

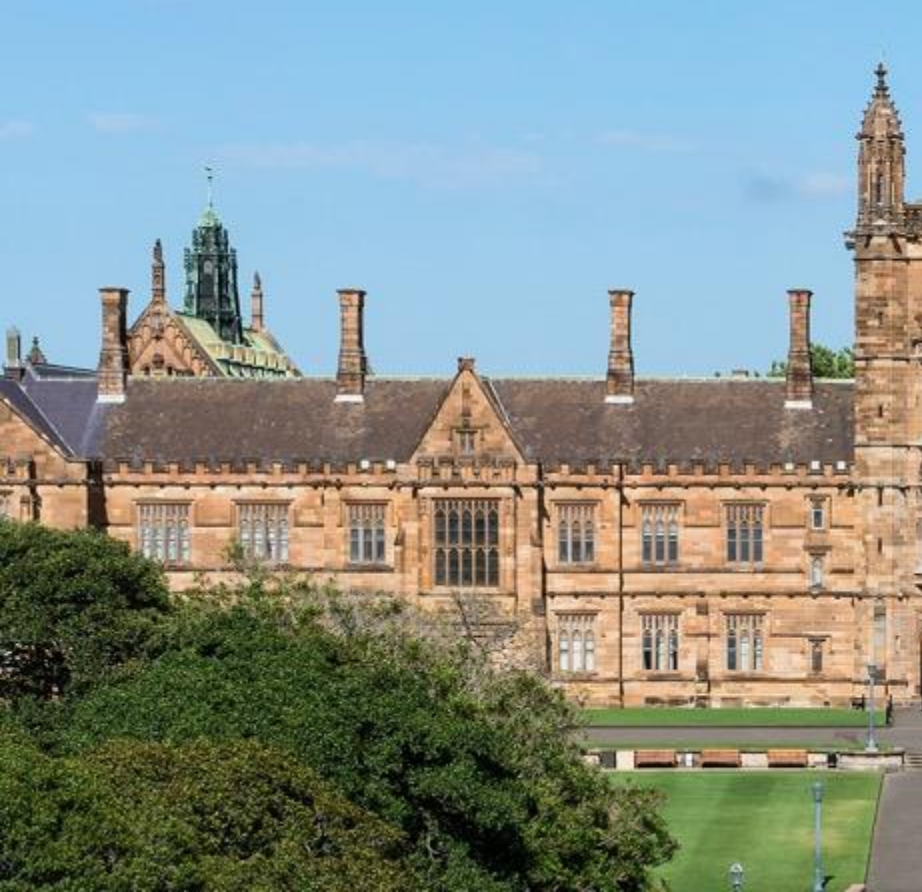
Aerosol & Phage Therapy for MDR Respiratory Pathogen

장윤경 (Rachel Yoon Chang)

파지 연구 팀 리더 | Advanced Drug Delivery Group



THE UNIVERSITY OF
SYDNEY



AMR and Respiratory Tract Infections

- 항미생물제 내성(AMR)은 인간의 건강에 큰 위협
- 항생제
- AMR
- 세균

퍼짐

워지고 있음



Staphylococcus aureus (*S. aureus*, resistant *S. aureus* (MRSA) can ca



DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS (TB)

THREAT LEVEL **SERIOUS**



that usually attack the lungs. Drug-resistant TB spread or mismanaged, and it can spread.



MULTIDRUG-RESISTANT PSEUDOMONAS AERUGINOSA

THREAT LEVEL **SERIOUS**



Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) causes many types of healthcare-associated infections, including pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, and surgical site infections.



CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER

THREAT LEVEL **URGENT**



Acinetobacter bacteria can survive a long time on surfaces. Nearly all carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections happen in patients who recently received care in a healthcare facility.

Centers for Disease Control and Prevention, 2019 Antibiotic Resistance Threats in the United States

세균성 호흡기 감염을 치료하기 위한 aerosol therapy

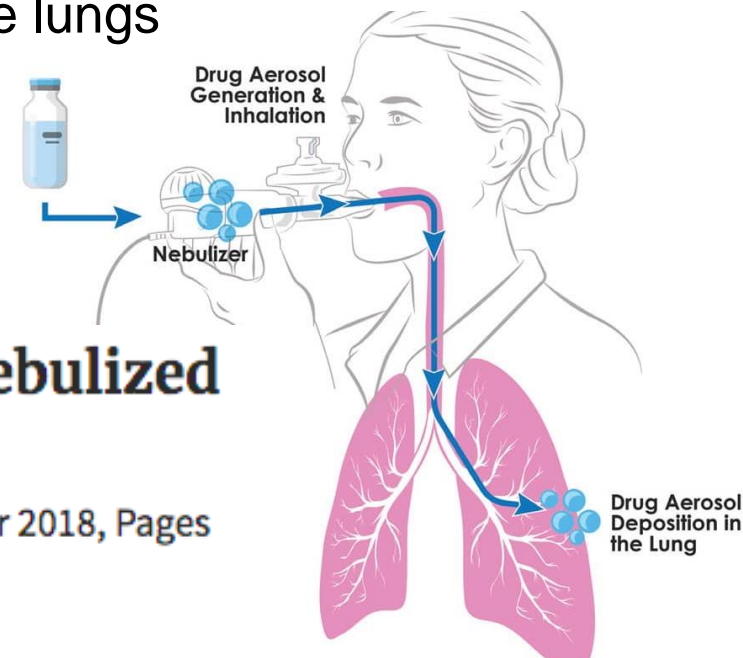
- 약을 폐로 바로 전달 할 수 있음 (targeted delivery)
- High local bioavailability (생체이용률) in the lungs
- 전신 흡수 및 독성 최소화

Example #1: Nebulised gentamicin

Pharmacokinetics of intravenous and nebulized gentamicin in critically ill patients FREE

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 73, Issue 10, October 2018, Pages 2830–2837, <https://doi.org/10.1093/jac/dky239>

- 인공호흡기 관련 폐렴이 있는 위독한 환자
- 겐타마이신(8 mg/kg)을 IV로 투여, 48시간 후 동일한 용량을 nebulise (분무)
- 분무 후 상피 폐액(ELF)의 겐타마이신 농도가 혈장보다 3800 배 높음
- 분무된 겐타마이신의 systemic bioavailability (전신 생체이용률): ~5%
- IV와 비교했을때 상피 폐액(ELF)의 겐타마이신 농도는 276 배 높고 혈장보다 18배 낮음



Inhaled therapy for respiratory infections

Example #2: Tobramycin in cystic fibrosis (낭포성 섬유증) patients with *P. aeruginosa* infection

Maselli et al., 2017 *Int J Mol Sci* 18(5):1062

IV therapy

- Poor penetration into the sputum (가래), 혈청 수준의 <12%
- *P. aeruginosa*를 죽이기 위해서는 높은 농도의 항생제 필요 (25 × MIC)
- 부작용(신독성 및 이독성)의 위험 증가, 정상적인 장내 세균총을 교란, 2차 감염(클로스트리디움 디피실리)의 위험 증가, 약물 내성을 촉진

