

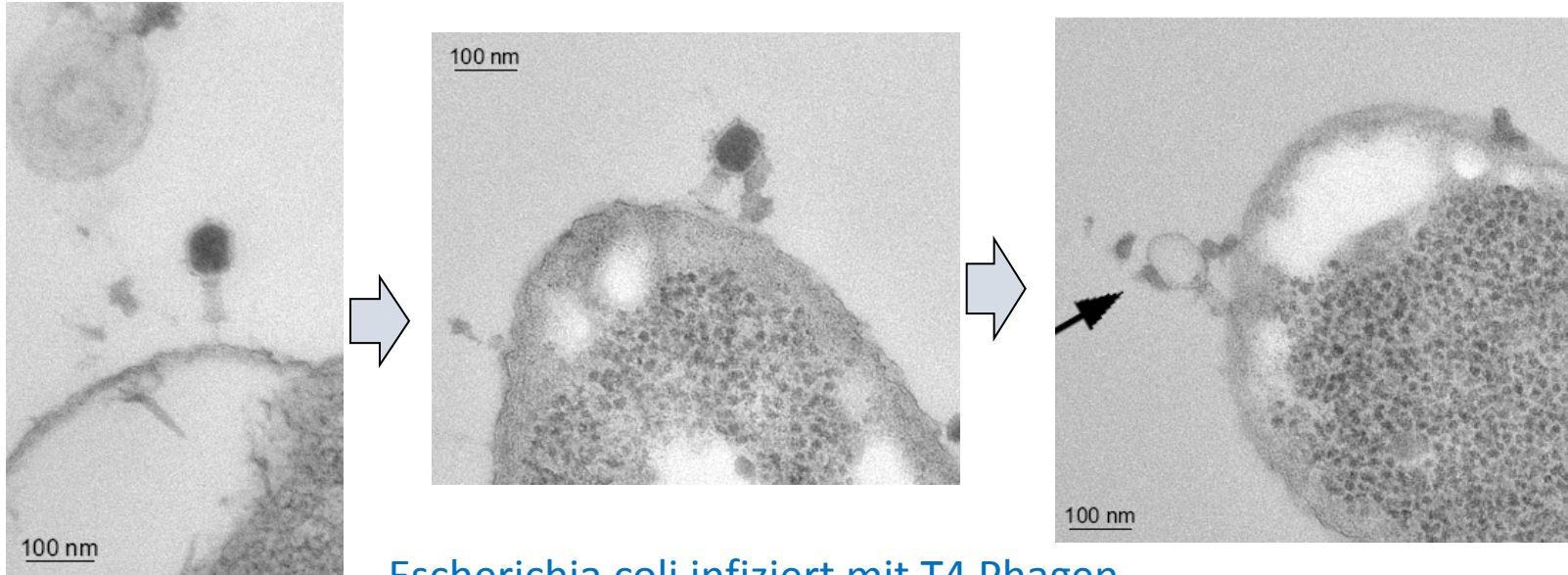
# Phagen Therapie – vom Labor ans Krankenbett

**BfR Forum Verbraucherschutz Bakteriophagen**

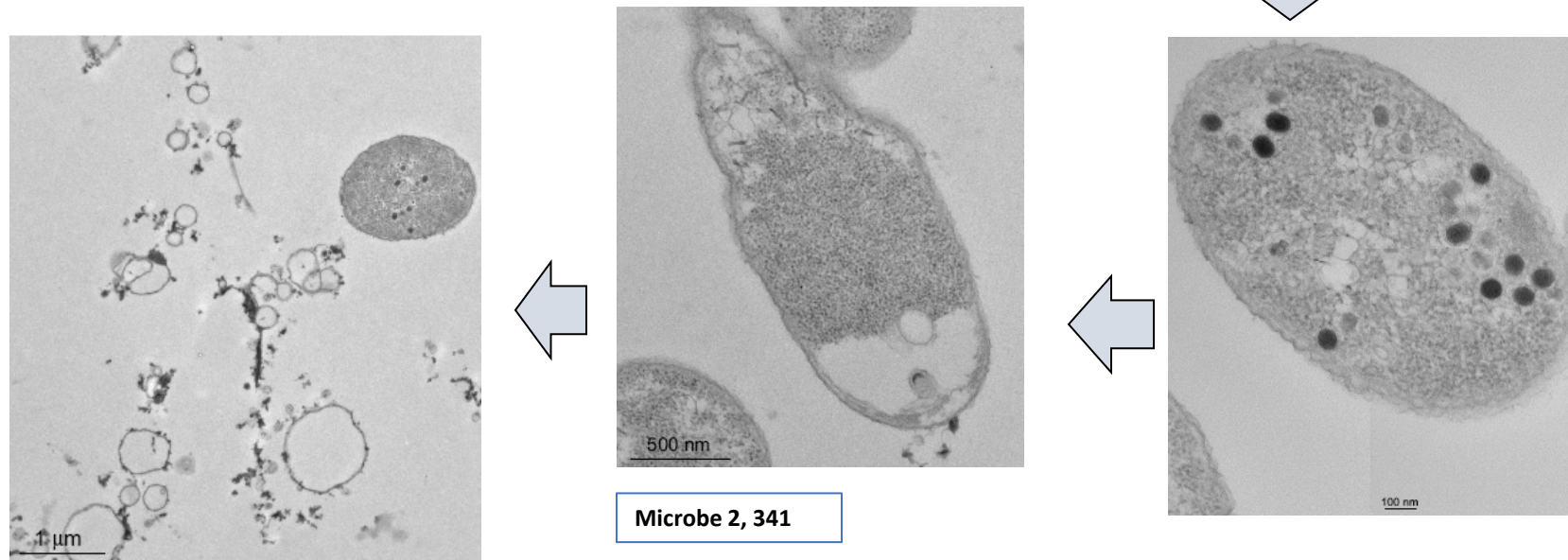
Harald Brüssow

KU Leuven Universität, Belgien

Ein attraktives Laborkonzept: Infektion von bakteriellen Krankheitserregern mit Viren



