

Ergebnisbericht (gemäß Nr. 14.1 ANBest-IF)

Konsortialführung:	Bundeswehrkrankenhaus Berlin
Förderkennzeichen:	01VSF18049
Akronym:	PTmHBP
Projekttitel:	Praktikabilitätstestung der magistralen Herstellung von Bakteriophagen zur Therapie septischer Infektionen (PhagoFlow)
Autorinnen und Autoren:	Häfner M., Korf I., Halama K., Garbe D., Leddin M., Wenzel W., Rohde C., Wienecke S., Hebecker S., Ziehr H., Willy C.
Förderzeitraum:	1. April 2019 - 31. März 2024
Ansprechperson:	Prof. Dr. med. Christian Willy: ChristianWilly@bundeswehr.org Melanie Häfner M.Sc.: MelanieHaefner@bundeswehr.org

Das dieser Veröffentlichung zugrundeliegende Projekt PTmHBP wurde mit Mitteln des Innovationsausschusses beim Gemeinsamen Bundesausschuss unter dem Förderkennzeichen 01VSF18049 gefördert.

Zusammenfassung

Hintergrund: Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien als ihren Wirt nutzen und diese lysieren können. In Deutschland gibt es kein zugelassenes Bakteriophagen-Arzneimittel. Die Anwendung von Bakteriophagen ist im Rahmen der erlaubnisfreien oder der magistralen Herstellung möglich. Bei dem Forschungsprojekt PhagoFlow handelt es sich um eine Praktikabilitätstestung der bereits zur Verfügung stehenden infrastrukturellen Bedingungen in Deutschland unter Berücksichtigung der gesetzlichen Vorgaben. Im Fokus steht die Überprüfung der Entwicklungsmöglichkeiten eines Ablaufplanes der magistralen Herstellung von Monophagen-Wirkstoffen für patientenindividuelle Zubereitungen sowie die Überprüfung der zeitgerechten klinische Anwendung im Rahmen individueller Heilversuche.

Methodik: Die Isolierung und Identifizierung wirksamer Bakteriophagen gegen priorisierte Erreger erfolgt durch das Leibniz-Institut DSMZ mittels umfangreicher Bakterien-Panels. Die Herstellung von Monophagen-Wirkkomponenten erfolgt durch das Fraunhofer ITEM. Nach Identifizierung des Patientenerregers erfolgt eine Suszeptibilitätstestung (Phagogramm) durch die Mikrobiologie. Die Krankenhausapotheke stellt aus den Monophagen-Wirkkomponenten eine patientenindividuelle (magistrale) Zubereitung her, welche durch die behandelnden Kliniken des Bundeswehrkrankenhauses im Rahmen einer Fallserie angewendet werden. Für die Überprüfung der zeitgerechten klinischen Anwendung werden die Zeitpunkte der Arbeitsschritte erhoben und mittels deskriptiver Statistik ausgewertet.

Ergebnisse: Zwölf Phagen gegen drei bakterielle Spezies (*P. aeruginosa*, *S. aureus* und *E. coli*) wurden anhand des Wirtsbereiches, der Genomauswertung und der lytischen Effizienz zur Produktion ausgewählt. Drei Phagen-Wirkkomponenten gegen *P. aeruginosa* konnten in Übereinstimmung mit GMP-Vorgaben hergestellt und freigegeben werden. Es wurden an Patientenisolaten von 33 Patienten Phagogramme durchgeführt, wobei in 21 Fällen mindestens ein Phage *in vitro* Wirksamkeit zeigte. Eine klinische Behandlung erfolgte in zehn Fällen. Die Zeit zwischen Isolation des Patientenerregers und Behandlungsbeginn betrug in keinem Fall weniger als zwei Wochen.

Diskussion: Die Forderung der GMP-konformen Herstellung führte zur Beschränkung auf den Zielerreger *P. aeruginosa*. Die geschaffenen infrastrukturellen Voraussetzungen sind nicht nachhaltig und an die Projektfinanzierung gebunden. Es ist davon auszugehen, dass bei Verfügbarkeit einer hinreichenden Anzahl von Phagenwirkstoffen und der Integration der Phagogramme in die mikrobiologische Routine ein Therapiebeginn wenige Tage nach Erregerisolierung möglich sein wird. Für die Regelversorgung der Solidargemeinschaft ist die zentrale Koordination der Isolierung und Charakterisierung von weiteren Phagen-Kandidaten, der deutliche Ausbau von Herstellkapazitäten sowie die Spezialisierung einzelner Krankenhäuser auf die Bakteriophagentherapie durch Ausbau von personellen und räumlichen Ressourcen erforderlich.

Schlagnworte: Bakteriophagen, Phagen, Phagentherapie, Praktikabilitätstestung, magistrale Herstellung, GMP-konforme Herstellung, Phagogramm, *Pseudomonas aeruginosa*, Fallserie

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	4
II	Abbildungsverzeichnis	5
III	Tabellenverzeichnis	5
1	Projektziele	6
2	Projektdurchführung	11
2.1	Projektbeteiligte	11
2.2	Beschreibung/ Darstellung des Projekts.....	12
2.3	Beschreibung Ablauf des Projekts	16
2.4	Erfahrungen mit der Implementierung/ Maßnahmen	21
2.5	Rechtsgrundlage	27
3	Methodik	28
4	Projektergebnisse.....	38
5	Diskussion der Projektergebnisse	46
6	Verwendung der Ergebnisse nach Ende der Förderung.....	49
7	Erfolgte bzw. geplante Veröffentlichungen	53
IV	Literaturverzeichnis	54
V	Anlagen.....	57

I Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz
ApBetrO	Apothekenbetriebsordnung
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DRG	Diagnosis Related Group
DSMZ	Leibniz Institute DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DSP	Downstream Processing
EPC	European Pharmacopoeia Commission
ESKAPE	Pseudonym für <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> -Spezies
EU	Europäische Union
GAA	Gewerbeaufsichtsamt
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GMP	Good Manufacturing Practice
InEK	Institut für das Entgeltsystem im Krankenhaus GmbH
IPTC	Israeli Phage Therapy Center der Hebrew University des Hadassah Medical Centers
ITEM	Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
LCB	Laboratory Cell Bank (Laborzellbank)
LVAD	Left Ventricular Assist Device
MCB	Master Cell Bank (Masterzellbank)
MOI	Multiplicity of Infection (Infektionsdosis)
MPS	Master Phage Stock (Masterphagenstock)
MRGN	Multiresistente Gram-Negative Erreger
NUB	Neue Untersuchungs- und Behandlungsmethoden
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Plaque Forming Unit
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia
Phagen-WK	Phagen-Wirkkomponente/n
PL	Phagenlysate
RCT	Randomized Controlled Trial
RNA	Ribonucleic Acid
SPRIND	Bundesagentur für Sprunginnovationen
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
USA	United States of America
USP	Upstream Processing

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick und Abhängigkeiten der Aufgaben beteiligter Partner im Projekt PhagoFlow	16
Abbildung 2: Fließschema zur Herstellung der MCB (links) und MPS (rechts).....	30
Abbildung 3: Fließschema zur Herstellung von Phagenlysats (PL) (links), Phagen-WK (Mitte) sowie die Etikettierung und Lagerung der Phagen-WK bis zur Auslieferung (rechts)	30
Abbildung 4: Patientenflussdiagramm.....	44

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Projektbeteiligte Institute und Mitarbeitende.....	11
Tabelle 2: Überblick zum zeitlichen Ablauf von Bereitstellung von Phagen und Wirten durch die DSMZ bis zur Abgabe von Phagen-WK (WK) durch ITEM.....	20
Tabelle 3: Überblick der zu erhebenden Daten im Projekt PhagoFlow.....	33
Tabelle 4: Übersicht von Stämme-Panels zur Isolation und Charakterisierung von Phagen...	39
Tabelle 5: Zusammenfassung der Wirtsbereiche von Einzel-Phagen und -Kombinationen....	40

1 Projektziele

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenzentwicklungen von Bakterien gegen Antibiotika wird bereits seit den 1990er Jahren über die sogenannte Resistenzkrise oder den Beginn einer post-antibiotischen Ära diskutiert (Hancock & Knowles, 1998; Alanis, 2005; Spellberg, 2008). Besonders häufig treten Infektionen mit resistenten Erregern im Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt auf. In Deutschland kommt es jährlich zu ca. 400.000 - 600.000 nosokomialen Infektionen und dadurch zu 10.000 - 20.000 Todesfällen - am häufigsten ausgelöst durch *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* / *faecium* (*E. faecalis* / *faecium*), *Clostridioides difficile* und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). (Institut R.K., 2019) Einige der genannten Erreger gehören der Gruppe der sogenannten ESKAPE Pathogene an – eine Gruppe von Bakterien, welche die Fähigkeit auszeichnet, sich den biologischen Mechanismen der Antibiotikatherapie regelhaft entziehen zu können. ESKAPE steht als Akronym für *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Enterobacter*-Spezies. (Rice, 2008) Einer Hochrechnung von Cassini et al. zufolge, sind allein die genannten Erreger für ca. 55.000 Infektionen pro Jahr und ca. 2.400 Todesfälle pro Jahr in Deutschland verantwortlich. (Cassini et al., 2019)

Bis in die 1980er Jahre hielt die Entdeckung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen und Substanzgruppen an. Seit den 1990er Jahren ist jedoch ein deutlicher Abfall in der Anzahl an Forschungsarbeiten sowie Neuzulassungen von Antibiotika zu verzeichnen. Besonders eindrücklich ist, dass 2019 von global 407 präklinischen antibakteriellen Projekten lediglich noch 187 mit Fokus auf direkt wirkende Antibiotika bekannt waren. (Theuretzbacher, et al., 2020) Das Review bestätigt die allgemeine Wahrnehmung, dass es für pharmazeutische Unternehmen kaum noch interessant ist, den großen Aufwand in hochspezifische Wirkstoffe zu investieren. Neben der aus mikrobiologischer Sicht schwierigen und aufwändigen Suche nach neuen Wirkansätzen, stellen vor allem die zeit- und kostenintensive Durchführung von Studien eine Hürde dar. Laut Schätzungen betragen die Entwicklungskosten eines einzelnen neuen Wirkstoffs über 1 Milliarde US Dollar, während aufgrund der spezifischen Anwendung v.a. bezogen auf die Resistenzprofile der Erreger der Kapitalwert in der Folge negativ ist und somit für Investoren uninteressant erscheint. (Towse et al., 2017)

Aufgrund dieser Entwicklung verschiebt der Forschungsschwerpunkt sich zunehmend auch auf andere antibakterielle Wirkkomponenten neben klassischen Antibiotika, darunter bspw. Peptid-basierte Antibiotika, antivirulente Strategien, Kombinationstherapien, monoklonale Antikörper, probiotische Strategien, Impfungen und Bakteriophagen. (Cook & Wright, 2022) Vor allem die Bakteriophagentherapie gewann in den letzten zwei Jahrzehnten erneut wissenschaftliche Aufmerksamkeit.

Obwohl Felix d’Herelle (1873 – 1949) als der Entdecker und Namensgeber der Bakteriophagen bekannt ist, war es Frederick William Twort, der bereits 1915 die Bildung von durchsichtigen Flecken (Spots / Plaques) auf einem Bakterienrasen beschrieb und vermutete, dass die Ursache in Viren liegen könnte, welche Bakterien befallen (Twort, 1915). Eine ähnliche Entdeckung machte d’Herelle 1917 bei Versuchen mit Fäkalien genesender Patienten bzgl. der Shigellen-Ruhr. Er gab den (vermuteten) Viren den Namen Bakteriophagen und beschrieb die Plaque-Zähl-Methode, anhand derer er die Bakteriophagen-Konzentration bestimmte.

(d'Hérelle, 1921) Die Grundidee dieser Methode hat bis heute Relevanz. Andere Forscher wie bspw. Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet und John Howard Northrop vertraten die Auffassung, dass es sich bei dem Spot-Phänomen nicht um das Werk von Viren, sondern das Resultat einer autolytischen Aktivierung der Bakterien handele (Stent, 1964; Northrop & Krueger, 1932; Northrop, 1937). Andre Gratia entdeckte jedoch bereits damals, dass sich die Sensitivität von Bakterien gegenüber Phagen von Stamm zu Stamm unterschied und der Wirtsbereich von Bakteriophagen unterschiedlich sein kann. (A. Gratia 1921, 1922, 1936). Die Vermutung, dass es sich um Viren handelt, wurde später auch durch Max Schlessinger bestärkt, der zeigte, dass Bakteriophagen aus DNA und Proteinen bestanden (Schlessinger, 1934). Die ersten Visualisierungen von Bakteriophagen gelangen erst 1940 Helmut Ruska, E. Peankuch und Kausche mithilfe eines Elektronenmikroskops (Ruska, 1940; Peankuch & Kausche, 1940).

Heute ist bekannt, dass es sich bei Bakteriophagen um Viren handelt. Sie binden an die Zellwand des Bakteriums und injizieren ihr genetisches Material (DNA oder RNA). Sie haben verschiedene Lebenszyklen, darunter den lytischen, lysogenen, pseudolysogenen und chronischen Infektionszyklus. Im lytischen Zyklus repliziert sich der Virus und zerstört die Wirtszelle, während er im lysogenen Zyklus in einer ruhenden Phase im Wirt verbleibt und erst durch bestimmte Reize induziert wird. Chronische Infektionen setzen ständig neue Viren frei, ohne die Wirtszelle zu zerstören, und bei der Pseudolysogenie koexistieren Phagen und Bakterien, wobei nur ein Teil der Bakterien infiziert wird. (Weinbauer, 2004; Bhargava et al., 2021) Für die therapeutische Anwendung sind insbesondere lytische Bakteriophagen von Interesse.

Die klinische Anwendung von Bakteriophagen erfolgte erstmals 1919 durch Felix d'Herelle. Zunächst im damals üblichen Selbstversuch und dann an Hühnern. Später erfolgten weitere größere Studien bspw. in Indien (d'Herelle 1927, 1929, 1931). In den 1920er bis 1930er Jahren erlebte die Bakteriophagentherapie eine Hochzeit, in welcher Unternehmen aus Frankreich, England und den USA kommerziell Phagencocktails produzierten. Dabei kam es jedoch immer wieder zu Qualitätsproblemen, was die Effektivität der Therapie beeinflusst haben könnte und folglich die Kontroverse um die Therapieform befeuerte (Eaton & Bayne-Jones, 1934; Krueger & Scribner, 1941). Zusätzlich fanden durch die Entdeckung und Anwendung von Sulfanilamiden und Penicillin (Entdeckung 1928, erste Anwendung 1941) andere antibakterielle Wirkstoffe einen breiten Zuspruch, was das Interesse an der Bakteriophagentherapie weiter verringerte, bis die Produktion von Bakteriophagen in der westlichen Welt in den 1970er Jahren endgültig eingestellt wurde (Summers, 2001).

In Tiflis, Georgien wurde bereits 1923 der Vorgänger des heutigen G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology gegründet, welches sich ab 1936 u.a. auf die Forschung an Bakteriophagen spezialisierte. (George Eliava Institute of Bacteriophages, 2024) In der ehemaligen Sowjetunion erfolgte während des zweiten Weltkrieges die Forschung und Anwendung von Bakteriophagen vorwiegend im militärischen Kontext bspw. bei Wundinfektionen. Ab den 1950er Jahren erweiterte sich die klinische Testung auf ein breites Anwendungsfeld, jedoch wurde die Grundlagenforschung nicht in den Vordergrund gestellt. (Chanishvili, 2016) Bis heute sind bspw. in russischen und georgischen Apotheken Phagenzubereitungen frei erwerbbar. Aufgrund der jahrzehntelangen Expertise gehören die Behandlerinnen und Behandler sowie Forscherinnen und Forscher aus Georgien heute zu den gefragten Experten. Auch hunderte Patientinnen und Patienten, welche hierzulande als

austherapiert gelten, wenden sich in ihrer Verzweiflung über fehlende Behandlungsmöglichkeiten an die osteuropäischen Institute (z.B. Eliava Institute of Bacteriophages in Georgien, Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Polen).

Im Gegensatz dazu hat sich in Deutschland die Therapie mit Bakteriophagen bisher nicht etabliert, obwohl es über die Jahrzehnte immer wieder Ärztinnen und Ärzte gab, welche sich dieser widmeten. Zu Beginn des Zweiten Weltkriegs erlebte die Bakteriophagentherapie in Deutschland einen Aufschwung, wobei Behringwerke im Jahr 1939 die ersten Phagenbasierten Präparate auf den Markt brachte. Zahlreiche deutsche Soldaten wurden erfolgreich mit Bakteriophagen gegen Shigellose behandelt, jedoch traten nach der anfänglichen Euphorie auch Misserfolge auf. Diese werden heute auf mangelnde Kenntnis über die spezifische Wirksamkeit der Phagen, die Verwendung temperenter Phagen sowie auf Qualitätsmängel der Phagenlösungen zurückgeführt. Der Mangel an wissenschaftlichen Beweisen für die Wirksamkeit der Phagen und die Einführung von Antibiotika wie Penicillin und Sulfonamiden führten schließlich zum Rückgang des Interesses an der Bakteriophagentherapie. (Häusler, 2006) In der DDR wurde zwischen 1959 und 1965 das Phagenpräparat Intestolysin® zur Bekämpfung von Typhus, Paratyphus, Dysenterie und pathogenen *E. coli* eingesetzt. Trotz großer Produktionsanstrengungen während einer Epidemie im Jahr 1962 wurde die Phagenprophylaxe noch im selben Jahr eingestellt. (Leupold, 2018) Ab 1979 wurden in der Endo-Klinik Hamburg Phagen zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt, insbesondere bei Implantat-assoziierten Infektionen. In den 1990er Jahren begann man an der Medizinischen Hochschule Hannover mit der topischen Anwendung von Phagen bei chronischen Wunden und Verbrennungen. Seit 2015 wurden in Chemnitz und Tirschenreuth 33 Patienten mit chronischen periprothetischen Infektionen mit Phagen behandelt, wobei in 25 Fällen eine vollständige Heilung erzielt wurde. (Willy et al., 2023)

In Deutschland wird die Bakteriophagentherapie unter dem Schutz des Artikels 37 der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Seit 2016 wurden im Bundeswehrkrankenhaus Berlin in Zusammenarbeit mit internationalen Partnern drei Patienten mit georgischen Phagen behandelt. (Willy et al., 2023) Am Deutschen Herzzentrum Berlin wurden von 2018 bis 2021 sechs Patienten als letzte Behandlungsoption mit Phagen therapiert, wobei einige positive Ergebnisse erzielt wurden. (Mulzer et al., 2019) An der Medizinischen Hochschule Hannover wurden seit 2015 in 33 Fällen personalisierte Bakteriophagentherapien durchgeführt, wobei die Erfolgsrate bei über 90 % lag. Diese Erfolge werden auf die patientenindividuelle Präparation von Phagen, die interdisziplinäre Verabreichung und die begleitende konventionelle Therapie zurückgeführt. Die am häufigsten behandelten Infektionen waren Implantat-assoziierte Infektionen, darunter Infektionen von Gefäßprothesen und linksventrikulären Unterstützungssystemen (LVAD). (Rubalskii et al., 2020) Am Universitätsklinikum Regensburg begann die Bakteriophagentherapie im Oktober 2022, wobei der erste Fall eine Infektion mit multiresistenten gramnegativen Bakterien im proximalen Femur betraf. (Alt et al., 2024) Am Universitätsklinikum Rostock wird die Bakteriophagentherapie vor allem bei gefäßchirurgischen Infektionen, insbesondere in der Leistenengegend, und bei kardiochirurgischen Infektionen nach LVAD-Implantationen

angewendet, wobei vermutlich aufgrund der Verwendung von vorformulierten Phagencocktails die Therapieerfolge bisher auf etwa 30 % begrenzt sind. (Willy et al., 2023)

Obwohl der Bakteriophagentherapie zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt wird, gilt es mehrere beeinflussende Faktoren für eine Etablierung in Deutschland näher zu betrachten. Trotz der Verfügbarkeit vieler Fallberichte von erfolgreichen Therapieversuchen, mangelt es bisher an qualitativ hochwertigen randomisiert-kontrollierten Studien (RCT). Bis heute gibt es bspw. lediglich eine abgeschlossene Phase 3 Studie. (ClinicalTrials.gov, 2024) In den meisten RCTs werden bereits im Vorfeld definierte oder kommerziell verfügbare Phagenzubereitungen angewendet. Dies kann jedoch dazu führen, dass bei fehlender vorheriger Suszeptibilitätstestung der Patientenisolat, keine ausreichende Wirksamkeit in der Anwendung erwartet werden kann. Dem gegenüber steht der Ansatz der individualisierten Medizin, welcher die patientenindividuelle Herstellung von Phagenpräparaten anstrebt, um eine möglichst hohe Suszeptibilität der Patientenisolat gegenüber einem oder mehreren Phagen zu nutzen.