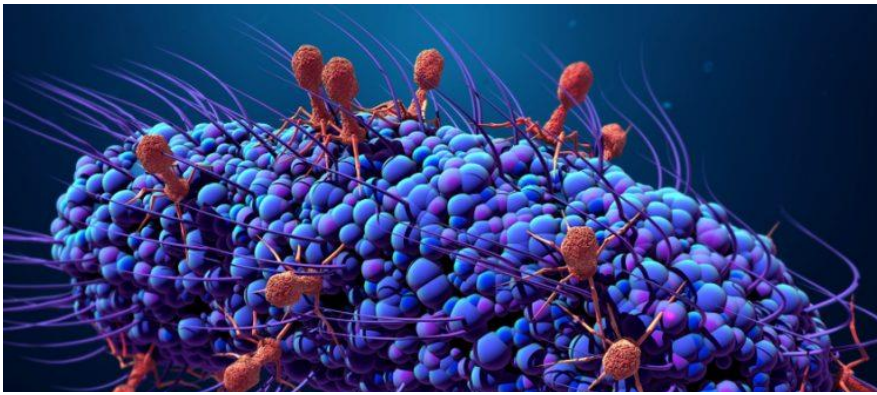
Inhaled therapy

- Tobramycin inhalation solution (Tobi, Novartis)
- Tobramycin inhalation powder (Tobi Podhaler, Novartis)
- Improved health outcomes in CF patients

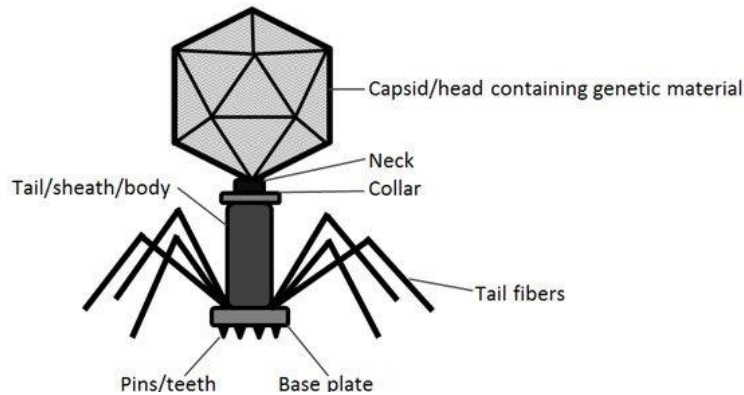
Aerosol therapy의 장점은 있지만, 다제내성 세균은 계속해서 큰 문제가 되고 있음

Bacteriophage (phage)

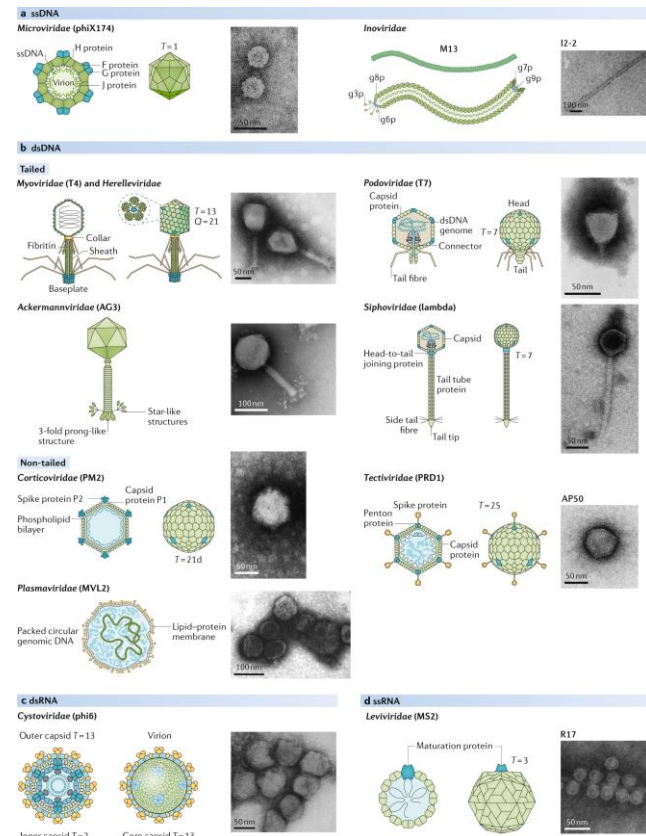
- Virus of bacteria (bacteria eaters)
- The most abundant organism (10^{31} virus particles on Earth)
- Commonly isolated from 하수 공장, 강, 토양, 연못 etc
- First discovered by Felix d'Herelle and Frederik Twort in early 1900s



www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/165703/what-to-consider-when-formulating-bacteriophages/

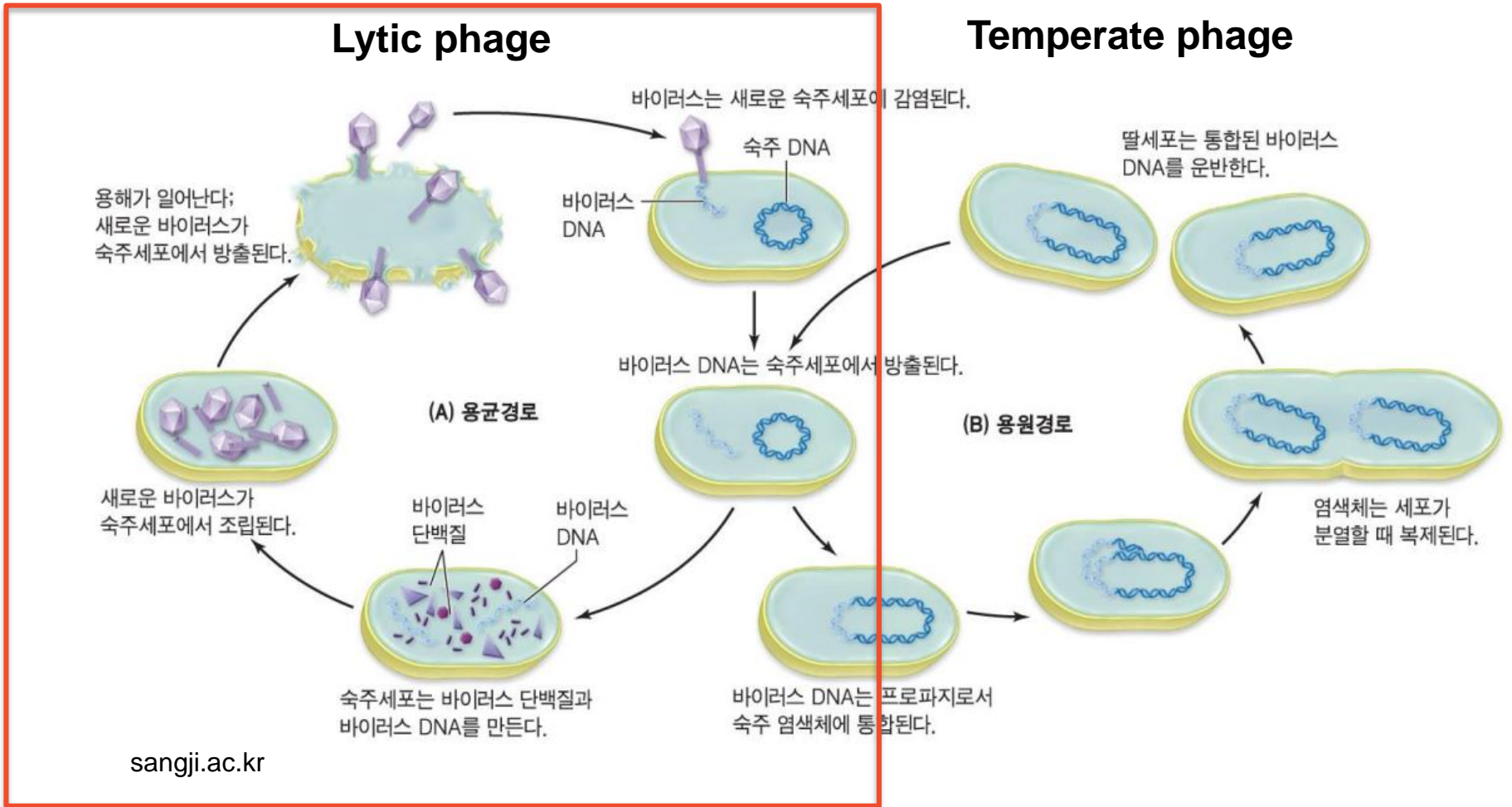


Doss et al., 2017 *Viruses* 9:50



Dion et al., 2020 *Nat Rev Microbiol* 18:125-138

Lytic and lysogenic life cycles



Risk of using temperate phages

- 세포 생리학 변경 (새로운 기능을 도입하거나 기존 기능을 변경)
- 독성 유전자 전이의 위험 (e.g., 항생제 내성)
- 유도 및 방출된 프로파지는 미생물총에 영향을 줄 수 있음