Escherichia coli infiziert mit T4 Phagen

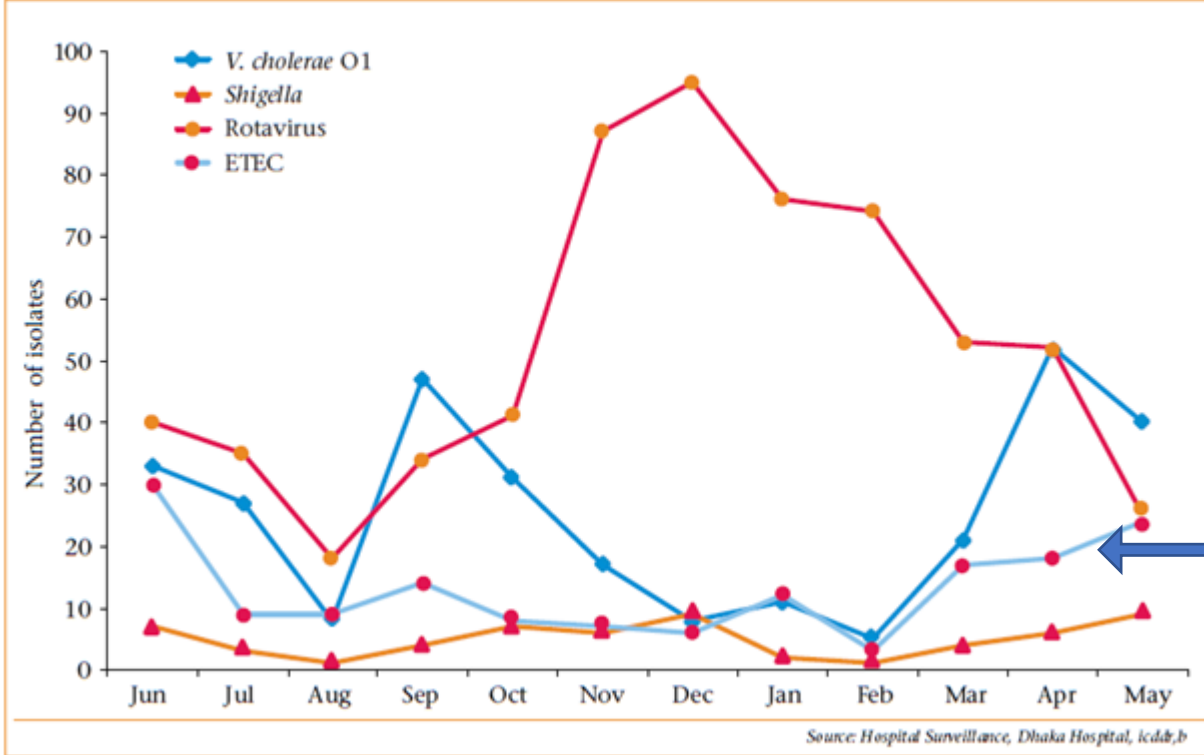


# Die Herausforderung: Durchfallserkrankungen von Kleinkindern in Entwicklungsländern



Dhaka/ Bangladesch: der Welt grösstes Durchfalls-Forschungszentrum

Monthly isolation of *V. cholerae* O1, *Shigella*, *Rotavirus* and *ETEC*: June 2014-May 2015



Problem 1: mehrere bakterielle Durchfallserreger (*Vibrio cholerae*, *Shigella*, *E. coli*), dazu noch Rotaviren

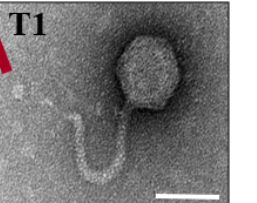
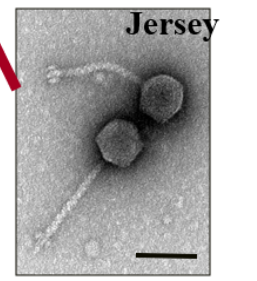
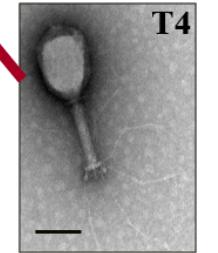
Problem 2: Phagen sind nicht nur Spezies-spezifisch (Vorteil über Antibiotika), sondern Serotype-spezifisch (über 100 O Serotypen in *E. coli*)

Phage JS →	n° stool phage+ /32 tested	Host Range							
		T4	T4	T4	T1	Jersey	T4	T4	
<i>E. coli</i> ↓									
EPEC <b>O18</b> :K77	16	X	X	X			X	X	
EPEC <b>O20</b> :K84	4	X	X					X	
EPEC <b>O26</b> :K60	10	X	X					X	
EPEC <b>O55</b> :K59	7			X			X		
EPEC <b>O86</b> :K61	13	X	X	X	X		X		
EPEC <b>O111</b> :K58	10	X	X	X				X	
EPEC <b>O112</b> :K66	6		X	X			X		
EPEC <b>O119</b> :K69	5	X	X					X	
EPEC <b>O124</b> :K72	0								
EPEC <b>O125</b> :K70	5	X	X					X	
EPEC*: A/E+	16	X	X	X			X	X	
EPEC*: A/E+	6	X	X				X	X	
EPEC*: A/E+	18	X	X	X	X	X	X	X	
EPEC*: A/E+	1								
EPEC*	13	X	X	X	X		X	X	
EPEC*	13	X	X	X			X	X	
EPEC <b>O6</b> :H16	15	X	X	X			X	X	
ETEC <b>O8</b> :H9	0								
ETEC <b>O15</b> :H11	12	X	X	X			X	X	
ETEC <b>O25</b> :H42	12	X	X	X			X	X	
ETEC <b>O78</b> :H12	11	X	X				X	X	
ETEC <b>O115</b> :H51	8	X	X				X	X	
ETEC <b>O20</b> :H11	7	X	X	X			X	X	
ETEC <b>O27</b> :H7	1							X	
ETEC <b>O128</b> :H18	0								
ETEC <b>O63</b> :H-	8	X	X				X	X	
ETEC <b>O148</b> :H28	14	X	X	X			X	X	
ETEC <b>O153</b> :H12	9								
ETEC* LT-/ST+/CFA 1	5	X	X						
ETEC* LT-/ST+/CS6	9								
ETEC* LT-/ST+/PCF O166	13	X	X	X			X	X	
ETEC* LT-/ST+/CFA1	13	X	X	X	X		X	X	
ETEC* LT-/ST+/CS4/CS6	12	X	X				X	X	
ETEC* LT+/ST+/CS1/CS3	13	X	X	X			X	X	
ETEC* LT+/ST+/CS5/CS6	0								
ETEC* LT+/ST+	17	X	X	X			X	X	
ETEC* LT+/ST+	1								
ETEC* LT+/ST-	14	X	X	X			X	X	
ETEC* LT+/ST-	0								
ETEC* LT+/ST-	12	X	X					X	

