

## Sachbericht Teil I: Kurzbericht

Verbundprojekt:	KMU-innovativ-22: TopAcb - Neuartige topische Behandlung von Infektionen iatrogenen Wunden mit multiresistenten Gram- negativen Bakterien (speziell humanpathogenen Acinetobacter-Stämmen) Teilprojekt C
Zuwendungsempfänger:	Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt (UKF – MMK)
Förderkennzeichen:	161B0769C
Laufzeit des Vorhabens:	01. April 2019 bis 30. September 2022

### 1. Aufgabenstellung

Das Projekt TopAcb hatte das Ziel, eine neuartige Phagenprotein-basierte Behandlung zur Bekämpfung bakterieller Wundinfektionen, besonders gegen multiresistente gram-negative Bakterien mit Resistenzen gegen drei der vier der wichtigsten Antibiotikagruppen (sog. 3MRGN bzw. 4MRGN) zu entwickeln. Die schnelle antimikrobielle, lytische Wirkung von Endolysin-Derivaten (Artilysin®e) sollte genutzt werden, um gezielt humanpathogene Gram- negative Bakterien zu eradizieren. Die Verwendung der Artilysin®e sollte erstmals als direkte, topische Applikation auf infizierte Wunden erfolgen, wobei die Applikationsform leicht und schmerzarm sein sollte. Die Wundheilung sollte durch Reduktion multiresistenter Bakterien gefördert werden. Hierdurch sollte das Behandlungsspektrum humanpathogener 3MRGN und 4MRGN erweitert und eine wirksame Bekämpfung zukünftig möglich sein.

### 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Das weit verbreitete Auftreten antimikrobieller Infektionen mit multiresistenten Gram-negativen Bakterien, speziell mit *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) oder *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), wird zu einer zunehmenden Bedrohung im Gesundheitswesen. Mit 3MRGN oder 4 MRGN infizierte Wundflächen gelten besonders häufig als antibiotisch nicht behandelbar, wodurch häufig septische Krankheitsbilder mit hoher Mortalität ausgehen [1]. Dies zeigt die dringende Notwendigkeit für alternative Behandlungsformen.

Der Verbundpartner Lisando GmbH konnte in eigenen projektspezifischen Vorarbeiten erste Artilysin®-Kandidaten entwickeln, die Wirksamkeit gegen ein breit umfassendes Gram- negatives Bakterienspektrum von *A. baumannii*, *P. aeruginosa* und relevanten Vertretern der *Enterobacteriaceae* aufweisen. Hierbei zeigte das Artilysin® Art-175 eine sehr

gute Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Dazu zeigten verschiedene Spezies keine Resistenzentwicklung gegen Artilysin® [3]. Erste Studien in der Veterinärmedizin zeigten, dass das Konzept der Wundbehandlung mit Artilysin® funktioniert.

Es liegen bereits Erfahrungen in der Analyse der Pathogenität speziell von *A. baumannii* in verschiedenen Infektionsmodellen (*ex vivo* und *in vitro*) vor [4-5].

Der Verbundpartner Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Frankfurt analysierte in einer Studie das Konzept der Antibiotika-Besprühung und Fixierung mit Fibrinkleber einer Wunde [6].

1. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017, <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
2. Briers Y, Lavigne R. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* 2015;10(3):377-390.
3. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, et al. Engineered endolysin-based "Artilynsins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *mBio.* 2014;5(4):e01379-14.
4. Weidensdorfer M, Chae JI, Makobe C, et al. Analysis of Endothelial Adherence of Bartonella henselae and Acinetobacter baumannii Using a Dynamic Human Ex Vivo Infection Model. *Infect Immun.* 2015;84(3):711-722.
5. Weidensdorfer M, Ishikawa M, Hori K, et al. The Acinetobacter trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of Acinetobacter baumannii. *Virulence.* 2019;10(1):68-81.
6. Janko M, Nau C, Marzi I, Frank J. Lokale Antibiotikafixation durch Fibrinbesprühung: Bei Knocheninfekten mit Weichteilbeteiligung [Local fixation of antibiotics by fibrin spray: In bone defects with soft tissue involvement]. *Chirurg.* 2017;88(2):166-174.

### 3. Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurden in neun Arbeitspakete unterteilt, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Arbeitsplan mit Arbeitspaketen

AP1	Wissenschaftliche Koordination & Konzeption
AP2	Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit ausgewählter Artilysin®e auf gram-negative Bakterien
AP3	Entwicklung Applikationsverfahren und Formulierung der topischen Applikationsform gegen MRGN
AP4	Wirksamkeitsanalyse der topischen Applikationsform (Lösung/Spray) an ausgewählten Infektionsmodellen
AP5	Dosisfindung und Optimierung der Wirksamkeit der topischen Applikationsform
AP6	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirksamkeit des neu entwickelten Produkts am Säuger-Tiermodell und Optimierung
AP7	Untersuchungen an Patientenproben
AP8	Anwendungen an Patienten
AP9	Begleitende F&E-Aktivitäten

Im ursprünglichen Antrag war die Anwendung der Artilysin®e auf Basis einer Fibrin-Applikation geplant, jedoch zeigten die Vorversuche des Verbundpartners Lisando GmbH eine Inaktivierung der Artilysin®e in dieser Matrix. Dementsprechend erfolgte hier die Anpassung

der Versuchsplanung. Des Weiteren gab es Änderung in der Applikationsform, die topische Applikation erfolgte nicht wie ursprünglich geplant als Spray, sondern als Lösung.

In Folge der SARS-CoV-2 Pandemie kam es bedingt durch die SARS-CoV-2 Pandemie zu unvorhersehbaren Verzögerungen im Arbeitsplan aufgrund von u.a. Lieferschwierigkeiten von Invertebraten (für *in vivo*-Infektionsmodell) und vielen Verbrauchsmaterialien. Die kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit von 6 Monaten ermöglichte die Nachholung der Verzögerungen aus dem Arbeitsplan.

#### 4. Wesentliche Ergebnisse

Die Wirksamkeit der entwickelten Artilysin®e Art-Top1, Art-Top2 und Art-Top3 wurde mit mehreren Gram-negativen Stämmen klinisch relevanter Bakterienspezies getestet. Dabei hatte vor allem Art-Top3 die höchste antimikrobielle Wirksamkeit gegen alle getesteten *A. baumannii* Stämme. Des Weiteren wurde die logarithmische Reduktion der bakteriellen Zellzahl durch die drei Artilysin®e mit *A. baumannii* Stämmen angewandt. Hierbei zeigten alle Artilysin®e eine  $\geq 5$ -log und somit eine Bakterienreduktion von 99,99%. Die antibakterielle Aktivität der drei *lead* Kandidaten gegen *A. baumannii* wurde durch *time-kill* Kinetiken bestimmt. Die Kinetik zeigte eine schnelle zeitabhängige Abtötung von *A. baumannii* für alle drei *lead*-Kandidaten innerhalb von nur einer Minute.

Die Kompatibilität ausgewählter Trägerstoffe Hydroxypropylcellulose (HPC) und Polyvinylalkohol (PVA) mit Art-Top3 wurde getestet. Dabei wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Art-Top3 durch die Verwendung der Trägerstoffe nicht gehemmt.

Verschiedene Infektionsmodelle (u.a. Biofilme, humane Zelllinien, Invertebraten: Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella*) wurden verwendet, um die Wirksamkeit der Artilysin®e in Vorbereitung für den *in vivo* Einsatz zu ermitteln. In allen verwendeten Infektionsmodellen konnte eine antimikrobielle Wirksamkeit der *lead*-Kandidaten nachgewiesen werden.

Die *in vivo* Wirksamkeit von Art-Top2 und Art-Top3 wurde am Säuger-Tiermodell an infizierten Rückenhautwunden bislang nicht bestätigt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die in der Wundflüssigkeit vorhandenen Protease-Inhibitoren die Aktivität der Artilysin®e beeinträchtigen.