파지 치료의 장점과 단점

장점

- 약물 내성 박테리아 죽이기 (multi-drug and pan-drug resistant superbugs)
- 특정 박테리아만 선택적으로 감염
- 미생물총의 파괴 최소화
- 항생제와의 교차 내성 피함
- 자가 복제 가능 (auto-dosing agents)
- 생물막 침투 가능
- 새로운 파지를 쉽게 발견할 수 있음
- 천연 제품 타입으로 안전함

단점

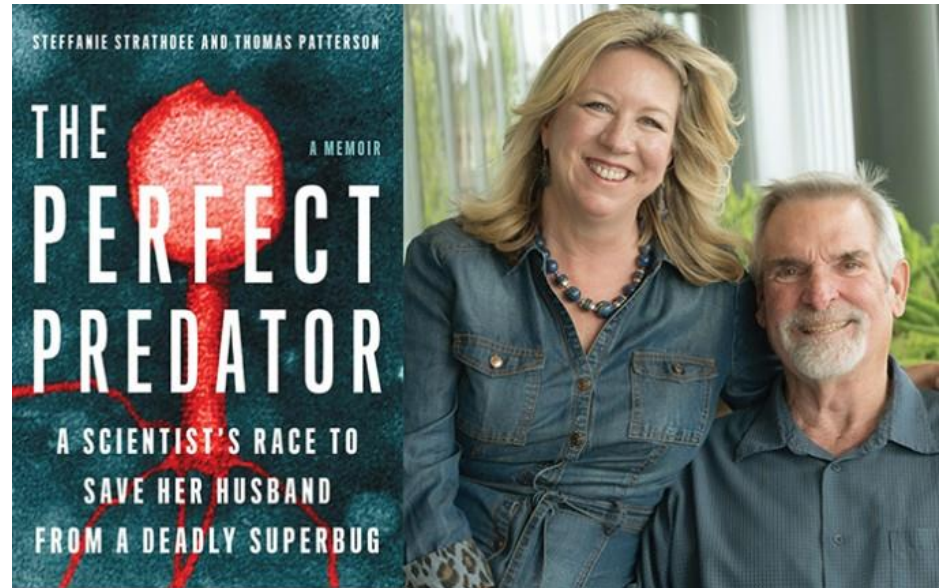
- 좁은 숙주범위 → 파지 칵테일, 유전자 조작 파지
- 파지 저항성 → 파지-항생제 콤보
- 바이러스여서 위험할 것이라는 생각
- 안전성 (항파지 항체)
- 파지 치료를 위한 적절한 규제 프레임워크의 부재



Eliava phage therapy centre in Georgia

Famous Tom Patterson case (UCSD)

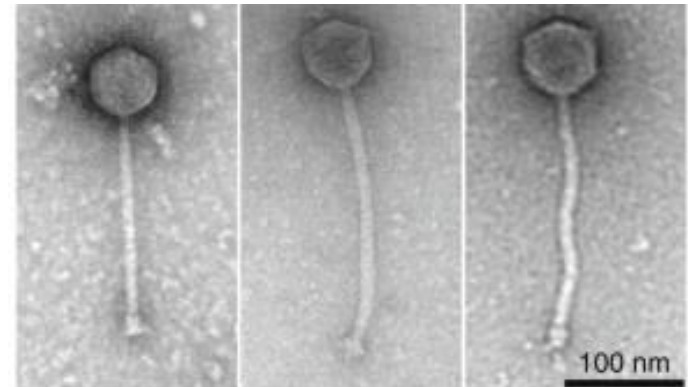
- 69세 UCSD 교수, 취약 가낭성 (MDR *A. baumannii*) (December 3 2015)
- 메로페넴, 티게사이클린, 콜리스틴으로 치료했지만 박테리아가 모든 항생제에 내성을 갖게 됨
- 수술중 박테리아가 신체의 다른 부분으로 퍼진 후 패혈성 쇼크를 유발한 후 혼수 상태
- IV 파지 테라피 using phage cocktail (March 15 2016)
- 파지 저항성을 극복하기 위해 multiple re-formulation of phage cocktail
- 회복 및 퇴원(August 12 2016)



Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*

abscessus [Nature Medicine](#) 25, 730–733 (2019) | !

- 15세 낭포성 섬유증 환자
- 췌장 기능 부전, 인슐린 의존성 당뇨병, 낭포성 섬유증 관련 간 질환, 낭포성 섬유증 관련 골다공증
- *P. aeruginosa* 및 *M. abscessus*에 만성 감염 (8년간 항생제 치료)
- 폐 이식후 면역억제제와 여러 IV 항생제 투여, 하지만 심한 부작용 (메스꺼움, 식욕 부진, 설사 및 electrolyte derangement) 때문에 중단
- 1주일 후 온 몸에 *M. abscessus* 퍼짐
- Three-phage cocktail 2 natural phages + 1 genetically engineered phage (screened >10,000 phages in the library)
- IV 10^9 PFU every 12h for 32 weeks
- 폐 및 간 기능 개선
- 항파지 항체 발견되지 않음



Muddy

BPs

ZoeJ

Inhaled phage therapy (Clinical case)

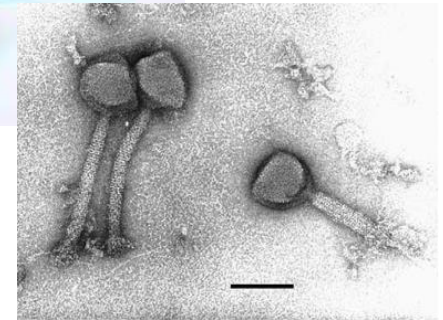
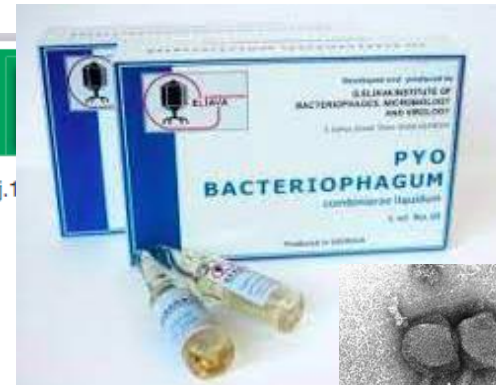
microbial
biotechnology

Microbial Biotechnology (2011) 4(5), 643–650

doi:10.1111/j.1

Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens

- 7세 낭포성 섬유증 환자
- *P. aeruginosa* (8×10^6 CFU/mL in sputum) and *S. aureus* (1×10^7 CFU/mL) 감염
- Broad spectrum 항생제 치료 실패
- Pyophage treatment by nebuliser (9 times, 4-6 week interval)
- *P. aeruginosa* 농도 감소 ($< 10^4$ CFU/mL), 하지만 *S. aureus* 농도는 높음 (10^6 CFU/mL)
- Pyophage에 phage Sb-1를 첨가하고 nebuliser로 투여 (5 times)
- 10^3 – 10^5 CFU/mL for *S. aureus* and 10–100 CFU/mL for *P. aeruginosa*