**EPEC**

**ETEC**

T4: Good *in vitro* pathogen coverage

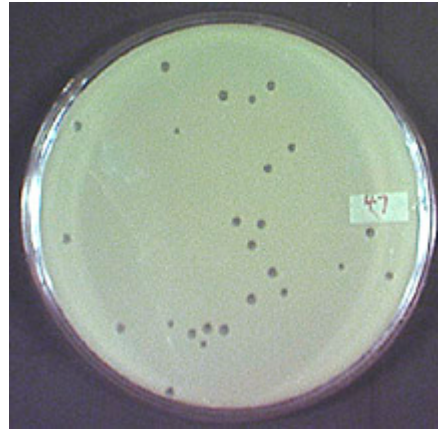


# Vom Ausgangsmaterial Stuhl über Phagen Isolierung zur Phagen Produktion

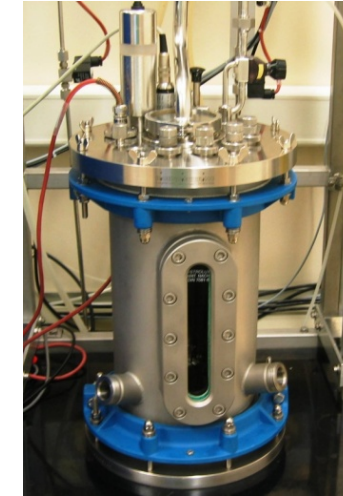


Stuhl als Phagen Quelle

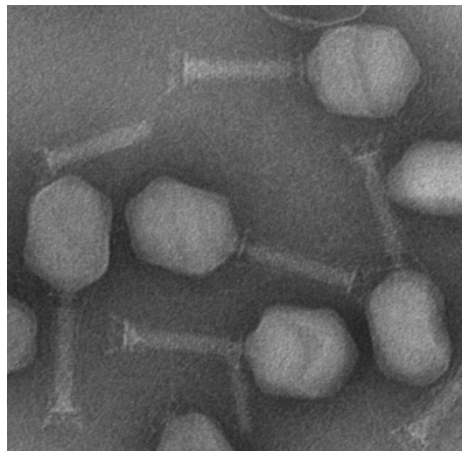
JB 186, 8287



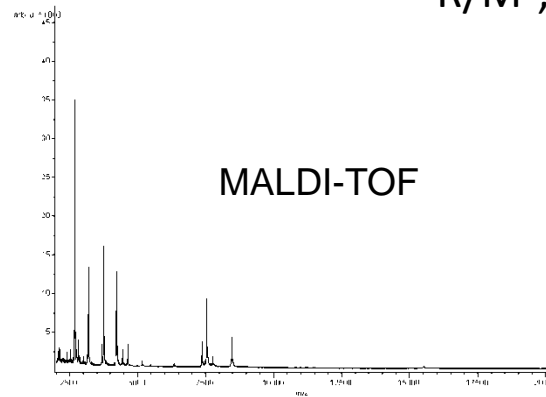
Phagen auf  
Bakterienrasen: K803  
R/M-; O-;  $\phi$ -; seq



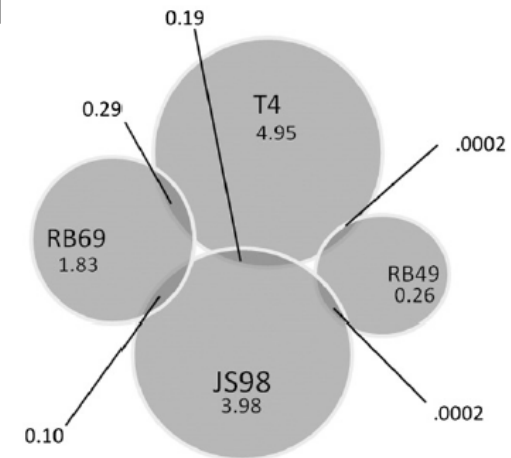
Vermehrung in Fermentern



Reinigung und Analyse



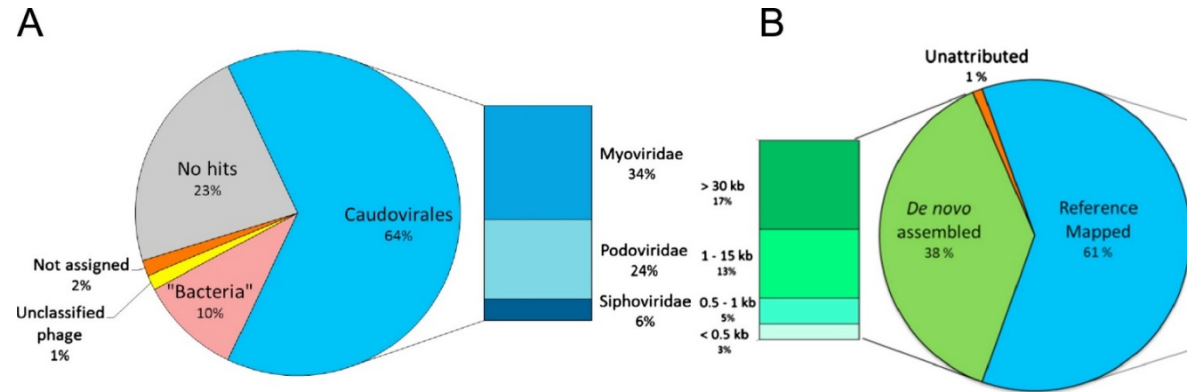
AEM 80, 1469



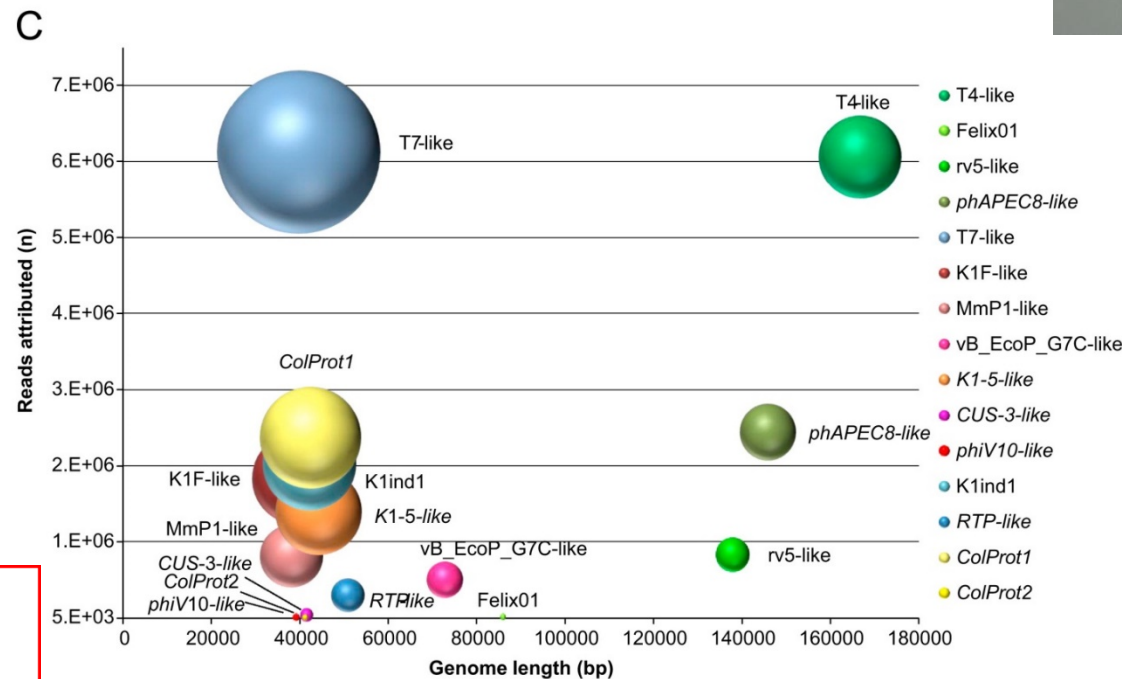
Virol 434, 222

Metagenom:

# Das russische Vergleichsprodukt von Microgen



Analyse mittels  
Metagenom  
Sequenzierung

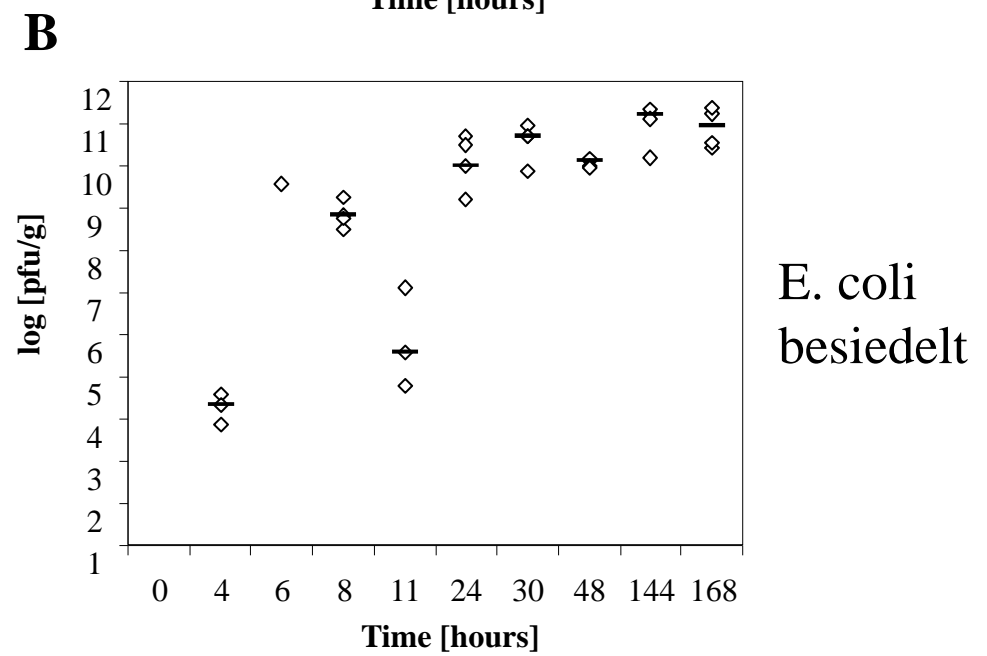
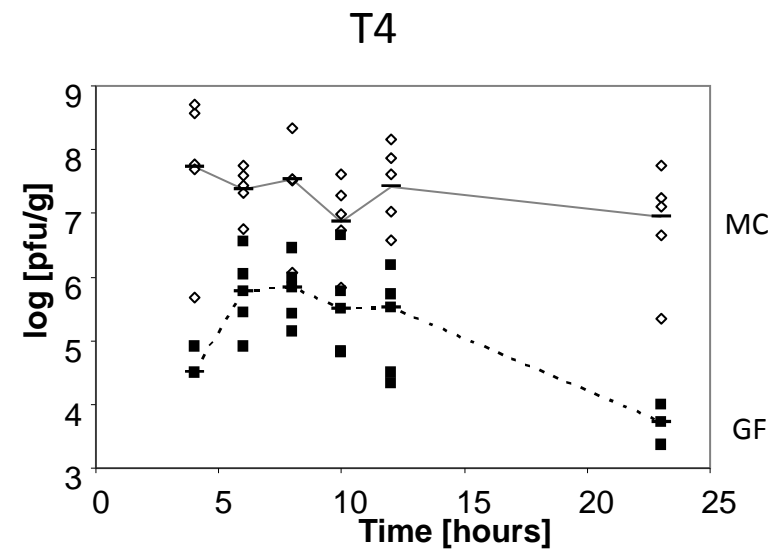
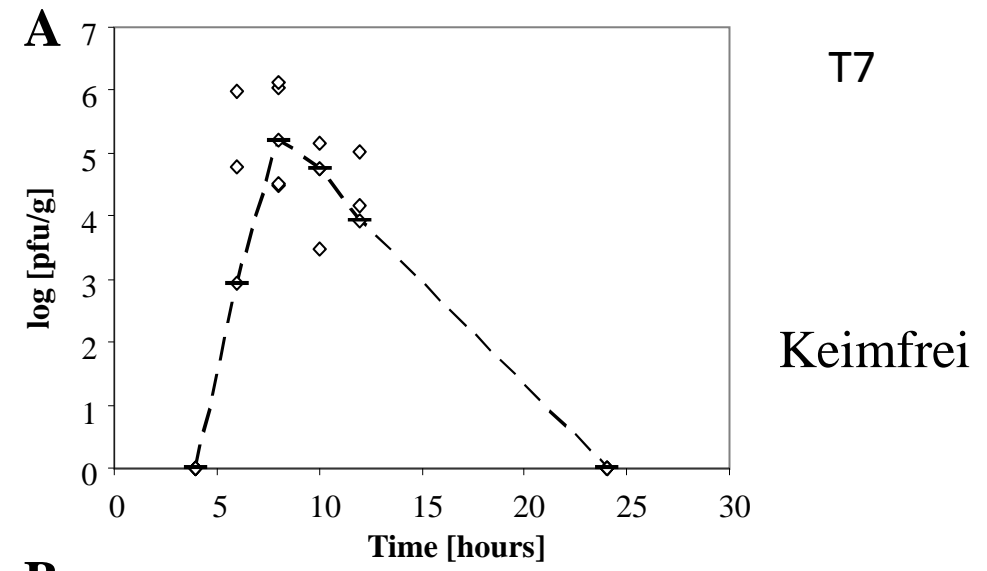


zwei unterschiedliche Konzepte:  
\*Cocktail von T4 Phagen  
\*Cocktail von >12 Phagen Gruppen

Viol 443, 187



Phagenvermehrung im Darm  
 von Mäusen:  
 Pharmakokinetik- und  
 Sicherheits-Studien



# Sukzessive Sicherheitsstudien

Metagenom Sequenzierung der Phagencocktails + Bioinformatik Analyse



Tierversuch



Sicherheitstest in der Schweiz (gesunde Erwachsene)



Sicherheitstest in Bangladesch (gesunde Erwachsene)



Sicherheitstest in Bangladesch (gesunde Halbwüchsige)



Sicherheitstest in Bangladesch (gesunde Kinder)



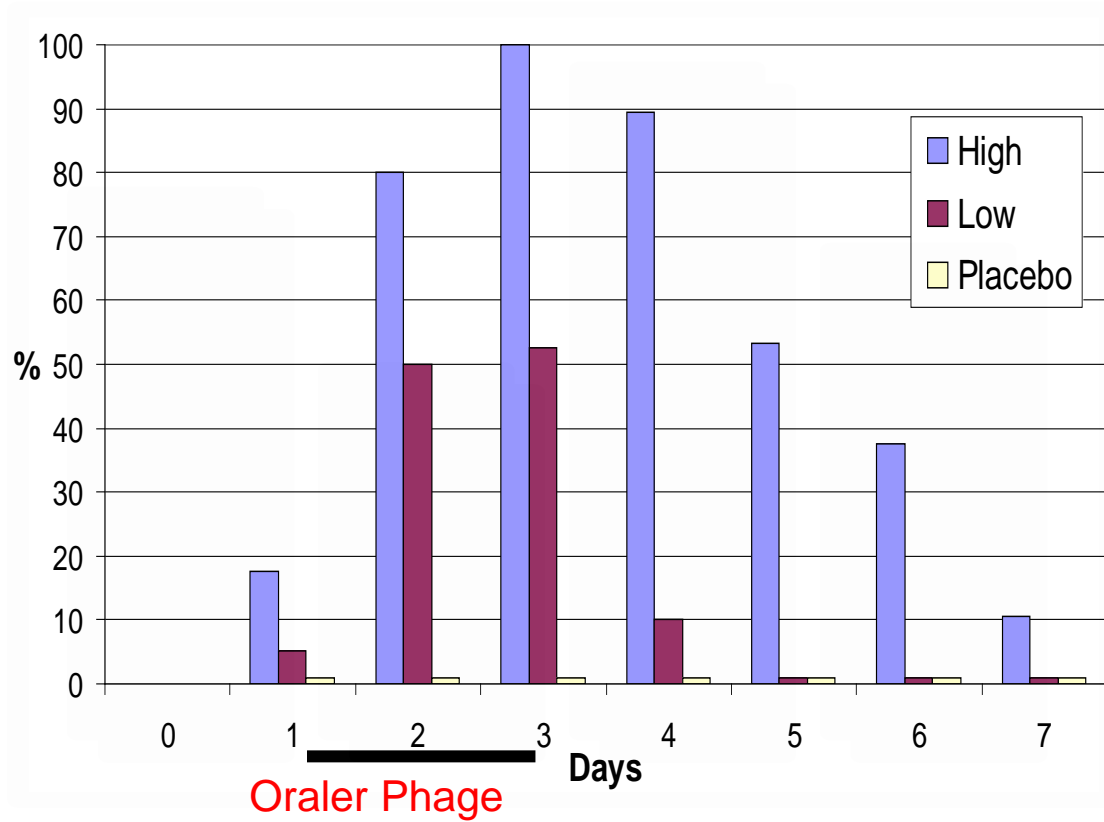
Sicherheitstest in Bangladesch (Kinder mit Durchfall)

