Teil I: Kurzbericht

Förderkennzeichen: 16GW0141

Verbundprojekt: Etablierung von Bakteriophagen als Therapeutikum gegen bakterielle Infektionen – Phage4Cure

Teilvorhaben: Präklinik (non-GLP)

Die im Schlussbericht gewählte männliche Form bezieht sich immer zugleich auf alle Geschlechter.

---

1. Aufgabenstellung

Phage4Cure ist ein gemeinsames Projekt von: Leibniz-Institut DSMZ GmbH (Braunschweig), Fraunhofer ITEM (Braunschweig und Hannover), Charité - Universitätsmedizin Berlin und Charité Research Organisation CRO GmbH (Berlin). Ziel des Verbundprojektes Phage4Cure war/ist die Entwicklung aufgereinigter, behördlich zugelassener medizinischer Prüfpräparate (IMP) von drei gut charakterisierten lytischen Bakteriophagen (kurz: Phagen) gegen *P. aeruginosa*. In einer klinischen Studie der Phase I sollten Sicherheit und Verträglichkeit der vernebelten inhalierten Phagen an gesunden Probanden und später auch bei Patienten nachgewiesen werden. Phagen als hochspezifische Viren der Bakterien sind deren natürliche Feinde, ihre Wirkung ist die Abtötung der Bakterienzellen mit dem Vorteil hoher Spezifität auch innerhalb einer Bakterienart. Im Teilvorhaben der Charité sollten umfassende präklinische Untersuchungen zur Sicherheit, Verträglichkeit, Wirksamkeit und Zytotoxizität des Phagenpräparates durchgeführt werden.

---

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

---

Phage4Cure zielt auf die Bekämpfung des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF), einer genetischen Erkrankung, die die Lunge und andere Organe betrifft. Eine weitere Zielgruppe sind Patienten mit Bronchiektasen ohne Mukoviszidose (Non-CF), einer chronischen, heterogenen Atemwegserkrankung unterschiedlicher Genese. Beide Patientengruppen sind sehr anfällig für Lungeninfektionen. Häufigster Erreger ist *P. aeruginosa* mit zunehmender Multiresistenz gegenüber Antibiotika. Antibiotisch lassen sich diese chronischen Lungeninfektionen nur unzureichend behandeln. Die Betroffenen sind schon früh im Leben Breitspektrum-Antibiotika ausgesetzt, was in der Konsequenz zur dramatischen Multiresistenzlage beiträgt. Die Therapie mit Bakteriophagen stellt eine attraktive therapeutische Option dar. Lytische Phagen sind Viren, die mit hoher Spezifität Bakterien infizieren, sich in ihnen replizieren und die Bakterienzellen lysieren. Das Potenzial von Phagen zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten wurde bereits bei ihrer Entdeckung zu Beginn des 20. Jahrhundert erkannt. Die Phagentherapie gilt als sicher und wird in Osteuropa seit vielen Jahrzehnten in bedeutsamem Umfang eingesetzt. Trotz des langjährigen medizinischen Einsatzes von Phagen in diesen Ländern hat die Phagentherapie jedoch nur selten die klinische Praxis im Westen erreicht, da es bisher an Material in GMP-Qualität und an klinischer Evidenz gemäß GCP-Standards und systematischen klinischen Studien mangelt. Der offensichtliche Vorteil der Phagentherapie ist ihre zielgerichtete spezifische Wirkung gegen ein bestimmtes bakterielles Pathogen unter Beibehaltung oder weitgehender Wahrung des natürlichen Mikrobioms. Zudem sind Phagen ein natürlicher Bestandteil der Biosphäre und des Mikrobioms und sogar die häufigsten replizierenden Einheiten auf der Erde.

Im Verbund Phage4Cure kombinier(t)en wir synergistisch unsere Expertisen in den Bereichen Mikrobiologie, Biotechnologie und pharmazeutische Anwendungen, präklinische Pharmakologie, und *in vivo* und *in vitro* Toxikologie sowie experimentelle präklinische und klinische Studien, um die Zulassung von Phagen als Arzneimittel voranzutreiben.

---

3. Ablauf des Vorhabens

Im Arbeitspaket 4b (*Präklinik (non-GLP))* des Verbundprojekts Phage4Cure wurden an der Charité - Universitätsmedizin Berlin die Sicherheit, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit der drei ausgewählten

Phagen sowie des daraus bestehenden Phagencocktails gegen *P. aeruginosa* in Modellen unterschiedlicher Komplexität analysiert. Es wurde ein *ex vivo* Modell auf dem Integritätsniveau eines intakten Gewebeverbandes (isoliert kultiviertes und infiziertes/stimuliertes humanes Lungengewebe) und ein *in vitro* Modell (infizierte/stimulierte humane Zellen) sowie ein anspruchsvolles, standardisiertes Mausmodell verwendet, das es ermöglichte, spezifische Aspekte des Krankheitsverlaufs sowie die Therapie bei Patienten abzubilden Es erfolgten umfangreiche Analysen der Phagen-Wirts-Reaktion unterschiedlicher Komplexität, die in der Gesamtschau eine Charakterisierung des Phagencocktails hinsichtlich seiner spezifischen Eigenschaften ermöglichten und schließlich durch die Bereitstellung experimenteller Daten auch eine wesentliche Grundlage für die Beantragung der klinischen Studie beim BfArM lieferten.

4. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Während der gesamten Laufzeit des Teilvorhabens und darüber hinaus fand ein intensiver Austausch zwischen den Verbundpartnern statt.

In AP4b wurde die Aerosolisierbarkeit der drei Studienphagen einzeln und als Cocktail untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die Cocktailphagen mit einem handelsüblichen CE-zertifizierten Verneblungssystem aerosolisieren lassen, was eine inhalative Anwendung bei Patienten ermöglicht.

Untersuchungen im *in vitro* Modell mit der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549 zeigten, dass die drei Cocktailphagen *per se* nicht zu einer Zellschädigung durch LDH-Freisetzung *in vitro* beitragen bzw. die durch *P. aeruginosa* induzierte Zellschädigung nicht verstärken.

Im humanen *ex vivo* Lungenmodell führte die Phagenbehandlung zu einer Reduktion der Bakterienlast bei hoher *Multiplicity of Infection*. Die Phagentiter blieben stabil oder stiegen an. Die Immunantwort zeigte eine vom Infektionsstamm abhängige IL-1β Aktivierung.