#### 5. Zusammenarbeit

Während der Projektlaufzeit herrschte eine enge Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern Lisando GmbH und Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Frankfurt.

## Sachbericht Teil II: Eingehende Darstellung

Verbundprojekt:	KMU-innovativ-22: TopAcb - Neuartige topische Behandlung von Infektionen iatrogenen Wunden mit multiresistenten Gram- negativen Bakterien (speziell humanpathogenen Acinetobacter-Stämmen) Teilprojekt C
Zuwendungsempfänger:	Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt (UKF – MMK)
Förderkennzeichen:	161B0769C
Laufzeit des Vorhabens:	01. April 2019 bis 30. September 2022

### 1. Verwendung der Zuwendung sowie die erzielten Ergebnisse

#### AP 2: Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit ausgewählter Artilysin®e auf Gram-negative Bakterien

##### 2.3 Etablierung repräsentativer Stammsammlung Gram-negativer Bakterien

Multiresistente Gram-negative klinische Isolate wurden aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene ausgewählt. Standard-Referenzstämme stammen von der *American Type Culture Collection* (ATCC).

##### 2.4 Wirksamkeitsanalyse der Artilysin®e hinsichtlich ihrer Bakterizidie (antimikrobielle Wirksamkeit)

Die Wirksamkeit der Artilysin® *lead*-Kandidaten Art-Top1, Art-Top2 und Art-Top3 wurde auf zehn Gram-negative klinische Isolate sowie Referenzstämme relevanter Spezies getestet (Tabelle 1). Hierbei zeigten alle Artilysin®e eine  $\geq 5$ -log und somit eine Bakterienreduktion von 99,99%.

Tabelle 1: Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit auf Gram-negative Stämme.

Stämme	Antimikrobielle Wirksamkeit [ $\log_{10}$ -Wert]			
	Spezies	Art-Top1	Art-Top2	Art-Top3
698		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
893		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
1284		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
1355	<i>A. baumannii</i>	$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
1372		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
1594		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
ATCC 19606		$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
4741	<i>E. cloacae</i>	$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$
ATCC 28753	<i>P. aeruginosa</i>	$\geq 5$	$\geq 5$	$\geq 5$

Die antibakterielle Aktivität von Art-Top3 gegen *A. baumannii* 1372 wurde durch *time-kill*-Kinetiken bestimmt. Die Kinetik zeigte eine zeit- und dosisabhängige Abtötung von *A. baumannii* (Abbildung 1). Hierbei wirkten Art-Top3 Konzentrationen zwischen 25-100 mg/ml schnell und effektiv, wohingegen niedrige Konzentrationen in dem untersuchten Zeitraum keine Wirkung zeigten.

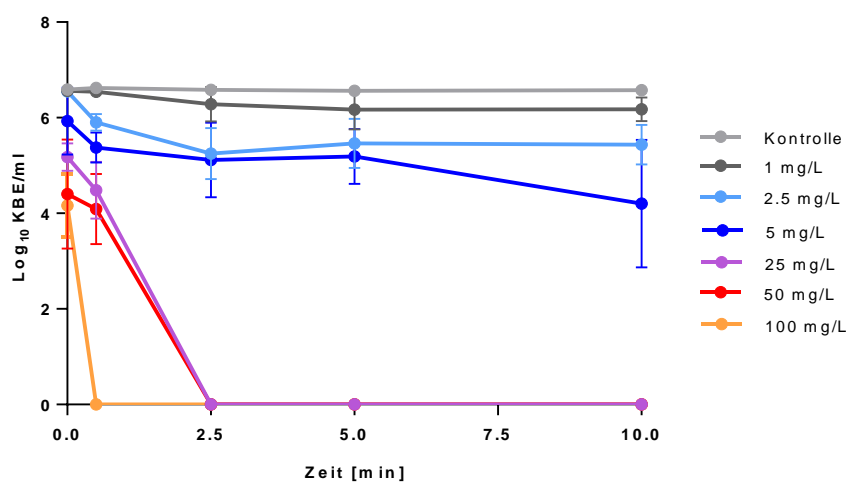
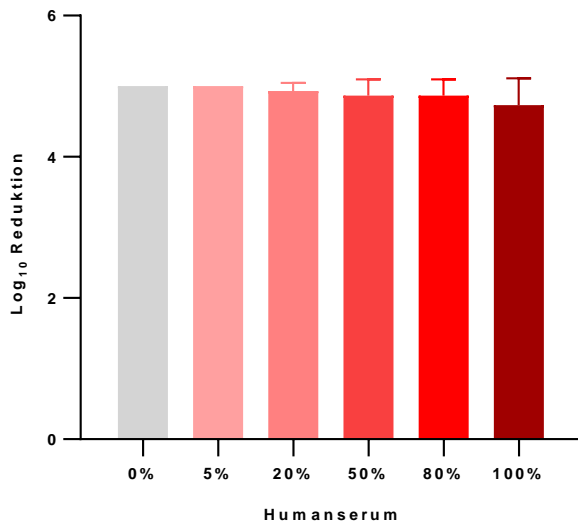


Abbildung 1: Time-Kill-Analysen von Art-Top3. *A. baumannii*-Isolat 1372 wurde über einen Zeitraum von 10 min bei 37 °C mit verschiedenen Art-Top3 Konzentrationen behandelt. Das Abtöten der Bakterien wurde bestimmt, indem nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen wurden.

Um das therapeutische Potenzial von Art-Top3 zu bewerten, wurde die Aktivität gegen *A. baumannii* in Humanserum getestet, wobei physiologische Bedingungen nachgeahmt wurden. Art-Top3 konnte seine Aktivität in Puffer mit bis zu 100% Serum beibehalten, was eine Bakterienreduktion von 4,3-log zeigte (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Antibakterielle Aktivität von Art-Top3 gegen *A. baumannii* in Gegenwart von Humanserum.** *A. baumannii* wurde mit 0,1 mg/ml Art-Top3 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

## 2.5 In vitro Bestimmung jeweils der minimalen Hemmkonzentration der Artilysin®e

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Artilysin® *lead*-Kandidaten Art-Top1, Art-Top2 und Art-Top3 wurde auf sieben klinische *A. baumannii* Isolate sowie einem Referenzstamm getestet. Dabei zeigte vor allem Art-Top3 mit einer MHK von 5 µg/ml die höchste antimikrobielle Wirksamkeit gegen alle getesteten *A. baumannii* Stämme (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentration der drei Artilysin®e auf *Acinetobacter baumannii* Stämme.**

Stämme	MHK (µg/ml)		
	Art-Top1	Art-Top2	Art-Top3
698	5	7,5	5
893	7,5	12,5	5
1284	12,5	12,5	5
1355	10	12,5	5
1372	12,5	12,5	5
1594	7,5	10	5
ATCC 19606	7,5	10	5

Die MHK von Art-Top2 und Art-Top3 wurde auf fünf Gram-negative Stämme relevanter Spezies getestet. Dabei zeigte auch hier Art-Top3 mit ≤20 µg/ml die höchste Wirksamkeit gegen alle getesteten Gram-negativen Stämme (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentration von Art-Top2 und Art-Top3 auf Gram-negative Stämme.**

Stämme	Spezies	MHK (µg/ml)	
		Art-Top2	Art-Top3
4741	<i>E. cloacae</i>	≥30	15
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	≥30	20
ATCC 28753	<i>P. aeruginosa</i>	≥30	10
920	<i>K. pneumoniae</i>	n.a.	12,5
ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	n.a.	10

Es wurden Vergleichsstudien mit klinisch relevanten Antibiotika durch Verwendung von Mikrodilution- und Epsilometertest durchgeführt. Dabei zeigten alle getesteten klinischen Isolate eine Imipenem-Resistenz (≥32 µg/ml) und eine niedrige MHK gegenüber Colistin und Minocyclin. Die verwendeten klinischen Isolate besitzen alle einen 4MRGN Resistenzphänotyp (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentration klinisch relevanter Antibiotika.** Bei >75% der klinischen Isolate besteht eine Ko-Resistenz gegenüber 12 weiteren, klinisch eingesetzten Antibiotika (nicht gezeigt).