In Deutschland kann die Herstellung von Bakteriophagen entweder mit dem Ziel eines zugelassenen Arzneimittels laut Regularien des Arzneimittelgesetzes (AMG) oder als magistrale Zubereitung gemäß den Regularien der Apothekenbetriebsordnung (ApBetrO) erfolgen. Es gibt aktuell keine zugelassenen Bakteriophagen-Produkte auf dem deutschen Markt. In Deutschland waren zu Beginn des hier zu beschreibenden Forschungsprojektes PhagoFlow die Qualitätsanforderungen an Bakteriophagen für den therapeutischen Einsatz am Menschen nicht festgelegt. In Belgien wurde basierend auf der magistralen Zubereitung ein regulatorischer Rahmen geschaffen, der eine patientenindividuelle Behandlung mit Phagen ermöglicht. Dabei müssen Wirkstoffe der magistralen Zubereitungen die Anforderungen eines offiziellen Arzneibuchs erfüllen, eine Zulassung durch den Gesundheitsminister nach einer positiven Stellungnahme der nationalen Arzneibuchkommission erhalten oder durch ein Analysezertifikat eines zugelassenen belgischen Labors begleitet werden (nicht zugelassene Wirkstoffe). Die Akkreditierung der Labore erfolgt durch die belgischen Aufsichtsbehörden. (Pirnay et al., 2018)

Die Behandlung mit einem Phagenpräparat nach magistraler Zubereitung aus einzelnen nach Good Manufacturing Practice (GMP) Regularien (s. Kapitel 2.5) hergestellten Monophagen-Wirkkomponenten (kurz: Phagen-WK) wurde in Deutschland bisher klinisch nicht angewendet bzw. erprobt. Daher handelt es sich bei dem Projekt PhagoFlow um eine Praktikabilitätstestung der bereits zur Verfügung stehenden infrastrukturellen Bedingungen in Deutschland unter Berücksichtigung der gesetzlichen Vorgaben, bei dem das Konzept der magistralen Herstellung der Belgier zum Vorbild genommen wurde. Im Fokus steht die Überprüfung der Realisierbarkeit einer Entwicklung eines Ablaufplanes der magistralen Herstellung von Phagen-WKs für patientenindividuelle Zubereitungen sowie der klinischen Anwendung im Rahmen individueller Heilversuche. Hierfür erfolgt eine Analyse des zeitlichen Ablaufs der Herstellung und Bereitstellung der Phagenpräparate, die Beschreibung des klinischen Verlaufs der Patienten und die Erhebung der Wirksamkeit der hergestellten Bakteriophagen-Zubereitungen. Das Projekt soll jedoch keinen konfirmatorischen Vergleich in einer primären Zielvariable ermöglichen. Es handelt sich daher explizit nicht um eine klinische Studie.

Klinisches Ziel war es, dass nach durchgeführter mikrobiologischer Erregercharakterisierung innerhalb von zwei Wochen eine Therapie mit wirksamen Bakteriophagen begonnen werden kann. Es sollte die Übertragbarkeit und Verbreitung des heutigen Wissens um die Bakteriophagentherapie bei adäquater Indikation (Infektion mit multiresistenten bzw. difficult to treat Erregern) im stationären Versorgungsalltag bewertet werden. Im Fokus standen in absteigender Reihenfolge priorisiert die Erreger *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* sowie *E. faecium* / *faecalis*.

Aus diesem übergeordneten Ziel ergaben sich folgende Arbeitshypothesen:

Primäre Arbeitshypothese: Es ist möglich, auf der Basis der klinikinternen Bakteriendifferenzierung innerhalb eines Zeitraumes von bis zu maximal zwei Wochen nach Probengewinnung unter GMP hergestellte Phagen dem Patienten in einer wirksamen Bakteriophagen-Zubereitung zu applizieren.

Sekundäre Arbeitshypothesen:

- Es ist aufgrund des dann angewachsenen Fundus an geeigneten gereinigten Phagenpräparaten zum Zeitpunkt des letzten halben Jahres der Fallserie möglich, nach Identifizierung des für die Infektion ursächlichen Erregers und seiner Resistenzeigenschaften innerhalb von drei Werktagen mit einer magistralen Phagenzubereitung die Phagentherapie zu beginnen.
- Es ist möglich, eine Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen durch den Anwender (Klinik) zeitnah durchzuführen („Phagogramm“).
- Es ist möglich, Phagen jederzeit nach Vorgaben der Klinik aus der entstandenen GMP-Phagenwirkstoffbank abzurufen.

Aus den Arbeitshypothesen werden die folgenden Zielgrößen abgeleitet.

Primäre Zielgröße: Zeitpunkt des Beginns der Anwendung magistraler Zubereitungen nach initialer Gewebeprobengewinnung

Sekundäre Zielgrößen:

- Ergebnisse der Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen (Phagogramm)
- Anzahl der hergestellten Phagen nach Vorgaben der Klinik und der Phagenbank.

Erhoben werden strukturelle Daten zur Dauer der Herstellung aktiver Phagenwirkstoffe in Abhängigkeit von der Genese, Neuisolate, Isolate aus der DSMZ-Sammlung oder Nachproduktion. Im Rahmen der Behandlung von Patientinnen und Patienten, die in die Fallserie aufgenommen werden, werden notwendige primäre Patientendaten sowie klinische Behandlungsdaten erhoben. Da jedoch keine der definierten Zielgrößen das klinische Outcome umfasst, wird im weiteren Verlauf nicht auf die klinischen Aspekte der Behandlung eingegangen. Eine detaillierte Betrachtung und Veröffentlichung klinischer Aspekte der Patientenbehandlung im Sinne einer Fallserie ist geplant.

Vor dem Hintergrund, dass in anderen europäischen Ländern (z.B. Belgien und Polen) die Bakteriophagentherapie eine Einführung erfährt, soll die Praktikabilitätstestung auch für

Deutschland zu einem Transfer des Wissens um die Bakteriophagentherapie in die Versorgungspraxis beitragen. Das Projekt sollte möglichst weitgehend wissenschaftlich transparent sein.

2 Projektdurchführung

2.1 Projektbeteiligte

Tabelle 1: Projektbeteiligte Institute und Mitarbeitende

Konsortialführer	Prof. Dr. med. Christian Willy
Bundeswehrkrankenhaus Berlin Scharnhorststr. 13 10115 Berlin	<p>Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie: Prof. Dr. med. Christian Willy (Klinikdirektor, Projektleitung) Dr. Dennis Vogt (Leiter Septische Chirurgie, Facharzt) Dr. Marcus Stichling (Oberarzt, Facharzt) Melanie Häfner, M.Sc. (Wissenschaftliche Mitarbeiterin)</p> <p>Klinik für Urologie: Dr. Holger Heidenreich (Klinikdirektor) Celina Güntzel (Assistenzärztin)</p> <p>Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde: Dr. Herbert Eichwald (Klinikdirektor) Dr. Jan Hagmann (Assistenzarzt) Julian Schwartz (Assistenzarzt)</p> <p>Abteilung für Mikrobiologie: Dr. Werner Wenzel (Abteilungsleiter) Morten Leddin (Medizinisch-technischer Angestellter) Andrea Patzke (Medizinisch-technische Angestellte)</p> <p>Krankenhausapotheke: Drudea Garbe (Abteilungsleiterin) Kai Halama (Leitung Qualitätskontrolle) Alexa Schnölzer (Fachapothekerin für Klinische Pharmazie)</p>
Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig	<p>Dr. Christine Rohde (Kuratorin, Leitung der AG Klinische Phagen und Gesetzliche Regulation) Dr. Imke Korf (Wissenschaftlerin) Dr. Johannes Wittmann (Kurator, Leitung der AG Phagen genomik und Anwendung) Dr. Boyke Bunk (Abteilungsleitung Bioinformatik) Dr. Cathrin Sproer (Wissenschaftlerin)</p>
Fraunhofer ITEM	<p>Prof. Dr. Holger Ziehr (Bereichsleitung, Qualified Person) Dr. Imke Korf (Projektleitung ITEM)</p>

Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Inhoffenstr. 7 38124 Braunschweig	Dr. Sarah Wienecke (Wissenschaftlerin) Dr. Stephanie Hebecker (Leitung der Herstellung) Katrin Rimkus (Leitung Qualitätssicherheit) Dr. Philipp Koch (/ Dr. Nico Langer) (Leitung Qualitätskontrolle)
--	--

2.2 Beschreibung/ Darstellung des Projekts

Im Rahmen des Forschungsprojektes sollte eine Praktikabilitätstestung der magistralen Phagenherstellung auf der Basis der zur Verfügung stehenden infrastrukturellen Bedingungen in Deutschland unter Berücksichtigung der gesetzlichen Vorgaben erfolgen. Hierbei stand im Fokus die Entwicklung eines Ablaufplanes zur magistralen Herstellung von Monophagen-Wirkstoffen für patientenindividuelle Zubereitungen sowie die klinische Anwendung bei adäquater Indikation im Rahmen individueller Heilversuche.

Die dazu notwendigen Bakteriophagen sollten isoliert, charakterisiert und für die therapeutische Anwendung als Wirkstoffe hergestellt werden. In absteigender Reihenfolge priorisiert wurden die Erreger *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* sowie *E. faecium* / *faecalis* betrachtet. Die Zielgruppe an Patientinnen und Patienten waren entsprechend jene mit Infektionen dieses Keimspektrums, welche nach bisherigem medizinischem Maßstab als ausbehandelt oder schwer zu behandeln gelten (Voraussetzung für individuellen Heilversuch). Für die in Frage kommenden Patientinnen und Patienten wurden die Erreger auf Suszeptibilität gegenüber den hergestellten Phagen getestet (Phagogramm). Im Falle eines ausreichend hohen Wirktiters wurde patientenindividuell eine Phagenzubereitung formuliert und angewendet.

DSMZ: Isolation und Auswahl von Phagen und bakteriellen Wirten

Das Vorhandensein von therapeutisch relevanten Phagen ist eine Grundvoraussetzung, dass die Phagentherapie angewendet werden kann. Es gibt weltweit wenige öffentlich zugängliche Sammlungen von Bioressourcen, welche in größerem Maßstab Phagensammlungen vorhalten, erweitern und diese ausführlich charakterisieren. Schwerpunktsammlungen sind oft universitär verortet, aber nicht öffentlich zugänglich. Zu Beginn des Projektes verfügte die DSMZ über eine diverse Phagensammlung, welche rund 700 Phagen gegen rund 80 verschiedene bakterielle Genera beinhaltete, wobei Phagen gegen *Escherichia* und *Pseudomonas* am häufigsten vertreten waren. Phagen für dieses Projekt stammen entweder aus der bereits bestehenden Sammlung oder wurden im Rahmen dieses Projektes neu aus Umweltproben wie Oberflächenwasser, Klärwasser oder Bodenproben isoliert. Sofern die Eigenschaften der Phagen nicht bekannt waren, erfolgte ihre Charakterisierung und die Beurteilung ihres therapeutischen Potentials hinsichtlich ihres Wirtsbereiches, des lytischen Verhaltens und der genomischen Sicherheit (Ausschluss von Genen, die beispielsweise für Toxine und Antibiotikaresistenzen codieren). Der theoretische Zeitaufwand für die Isolation bis hin zum Abschluss der Charakterisierung setzt sich wie folgt zusammen

1. Anreicherung und Isolation von Einzelplaques (Voraussetzung: Reinkultur Bakterienisolat, filtriertes Probenmaterial (z.B. Klärwasser)) → 4 Tage

2. Klonale Reinigung Einzelplaques (Voraussetzung: Vorhandensein passender Phagen in Probenmaterial, sonst Neustart bei 1.) → 4 Tage
3. Herstellung Arbeitslysat inkl. Titerbestimmung → 5 Tage
4. Charakterisierung (Voraussetzung: 300-400 mL LySAT Titer > 1E9 PFU/mL, bei kleinerem Titer Anpassung Kultivierungsbedingungen bei 3.), Schritt 4.1.-4.3. können bei ausreichenden personellen Kapazitäten parallel ablaufen.
 - 4.1. Wirtsbereich bei mind. 100 Isolaten (Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Wirksamkeit auf einem unbekanntem Patientenisolat, Phagen mit breitem Wirtsbereich werden bevorzugt) → 5 Tage
 - 4.2. Lytische Effizienz (Abschätzung der Wirksamkeit und Produzierbarkeit) → 3 Tage
 - 4.3. Genomanalyse → 5 Tage

Selbst unter idealen Bedingungen (keine personelle, finanzielle und infrastrukturelle Limitation) ist für die oben genannten Arbeitsschritte ein Zeitaufwand von mind. 3 Wochen erforderlich, bis ein Phage qualitätskontrolliert für die GMP-Herstellung bereitgestellt werden kann. In der Realität erfolgten die Isolation und Charakterisierung mehrerer Phagen parallel, was erforderlich ist, um Phagen mit höchstem therapeutischem Potential auszuwählen. Im Zuge der Isolation und Charakterisierung wurde eine Reihe von Phagen isoliert, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit bzw. ihres geringen Wirtsbereichs nicht für die Herstellung vorgesehen wurden. Für die Bereitstellung von drei geeigneten Phagen gegen die Spezies *P. aeruginosa* sowie *S. aureus* sowie 6 Phagen gegen *E. coli* wurden pro Targetspezies jeweils ungefähr 6 Monate benötigt. Kenntnisse über Phagenbiologie, Mikrobiologie, Kultivierung und Konservierung von Bioressourcen sowie die Sequenzierung von Viren und Mikroorganismen sowie deren Auswertung sind dafür erforderlich. Aufgrund der Pathogenität der Bakterien mussten die Arbeiten in Laboren der Schutzstufe 2 durchgeführt werden.

Das beteiligte wissenschaftliche Personal setzte sich aus den Fachgebieten Biologie, Mikrobiologie und Bioinformatik zusammen.

ITEM: GMP-konforme Herstellung der Phagen-Wirkkomponenten

Die therapeutische Anwendung von Bakteriophagen im Rahmen der magistralen Zubereitung setzt nach geltendem Recht die GMP-konforme Herstellung der Phagen-Wirkstoffe (APIs) voraus. Ein wesentlicher Bestandteil des Projektes war die Realisierung der Produktion. Deutschlandweit gab es zum Projektstart keine Produktionsstätte, die eine Herstellungserlaubnis für GMP-konforme Produktion von Phagen-Wirkstoffe innehatte. Fraunhofer ITEM hat dementsprechend in enger Zusammenarbeit mit dem Gewerbeaufsichtsamt und BfArM Rahmenbedingungen abgestimmt, die Qualitätsanforderungen an die Herstellung und Freigabeproofung von Phagen-Wirkstoffen definieren. Dies mündete im August 2022 in der Herstellungserlaubnis zur Produktion von Phagen-WKs (nach 43 Monaten Projektlaufzeit) mit der Einschränkung auf das Projekt PhagoFlow (keine allgemeine Herstellungserlaubnis für Phagen(-WKs)). Für die Herstellung und Freigabe von drei Phagen-WKs inklusive der erforderlichen Phagen- und Zellbänke, war allein ein Zeitraum von etwa 14 Monaten erforderlich, wobei die eigentliche Herstellung der Phagen-WKs mit etwa zwei Wochen zu veranschlagen war. Im Vorfeld mussten die Start-

Materialien (Phagenstöcke (MPS) und Zellbänke (MCB)) GMP-konform hergestellt werden. Auch dabei lag die reine Herstellungszeit bei etwa zwei Wochen. Der Hauptanteil des Zeitaufwands nahmen die Dokumenterstellung, Prozessetablierung, Chargendokumentation und Freigabeprüfung der MPS, MCB und Phagen-WK in Anspruch. Kenntnisse über GMP-Qualitätsanforderungen, geltendes Recht für die Herstellung von Wirkstoffen sowie Kenntnisse im Umgang mit Phagen unter biotechnologischen Aspekten waren und sind dafür erforderlich.

Das beteiligte wissenschaftliche Personal setzte sich den Fachgebieten Biotechnologie, Biologie, Mikrobiologie und Pharmazie zusammen.

Mikrobiologie: Durchführung von Phagogrammen und Sterilitätstestung

Aus der umfangreichen mikrobiologischen Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie wurden 460 Isolate der im Projektprotokoll genannten Mikroorganismen kultiviert, auf Erregeridentität und Resistenzverhalten geprüft und an den Konsortialpartner DSMZ übergeben. Aus Patientenproben isolierte Bakterienstämme wurden nach massenspektrometrischer Identifizierung und Feststellung der Resistenzeigenschaften mittels kultureller und molekularbiologischer Verfahren laufend in der Stammsammlung archiviert, um sie bei Bedarf an die DSMZ zu übergeben. Dabei findet auch das im Rahmen des Projekts beschaffte Analysesystem Curetis Unyvero® Anwendung. Es wurde nach Bereitstellung einem umfangreichen Verifizierungsprozess unterzogen, der auf den Einsatz der projektrelevanten ITI- (Implant and Tissue Infection) ausgerichtet war. Das Gerät steht seit erfolgreichem Abschluss der Verifizierung der Routinediagnostik zur Verfügung.

Im Rahmen der klinischen Fallserie wurde bei multiresistenten Infektionen oder bei Versagen vorheriger Therapien ein Phagogramm durchgeführt, um die Wirksamkeit von Phagen gegen *P. aeruginosa* zu testen. Das Phagogramm basiert auf dem Plaque-Assay-Verfahren, bei dem eine Phagenverdünnungsreihe auf eine Agarplatte mit Bakterienkultur aufgetragen wird. Nach der Inkubation wird die Phagenwirkung anhand der gebildeten Plaques quantifiziert. Alternativ kann ein Spot-Assay verwendet werden, der weniger Material benötigt, aber weniger genau ist. Insgesamt ist mit einer Bearbeitungszeit von ca. drei Stunden pro Patient bei fünf zu testenden Phagen zu rechnen.

Der netto Zeitbedarf von Erhalt einer Patientenprobe bis zum Vorliegen eines Phagogramms mit ermitteltem Wirktiter liegt damit bei mindestens vier Tagen. In Abhängigkeit vom Untersuchungsmaterial, von Anzahl und Menge der nachgewiesenen Erreger und der Verfügbarkeit geschulten Personals durchschnittlich eher bei einer Woche. Aufgrund des hohen Aufkommens an Phagogramm-Anfragen war die real benötigte Zeit jedoch deutlich höher.

Darüber hinaus überprüft die mikrobiologische Abteilung regelmäßig die Sterilität der von ITEM gelieferten Phagensuspensionen, bevor sie zur klinischen Anwendung freigegeben werden.

Krankenhausapotheke: patientenindividuelle Formulierung von Phagenzubereitungen

Für die Herstellung von Phagenzubereitungen durch die Krankenhausapotheke des Bundeswehrkrankenhauses Berlin war die Qualifikation eines Herstellungsraumes als

Reinraum zur Herstellung von parenteralen Arzneimitteln im Sinne des § 35 Apothekenbetriebsordnung notwendig. Es erfolgte die notwendige Dokumentationsleistung zu Raumhygiene, Personalhygiene und Hygienemonitoring sowie die Validierung des pharmazeutischen Personals zur aseptischen Herstellung im Sinne einer Eignungsprüfung. Für die Etablierung der Herstellung von Phagenzubereitungen wurden eine Herstellungsanweisung und ein Herstellungsprotokoll erstellt. Die Phagenzubereitungen wurden auf schriftliche Anforderung der behandelnden Ärzte jeweils patientenindividuell hergestellt. An jedem Tag musste der Herstellungsraum inklusive Isolator vor der patientenindividuellen Phagenzubereitung mehrere Stunden aufwendig gereinigt werden. Der Aufwand für die dann folgende Herstellung der Phagenzubereitung ist dagegen als gering zu bewerten.

Klinische Praktikabilitätstestung / Fallserie

Die Leitung und Administration des Forschungsprojektes sowie der Patientenbehandlung erfolgte durch die Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie des Bundeswehrkrankenhauses Berlin. Das Patientenmanagement erfolgte durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin unter chefärztlicher Leitung, wodurch die Kommunikation mit Patientinnen und Patienten sowie Behandlerinnen und Behandlern gebündelt werden konnte. Aufgrund der hohen Nachfrage und der Komplexität der einzelnen Patientenfälle stellte die Administration potenzieller Phagenpatientinnen und -patienten einen beträchtlichen Aufwand dar. Nach Vorauswahl möglicher Patientinnen und Patienten wurden diese fachärztlich vorgestellt. Im Anschluss erfolgte entweder eine Probenentnahme im Bundeswehrkrankenhaus oder eine postalische Probeneinsendung zur Testung der Patientenisolate auf Suszeptibilität gegenüber den Bakteriophagen. Bei positivem Testergebnis des Phagogramms erfolgte die individuelle Behandlungsplanung und -durchführung durch die jeweiligen Fachkliniken des Bundeswehrkrankenhauses Berlin auf Facharztniveau entweder im ambulanten Setting oder stationär für mindestens zehn Tage. In Rücksprache mit der Krankenhausapotheke wurden patientenindividuelle Phagenzubereitungen abhängig vom Wirktitel des Phagogramms angefordert.