Die Untersuchungen im *in vivo* Mausmodell bestätigten die Unbedenklichkeit des Phagencocktails. Es zeigte sich eine Reduktion der Bakterien in Lunge und BAL 12 Stunden p.i. Die Phagenapplikation hatte keinen Einfluss auf die Integrität der alveolokapillären Barriere, und die Immunreaktion variierte je nach Zytokin. Die histopathologische Auswertung bestätigte diese Ergebnisse.

Die Einreichung der erforderlichen Dokumente zur Beantragung der Phage4Cure Studie erfolgte über das CTIS-Portal der *European Medicine Agency* (EMA) durch Mitarbeiter der Charité Research Organisation GmbH (CRO). Die bereits erstellten Dokumente zu den präklinischen Daten in der *Investigator's Brochure* wurden dafür optimiert und korrigiert, in enger Abstimmung mit den Projektpartnern.

Parallel dazu wurden die Protokolle für die Analyse von Patientenmaterial an das externe Labor und die CRO übergeben und die Versuchsabläufe optimiert. Die parallel zur klinischen Studie durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Phagentiter im gemischten Cocktail unabhängig von der Konzentration zu allen untersuchten Zeitpunkten stabil blieben.

Die Ergebnisse tragen dazu bei, den untersuchten Cocktail als mögliche Option zur Behandlung chronischer Pseudomonas-Infektionen weiter in Betracht zu ziehen.

Teil II: Eingehende Darstellung

Förderkennzeichen: 16GW0141

Verbundprojekt: Etablierung von Bakteriophagen als Therapeutikum gegen bakterielle Infektionen – Phage4Cure

Teilvorhaben: Präklinik (non-GLP)

Die im Schlussbericht gewählte männliche Form bezieht sich immer zugleich auf alle Geschlechter.

---

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

---

Phage4Cure ist ein Verbundprojekt von: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig), Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM Braunschweig und ITEM Hannover), Charité - Universitätsmedizin Berlin und Charité Research Organisation CRO GmbH (Berlin).

Der folgende inhaltliche Sachbericht mit ausführlicher Darstellung ist eine Zusammenstellung u. a. aus Teilen der Dokumente IMP-Dossier und Entwicklungsbericht sowie aus Teilen der im Rahmen des Projektes entstandenen Dissertation von Herrn Vollgraf, angepasst an den Zweck dieses Sachberichts. Die beiden erstgenannten Dokumente sind Pflichtbestandteil in Projekten zur Entwicklung eines Arzneimittels in Deutschland, sie enthalten die Detailberichte aller beteiligten Projektpartner aus ihren jeweiligen Verantwortungsbereichen im Gesamtprojekt. Zulassungsbehörde und gleichzeitig begleitende Behörde im Projektverlauf ist das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM.

Im Folgenden werden die drei ausgewählten Phagen aus Gründen noch bestehender Projekt-Geheimhaltungsvereinbarungen mit den Nummern 1, 2 und 3 bezeichnet. *Pseudomonas aeruginosa*-Stammbezeichnungen werden ebenfalls nicht genannt, es wird die interne Stammbezeichnung für die klinischen Isolate verwendet. Im Folgenden ist mit „Stämmen“ grundsätzlich *P. aeruginosa* gemeint. Auf Literatur- oder andere Quellenangaben wird verzichtet.

Ziel des Projektes Phage4Cure war es, hochgereinigte Präparate einiger weniger gut charakterisierter lytischer Phagen als alternative Therapieoption bei chronischer Besiedlung der Lunge mit *P. aeruginosa* zu entwickeln. Aus diesen Einzelphagen sollten nach EU-GMP-Standards IMP-Präparate (IMP = *Investigational Medicinal Product*, Medizinisches Prüfpräparat) hergestellt werden, die schließlich als Phagencocktail ein breiteres Spektrum der Bakterienabtötung bieten und das Auftreten phagenresistenter Bakterienvarianten reduzieren sollten.

Hintergrund des Gesamtvorhabens

Der Einsatz von Phagen zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten wurde erstmals vor mehr als einem Jahrhundert von dem französisch-kanadischen Mikrobiologen Felix d'Hérèlle am Institut Pasteur in Paris vorgeschlagen. Lytische Phagen sind hochspezifisch, überschreiten nur sehr selten die bakterielle Artgrenze und sind in der Regel sehr wirksam bei der Bakterienlyse, wenn ein Phage zu seinem Bakterienstamm passt. Neue Phagen können aus Umweltproben für *P. aeruginosa* und vielen andere Bakterien isoliert werden. Die Phagentherapie gilt als sicher und wird in Osteuropa seit vielen Jahrzehnten in bedeutsamem Umfang eingesetzt. Trotz der langjährigen medizinischen Anwendung von Phagen in Osteuropa hat die Phagentherapie jedoch nur selten die klinische Praxis im Westen erreicht, da es bisher an Material in GMP-Qualität und klinischer Evidenz nach GCP-Standards sowie an systematischen klinischen Studien mangelt. Phagen haben gegenüber klassischen/chemischen antimikrobiellen Mitteln mehrere Vorteile, z. B. vermehren sich Phagen nur in ihrem Zielbakterium und können keine eukaryotischen Zellen infizieren. Der offensichtlichste Vorteil der Phagentherapie ist ihre zielgerichtete spezifische Wirkung gegen ein bestimmtes bakterielles Pathogen unter Wahrung bzw. weitgehender Wahrung des natürlichen Mikrobioms. Zudem sind Phagen ein natürlicher Bestandteil der Biosphäre und des Mikrobioms und sogar die häufigsten replizierenden Einheiten auf der Erde. Phagen müssen vor der Anwendung am Menschen (oder am Tier) unter Einhaltung strenger Verfahren nach dem Arzneimittelgesetzt aufgereinigt werden. Da Phagen und Antibiotika unterschiedliche Wirkungsweisen haben, können Phagen zur Behandlung antibiotikaresistenter Bakterien eingesetzt

werden. Es besteht zwar die Möglichkeit der Entwicklung von bakteriellen Phagenresistenzen, die die Wirksamkeit eines Phagenpräparates beeinträchtigen können. Die Anwendung von Phagencocktails (komplementär oder synergistisch wirkende Phagenmischungen) reduziert dieses Phänomen.

