Phangenomik und Phagenfähigkeiten sind so enorm, dass von einem unvorhersehbar spannenden 2. Jahrhundert der Phagenforschung gesprochen wird



S. auch S. Abedon et al. (2011): *Phage treatment of human infections*. Bacteriophage: Großer Überblick inkl. Monographien; frühe französische Phase, damals die meisten Phagentherapien gegen *S. aureus* (noch in 1976)

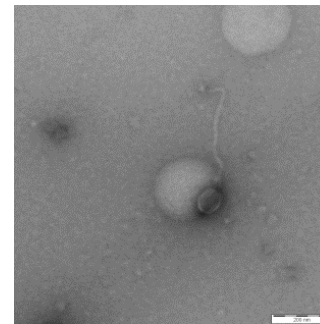
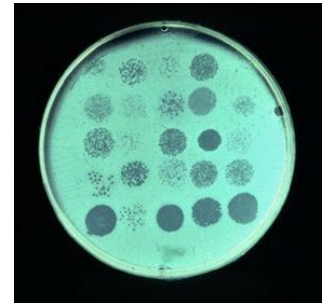
Was macht Phagen so interessant?

Beste Taxonomen der Bakteriologie!

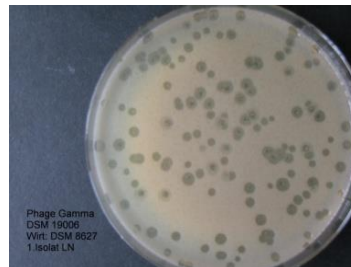
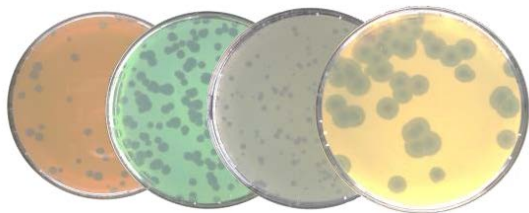
Ihre Spezifität hilft bei medizinisch relevanten Fragen:

- Evolution / Populationsgenetik Pathogener besser verstehen
- Pathogene typisieren (zB *Salmonella* typing am RKI)
- Coliforme identifizieren (Trinkwasser; zB phiX174) oder
- gefährliche Pathogene (zB gamma gegen *B. anthracis*)
- als Modellsysteme in humaner Virologie zu fungieren (zB MS2 / HIV)
- M13-Modell zur Erforschung der Pathologie neurodegen. Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson)*
- in Therapieanwendungen

* Phage M13-Capsidprotein als generelles Amyloid-Interaktions-Motiv (GAIM). R. Krishnan et al. (2014) J. Mol. Biol. 426



Neuer Phage **vB_BanS-longtail** gegen *B. anthracis*



B. anthracis?
B. anthracis!



Kooperation ELIAVA-Institut IBMV - DSMZ



Foto*

- 2008: Memorandum of Understanding
- Gemeinsame Studie: Phagen gegen klin. *S. aureus*: L. Kvachadze et al. *Microbial Biotechnol.* 4 (2011)
- Phagen gegen *Achromobacter xylosoxidans* der DSMZ¹ wurden kürzlich im IBMV für Therapie Zwecke adaptiert
- 2016: Phagen gegen *A. baumannii*, präklin. Mausmodell: Charité - DSMZ - IBMV
- 2016: Publikation: 60 Teilnehmer, 12 Nationen (Roundtable Tbilisi Okt. 2015): *Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy*. *Biotechnol. J.* 11

*freundl. Genehmigung Eliava-Inst. & M. Rohde, HZI

¹(J. Wittmann et al.: *Viol. J.* 1(2014); J. Wittmann et al.: *PLOSone* 9 (2014)



Phagenforschung an der DSMZ

Leitmotiv bakterielle Diversität zur Selektion neuer Phagen nutzen

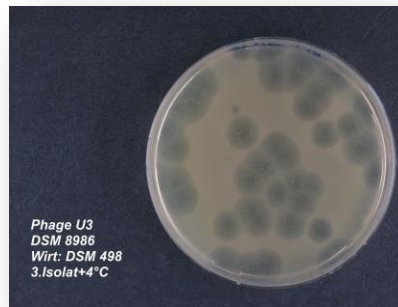
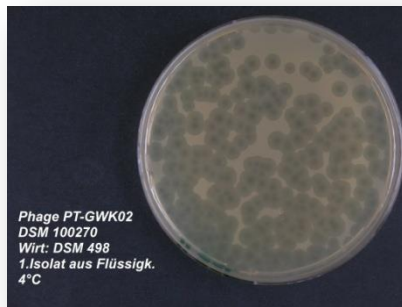


Coliphagen sind leicht isoliert

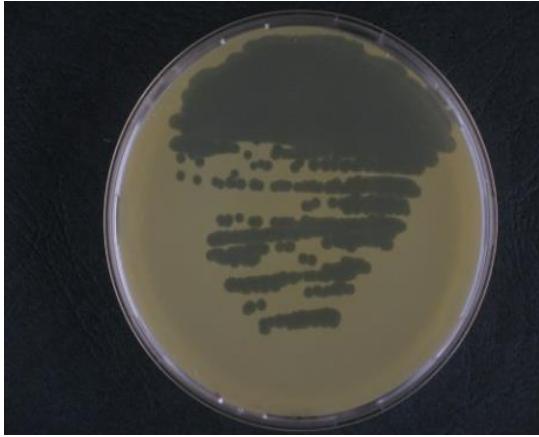
GWK02 (Univ. Saarbrücken)

U3: wichtiges Werkzeug

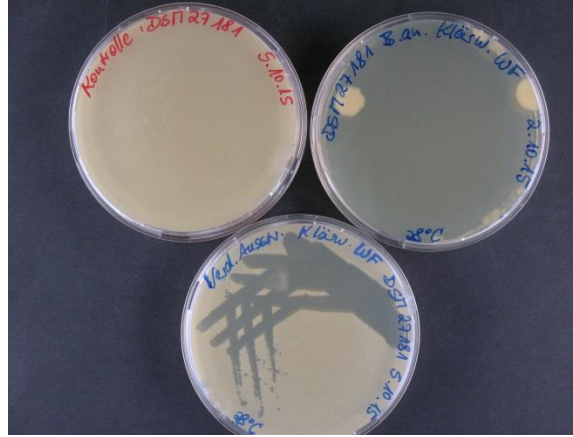
PT-XU-05



Phagen authentisch für die Zukunft bewahren



Phage für *Stenotrophomonas humi*



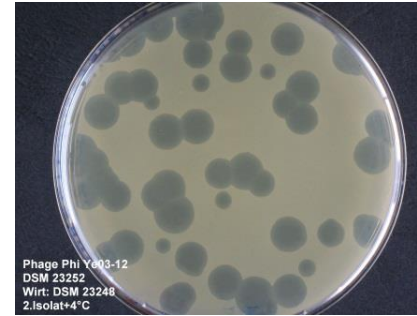
Phage aus Klärwasser gegen *B. anthracis*



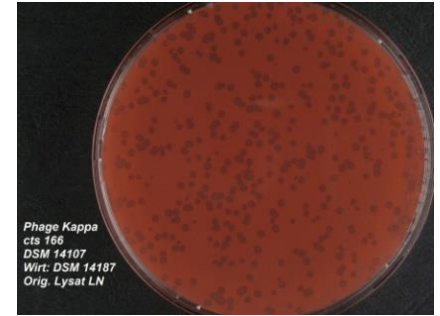
Reinigungsausstrich Einzelplaques



Phage T4 Vakuum-getrocknet & revitalisiert



Phage Ye03-12 gegen
Y. enterocolitica



Phage kappa gegen
S. marcescens

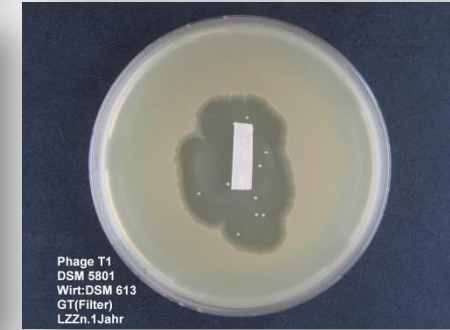
- 4°C-Arbeits-Stock
 - LN-Vorrat
 - Vakuum-Ampullen
- } Langzeit



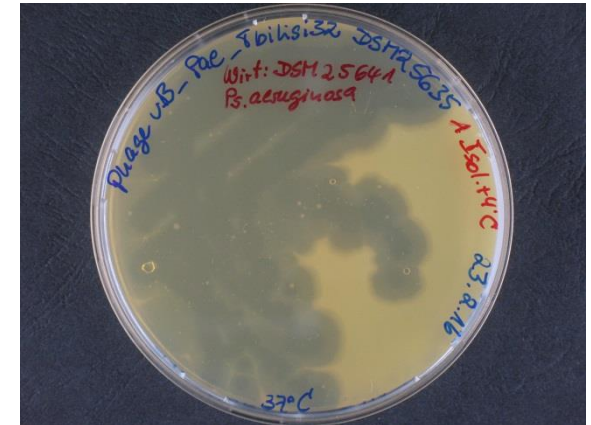
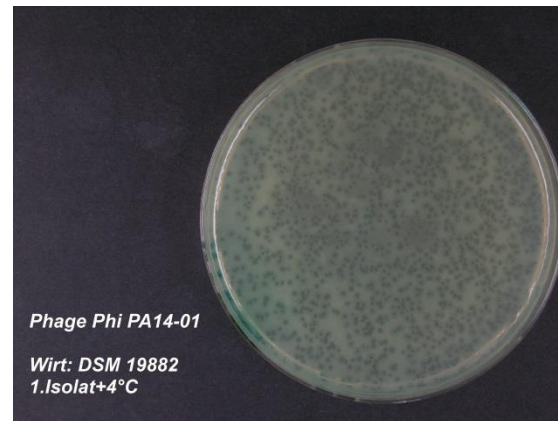
Service for Science – Science for Service