2.3 Beschreibung Ablauf des Projekts

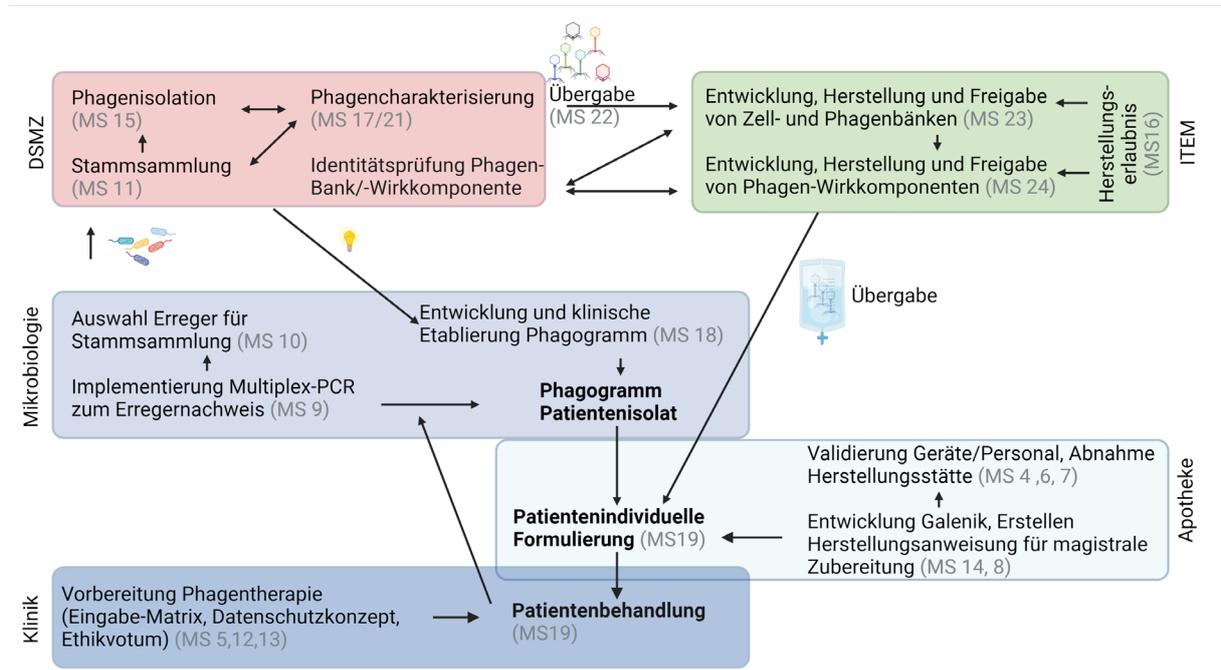


Abbildung 1: Überblick und Abhängigkeiten der Aufgaben beteiligter Partner im Projekt PhagoFlow

Im Zeitraum von Projektstart bis Oktober 2020 erfolgte zunächst die Auswahl geeigneter Phagen und Produktionswirte an der DSMZ. Um mit der Isolation und Auswahl der Phagen beginnen zu können, musste eine Sammlung von relevanten Erreger-Isolaten durch die Mikrobiologie des Bundeswehrkrankenhauses Berlin zusammengestellt werden. Es wurden Erreger ausgewählt, die entweder eine Multiresistenz (3/4 MRGN) bzw. eine Methicillin Resistenz aufwiesen, die in verschiedenen Kliniken und Stationen über einen Zeitraum von 2015 bis 2018 isoliert wurden, um eine große Bandbreite an Erregern abdecken zu können und auf diese Weise eine gute Vorhersage zur Nutzbarkeit der Phagen treffen zu können. Diese wurden sukzessive an die DSMZ gesendet und dort Laborbanken von rund 600 Isolaten angelegt. Die ersten Phagen wurden im Februar 2020, beginnend mit Phagen gegen *P. aeruginosa*, an das ITEM übergeben. Parallel wurde mit der Auswahl von Phagen gegen *S. aureus* und *E. coli* gestartet. Erste Phagen zu den nächstpriorisierten Spezies konnten im Juni 2020 übergeben werden. Im Folgenden wurde der Pool an charakterisierten Phagen kontinuierlich für die drei Target Spezies erweitert. Bis März 2021 wurden weitere Phagen gesucht, um die noch vorhandenen Abdeckungslücken zu schließen. Es konnten jedoch nur Phagen isoliert werden, die dazu keinen wesentlichen Beitrag geleistet hätten und daher nicht für eine Übergabe zur Produktion bei ITEM in Frage gekommen sind. Die Corona-Pandemie hatte ab 2020 einen Einfluss auf Zugänglichkeit der Labore (Reduktion der Personendichte), sodass die Laborarbeit über Monate nicht mit der vollständigen Kapazität ausgeübt werden konnte. Auf den Umfang der bereitgestellten Phagen hatte dies aber nur einen geringen Einfluss, da diese Zeit vermehrt zur Datenauswertung genutzt wurde.

Die Etablierungsarbeiten für die Herstellung der Phagenbanken startete am ITEM im Februar 2020. Diese Arbeiten dienten dazu, Herstellungsdokumente zu erstellen und notwendige Vorgaben zu Prozessparametern zu bestimmen, da jede Phage-Wirt Kombination ein

spezifisches Wachstum-Lyseverhalten zeigt. Trotzdem war das Ziel, einen Herstellprozess zu entwickeln, bei dem möglichst wenige Parameter Phagen-spezifisch angepasst werden müssen. Parallel erfolgten Arbeiten und Absprachen mit der zuständigen Behörde (Gewerbeaufsichtsamt = GAA) zur Erlangung der Herstellungserlaubnis. Dazu gehörte das Einrichten eines Herstellraumes (welcher in der Luftqualität nachweislich der Reinraumklasse D entsprechen musste), Erstellen eines Prozessbeschreibungsfiles sowie der Entwurf von Herstellenweisungen. Auf Grundlage dessen erfolgte die Absprache zu Anforderungen an die Räume / Geräte, den Herstellprozess und die Freigabeprüfungen. Auch hier verzögerte die Corona-Pandemie den Projektablauf, da das Audit mit dem GAA erst im Jahr 2021 durchgeführt werden konnte und erst dann im Detail eine Abstimmung zu den nötigen Bedingungen möglich waren. Zudem waren Prozess-relevante Geräte und Hilfsmittel nur mit zum Teil sehr langen Lieferzeiten erhältlich.

Da zum Zeitpunkt des Projektbeginns keine verbindlichen nationalen oder internationalen Leitfäden oder Monographien vorlagen, wurde unmittelbar nach der Bewilligung des Projektes basierend auf der belgischen Monographie (Pirnay et al., 2018) ein Entwurf für eine deutsche Monographie zur Herstellung / Freigabe von Phagenwirkstoffen erarbeitet, der die Mindestanforderungen dafür enthalten sollte. Dieser Entwurf wurde vom BfArM einmalig gesichtet und mit Nachforderungen zurückgespielt. Nach der Überarbeitung erfolgte keine weitere Rückmeldung, da sich das BfArM auf die Erarbeitung einer europaweit wirkenden Monografie fokussierte und keinen nationalen Alleingang anstrebte. Wenn auch ein European Chapter mittlerweile (Anfang 2024) publiziert wurde, liegt jedoch eine die Herstellung anleitende Europäische Monografie (European Pharmakopöe) noch nicht vor. Da auf diese Weise die Möglichkeit genommen wurde, Qualitätsanforderungen zu definieren, die der Biologie der Phagen gerecht wurde, konnten im Vergleich zu anderen Arzneimittelherstellungen kaum notwendigen Abstriche gemacht werden. Insbesondere die Notwendigkeit einer Qualifizierung aller Geräte und des Herstellraumes sowie die Notwendigkeit einer GMP-konformen Sequenzierung (Anforderung vom Arzneimittelbeauftragten der Bundeswehr) zur Identitätstestung in der Freigabeanalytik bei Phagenbänken und Phagen-WK führten zu Verzögerungen bei der Herstellung. Die größte Herausforderung stellte dabei die Suche nach einem geeigneten Labor für die Sequenzierung dar. Weltweit gab es nur wenige Labore, die diese Analytik angeboten haben. Die dabei entstehenden Kosten (30.000 – 40.000 € / Sequenzierung) wären im Projektrahmen nicht finanzierbar gewesen. Die Lösung stellte die Bereitschaft der DSMZ dar, das vorhandene Qualitätssystem auszubauen, gemeinsam mit dem ITEM Vorgabedokumente zu entwickeln, sich vom ITEM als Lieferant qualifizieren und durch das GAA auditieren zu lassen. Die DSMZ erfüllte final die Anforderungen, sodass die Gewerbeaufsicht im Juli 2022 die GMP-Konformität bestätigte.

Im Februar 2022 wurden dann die ersten Zell- und Phagenbänke in den Räumen hergestellt und im Anschluss für die Etablierung des Prozesses zur Herstellung der Phagen-WK im Labormaßstab eingesetzt. Es ist entscheidend für die Etablierung der Herstellung der Phagen-WKs, bereits finale Bänke einzusetzen, da leichte Unterschiede in der Phagen-Konzentration bereits zu einem unterschiedlichen Lyseverhalten der Kultur führen können, was in abweichender Konzentration im Lysat resultiert und damit der gesamte nachfolgende Prozess variiert. Bei zwei von drei Phagen gegen *P. aeruginosa* wurden darüber hinaus Technische

Chargen im finalen Prozessmaßstab hergestellt, um zu überprüfen, wie gut der Upscale vorhersagbar ist. Für die Herstellung der Phagen-WK musste die Herstellungserlaubnis vorliegen. Diese wurde im August 2022 ausgestellt, nachdem dem GAA bestätigt werden konnte, dass alle Forderungen erfüllt wurden. Im Oktober 2022 startete die Herstellung der ersten Phagen-WK, in den folgenden zwei Monaten folgten zwei weitere Herstellungen. Die Freigabeprüfung konnte Mitte Februar 2023 abgeschlossen und die Phagen-WK nach der Freigabe Ende Februar 2023 an die Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses Berlin zugestellt werden.

Im Februar 2023 startete die Herstellung der Zell- und Phagenbänke für die Zielspezies *S. aureus*. Auch hier erfolgte analog die Etablierung der Herstellsequenz im Labormaßstab ausgehend von den GMP-konform hergestellten Bänken. Von April bis Juni wurden zwei Phagen-WKs hergestellt, bei denen im Rahmen der Freigabeprüfung jedoch ein unerwartet niedriger Titer festgestellt wurde, der knapp unterhalb der Spezifikation lag. Zum einen wurden Untersuchungen zur Erklärung des niedrigen Titers eingeleitet, zum anderen wurde an einer methodischen Anpassung der DNA-Isolierung gearbeitet, die eine ausreichend hohe DNA-Menge für die Sequenzierung ermöglicht. Es wurde vermutet, dass möglicherweise der zweite Diafiltrationsschritt fehlerhaft war. Aus diesem Grund erfolgte mit vorhandenem Material die Wiederholung des zweiten Diafiltrationsschritts. Nachdem zudem bestätigt wurde, dass die Chromatographie des Materials reproduzierbare Ergebnisse liefert und der finale Titer oberhalb der gesetzten Spezifikation lag, wurde die Herstellung eines Phagen im Oktober 2023 wiederholt. Unerwartet ergab die Konzentrationsbestimmung erneut einen Wert unterhalb der Spezifikation. Bis zum Ende des Projektes konnte die Ursache trotz der Einbeziehung von Phagenexpertinnen und -experten aus Belgien nicht ermittelt werden. Auch die Anpassung der Methode zur DNA-Isolation blieb erfolglos. Zwar konnte ausreichend DNA isoliert werden, jedoch war die Qualität der DNA nicht ausreichend für eine Sequenzierung. Dementsprechend war es nicht möglich, Phagen-WKs gegen *S. aureus* an die Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses abzugeben.

Parallel zu den Arbeiten zur Herstellung der Phagen-WKs erfolgte am Bundeswehrkrankenhaus Berlin die Vorbereitung der klinischen Phagenanwendung. Nach Projektbeginn 2019 konnten zügig die infrastrukturellen Bedingungen geschaffen werden.

Durch die Abteilung für Mikrobiologie erfolgte neben der Etablierung einer Multiplex-PCR zum Schnellnachweis studienrelevanter Erreger die Etablierung eines standardisierten Verfahrens zur Suszeptibilitätstestung von Patientenisolaten gegenüber Phagen (Phagogramm) als festkulturbasiertes manuelles Verfahren. Die technische Weiterentwicklung des Verfahrens als flüssigkulturbasiertes teilautomatisiertes Verfahren konnte aufgrund der geforderten Ressourcen im Rahmen der Corona-Pandemie erst im Jahr 2023 weiterverfolgt werden, stellte sich jedoch ohne zusätzliche zeitliche und personelle Ressourcen für weitere Versuchsreihen als im Projektzeitraum nicht umsetzbar heraus. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf den Projektverlauf, das mittels des etablierten festkulturbasierten Verfahrens die Phagogramme durchgeführt werden konnten.

Die Krankenhausapotheke qualifizierte 2019 den Herstellungsraum und validierte pharmazeutisches Personal zur aseptischen Herstellung von Phagenzubereitungen. Nach Erhalt der Herstellungserlaubnis durch ITEM konnte 2022 die Herstellungsanweisung der

magistralen Zubereitung finalisiert werden. Auf klinischer Seite erfolgte die Erstellung eines Datenschutzkonzeptes sowie die Beantragung des Ethikvotums bei der zuständigen Ethikkommission (Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Behandlung von Patientinnen und Patienten mit Bakteriophagen bei septischen Infektionen an der unteren Extremität. Das positive Votum erfolgte im Oktober 2020. Im späteren Projektverlauf stellte sich nach der unerwartet späten Bereitstellung der Phagen heraus, dass zur Erreichung der initial festgelegten Fallzahl von 50 Patientinnen und Patienten aufgrund des baldigen Projektendes die Einschränkung auf Infektionen an der unteren Extremität zu groß war. Dem Änderungsantrag auf Ausweitung des Patientenspektrums auf alle Fachrichtungen des Bundeswehrkrankenhauses Berlin ohne Einschränkung auf eine Körperregion wurde im August 2023 stattgegeben.

Nach Erhalt der zur klinischen Anwendung freigegebenen Bakteriophagen gegen *P. aeruginosa* konnte ab April 2023 mit der klinischen Etablierung von Phagogrammen, magistraler Phagenzubereitung und Phagenanwendungen begonnen werden. Die ursprünglich avisierte Fallzahl von 50 Patientinnen und Patienten konnte jedoch nicht erreicht werden. Gründe dafür sind, dass lediglich Phagen gegen *P. aeruginosa* zur Verfügung standen, die begrenzte Suszeptibilität der Patientenisolat gegenüber den drei Phagen sowie die initiale Einschränkung auf die untere Extremität, welche durch den Änderungsantrag im Sommer 2023 aufgehoben werden konnte. Weiterhin zeigte sich, dass die Durchführung von Phagogrammen zusätzlich zur Aufrechterhaltung des Klinikbetriebs die vorhandenen personellen Ressourcen ausreizte. Auf die einzelnen Aspekte wird detaillierter in Kapitel 2.4 eingegangen.

PTmHBP (01VSF18049)

Tabelle 2: Überblick zum zeitlichen Ablauf von Bereitstellung von Phagen und Wirten durch die DSMZ bis zur Abgabe von Phagen-WK (WK) durch ITEM

Name Stamm	DSM Nr.	Übergabe	Name Phage	DSM Nr.	Übergabe	Etablierung Phagenbank	Herstellung Phagenbank	Freigabe Phagenbank	Etablierung WK	Herstellung WK	Freigabe WK	Übergabe WK	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	DSM19880	vor 2019	JG004	DSM19871	02/2020	02,03/2020	02/2022	02/2023	4+7/2022	10/2022	02/2023	02/2023	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	DSM19882	vor 2019	PTLAW1	DSM105275	02/2020	02,03/2020	02/2022	02/2023	4,5,7/2022	12/2022	02/2023	02/2023	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MH 29	DSM22043	09/2020	vB_PaeS_22043_B8_1	DSM110827	09/2020	10,11/2020	02/2022	02/2023	5,6,7/2022	11/2022	02/2023	02/2023	
<i>Staphylococcus aureus</i> BWKH 155	DSM110897	06/2020	vB_SauM_155Rind1	DSM110811	06+08/2020	09/2020	02/2023	N/A	05/2023	06/2023	N/A	N/A	
<i>Staphylococcus aureus</i> MHH 639507	DSM104437	09/2020	EBHT	DSM26856	09/2020	09/2020	02/2023	N/A	03+08,09/2023 3/2024	04,05+10/2023	N/A	N/A	
<i>Staphylococcus aureus</i> BWKH 246	DSM110898	10/2020	vB_SauM_246UKE	DSM110796	10/2020	11,12/2020, 12/2022-02/2023	03/2023	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
<i>Escherichia coli</i> APEC 4507	DSM103263	09/2020	vB_EcoM-G4507	DSM103891	06/2020	09-10/2020	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
<i>Escherichia coli</i> 15085 5679	DSM101139	10/2020	vB_EcoM_WFH	DSM103160	10/2020	11/2020	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
<i>Escherichia coli</i> BWKH 288	DSM111506	10/2020	vB_EcoP_BiBS288	DSM111562	10/2020	01/2021	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
<i>Escherichia coli</i> K12	DSM498	06/2020	vB_EcoM-PTJN4	DSM107656	09/2020	02/2021	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
			vB_EcoS_EASG3	DSM103294	06/2020	01/2022	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
			PT-MM02	DSM29475	06/2020	01-02/2023	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

2.4 Erfahrungen mit der Implementierung/ Maßnahmen

DSMZ: Bereitstellung therapeutisch relevanter Phagen

Aufgabe der DSMZ war die Bereitstellung von Phagen (und deren Wirten) mit therapeutischem Potential zur Behandlung von Infektionen mit den priorisierten Bakterien. Dazu mussten sowohl in der Sammlung bereits hinterlegte Phagen charakterisiert werden als auch neue Phagen isoliert werden. Im Projekt zeigte sich, dass dieser Prozess mit einem großen Zeitaufwand verbunden ist. Zwar konnte aus vorherigen Projekten schon auf eine nennenswerte Sammlung an Phagen gegen *P. aeruginosa* und *E. coli* zurückgegriffen werden, jedoch lagen kaum Phagen gegen *S. aureus* in der Sammlung vor. Die Phagen waren zudem nicht in der notwendigen Tiefe charakterisiert. Eine externe Bereitstellung von Phagen ist nicht erfolgt. Zum Zeitpunkt des Projektes war die Bereitschaft von externen Phagenforschenden, eigene Phagen für dieses Projekt oder die öffentliche Sammlung der DSMZ bereitzustellen, sehr gering. Ein Austausch von Phagen in bereits bestehenden, auch international verorteten Netzwerken wie z.B. das „Phage Directory“ erfolgt nur in Notfällen und ist keine Basis für die Zuteilung von Phagen für ein Versorgungsforschungsprojekt. Zudem variiert der Charakterisierungsgrad von Labor zu Labor erheblich. Jedes Labor führt die Methoden mit leichten Abwandlungen durch, wodurch keine einheitliche Datengrundlage existiert. Dies bezieht sich insbesondere auf die Stammsammlung der Wirte, die zur Bestimmung der Wirtsbereiche eingesetzt werden. Eine Einschätzung, ob ein Phage einer anderen Forschungseinrichtung einen ergänzenden Wirtsbereich aufweist, kann daher durch einen reinen Datenaustausch nicht sicher getroffen werden. Auch erfolgen die Isolationen häufig in studentischen Projekten, bei denen keinerlei qualitätssichernde Maßnahmen implementiert sind.

Als weitere Schwierigkeit wird die Abdeckung der Bakterienstämme angesehen. Es war im Projektzeitraum nicht möglich 100 % der Stämme einer Zielspezies abzudecken. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ähnliche Phagen selbst aus verschiedenen Proben isoliert werden. Die Wahrscheinlichkeit tatsächlich andere Phagen zu isolieren, die eine Abdeckungslücke füllen würden, ist naturgemäß sehr gering. Entsprechend viel „Ausschuss“ wird isoliert und aufwändig charakterisiert, bis festgestellt wird, dass der neu isolierte Phage keinen nennenswerten Vorteil gegenüber bereits bestehenden liefert. Eine Basisabdeckung von etwa 50 % der Stämme war bei den drei priorisierten Zielspezies in einem Zeitraum von etwa sechs Monaten möglich. Der Aufbau einer Phagensammlung mit einer relevanten Abdeckung würde Jahre in Anspruch nehmen. Zudem müsste diese Phagensammlung kontinuierlich angepasst und erweitert werden. Um zumindest für die wichtigsten nosokomialen Erreger Phagensammlungen aufzubauen, zu pflegen und aktuell zu halten, fehlen der DSMZ dafür dezidierte Ressourcen.

Die Infrastruktur dafür ist aktuell nicht vorhanden. Zwar existieren national und international immer mehr Labore, die sich mit der Sammlung und Charakterisierung von Phagen für therapeutische Zwecke beschäftigen, jedoch findet keine übergeordnete Koordination dieser Aktivitäten und zu wenig Austausch von Phagen statt.

ITEM: GMP-Bedingungen bei Herstellung

Aufgabe des ITEMs war die Herstellung von Phagen-WKs und den dafür benötigten starting materials (MCB und MPS) entsprechend der Qualitätsanforderungen, die für die magistrale Zubereitung erforderlich sind. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Phagen-spezifischen Qualitätsanforderungen gab, sollten diese mit den zuständigen Behörden erarbeitet werden. Dabei stellte sich heraus, dass wenig Abstriche an die Qualitätsanforderungen / Anforderungen an Räume, Dokumentation etc. gemacht wurden.