Im Arbeitspaket 4b (*Präklinik (non-GLP))* des Verbundprojektes Phage4Cure wurden an der Charité - Universitätsmedizin Berlin die Sicherheit, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit der drei ausgewählten Phagen bzw. des daraus bestehenden Phagencocktails gegen *P. aeruginosa* in Modellen unterschiedlicher Komplexität analysiert. Es wurde ein *ex vivo* Modell auf dem Integritätsniveau eines intakten Gewebeverbandes (isoliert kultiviertes und infiziertes/stimuliertes humanes Lungengewebe) und ein *in vitro* Modell (infizierte/stimulierte humane Zellen) sowie ein anspruchsvolles, standardisiertes Mausmodell verwendet, das es ermöglichte, spezifische Aspekte des Krankheitsverlaufs sowie die Therapie bei Patienten abzubilden. Es wurden umfangreiche Analysen zur Phagen-Wirts-Antwort unterschiedlicher Komplexität durchgeführt, die in der Gesamtschau eine Charakterisierung des Phagencocktails hinsichtlich seiner spezifischen Eigenschaften ermöglichten und schließlich durch die Bereitstellung experimenteller Daten auch eine wesentliche Grundlage für die Beantragung der klinischen Studie beim BfArM lieferten. Das Teilvorhaben wurde im Förderzeitraum (2017 – 2024) erfolgreich bearbeitet. Im Folgenden werden die entsprechenden Aktivitäten und erzielten Ergebnisse in den Arbeitspaketen 4b-1 und 4b-2 dargestellt:

Arbeitspaket 4b-1

Analyse der antimikrobiellen Aktivität nach Aerosolisierung

Da sich Phagen am besten vermehren, wenn sie direkt auf ihre Wirtsbakterien treffen, ist die Aerosolisierung die beste Methode für den medizinischen Einsatz von Phagen zur Behandlung von Atemwegsinfektionen mit *P. aeruginosa*. Daher wurden zunächst die Auswirkungen von physikalischem Stress, insbesondere hydrodynamischem Stress, auf die Replikationsfähigkeit von Phagen nach Aerosolisierung getestet.

Parallel zum Auswahlverfahren der Studienphagen durch die Leibniz-Institut DSMZ GmbH wurden 14 Phagen (jeweils 4-5 aus den Morphotypen *Myoviridae, Podoviridae*, *Siphoviridae*) aus der Phagensammlung der DSMZ auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Stress unter Verwendung verschiedener Verneblungssysteme untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sollten bei der Auswahl der Studienphagen berücksichtigt werden. Da zu Studienbeginn noch nicht klar war, welches Inhalationssystem in der klinischen Phase des Projekts zum Einsatz kommen würde, wurden verschiedene Systeme getestet, die sich in ihrer Funktionsweise (Druck vs. vibrierende Membran) unterscheiden.

Die drei Studienphagen wurden von Mitarbeitern der DSMZ identifiziert und zusammen mit ihren Indikatorstämmen (Bakterienstämme, die eine eindeutige Identifizierung der Phagen ermöglichen) sowie mit zwei Stämmen, die von allen drei Phagen lysiert werden (Infektionsstämme, intern PA70 und PA74), an die Charité und die anderen Projektpartner übergeben. Alle klinischen Isolate wurden dem Konsortium freundlicherweise von Prof. S. Häußler (TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung, Hannover, Deutschland und Department of Clinical Microbiology, Copenhagen University Hospital-Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) zur Verfügung gestellt.

Nach Durchführung erster Aufreinigungsprozesse wurden die drei Studienphagen ebenfalls in die Aerosolisierungsexperimente eingeschlossen. Es erfolgten Titerbestimmungen vor und nach Aerosolisierung sowie Vergleiche zwischen aufgereinigten Phagen und Lysaten.

In Experimenten mit dem mechanischen Aerosolisierungssystem wurden pro Morphotyp 4 verschiedene Phagen vernebelt. Dabei zeigten die Phagen des Typs *Siphoviridae* die stärksten Titerverluste und Phagen des Typs *Podoviridae* den geringsten. Unter den *Myoviridae* gab es sowohl Phagen, die einen hohen Titerverlust nach Vernebelung zeigten als auch Phagen mit geringem Titerverlust. Der mechanische Nebulizer wurde u. a. aufgrund der Ergebnisse aus den o. g. Untersuchungen als nicht geeignet für die Anwendung am Patienten eingestuft, daher kam zur Analyse der finalen Studienphagen nur der Mesh Vernebler zum Einsatz.

Im Mesh Verneblungssystem zeigten alle drei Studienphagen einen Titerverlust nach der Verneblung unabhängig vom Aufreinigungsgrad. Nur bei einem der aufgereinigten Cocktailphagen kam es prozentual zu einem stärkeren Titerverlust bei der Verneblung der aufgereinigten Probe verglichen mit dem Lysat.

Nach Festlegung des Verneblungssystems, welches in der klinischen Studie eingesetzt werden sollte (Mesh Vernebler, mit CE-Zertifizierung und 2 Membranen mit unterschiedlicher Porengröße), wurden analog zu den vorherigen Experimenten Titerbestimmungen vor und nach Aerosolisierung sowie Vergleiche zwischen aufgereinigtem Phagen und Lysat durchgeführt.

Die Aerosolisierung der drei Studienphagen mittels der größeren Membran ergab einen durchschnittlichen Titerverlust von 20% nach Verneblung. Aus Gründen der Stabilität wurde den aufgereinigten Phagen humanes Serumalbumin (HSA) zugesetzt. Zum Ausschluss eines negativen Einflusses des Zusatzes auf die Verneblungseigenschaften, wurden die mit HSA versetzen Phagen ebenfalls aerosoliert. Es konnten dabei keine nachteiligen Effekte beobachtet werden. Daher enthielten alle Pufferlösungen, die als Placebo oder Kontrolle (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*) dienten, ebenfalls HSA.

Zur Komplementierung der Aerosolisierungsexperimente wurde in einem letzten Schritt der Cocktail bestehend aus den 3 Einzelphagen, die vom Fraunhofer ITEM aus den Referenzläufen (inkl. Zusatz von HSA) zur Verfügung gestellt wurden, aerosolisiert. In Vorbereitung auf die klinische Studie wurde für die Untersuchungen die kleinere Membran des Verneblungssystems verwendet. Dies sollte zur Bildung kleinerer Aerosoltröpfchen führen, um bei der Anwendung am Patienten theoretisch eine tiefere Deposition der Phagen in den Atemwegen zu ermöglichen. Der Titer des Phagencocktails wurde vor und nach Verneblung unter Verwendung eines für alle 3 Phagen suszeptiblen *P. aeruginosa* Stamms (PA74) bestimmt und der Titerverlust in % berechnet. Dabei konnte ein Titerverlust von ca. 16% nach der Verneblung bestimmt werden, d. h. ca. 84% der Phagen waren noch infektiös. Dieses Ergebnis wurde bei der Berechnung der Startdosis für die klinische Studie berücksichtigt.