Stämme	Klassifizierung	MHK (µg/ml)		
		Imipenem	Colistin	Minocyclin
698	4 MRGN	≥32	1	0,047
893		≥32	1	2
1284		≥32	1	2
1355		≥32	0,25	1
1372		≥32	0,5	0,094
1594		≥32	1	1
ATCC 19606	WT	≥32	0,125	2

### AP 3: Entwicklung Applikationsverfahren und Formulierung der topischen Applikationsform gegen MRGN

#### 3.5 Ausschluss von antibakteriellen Matrixeffekten des Fibrinklebers

Die ursprüngliche Anwendung der Artilysin®e auf Basis einer Fibrin-Applikation wurde verworfen, da die Vorversuche des Verbundpartners Lisando GmbH eine Inaktivierung der Artilysin®e durch Fibrin zeigten. Dementsprechend wurden nach Absprache mit den Verbundpartnern zwei neue Trägerstoffe Polyvinylalkohol (PVA) und Hydroxypropylzellulose (HPC) ausgewählt und die Kompatibilität mit Art-Top3 getestet. Dabei wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Art-Top3 nicht durch die Verwendung der Trägerstoffe gehemmt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Bestimmung der Kompatibilität der Trägermaterialien mit Art-Top3.** Dargestellt ist die antimikrobielle Wirksamkeit.

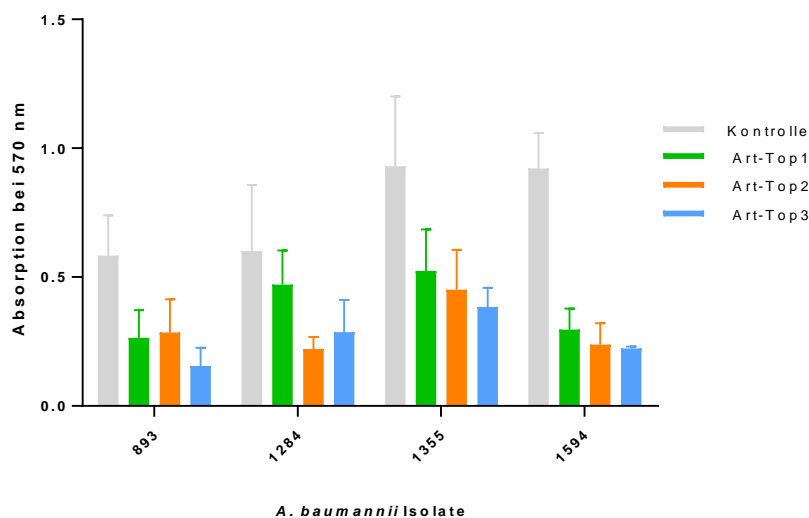
Formulierung	Antimikrobielle Wirksamkeit [log <sub>10</sub> -Reduktion] auf <i>A. baumannii</i> 1372
	0,1 mg/ml Art-Top3
Puffer	≥5
0,8 % HPC	≥5
10% PVA	≥5
30% PVA	≥5

#### AP 4: Wirksamkeitsanalyse der topischen Applikationsform (Lösung/Spray) an ausgewählten Infektionsmodellen

##### 4.2 Ermittlung der Funktionalität der neuen Applikationsform in verschiedenen Infektionsmodellen mit und ohne MRGN- Status in Vorbereitung für den *in vivo* Einsatz

###### Biofilme (*in vitro*)

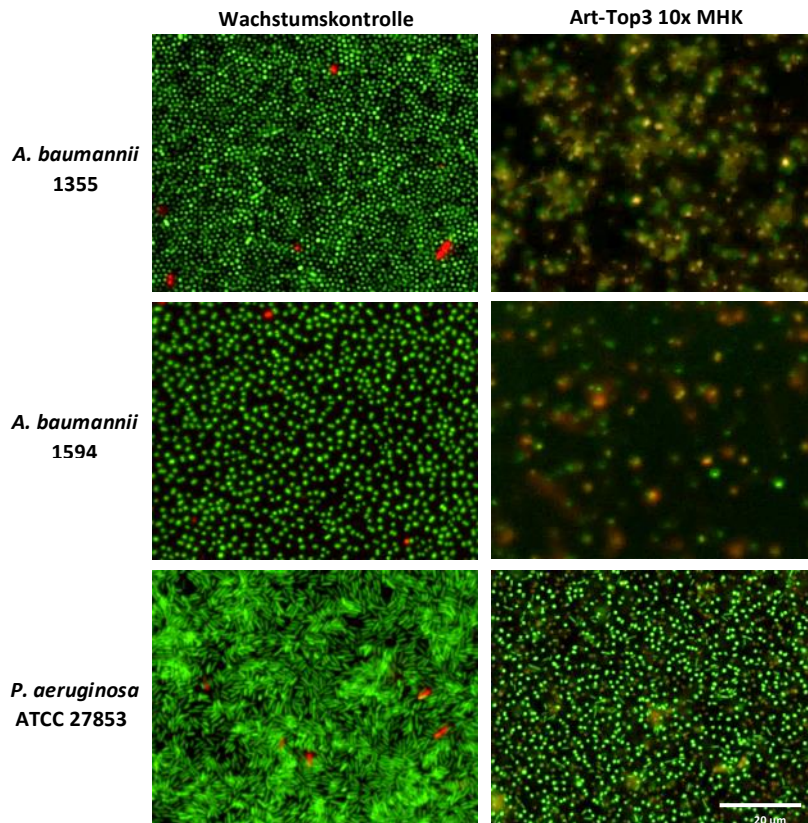
Die antimikrobielle Wirksamkeit der drei Lead-Kandidaten wurde auf präformierte Biofilme von *A. baumannii* unter statischen Bedingungen getestet. Dabei erwiesen sich alle drei Kandidaten als wirksam, da diese über 50% des bereits gebildeten Biofilms entfernten (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Effekt der lead-Kandidaten auf reife *A. baumannii* Biofilme unter statischen Bedingungen.** Absorptionswerte (570 nm) von unbehandelten und mit Artilysin® (10x MHK) behandelten Biofilmen. Die Behandlung mit Artilysin® erfolgte für eine Stunde. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

Weiterhin wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Art-Top3 auf dem geformten Biofilm von *A. baumannii* sowie *Pseudomonas aeruginosa* unter dynamischen Bedingungen getestet. Art-Top3 lysierte sowohl den reifen *A. baumannii* Biofilm der Isolate 1355 und 1594 sowie den *P. aeruginosa* Biofilm (Abbildung 4).