Grundsätzlich stellt es kein Problem dar, Phagen GMP-konform herzustellen. Mit ausreichend Zeit und Geld ist eine Herstellung von Phagen möglich. Die Schwierigkeit liegt vielmehr in der Natur der Phagen. Es ist nicht ausreichend, einen Phagen herzustellen und damit eine Behandlung von beliebigen Infektionen durchzuführen. Aufgrund der hohen Spezifität der Phagen, welche selten über die Speziesgrenze der bakteriellen Wirte reicht, und teilweise sogar stammspezifisch ist, ist es erforderlich eine Vielzahl von Phagen herzustellen. Werden nun jedoch von regulatorischer Seite Anforderungen an die Herstellung gesetzt, die denen von beispielsweise Antikörpern entsprechen, führt der mit einer GMP-Produktion notgedrungen einhergehende Aufwand zu erheblichen Mehrkosten- und einem erheblich höheren Zeitaufwand, was aus Sicht der dieses Projekt Durchführenden zum Scheitern des Vorhabens, Phagen nach magistraler Zubereitung einzusetzen, führen wird.

Selbst in einem bereits etablierten und jahrelang mit der Herstellung geschulten GMP-Betrieb war das Realisieren einer Phagen-Herstellung extrem zeitaufwendig, da die Anforderungen aufgrund fehlender Vorgaben individuell mit den Behörden abgesprochen werden mussten. An diesem Zustand hat sich nur insoweit etwas geändert, dass inzwischen in Deutschland das Fraunhofer ITEM eine Herstellungserlaubnis erhalten hat. National existieren noch immer keine Vorgaben. In einem bestehenden Betrieb Phagen GMP-konform mit an Phagen angepassten Qualitätsanforderungen herstellen zu können, hat sich am ITEM als schwierig zu etablieren erwiesen. Es war nicht möglich, zwei GMP-Systeme mit unterschiedlichen Anforderungen nebeneinander laufen zu lassen, sowohl auf Grundlage der behördlichen Anforderungen als auch aus internen organisatorischen Gründen.

Zwischenzeitlich hatte auch die Europäische Arzneibuchkommission (EPC) sich für die Jahre 2023-2025 die Ausarbeitung von Texten des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur.) zur Standardisierung der Anforderungen an die Bakteriophagentherapie zum Ziel gesetzt. Zunächst wurde ein Dokument zu Bakteriophagentherapie-Arzneimitteln (Kapitel: Phagentherapie-Wirkstoffe und -Arzneimittel für Human- und Tierarzneimittel (Nr. 5.31)) durch die EPC im März 2024 angenommen, was Teil eines neuen allgemeinen Kapitels im Ph. Eur. ist. Dieses soll Anforderungen an die Herstellung und Kontrolle von Phagen-Arzneimitteln liefern. Da in diesem Dokument jedoch viele Freiheiten gelassen werden, wird es für jeden potenziellen Phagen-produzierenden Betrieb erneut nötig sein, mit den zuständigen Behörden die Anforderungen im Detail festzulegen. Der Aufbau neuer Betriebe / Firmen, welche „bei null“ starten, wird vermutlich Jahre in Anspruch nehmen.

Um die Bakteriophagentherapie als Option in die Regelbehandlung aufnehmen zu können, müssen ausreichend Phagen hergestellt werden können. Dabei geht es nicht allein um die Produktion großer Volumina, sondern vielmehr um die Anzahl verschiedener Phagen. Dies bedeutet, dass entweder viele Betriebe die Herstellung ermöglichen müssen oder einige

wenige zentrale Hersteller etabliert werden. Nur weil ITEM inzwischen eine Herstellungserlaubnis innehat, ist trotzdem die Infrastruktur für die Bereitstellung von Phagen nicht gegeben. Zudem wurde die Herstellungserlaubnis behördlich auf die Produktion von Phagen-WKs so weit reglementiert, dass dies nur für das Projekt PhagoFlow mit den im Projekt beteiligten Partnern (DSMZ, ITEM, Bundeswehrkrankenhaus Berlin) möglich ist.

Zwar könnten am ITEM theoretisch weiterhin Phagen-WKs produziert werden, jedoch fehlt es an finanziellen Mitteln dafür. Nach Beendigung des Projektes PhagoFlow müsste die Herstellungserlaubnis bei neuen Beteiligten neu beantragt werden. Es ist bisher nicht geklärt, wie eine Herstellung von Produktchargen vergütet werden sollte.

Eine weitere Herausforderung zeigte sich während der Prozessentwicklung, bei der festgestellt werden musste, dass es nicht möglich sein wird, einen Plattformprozess aufzusetzen, mit dem Phagen-WKs ohne vorherige Etablierungsläufe hergestellt werden können. Der Plattformgedanke konnte lediglich auf die Nutzung der gleichen Geräte, Materialien und Methoden beschränkt werden. Prozessparameter (MOI = Multiplicity of infection / Infektionsdosis, Infektionszeitpunkt, Beladung des Chromatographiematerials etc.) mussten im Vorfeld jeder Herstellung individuell ermittelt werden. Zu verschieden ist das Lyseverhalten der Phagen auf den unterschiedlichen Wirten. Selbst ein Etablierungslauf hat sich im Verlauf des Projektes als nicht immer ausreichend gezeigt, um das Lyseverhalten der Phagen vorherzusagen. Auch mit Hinblick auf die Aufreinigung der Phagen wurde eine große Variabilität der Phagen beobachtet. Auch wenn die Phagen zum Teil morphologisch nicht voneinander zu trennen waren, unterschieden sich die Chromatogramme erheblich. Es zeigte sich, dass die Kapazität der Chromatographie- Säule bei jedem Phagen unterschiedlich ist und experimentell ermittelt werden muss.

Obwohl es sich gezeigt hatte, dass eine gewisse Etablierung vor jeder Phagenherstellung erforderlich ist, um den Prozess planbar zu gestalten, wurden die Etablierungszyklen auf ein Minimum beschränkt. Bei der Herstellung war es erforderlich schon im Vorfeld in der Herstellungsanweisung Grenzen zu setzen, in denen sich der Prozess bewegen durfte (z.B. Definition von OD-Werten (Optische Dichte), die als Erntekriterium dienen). Die Etablierung wurde beendet, sobald mit einem ausreichend hohen Titer ($>1E9$ PFU/mL) und einer Abtrennung von Prozess-bedingten Verunreinigungen zu rechnen war. Dies bedeutet, dass bewusst nicht das Ziel verfolgt wurde, einen maximal hohen Titer und maximal von Verunreinigungen befreites Produkt zu erhalten, sondern das Zeitintervall für die Prozessetablierung möglichst klein zu halten. Bei der Herstellung der Phagen gegen *P. aeruginosa* war dieses Vorgehen erfolgreich. Bei der Herstellung von *S. aureus*-Phagen musste jedoch festgestellt werden, dass die Erfahrungen aus den Herstellungen von Phagen gegen die höchstpriorisierte Spezies nicht ausreichten, um freigabefähige Phagen-WKs herzustellen. Die Phagen zeigten bei der zweiten Diafiltration einen hohen, bisher nicht erklärbaren Verlust. Eine detaillierte Betrachtung dieses Prozessschrittes wäre demnach erforderlich gewesen, konnte jedoch im Rahmen des Projektzeitraums nicht mehr realisiert werden.

Durch die Notwendigkeit der Einhaltung von Vorgaben in Bezug auf Monitoring von Wasser- und Luftqualität war eine flexible Planung der Produktionschargen nicht möglich. Diese mussten mindestens zwei Monate im Vorfeld für die Einteilung von Personal für die Reinigung, das Monitoring und die Herstellung sowie die Raumbelagung definiert werden. Grund für den

hohen Koordinierungsaufwand ist, dass zwar für den eigentlichen Herstellungsprozess ein dezidiertes Phagenraum eingerichtet wurde, jedoch die Vorbereitungen (Ansetzen von Puffern, Spülen von Materialien und Autoklavieren) in Räumlichkeiten der GMP-Anlage erfolgten, die auch für andere Herstellungskampagnen genutzt werden muss. Im Vorfeld jeder Herstellung muss in einer Risikoanalyse das Risiko von parallelen und vorausgegangenen Arbeiten in den verwendeten Räumen hinsichtlich beispielsweise der Kontamination mit anderen Produkten (vorheriger Chargen) oder der Verwechslung der eingesetzten Rohstoffe (parallele Chargen) beurteilt werden und Maßnahmen zur Reduktion des Risikos definiert werden.

Zudem schränkten die GMP-Anforderungen die Flexibilität ein, kurzfristig andere Medien für die Kultivierung bzw. andere Pufferzusammensetzungen bei der Chromatographie und Diafiltration auszutesten. Jeder verwendete Rohstoff (gleiches gilt für Hilfsmittel etc.) musste beim ITEM spezifiziert sein und im Vorfeld der Herstellung freigegeben werden. Dies beinhaltete zum Teil eine externe Identitätstestung nach monographierten Vorgaben. Für die Umstellung eines Rohstoffes wären zwei bis drei Monate Vorlaufzeit nötig gewesen. Aus diesem Grund wurde versucht, die Herstellung möglichst mit identischen Materialien durchzuführen.

Ein weiterer Faktor bei der Implementierung sind die bei der Herstellung entstehenden Kosten. Diese werden aus Erfahrungen im Projekt auf 250.000 € pro Phagen-WK geschätzt. Etwa 15 % der Summe sind für Verbrauchsmaterialien und Rohstoffe zu rechnen, weitere 15 % beinhalten in etwa die Kosten für die Freigabeanalytik und die restlichen Kosten beinhalten die Bereitstellung der Infrastruktur sowie Personalkosten. Diese Kosten beinhalten jedoch keine vorherigen Etablierungsarbeiten. Bei der ersten Herstellung eines Phagen werden demnach höhere Kosten zu veranschlagen sein, bei einer Nachproduktion wird jedoch die genannte Aufsummierung korrekt sein. Berücksichtigt man jedoch, dass ausgehend vom Ausgangstiter ($\sim 1E10$ PFU/mL) und der zu verabreichenden Dosis mit einer Charge bis zu 1000 Patienten behandelt werden können, liegen die Kosten pro Therapie in einem akzeptablen Rahmen. Diese Angabe setzt voraus, dass bei einem Patienten insgesamt eine Phagendosis von $1E11$ PFU basierend auf dem Produktionstiter eingesetzt wird. Die Anzahl an möglichen Behandlungen fällt in der Regel um den Faktor 10 niedriger aus, wenn die Phagenzubereitung auf den Wirktiter eingestellt wird. Bei dem Wirktiter handelt es sich um die Konzentration aktiver Phagen auf dem Patientenstamm, welcher vom Titer auf dem Produktionswirt abweichen kann. In diesem Projekt erfolgte die Herstellung in einem 10 L Maßstab. Eine 10-fache Skalierung ohne wesentliche Änderungen im Kostenrahmen und Prozessablauf, wurden zwar nicht experimentell durchgeführt, werden aber als durchaus realistisch eingeschätzt.

Mikrobiologie: Umsetzbarkeit der Phagogramme im klinischen Alltag

Das im Projektrahmen beschaffte Analysesystem Curetis Unyvero® zur Identifizierung schwer kultivierbarer Erreger und ihrer wichtigsten Resistenzeigenschaften direkt aus Untersuchungsmaterial konnte nach einem umfassenden Verifizierungsprozess in der Routinediagnostik etabliert werden.

Die für eine Phagentherapie infrage kommenden Bakterien stammen aus der mikrobiologischen Routinediagnostik und können von jedem mikrobiologischen Labor bereitgestellt werden. Der Durchführung von Phagogrammen zur Ermittlung des Phagentiters

auf Patientenisolaten liegt ein simples und zugleich handwerklich aufwendiges Verfahren zugrunde, welches jedoch keine Standardmethode der klinischen Mikrobiologie ist. Die Abteilung für Mikrobiologie etablierte und verwendete zwei gängige Methoden zur Suszeptibilitätstestung, die Double-Layer-Methode und den Spot Assay. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Die Double-Layer-Methode bietet eine sehr hohe Genauigkeit der Titerbestimmung auf Kosten eines höheren Zeit- und Materialaufwandes. Sie wurde im Rahmen dieses Projektes vorrangig eingesetzt. Die Spot-Methode spart Zeit und Material auf Kosten einer geringeren Genauigkeit des Phagentiters.

Im Projektverlauf stellte sich heraus, dass die regelmäßige Durchführung der aufwendigen Phagogramme zusätzlich zum regulären Klinikbetrieb eine Herausforderung darstellte. Der Umgang mit einer Vielzahl von Nährmedien mit unterschiedlichen Phagen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen erfordert ein hohes Maß an Konzentration und kann im Labor nicht nebenbei erledigt werden. Das Übersichten stellte sich als Tätigkeit heraus, die ein hohes Maß an manueller Geschicklichkeit erfordert, um ein gleichmäßiges Ergebnis zu erhalten, und auch im Verlauf nicht von allen Mitarbeitenden beherrscht wurde.

So konnten maximal ein bis zwei Phagogramme pro Woche realisiert werden, da jedes Phagogramm ca. drei Stunden Bearbeitungszeit benötigte. Der Zeitaufwand vom Eingang des Untersuchungsmaterials bis zum Vorliegen des Phagogramms beträgt mindestens vier Tage, im Durchschnitt sieben Tage. Es bedurfte der Schulung mehrerer Angestellter, um die Anfragenlast im Projektrahmen stemmen und Krankheits- und Urlaubszeiten kompensieren zu können. Das gesetzte Ziel Phagogramme direkt im Anschluss an die Erreger- bzw. Resistenzbestimmung durchzuführen, konnte folglich nicht erreicht werden. Um dies realisieren zu können, bedarf es allen voran zusätzlicher personeller Ressourcen, die speziell für diese Aufgaben geschult sind.

Apotheke: Herstellung patientenindividueller Phagenzubereitungen

Die Herstellung von Phagenpräparaten stellt eine Herausforderung dar, da Phagen biologische Produkte sind und ihre Produktion spezifische Bedingungen erfordert. Die Phagen werden nach strengen GMP-Standards produziert. Dabei müssen die Reinheit, Stabilität und Wirksamkeit der Phagen sichergestellt werden. Ein wesentlicher Aspekt der Implementierung ist die Sicherstellung einer konstanten Qualität der Phagenzubereitungen. In Deutschland gibt es keine spezifischen Zulassungswege für Phagenpräparate. Dies bedeutet, dass Phagen oft im Rahmen von Ausnahmegenehmigungen oder experimentellen Programmen eingesetzt werden. Im Rahmen des Projektes haben wir dabei die Erfahrung gemacht, dass es notwendig ist, eng mit den Regulierungsbehörden zusammenzuarbeiten, um individuelle Genehmigungen zu erhalten. Hier hat das "Magistralpräparat"-Konzept (Herstellung individueller Rezepturen) als rechtlicher Rahmen gedient, was jedoch die großflächige Anwendung einschränkt.

Die Entwicklung und Herstellung nicht als Arzneimittel zugelassener einzelner Phagen-WK kann bei bereits zur Verfügung stehender Infrastruktur auch unter GMP-Bedingungen durchaus kosteneffizient gestaltet werden. Um jedoch das breite Erregerspektrum von Patienten abdecken zu können, sind aufgrund des engen Wirtsspektrums von Phagen zur Zubereitung patientenindividueller Mischungen sehr viele einzelne Phagen-WK notwendig. Daher stellt sich der Aufbau einer suffizienten Sammlung klinisch einsetzbarer Phagen-WK als

teuer und aufwendig dar. Dies hat dazu geführt, dass pharmazeutische Unternehmen vorsichtig mit ihren Investitionen in diesen Bereich sind, da die Marktdurchdringung und Rentabilität noch ungewiss sind. Erfahrungen aus Ländern wie Georgien, wo Phagen traditionell eingesetzt werden, zeigen jedoch, dass eine kosteneffiziente Produktion (nicht GMP-Standards folgend) möglich ist. Die Präparate sind jedoch nur für oralen oder lokalen Gebrauch gedacht.

Ein weiterer Aspekt der pharmazeutischen Erfahrung mit der Phagen-Therapie ist die Entwicklung geeigneter Formulierungen und Verabreichungssysteme. Phagen können topisch an verschiedenen Applikationsorten verabreicht werden, aber jede Methode erfordert spezifische Formulierungen, um die Stabilität und Wirksamkeit der Phagen sicherzustellen. Auch wird es sinnvoll sein, mit unterschiedlichen Darreichungsformen zu experimentieren.

Phagenzubereitungen erfordern spezielle Lagerbedingungen, um ihre Wirksamkeit zu erhalten. Es gibt Erfahrungen, dass Phagen bei tiefen Temperaturen stabil bleiben, jedoch gibt es auch Phagen, die bei Raumtemperatur über einen gewissen Zeitraum stabil bleiben können. Dies stellt eine Herausforderung für die Logistik in der klinischen Anwendung dar, insbesondere in Krankenhäusern ohne spezialisierte Lagerkapazitäten.

Die erfolgreiche Implementierung der Bakteriophagentherapie erfordert eine enge Zusammenarbeit zwischen Apotheke, Klinik und Mikrobiologie. Wir haben die Erfahrung gemacht, dass die Einbindung der Ärzte und Mikrobiologen entscheidend ist, um die richtige Phagenauswahl und -anwendung zu gewährleisten.

Aus pharmazeutischer Perspektive bietet die Implementierung der Bakteriophagentherapie sowohl große Chancen als auch erhebliche Herausforderungen. Die Erfahrungen zeigen, dass die Herstellung und Qualitätssicherung technisch machbar sind, jedoch regulatorische Hürden und wirtschaftliche Unsicherheiten überwunden werden müssen. Die Zusammenarbeit mit klinischen Einrichtungen und die kontinuierliche Forschung sind entscheidend für den Erfolg der Bakteriophagentherapie. Langfristig könnte eine stärkere Integration dieser Therapieform in die medizinische Praxis zu einem wichtigen Baustein im Kampf gegen Antibiotikaresistenzen werden.

Klinische Anwendung der Phagenzubereitungen

Aus klinisch-administrativer Perspektive zeigte sich, dass das Management der vielen Anfragen sowohl von Patientinnen und Patienten als auch von ärztlichen Kolleginnen und Kollegen zeitintensiv ist. Die Gründe werden vor allem in der Komplexität der Erkrankungen der Betroffenen gesehen, da die Entscheidung für einen individuellen Heilversuch sowie das Eruiereiner sinnvollen Umsetzbarkeit einer Bakteriophagentherapie erst auf Grundlage intensiver Auseinandersetzung mit den einzelnen Fällen erfolgen kann. Hinzu kommt für die Behandlungsplanung und -durchführung die Ressourcenbindung von Personal und Betten zusätzlich zum klinischen Alltagsbetrieb.

Die besondere Form des Forschungsprojektes als Praktikabilitätstestung ermöglichte, jeden einzelnen Patienten im Sinne der personalisierten Medizin behandeln zu können und somit auf die Besonderheiten der jeweiligen Erkrankung einzugehen. Dazu zählen auch die Wahl der Dosierung, Häufigkeit und Dauer der Bakteriophagentherapie. Eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Behandlungen ist dadurch jedoch nicht möglich.

Weiterhin war von Vorteil, dass es für dieses Projekt ausreichend war, einmalig das positive Ethikvotum für die gesamte Fallserie einzuholen. Für Behandlungen außerhalb der Fallserie wäre es im Zweifelsfall sinnvoll und notwendig mindestens das hausinterne Ethikkomitee anzufragen, was fallabhängig unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nehmen kann.

Eine Herausforderung stellte die Frage der Kostenabrechnung der Behandlungen dar, da bisher keine DRG (Diagnosis Related Group) – Fallpauschale für die Bakteriophagentherapie existiert. Da die vergleichsweise hohen Kosten für die Herstellung der Phagen-WK, die Durchführung von Phagogrammen und die Zubereitung patientenindividueller Mischungen durch Finanzmittel des Forschungsprojektes gedeckt waren, betraf die Finanzierungsfrage lediglich die klinische Anwendung. Für jeden Einzelfall wurde eine individuelle Lösung erarbeitet, wobei die Patientinnen und Patienten keine Zuzahlung leisten mussten. Eine nachhaltigere Lösung wie bspw. die Beantragung eines Entgeltes für neue Untersuchungs- und Behandlungsmethoden (NUB-Entgelt) wurde angestoßen, jedoch konnte bis zum Projektabschluss noch kein Ergebnis erzielt werden. Die Thematik der Finanzierung wird in Kapitel 5 näher diskutiert.

Die im Projekt angestrebte Fallzahl von 50 behandelten Patientinnen und Patienten konnte nicht erreicht werden. Der Hauptgrund ist der erheblich gekürzte Behandlungszeitraum aufgrund der sehr späten Zulieferung der drei Phagen Ende Februar 2023. Aufgrund notwendiger Validierungsprozesse konnte der nachfolgende Einsatz der Phagen erst ab Mai 2023 erfolgen, sodass der tatsächliche Behandlungszeitraum lediglich elf Monate betrug. Im ursprünglichen Projektplan waren mindestens 18 Monate angedacht. Die initiale Einschränkung auf Infektionen an der unteren Extremität verkleinerte zunächst die Auswahl möglicher Patienten, konnte jedoch durch den Änderungsantrag im Sommer 2023 aufgehoben werden. Zum klinischen Einsatz standen lediglich drei Phagen gegen *P. aeruginosa* zur Verfügung, wodurch nur ein kleiner Teil der eintreffenden Anfragen in Betracht gezogen werden konnte. Die durchgeführten Phagogramme zeigten zusätzlich eine eingeschränkte Suszeptibilität der Patientenisolat gegenüber den drei Phagen, sodass ein Behandlungsversuch bei einem noch kleineren Anteil an Patienten überhaupt sinnvoll erschien. Weiterhin stellte die unmittelbare Durchführung von Phagogrammen nach Isolation der Erreger wiederholt eine personelle Herausforderung dar, da zur Gewährleistung der Prozessqualität ausschließlich speziell geschultes Personal notwendig war, welches diese Leistung zusätzlich zur hohen Arbeitslast des klinischen Alltagsbetriebes erbringen musste.