Analyse der antimikrobiellen Aktivität, klinischer Parameter und Unbedenklichkeit des Phagenpräparates *in vivo*

Die Untersuchungen im Mausmodell hingen stark von der Auswahl der Cocktailphagen und damit von der Bestimmung eines klinischen Pseudomonas-Isolats für die Infektion ab. Ziel war es, einen Stamm auszuwählen, der von allen Phagen im Cocktail lysiert wird. Dazu erfolgte zunächst eine *in vitro* Charakterisierung der ausgewählten Bakterien-Stämme hinsichtlich Wachstums- und Infektionseigenschaften. Ein entsprechender Tierversuchsantrag zur Etablierung eines spezifischen Infektionsmodells für die Anforderungen von Phage4Cure wurde erstellt, eingereicht und genehmigt. Da sich die klinischen Isolate in ihrem Infektionsverhalten stark von den klassischen etablierten Laborstämmen unterscheiden, wurden verschiedene Infektionsdosen getestet, bis die optimalen Versuchsbedingungen etabliert waren.

Nach Abschluss der Versuche zur Etablierung der Infektionsdosis im Mausmodell wurde der Antrag für die Durchführung der präklinischen Studie erstellt, bei der zuständigen Behörde eingereicht und genehmigt. Grundlegende experimentelle Techniken wurden speziell für Phage4Cure entwickelt oder angepasst (z. B. Applikation des Phagencocktails durch Intubation). Im Anschluss an den tierexperimentellen Teil erfolgten Auswertung, Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Dazu erfolgte eine eingehende biostatistische Beratung u. a. durch Mitarbeiter der Statistischen Beratungseinheit (fu:stat) der Freien Universität Berlin.

Basierend auf den Ergebnissen der Etablierungsversuche wurde folgender genereller Versuchsaufbau gewählt: Infektion der Mäuse mit *P. aeruginosa* oder PBS (Scheininfektion), 6 Stunden nach der Infektion Applikation des Phagencocktails, bestehend aus allen 3 vom Fraunhofer ITEM hergestellten Phagen im Verhältnis 1:1:1 oder Applikation der Rekonstitutionslösung (Placebo) und Analyse zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion.

Nach der transnasalen Infektion mit dem ausgewählten *P. aeruginosa*-Isolat waren ab 12 Stunden *post infectionem* (p.i.) Bakterien in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Lungengewebe nachweisbar. Zusätzlich traten klinische Symptome einer Lungenentzündung auf, einschließlich Hypothermie und fortschreitendem Gewichtsverlust. Die Behandlung mit den Phagen reduzierte den durch die Infektion verursachten Temperaturverlust 6 Stunden nach der Behandlung. Die Untersuchung der Veränderungen des Körpergewichts zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Phagen- oder Placebobehandlung hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht der mit PBS-infizierten Mäuse.

Die intratracheale Behandlung mit den Phagen 6 h p.i. führte im Vergleich zur Placebogruppe zu weniger Bakterien in der BAL und in der Lunge 12 h nach der Infektion, während zu den anderen Zeitpunkten keine Unterschiede festgestellt wurden.

In allen mit Phagen behandelten Gruppen konnten zu allen Zeitpunkten (12, 24 und 48 h p.i.) Phagen in BAL, Lunge und Milz nachgewiesen werden. Es wurden Titer von ca. 10^8 *plaque forming units* (PFU)/ml in Lungengewebe und BAL bzw. 10^4 PFU/ml in der Milz gemessen.

Untersuchung der Integrität der alveolokapillären Barriere sowie der pulmonalen und systemischen Immunantwort

Die Integrität der Lungengefäße wurde mittels ELISA bestimmt. Das Verhältnis der Konzentration von Albumin in der BAL und im Plasma 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach der Infektion wurde analysiert, um den Grad der vaskulären Leckage in den Alveolarräumen zu bestimmen.

Mit PBS scheininfizierte Tiere zeigten keine erhöhte Lungenpermeabilität. Die Infektion mit *P. aeruginosa* führte zu einem Integritätsverlust der alveolokapillären Barriere, der durch die Phagenbehandlung nicht beeinflusst wurde.

Die Anzahl der Leukozyten in der BAL wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Gesamtzahl der Leukozyten war bei infizierten Mäusen im Vergleich zu scheininfizierten Tieren erhöht. Die am häufigsten nachgewiesenen Zellen unter diesen Leukozyten waren polymorphkernige Leukozyten (PMN). Der Prozentsatz der PMN war bei den scheininfizierten und mit Phagen behandelten Tieren zu allen Zeitpunkten höher als bei den scheininfizierten und mit Placebo behandelten Tieren. Es wurden keine Unterschiede zwischen den mit Placebo und den mit Phagen behandelten infizierten Tieren festgestellt. Bei den infizierten Tieren war der prozentuale Anteil der alveolären Makrophagen reduziert. Bei scheininfizierten Tieren, die mit Phagen behandelt wurden, war der prozentuale Anteil der Makrophagen ebenfalls reduziert. Bei infizierten Tieren blieb die Gesamtzahl der Alveolarmakrophagen stabil. Die Gesamtzahl der Alveolarmakrophagen in der Phagengruppe 48 h p.i. stieg jedoch bei den scheininfizierten Tieren an.

Die Zellzahlen im Blut wurden mit einem für Tiere geeigneten automatischen Zellzähler gemessen. Bei den infizierten Mäusen, die die Placebo- oder Phagenbehandlung erhielten, blieb die Gesamtleukozytenzahl im Blut weitgehend unverändert. Erst 24 h nach der Infektion wiesen die infizierten und mit Placebo behandelten Tiere höhere Gesamtleukozytenzahlen auf als die scheininfizierten und mit Placebo sowie die infizierten und mit Phagen behandelten Mäuse. Abgesehen von diesem Ergebnis hatte die Phagenbehandlung weder bei den scheininfizierten noch bei den mit Pseudomonas infizierten Tieren einen relevanten Einfluss auf die im Blut gemessenen Zellpopulationen.

Zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort wurden die folgenden inflammatorischen Mediatoren in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Plasma mittels eines Multiplex-Assays gemessen: IFN-γ, CXCL1 (KC), TNF-α, CCL2 (MCP-1), IL-12p70, CCL5 (RANTES), IL-1β, CXCL10 (IP-10), GM-CSF, IL-10, IFN-β, IFN-α, IL-6. Insgesamt wurde bei den mit Phagen behandelten Mäusen mit (IL-12p70) und ohne (TNF-α, GM-CSF, IL-6, CXCL1, CXCL10, CCL2 und CCL5) Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein Anstieg verschiedener Entzündungsmediatoren in der Lavageflüssigkeit gemessen. Das Zytokin IL-1β hingegen war 6 h nach Behandlung mit den Phagen sowohl in der Lavageflüssigkeit als auch im Plasma reduziert. Die biologische Relevanz dieser Ergebnisse ist bislang nicht geklärt. Systemisch wurden in der infizierten und mit Phagen behandelten Gruppe erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-12p70, IFN-α und IFN-γ gefunden.

Histopathologische Untersuchungen

Die histopathologische Untersuchung verschiedener Organe wurde am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin von erfahrenen Tierärzten durchgeführt. Die histopathologische Untersuchung der infizierten Lungen zeigte laut Bericht der Pathologen typische Veränderungen, wie sie bei Infektionen mit *P. aeruginosa* zu erwarten sind.

Auszüge aus dem Bericht werden im Folgenden wörtlich wiedergegeben: Zwölf Stunden nach der Infektion wies die infizierte und mit Phagen behandelte Gruppe tendenziell „eine etwas geringere Ausprägung der bronchoalveolären Entzündungskomponente sowie damit assoziiert ein etwas geringer ausgeprägtes alveoläres und perivaskuläres Ödem" auf als die mit *P. aeruginosa* und Placebo behandelte Gruppe. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurden in der mit *P. aeruginosa* und Phagen behandelten Gruppe im Vergleich zur mit *P. aeruginosa* und Placebo behandelten Gruppe „weniger Nekrosen des Alveolarepithels" festgestellt. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion zeigte die phagenbehandelte Gruppe im Vergleich zur placebobehandelten Gruppe "ein geringeres alveoläres Ödem, eine geringere Ansammlung von neutrophilen Granulozyten im perivaskulären Raum sowie eine geringere Ausprägung von hyalinen Thromben". In der statistischen Auswertung mittels eines semiquatitativen Scores für die spezifischen Parameter Grad der Entzündung sowie Ödembildung (alveolar und perivaskulär) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

"Die scheininfizierten und phagenbehandelten Tiere als auch in geringerem Umfang die placebobehandelten Tiere zeigten unabhängig vom experimentellen Zeitpunkt zusätzlich zu den durch die PBS-Applikation typischen Veränderungen minimale bis geringgradige, neutrophile alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate. Die Art und Ursache dieser Infiltrate konnte zum Zeitpunkt der histopathologischen Untersuchung nicht mit Sicherheit bestimmt werden."

Arbeitspaketen 4b-2

Analyse der Zytotoxizität / Untersuchung der Unbedenklichkeit des Phagenpräparates *in vitro*

Es wurde ein *in vitro* Modell mit der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549 etabliert, um die Zellantwort nach Phagenbehandlung zu bestimmen und mögliche zytotoxische Effekte des Phagencocktails, z. B. durch die enthaltenen Endotoxine, zu analysieren. Dazu wurden die Zellen mit *P. aeruginosa* infiziert und entweder mit Phagenlysat oder aufgereinigten Phagen (jeweils zusammengemischt als Cocktail) behandelt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen nicht infiziert und nur mit dem Phagenlysat oder dem aufgereinigten Cocktail inkubiert. Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde als Maß für eine potenzielle Zellschädigung gemessen.

Nach Inkubation der nur mit dem Phagencocktail stimulierten Zellen konnte unabhängig vom Aufreinigungsgrad der Phagen keine (erhöhte) LDH-Freisetzung gemessen werden. Infolge der Pseudomonas-Infektion wurde LDH aus den Zellen freigesetzt. Die Behandlung der Zellen mit dem Phagencocktail hatte unabhängig vom Aufreinigungsgrad keinen Einfluss auf diese Freisetzung. Die behandelten Zellen zeigten tendenziell eine geringere LDH-Ausschüttung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei Cocktailphagen im untersuchten Setting *per se* nicht zu einer Zellschädigung mittels LDH-Freisetzung *in vitro* beitragen bzw. die durch die *P. aeruginosa* induzierte Zellschädigung nicht verstärken.

Analyse der antimikrobiellen Aktivität sowie Analyse der Phagentiter

Einzelphagen:

Es wurden *ex vivo* Untersuchungen an humanem Lungengewebe mit dem klinischen Pseudomonas-Isolat (PA74) und den aufgereinigten Phagen etabliert und durchgeführt. Dabei wurden alle Phagen einzeln getestet. Humanes Lungengewebe wurde mit *P. aeruginosa* infiziert und 30 Minuten nach der Infektion einmalig mit je einem der Phagen in je zwei Dosierungen (*multiplicity of infection*, MOI) behandelt. Als Kontrolle dienten die Pufferlösung (Phagenpuffer + HSA) sowie das Antibiotikum Imipenem. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 6 h, 24 h) nach der Applikation wurden die Proben entnommen und die bakterielle Last sowie die Phagentiter bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation der einzelnen Phagen einen unterschiedlichen Effekt auf die Vermehrung von *P. aeruginosa* im Lungengewebe *ex vivo* hatte. Während Phage 1 (hohe MOI) die Erregerlast zu allen Zeitpunkten um ca. eine log-Stufe reduzierte, führte die Applikation von Phage 2 nur zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden zu einer Reduktion der Bakterienlast. Der dritte Phage sowie die niedrig dosierten Phagen 1 und 2 hatten keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum. Bei der Applikation von Imipenem konnten keine viablen Bakterien nachgewiesen werden.

Alle drei Phagen konnten zu allen Zeitpunkten und in beiden Dosierungen aus dem humanen Lungengewebe isoliert werden. Die gemessenen Titer der Phagen waren bei der Inkubation im Lungengewebe bei 37°C stabil bzw. es kam durch Lyse der Bakterien am Infektionsort zu einem Anstieg des Phagentiters über die Zeit (24 h Zeitpunkt). Phage 2 zeigte dabei den höchsten Titeranstieg. Zur Kontrolle wurden die Phagentiter zusätzlich aus Lungenproben bestimmt, die zuvor nicht mit *P. aeruginosa* infiziert worden waren. Hier zeigte sich kein Titeranstieg über die Zeit, sondern die Titel blieben stabil auf dem Ausgangsniveau.