세계 최초 파지 테라피 임상실험 (PhagoBurn)

THE LANCET
Infectious Diseases

Inhaled phage therapy를 위한 formulation and delivery
연구 중심으로 하고 있음

THE STUDY FAILED

Possible reasons

- Multi-species infection
- Phages formulation 의 불안전성 (actual dose given: 10^2 PFU/mL)
- 딜리버리의 문제 (파지가 드레싱에 달라붙음)

Formulation & Delivery for Inhaled Phage Therapy

Liquid vs powder formulations

Liquid	Powder
Formulation	
<ul style="list-style-type: none"> • Relatively easy to formulate • 냉장보관 필수 (cold chain, \$\$) 	<ul style="list-style-type: none"> • Formulation development • 운송과 보관이 쉬움 (실온보관 가능)
Delivery	
<ul style="list-style-type: none"> • Bulky • 전기 필요함 • Can be expensive • Transmission of aerosol-borne infectious agents 	<ul style="list-style-type: none"> • Small, portable, hand-held device • No need for electricity for operation • Cheap



ney



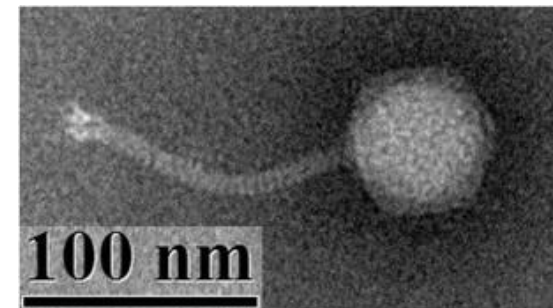
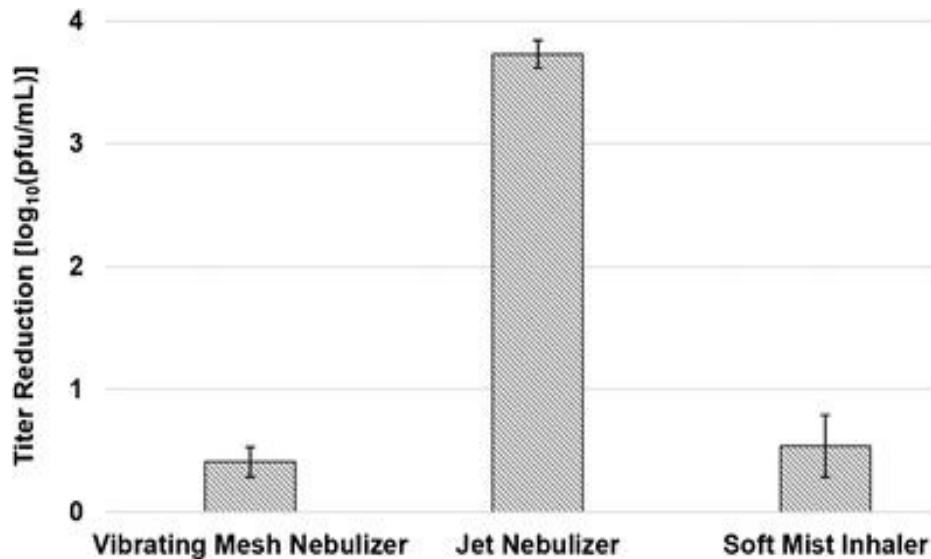
Inhaled Phage Therapy (흡입 파지 요법)

Anti-Tuberculosis Bacteriophage D29 Delivery with a Vibrating Mesh Nebulizer, Jet Nebulizer, and Soft Mist Inhaler

[Nicholas B. Carrigy](#), [Rachel Y. Chang](#), [Sharon S. Y. Leung](#), [Melissa Harrison](#), [Zaritza Petrova](#), [Welkin H. Pope](#), [Graham F. Hatfull](#), [Warwick J. Britton](#), [Hak-Kim Chan](#), [Dominic Sauvageau](#), [Warren H. Finlay](#) & [Reinhard Vehring](#) ✉

Pharmaceutical Research **34**, 2084–2096 (2017) | [Cite this article](#)

- Aerogen solo vibrating mesh nebuliser
- Pari LC Sprint air-jet nebuliser
- Respimat soft mist inhaler



Inhalable phage powders

- 세균: *Pseudomonas aeruginosa*
- 파지: PEV1, PEV20 and PEV61 (90 AU clinical MDR *P. aeruginosa* isolates 중에 >70%를 죽일 수 있음)



Characterisations

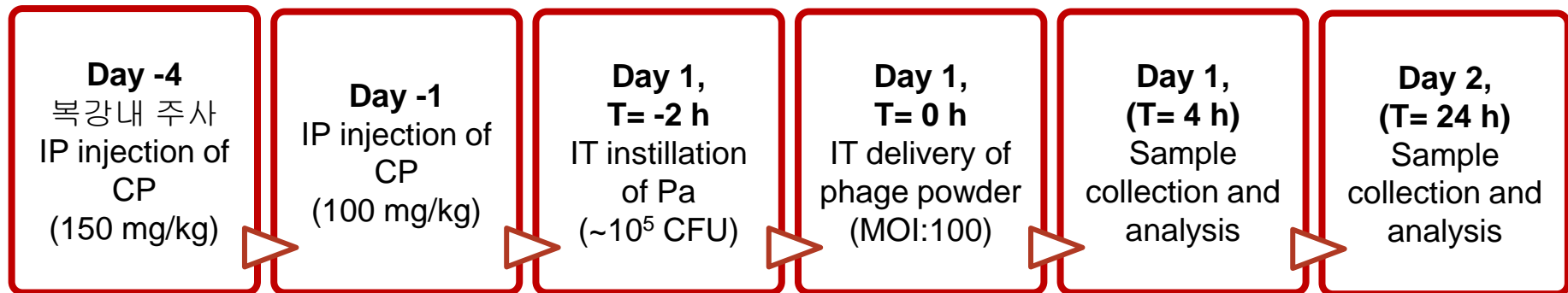
1. *In vitro* biological activity
2. Physicochemical properties: 에어로졸 성능(FPF;), 크기(입자 크기 분포), 입자의 형태, 결정도, 열역학적 특성, 수분 흡착 분석, *in vitro* phage release
3. 보관 Stability over time

Spray dryer

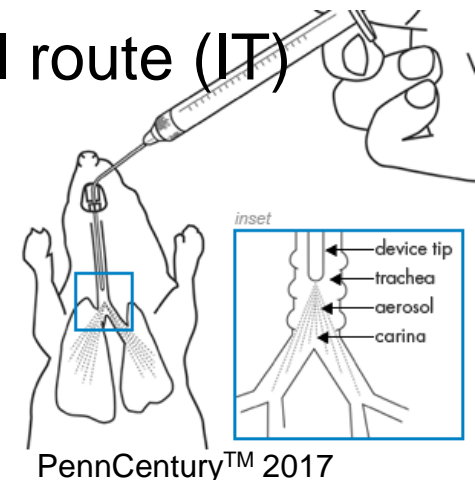
- Biological (생물학적) & Physicochemical (물리화학적) stabilities: 적합한 부형제의 사용, biologics-friendly spray drying conditions
- Inhalable 하고 stable 한 파지 파우더를 만듦. 실온상태에서 4년+ 안전함

In vivo efficacy (생체 내 효능)

- 세균: 낭포성 섬유증 환자의 폐에서 발견된 다제내성 *P. aeruginosa* strain
- 쥐 모델: Lung infection model in neutropenic mice
- 파지 파우더: PEV20 with lactose and leucine