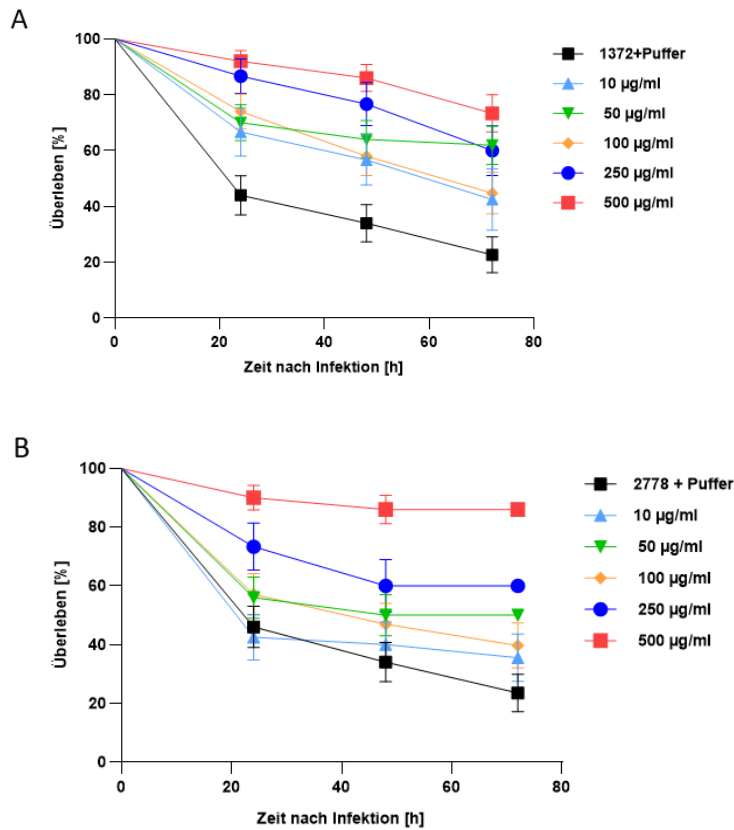




**Abbildung 4: Effekt des lead-Kandidaten auf reife *A. baumannii* und *P. aeruginosa* Biofilme unter dynamischen Bedingungen.** Lebend-Tod-Färbung von unbehandelten und Art-Top3-behandelten Biofilmen. Syto9 (grün) Färbung von lebensfähigen Bakterien und Propidiumiodid (rot) Färbung von toten Bakterien. Vergrößerung: 1000-fach.

#### Analyse in Invertebraten-Infektionsmodellen (*Galleria mellonella*)

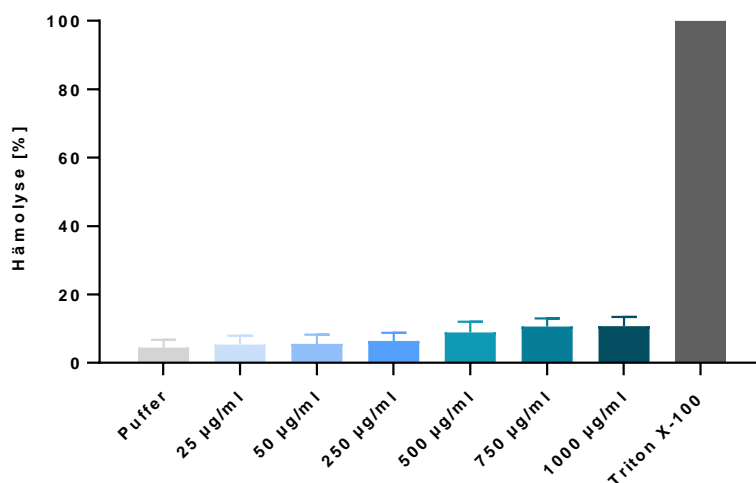
Zur Beurteilung der antibakteriellen Wirksamkeit von Art-Top3 *in vivo* wurde ein Insekten- Infektionsmodell mit Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* verwendet (Peleg *et al.*, 2009). Dabei wurden *G. mellonella* mit den multiresistenten *A. baumannii* Patientenisolaten 1372 und 2778 infiziert und nach 30 min erfolgte die Injektion der Artilysin®- oder HEPES/Natriumchlorid-Lösung. In der jeweiligen Kontrollgruppe, ohne Injektion von Art-Top3, starben ungefähr 60% der *G. mellonella* 24 Stunden nach Injektion. Die Sterblichkeitsrate stieg nach 72 Stunden auf 80%. Im Gegensatz dazu zeigten die Art-Top3 Behandlungsgruppen, dass eine hohe Art-Top3 Konzentration auch zu einer höheren Überlebensrate führt. Demnach überlebten bei Verwendung von 250-500 µg/ml Art-Top3 70-90% der *G. mellonella* 24 Stunden nach Injektion. Die Überlebensrate fiel nach 72 Stunden auf 60-80% (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Antibakterielle in vivo-Wirksamkeit von Art-Top3 im *G. mellonella*-Infektionsmodell.** (A) Überlebenskurven für *G. mellonella*, infiziert mit *A. baumannii* Isolat 1372 (4MRGN) und (B) *A. baumannii* Isolat 2778 (4MRGN) gefolgt von Injektion mit HEPES/NaCl- Lösung (Kontrollgruppe) oder 10-500 µg/ml Art-Top3 (Behandlungsgruppe) (n=5).

### Wirksamkeitsanalyse der topischen Applikationsform in Zellkultur (*in vitro*)

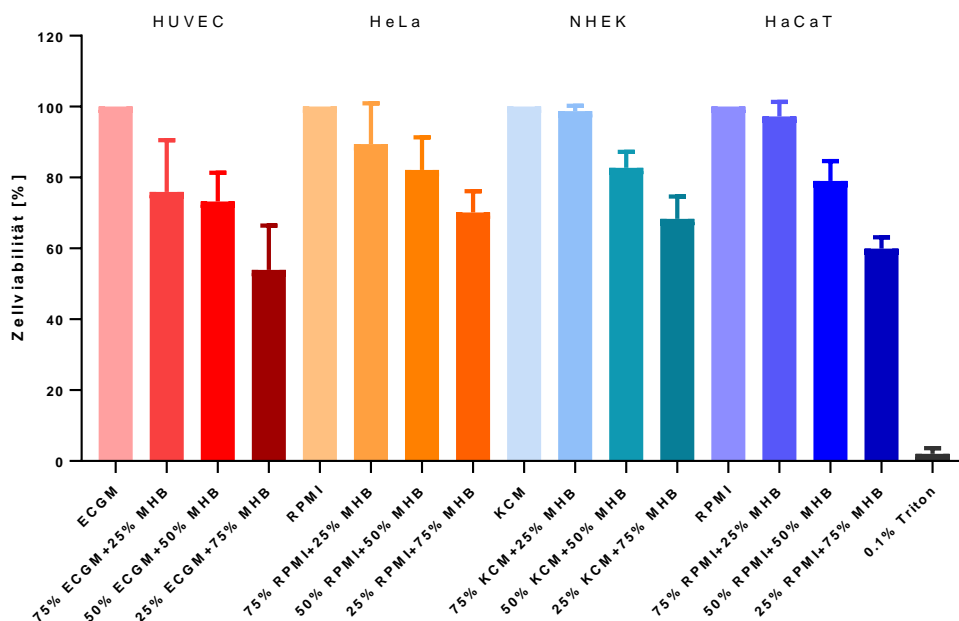
Um die Wirkung von Artilycin® auf humane Zellen zu bestimmen, wurde Art-Top3 mit roten Blutkörperchen bei Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml inkubiert. Triton X-100 und Puffer dienten als Positiv- und Negativkontrolle. Art-Top3 zeigte selbst in hohen Konzentrationen im Vergleich zur Triton X-100 Kontrolle keine Hämolyse der roten Blutkörperchen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Hämolytische Aktivität verschiedener Art-Top3-Konzentrationen.** Rote Blutkörperchen wurden für 24 Stunden mit Art-Top3 bei 37 °C behandelt. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