Phagencocktail:

Die Untersuchungen an humanem Lungengewebe mit den 3 Einzelphagen wurden um Experimente mit dem Phagencocktail und ein zweites klinisches *P. aeruginosa*-Isolat ergänzt. Dazu wurde humanes Lungengewebe mit jeweils einem der *P. aeruginosa*-Stämme (intern PA74 bzw. PA70 bezeichnet) infiziert und 30 Minuten nach der Infektion mit dem Phagencocktail kombiniert aus den 3 Einzelphagen (1:1:1; in 2 Dosierungen) behandelt. Als Kontrollen dienten die Pufferlösung und Imipenem. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 6 h, 24 h) nach der Behandlung wurden die Proben entnommen und die bakterielle Last sowie die Phagentiter bestimmt. Es zeigte sich, dass die Anwendung des Cocktails mit einer hohen Dosierung zu allen Zeitpunkten nach der Behandlung in PA74 sowie 6 und 24 Stunden in PA70-infizierten Lungen zu einer geringeren Bakterienzahl führte. Die Applikation von weniger Phagen hemmte das bakterielle Zellwachstum 24 Stunden nach der Behandlung nur bei PA70. Bei der Applikation von Imipenem konnten keine viablen Bakterien nachgewiesen werden.

Die Analyse der Phagentiter zeigte das Vorhandensein des Phagencocktails im menschlichen Lungengewebe bei beiden Dosierungen zu allen Zeitpunkten. Es zeigte sich, dass die Titer des Phagencocktails in PA74- und PA70-infizierten Lungenproben im Laufe der Zeit (2 h vs. 24 h und 6 h vs. 24 h nach der Behandlung) bei beiden Dosen und zwischen 2 h und 6 h in PA74-infizierten und mit der niedrigen Dosis behandelten Proben anstiegen. Ferner zeigte sich, dass die Phagenvermehrung in

mit PA74-infizierten Lungenproben tendenziell stärker war als in den mit PA70-infizierten Proben. Die Titer des Cocktails in nicht infiziertem Gewebe blieben über die Zeit stabil.

Analyse der Immunantwort *in vitro*

Einzelphagen:

Zur Analyse der Immunantwort wurde exemplarisch das frühe proinflammatorische Zytokin IL-1β bestimmt. Die höchsten Werte wurden in infiziertem Gewebe 24 h nach der Behandlung gemessen; die niedrigsten Werte in nicht infizierten, mit Phagen behandelten Proben und in infizierten, mit Antibiotika behandelten Proben. In Proben, die mit Phage 1 (hohe Dosis) oder Phage 2 (beide Dosierungen) behandelt wurden, konnten 24 h nach der Behandlung erhöhte Werte im Vergleich zu kontrollbehandelten Proben gemessen werden. Bei Phage 3 konnten keine erhöhten Werte gemessen werden.

Phagencocktail:

Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den einzelnen Phagen. Interessanterweise wurde 24 h nach der Behandlung nur in der mit PA74 infizierten Lunge ein Anstieg des IL-1β (hohe Dosis) im Vergleich zu den mit Puffer behandelten Proben zur gleichen Zeit festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte in den mit dem zweiten klinischen Isolat infizierten Lungenproben weniger IL-1β gemessen werden. Die alleinige Applikation von Phagen führte zu keiner Stimulation des Zytokins IL-1β, ebenso wenig wie die Applikation von Imipenem.

Vorbereitende und die klinische Studie begleitende Arbeiten

Im März 2023 erfolgte die Einreichung der erforderlichen Dokumente zur Beantragung der Phage4Cure Studie über das CTIS-Portal der *European Medicine Agency* (EMA) durch Mitarbeiter der Charité Research Organisation GmbH (CRO). Für die erfolgreiche Einreichung der erforderlichen Unterlagen wurden die bereits im Jahr 2022 erstellten Dokumente der präklinischen Daten in der *Investigator's Brochure* optimiert und korrigiert. Dies erfolgte in einem intensiven Austausch gemeinsam mit den Projektpartnern. Im Zuge der Prüfung der Dokumente gab es einige Rückfragen seitens des BfArM, u. a. zu den präklinischen Daten. Diese wurden von den Mitarbeitern der Charité umfassend bearbeitet, fristgerecht beantwortet und die Studie/Unterlagen neueingereicht. Die Genehmigung der klinischen Studie erfolgte schließlich im August 2023. Parallel zu diesen Prozessen wurden in Vorbereitung der Analysen des Patientenmaterials und der Probenaufarbeitung die Protokolle an das durchführende Labor sowie die CRO übergeben und in enger Abstimmung die Versuchsabläufe weiter optimiert sowie eine Standardmethode zur Phagenextraktion für die späteren mikrobiologischen Experimente der klinischen Projektphase etabliert.

Die Studie startete im September 2023. Begleitend zur Studiendurchführung wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Witzenrath Stabilitätsuntersuchungen des Phagencocktails durchgeführt. Diese waren notwendig, um die Prozesse und Arbeitsabläufe rund um die Studie zu standardisieren und zu vereinfachen, insbesondere im Hinblick auf die Lagerungsfähigkeit der zubereiteten Studienmedikation unmittelbar vor der Applikation. Zunächst wurde die Stabilität der Phagen im Cocktail zu den Zeitpunkten 0, 3, 7, 12 und 24 Stunden nach Zubereitung der Studienmedikation in den verwendeten Einwegspritzen (*in use* Stabilität) durch vergleichende Untersuchung der Konzentrationen vor und nach Zubereitung bzw. nach verschiedenen Lagerungsintervallen bestimmt. Die untersuchten Zeitpunkte richteten sich nach den Phagengaben (und somit Zubereitungs-Zeitpunkten des Cocktails) für die Probanden. In einem weiteren Versuchsdurchlauf wurden zusätzlich Messungen zu den Zeitpunkten 0 und 48 Stunden nach Zubereitung des Cocktails durchgeführt.

Die Phagentiter (Einzelphagen auf Indikatorstämmen getestet) waren unter allen getesteten Bedingungen stabil. Bei keinem der drei Phagen wurde ein relevanter Konzentrationsabfall über die Zeit oder nach 48 Stunden festgestellt.

Diese Stabilitätsuntersuchungen wurden aufgrund des Addendums zur Anwendung einer höheren Phagendosis mit entsprechend höher konzentrierten Phagenproben (1x, 2x, 3,5x im Vergleich zur Ursprungsdosis) zu den Zeitpunkten 0 und 48 Stunden nach Zubereitung des Cocktails wiederholt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Phagentiter auch in der 2- und 3,5-fachen Phagenkonzentration über 48 Stunden stabil sind.