Authentische Bioressourcen für die Wissenschaft

DSMZ: zwei SOP-geführte Langzeit-Konservierungsmethoden auch bei Phagen
– Vakuumtrocknung: ein Plus -



Biologische Phagen-Parameter beurteilen



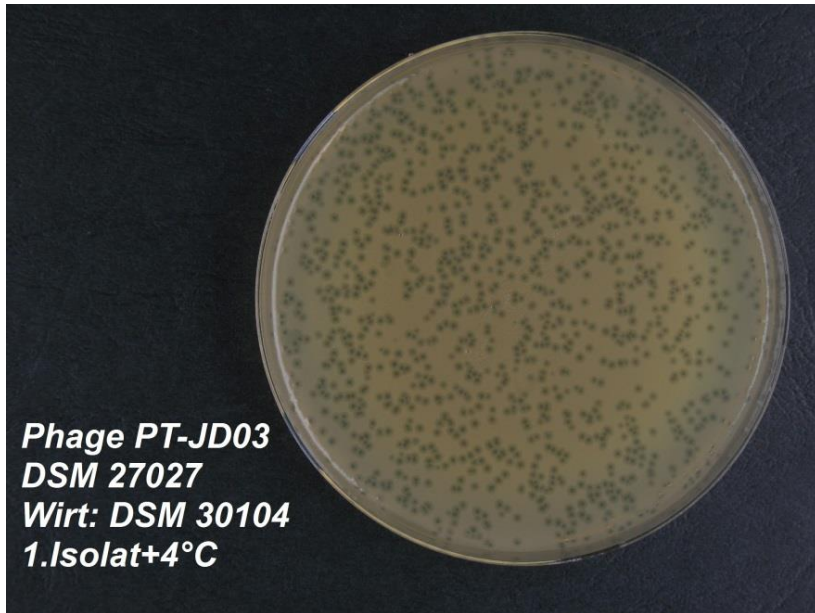
Phagen gegen *A. pittii*, *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa*

- * Plaque-Größe
- * Trübheit
- * Halo
- * Grad bakt. Resistenz
- * burst size
- * efficiency of plating
- * Umweltresistenz

Stabilität von Phagensuspensionen

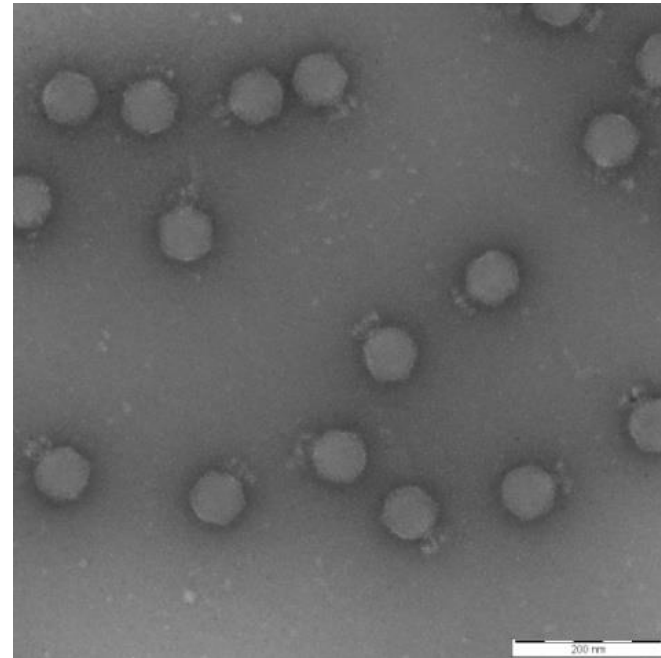
Üblicherweise sehr gut:

- Monopräparate & Cocktails bei 5°C, 1 Jahr ohne Titerverlust
 - Titerbestimmung einfach & präzise: Agar-Overlay



Phage für *K. pneumoniae*

Unerlässliche QC: TEM

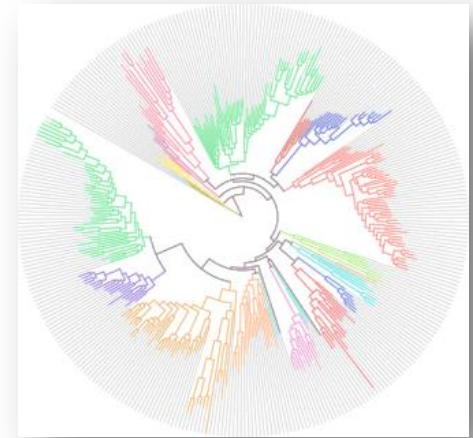


Das Wissen über Phagen

Erst seit wenigen Jahren trägt die (Meta-)Genomik

- * erheblich
- * immer schneller
- * immer präziser
- * immer kostengünstiger

zum Wissen über Phagen auf dem Planeten, im humanen Mikrobiom und in allen möglichen Habitaten bei.

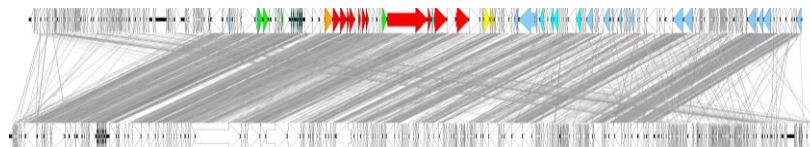


CsCl-Dichtegradient
mit ganzen Phagen

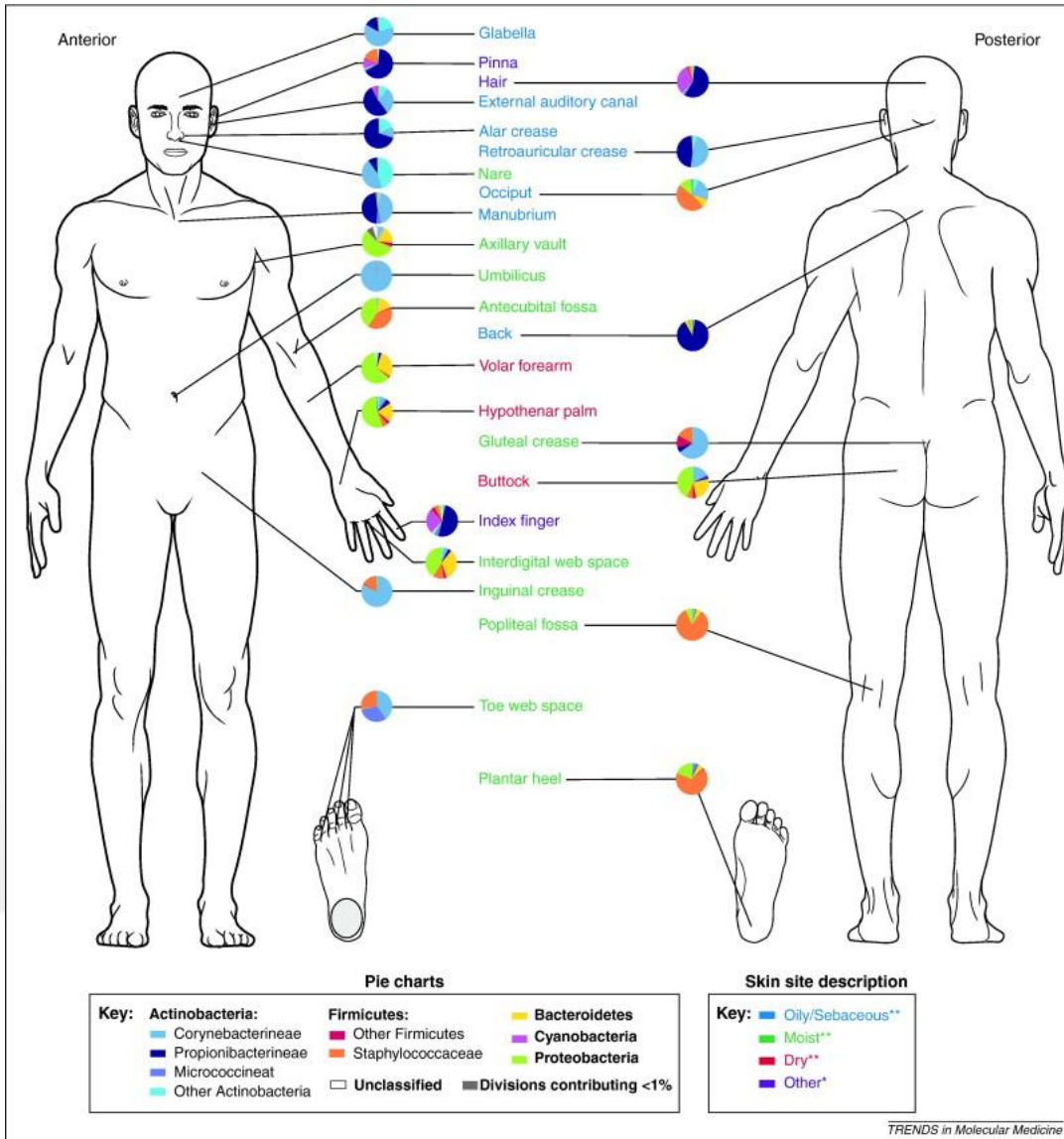


PacBio RS II
Sequencer der DSMZ
basiert auf single
molecule, real-time
Technologie (SMRT)

Ein Phagengenom
ca. 100 €



Metagenomik > Mikrobiom > Phageom



Metagenomik kann die Rolle von Mikrobiom-beteiligten **Bakterien** aufklären > **indigene Mikrobiota**



Unser Mikrobiom trägt viele **opportunistisch pathogene Bakterien**, darunter **ESKAPE-Keime** und **Zoonoseerreger** > der Patient bringt sie **inkl. multiresistente** als stille Gefahr mit ins Krankenhaus

Globale MDR Krise



MRSA: Methicillin resistente *S. aureus*
VRE: Vancomycin resistente Enterokokken

ESKAPE:

Enterokokken (VRE)

S. aureus (MRSA)

K. pneumoniae (Carbapenem resistant)

A. baumannii (oft intrinsisch resistant)

P. aeruginosa

Enterobacteriaceae (**ESBL**)

3MRGN, 4MRGN etc.....