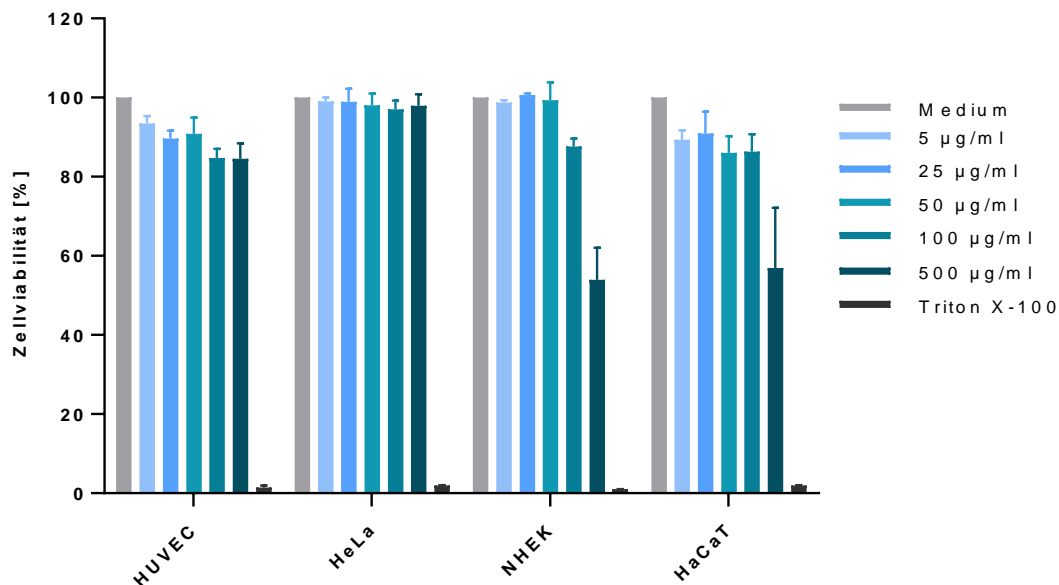
Die Erkenntnisse zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden weiter validiert, indem zunächst geeignete Medien- und Puffer-Kombinationen getestet wurden, die keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit verschiedener humanen Zelllinien haben. Die Medien- und Puffer-Kombinationen wurden so gewählt, dass die standardmäßig verwendeten Kultivierungsmedien *Endothelial Cell Growth Medium* (ECGM) für humane primäre Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) für Henrietta Lacks (HeLa) und immortalisierte Keratinozyten (HaCaT), *Keratinocyte Growth Medium* (KCM) für humane primäre Keratinozyten (NHEK) sowie Mueller Hinton-Broth (MHB) für Bakterien zur *in vitro*-Testung von Artilysin®en kombiniert werden konnten. Zur Bestimmung des Einflusses der Medien-Kombinationen auf die Lebensfähigkeit der Zelllinien wurde ein kolorimetrischer Test (MTT-Test) durchgeführt.

Die Verringerung der Menge an Zellkulturmedium in den verwendeten Kombinationen führte zu einer stetigen Abnahme der Lebensfähigkeit aller verwendeten Zelllinien. Dagegen zeigten die Kombinationen von 75% Zellkulturmedium mit 25% MHB mit 75-95% die höchste Lebensfähigkeit (Abbildung 7).



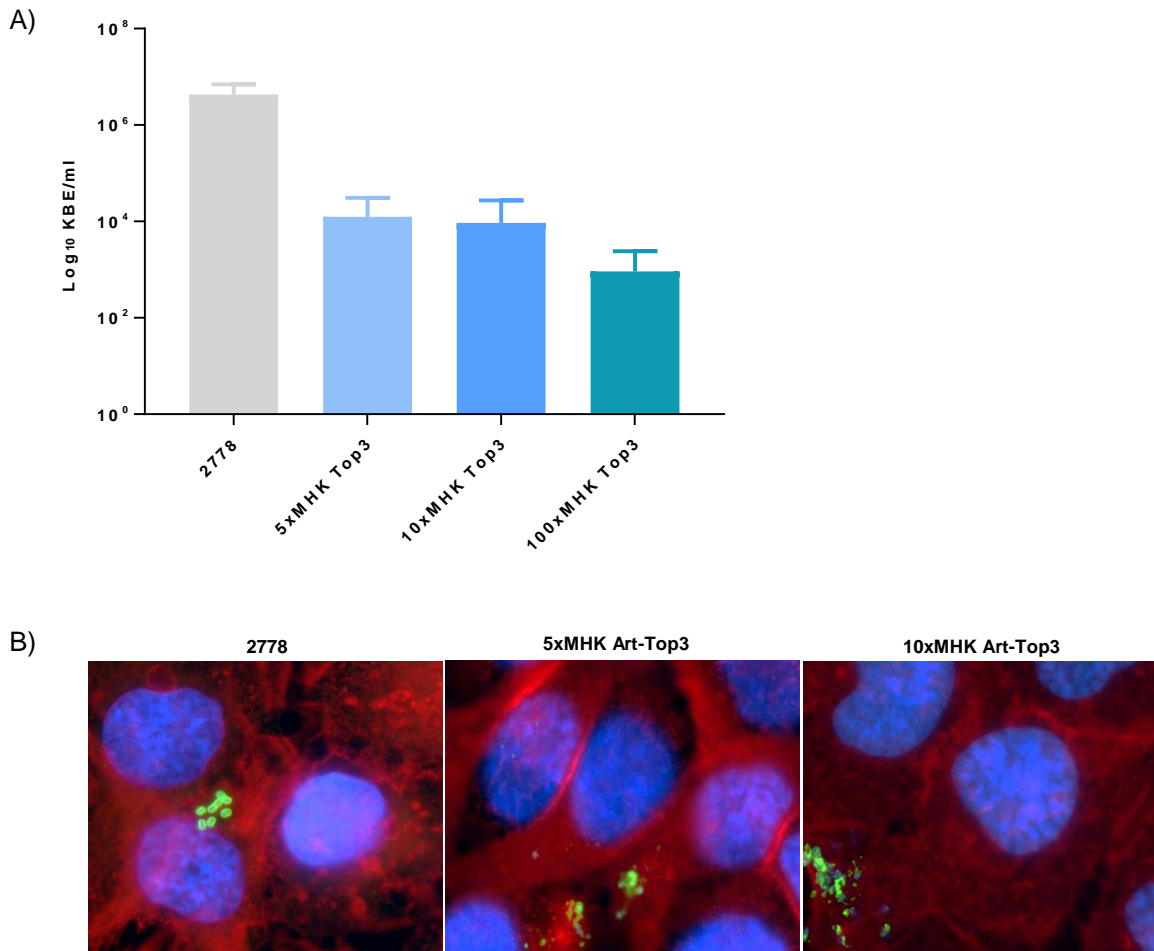
**Abbildung 7: Lebensfähigkeit von humanen Zelllinien nach Exposition mit Medien-Kombinationen.** Säulendiagramm repräsentiert den Prozentsatz lebensfähiger Zellen in Bezug auf Kontrollzellen, nachdem sie unterschiedlichen Medien-Kombinationen für eine Stunde ausgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ausgedrückt.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Art-Top3 auf humane Zelllinien, wurden Art-Top3 Konzentrationen von 5-500 µg/ml in 75% Zellkulturmedium mit 25% MHB verwendet. Dabei zeigten hohe Art-Top3 Konzentrationen von 100 und 500 µg/ml eine geringe Abnahme der HUVEC Lebensfähigkeit von ≤15% verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 8). HeLa-229 Zellen zeigten auch bei hohen Art-Top3 Konzentration keine Abnahme der Lebensfähigkeit, wohingegen NHEK und HaCaT bei der höchsten Konzentration von 500 µg/ml eine Abnahme der Vitalität von ca. 50% zeigten.



**Abbildung 8: Lebensfähigkeit von humanen Zelllinien nach Exposition mit Art-Top3.** Säulendiagramm repräsentiert den Prozentsatz lebensfähiger Zellen in Bezug auf Kontrollzellen, nachdem sie unterschiedlichen Art-Top3 Konzentrationen für eine Stunde ausgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ausgedrückt.

Die antibakterielle Wirksamkeit von Art-Top3 wurde *in vitro* auf *A. baumannii* infizierte HaCaT getestet. HaCaT-Zellen wurden mit dem multiresistenten *A. baumannii* Patientenisolat 2778 infiziert und nach zwei Stunden mit Medium oder Art-Top3 behandelt. Die bakterielle Überlebensrate wurde durch Auswertung der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Therapie mit Art-Top3 bestimmt. Ohne Zugabe von Art-Top3 wurden  $4,3 \times 10^6$  KBE/ml nachgewiesen (Abbildung 9 A). Die Behandlung mit Art-Top3 zeigte eine 2,5- bis 3-fache Bakterienreduktion. Immunfluoreszenzmikroskopie der mit *A. baumannii* infizierten HaCaT bestätigte die Wirksamkeit von Art-Top3, in dem die Bakterien lysiert erscheinen (Abbildung 9 B).