AAC 48, 2558; AAC 49, 2874; Virol  
434, 222; EMI 19, 237; EBioMed  
4, 124

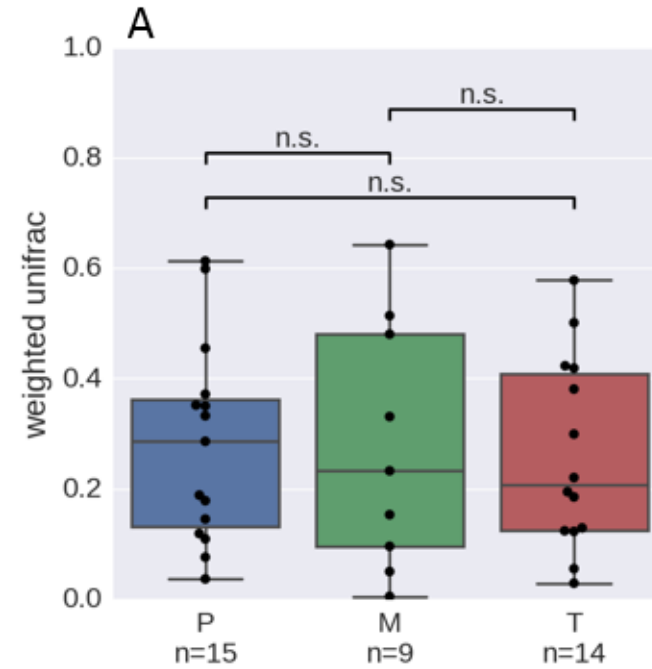
Es wurden keine Sicherheitsbedenken in der Verwendung beider  
Phagen Produkte gefunden



# Pharmakokinetik von oral verabreichten Phagen im Stuhl von gesunden Probanden



AAC 49,2874



Oraler Phage hatte keinen negativen Einfluss auf Darmmikrobiota Zusammensetzung  
EMI 19, 237

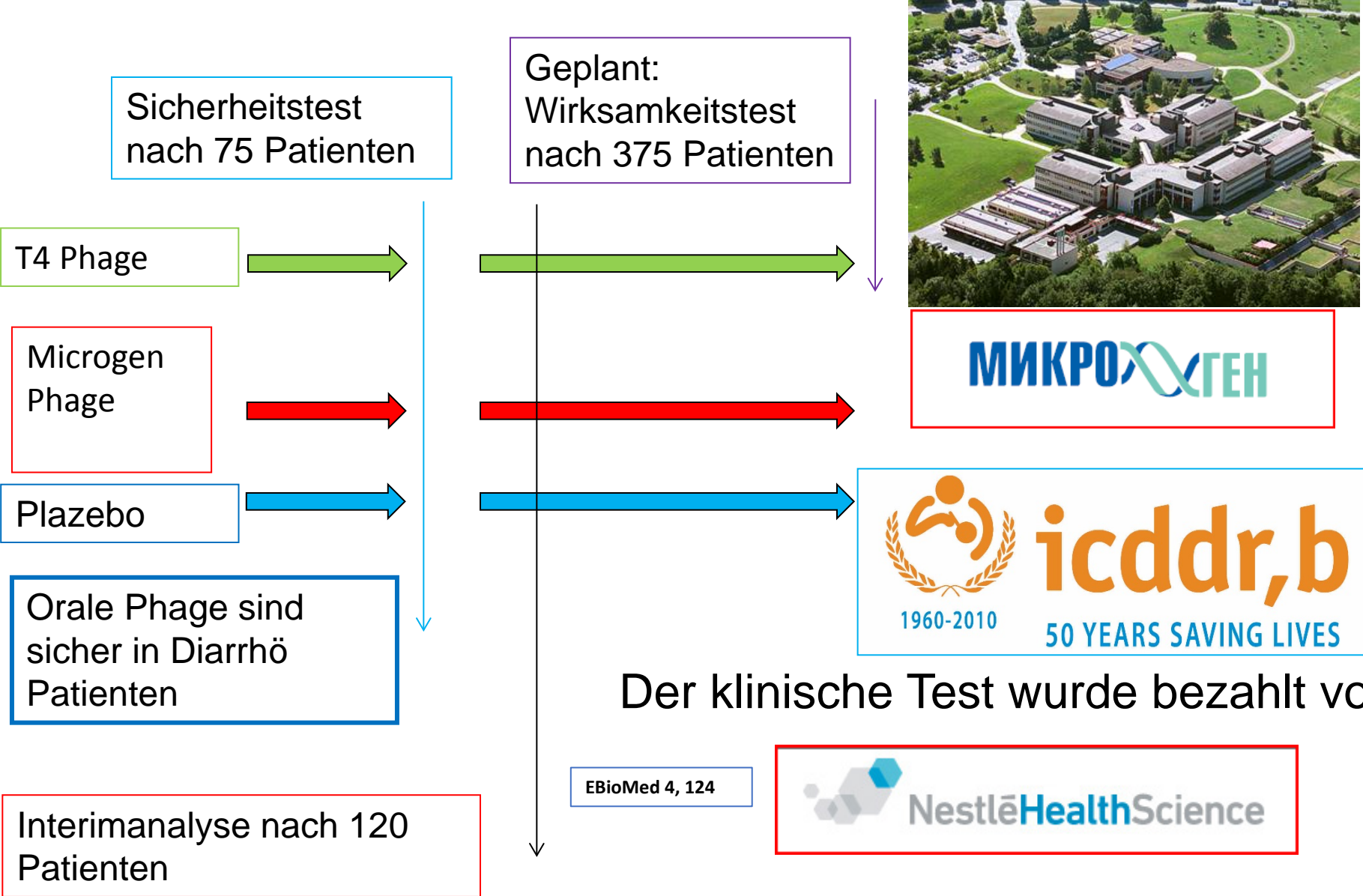
# Vielfältige klinische und Blut Untersuchungen zeigten keine auffälligen Befunde