2.5 Rechtsgrundlage

In der Europäischen Union werden Bakteriophagen für die therapeutische Anwendung am Menschen gemäß der EU-Richtlinie 2001/83/EC als biologische Arzneimittel eingestuft. Daher ist für den Marktzugang eines Bakteriophagen-Arzneimittels grundsätzlich eine Herstellungserlaubnis und eine Zulassung durch die verantwortlichen Behörden erforderlich.

Die Herstellung von Arzneimitteln im Sinne der EU-Richtlinie 2001/83/EC hat in Übereinstimmung mit den Richtlinien (ICH-Guidelines, EurdaLex - GMP-Guidelines) zur Guten Herstellungspraxis (GMP) zu erfolgen mit dem Ziel die Sicherheit, Wirksamkeit und gleichbleibende Qualität des Produktes sicherzustellen. Zu Beginn des Projektes existierten keine Bakteriophagen-spezifischen nationalen oder internationalen Vorgaben zu GMP-Anforderungen, auch wenn in verschiedenen Publikationen Anforderungen für die Herstellung

von Phagen für therapeutische Zwecke postuliert wurden (Pirnay et. al 2015, Pirnay et. al 2018, Bretaudeau et. al 2020). Entsprechend gelten allgemeingültige Vorgaben zu Kontrolle der Roh- und Verbrauchsmaterialien, Schulung der Mitarbeitenden, Qualifizierung und Wartung von Geräten, Qualifizierung und Monitoring der GMP-Anlage (z.B. Raum, Wasser), Kontrolle des Herstellungsprozesses und der Methoden zur Qualitätskontrolle sowie die behördliche Inspektion für die Herstellung (GMP Navigator, GMP-Verlag Peither).

Gemäß Artikel 3 der EU-Richtlinie 2001/83/EC und §13(2) des deutschen Arzneimittelgesetzes (AMG) bedarf es keiner Herstellungserlaubnis für Apotheken sofern diese als sog. Magistrale Formulierung erfolgen. Weiterhin bedarf es gemäß §13(2b) AMG keiner Herstellungserlaubnis für Ärzte, sofern die Arzneimittel unter deren unmittelbaren fachlichen Verantwortung zum Zwecke der persönlichen Anwendung bei einem bestimmten Patienten hergestellt werden. Diese Zubereitungen müssen gemäß § 55(8) AMG nach anerkannten pharmazeutischen Regeln hergestellt werden. Zu Beginn dieses Projektes gab es in Deutschland keine spezifische Regelung für Phagen, welche Standards erfüllt sein müssen. Gemäß §67 AMG sind die zuständigen Behörden über die Herstellung zu informieren.

Die klinischen Anwendungsmöglichkeiten für Bakteriophagen in Deutschland umfassen aktuell zum einen das Compassionate-Use-Programm (gemäß EU-Richtlinie 726/2004, Artikel 83), das in Härtefällen den Einsatz von Phagen als Arzneimittel, die sich noch in klinischen Studien oder im Zulassungsverfahren befinden, unter Zustimmung nationaler Behörden ermöglicht. Zum anderen bietet die o.g. magistrale Zubereitung eine personalisierte Therapieform, bei der Phagen für einzelne Patienten hergestellt werden. Der Individual Treatment Trial im Sinne des Artikels 37 der Deklaration von Helsinki erlaubt es Ärzten, im Rahmen der Behandlungsfreiheit Bakteriophagen auch ohne Genehmigung einzusetzen. Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden die Patienten ausnahmslos als Individueller Heilversuch behandelt.

3 Methodik

Beim Projekt PhagoFlow handelt es sich um eine Praktikabilitätstestung. Es sollen die Prozesse, infrastrukturelle und rechtliche Rahmenbedingungen zur Herstellung von Bakteriophagen in Deutschland sowie deren klinische Anwendung im Sinne einer Fallserie erprobt werden. Da die Erprobung und Umsetzung der Herstellung von Bakteriophagen einen umfangreichen Teil dieses Projektes darstellen, soll im Folgenden zunächst die Methodik dessen erläutert werden. Im Anschluss wird auf das Design der klinischen Fallserie eingegangen.

Isolation, Charakterisierung und Auswahl von Phagen und Produktionswirten (DSMZ)

Die Charakterisierung der Stämme erfolgte durch die DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Eine Sequenzierung erfolgte bei Stämmen, die für die Herstellung ausgewählter Phagen in Betracht kamen. Sequenzbasiert erfolgte eine Vorhersage von Antibiotikaresistenzen, Virulenzfaktoren und Prophagen (Sequenzen siehe <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Das Vorhandensein dieser Faktoren führte nicht zu einem Ausschluss der Stämme als Produktionswirte, da es faktisch keine geeigneten Wirte gibt, bei denen diese Faktoren ausgeschlossen werden können. Es

erfolgte lediglich eine Listung der identifizierten Gene / Prophagen. Details zur Methodik sind der Anlage 22 zu entnehmen.

Zudem erfolgte die Auswahl der Phage-Wirt-Paare aus prozesstechnischen Gründen hinsichtlich der lytischen Effizienz, eine inkomplette Lyse auf dem Produktionswirt während der Kultivierung hätte zu einer Verblockung der Filter bei der Ernte der Phagenlysate geführt, da sich die Poren der Filter mit Zellmaterial blockiert werden.

Phagen wurden hinsichtlich ihres Wirtsbereiches ausgewählt, was eine der wichtigsten Entscheidungsgrundlagen dafür war, ob der Phage für die GMP-Herstellung ausgewählt wurde. Nur Phagen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit der klinischen Anwendung wurden in diesem Projekt ausgewählt. Vor der Auswahl musste jedoch sequenzbasiert ausgeschlossen werden, dass der Phage Träger von Virulenzfaktor- / Antibiotikaresistenzgenen ist und einen lysogenen Zyklus durchlaufen kann (Sequenzen siehe <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Metadaten wie die Herkunft / Historie und Klassifizierung wurden dokumentiert. Bei der Auswahl der Phagen gegen eine Zielspezies wurde zum einen darauf geachtet, dass eine möglichst große Gesamtabdeckung des Stämmepanels realisiert wird und aufgrund ihrer Diversität auf Genomebene die Nutzung unterschiedlicher Rezeptoren wahrscheinlich ist. Details zur Methodik sind dem Anhang 23 zu entnehmen. Ergebnisse der Charakterisierung wurden in einem Phagendatenblatt zusammengestellt (Vorlage s. Anlage 23).

Herstellung, und Freigabe von Phagen-WKs (ITEM)

Das Produkt Bakteriophagen-Wirkkomponente bestand aus einer aufgereinigten Phagenlösung, die final manuell als aufgereinigter Bulk abgefüllt wird. Die Wirkkomponente stellt das Endprodukt dieser Prozesskette dar, welches im Rahmen des Projektes „PhagoFlow“ allein oder mit weiteren Phagen-Wirkkomponenten Bestandteil einer Phagen-Präparation, die durch die Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses Berlin kurz vor Verabreichung steril und patientenspezifisch als magistrale Zubereitung hergestellt wird. Die Herstellungssequenz einer Phagen-WK beinhaltet zunächst die GMP-konforme Herstellung der Masterzellbank (MCB) sowie des Masterphagenstocks (MPS) (=Starting materials) aus Einzel-Kolonie bzw. Einzel-Plaques (Abbildung 1), gefolgt von der Kultivierung Bakterien, Infektion mit Phagen, deren Vermehrung und Ernte des Lysats im USP (Upstream processing) zur Herstellung des zellfreien Phagenlysats (PL) und die Aufreinigung und Umpufferung der Phagenlösung im DSP (Downstream processing) sowie die manuelle Abfüllung als purified Bulk in Flexboy-Bags (4 x 2,5 L bzw. 10 L) (Abbildung 2). Nach der Herstellung folgte die Freigabeproofung der MCB, MPS und Phagen-WK, bei der die Einhaltung der gesetzten Spezifikationen in Hinblick auf Identität, Reinheit und der Gehalt jedes Produkts bestätigt werden musste. Für die Phagen-WKs wurde zudem eine on-going Stabilität durchgeführt. Details zur Methodik sind der Anlage 22 zu entnehmen.

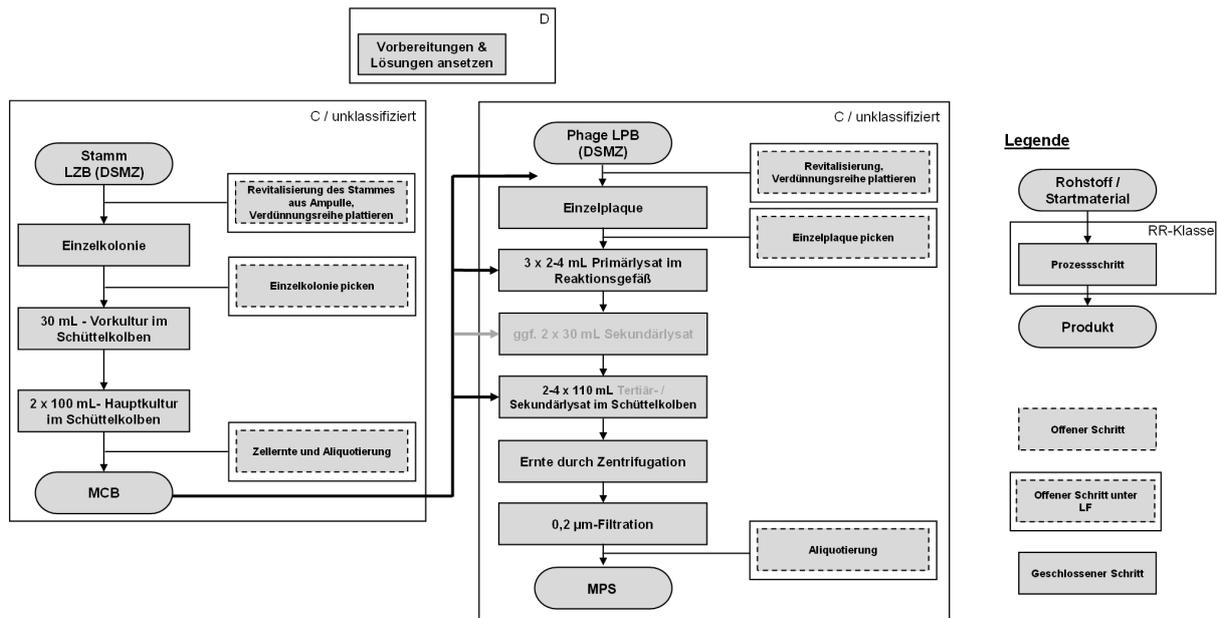


Abbildung 2: Fließschema zur Herstellung der MCB (links) und MPS (rechts).

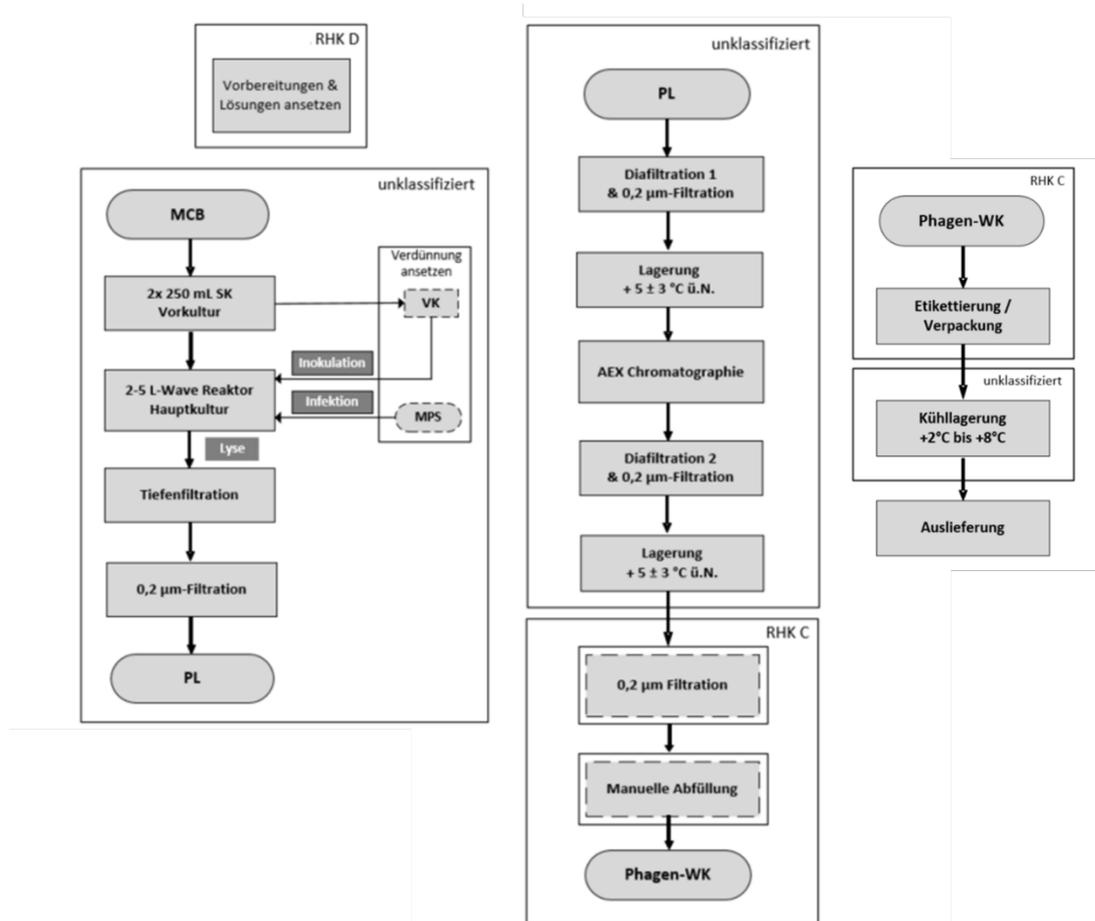


Abbildung 3: Fließschema zur Herstellung von Phagenlysats (PL) (links), Phagen-WK (Mitte) sowie die Etikettierung und Lagerung der Phagen-WK bis zur Auslieferung (rechts)

Klinische Praktikabilitätstestung / Fallserie

Die Zielpopulation der klinischen Fallserie stellten Patientinnen und Patienten mit Infektionen bzw. Erkrankungen mit multiresistenten oder difficult to treat Erregern dar. Dabei wurde keine Einschränkung bezüglich der Lokalisation der Infektion gemacht. Da es sich explizit nicht um eine klinische Studie handelte, wurden keine Ein- und Ausschlusskriterien definiert, sondern lediglich Kriterien für die Teilnahme bzw. Nicht-Teilnahme.

Kriterien für die Teilnahme:

- Alter über 18 Jahre
- Infektion mit einem multiresistenten (3 MRGN / 4 MRGN) oder difficult to treat Erreger (als „difficult to treat“- Erreger werden Bakterien angesehen, bei denen für eine Infektbehandlung bei Vorliegen einer Fremdkörper-assoziierten Infektion keine Biofilm-aktive antimikrobielle Substanz zur Verfügung steht oder kein bioverfügbares orales Antibiotikum vorliegt und daher eine erforderliche orale Langzeittherapie nicht möglich wäre
- Mono- oder polymikrobieller Erregernachweis
- Phagogramm hat positive Lysen und damit passende Phagen ergeben

Kriterien für die Nicht-Teilnahme:

- Pilzinfektion, Virus- oder parasitäre Infektion ohne gleichzeitigen bakteriellen Erregernachweis
- Gravidität
- Fehlender informed consent

Die Rekrutierung der Patientinnen und Patienten, die oben genannte Kriterien erfüllen, erfolgte aus dem Patientenkollektiv des Bundeswehrkrankenhauses Berlin, das Anschreiben septisch-chirurgischer Kliniken deutschlandweit und mittels Initiativanfragen von Patientinnen und Patienten sowie von behandelnden Ärztinnen und Ärzten. Die Kommunikation mit potenziellen Phagenpatientinnen und -patienten wurde durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin koordiniert. Potenzielle Patientinnen und Patienten wurden gebeten, ein Übersichtsformular auszufüllen, in welchem neben Kontaktdaten, Infektionsart, Infektionsort, bekannte bakterielle Erreger, relevante Historie sowie vorhandene Vorbefunde (z.B. AntibioGramme) erhoben wurden (s. Tabelle 3). Als relevante Erreger für den Trigger „Aufnahme in die Fallserie“ galten multiresistente Erreger (3 MRGN / 4 MRGN) oder difficult to treat Erreger, für die Bakteriophagen im Rahmen des Projektes zur Verfügung stehen. Traf dies auf Aktenlage zu, wurden detaillierte Vorbefunde (z.B. radiologische Diagnostik, Arztbriefe) angefordert oder sofern möglich, die Patienten zu einem ambulanten Vorstellungstermin eingeladen, um ein detailliertes Bild für die weitere Entscheidungsfindung erhalten zu können. Sofern die Gewinnung von Gewebeproben zur Erregerbestimmung und -isolierung mit zusätzlichen invasiven bzw. risikobehafteten Eingriffen (bspw. Punktionen / Operationen der Hüfte oder des Knies) einhergegangen wäre, die nicht ohnehin im Behandlungsplan vorgesehen waren, wurde sich gegen eine Aufnahme in die Fallserie entschieden. Weiterhin wurde bspw. im Fachbereich HNO festgelegt, dass das Intakt sein des

Trommelfells bei Anwendung im äußeren Gehörgang ein Teilnahmekriterium ist. Alle Entscheidungen beruhten jeweils auf einer fachärztlichen Einzelfallentscheidung.

Sofern ein Patient eine Infektion mit einem Erreger hatte, für den Bakteriophagen verfügbar sind, die oben genannten Teilnahmekriterien erfüllt waren (insb. difficult to treat Infektionen, langfristige nicht erfolgreiche Standard-/Antibiotikatherapie, nicht oder stark eingeschränkte Einsetzbarkeit von Antibiotika bspw. aufgrund von Allergien) und sich im Einzelfall fachärztlich für den Versuch einer Bakteriophagentherapie ausgesprochen wurde, wurde die Entscheidung für die Durchführung eines Phagogrammes getroffen. Wurde im Phagogramm eine mittlere bis gute Suszeptibilität des Patientenisolates gegenüber den Phagen festgestellt, wurde auf fachärztlicher Ebene zusammen mit den Patienten über die Art der möglichen Behandlung entschieden. In der Entscheidungsfindung spielten u.a. Faktoren wie die Zugänglichkeit des Infektionsortes für die Bakteriophagen, individuelle Faktoren, die den Therapieerfolg beeinflussen könnten (z.B. anatomische Besonderheiten), ggf. zusätzlich notwendige medizinische Interventionen sowie organisatorische Aspekte wie die Transportfähigkeit eine Rolle. Die Dosisfestlegung und ärztliche Anforderung der Bakteriophagenzubereitung erfolgte in Absprache mit der Krankenhausapotheke (s. Anlage 16). Eine Randomisierung und Verblindung im Rahmen der Behandlung erfolgte nicht. Zusätzlich wurde eine antimikrobielle Therapie in enger Absprache im Sinne des Antibiotic Stewardship-Konzeptes (vgl. AWMF-S3-Leitlinie 092/001 „Strategien zur rationalen Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus, 15.12.2013) mit der hauseigenen Abteilung für Mikrobiologie nach der ersten Gewebeprobengewinnung kalkuliert begonnen, sofern eine akute Antibiotikatherapie notwendig und möglich war. Nach Kenntnisnahme des Antibiogramms wurde die Antibiose bei Bedarf umgestellt.

Als primäre Zielgröße wurde der Zeitpunkt des Beginns der Anwendung magistraler Zubereitungen nach initialer Gewebeprobengewinnung gewählt. Als Erhebungsinstrument dienten die Daten aus mikrobiologischen Dokumenten (Tag Gewebeprobenentnahme) und dem Krankenakteintrag (Tag Beginn der Therapie). Detaillierte strukturelle Daten des Herstellungsprozesses (s. Tabelle 3) wurden zusätzlich der Herstellungsdocumentation der Apotheke entnommen. Sekundäre Zielgrößen waren die Ergebnisse der Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen (Phagogramm) sowie die Anzahl der hergestellten Phagen nach Vorgaben der Klinik und der Phagenbank. Die Ergebnisse der Suszeptibilitätstestung wurden den Phagogrammen entnommen. Die genannten Zielgrößen wurden mit den Mitteln der Deskription beschrieben. Die Datenerhebung erfolgte prospektiv.