**Abbildung 9: Antibakterielle Wirksamkeit von Art-Top3 an *A. baumannii* infizierten HaCat.** A) Bakterielle Überlebensrate nach Inkubation mit verschiedenen Art-Top3 Konzentrationen. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ausgedrückt. B) Immunfluoreszenzmikroskopie von *A. baumannii* infizierten und mit Art-Top3 behandelten HaCat. Das Aktin-Zytoskelett ist mittels TRITC-Phalloidin (rot), Zellkerne mit DAPI (blau) und Bakterien mit Alexa 488 (grün) gefärbt. Maßstab: 10  $\mu$ m.

#### 4.4 Untersuchung zur bakteriellen Resistenzentwicklung

Um die Resistenzentwicklung von *A. baumannii* gegenüber Art-Top3 zu analysieren, wurden zwei *A. baumannii*-Isolate seriell in steigenden Artilysin<sup>®</sup>-Konzentrationen passagiert. Zur Identifikation der genetischen Ursache einer Artilysin<sup>®</sup>-Resistenz wurden Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analysen der Isolate mit der höchsten Artilysin<sup>®</sup>-Konzentration durchgeführt. Die Analysen zeigten Mutationen im Zweikomponenten-Regulationssystem PmrA/PmrB, deren funktionelle Relevanz noch unklar ist.

#### 4.5 Optimierung der Fibrin-Artilylin®-Formulierung für *in vitro* Infektionsmodelle

Die Zytotoxizität der Trägerstoffe HPC und PVA wurde mittels kolorimetrischem Test auf humane Zelllinien getestet. Dabei zeigte die Applikation von 0,8% HPC keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zelllinien (Abbildung 10). Eine Reduktion der Zellviabilität um  $\geq 95\%$  zeigte 30% PVA auf alle Zelllinien, wohingegen 10% PVA nur eine Reduktion der Zellviabilität von ca. 50% herbeiführte.

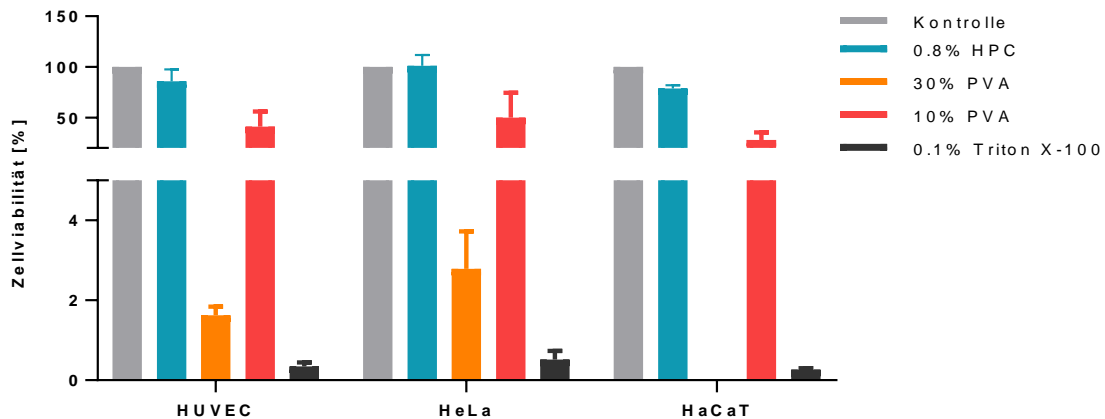
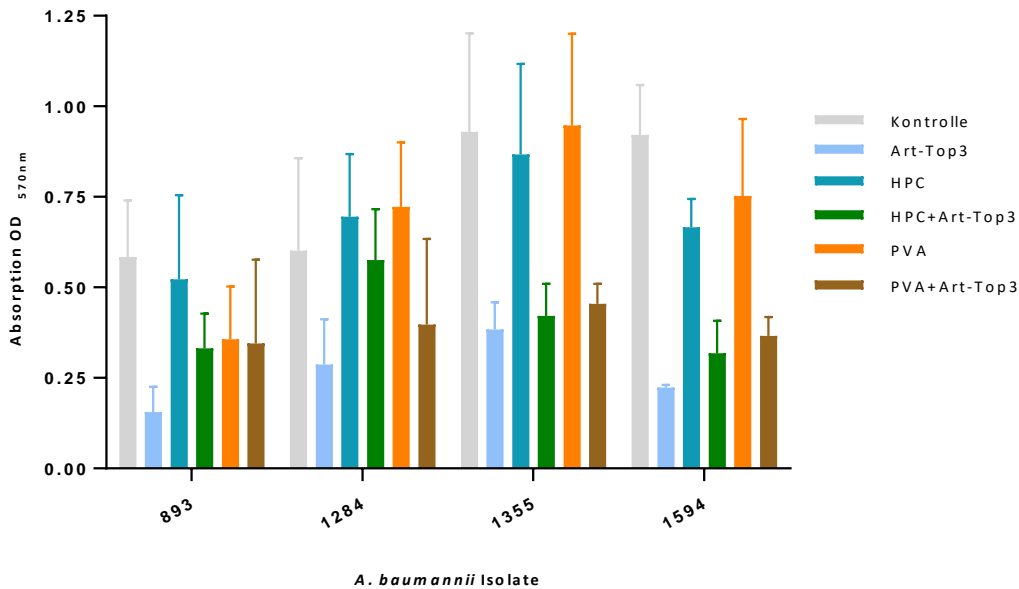


Abbildung 10: **Lebensfähigkeit von humanen Zelllinien nach Exposition mit Trägermaterialien.** Säulendiagramm repräsentiert den Prozentsatz lebensfähiger Zellen in Bezug auf Kontrollzellen, nachdem sie HPC und PVA für eine Stunde ausgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ausgedrückt.

In bereits gezeigten Analysen wurden keine Beeinträchtigungen der antimikrobiellen Wirksamkeit des Art-Top3 in Kombination mit den Trägerstoffen Hydroxypropylcellulose (HPC) und Polyvinylalkohol (PVA) festgestellt. Daher wurde Art-Top3 in Kombination mit den Trägerstoffen in Bezug auf antibakterielle Wirksamkeit mit präformierten *A. baumannii* Biofilmen getestet. Dabei war Art-Top3 bei allen getesteten Isolaten wirksam, da der Biofilm signifikant ( $\geq 50\%$ ) entfernt wurde (Abbildung 11). Art-Top3 in Kombination mit 0,8% HPC zeigte eine Reduktion der Biofilme um 20-50% im Vergleich zur Wachstumskontrolle und der nur mit HPC behandelten Biofilme. Die Kombination von Art-Top3 mit 30% PVA führte bei den multiresistenten *A. baumannii* Patientenisolaten 1284, 1355 und 1594 zu einer Reduktion der Biofilme um  $\leq 40\%$  verglichen mit der Wachstumskontrolle und der nur mit PVA behandelten Biofilme. Dies zeigt, dass Art-Top3 auch in Kombination mit den getesteten Trägerstoffen HPC und PVA antimikrobiell wirksam ist.



**Abbildung 11: Kompatibilität der Trägermaterialien mit Art-Top3 auf reife *A. baumannii* Biofilme unter statischen Bedingungen.** Absorptionswerte (570 nm) von unbehandelten, mit 0,8% HPC, 30% PVA und mit Art-Top3 (10xMHK) behandelten Biofilmen. Die Behandlung mit den Trägerstoffen und Art-Top3 erfolgte für eine Stunde. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) ausgedrückt.