**Table 1**

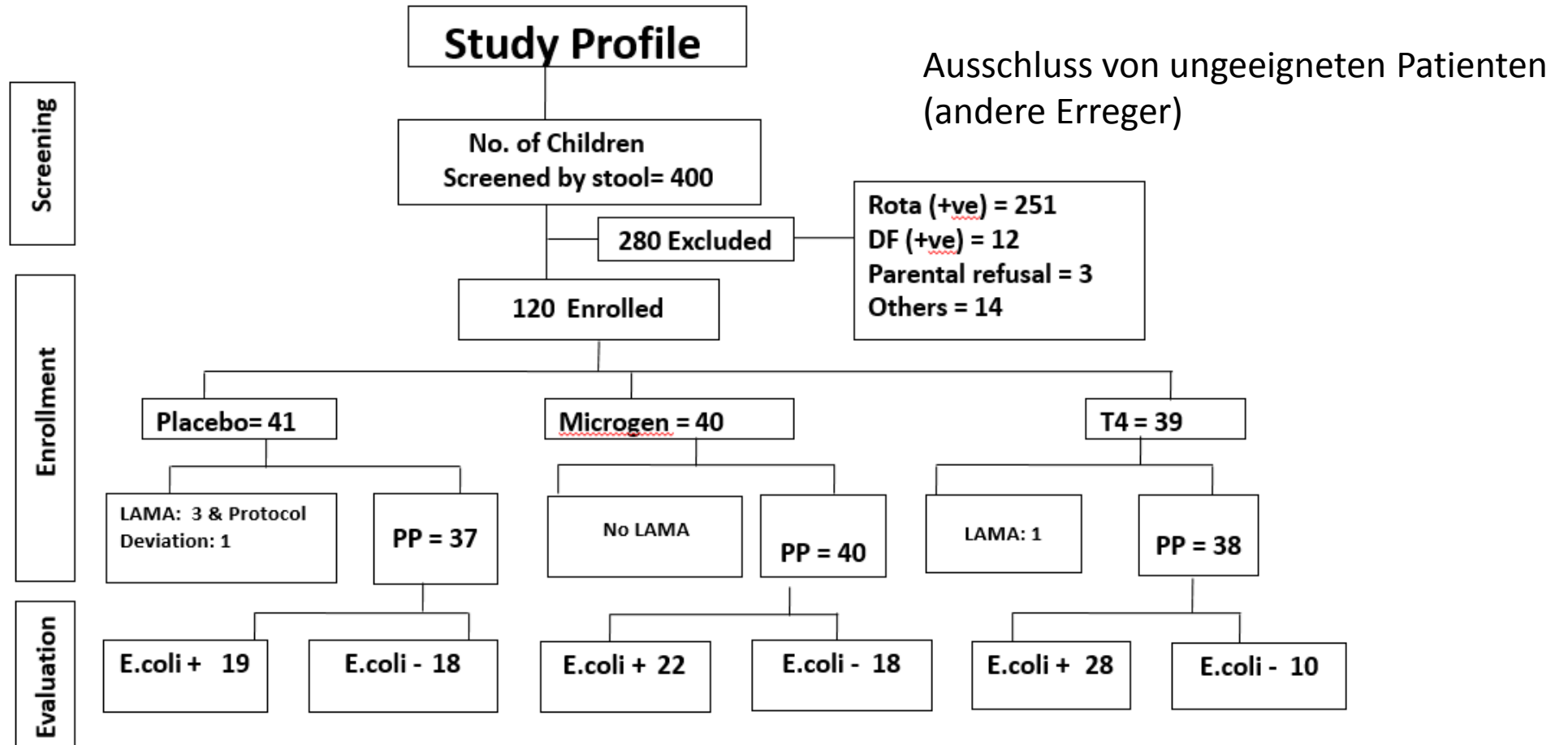
Characteristics of study subjects and observation of abnormal values in physical examination and clinical chemistry or hematology analyses in fifteen healthy volunteers from Bangladesh of different ages receiving Microgen phage cocktails and placebo.

Subject	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Normal range
<b>Characteristics of subjects:</b>																
Age (y)	32	26	40	25	25	9.8	7.4	7.3	9.9	5.4	4.3	3.5	4.5	4	4.3	
Sex (1=m)	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	
Weight (kg)	60	62	65	59	71	27	21	15	24	15	12	14	13	14	13	
BMI (1-5), Weight per age	23	24	25	23	24	85	91	64 <sup>(1)</sup>	77	81	75	81	79	82	80	
Weight loss > 0.7 kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0.7 kg (1.5%)
Pulse rate	-	-	-	-	-	-	a3	-	(1)	-	-	3	3	-	-	60-100/min
Respiration rate	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	a <sup>(2)</sup>	a <sup>(2)</sup>	-	20-30/min
Fever	2	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	a3	-	-	-	< 37.5 °C
Systolic blood pressure	-	2	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	-	-	a	110-140
Diastolic blood pressure	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	60-85
<b>Clinical chemistry:</b>																
Na <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	a123	-	136-145 mEq/L
K <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5-5.1 mEq/L
Cl <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	a	-	-	-	98-107 mEq/L
Total CO <sub>2</sub>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	a	-	23-29 mEq/L
Ca <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1-2.6 mmol/L
Creatinine	-	-	a1	a123	123	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	20-100 µmol/L
Blood urea nitrogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6-20 mg/dL
Total serum protein	-	a123	a2	-	a2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0-8.3 g/dL
Albumin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.4-5.4 g/dL
Total cholesterol	-	a2	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 5.18 mmol/L
Triglycerides	-	-	a	-	a	1	-	-	1	2	-	13	a12	-	-	< 1.7 mmol/L
Total bilirubin	-	a	-	-	2	a2	a1	-	2	a	a	a12	a	a12	a12	5.1-17 mmol/L
Alanine Aminotransferase	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 56 U/L
Aspartate Aminotransferase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a123	2	2	a123	a	< 40 U/L
γ-GlutamylAminotransferase	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 40 U/L
Fasting blood glucose	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9-5.6 mmol/L
<b>Hematology:</b>																
Platelet count	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	a	3	-	170-500,000/µL
Red blood cell count	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4.3-6.2 × 10 <sup>6</sup> /µL
Mean corpuscular volume	3	-	1	-	-	-	-	a123	-	-	-	-	-	a123	a13	82-102 fL
Mean Corp. hemoglobin Conc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31-35 g/dL
Hemoglobin	3	3	-	-	-	-	a13	a123	-	-	12	1	2	a23	1	11-16 g/dL
Hematocrit	-	-	-	-	-	a	a13	a13	-	a123	-	-	2	a12	1	34-40%
White blood cell count	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A12	3.9-11 × 10 <sup>9</sup> /L
Neutrophils	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	a123	-	a	-	45-74% WBC
Lymphocytes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	a123	-	a3	-	25-45% WBC
Monocytes	a	a	a3	3	-	-	-	-	a	-	-	2	-	1	-	3-7% WBC
Eosinophils	a123	-	-	-	-	a123	a123	a13	3	a12	23	a13	-	-	-	1-7% WBC
<b>Adverse events</b>	1 <sup>(3)</sup>	-	1 <sup>(4)</sup>	3	3 <sup>(5)</sup>	-	2 <sup>(6)</sup> 3 <sup>(7)</sup>	-	-	-	-	1 <sup>(8)</sup>	-	-	-	