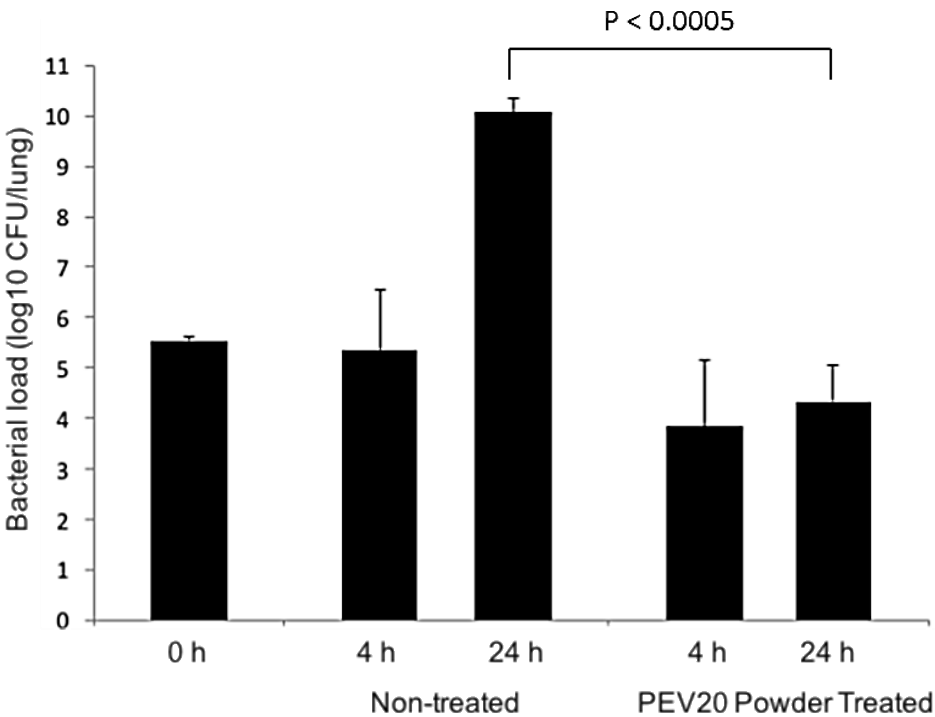


Intratracheal route (IT)
기관내 경로



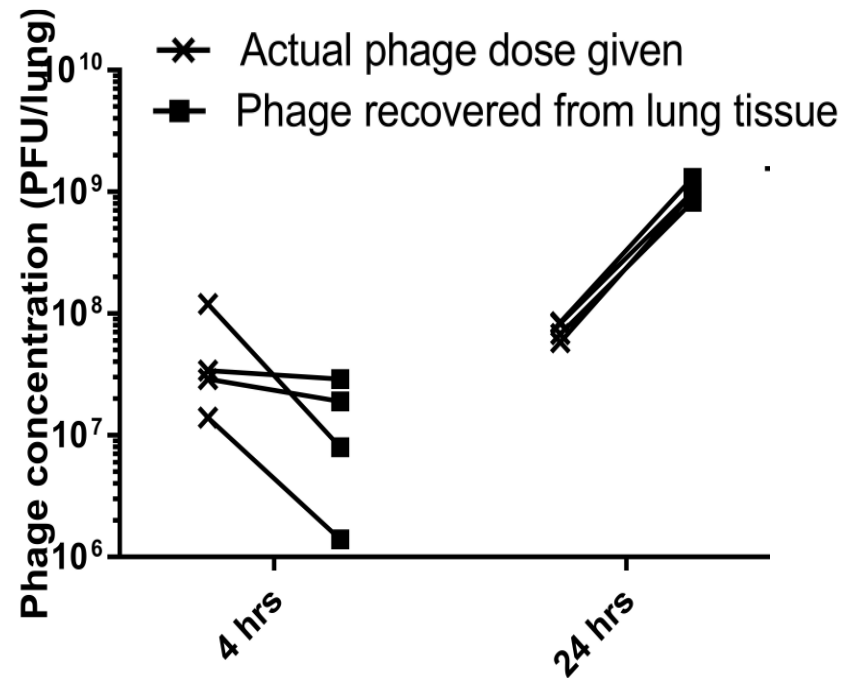
In vivo efficacy

폐에 있는 세균의 농도



파지 파우더를 받은 그룹은 폐에 있는 세균 농도가 5.3-
log₁₀ 만큼 낮음

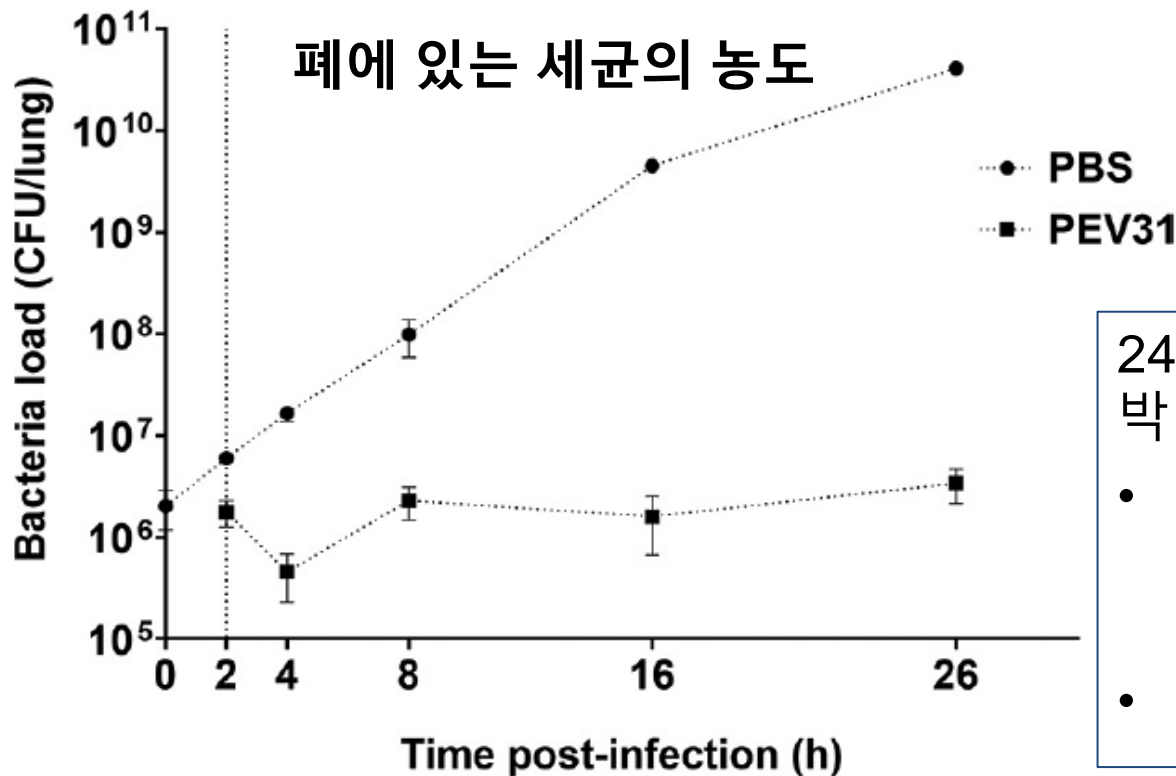
폐에 있는 파지의 농도



파지의 농도가 24시간 후
>1-log₁₀ 올라감

In vivo time-kill of inhaled phage therapy

- Female BALB/c mice
- Intra-tracheal (기관내 경로) administration of *P. aeruginosa* (2×10^6 CFU)
- Intra-tracheal delivery of PEV31 (10^9 PFU) or PBS at 2h post-infection
- Lung collection, viricide treatment and then colony counting