Die angestrebte Fallserien-Größe wurde auf 50 Patientinnen und Patienten festgelegt. Die Schätzung erfolgte auf Basis der Anzahl der für dieses Projekt relevanten Erreger (gesellschaftliche Bedeutung), der Anzahl der erforderlichen Bakteriophagen zur Behandlung dieser Erreger (fachliche Bewertung) sowie der Anzahl der potentiell behandelbaren Patienten (Realisierbarkeit des Projektdesigns). Die Anzahl der klinisch relevanten Erreger (Multiresistenzen, difficult to treat) betrug im Zeitraum 2015 bis 2017 im Bundeswehrkrankenhaus Berlin über 300 Isolate. Daher war davon auszugehen, dass 50 Patientinnen und Patienten in einem Zeitraum von ca. 1,5 - 2 Jahren in das Projekt aufgenommen werden könnten.

Da die tatsächliche Behandlung der Patientinnen und Patienten im Rahmen individueller Heilversuche folgte, wurden die entsprechenden Behandlungsdaten der Bakteriophagentherapie (z.B. Dauer der Anwendung, Applikationsform, Dosis, Frequenz, klinischer Verlauf, Nebenwirkungen usw.) im Sinne der Deklaration von Helsinki § 37 dokumentiert. Da die Arbeitshypothesen und daraus abgeleitete Zielgrößen des Projektes diese Parameter jedoch nicht umfassen, findet im Weiteren keine nähere Betrachtung dieser Daten statt.

Tabelle 3: Überblick der zu erhebenden Daten im Projekt PhagoFlow

Patientendaten	Initialen des Patienten, Geschlecht, Alter
Klinische Daten	Diagnose Lokalisation der Infektion, Wunde, Verletzung oder Verwundung (inkl. Bildmaterial) Ursache der Wunde/Verletzung/Infektion Dauer der Infektion/Wunde vor erster Behandlung Komorbiditäten Art der bisherigen Therapie (Art, Dosierung und Dauer der antimikrobiellen Therapie), Erfolg der bisherigen Therapie Nachgewiesene Erreger
Behandlungsdaten	Zeitpunkte der therapeutischen Maßnahmen zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns im BwKrhs Berlin Erreger-Besiedelung und aktuelles Ergebnis der Resistenztestung Dosis und Frequenz der Bakteriophagentherapie Dauer und genaue Art der Durchführung der Bakteriophagentherapie Epidemiologische Daten: Klinischer Verlauf, Monitoring der mikrobiologischen Infekt-/Wundsituation im Behandlungsverlauf Nebenwirkungen (Allergien, Schmerzen, Intoleranzen)
Strukturelle Daten Herstellungsprozess	Zeitpunkt der Identifizierung und Charakterisierung des relevanten Infektionserregers (einschließlich Befundübermittlung) Zeitpunkt, Ergebnis und zeitlicher Aufwand für die Suszeptibilitätstestung des nachgewiesenen bakteriellen Erregers gegenüber den möglicherweise wirksamen Phagen (Phagogramm, anhand verfügbarer gereinigter Phagen). Jedes Phagogramm-Ergebnis wird digital bilddokumentiert Dokumentation der Auswahl der identifizierten Bakteriophagen Zeitpunkt der Verschreibung der magistralen Phagenzubereitung Zeitpunkt der Erstellung der magistralen Phagenzubereitung

	<p>Zeitpunkt der ersten lokalen und oralen Anwendung der Bakteriophagen (BP)</p> <p>Dauer der Herstellung eines Monophagenwirkstoffes</p> <p>Art der Phagenlokalisierung (Phagenbank), Quellen von bzw. Bereitstellungswege der Phagen</p> <p>Anforderungen an die Dokumentation der Bakteriophagen-Herstellung</p> <p>Dauer der Bereitstellungsmöglichkeit des Monophagenwirkstoffes nach erster Gewebeprobenentnahme</p>
Erhebungsinstrumente	<p>Auswertung der Krankenakte</p> <p>Ggf. zusätzliche Anamnese, Fremdanamnese, Analyse vorliegender Röntgenbilder</p> <p>Ggf. Konsiluntersuchungen zur Präzisierung von Komorbiditäten</p> <p>Mikrobiologische Analyse einschließlich Antibiotogramm</p> <p>Ergebnis des Phagogramms</p>
Zeitpunkte der Datenerhebung	<p>Vorgeschichte-Erhebung bei stationärer Aufnahme</p> <p>Mikrobiologisches Screening (Kolonisation) aus dem Wundgebiet und wiederholt bei Nachfolge-Operationen</p> <p>T0 = Zeitpunkt der ersten Gewebeprobeentnahme (Null)</p> <p>TMB = Zeitpunkt der Festlegung (mikrobiologische Befundung) auf den ursächlichen Erreger</p> <p>TI = Zeitpunkt der Festlegung des oder der angenommen wirksamen Phagen (Identifikation)</p> <p>TP = Zeitpunkt des „Phagogramms“ und Festlegung der tatsächlich wirksamen Monophagenwirkstoffe</p> <p>TR = Zeitpunkt der Festlegung der Rezeptur der erforderlichen Phagenzubereitung</p> <p>TM = Zeitpunkt der Freigabe der magistralen Zubereitung durch die Apotheke</p> <p>TT1 = Zeitpunkt des ersten Tages der Bakteriophagentherapie, nachfolgende Zeitpunkte werden als TTx= bezeichnet, wodurch der Term x durch den jeweils x. Tag der Bakteriophagentherapie ersetzt wird.</p> <p>TTF= Zeitpunkt des Endes der Bakteriophagentherapie</p> <p>TpostTx = Zeitpunkt der Behandlung nach Ende der Bakteriophagentherapie in Tagen</p> <p>Zeitpunkte der einzelnen Operationen/Behandlungen</p> <p>Zeitpunkte der Gewebeprobenentnahmen</p>

Klinische Suszeptibilitätstestung von Patientenisolaten (Phagogramme) und Sterilitätsprüfung (Mikrobiologie Bundeswehrkrankenhaus Berlin)

Aus Patientenproben isolierte Bakterienstämme wurden nach Identifizierung und Bestimmung ihrer Resistenzen archiviert, um sie bei Bedarf an die Konsortialpartner weiterzugeben. Dabei wurde auch das Analysesystem Curetis Unyvero® verwendet, das nach einem umfassenden Verifizierungsprozess für den Einsatz in der Routinediagnostik freigegeben wurde.

Nach der Speziesidentifizierung und Testung der Antibiotikasuszeptibilität eines Patientenisolates erfolgte bei Vorliegen einer Multiresistenz oder nach Rücksprache mit den behandelnden Ärztinnen und Ärzten bei ausbleibendem Erfolg bisheriger Therapieversuche die Suszeptibilitätstestung (Phagogramm) gegenüber den drei verfügbaren Phagen gegen *P. aeruginosa* in der Mikrobiologie des Bundeswehrkrankenhauses (s. Anlagen 24 - 26).

Beim Agar Overlay Assay, auch Double-Layer-Methode genannt, wird eine Kombination aus Fest- und Flüssigmedien verwendet. Als Flüssigmedium zur Vermehrung des Erregerisolats diente Müller-Hinton-Bouillon (22 g/l Müller-Hinton in VE-H20). Der „Bottom-Agar“ ist eine handelsübliche Müller-Hinton-Agarplatte. Der „Top-Agar“ ist ein Müller-Hinton-Softagar, der für das Projekt eigens hergestellt wurde durch das Zentrale Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Abteilung A Veterinärmedizin in der Außenstelle Berlin. Zur Vorbereitung wird am Vortag der eigentlichen Testung pro zu testenden Phagen ein Röhrchen Flüssigmedium mit dem zu testenden Bakterium beimpft und 16 - 24 Stunden bei 36°C inkubiert.

Am Tag der Messung werden die Flüssigmedien mit dem zu testenden Bakterium auf einen McFarland Standard zwischen 2,0 und 3,0 eingestellt. Die Einstellung der Bakterien-Suspension in Flüssigmedien auf einen bestimmten McFarland Standard wurde erforderlich, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Für jeden zu testenden Phagen wird eine Verdünnungsreihe in 10er-Stufen hergestellt (genaue Vorgehensweise in Laboranweisung beschrieben). Für jede der zehn Verdünnungsstufen wird ein Softagar-Röhrchen in einem Wasserbad auf 48°C bis zu Verflüssigung des Agars erhitzt und bis zur Verwendung flüssig gehalten. Die einzelnen Verdünnungsstufen werden nun jeweils individuell in einen flüssigen Softagar pipettiert, gemischt und anschließend mit dosiertem Schwung auf eine raumtemperierte Müller-Hinton-Agarplatte gegossen. Bei bspw. einem zu testenden Erreger mit fünf infrage kommenden Phagen und zehn Verdünnungsstufen werden 50 Softagar-Röhrchen benötigt, jedes davon muss individuell mit Phagen bestückt werden. Mit jedem so präparierten Softagar wird die Müller-Hinton-Agarplatte überschichtet, also im Beispiel 50 Platten. Nachdem der Softagar erstarrt ist, wird der Ansatz bei 37°C für 16-24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand einer Formel berechnet. Insgesamt ist mit einer Bearbeitungszeit von ca. drei Stunden pro Erreger mit fünf zu testenden Phagen zu rechnen.

Als Alternative zu der Material-aufwändigen Double-Layer-Methode dient der Spot Assay. Die Vorbereitung der Phagen-Verdünnungsstufen ist identisch wie beim Agar Overlay Assay. Es wird jedoch nur eine Müller-Hinton-Platte mit einem Softagar mit dem zu testenden Bakterium überschichtet. Nach dem Erstarren werden jeweils 5 µl Phagensuspension pro Verdünnungsstufe in Abständen auf diese Platte pipettiert. Auch hier wird der fertige Ansatz

bei 37°C für 16-24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand einer Formel berechnet.

Im Vergleich haben beide Methoden Vor- und Nachteile. Die Double-Layer-Methode bietet eine sehr hohe Genauigkeit bei der Titer-Bestimmung im Austausch für einen höheren Zeit- und Materialaufwand. Die Spot-Methode spart etwas Zeit und viel Material auf Kosten einer geringeren Genauigkeit des Phagen-Titers.

Es wurde der Versuch gestartet, eine Automatisierung von Phagogrammen zu etablieren. Dazu wurden Messreihen mit unterschiedlichen Erregern, Erregerkonzentrationen sowie unterschiedlichen Phagen und Phagenkonzentrationen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte zu unterschiedlichen Messzeitpunkten durch Bestimmung der OD 600 nm. Das grundlegende Funktionsprinzip der Messung wurde dadurch etabliert. Als problematisch stellte sich heraus, dass nach den im mikrobiologischen Labor üblichen Bebrütungszeiten von 16-24 Stunden keine Auswertung mehr möglich war, weil die Bakterien alles "überwuchert" hatten. Nach den bisherigen Ergebnissen sind je nach Erreger-Phagen-Kombination jeweils deutlich unterschiedliche Messzeitpunkte erforderlich, die erst noch etabliert werden müssen. Die Alternative einer kinetischen Messung ist auf den gängigen automatisierten Analysegeräten nicht ohne weiteres umsetzbar. Die Automatisierung kann daher erst nach Etablierung der Messparameter umgesetzt werden, was ohne weitere zeitliche und personelle Ressourcen im Projektrahmen nicht umsetzbar war.

Da die zu testenden Phagen nach ihrer Herstellung durch ITEM über einen längeren Zeitraum in der Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses gelagert werden, testet die Abteilung Mikrobiologie auf Wunsch der Apotheke die Phagen-Suspensionen regelmäßig auf Sterilität. Bei dieser Testung werden alle Phagenlösungen jeweils auf eine Columbia-Blut- und eine Schaedler-Agarplatte ausgeimpft und zudem in eine Thyoglykolat-Bouillion gegeben. Die Nährmedien werden dann entsprechend aerob oder anaerob bei 36°C für 48 Stunden inkubiert. Bei sterilen Nährmedien konnten so die Phagen-Suspensionen zur Anwendung freigegeben werden.

Herstellung magistraler Phagenzubereitungen (Apotheke Bundeswehrkrankenhaus Berlin)

Aus Perspektive der Krankenhausapotheke ist das Ziel des Projektes, zunächst den Herstellungsraum als Reinraum zur Herstellung von parenteralen Arzneimitteln Sinne des § 35 Apothekenbetriebsordnung zu qualifizieren, da die zuständige Aufsichtsbehörde diese Anforderung gestellt hat, obgleich die Zubereitungen nur zur topischen Anwendung vorgesehen sind. Hier wird bewusst der höchste Standard angelegt, um die Reinheit und Qualität der Produkte zu gewährleisten. Die Qualifizierung des Reinraums spielt deshalb eine zentrale Rolle. Der Herstellungsraum wird infrastrukturell so hergerichtet, so dass er den Vorgaben nach § 35 Apothekenbetriebsordnung entspricht.

Nach der Betriebsqualifizierung erfolgt die Erstellung von Dokumenten (s. Anlagen 1 - 14), welche Festlegungen trafen:

- zu den technischen und zu den organisatorischen Maßnahmen, um Kontaminationen zu vermeiden,
- zur Wartung und Reinigung der Ausrüstungen und des Herstellungsraums,

- zur Validierung der die Produktqualität beeinflussenden Prozesse, Methoden und Systeme und zur Revalidierung,
- zu den Hygienemaßnahmen,
- zum hygienischen Verhalten des Personals am Arbeitsplatz und zur Art der Schutzkleidung für die Arzneimittelherstellung.

Da das hergestellte Arzneimittel keinem Sterilisationsverfahren im Endbehältnis unterzogen wird und auch nicht im geschlossenen System hergestellt wird, ist während der Zubereitung und Abfüllung eine geeignete Umgebung erforderlich, die in Bezug auf Partikel- und Keimzahl, bei Einsatz eines Isolators, der Klasse D des Anhangs des GMP-Leitfadens entspricht. Diese Festlegungen werden im Rahmen einer Leistungsqualifizierung unter realen Bedingungen überprüft. Es werden Tests durchgeführt, um sicherzustellen, dass der Reinraum die spezifizierten Standards während einer tatsächlichen Produktion aufrechterhält. Dies umfasst auch Schulungen für das Personal, um sicherzustellen, dass alle Prozesse korrekt ausgeführt werden. Die kontinuierliche Überwachung und Wartung sind entscheidend für den langfristigen Erfolg der Reinraumqualifizierung. Regelmäßige Inspektionen, Kalibrierungen und Wartungsarbeiten gewährleisten, dass der Reinraum dauerhaft den geforderten Standards entspricht.

Der nächste Schritt ist die Etablierung der Herstellung der Phagenzubereitungen. Dazu werden die verschiedenen Phagen-WK patientenindividuell zusammengestellt. Aus dem Patientenisolat wird zunächst ein Phagogramm (Mikrobiologie) erstellt. Daraus können die Titer der Phagen auf das spezifische Patientenisolat abgeleitet werden. Diese Titer sind die Berechnungsgrundlage für die anschließende Erstellung des Herstellungsdocuments (Herstellungsanweisung und Herstellungsprotokoll). Da auch die Art der Applikation patientenindividuell angefordert wird, muss das Herstellungsdocument entsprechend angepasst werden.

Gemäß den Anforderungen der zuständigen Behörden ist der Herstellungsraum als Reinraum zur Herstellung von parenteralen Arzneimitteln im Sinne des § 35 Apothekenbetriebsordnung zu qualifizieren. Die Erstellung der notwendigen Dokumente kann in 3 Themengebiete eingeteilt werden. Zum einen Festlegungen im Bereich der Raumhygiene, zum anderen im Bereich der Personalhygiene und zuletzt Festlegungen, die die Überwachung und Dokumentation des Herstellungsprozesses betreffen.

Zur Festlegung der Raumhygiene im Sterilbereich wurde eine Arbeitsanweisung erstellt, welche die Reinigung des Reinraumes für die Herstellung steriler Phagen-Zubereitungen inklusive der Schleusen, Geräte und sonstigen benötigten Materialien zur Vermeidung von Kreuz- und mikrobiologischer Kontamination sowie zur Gewährleistung des Produktschutzes regelt. Die Reinigung des Reinraumes inkl. Gerätschaften, der Material-/Personalschleusen sowie des Isolators wird in definierten Reinigungsintervallen durchgeführt. Im Formblatt „Raumhygiene Sterilbereich“ werden die produktionstäglichen, wöchentlichen und halbjährlichen Reinigungsmaßnahmen beschrieben. Dieser Hygieneplan hängt im Reinraum aus. Die Abfolge der Reinigungsschritte erfolgt gemäß der Arbeitsanweisung. Die durchgeführten Reinigungsmaßnahmen, werden im Formblatt „Dokumentation Raumhygiene Sterilbereich“ dokumentiert.

Zur Festlegung der Personalhygiene im Sterilbereich wurde eine Arbeitsanweisung erstellt, welche die Maßnahmen zur Personalhygiene bei Betreten und Verlassen des Sterilbereichs sowie während der Herstellung steriler Zubereitungen regelt. Das Ein- und Ausschleusen von Personen und Material erfolgt nach einem klar definierten Ein- und Ausschleusungskonzept mit dem Ziel, eine Kontamination des Reinraumes auszuschließen. Im Formblatt „Personalhygiene Sterilbereich“ werden die Abläufe beim Ein- und Ausschleusen beschrieben. Dieser Hygieneplan hängt im Reinraum aus.

Zur Regelung der Vorgehensweise zur mikrobiologischen Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen wurde eine Arbeitsanweisung erstellt. Die mikrobiologische Prozessüberwachung setzt sich aus produktionstäglicher mikro-biologischer Prozesskontrolle und mikrobiologischem Umgebungsmonitoring zusammen. Die Messpunkte für das Umgebungsmonitoring sind in dem zugehörigen Formblatt „Probenliste Hygienemonitoring“ festgelegt. Die Durchführung und Auswertung des Monitorings, werden im Formblatt „Hygienemonitoring“ dokumentiert.

In der Arbeitsanweisung zur Personalvalidierung wird die Durchführung der Simulation des Herstellprozesses mit Nährmedien zur Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen detailliert beschrieben. Die Validierung der aseptischen Herstellungsweise erfolgt durch Simulation der Herstellungsprozesse mittels Abfüllung von Nährmedien (Media fill). Die Prozessvalidierung ist für jede herstellende Person in der Sterilherstellung als verpflichtende Erstvalidierung (Eignungsprüfung) durchzuführen. Erst nach Bestehen der Validierung dürfen aseptische Zubereitungen hergestellt werden. Eine Überprüfung (Revalidierung) der aseptischen Arbeitsweise jedes validierten Mitarbeiters erfolgt in festgelegten Zeitintervallen, entweder kontinuierlich (häufige Nährmedienabfüllung in geringem Umfang und summativ Auswertung) oder diskontinuierlich (halbjährlich in größerem Umfang). Die Durchführung und Auswertung der Validierung, werden im Formblatt „Personalvalidierung“ dokumentiert.

Sind die Phagentiter des Patientenisolats ermittelt worden und die individuellen Therapietiter festgelegt, kann dann mit Hilfe eines Rechenblattes berechnet werden, wie die Phagen entsprechend zu verdünnen sind. Daran folgt die Erstellung des Herstellungsdokuments (Herstellungsanweisung und Herstellungsprotokoll). Hier ist exemplarisch ein Fall einer Anforderung einer Phagenzubereitung mit dem entsprechenden Herstellungsdokument beigelegt.

4 Projektergebnisse

Im Folgenden werden aufgrund der Besonderheit der Praktikabilitätstestung von Abläufen die Projektergebnisse möglichst in zeitlich-chronologischer Reihenfolge dargestellt.

Zielgröße: Anzahl der hergestellten Phagen nach Vorgaben der Klinik und der Phagenbank

Aufbau Sammlung klinischer Isolate priorisierter Bakterienspezies

Die Stammsammlung der Mikrobiologie wurde hinsichtlich der studienrelevanten Erreger gesichtet (antibiotikaresistente Erreger der Spezies *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. faecalis/ faecium*) und geeignete Isolate revitalisiert.

Anschließend wurde für jeden Stamm die Bakterienspezies mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt und die Antibiotikaempfindlichkeit mittels bioMerieux Vitek II erneut getestet. Danach erfolgte der Versand als Stichagarkulturen an die DSMZ. Dort erfolgte die Wiederanzucht und Ablage als Laborzellbänke (LCB). Die Stämme waren im Zeitraum von Januar 2015 bis März 2019 auf verschiedenen Stationen der Bundeswehrkrankenhäuser in Hamburg und Berlin aus verschiedenen Proben (z.B. Urin, Abstriche, Blutkultur) isoliert worden. Die Erstellung der Stammsammlung gegen die drei hoch priorisierten Erreger wurde in Q1 2020 wie geplant abgeschlossen. Eine sukzessive Weitergabe studienrelevanter Erreger an die DSMZ zur kontinuierlichen Überprüfung der Eignung von Phagen ist nicht erfolgt.

Die Stämme der Bakterienpanels, insbesondere Stämme, die als Wirte für neu isolierte Phagen dienen, werden kontinuierlich der öffentlichen Sammlung der DSMZ zugeführt, damit die Öffentlichkeit Zugriff auf diese hat und deren Erforschung fortgesetzt werden kann. Bis zum Ende der Projektlaufzeit wurden 242 Stämme öffentlich hinterlegt.