# Plazebo-kontrollierter, randomisierter doppelt-blind Versuch in Diarrhö Patienten

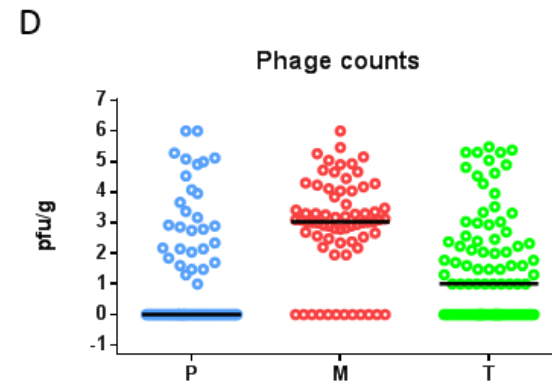
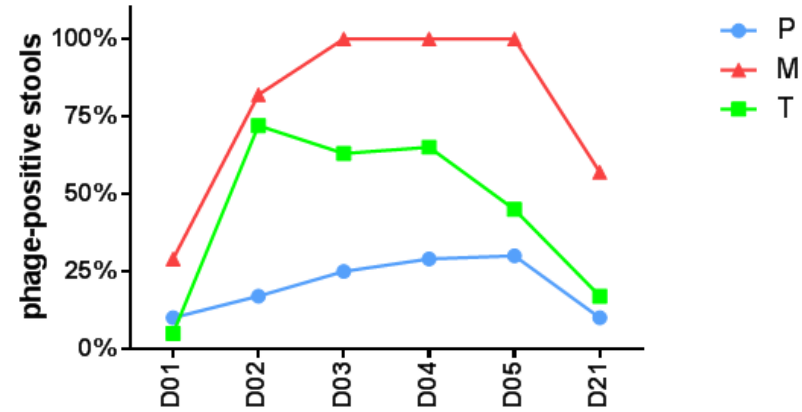
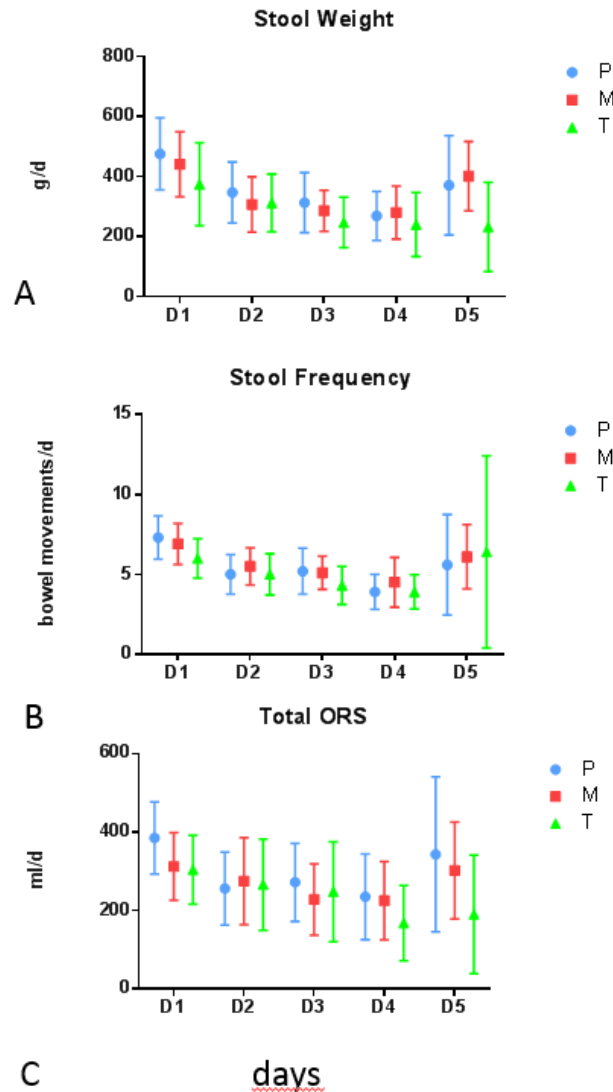


# Probleme mit der Rekrutierung von informativen Patienten



Zeitaufwendige E. coli Erreger Diagnostik

# Kein Behandlungserfolg auf objektive Durchfallparameter gegenüber Standardtherapie



EBioMed 4, 124

Phagendurchtritt, aber keine Phagenvermehrung

Randomisierte Patienten waren vergleichbar zum Therapiebeginn:

Diarhea patients' characteristics before first dose of allotted treatment (baseline).

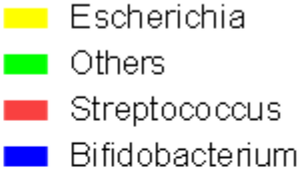
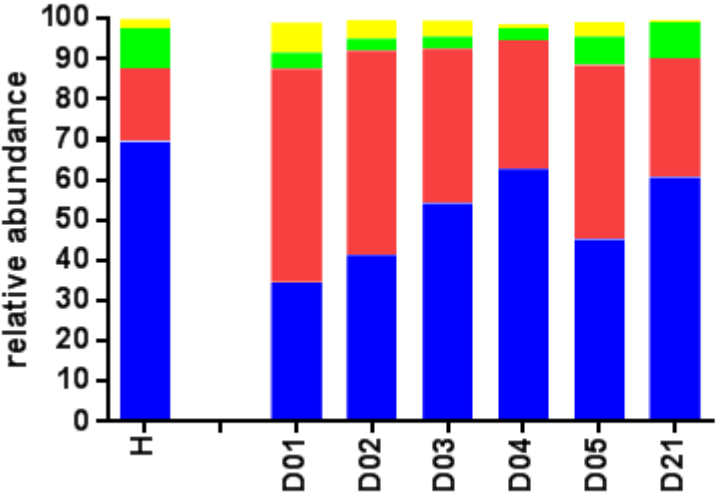
Group	Number of patients	Admission weight kg	Diarhea duration before 1st dose (hours)	Stool frequency/day before 1st dose	No of vomiting/day before 1st dose
Placebo	41	8.70 ± 1.7 (8.2–9.2)	32.1 ± 10.3 (29.0–35.2)	16.0 ± 7.1 (13.8–18.2)	5.9 ± 4.7 (4.5–7.3)
Microgen phages	40	8.43 ± 1.4 (8.0–8.9)	33.1 ± 10.4 (32.5–33.7)	14.6 ± 6.5 (12.6–16.6)	6.4 ± 5.7 (4.6–8.2)
T4-like phages	39	8.36 ± 1.3 (8.0–8.8)	32.6 ± 10.2 (29.4–35.8)	16.0 ± 7.6 (13.6–18.4)	7.7 ± 7.2 (5.4–10.0)

Auch kein Behandlungseffekt in der Untergruppe der E.coli-positiven Patienten:

Quantitative diarhea parameters in patients with microbiologically confirmed *E. coli* diarhea treated with Microgen or T4-like phage cocktail or placebo.

Confirmed <i>E. coli</i> infections (n = 69)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
<i>Stool frequency:</i>				
Placebo (n = 19)	7.5 ± 3.4 (6.0–9.0)	6.0 ± 3.1 (4.6–7.4)	6.3 ± 4.5 (4.3–8.3)	4.8 ± 3.9 (3.0–6.6)
Microgen (n = 22)	6.3 ± 4.1 (4.6–8.0)	5.3 ± 2.9 (4.1–6.5)	4.2 ± 2.5* (3.2–5.2)	4.6 ± 5.1 (2.5–6.7)
T4-like phage (n = 28)	6.6 ± 4.1 (5.1–8.1)	5.8 ± 4.3 (4.2–7.4)	5.0 ± 3.9 (3.6–6.4)	4.3 ± 3.2 (3.1–5.5)
<i>Stool weight:</i>				
Placebo (n = 19)	514 ± 444 (314–714)	422 ± 360 (260–584)	350 ± 352 (192–508)	316 ± 280 (190–442)
Microgen (n = 22)	433 ± 265 (322–544)	276 ± 196 (194–358)	278 ± 213 (189–367)	293 ± 279 (176–410)
T4-like phage (n = 28)	406 ± 480 (228–584)	344 ± 321 (225–463)	280 ± 284 (175–385)	280 ± 345 (152–408)