400.000 - 600.000 nosokomial erworbene Infektionen/Jahr für Deutschland berichtet und mind. 25.000 Todesfälle in der EU. Die Antibiotika-Pipeline ist leer.

<http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/>



WHO Global Surveillance Report 2014, **ReAct** und G7



Ziel der DSMZ:

Substanziell große Sammlung von Phagen gegen

1. Priorität: ESKAPE-Keime
2. Priorität: andere Opportunisten

etablieren und für die Zukunft vorhalten

ReAct : Global Action Plan on AMR

„AMR requires global collective action: access, conservation, innovation“!

<http://www.reactgroup.org/>
react@medsci.uu.se

(Feb 2015 Report: Uppsala University)

Thema des Weltgesundheitsgipfels Berlin, Okt. 2016!



International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) Report 2014

6 Jahres-Studie 2007 – 2012

In 503 ICUs in Lateinamerika, Asien, Afrika, Europa

Detaillierter Überblick über Antibiotikaresistenzlage,
Indikationslagen und Häufigkeiten von zB Katheter-
assoziierten UTI, Beatmungs-assoziierten Pneumonien
etc.

Warum Phagen als Option in der Humanmedizin?

Internet-Treffer:

„*Multi-drug resistant (MDR) bacteria*“: ca. 3.440.000

<http://www.bionity.com/de/news>: dpa, 03.06.2015:

„Ohne scharfes Umsteuern beim Einsatz von Antibiotika wird sich die Zahl der Toten durch multiresistente Keime drastisch erhöhen ... geht aus einer Studie der **Berliner Charité** hervor, ... warnen die Autoren, dass sich die Zahl der Toten von jetzt weltweit etwa 700.000/Jahr ohne Gegenmaßnahmen bis 2050 auf 10 Mio erhöhen wird. Für Europa ... Anstieg von jetzt 23.000 auf 400.000 prognostiziert

... gehört zu den größten Gefahren für die menschliche Gesundheit“.

Öffentliches Interesse stark gestiegen

EU Research Participants Portal: Personalising health and care, Calls 2020

„Personalised medicine has the potential to respond to, amongst others, the increasing burden of chronic disease and the complexity of co-morbidities and in doing so contribute to the sustainability of health and care systems....

Personalised medicine refers to a medical model using molecular profiling for tailoring the right therapeutic strategy for the right person at the right time, and/or to determine the predisposition to disease and/or to deliver timely and targeted prevention.“

EMA, European Medicines Agency, London

Workshop on Therapeutic use of Bacteriophages 08. Juni 2015

Ca. 60 Experten/Interessenvertreter diskutierten praktische und regulatorische Aspekte für die Zulassung von Phagenpräparaten im Vergleich zu statischen Drogen



- * **Klare Definitionen** zur Präzisierung aller Details, Beteiligte müssen alle Prozesse verstehen > Basis für **Entwurf einer neuen Regulative**
- * Sie muss **nötige Infrastruktur** vorgeben > Basis für **zuverlässige Prozessketten**
- * **Mehr klinische Studien** mit verschiedenen medizinischen Targets und Forschung nötig **zur Absicherung der Datenlage** und um Effizienz und Sicherheit von Phagenpräparaten zu demonstrieren
- * Erst so kann Phagentherapie standardmäßig eingesetzt werden
- * **Rolle der EU** Kommission zügig verhandeln

Commentary: L. Debarbieux et al. (2016): *A bacteriophage journey at the European Medicines Agency*

P.H.A.G.E. – Non-profit Organisation

PHAGES FOR HUMAN APPLICATIONS GROUP EUROPE

<http://www.p-h-a-g-e.org>



Direktive EC/2001/83 („Human Code for Medicines“) hat Phagen nicht definiert. P.H.A.G.E. arbeitet an einer Regulative zur Wieder-Einführung der **Phagentherapie als Therapiekonzept** in Europa.

Relevante Fragen:

Industrieller Maßstab oder Klinik-basiert, individualisiert, Patientenspezifisch, „Phages On-Demand“?

P.H.A.G.E. und DSMZ unter MoU: **Therapiephagenbank an der DSMZ:** potentiell geeignete Phagen verfügbar machen für weitere

Aufreinigung:

<https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/>

- J.-P. Pirnay et al., Pharm. Res. (Jan 2015)
- G. Verbeke et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. (Feb 2014)
- M. Merabishvili et al., PLoS One (Mar 2009)



Phagentherapie: ein Therapiekonzept

„Regulation needs to be adapted to phage therapy and not vice versa“
(A. Fauconnier)

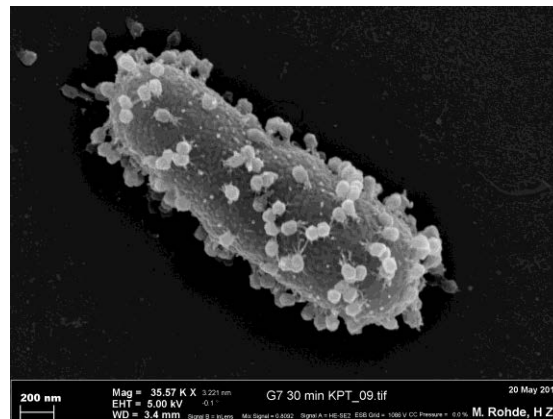
- Phagen für die Mainstream Medizin: wie geht es weiter in Europa? -

G. Verbeken et al.: *Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy* (2014) interviewten 35 Experten zu folg. Basisfragen:

- *Definition Human Medicinal Product
- *Therapeutische Aktivität eines Phagen
- *Verabreichungs-Route
- *Mögliche Nebenwirkungen
- *Physiko-chemisch-biologische Tests
- *Vergleichbarkeit natürlicher Phagen mit Vakzinen?
- *Phagen und die Definition eines ATMP (**A**dvanced **T**herapy **M**edicinal **P**roduct)
- *Marketing Authorization
- *Over-the-Counter Abgabe
- *Bedarf für neues Regelwerk

Therapeutisches Prinzip lytischer Phagen

- **spezifisch**: zielgerichtet gegen Stämme einer Bakterienart
- **Selbstreplizierend & selbstlimitierend > selbstregulierend** am Infektionsort, danach Zerfall und Abbau durch Reticuloendothel



Was macht Phagen spezifisch?

Glycolipide, Membranproteine (OmpC, OmpF...), Flagellenproteine usw

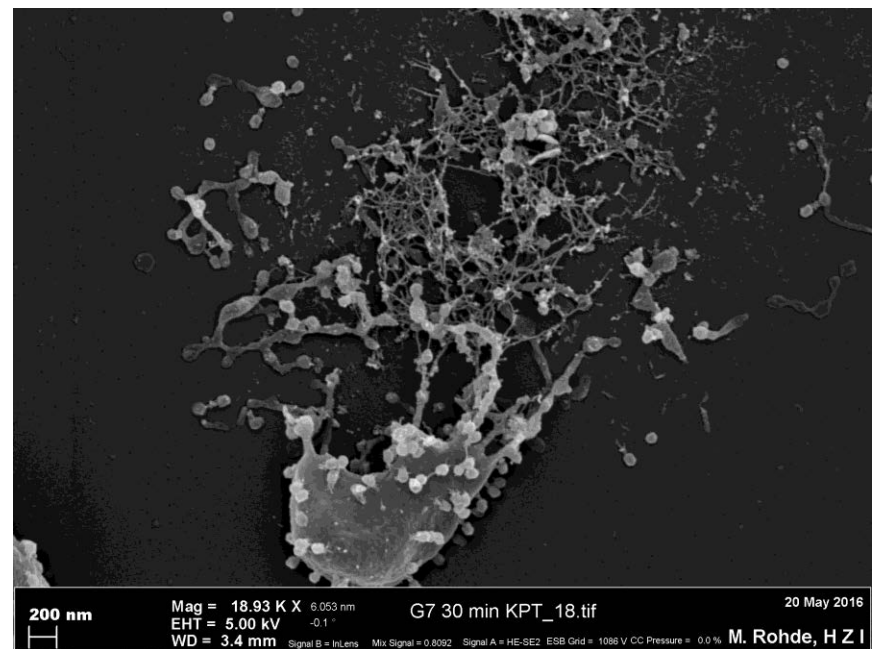
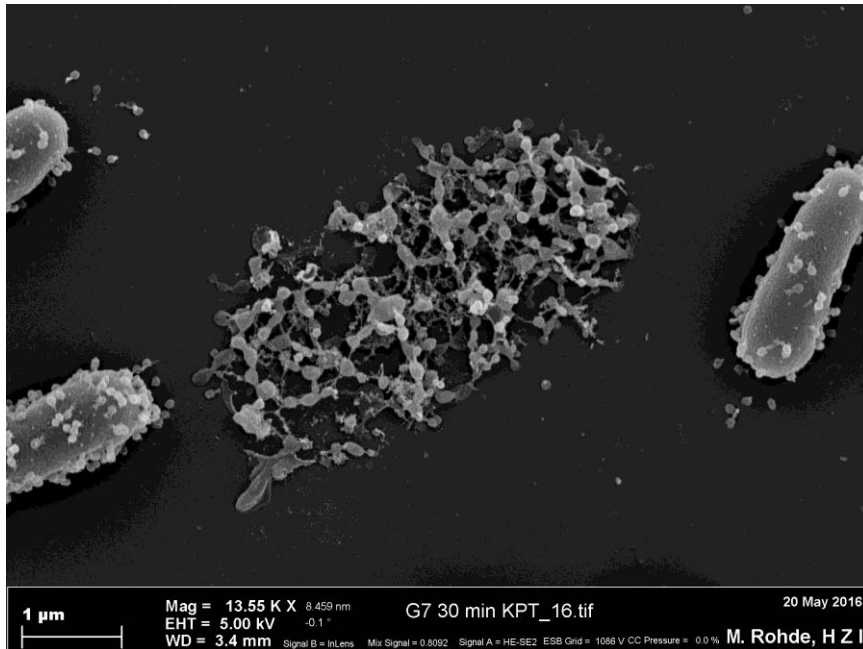
Bakterielle Resistenzentwicklung:

- Fakt! Aber ohne nachhaltige Konsequenzen
- geringer bei evolvierten/adaptierten Phagen, die öfters über ihren Wirt passagiert wurden (Studien an *P. aeruginosa* PAO: V.-P. Friman, A. Betts)

Prinzip lytischer Phagen

Beispiel Phage G7 gegen *A. baumannii*
Laufendes präklinisches *in vivo* Maus-Lungenmodell

Charité Pneumologie, Lunglab 2016, AG M. Witzenrath



Phagen vs. Antibiotika – Vor- und Nachteile beider antimikrobieller Ansätze

aus: *NOVOMED* Integrative Medicine Center of Georgia, <http://www.phagetherapy.com/>

Comparison of the Prophylactic and/or Therapeutic Use of Phages and Antibiotics

Bacteriophages

Very specific (i.e., usually affect only the targeted bacterial species); therefore, dysbiosis and chances of developing secondary infections are avoided.

Replicate at the site of infection and are thus available where they are most needed.

No serious side effects have been described.

Phage-resistant bacteria remain susceptible to other phages having a similar target range.

Selecting new phages (e.g., against phage-resistant bacteria) is a relatively rapid process that can frequently be accomplished in days or weeks.

Antibiotics

Antibiotics target both pathogenic microorganisms and normal microflora. This affects the microbial balance in the patient, which may lead to serious secondary infections.

They are metabolized and eliminated from the body and do not necessarily concentrate at the site of infection.

Multiple side effects, including intestinal disorders, allergies, and secondary infections (e.g., yeast infections) have been reported.

Resistance to antibiotics is not limited to targeted bacteria.

Developing a new antibiotic (e.g., against antibiotic-resistant bacteria) is a time-consuming process and may take several years.

Comments

High specificity may be considered to be a disadvantage of phages because the disease-causing bacterium must be identified before phage therapy can be successfully initiated. Antibiotics have a higher probability of being effective than phages when the identity of the etiologic agent has not been determined.

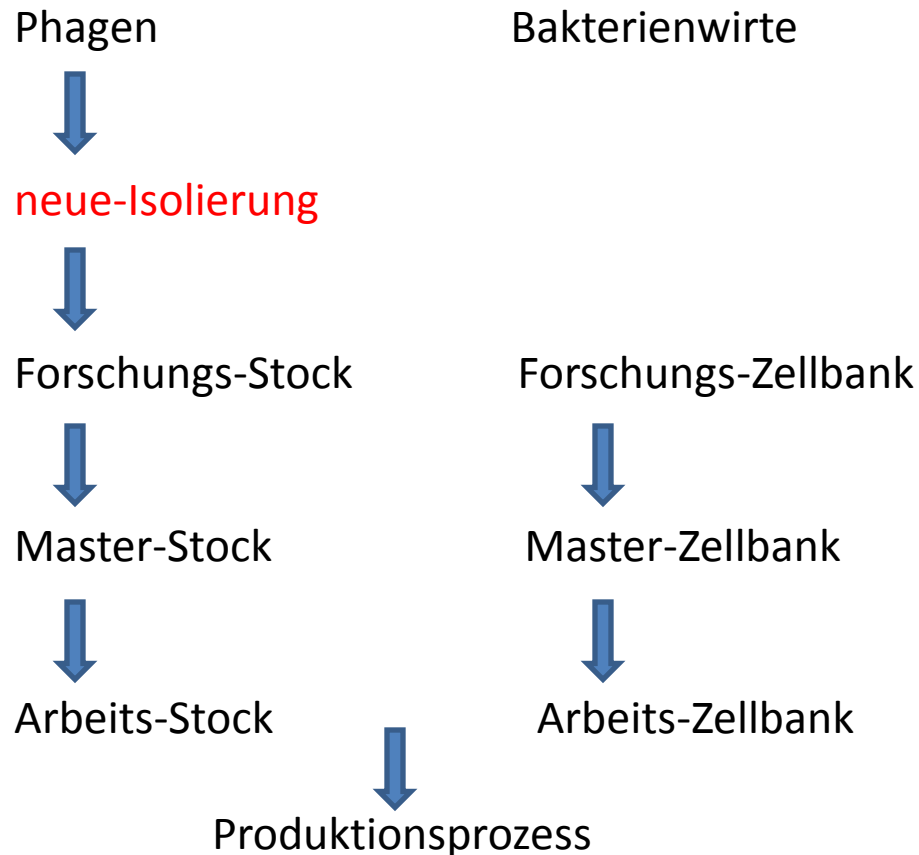
The "exponential growth" of phages at the site of infection may require less frequent phage administration in order to achieve the optimal therapeutic effect.

A few minor side effects reported for therapeutic phages may have been due to the liberation of endotoxins from bacteria lysed in vivo by the phages. Such effects also may be observed when antibiotics are used.

Because of their more broad-spectrum activity, antibiotics select for many resistant bacterial species, not just for resistant mutants of the targeted bacteria.

Evolutionary arguments support the idea that active phages can be selected against every antibiotic-resistant or phage-resistant bacterium by the ever-ongoing process of natural selection.

Generelles Prinzip Produktionsprozess R & D in GMP überführt



(www.phagoburn.eu):

erste westliche klin. Phase 1 und 2 randomisierte, kontrollierte Mehrfachstandort-Studie (11 spezialisierte Kliniken für Verbrennungsoffer in Frankreich, Belgien, Schweiz). Start: Juli 2015, 220 Patienten. Phagen-Cocktails gegen *E. coli* (13) und *P. aeruginosa* (12), (*Pherecydes*)

C. Sansom:

www.thelancet.com/infection
15 (2015)

Bewährte georgische Phagenpräparate

Bacteriophages for Treatment of Diseases caused by Antibiotic-Resistant Pathogens
(ELIAVA Institute IBMV, Mzia Kutateladze, Chief Scientific Council)

[http://www.istc.ru/istc/istc.nsf/va_WebResources/Event_Lyon/\\$File/Kutateladze.pdf](http://www.istc.ru/istc/istc.nsf/va_WebResources/Event_Lyon/$File/Kutateladze.pdf)

IBMV: neue quasi-GMP Produktion

- **Pyo-Phage** (5 Komp.: *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*)
- **Intesti-Phage** (17 Komp.: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus*, *Proteus* spp., *E. coli*, div. Serotypen, *P. aeruginosa*)
- **Mono-Phagen** (Staphylokokken, *E. coli*, Streptokokken, *P. aeruginosa*, *Proteus*)

Phagenpräparat PYOPHAGE

Panzernashorn vor und nach Phagenbehandlung



Fotos: freundl. Genehmigung Dr. med. vet. K. Baumgartner, Tiergarten Nürnberg, Sept. 2016

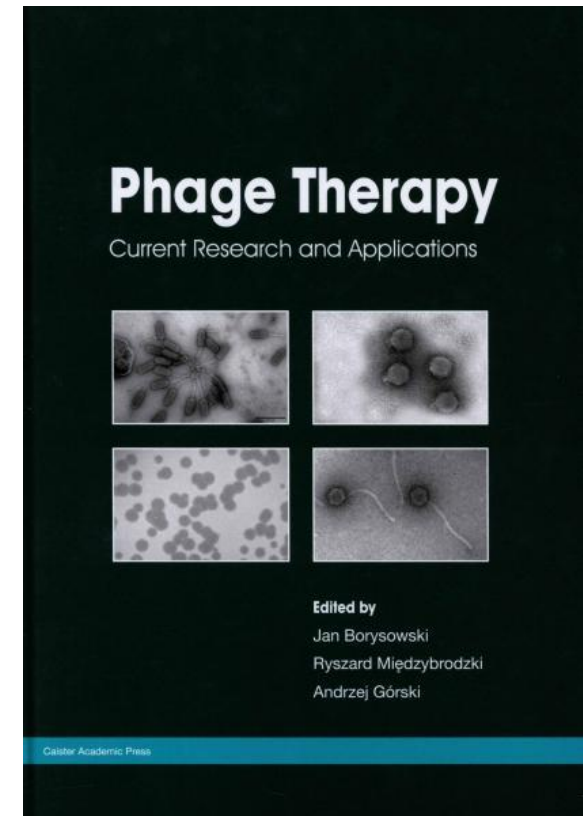
Phagentherapie in Polen

Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology & Experimental Therapy, Wroclaw

- Tausende **gut dokumentierte** Patientenfälle
- 550 Fälle 1981 – 1986: jeder in einem der Overviews aufgenommen
- Heilungsraten um > 80%
- Keine auffällige (negative) Immunantwort (Studie 2008
- - 2010 mit 153 Patienten). Folgerung A. Górski betr. Immunantwort: noch unklar, ob Anti-Phagen-Antikörper bei Therapie helfen oder hinderlich sind. Górski: Phagen wirken trotz der Antikörper!

Prof. A. Górski & Dr. B. Weber-Dabrowska
agorski@ikp.pl

Die Klinik nimmt antibiotisch austerapierte Patienten und behandelt mit Monophagen.