24시간 후에 파지 내성
박테리아가 관찰됨

- Amikacin, ciprofloxacin, and tobramycin 내성이 사라짐
- Colistin 내성이 생김

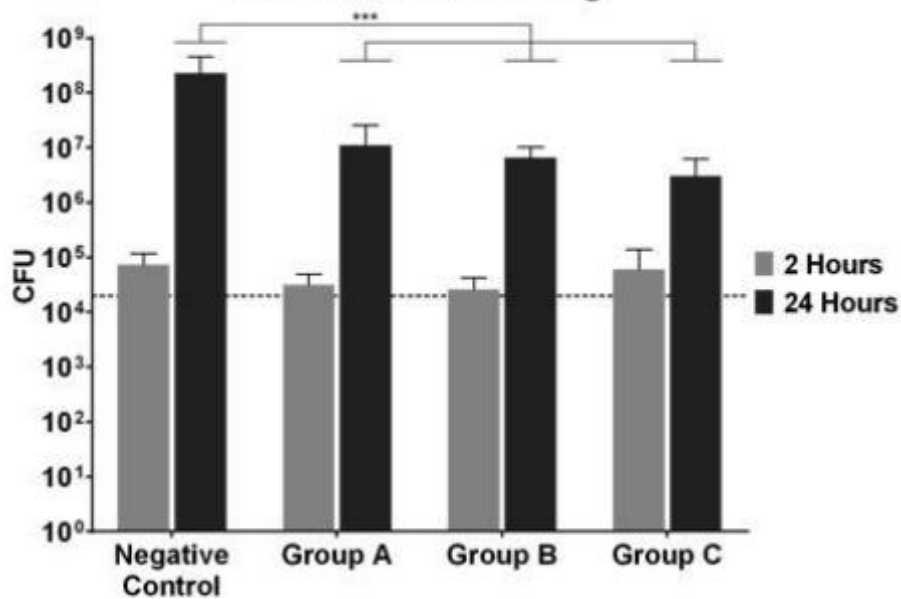
The effects of different doses

- 항생제에 비해 아직 파지 테라피에 대해 모르는것은 많음
- 그중에 하나는 dose response effect임

- Intra-tracheal administration of *P. aeruginosa* (2×10^4 CFU)
- Intra-tracheal PEV31 or PBS treatment at 2h post-infection
 - Group A: 7×10^4 PFU
 - Group B: 5×10^6 PFU
 - Group C: 5×10^8 PFU
- 파지 전달 직후 및 22시간 후 샘플 수집
- 파지와 세균 분리 후 농도 확인

폐에 있는 세균의 농도

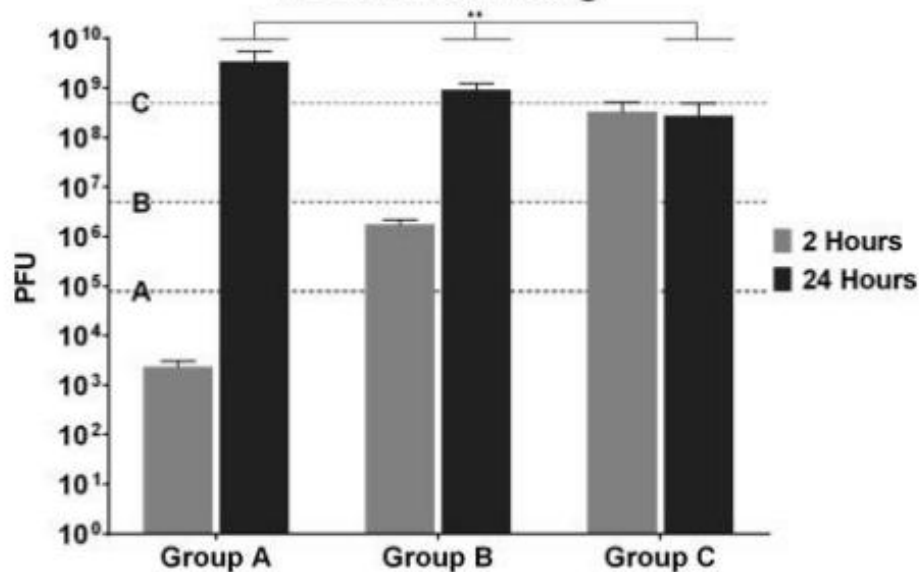
Bacterial load in lung



- Control group에 비해 폐에 있는 세균의 농도가 낮았음
- 투여받은 도스에 상관 없이 24시간 후에는 폐에 있는 세균의 농도가 비슷함
- No dose-response!

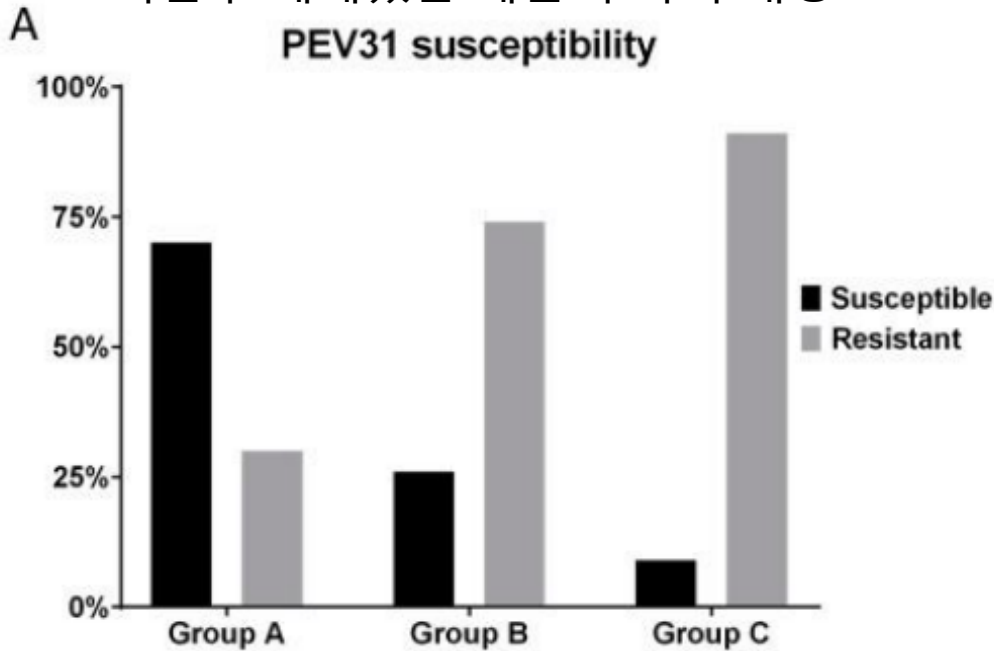
폐에 있는 파지의 농도

PEV31 titre in lung



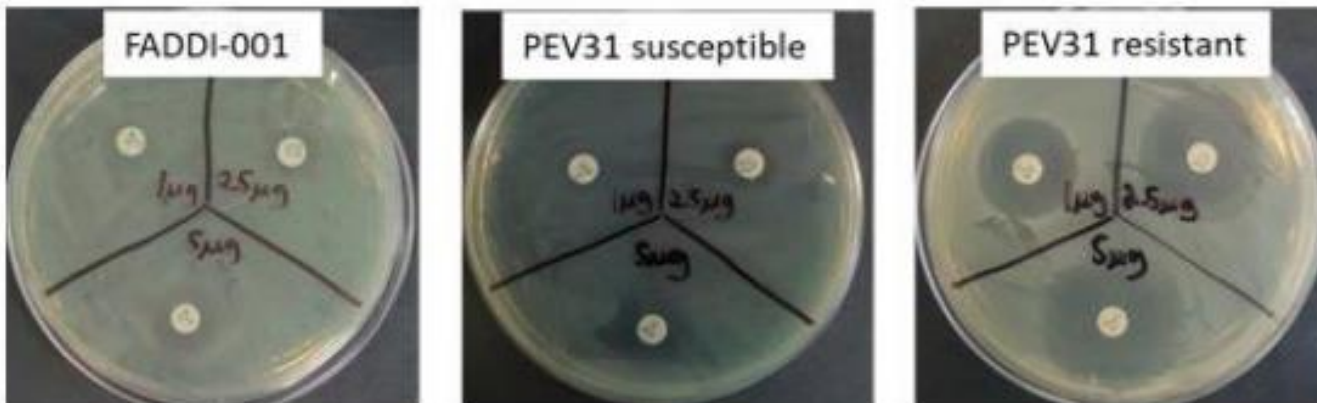
- 투여받은 파지의 도스가 낮을 수록 24시간 동안 phage replication이 높아짐
- Dose response