Meilenstein Teilvorhaben Charité: M4b: Teil der präklinischen Studienreports (non-GLP) zur Einreichung der klinischen Studie bei den Behörden wurde erreicht.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamtausgaben für das Projekt (AP4b-1 und AP4b-2) beliefen sich auf 397.513,06 €. Bitte finden Sie nachfolgend eine Aufschlüsselung der Ausgaben nach Finanzpositionen:

0812 – Wissenschaftliches Personal: Von den insgesamt bewilligten 210.735,00 € wurden 244.965,86 € (116,24 %) für die Beschäftigung von wissenschaftlichem Personal zur Bearbeitung der umfangreichen wissenschaftlichen Fragestellungen in den Arbeitspaketen 4b-1 und 4b-2 des Verbundprojektes verwendet. Die Überziehung in dieser Position ist auf die kostenneutralen Laufzeitverlängerungen zur Durchführung neuer, die klinische Studie begleitender Untersuchungen zurückzuführen, die zum Zeitpunkt der Antragstellung noch nicht absehbar waren. Durch Einsparungen in anderen Positionen (F0835, F0850) konnte die Überziehung in dieser Position ausgeglichen werden.

0817 – Nicht-wissenschaftliches Personal: Von den insgesamt bewilligten 90.863,00 € wurden 90.648,66 € (99,76 %) zweckentsprechend für die unterstützenden Aufgaben in den Arbeitspaketen 4b-1 und 4b-2 eingesetzt.

0835 – Vergabe von Aufträgen: Von den insgesamt bewilligten 14.638,00 € für Multiplex-Zytokinassays wurden 0 € (0 %) eingesetzt, da die Untersuchungen durch eigene, kostengünstigere Analysen selbst durchgeführt werden konnten. Ein Teil dieser Mittel wurde als Verbrauchsmittel (F0838) zur Durchführung der geplanten, die klinische Studie begleitenden Untersuchungen verwendet.

0843 – Sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben: Von den insgesamt bewilligten 50.000,00 € wurden 61.898,54 € (123,80 %) zweckentsprechend für Verbrauchsmaterialien (Mäuse, Materialien für Gewebe- und Phagenkultur, Antikörper für FACS, ELISA und Mikroskopie etc.) ausgegeben. Die Überziehung in dieser Position konnte durch Einsparungen in der Position F0835 ausgeglichen werden, wofür Mittel aus F0835 in Mittel für Verbrauchsmaterialien (F0838) umgewidmet werden müssen.

0846 – Dienstreisen: Von den insgesamt bewilligten 1.000,00 € wurden 0 € (0 %) ausgegeben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Projekttreffen entgegen der Planung in Berlin stattfanden. Die hier nicht benötigten Mittel konnten zur Deckung des Mehrbedarfs in anderen Positionen verwendet werden.

0850 – Investitionen: Von den insgesamt bewilligten 30.589,00 € für die Anschaffung eines Lungenfunktionsmessplatzes und eines Metallblockthermostats wurden 0 € (0%) ausgegeben. Die Anschaffung des Lungenfunktionsmessplatzes sowie des Metallblockthermostats konnte aus anderen verfügbaren Mitteln realisiert werden, so dass die dafür vorgesehenen Mittel zur Deckung des Mehrbedarfs in Position F0812 verwendet wurden.

Insgesamt konnten die zur Verfügung gestellten Mittel mit einem Nutzungsgrad von 99,92 % für das Projekt eingesetzt werden.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der weit verbreitete Einsatz von Antibiotika in der Medizin und Nutztierhaltung hat zu einer ausgeprägten Resistenz vieler Bakterienstämme geführt, was weltweit ein großes Problem darstellt. Antibiotikaresistenzen tragen jedes Jahr zu fast 5 Millionen Todesfällen bei. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat in den letzten Jahren zahlreiche Maßnahmen vorgeschlagen, um die Faktoren, die zur Antibiotikaresistenz führen, zu verringern und die Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Antibiotikaresistenz zu koordinieren. Zu den relevantesten resistenten Bakterien gehören *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*, die bei vorhandener Carbapenem-Resistenz auf der WHO-Liste der prioritären Krankheitserreger als kritisch eingestuft sind.

Obwohl die Phagentherapie noch nicht als medizinische Standardbehandlung anerkannt ist, hat sie sich zu einem vielversprechenden therapeutischen Ansatz gegen antimikrobielle Resistenzen entwickelt, da sie in der Lage ist, ihre Wirtsbakterien ohne schwerwiegende Komplikationen zu zersetzen.

Zur Behandlung von Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* werden in der Regel antimikrobielle Medikamente eingesetzt. Die Behandlung von Infektionen mit antimikrobiellen Medikamenten wird jedoch zunehmend schwieriger, da die Zahl multiresistenter und panresistenter Stämme weltweit

zunimmt. Eine chronische *P. aeruginosa*-Infektion wird mit einem Fortschreiten der Krankheit und einer höheren Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Bronchiektasen ohne und mit zystischer Fibrose (CF) in Verbindung gebracht, was eine komplexe Behandlung erfordert.

Die Europäische Arzneimittelagentur (*European Medicines Agency* - EMA) erkennt zwar das große Potenzial von Phagen an, betont aber, dass Phagen erst dann für eine Zulassung empfohlen werden können, wenn ihre Wirksamkeit und Sicherheit in entsprechend konzipierten klinischen Studien nachgewiesen wurden.

Mit dem interdisziplinären Verbundprojekt Phage4Cure konnten wir ein leistungsstarkes Forschungskonsortium etablieren, das sich zum Ziel gesetzt hat, hochgereinigte Präparate einiger weniger gut charakterisierter lytischer Phagen als alternative Therapieoption bei chronischer Besiedlung der Lunge mit *P. aeruginosa* zu entwickeln. Aus diesen Einzelphagen sollten nach EU-GMP-Standards IMP-Präparate (IMP = *Investigational Medicinal Product*, Medizinisches Prüfpräparat) hergestellt werden, die schließlich als Phagencocktail ein breiteres Spektrum der Bakterienabtötung bieten und das Auftreten phagenresistenter Bakterienvarianten reduzieren sollten. Im Verbund Phage4Cure kombinier(t)en wir synergistisch unsere Expertisen in den Bereichen Mikrobiologie, Biotechnologie und pharmazeutische Anwendungen, präklinische Pharmakologie, *in vivo* und *in vitro* Toxikologie sowie experimentelle präklinische und klinische Studien, um die Zulassung von Phagen als Arzneimittel voranzutreiben.