QC-Aspekte für nachhaltige Phagenpräparate

- Stabilität (Titer)
- Pyrogennachweis
 - Sterilität
 - Zytotoxizität
- Genomsequenzen: Abwesenheit temperenter Phagen und toxcodierender Gene
 - TEM (Morphologie/Reinheit und Interaktion mit Targetbakterien)

Genomsequenzen: zusätzlicher Vorteil der taxonomischen Einordnung, künftig als begleitende Forschung essentiell

Wegweisend:

M. Merabishvili et al., PLoS ONE 4 (2009)

J.-P. Pirnay et al., Pharm. Res. Jan. 2015

Verunreinigungen von Phagen-Präparaten

Müssen eliminiert werden:

- Proteine des bakteriellen Wirts
- DNA
- Endotoxine
- Pyrogene Exotoxine
- Hämolsine
- Chemische Restbestandteile

ZB: **Hyglos**-EndoTrap-Säulen,
s. rechts

Produkte und Applikationen:

	EndoTrap® red	EndoTrap® HD
LPS-Bindekapazität:	> 2.000.000 EU/ml Gel	> 5.000.000 EU/ml Gel
Wiederverwendbarkeit:	3x	mehr als 10x
pH Probenpuffer:	6-9	4-10
Geeignete Puffer:	Kalziumchelatoren	auch für Hochsalzbedingungen (> 150 mM NaCl)
Applikationen:	Proteine, Peptide, Antikörper	Proteine, Peptide, Antikörper, DNA/RNA, Antigene, Pflanzenextrakte, automatisierte Systeme , biopharmazeutische Produktionsprozesse

Phagen-Pharmakinetik

- Einfluss des Phagen auf den Körper
- Einfluss des Körpers auf den Phagen

beinhaltet per def.:

Absorption, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung

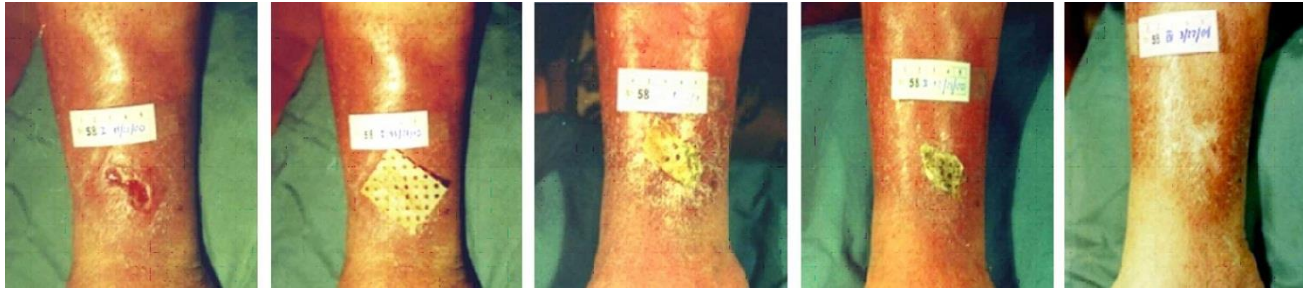
„Metabolismus“ bei Phagen: Phageninaktivierung durch ihre Interaktion mit Immunsystem. Oder: Aktivierung i.S. von *in situ* Replikation

Ziel immer: völlige bakterielle Beseitigung

J.-P. Pirnay et al., Pharm. Res. Jan. 2015

MRSA – der „populärste“ nosokomiale Problemkeim

Phagenerfolge



Intralytix.com

Phagen in PhagoBioDerm™ entfernen MRSA aus Wunden.
Intl. J. Dermatol. 41 (2002)

1921: Der erste Bericht über Phagentherapie am Menschen
betraf Staphylokokken-Hautinfektionen bei 6 Patienten
(R. Bruynoghe & J. Maisin).

Seitdem viele Phagenanwendungen bis zur breiten Anwendung von Antibiotika
auch in USA. Produzenten zB: Eli Lilly, Squibb & Sons, Swan-Myers

aus: **NOVOMED Integrative Medicine Center of Georgia**

Spezialisierung: chronische Wunden

Chronische Wunden nehmen zu!

USA: 6.5 Mio Patienten:

- ältere Gesellschaft
 - mehr Diabetes
 - steigende Gesundheitskosten
-
- Chronische Wunden seltener bei ansonsten Gesunden
 - Geschwüre: 20% der Hospitalisierung im Diabeteskontext
 - Komplikation: komplex organisierte Multispezies-Biofilme, die Bakterien vor Antibiotika schützen
 - Phagen penetrieren tiefer ins lokale Gewebe, AB haben abnehmende Aktivität in tieferen Schichten
 - Bei 90.8% (305 Verletzungen) Heilung durch Phagen: S. Slopek et al. (1987)
 - Bewährter Phagencocktail auf Wunden gesprüht: *Pyophage*

Einige Projekte zu *S. aureus*

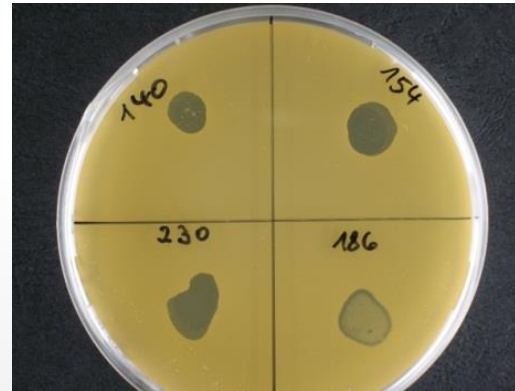


- **Intralytix:** z.Zt. Therapieprodukte in versch. Entwicklungsphasen, zB 8-Phagen-Cocktail zur Wundbehandlung/Ulcus cruris: Phase I, Lubbock/Texas S. auch www.clinicaltrials.gov
- J.J. Mendes et al., Wound Repair Regen. 21 (2013); **Wound Healing Society** Topische Phagentherapie bei chron. diabetischen Wunden: Phagencocktail in 2 Nagetiermodellen: Bakterienreduktion, verbesserte Wundheilung mit kleineren Epithelspalten bei *S. aureus* und *P. aeruginosa*
- Im Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (**DZIF**) arbeiten Forscher der Universitäten Tübingen, München und Münster mit **Hyglos GmbH**, Bernried, mit **BMBF**-Unterstützung an der Vorbereitung der klinischen Prüfung eines *S. aureus*-spezifischen Phagen-Lysins (GMP) zur Sanierung der Nasenflora.
Kontakt: A. Peschel, Tübingen

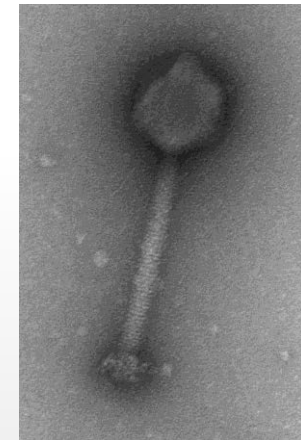
Sb-1-ähnliche *S. aureus*- Phagen: eine Phagenfamilie

Phage Sb-1:
lytisch für ca. 90% aller *S. aureus*-Stämme
wurde bereits i.v. appliziert:

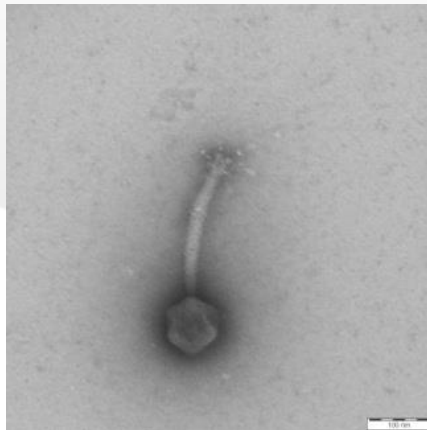
Sb-1-ähnliche Phagen des ELIAVA-Instituts
wurden in der DSMZ auf ihr Wirtsspektrum
gegen MRSA der lfd. Diagnostik getestet
(MHH, S. Suerbaum)



„Spot test“ mit 4 von
9 Phagen gegen MRSA



Phage 232

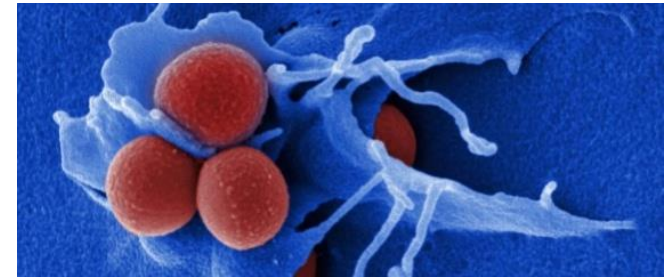
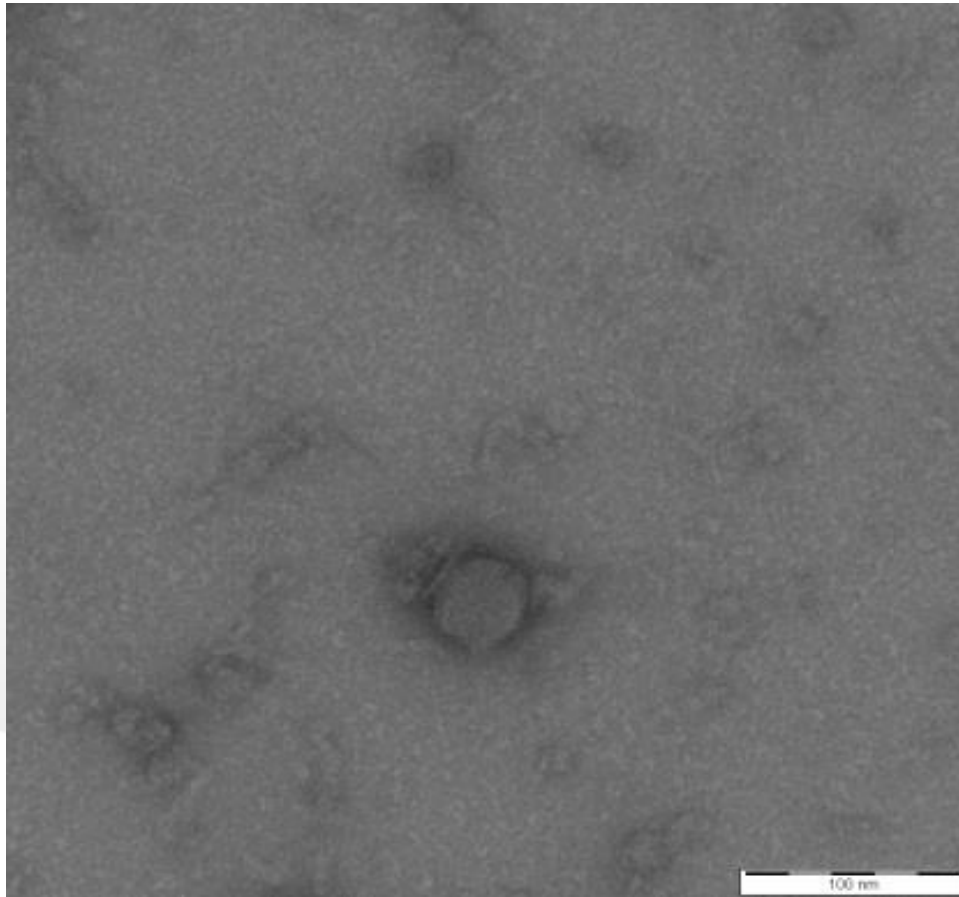