24시간후 폐에있는 세균의 파지 내성

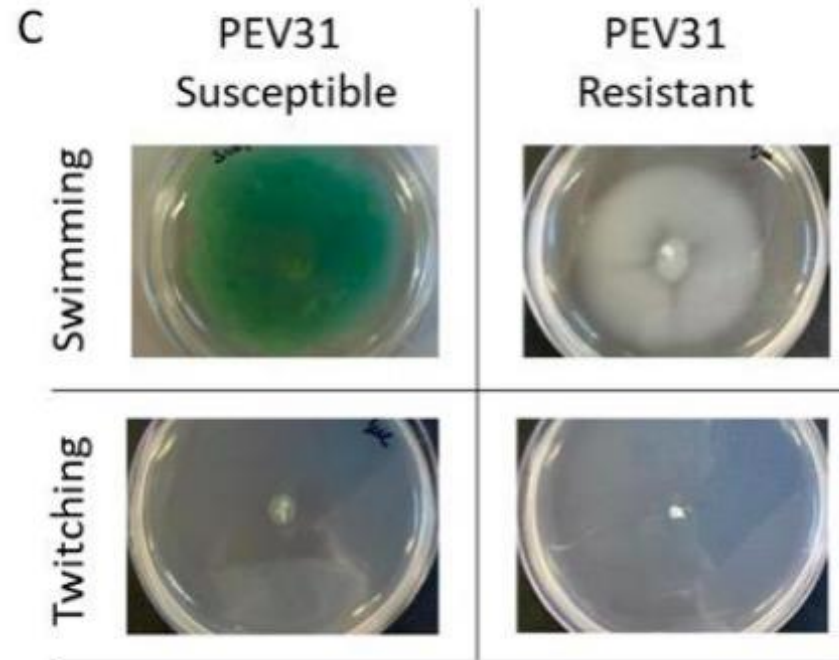


도스가 높을수록 파지내성이 높아짐
Dose-response

B

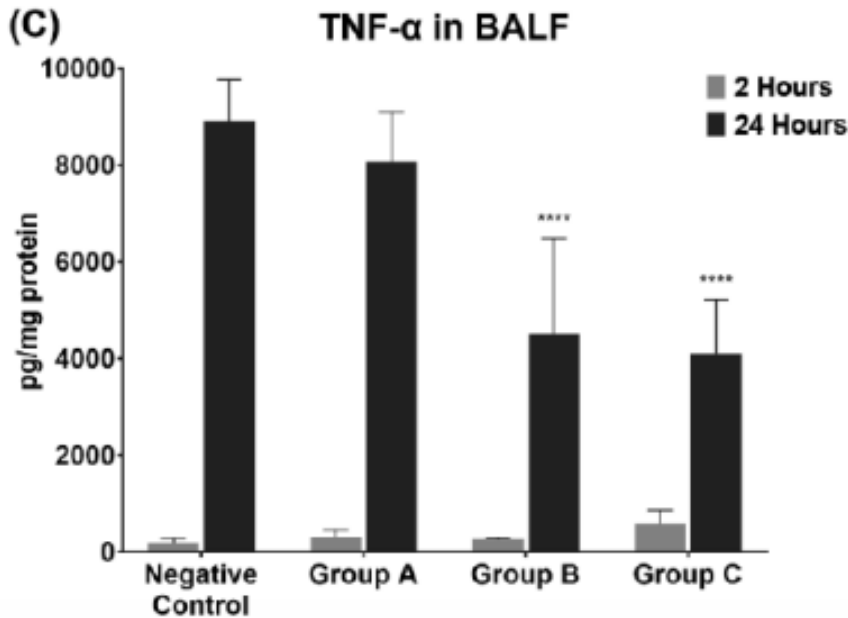
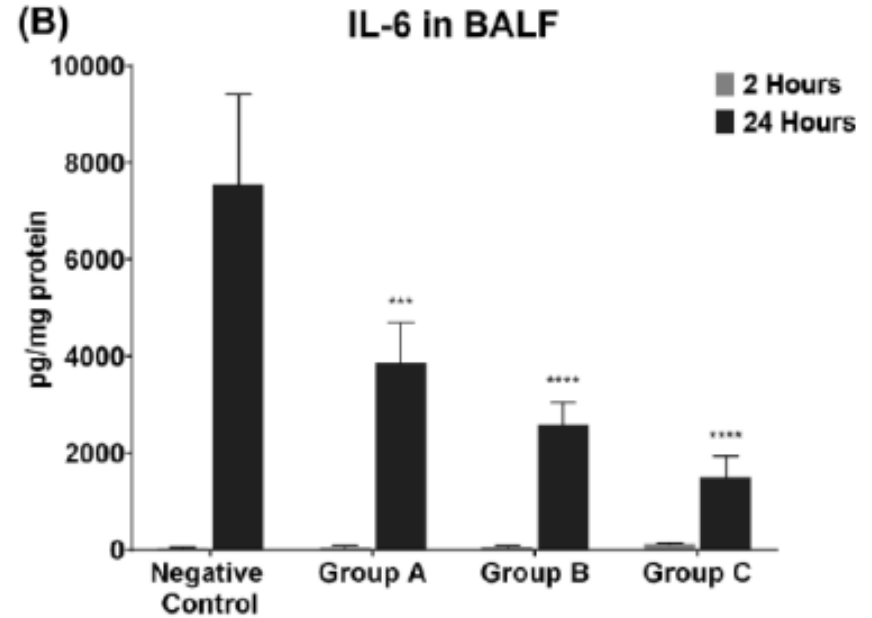
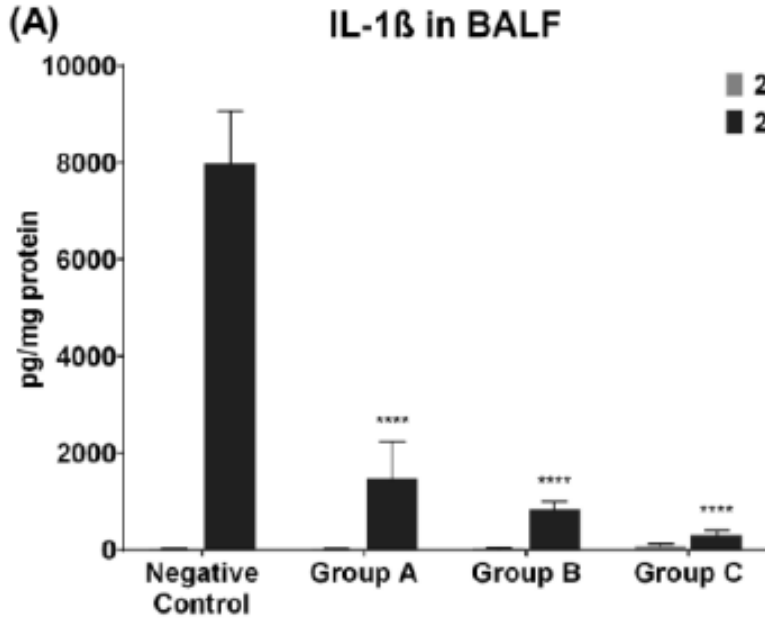