Die beantragten Mittel wurden umfänglich für die Planung, die vorbereitenden Arbeiten, die Initiierung und Durchführung der experimentellen Versuche und Untersuchungen sowie Datenerhebungen, einschließlich der Datenanalysen eingesetzt. Im Teilvorhaben Präklinik wurden umfassende Analysen zur Phagen-Wirts-Antwort unterschiedlicher Komplexität durchgeführt, die in der Gesamtschau eine Charakterisierung des Phagencocktails hinsichtlich seiner spezifischen Eigenschaften ermöglichten und schließlich durch die Bereitstellung von experimentellen Daten auch eine wesentliche Grundlage für die Beantragung der klinischen Studie beim BfArM lieferten.

4. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Aufgrund der interdisziplinären Natur des Verbundvorhabens und der Interdependenz der Teilvorhaben kann und soll die Verwertung der Ergebnisse des Phage4Cure Konsortiums ausschließlich gemeinsam erfolgen.

Mit dem Projekt Phage4Cure haben wir einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung des klinischen Erfolgs der Phagentherapie und zur Zulassung der Bakteriophagen-Therapie in Deutschland geleistet.

Im Rahmen des Teilvorhaben Präklinik des Phage4Cure-Projekts wurden insbesondere neue und verbesserte präklinische experimentelle Systeme (*ex vivo* humanes Lungenmodell, Zelllinien und Mausmodell) verwendet, die in ihrer Gesamtheit die Untersuchung verschiedener Aspekte der Phagentherapie ermöglichen. Die experimentellen präklinischen *in vitro, ex vivo* und *in vivo* Modelle liefern wichtige Daten für die Beantragung der Zulassung phagenbasierter Therapeutika. Darüber hinaus stärkt dieses Kooperationsprojekt die Kompetenzen der einzelnen Partner auf diesem neuen und noch wenig erforschten Gebiet.

Die drei in Phage4Cure identifizierten Phagen wurden für den therapeutischen Einsatz beim Menschen im deutsch-französischen Projekt MAPVAP (gefördert vom BMBF, PIs Martin Witzenrath, DE und Jean-Damien Richard, FR) hinsichtlich ihres Wirkmechanismus, ihres Einflusses auf das Immunsystem und die Mikrobiota sowie ihrer Biofilm-lysierenden Eigenschaften weiter untersucht (Kooperationsvertrag liegt vor).

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden keine neuen Studien zum untersuchten Phagencocktail ohne Beteiligung einzelner Konsortiumsmitglieder veröffentlicht.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die nachfolgende Liste beinhaltet Publikationen, die bis zum Zeitpunkt des Abschlussberichtes veröffentlicht wurden. Weitere Publikationen sind geplant, u. a. zur klinischen Studie in Verbindung mit den Ergebnissen der präklinischen Untersuchungen.

1. Asmus E, Karle W, Brack MC, Wittig C, Behrens F, Reinshagen L, Pfeiffer M, Schulz S, Mandzimba-Maloko B, Erfinanda L, Perret PL, Michalick L, Smeele PJ, Lim EHT, van den Brom CE, Vonk ABA, Kaiser T, Suttorp N, Hippenstiel S, Sander LE, Kurth F, Rauch U, Landmesser U, Haghikia A, Preissner R, Bogaard HJ, Witzenrath M, Kuebler WM, Szulcek R, Simmons S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators attenuate platelet activation and aggregation in blood of healthy donors and COVID-19 patients. **Eur Respir J. 2023;** 61:2202009.
2. Felten M, Ferencik S, Teixeira Alves LG, Letsiou E, Lienau J, Müller-Redetzky HC, Langenhagen AK, Voß A, Dietert K, Kershaw O, Gruber AD, Michalick L, Kuebler WM, Ananthasubramaniam B, Maier B, Uhlenhaut H, Kramer A, Witzenrath M. Ventilator-induced Lung Injury Is Modulated by the Circadian Clock. **Am J Respir Crit Care Med. 2023;** 207:1464-1474.
3. Weissfuss C, Wienhold SM, Bürkle M, Gaborieau B, Bushe J, Behrendt U, Bischoff R, Korf IHE, Wienecke S, Dannheim A, Ziehr H, Rohde C, Gruber AD, Ricard JD, Debarbieux L, Witzenrath M, Nouailles G. Repetitive Exposure to Bacteriophage Cocktails against Pseudomonas aeruginosa or Escherichia coli Provokes Marginal Humoral Immunity in Naïve Mice. **Viruses. 2023;** 15:387.
4. Hollenhorst MI, Nandigama R, Evers SB, Gamayun I, Abdel Wadood N, Salah A, Pieper M, Wyatt A, Stukalov A, Gebhardt A, Nadolni W, Burow W, Herr C, Beisswenger C, Kusumakshi S, Ectors F, Kichko TI, Hübner L, Reeh P, Munder A, Wienhold SM, Witzenrath M, Bals R, Flockerzi V, Gudermann T, Bischoff M, Lipp P, Zierler S, Chubanov V, Pichlmair A, König P, Boehm U, Krasteva-Christ G. Bitter taste signaling in tracheal epithelial brush cells elicits innate immune responses to bacterial infection. **J Clin Invest. 2022;** 132:e150951.
5. Lingscheid T, Lippert LJ, Hillus D, Kruis T, Thibeault C, Helbig ET, Tober-Lau P, Pfäfflin F, Müller-Redetzky H, Witzenrath M, Zoller T, Uhrig A, Opitz B, Suttorp N, Kramer TS, Sander LE, Stegemann MS, Kurth F. Characterization of antimicrobial use and co-infections among hospitalized patients with COVID-19: a prospective observational cohort study. **Infection. 2022;** 50:1441-1452.
6. Kühnapfel A, Horn K, Klotz U, Kiehntopf M, Rosolowski M, Loeffler M, Ahnert P, Suttorp N, Witzenrath M, Scholz M. Genetic Regulation of Cytokine Response in Patients with Acute Community-Acquired Pneumonia. **Genes (Basel). 2022**; 13:111.
7. Wienhold SM, Brack MC, Nouailles G, Krishnamoorthy G, Korf IHE, Seitz C, Wienecke S, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Ross A, Ziehr H, Rohde M, Neudecker J, Lienau J, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC, Rohde C, Witzenrath M. Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental Acinetobacter baumannii Lung Infection. **Viruses. 2021**; 14:33.
8. Witzenrath M, Kuebler WM. The CypA-netics of Ventilator-induced Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med. 2021**; 204:385-387.
9. Wienhold SM, Lienau J, Witzenrath M. Towards inhaled phage therapy in Western Europe. **Viruses. 2019**; 11:295.