Fotos: M. Rohde

L. Kvachadze et al.,
Microb. Biotechnol. 4 (2011)



S. aureus / MRSA – DSMZ-Forschung



MRSA / M. Rohde

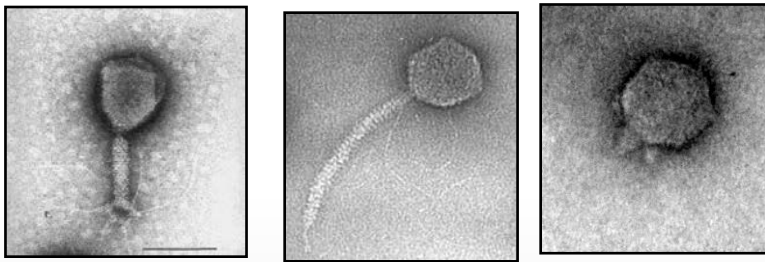
Jeder neue Phage ist willkommen!

Phage „Eberhard“
gegen *S. aureus*, isoliert aus
Schweinenase

(J. Wittmann & M. Rohde)

Elektronenmikroskopie (TEM & SEM) klärt wichtige Fragen

Phagenpartikel haben oft Kopfgrößen von 30-100 nm, Schwanzlängen variieren je nach taxonomischer Gruppe:



T4, myovirus lambda, siphovirus T7, podovirus

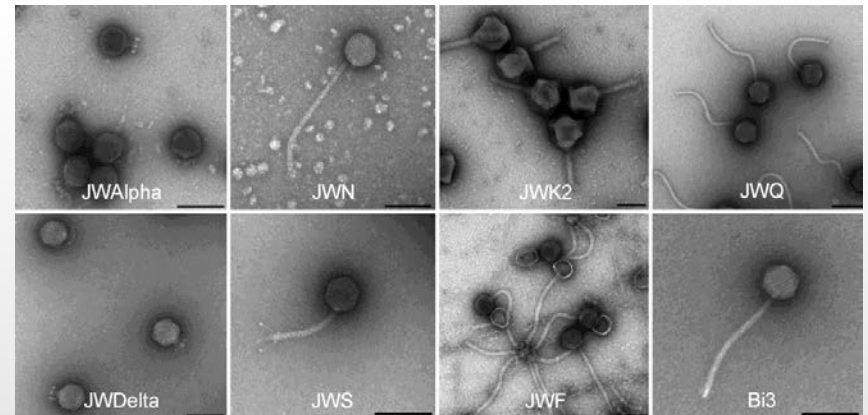


SEM of phage JWAlpha adsorbed to *Achromobacter* DSM 11852 cells (M. Rohde & J. Wittmann).

Aus der eigenen Forschung:
neue Phagen gegen den opp. pathogenen
A. xylosoxidans

J. Wittmann et al., *Virology J.* 11 (2014)

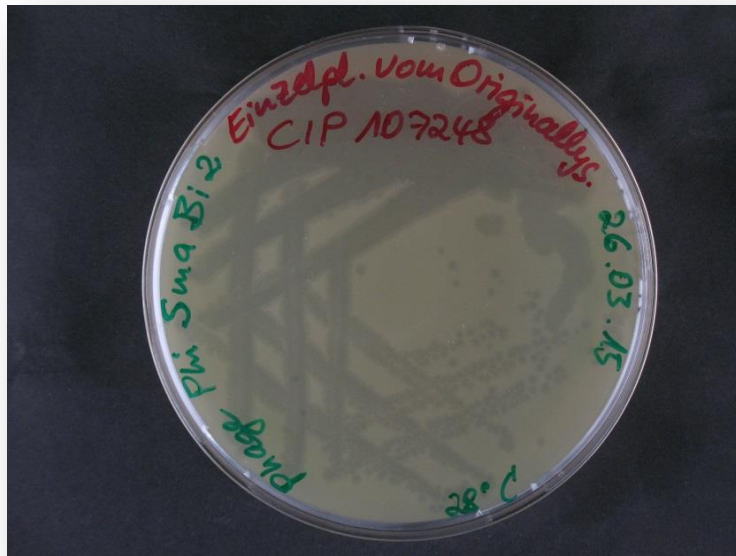
J. Wittmann et al., *PLoS ONE* 9 (2014)