## AP 5: Dosisfindung und Optimierung der Wirksamkeit der topischen Applikationsform

### 5.3 Analyse der antibakteriellen *in vivo* Wirksamkeit

Es wurden Wundflüssigkeiten von unbehandelten Kontrollpatienten mit *A. baumannii* versetzt, um die Art-Top3 Wirksamkeit zu testen. Art-Top3 zeigte in beiden Proben mit einer log-Reduktion von 0,3 und 0,5 keine Wirksamkeit (Tabelle 6). Wundflüssigkeit besitzt eine hohe Menge an Proteasen, wie Metallo-Matrixproteasen oder Serinproteasen, die entscheidend für die physiologische Wundheilung sind (Eming *et al.*, 2014). Diese Proteasen können aufgrund ihrer proteolytischen Funktion Artilysin®e angreifen und diese abbauen. Um die Aktivität der Proteasen zu hemmen, wurde in einem weiteren Experiment Protease-Inhibitor zugegeben. Dabei konnte Art-Top3 intakt bleiben und mit  $\geq 5$  log die erwartete antibakterielle Reduktion zeigen.

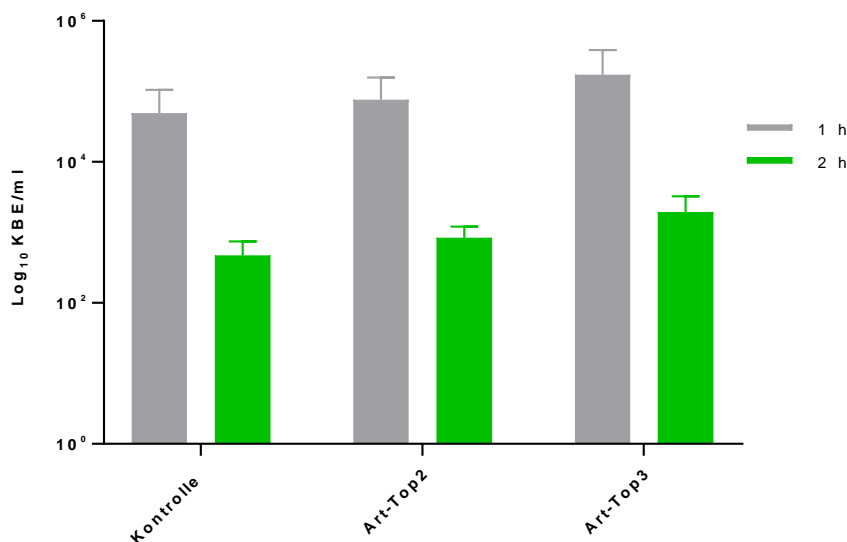
**Tabelle 6: Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Art-Top3 in *A. baumannii* zugesetzter Wundflüssigkeit.**

Gespickte Wundflüssigkeit	Antibakterielle Wirksamkeit [ $\log_{10}$ -Reduktion]	
	Art-Top3	Art-Top3+Protease-Inhibitor
Probe 1	0,3	$\geq 5$
Probe 2	0,5	$\geq 5$

## AP 6: Untersuchung der *in vivo* Wirksamkeit des neu entwickelten Produkts am Säuger-Tiermodell und Optimierung

### 6.1 Etablierung Rückenhautwundmodelle

Die Untersuchung der Wirksamkeit der Artilylin® *in vivo* erfolgte am Rückenhautwundmodell der Ratte. Hierbei wurden den Tieren nach der Narkose vier Rückenhautwunden gesetzt, die mit *A. baumannii* für eine halbe Stunde infiziert wurden. Nach ein- und zweistündiger Behandlung mit 250 µg/ml Artilylin® wurden die Proben entnommen und die bakterielle Überlebensrate durch Auswertung der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Beide Zeitpunkte zeigten keine Bakterienreduktion in den Therapiegruppen, wodurch die Wirksamkeit der Artilylin® *in vivo* vorerst nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 12).

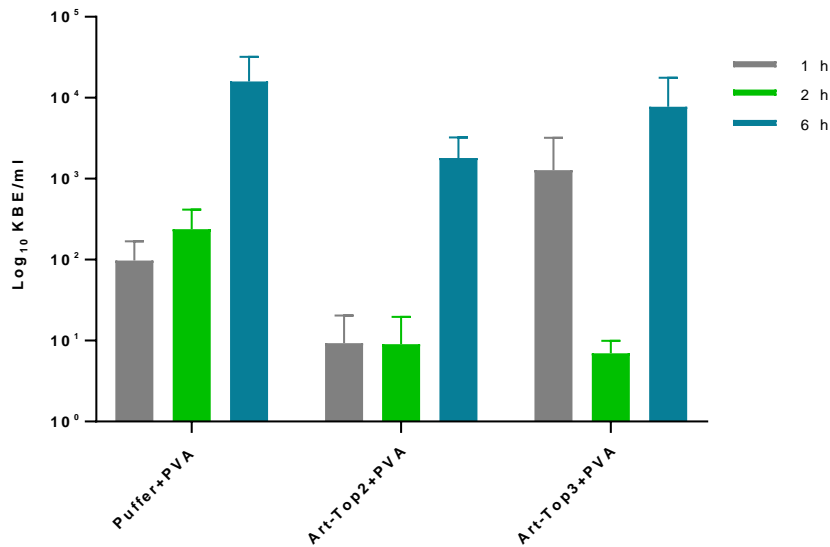


**Abbildung 12: Antibakterielle Wirksamkeit von Art-Top2 und Art-Top3 am Rückenhautwundmodell.** A) Säulendiagramm repräsentiert die bakterielle Überlebensrate nach Inkubation mit 250 µg/ml Art-Top2 und Art-Top3. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

### 6.3 Effektivität der ermittelten Formulierung der Applikationsform mit Inhaltsstoff Fibrin und Artilylin® mittels infiziertem Rückenhautwundmodell an einer SD-Ratte

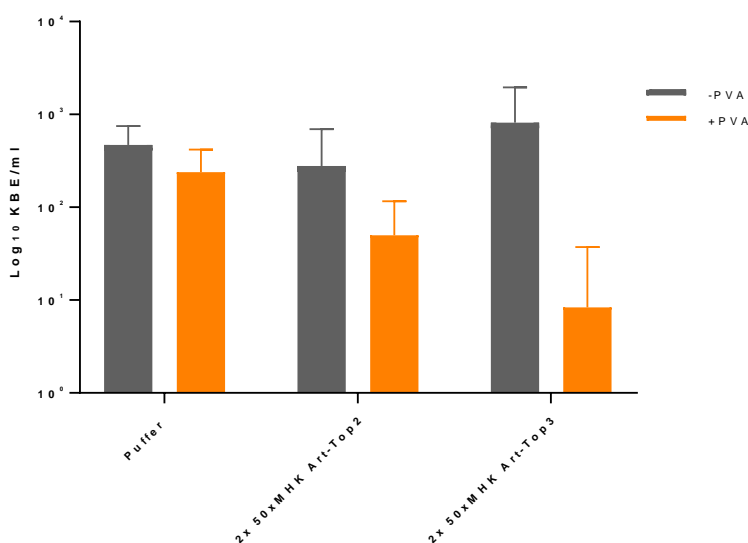
Die Untersuchung der Wirksamkeit der Artilylin® *in vivo* erfolgte auch in Kombination mit dem Trägerstoff PVA. Dazu wurden die Rückenhautwunden für eine halbe Stunde mit *A. baumannii* infiziert und topisch mit 250 µg/ml Artilylin® in Kombination mit 10% PVA behandelt. Nach einer, zwei und sechs Stunden wurden die Proben entnommen. Die Kontrollgruppe Puffer+PVA zeigte den erwarteten Anstieg der Bakterienzahl bei Verlängerung der Inkubationszeit (Abbildung 13). Die Behandlung mit Art-Top2 zeigte bei allen Zeitpunkten eine Bakterienreduktion von 1 bis 1,5-log, wohingegen nur bei zwei und sechsstündiger Behandlung mit Art-Top3 eine Bakterienreduktion (0,5 bis 1,5-log) gezeigt werden konnte.