Tabelle 4: Übersicht von Stämme-Panels zur Isolation und Charakterisierung von Phagen

Spezies	Resistenzen	Anzahl Isolate / Stammpanel	Isolationszeitraum
<i>P. aeruginosa</i>	3 / 4 MRGN	121	Jan 2015-Sep 2018
<i>S. aureus</i>	MRSA	112	Feb 2015-Jan 2018
<i>E. coli</i>	3 MRGN	100	Jan 2015-Mai 2015
<i>K. pneumoniae</i>	3 MRGN	95	Feb 2015- Mär 2019
Acinetobacter complex (ABC complex)	4 MRGN	15	2015-2019
<i>E. faecalis</i> / <i>faecium</i>	VRE	Keine Stammsammlung angelegt	N/A

Aufbau einer Sammlung von Phagen mit therapeutischem Potential gegen priorisierter Bakterienspezies und Auswahl geeigneter Phagen für die GMP-Produktion

Gemäß dem Studienprotokoll wurde initial angestrebt eine Anzahl von jeweils zehn Phagen gegen *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* und fünf Phagen gegen *S. aureus* mit therapeutischem Potential für die GMP-konforme Produktion auszuwählen.

Im Projektzeitraum wurden rund 110 Phagen neu aus verschiedenen Proben gegen die priorisierten Targetspezies isoliert und etwa 190 Phagen, inklusive zusätzlicher relevanter Phagen aus der Sammlung der DSMZ, hinsichtlich der Morphologie, ihres Wirtsbereiches unter Verwendung der jeweiligen Stämmepanels (Anlage 19-21), genetischer Merkmale (Hinterlegung der Sequenzen bei GenBank (NCBI)) sowie der Lyseeffizienz (Anlage 18) untersucht. Lagen Hinweise auf Ähnlichkeiten zu anderen Phagen, bzw. Gründe, die gegen eine Auswahl eines Phagen sprachen (z. B. sehr enger Wirtsbereich), vor, erfolgte keine vollständige Charakterisierung. Aus bereits im Kapitel „Implementation“ beschriebenen

Gründen, wurde die Anzahl auf insgesamt 12 Phagen gegen die drei Targetspezies reduziert, welche für die Weitergabe an ITEM für die Produktion ausgewählt wurden

Auswahl der Phagen

Speziesabhängig variierte die Abdeckung stark. Während bei *S. aureus* 95% der Isolate abgedeckt werden konnten, waren es bei *P. aeruginosa* lediglich 53% der getesteten Isolate. 78% der getesteten Isolate konnte mit den ausgewählten 6 *E.coli*-Phagen abgedeckt werden. Um eine bessere Abdeckung bei *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* erreichen zu können, wäre die Erweiterung um 10 bzw. 6 Phagen notwendig gewesen. Diese Phagen hatten allerdings für sich genommen so enge Wirtsbereiche, dass der spätere Einsatz sehr unrealistisch gewesen wäre. Um Phagen zu finden, die bei eigenem breiten Wirtsspektrum die Abdeckungslücken schließen, wäre schätzungsweise mind. 1 Jahr pro Spezies erforderlich gewesen.

Aus 139 *Pseudomonas*-Phagen, von denen 77 im Rahmen des Projektes über unterschiedliche Strategien neu isoliert wurden, erfolgte die Auswahl der drei Phagen JG004, PTLAW1 und 22043_B8_1. Dabei handelt es sich um Vertreter der *Pakpuna*-, *Pbuna*- und *Septimatreviren*. Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, lag die Abdeckung der *Pseudomonas*-Stämme durch die Einzelphagen bei 14-38% (Anlage 21).

Typischerweise hatten die Phagen gegen *S. aureus* ein breiteres Wirtsspektrum. Hier lag der Wirtsbereich der ausgewählten Phagen mit 63 – 89 % deutlich über dem der *Pseudomonasphagen*. Taxonomisch sind sie den Kay- und Rosenblumviren zuzuordnen. Der Wirtsbereich der *E. coli*-Phagen ähnelte mit einer Abdeckung von 14-39% dem der *Pseudomonasphagen*. Die ausgewählten Phagen wurden den *Mosig*-, *Tequinta*-, *Kayfuna*-, *Tequatro*- und *Wifceviren* zugeordnet (Anlagen 19 und 20).

Die ausgewählten Phagen wiesen keinerlei Gene für kritische Faktoren (Antibiotikaresistenz, Virulenzfaktoren, Lysogenie) auf. Durch die Sequenzierung der Phagen wurde gleichzeitig die für die Identitätsprüfung der MPS und Phagen-WK benötigte Referenzsequenz erstellt. Details sind der Anlage 22 zu entnehmen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Wirtsbereiche von Einzel-Phagen und -Kombinationen

Target-Panel	Phage / Kombination		Morphotyp Phage	Lysierte Stämme	% Lyse	% Mehrfach-Abdeckung
3/4 MRGN <i>P. aeruginosa</i> Stämme	Einzel- Phage	JG004	Myo	32	29	
		LAW1	Myo	42	38	
		22043_B8_1	Sipho	15	14	
	Kombi	JG004, LAW1, 22043_B8_1		59	53	26
		Max. Abdeckung (13 Phagen)		96	86	
MRSA- Stämme	Einzel- Phage	155Rind1	Myo	99	88	
		EBHT	Podo	71	63	
		246UKE	Myo	100	89	
	Kombi	155Rind1, EBHT, 246UKE		106	95	88
		Max. Abdeckung (3 Phagen)		108	96	

Target-Panel	Phage / Kombination		Morphotyp Phage	Lysierte Stämme	% Lyse	% Mehrfach-Abdeckung	
3 MRGN E. coli	Einzel- Phage	PTJN4	Myo	27	26		
		BiBS288	Podo	14	14		
		G4507	Myo	40	39		
		MM02	Myo	23	23		
		WFH	Myo	37	36		
		EASG3	Sipho	27	26		
	Kombi	PTJN4, BiBS288, G4507, MM02, WFH, EASG3			80	78	51
		Max. Abdeckung (12 Phagen)			95	93	

Auswahl der Wirtsbakterien:

Mit Ausnahme der Phagen PTJN4, MM02 und EASG3, deren Wirt der Laborstamm *E. coli* K12 ist, wurden für die Herstellung der Phagen klinische Bakterienisolate ausgewählt. In allen Fällen wurden die Stämme, welche auch zur Isolation der Phagen genutzt wurden, als spätere Stämme für die Produktion ausgewählt. Ein Wirtswechsel auf potenziell weniger pathogene Stämme konnte aus Ermangelung dieser nicht vorgenommen werden.

Etablierung und GMP-konforme Produktion von MCB, MPS und Phagen-WK und deren Freigabe

Ziel des Projektes am ITEM war es einen plattformartigen Herstellungsprozess zu entwickeln, der es in kurzer Zeit ermöglicht Phagen-WK nach den gültigen Qualitätsanforderungen herzustellen. Dabei sollte untersucht werden, wie viel Etablierungsarbeit notwendig ist, um einen vorhersagbaren Prozess durchzuführen, der Phagen in der im Vorfeld definierten Qualität liefert. Es wurde dabei festgestellt, dass jede Phage-WK hinsichtlich ihres lytischen Verhaltens sehr unterschiedlich ist. Parameter, die bei der Etablierung angepasst wurden, waren dabei die Temperatur, die Zelldichte, bei der die Infektion mit Phagen erfolgte, sowie die Infektionsdosis. Bei den meisten Phagen genügte für die MPS-Herstellung ein Etablierungslauf, bei dem parallel verschiedene Infektionsdosen getestet wurden. Bei dem Phagen 22043_B8_1 musste abweichend von Standardprozedere auch das Volumen des Primärlysates und der Infektionszeitpunkt abgewandelt werden, um einen ausreichend hohen Titer im Sekundärlysat zu erhalten. Insbesondere der Phage 246UKE ließ sich über die Strategie aus zwei Passagen nicht mit einem ausreichend hohen Titer produzieren. Aus diesem Grund wurde eine weitere Passage eingeführt, die letztendlich zu einer ausreichenden Phagenkonzentration in der MPS führte. Die Idee des Plattformprozesses bei der MPS-Herstellung beschränkte sich demnach auf die Verwendung der gleichen Geräte und Materialien (Hilfsmittel und Rohstoffe) bei allen Herstellungen. Die Phage-Wirt-spezifischen Parameter mussten jedoch in jedem Fall im Vorfeld überprüft werden. Dafür waren bis zu 19 verschiedenen Versuchsansätze nötig. Da es nicht sinnvoll ist alle Ansätze parallel durchzuführen, erfolgten die Etablierungsarbeiten über eine Nettozeit von bis zu sechs Wochen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Herstellung der Phagen-WKs gemacht. Während die Kultivierung aufgrund der Vorerfahrung aus der MPS-Herstellung mit ein bis zwei

Etablierungsläufen sicher zu einem ausreichend hohen Titer führten, war der Etablierungsaufwand bei dem DSP-Teil höher. Für jeden Phagen musste individuell die Beladung des Chromatographiematerials ausgetestet werden. Zum einen sollte möglichst viel Material gereinigt werden, zum anderen erfolgte bei Überladung der Säule keine Aufreinigung der Phagenpartikel. Bei den Pseudomonasphagen konnte man aus den Erfahrungen aus einem vorherigen Projekt profitieren, wodurch 1-3 Etablierungsläufe im Labormaßstab und bei den ersten beiden Phagenherstellungen auch eine Technische Charge durchgeführt wurde, bei der die Bedingungen Prozessmaßstab entsprachen. Für die Herstellung von Phagen-WKs für topische Anwendungen, bei denen die Abreicherung von prozessbedingten Verunreinigungen (Endotoxine, Hostzellproteine- und DNA) nicht auf die Grenzen von Parenteralia reduziert werden musste, konnte mit relativ geringem Etablierungsaufwand die Herstellung von drei Phagen-WKs gegen *P. aeruginosa* realisiert werden.

Bei der Herstellung von Phagen-WKs gegen *S. aureus* musste festgestellt werden, dass die Erfahrungen aus den Pseudomonas-WK Herstellungen nicht uneingeschränkt übertragbar waren. Hier wurde riskiert direkt nach 1-2 Etablierungsläufen im Labormaßstab in die GMP-Herstellung überzugehen. Der Upscale auf den Prozessmaßstab bei der GMP-Charge war in dem Fall nicht erfolgreich, wodurch die Phagen-WK nicht einen ausreichend hohen Titer erzielten. Um diese Prozesse so zu optimieren, dass die Spezifikationen bei der Freigabeprüfung erfüllt worden wären, hätte es schätzungsweise noch 3-4 weitere Etablierungsläufe im Prozessmaßstab bedurft. Um eine GMP-konforme Herstellung durchführen zu können, sind dementsprechend abhängig vom Phagen unterschiedliche Bemühungen nötig, um den Prozess spezifikationsgemäß abschließen zu können.

Von der ursprünglichen Annahme im Projektzeitraum 25 Phage-WKs herstellen zu können musste demnach Abstand genommen werden. Dies hätte bedeutet, dass für jeden Phagen etwa ein Monat Zeit für die Herstellung und Freigabe gewesen wäre. Aufgrund der Vorgaben, dass nur begrenzt verschiedene Chargen in einem Raum zur gleichen Zeit durchgeführt werden durften und des ursprünglich nicht eingeplanten, seitens des klinischen Partners aber benötigten, Volumens musste faktisch in Ermangelung von verschiedenen Herstellräumen jede Phage-WK-Produktion nacheinander durchgeführt werden. Dies schloss die Etablierungsläufe als auch die GMP-Chargen mit ein. Ein weiterer Zeitfaktor war die Zeit für die Dokumenterstellung und Freigabe der MCB, MPS und Phagen-WKs. Erst wenn die Bänke als auch die Phagen-WK freigegeben war, konnte die Abgabe der Phagen-WK erfolgen. Ein Teil der notwendigen Freigabeprüfungen wurde an externe Labore vergeben, die bis zu 5 Monaten für einzelne Analysen benötigten. Eine Zeitspanne auf die von Seiten des ITEMs nur bedingt Einfluss genommen werden konnte. Die Zeitschiene, auf der die Phagen hergestellt wurden, verlängerte sich demnach von einem Phagen pro Monat auf drei Phagen in 14 Monaten. Wobei die Zeit pro Phagen-WK nicht durch drei geteilt werden konnte, weil zwar die Herstellungen sukzessive durchgeführt werden mussten, viele Arbeiten, bei denen beispielsweise auf Ergebnisse gewartet wurde, jedoch verschachtelt erfolgten.

Klinische Praktikabilitätstestung / Fallserie

Die klinische Fallserie konnte nach Zulieferung der drei Bakteriophagen gegen den Erreger *P. aeruginosa* im April 2023 begonnen werden. Der Betrachtungszeitraum umfasste 18 Monate und endete im September 2024, der Behandlungszeitraum umfasste davon elf Monate.

Die Rekrutierung des Patientenkollektivs erfolgte in den meisten Fällen aus Initiativanfragen von interessierten Patientinnen und Patienten, jedoch auch von deren bisher behandelnden Ärztinnen und Ärzten. Darüber hinaus wurden mögliche Phagenpatientinnen und -patienten aus dem Patientenkollektiv des Bundeswehrkrankenhauses Berlin in Betracht gezogen sowie ein Rundschreiben an septisch-chirurgische Kliniken deutschlandweit gesendet. Über die verschiedenen Rekrutierungskanäle erreichten uns insgesamt 308 Anfragen zu einer in Frage kommenden Bakteriophagentherapie. In der Statistik wurden lediglich Anfragen von Patienten berücksichtigt, die eine bakterielle Infektion angaben. Nicht statistisch erfasst wurden die vielen weiteren Anfragen abseits des Wirkmechanismus von Phagen, wie beispielsweise die erstaunlich häufig gestellte Frage nach dem Einsatz von Phagen gegen Krebserkrankungen.

Die Kommunikation mit Patientinnen und Patienten sowie die Koordination hausintern erfolgte zentral durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin. Die Administration der Patientenfragen umfasste das Einholen eines standardisierten Kontaktformulars im Sinne einer Checkliste sowie im Verlauf sämtliche relevante ärztliche Befunde (z.B. Arztbriefe, mikrobiologische Befunde, radiologische Bildgebung). Hausintern erfolgte die Koordination von Probeneinsendungen und Probenentnahmen, die Interpretation von Phagogramm-Ergebnissen, die Koordination der Kommunikation zwischen Patienten, Ärzten und der Abteilung für Mikrobiologie sowie die Koordination zwischen Ärzten und Krankenhausapotheke zur Herstellung von patientenindividuellen Phagenzubereitungen auf ärztliche Anforderung.

Aufgrund der therapeutischen Einschränkung auf den Erreger *P. aeruginosa* kamen lediglich 18 % der Therapieanfragen für die Aufnahme in die Fallserie in Betracht. Eine Vorauswahl der in Frage kommenden Patienten erfolgte durch ein Screening der vorliegenden Patientenunterlagen auf die Art des Erregers, die Art der Infektion und den bisherigen Behandlungsverlauf (s. Anlage 15, 17). Die Art der Infektion spielt vor allem in Hinblick auf die Umsetzbarkeit der Isolierung des Erregers eine praxisrelevante Rolle, da bspw. die Entnahme von Wundabstrichen, Sputumproben und Urinproben keine invasive Maßnahme darstellen während bspw. die invasive Entnahme von Knochen-/Gewebeproben nur dann durchgeführt wurde, sofern ein derartiger Eingriff im Rahmen der Standardtherapie ohnehin notwendig war und somit kein zusätzliches Risiko zu Forschungszwecken eingegangen wurde. Entsprechend wurden nicht alle Patienten, welche gemäß Aktenlage den Erreger *P. aeruginosa* aufwiesen, auch tatsächlich in die Fallserie zur Durchführung eines Phagogramms aufgenommen. Sofern sicher oder mit hoher Wahrscheinlichkeit der Erreger *P. aeruginosa* als Infektions- bzw. Komplikationsursache vorlag, eine Isolierung des Erregers für umsetzbar und tragbar gehalten wurden und die Patienten in der Vergangenheit bereits eine leitliniengerechte Standardbehandlung erhalten hatten, wurde eine Probenentnahme im Bundeswehrkrankenhaus oder eine Probeneinsendung koordiniert.

Zielgröße: Ergebnisse der Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen (Phagogramm)

Die Abteilung für Mikrobiologie isolierte – sofern möglich – zunächst den Erreger und führte daraufhin eine Suszeptibilitätstestung des Patientenisolats gegenüber der drei Phagen durch (Phagogramm). Dafür wurde vorwiegend die Double-Layer-Methode angewendet. Im

Betrachtungszeitraum wurden für 33 Patienten mit *P. aeruginosa* Phagogramme erstellt. Bei den initial durchgeführten Phagogrammen zur Entscheidung über eine mögliche Bakteriophagentherapie zeigte in 15 Fällen mindestens ein Phage eine gute, in 6 Fällen mindestens ein Phage eine geringe und in 12 Fällen kein Phage eine Wirksamkeit. Eine Übersicht der Fallzahlen liefert Abbildung 4. Die wesentlichen Charakteristika der genannten Fälle sind Anlage 15 zu entnehmen.

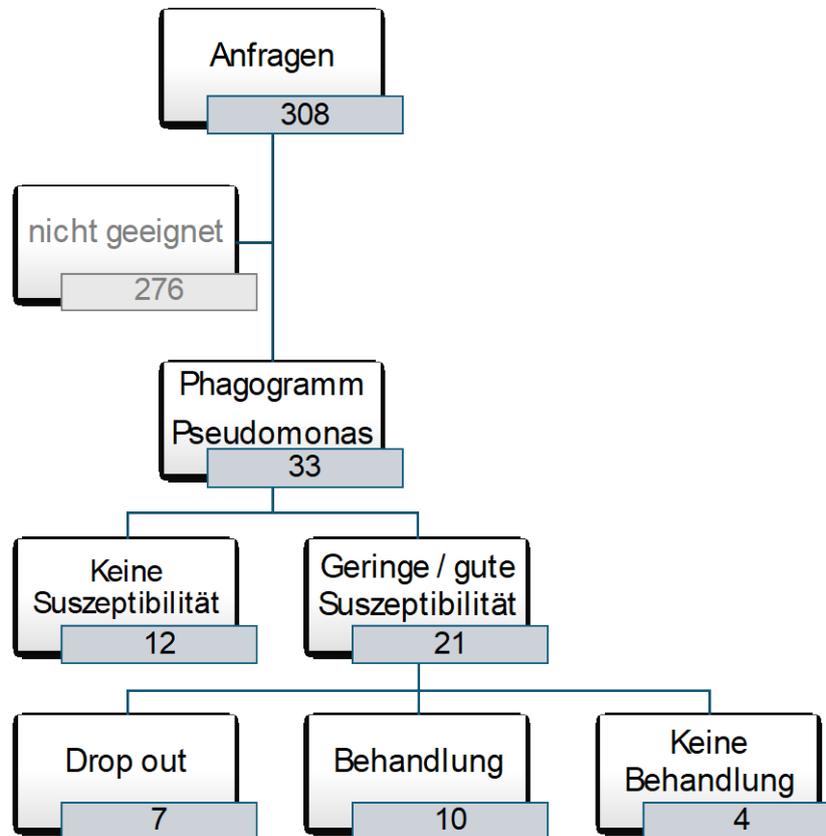


Abbildung 4 Patientenflussdiagramm

Sofern die Phagen mindestens eine geringe Wirksamkeit *in vitro* zeigten, wurden die therapeutischen Optionen gemeinsam mit den Patienten eruiert. Sofern die Umsetzung einer Bakteriophagentherapie im jeweils individuellen Fall für zielführend und umsetzbar erschien, erfolgte die Behandlungsplanung im Bundeswehrkrankenhaus Berlin.

In vier Fällen wurde sich bei geringer *in vitro* Wirksamkeit aufgrund der fehlenden Erfolgsaussichten gemeinsam mit den Patienten gegen einen Behandlungsversuch entschieden. Davon ergab in zwei Fällen ein erneutes Phagogramm, dass keine *in vitro* Wirksamkeit mehr gegeben war. Sieben Patienten entschieden sich trotz *in vitro* wirksamer Phagen aus unterschiedlichen Gründen gegen einen individuellen Heilversuch und werden daher als Drop out gewertet (Entscheidung für Amputation, zum Entscheidungszeitpunkt stabile / zufriedenstellende Wundverhältnisse, Beginn einer georgischen Phagenkur, Entscheidung für andere Therapieform).

Falls sich für den individuellen Heilversuch entschieden wurde, erfolgte die Festlegung der therapeutisch angestrebten Phagothérapie in enger Absprache zwischen Klinik und

Krankenhausapotheke. Angestrebt wurden möglichst hohe Ziel-Phagentiter in der finalen Phagenzubereitung unter Berücksichtigung teilweise notwendiger Verdünnungen durch das Mischen der einzelnen Monophagen-Lösungen zu einer patientenindividuellen Phagenzubereitung. Dabei wurden lediglich Monophagen-Lösungen in die Zubereitung aufgenommen, sofern der Phage im Phagogramm mindestens eine geringe Wirksamkeit zeigte.

Je nach Infektionsart wurde die Behandlung im ambulanten oder stationären Setting versiert. Sofern eine Behandlung im ambulanten Setting stattfand, erfolgte die Erstgabe der Phagen unter ärztliche Supervision mit anschließendem Überwachungszeitraum. Bei Fortführung der Anwendung durch den Patienten selbst im heimischen Umfeld erfolgte zusätzlich die Anleitung des Patienten zur Phagenanwendung und Kontrolle dessen. Bei Behandlung im stationären Setting erfolgte die Phagenapplikation durch ärztliches Personal, welches zuvor im Umgang mit Phagenlösungen geschult wurde.