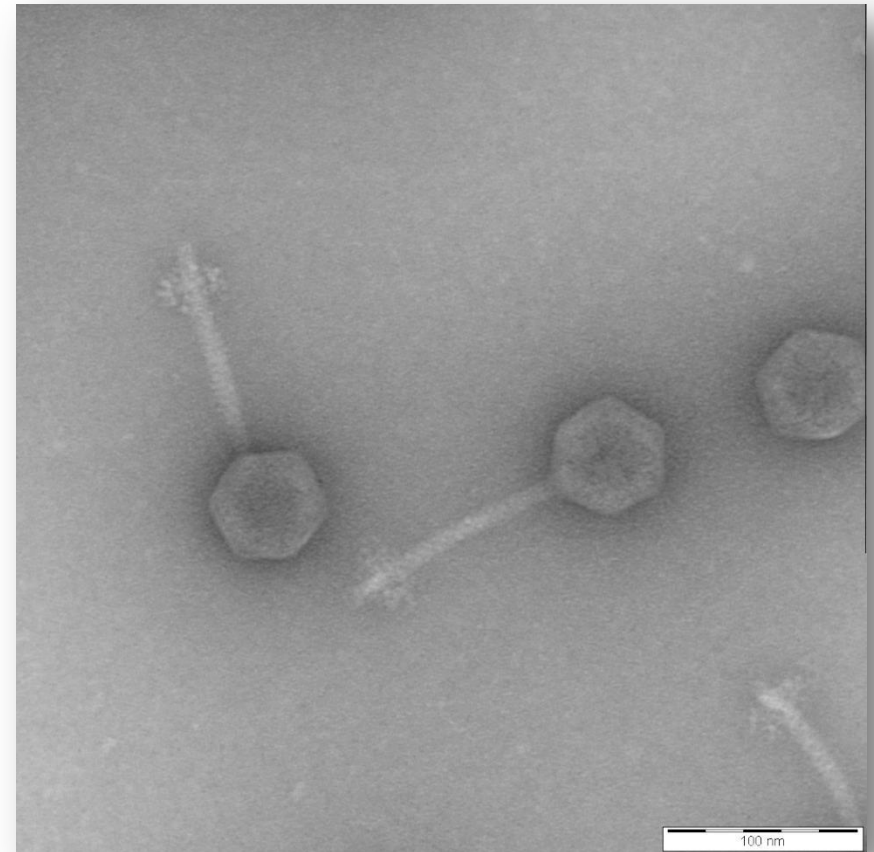
Serratia marcescens Phagen

Eine neue Sammlung für einen opportunistisch pathogenen Erreger

Zahlreiche neue Phagen isoliert von
B. Dreiseikelmann, Univ. Bielefeld



Phage Bi2



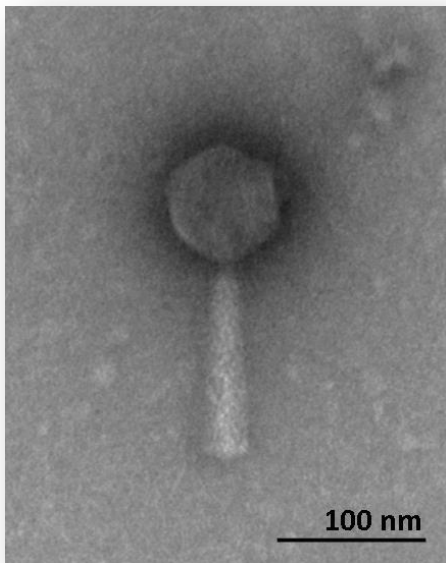
Präklinische Forschung im Visier

Kooperation mit Charité-Universitätsmedizin Berlin

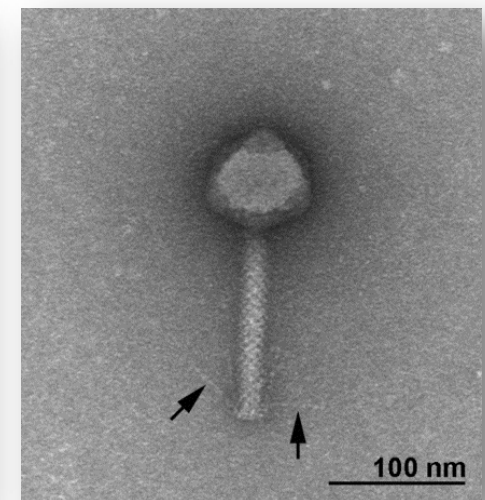
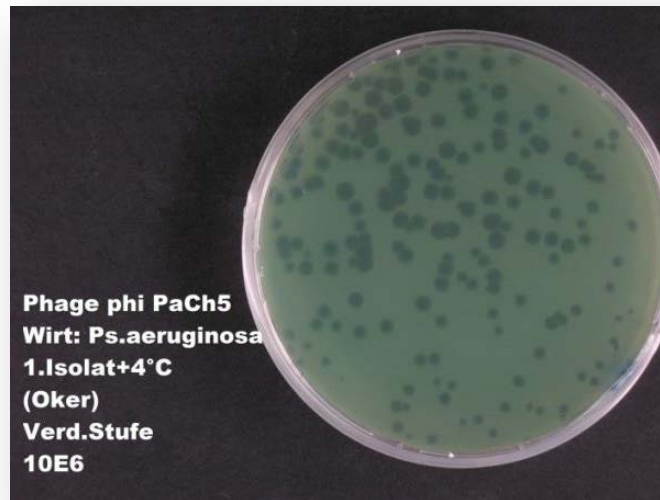
Phagen gegen *P. aeruginosa* & *A. baumannii*

Voraussetzung: ausreichend Phagen pro Bakterienart

Multi- bzw. panresistente *P. aeruginosa*-Isolate wurden zum Screenen neuer Phagen genutzt. Die meisten Isolate wurden spontan durch Phagen „abgedeckt“



Phi PaCh5

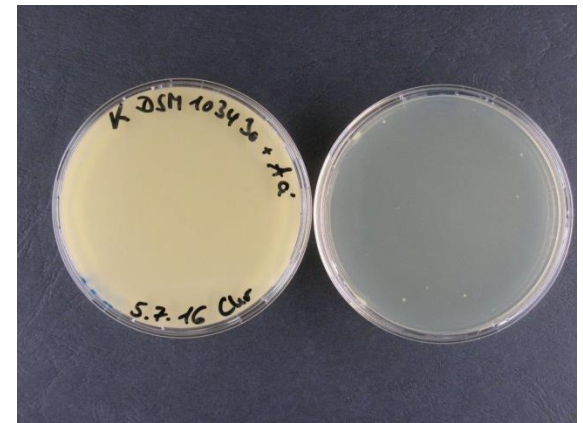
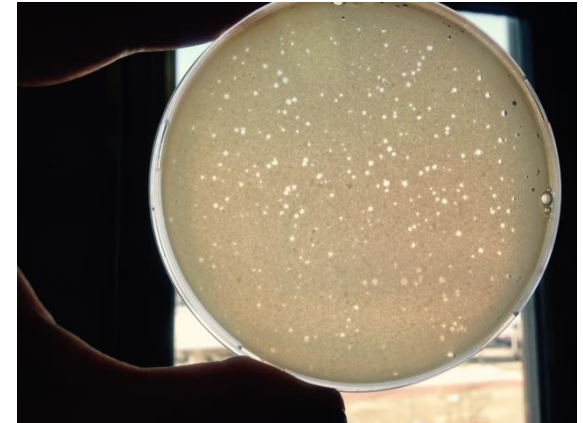
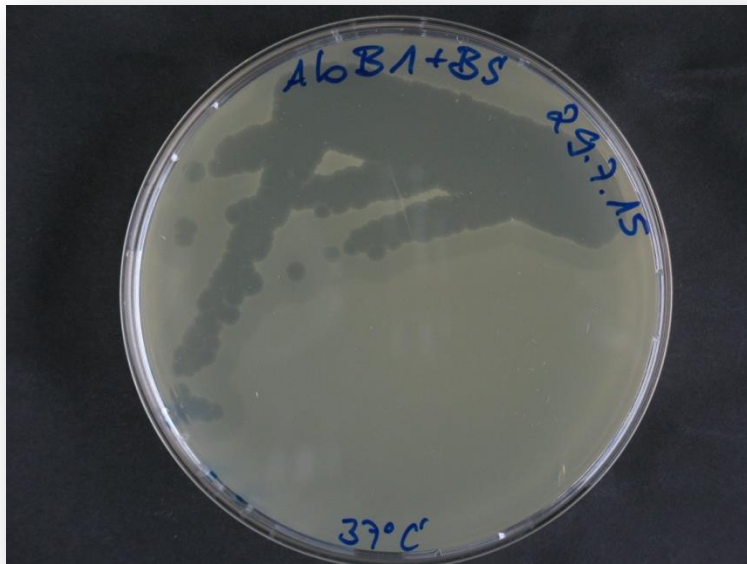


Phi PaCh1

Wanted!: *Acinetobacter baumannii* Phagen

- Präklinisches *in vivo* Maus-Lungenmodell -

8 neue Phagen gegen *A. pittii* aus Oker-Wasser gefunden, typisch: große Plaques mit Halos –
..... aber *A. baumannii*-Phagen?



Phage Acibel 004 gegen *A. baumannii*,
freundlich überlassen von M. Merabishvili
QAMH, Brüssel

Acinetobacter baumannii

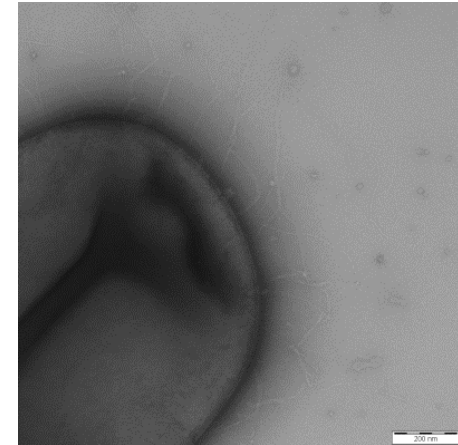
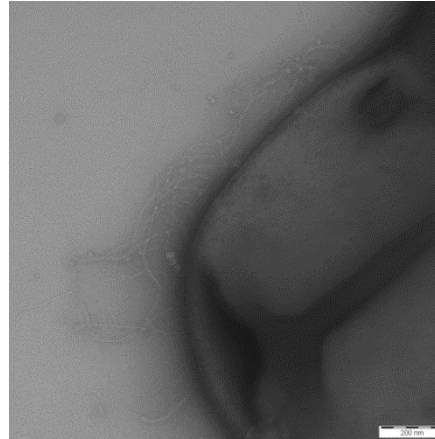
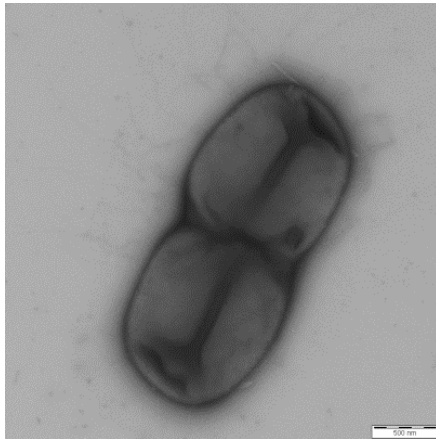
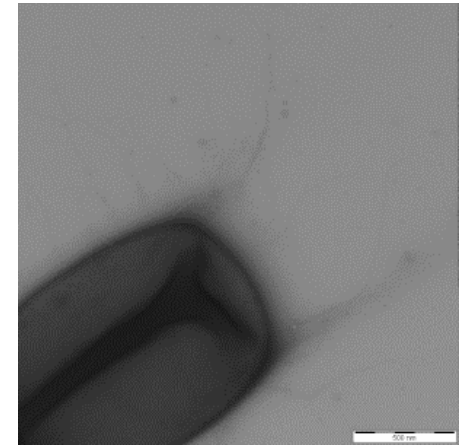
Spezies-ID schwierig!

Helsinki University Hospital:
von 55 *Acinetobacter*-Isolaten 18 *A. baumannii*, 19 *A. pittii*
(pers. Mitt. M. Skurnik)

Empfohlene ID-Methoden: **MALDI-TOF**:
matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
Zu beachten aber die jeweiligen Datenbanken!

MLST-PCR-Sequenzierung (*bla*_{oxa51}, *rpoB*)

Nicht hinreichend zuverlässig: VITEK 2 BIOMÉRIEUX

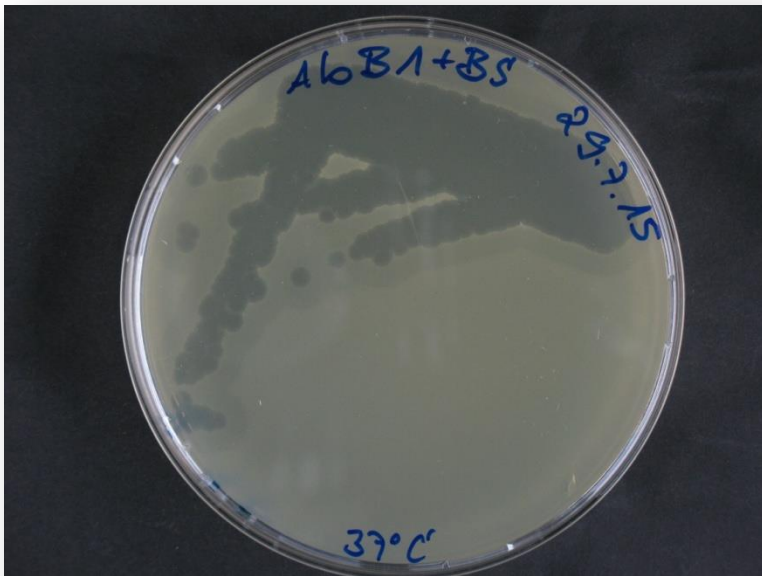


A. baumannii Stämme: T. Chakraborty, Univ.-Klin. Gießen, TEM: M. Rohde, HZI

Warum penetrieren Phagen Biofilme?