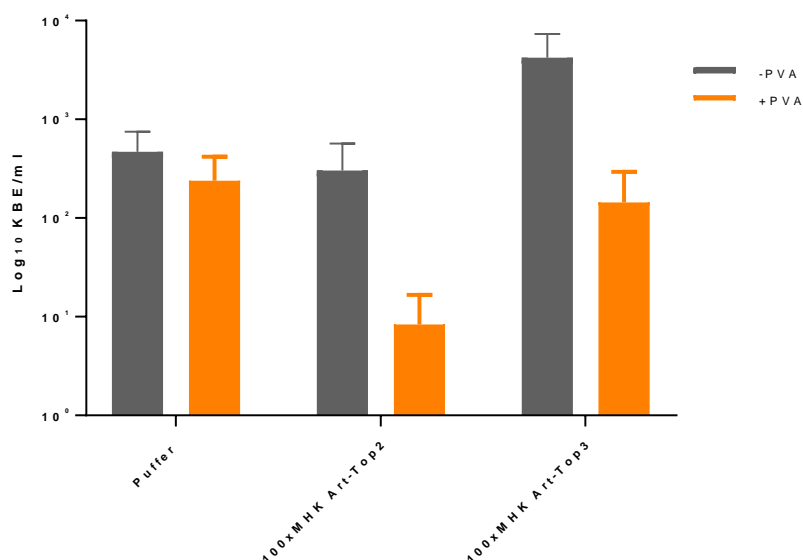
**Abbildung 13: Antibakterielle Wirksamkeit von Art-Top2 und Art-Top3 am Rückenhautwundmodell.** Bakterielle Überlebensrate nach einer, zwei und sechs Stunden Inkubation mit 250 µg/ml Art-Top2 und Art-Top3 in Kombination mit PVA. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

Um die Wirksamkeit der Artilylin®e zu erhöhen, erfolgte die zweimalige Applikation von 250 µg/ml Artilylin® mit und ohne PVA nach halbstündiger *A. baumannii* Infektion. Dabei zeigte die Applikation von 10% PVA bereits eine Bakterienreduktion von ca. 0,5-log (Abbildung 14). Die Applikation von Art-Top2 und Art-Top3 ohne PVA zeigte keine antibakterielle Wirksamkeit. Es konnte eine Bakterienreduktion von 1-log durch die Applikation der Kombination Art-Top2 und PVA gezeigt werden. Die Kombination Art-Top3 und PVA zeigte eine ca. 50-fache Bakterienreduktion.



**Abbildung 14: Antibakterielle Wirksamkeit von Art-Top2 und Art-Top3 nach zweimaliger Applikation am Rückenhautwundmodell.** Bakterielle Überlebensrate nach zweimaliger Applikation von 250 µg/ml Art-Top2 und Art-Top3 mit und ohne PVA. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

Des Weiteren wurde zur Verbesserung der Artilysin® Wirksamkeit die Konzentration auf 500 µg/ml erhöht. Die Applikation von Art-Top2 und Art-Top3 ohne PVA zeigte trotz Erhöhung der Konzentration keine antibakterielle Wirksamkeit (Abbildung 15). Auch zeigte die Kombination Art-Top3 und PVA keine Bakterienreduktion, wohingegen die Behandlung mit der Kombination Art-Top2 und PVA eine ca. 50-fache Bakterienreduktion zeigte.



**Abbildung 15: Antibakterielle Wirksamkeit von 500 µg/ml Art-Top2 und Art-Top3 am Rückenhautwundmodell.** Bakterielle Überlebensrate nach Inkubation mit 500 µg/ml Art-Top2 und Art-Top3 mit und ohne PVA. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD (n = 3) ausgedrückt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die antibakterielle Wirksamkeit der Artilysin®e *in vivo* durch die Verwendung von PVA verstärkt wurde, jedoch die erwartete Wirksamkeit vermutlich durch das Vorhandensein von Proteasen im Wundbereich (s. 5.3) vermindert wurde.

## 2. Zahlenmäßige Nachweise

**Tabelle 7: Ausgabenübersicht des Projekts**

	Personalkosten	Sachkosten	
2019	24.245,62	1.491,74	
2020	62.993,19	15.563,89	
2021	79.787,50	18.467,46	
2022	112.010,12	3.778,48	
2023	23.867,10	0	
<b>Gesamt</b>	<b>302.903,53</b>	<b>39.301,57</b>	<b>342.205,10</b>

Zu den Gesamtausgaben (Tabelle 7) kommen noch 1.687,73 € an Investitionen hinzu, die aber nicht erstattet werden können, da keine Mittel für Investitionen vorgesehen waren.

### 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeit

Die durchgeführten Arbeiten erscheinen durch Erreichen der Ziele innerhalb des Zeit- und Kostenrahmens als angemessen und ihre die Notwendigkeit lässt sich aus der eingehenden Darstellung des Projekts ableiten.

### 4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

In diesem Projekt konnte eine neuartige Formulierung zur Behandlung von multiresistenten *A. baumannii* Infektionen entwickelt werden, die eine Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* zeigt. Als neue Klasse von bakteriolytischen Phagenproteinen könnten in Zukunft Artilysin®e tatsächlich in den Markt eingeführt werden und in der Klinik zur Behandlung von Patienten mit multiresistenten *Acinetobacter*-Infektionen zum Einsatz kommen.

### 5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es sind bereits mehrere Publikationen erschienen, in denen umfassende Erkenntnisse zum rationalen Design und Erstellen von Endolysinen gezeigt wurden. Des Weiteren wurden mehrere Endolysine beschrieben, die eine gute Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* gegen Gram-negative Bakterien zeigten. Außerdem wurden erste Ansätze zu einem Wundmodell etabliert. Die hier aufgeführte Publikation von dritter Seite stellen nur einen Teil der bereits veröffentlichten Ergebnisse dar, die für das Vorhaben relevant sind.

Gerstmans H, Grimon D, Gutiérrez D, Lood C, Rodríguez A, van Noort V, Lammertyn J, Lavigne R, Briers Y. A VersaTile-driven platform for rapid hit-to-lead development of engineered lysins. *Sci Adv.* 2020 Jun 3;6(23):eaaz1136.

Blasco L, Ambroa A, Trastoy R, Bleriot I, Moscoso M, Fernández-García L, Perez-Nadales E, Fernández-Cuenca F, Torre-Cisneros J, Oteo-Iglesias J, Navarro F, Miró E, Pascual A, Bou G, Martínez-Martínez L, Tomas M. In vitro and in vivo efficacy of combinations of colistin and different endolysins against clinical strains of multi-drug resistant pathogens. *Sci Rep.* 2020 Apr 28;10(1):7163.

Chen X, Liu M, Zhang P, Leung SSY, Xia J. Membrane-Permeable Antibacterial Enzyme against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infect Dis.* 2021 Aug 13;7(8):2192-2204.

### 6. Veröffentlichungen

Es wurden bisher keine Ergebnisse veröffentlicht, jedoch werden in naher Zukunft Teile des Projektes als Publikation eingereicht. Geplant sind voraussichtlich folgende Publikationen:

1. Sara Garcia Torres, Gernot Hahne, Stephan Göttig, Volkhard A.J. Kempf  
*Bactericidal effect of novel phage-lysins targeting multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*
2. Sara Garcia Torres, Gernot Hahne, Tilman G. Schultze, Volkhard A.J. Kempf, Stephan Göttig  
*Resistance development of phage-lysins against gram-negative bacteria*

## **7. Literatur**

Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2605-9.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014 Dec 3;6(265):265sr6.