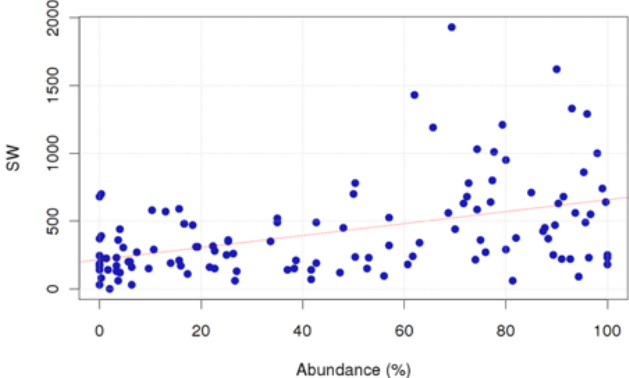
# Stuhlmikrobiom Analyse zeigte wenig E. coli, aber eine massive Streptokokken Vermehrung



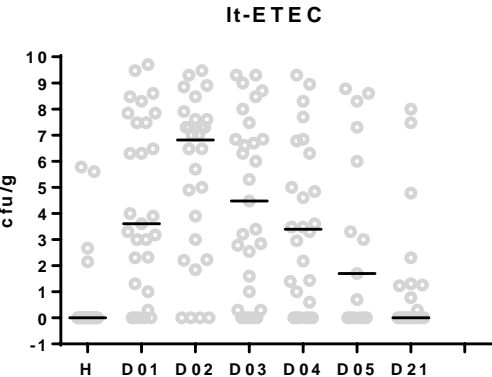
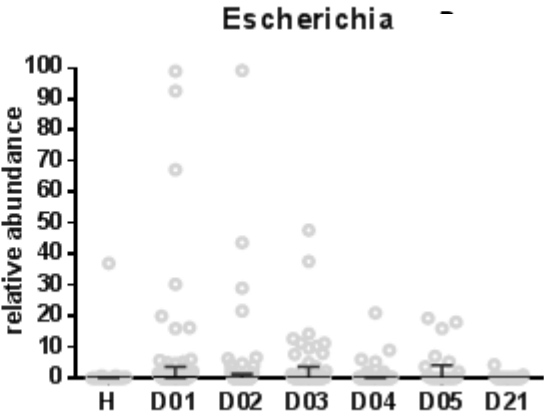
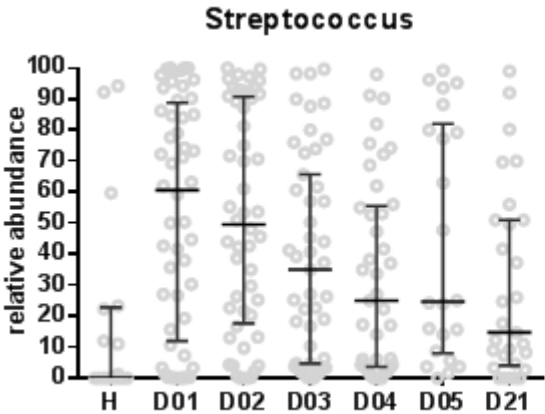
EBioMed 4, 124

Streptokokken korrelierten mit Stuhlmenge und Diarrhö Verlauf

Streptococcus R=0.449 P=0

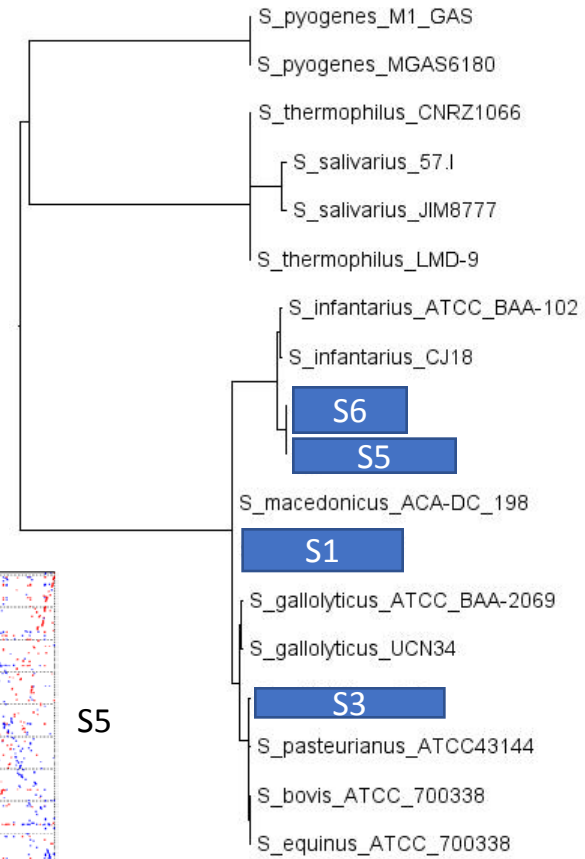
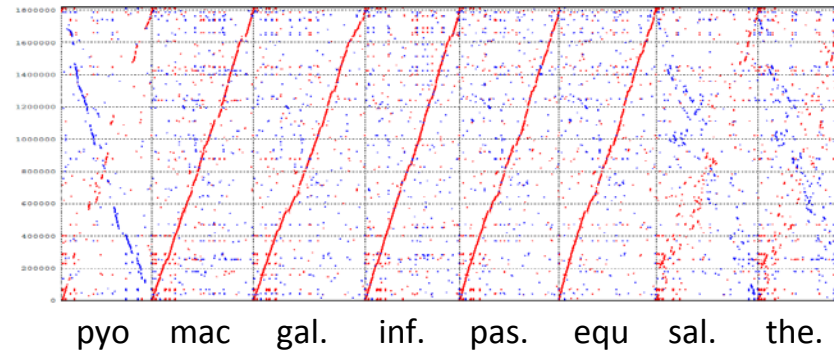


A



# Die Genom Analyse von Stuhl Streptokokken zeigten

- \* *S. bovis* Arten,
- \* Kommensale des Dünndarms,
- Ohne Virulenz Gene
- Darm Mikrobiom Dysbiose





## Fehleranalyse:

Der Darm ist ein schwieriges Versuchsfeld für Phagentherapie,

- Unzugänglich (invasive Probennahme bei Durchfall ethisch nicht zulässig),
  - Orale Phagen müssen gegen Säureeinwirkung bei Magenpassage geschützt werden
  - Rolle von E. coli bei Durchfall zunehmend angezweifelt
  - Bei E.coli Durchfall ist die Erregerkonzentration eventuell unterhalb der Phagen Replikationsschwelle
  - Tierexperimente zeigten, dass Phagen-Bakterien Interaktionen im Darm stark von Laborbedingungen abweichen
- 
- Phagentherapie aus unserer Sicht:
  - —→ Bedarf nach mehr Grundlagenforschung
  - von der Laborbank ans Krankenbett und wieder zurück zum Tiermodell
  - —→ Definition geeigneter Infektionen mittels mikrobiologischer Auswertung von Fallstudien (belgisches Modell)

# Danksagung

Am icddr,b:

S. A. Sarker (PI), S. Sultana, S. Huq, K. A. Talukder,  
F. Qadri, A. Cravioto

Am NRC:

G. Bourdin, J. Sidoti, A. Bruttin, M. Weiss,  
S. Chenouffi-Chibani, S. Zuber, G. Reuteler,  
F. Charton, S. McCallin, S. Kieser, B. Berger, C.  
Barretto, C. Ngom-Bru, M. Delley, A.-C. Pittet, O.  
Sakwinska



...und den Kindern von Bangladesch, die an  
den Versuchen teilnahmen