The L Ciprofloxacin antibiotic disc; 파지내성 세균은 항생제에 내성을 잃음



파지내성 세균은 virulence factor인 pyocynin expression이 낮아짐

상피 폐액에 있는 염증성 cytokine 수치



- 박테리아의 농도는 도스에 상관없이 비슷했지만, inflammatory cytokine은 투여된 도스가 높을 수록 수치가 낮았음
- Dose response
- High dose의 benefit

Overcoming phage resistance

1. **Phage cocktail** (a mixture of two or more phages)

Broaden host range

파지 내성 돌연변이의 출현 감소 (박테리아의 다른 receptor를 표적으로 하는 파지를 사용)

파지 내성이 발견시 새로운 파지로 cocktail 만듦 (personalised therapy)

2. **Innate immune system** (immunophage synergy)

면역 체계와 파지의 시너지 효과 (파지 내성 박테리아 제거)

3. **Phage antibiotic combination** (phage antibody synergy)

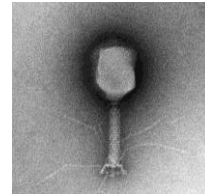
항균 효과 강화

파지 및 항생제 내성 돌연변이의 출현 감소

Imposition of two (or more) selective pressures on bacteria

Phage-ciprofloxacin combination

- 항균 효과 강화
- 파지 및 항생제 내성 돌연변이의 출현 감소



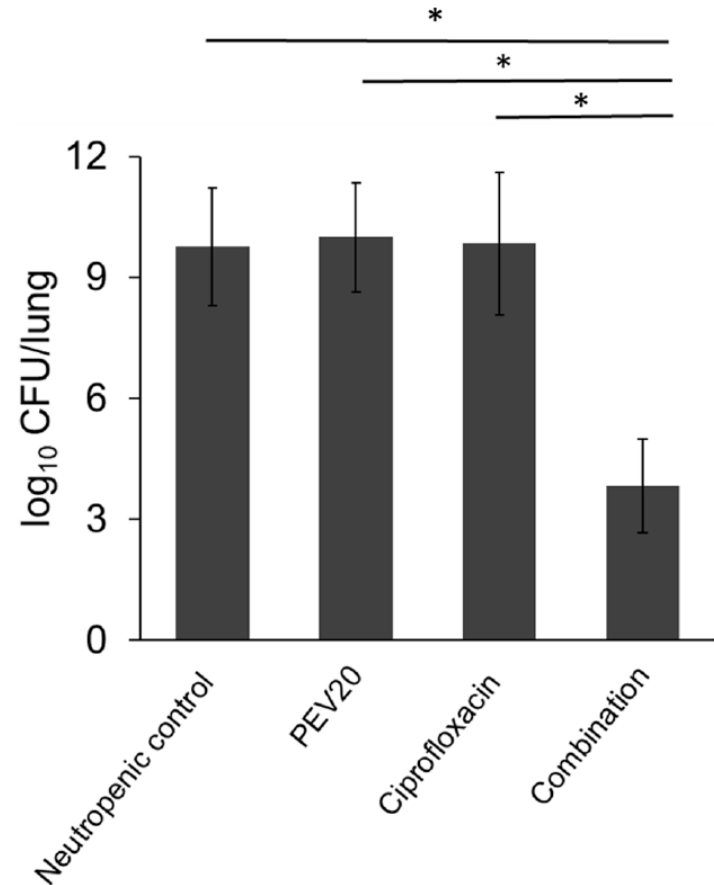
Neutropenic mouse model intra-tracheally infected with *P. aeruginosa* (10^6 CFU)

Treatment

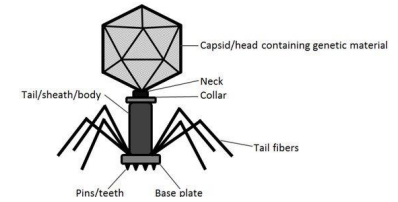
- Ciprofloxacin only (0.33 mg)
- PEV20 powder (10^6 PFU)
- Combination of the two
- No treatment

Lungs harvested at 24 h for bacterial colony counting

폐에 있는 세균의 농도



극복해야 할 Challenge들



Doss et al., 2017
Viruses 9:50

Putting together a team of experts

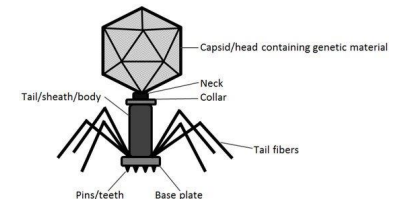
Multidisciplinary team 다학제 팀이 구성되어야 함: infectious disease specialist, microbiologists, phage biologists, phage formulation scientists, and pharmacologists

1. 환자에게서 세균을 재취 후 가지고 있는 파지 콜렉션을 스크린 (필요시 환경에서 새로운 파지를 찾아냄)
2. 환자에게 파지 테라피라는 옵션 대하여 설명
3. 파지 또는 파지 칵테일을 Good Manufacturing Guideline를 따라 준비
4. 사용할 파지를 환자가 받고있는 항생제와의 반응을 조사 (synergy is good, but antagonism is bad)
5. 전문의를 통해 치료를 시작

⇒ 팀에 따라서 다른 치료요법을 받을수 있음

⇒ standard guideline이 도움이 될것으로 예상됨 (파지 선택, 생산 및 정제, 보조 항생제 요법, 항생제를 포함하거나 포함하지 않는 파지의 제형 및 전달, 투여 요법 및 치료 방법)

Challenges (compassionate use)



Doss et al., 2017
Viruses 9:50

Regulatory hurdles

- 파지 테라피는 personalised medicine으로 많이 쓰임
- 파지 제품의 규제 분류를 바꿔야 한다고 많은 연구자와 의사가 표명중
- Belgium (벨기에)의 새로운 regulatory frame work: 내부 모노그래프에 따라 준비한 파지를 magistral 제제의 활성 제약 성분으로 허용
- Naturally occurring phages (유전자 변형이 없는 파지) 는 미국 식품의약국(FDA)에서 의약품으로 (drugs) 분류됨 (GMP 가이드라인과 인프라 필요)
- 전 세계에 GMP 등급 파지 제조를 위한 사이트가 몇 개 있지만 이러한 기준으로 clinical trial을 수행하기가 어렵고 비용이 많이 듦
- 이러한 막대한 재정적 투자는 긴급한 임상적 요구를 충족시키기에 불가능할 뿐만 아니라 파지 치료의 personalised therapy를 고려할 때 비현실적임.
- 하지만, clinical trial은 임상에서 파지 요법의 표준화에 필수적임

Acknowledgement

Professor Kim Chan, head of Advanced Drug Delivery Group, Sydney Pharmacy School, University of Sydney

Dr Yu Lin, Advanced Drug Delivery Group, Sydney Pharmacy School, University of Sydney

Professor Warwick Britton, Tuberculosis Research Program, Centenary Institute

Professor Jian Li, Monash University

Dr Sandra Morales, Phage Consulting

Professor Elizabeth Kutter, Evergreen State University



Australian Government

National Health and Medical Research Council



Australian Government

Australian Research Council



National Institute of
Allergy and
Infectious Diseases

Questions?

Connect with me

장윤경 Rachel Yoon Chang

yoon.chang@sydney.edu.au



@RachelYKChang



Rachel Yoon Chang



THE UNIVERSITY OF
SYDNEY



THE UNIVERSITY OF
SYDNEY