- Exopolymer-abbauende Enzyme
- Studien deuten auf weitere begünstigende Phagen-Eigenschaften:
Phagen nutzen Mukosa-Gewebeoberflächen zur Wirkungsverstärkung

Phage gegen *A. pittii*



Einige Phagen codieren Polysaccharid-Depolymerase.
Hier deutliche Höfe um klare Plaques:

D. Harper et al.: *Bacteriophages and Biofilms*. Antibiotics (2014)

F. Rossmann et al.: *Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing*. PLOS Pathogens (2015)

Die „Schnittstelle“ ...

Reduktion von ESBL* *E. coli* in der Hähnchenmast und der Antibiotikalast in der Umwelt

gefördert durch



Deutsche
Bundesstiftung Umwelt

www.dbu.de

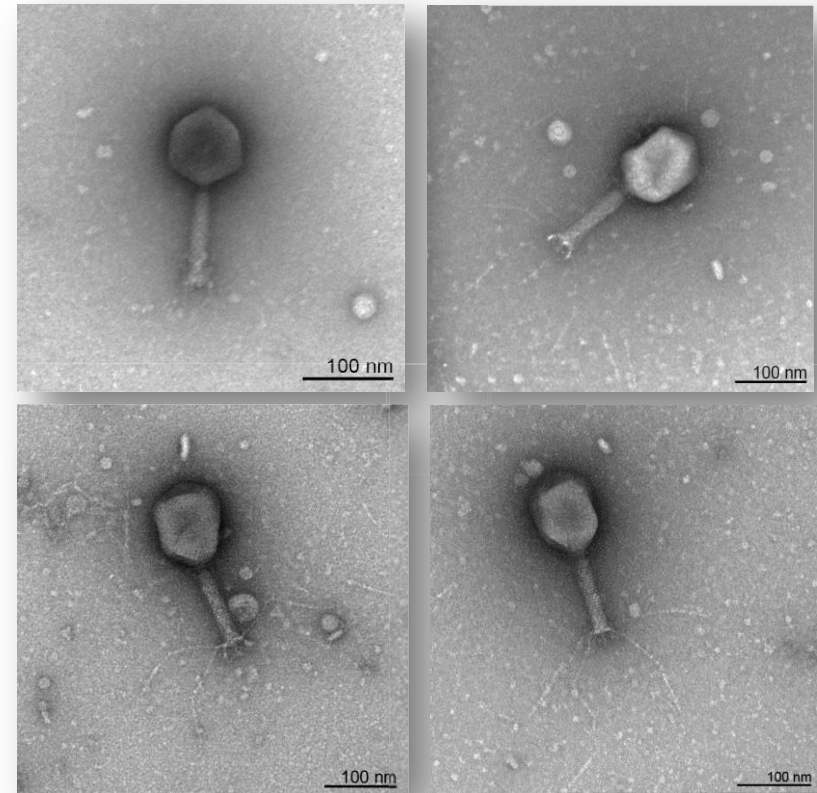
Projektbeginn: Jan. 2016, Projektpartner:

- PTC, Phage Technology Center GmbH
- Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Leibniz-Institut DSMZ

*ESBL: extended spectrum β -lactamase



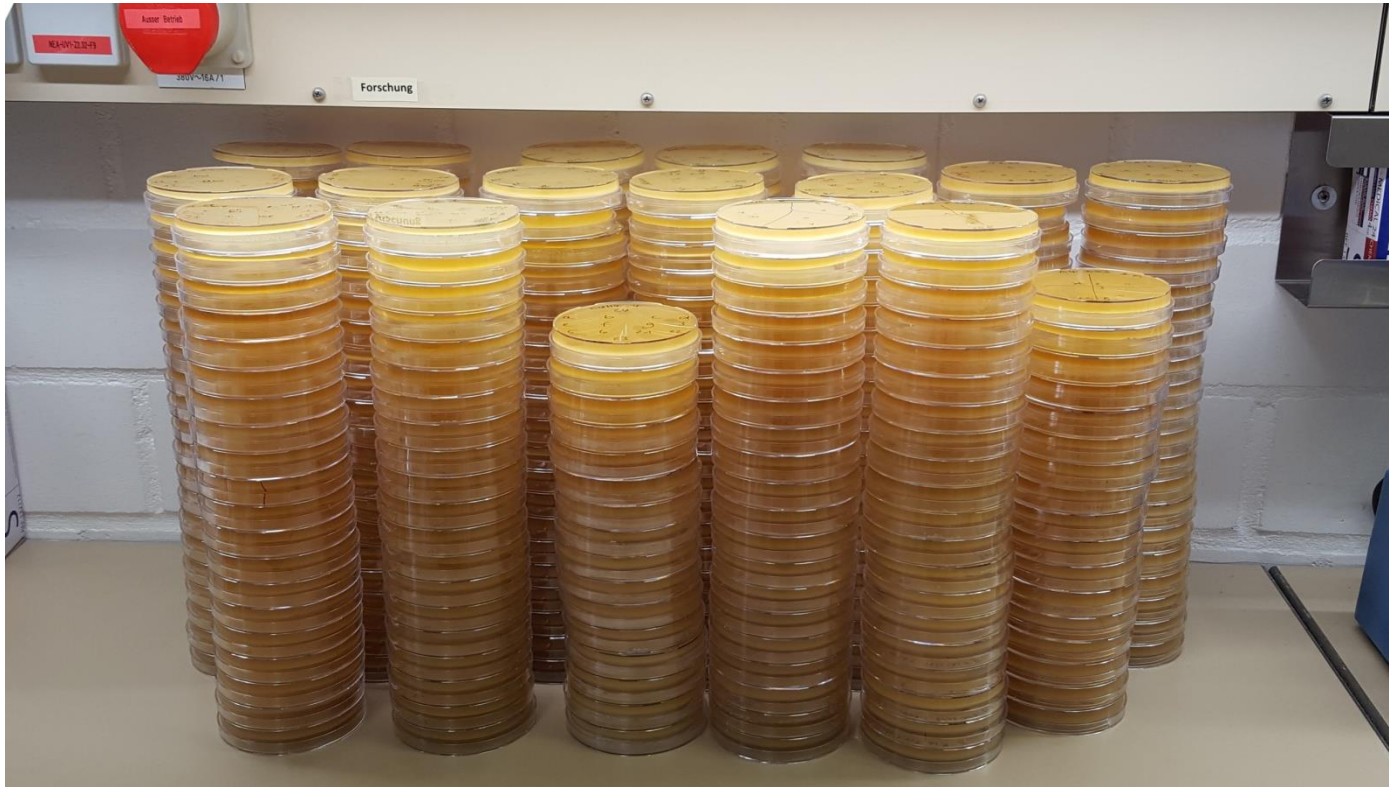
Leibniz-Institut • DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



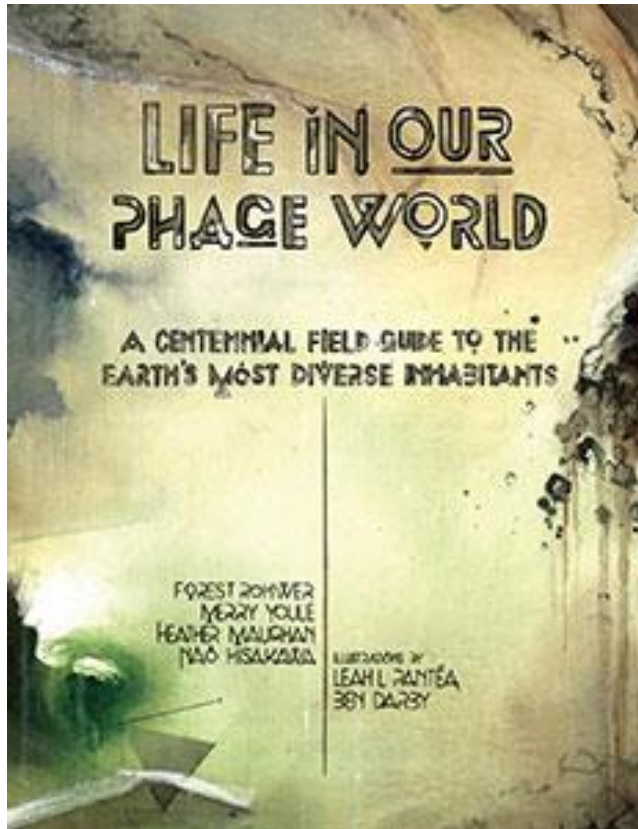
Vier neue Coliphagen einer großen neuen Phagenserie
(H. Lehnerr & M. Rohde)

Cocktail-Anpassung für Stall- und Feldversuche je nach
Zielbakterien-Wirtsbereich

Reduktion von ESBL *E. coli* in der Hähnchenmast und der Antibiotikalast in der Umwelt



Phagensuche, Titerquantifizierung, Tagesauswertung (I. Schmidt)



**„Die spezifische Literatur ist sehr viel
reicher als gedacht!“**
Elizabeth Kutter

Buchempfehlung zum 100.
Geburtstag der
Phagenentdeckung

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

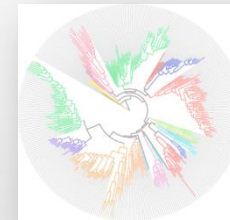


Danke:

Johannes Wittmann
Imke Schmidt
Bettina Henze
Stefanie Letzel
Julia Sabirova
Stephanie Peter

Danke:

Manfred Rohde, HZI:
Alle TEM/SEM-Abb.



Und danke an die DSMZ und
ihre Ressourcen