Zielgröße: Zeitpunkt des Beginns der Anwendung magistraler Zubereitungen nach initialer Gewebeprobengewinnung

Insgesamt konnten im Betrachtungszeitraum zehn Patientinnen und Patienten mit Bakteriophagen gegen *P. aeruginosa* behandelt werden (s. Anlage 17). Der Zeitpunkt des Behandlungsbeginns mit Bakteriophagen nach initialer Gewebeprobengewinnung lag im Mittel bei 50 Tagen (21 – 131 Tage).

Dabei handelte es sich in vier Fällen um chronische Wundinfektionen, fünf chronisch-rezidivierende Harnwegsinfekte, eine chronische Otitis externa und eine chronisch-rezidivierende Infektion der unteren Atemwege (ein Patient wurde an zwei Lokalisationen gleichzeitig behandelt). Eine nähere Betrachtung und Auswertung der Behandlungsdaten finden nicht statt, da diese nicht Teil der Fragestellung sind. Die Behandlungsdaten wurden dennoch im Sinne der Deklaration von Helsinki § 37 erfasst und stehen somit für eine weitere wissenschaftliche Betrachtung zur Verfügung. Sie können Anlage 17 entnommen werden.

Bewertung der Arbeitshypothesen:

Die dargelegten Ergebnisse zeigen, dass es im gesamten Betrachtungszeitraum nicht möglich war, innerhalb von weniger als zwei Wochen nach initialer Probengewinnung eine patientenindividuelle Bakteriophagenzubereitung zu applizieren. Somit ist die primäre Arbeitshypothese zu verwerfen. Dies hatte im Projektverlauf unterschiedliche Gründe. Im Bereich der Mikrobiologie konnte die Suszeptibilitätstestung (Phagogramm) etabliert und in der Apotheke die Voraussetzung geschaffen werden, patientenindividuelle Mischungen der Phagenwirkstoffe unter den erforderlichen Reinraumbedingungen herzustellen und den Kliniken bereitzustellen. Ausschlaggebend für die Verzögerungen waren jedoch vor allem mangelnde personelle Ressourcen zur Durchführung von Phagogrammen. Die notwendigen Schritte konnten nicht in den klinischen Routinebetrieb integriert werden, sondern blieben organisatorische Zusatzarbeit. Darüber hinaus stellte die komplexe Koordination der Behandlung von Patientinnen und Patienten aus ganz Deutschland eine zeitliche Herausforderung dar, da eine Anreise nach Berlin meist nicht innerhalb weniger Tage realisierbar war (s. auch Kapitel 2.4).

Auch die sekundäre Arbeitshypothese, dass es aufgrund des im Projektverlauf angewachsenen Fundus an geeigneten gereinigten Phagenpräparaten zum Zeitpunkt des letzten halben Jahres der Fallserie möglich sei, nach Identifizierung des für die Infektion ursächlichen Erregers und seiner Resistenzeigenschaften innerhalb von drei Werktagen mit einer magistralen Phagenzubereitung die Bakteriophagentherapie zu beginnen, ist zu verwerfen. Zum einen ist wie ausführlich dargestellt der Fundus an gereinigten Phagenpräparaten im Projektverlauf nicht weiter angewachsen (s. Kapitel 2.4). Zum anderen pendelte sich im Projektverlauf nach Überwindung der initialen koordinativen Herausforderungen die Zeitspanne zwischen Erregeridentifizierung (Antibiogramm) und Behandlungsbeginn bei ca. zwei bis vier Wochen ein (s.o.). Die Ursachen der benötigten Zeit (personelle Ressourcen, Patientenlogistik) ließen sich im Projektrahmen jedoch nicht beheben.

Die sekundäre Arbeitshypothese eine Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen durch den Anwender (Klinik) zeitnah durchzuführen (Phagogramm) kann ohne nähere Definition des Begriffes „zeitnah“ grundsätzlich bestätigt werden, unter der Bedingung, dass entsprechende personelle Ressourcen zur Verfügung stehen. Im laufenden Klinikbetrieb ist jedoch die gewünschte unmittelbare Umsetzung von Phagogrammen ohne Verzug im Rahmen des Projektes nur in Einzelfällen gelungen.

Die sekundäre Arbeitshypothese Phagen jederzeit nach Vorgaben der Klinik aus der entstandenen GMP-Phagenwirkstoffbank abzurufen, kann zwar insofern bestätigt werden, dass die Herstellung der patientenindividuellen Phagenzubereitungen durch die Krankenhausapotheke in allen Fällen unmittelbar vor Behandlungsbeginn erfolgte. Jedoch ist an dieser Stelle die extreme Einschränkung auf lediglich drei Phagen gegen *P. aeruginosa* zu betonen. Obwohl bei der initialen Auswahl der Bakteriophagen darauf geachtet wurde, ein möglichst breites Wirtsspektrum zu bedienen, zeigte sich, dass die Suszeptibilität der Patienten isolate dennoch deutlich eingeschränkt war. Um zukünftig flächendeckend Patientinnen behandeln zu können, ist die Verfügbarkeit von therapeutisch anwendbaren Phagen für möglichst alle Bakterienarten unerlässlich.

5 Diskussion der Projektergebnisse

Das Forschungsprojekt hatte das Ziel, die Praktikabilität der Herstellung von Phagen-Wirkkomponenten und der anschließenden patientenindividuellen magistralen Zubereitung unter den aktuell existierenden infrastrukturellen Bedingungen zu testen. Dies sollte im Rahmen einer Fallserie von individuellen Heilversuchen erprobt werden.

Zum Zeitpunkt des Projektstartes waren die Projektpartner nicht darauf spezialisiert diese Therapieform zu ermöglichen. Die DSMZ beherbergte zwar eine Sammlung von Phagen, diese waren jedoch nicht hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials charakterisiert. Das Fraunhofer ITEM hatte zwar eine Herstellungserlaubnis für andere Wirkstoffklassen, diese galt jedoch nicht für Phagen und auch das Bundeswehrkrankenhaus Berlin hatte erst im Jahr 2016 begonnen, in Einzelfällen aus dem Ausland bezogene Phagencocktails therapeutisch anzuwenden. Im Laufe des Projektes wurden bei den einzelnen Partnern die notwendigen Abläufe, Vorschriften und Voraussetzungen dafür geschaffen, dass eine Anwendung von in

Deutschland hergestellten Phagen für die Therapie von Infektionen ermöglicht werden konnte.

Aus einer dreistelligen Anzahl von Phagen wurden durch die DSMZ drei Phagen von hohem therapeutischem Potential (Zusammensetzung aus breitem Wirtsbereich, effizienter Lyse und Sicherheit auf Genomebene) ausgewählt, charakterisiert und durch das ITEM GMP-konform zu therapeutisch anwendbaren Phagen-WK hergestellt. Das ursprüngliche Ziel der Isolierung, Charakterisierung und Herstellung von jeweils fünf bis zehn Phagen-WK für die Zielerreger *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *E. coli* konnte nicht erreicht werden.

Die für die Herstellung von Phagen-WK notwendigen, teilweise erst durch das Forschungsprojekt geschaffenen infrastrukturellen Voraussetzungen sind jedoch faktisch nicht nachhaltig. So wurde beispielsweise durch das GAA die Herstellungserlaubnis für das ITEM nicht allgemeingültig für die „Wirkstoffklasse Bakteriophagen“ erteilt, sondern lediglich für die Herstellung im eng definierten Projektrahmen. Für die weiterführende Herstellung von Phagen müsste eine neue Herstellungserlaubnis beantragt werden. Dieses Vorgehen weicht vom Prozedere bei anderen Wirkstoffklassen ab.

Weiterhin waren die infrastrukturellen Voraussetzungen stark an die Projektfinanzierung gebunden. Unabhängig von den Projektmitteln besteht derzeit keine Möglichkeit, die bei jedem Partner entstehenden Kosten für eine weitere Herstellung und für die Anwendung von Phagen im Klinikalltag abzudecken, da magistral hergestellte Rezepturen nicht kommerziell vertrieben werden dürfen. Es ist wichtig, dass die Regierung und Gesundheitseinrichtungen weiterhin die Forschung zur Bakteriophagentherapie finanziell unterstützen. Dies schließt die Durchführung klinischer Studien und die Entwicklung standardisierter Herstellungs- und Anwendungsprotokolle ein. Gesundheitspolitiker sollten sich für eine klare rechtliche Einordnung und Regulierung der Bakteriophagentherapie einsetzen. Dies könnte durch Anpassungen bestehender Gesetze oder die Einführung neuer Vorschriften geschehen, die Phagen als besondere therapeutische Kategorie anerkennen. Zu Beginn des Betrachtungszeitraums dieses Projektes zeigte sich, dass eine Kostenerstattung über die Krankenkasse nur mittels aufwendigen Gutachtenprozess übernommen werden würde, sodass sich dazu entschieden wurde, die möglicherweise anfallenden Kosten nicht zu Lasten der Patienten auszulegen und im Zweifel durch die Klinik selbst zu tragen. Dass dies kein nachhaltiger und zukunftsfähiger Ansatz für eine zügige Behandlung ist, ist selbsterklärend und sollte nach unserer Auffassung dringlich gesundheitspolitische Klärung finden. Bis zur Zulassung von Fertigpräparaten als Arzneimittel sollte unserer Auffassung nach die patientenindividuelle magistrale Herstellung von Phagenpräparaten über ein Zusatzentgelt (NUB-Verfahren) vergütet werden, um die entstehenden Kosten decken zu können.

Aus den dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Applikation eines patientenindividuellen Bakteriophagenpräparates in einem Zeitraum von weniger als zwei Wochen nach der ersten Probenentnahme im gesamten Beobachtungszeitraum nicht möglich war (primäre Arbeitshypothese). Grund dafür war vorrangig, dass die Suszeptibilitätstestung des Bakterienisolates gegenüber den Phagen nicht zeitnah durchzuführen war (sekundäre Arbeitshypothese). Folglich war es auch zum Zeitpunkt des letzten halben Jahres der Fallserie nicht möglich, nach Erregeridentifizierung innerhalb von drei Werktagen mit einer magistralen Phagenzubereitung die Bakteriophagentherapie zu beginnen (sekundäre Arbeitshypothese).

Im Projektverlauf betrug die Zeitspanne zwischen Erregernachweis und Therapiebeginn nach Überwindung der anfänglichen Koordinationsschwierigkeiten ca. zwei bis vier Wochen. Allerdings konnten im Rahmen des Projektes die zwei Hauptursachen für den Zeitbedarf (Personalressourcen, Patientenlogistik) nicht behoben werden. Lediglich die sekundäre Arbeitshypothese, Phagen jederzeit nach Vorgaben der Klinik aus der entstandenen GMP-Phagenwirkstoffbank abzurufen, kann bestätigt werden, da die Herstellung der patientenindividuellen Phagenzubereitungen durch die Krankenhausapotheke bis auf eine Ausnahme immer unmittelbar vor Behandlungsbeginn erfolgte.

Insgesamt wurde die Erfahrung gemacht, dass die Administration und Koordination der vielen Patientenfragen sowie der klinikinternen Abläufe nicht ohne zusätzliche personelle Ressourcen im laufenden Klinikbetrieb realisierbar sind. Eine zentrale Anlaufstelle zur Kommunikation und Koordination ist aufgrund der vielen beteiligten Institutionen essenziell. Weiterhin wird zusätzliches, geschultes Personal sowohl für die Gewährleistung der unmittelbaren Durchführung von Phagogrammen als auch für die Anwendung von Bakteriophagen benötigt, um behandelnde Ärztinnen und Ärzte vor und während der Behandlung mit Phagen anzuleiten.

Auf Basis der Projektergebnisse und der Erfahrungen mit zahlreichen Schwierigkeiten bei der Projektdurchführung ist davon auszugehen, dass bei Verfügbarkeit einer hinreichenden Anzahl von Phagenwirkstoffen, der Integration der Bakteriophagentherapie in die mikrobiologische Routine und der Möglichkeit, entweder fertige Cocktails zu kaufen oder Phagenzubereitungen in der Krankenhausapotheke anzusetzen, ein Therapiebeginn wenige Tage nach Erregerisolierung möglich sein wird.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass viele Erfahrungen und Wissen im Projekt gesammelt wurden, jedoch naturgemäß und durch den Projektrahmen bedingt, keine Möglichkeit geschaffen wurde, an die Bereitstellung und Anwendung weiterer Phagen anzuknüpfen. Mit der bestehenden Infrastruktur, d.h. dem Umfang der aktuell verfügbaren Phagensammlungen, der Produktionsbetriebe und der Anzahl durchführbarer Phagogramme pro Zeiteinheit, ist es aktuell noch nicht möglich, Phagen in eine Regelversorgung der Solidargemeinschaft zu überführen. Um dies zu ermöglichen, wäre eine zentrale Koordination der Isolierung und Charakterisierung von weiteren Phagen-Kandidaten, der deutliche Ausbau von Herstellkapazitäten sowie die Spezialisierung einzelner Krankenhäuser für diese Therapieform durch Ausbau von personellen und räumlichen Ressourcen erforderlich. Es besteht ein Bedarf an umfassender Aufklärung und Weiterbildung von medizinischem Personal bezüglich der Bakteriophagentherapie. Krankenhäuser müssen entsprechend geschult werden, um die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Behandlung sicherzustellen. Denkbar hierfür wären verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit wäre die Errichtung von Phagentherapiezentren beispielsweise nach dem Vorbild des Israeli Phage Therapy Center (IPTC) der Hebrew University des Hadassah Medical Centers oder die Schaffung einer Möglichkeit für Pharmaunternehmen bzw. Herstellungsbetrieben, die Herstellung von Phagen mit den Krankenkassen bzw. Krankenhäusern abrechnen zu können.

Die Bakteriophagentherapie bietet ein großes Potenzial zur Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen und könnte in Zukunft eine wichtige Rolle im deutschen Gesundheitswesen spielen. Damit dies gelingt, sind jedoch erhebliche gesundheitspolitische

Anstrengungen erforderlich, um Forschung und Entwicklung voranzutreiben, regulatorische Rahmenbedingungen zu schaffen und die Anwendung in der klinischen Praxis zu ermöglichen. Nur durch eine umfassende und koordinierte Strategie kann das volle Potenzial der Bakteriophagentherapie ausgeschöpft werden.

6 Verwendung der Ergebnisse nach Ende der Förderung

Ziel des Projektes war, zu überprüfen, ob es mit den heute bereits zur Verfügung stehenden infrastrukturellen Gegebenheiten möglich ist, eine magistrale Herstellung von Phagen für die Solidargemeinschaft zu realisieren. Diese sollte an einzelnen Patientinnen und Patienten im Sinne einer Fallserie im medizinrechtlich-ethischen Rahmen des individuellen Heilversuches (Artikels 37 der Deklaration von Helsinki) durchgeführt werden. Zielkriterium für dieses Projekt war der Zeitraum zwischen der Erregerisolation und dem Beginn der Bakteriophagentherapie, der, an dem üblichen klinischen Bedarf orientiert, nicht länger als 14 Tage sein sollte.

Im Rahmen des Projektes gelang es, drei qualitativ hochwertige Phagenwirkstoffe aus einer dreistelligen Anzahl von Phagen auszuwählen, zu charakterisieren und GMP-konform, d.h. den höchsten Qualitätsanforderungen folgend, herzustellen. Es gelang weiterhin im Bereich der Mikrobiologie die Suszeptibilitätstestung (Phagogramm) zu etablieren und in der Apotheke die Voraussetzungen zu schaffen, patientenindividuelle Mischungen der Phagenwirkkomponenten unter den erforderlichen Reinraumbedingungen zu mischen und anschließend den Kliniken zur Verfügung zu stellen.

Leider war es nicht möglich, das ursprüngliche Ziel von fünf bis zehn Phagenwirkstoffen für drei der priorisierten Zielerreger zu isolieren, zu charakterisieren und herzustellen. Aufgrund der geringen personellen Ressourcen im Bereich der Mikrobiologie verzögerten sich in der Folgezeit die erforderlichen Zeiträume für die Suszeptibilitätstestung, so dass der ursprünglich festgelegte Zeitraum von 14 Tagen (zwischen Erregerisolation und Beginn Bakteriophagentherapie) in der Regel gerissen wurde. Die erforderlichen Schritte waren nicht in den Routinebetrieb integrierbar, sondern immer ein organisatorisches Add-on geblieben. Von Seiten der Apotheke war es in keinem Fall zu einer Verzögerung gekommen.

Klinisch zeigte sich, dass die Kombination der zur Verfügung stehenden Phagen nur in ca. 64% *in vitro* (d.h. im Rahmen der Suszeptibilitätstestung) erfolgreich die jeweiligen bakteriellen Erreger lysieren konnten.

Zu betonen ist, dass bei der Anwendung der Phagen keinerlei Nebenwirkungen und Komplikationen beobachtet werden konnten. In einigen Fällen konnten ein klinischer Erfolg mit hoher Wahrscheinlichkeit der Bakteriophagentherapie zugesprochen werden. In anderen Situationen, in der neben der Bakteriophagentherapie sowohl chirurgisch als auch antibiotisch behandelt werden musste, kann der schlussendlich verzeichnete Erfolg nicht der Bakteriophagentherapie allein zugeordnet werden. In der Gesamtsicht muss vor dem Hintergrund der Projektergebnisse und der Erfahrung mit zahlreichen Schwierigkeiten bei der Projektdurchführung davon ausgegangen werden, dass bei Vorliegen einer ausreichenden Anzahl von Phagenwirkstoffen, der Integration des Phagogramms in den mikrobiologischen Routinebetrieb und der Möglichkeit entweder fertige Cocktails einzukaufen oder in der

Krankenhausapotheke Phagencocktails zu mischen, ein Therapiebeginn wenige Tage nach Erregerisolation realisierbar sein wird.

Fortführung bzw. Weiterentwicklung des Projekts:

Teilaspekte des Projektes sollten unbedingt fortgeführt und weiterentwickelt werden. Dies betrifft die Fortführung der Phagenisolation, -charakterisierung und -herstellung, die Implementierung der Phagogramm-Technik in den mikrobiologischen Routine-Alltag sowie das Schaffen von Herstellungsmöglichkeiten von Phagemischungen in Krankenhausapotheken. Eine Fortführung der beabsichtigten Praktikabilitätstestung ist allerdings nicht notwendig. Das Projekt zeigte eindeutig, dass die derzeitigen infrastrukturellen Gegebenheiten für eine routinemäßige Implementierung der Bakteriophagentherapie in die bestehenden Abläufe nicht ausreichend ist. Zur Realisierung der einzelnen Teilaspekte muss eine infrastrukturelle Anpassung erfolgen.

Die GMP-konforme Herstellung einiger guter Phagen und die Vorhaltung in der Apotheke wäre bei entsprechenden Abrechnungsmöglichkeiten denkbar. Es muss jedoch zusätzlich eine Möglichkeit geben, wirklich patientenindividuell Phagen zur therapeutischen Anwendung herzustellen und nicht nur patientenindividuell Zubereitungen aus einer begrenzten Menge bereits vorhandener Phagen-Wirkkomponenten zu formulieren. Die GMP-konforme Herstellung sämtlicher klinisch benötigter Phagen ist nicht wirtschaftlich möglich. Dadurch ergibt sich das gleiche Problem wie bei Reserveantibiotika. Die Phagen, bei denen ein Einsatz aufgrund des Wirtsbereichs nicht wahrscheinlich ist, würden nur Kosten bei der Herstellung und Lagerung erzeugen, aber selten zum Einsatz kommen.

Beitrag des Projekts zur Weiterentwicklung der GKV-Versorgung:

Das Projekt zeigte einen erheblichen Bedarf an einer Bakteriophagentherapie. Die zahlreichen Patientenfragen und Nachfragen von Klinikern und niedergelassenen Kollegen zeigen auf, dass viele Patienten in Deutschland in einer Situation sind, in der die bisherige Standardtherapie keine weiteren therapeutischen Erfolge erzielen kann und Alternativen oder Ergänzungen zur bisherigen Therapie von Nöten sind. Das Projekt konnte eindrucksvoll darstellen, welcher enorme zusätzliche Aufwand das strenge Befolgen einer GMP-konformen Herstellung bedeutet. Statt ein GMP-System für Phagen zu etablieren, wurden wir gezwungen die Phagen ins bestehende System zu integrieren. Für das eigentliche Ziel eine patientenindividuelle Herstellung zu ermöglichen, muss es nach unserer Auffassung risikobasiert möglich sein auf Sicherheitsaspekte zu verzichten. In Belgien ist diese Erkenntnis schon seit einem Jahrzehnt die Basis dafür, in einem staatlich anerkannten Zertifizierungsprozess die Phagenherstellung zu ermöglichen, ohne die strengen Auflagen der Einhaltung von GMP-Standards unreflektiert übergestülpt zu bekommen. Das Projekt konnte ebenfalls zeigen, dass bei einer ausreichenden Bevorratung mit Phagenwirkstoffen eine Therapie innerhalb weniger Tage nur dann möglich ist, wenn die personellen Ressourcen im mikrobiologischen Bereich vorgehalten sind. Das Projekt konnte ebenfalls die Wirksamkeit der Bakteriophagentherapie in Einzelfällen der insgesamt eher geringen Patientenzahl darstellen. In der Gesamtsicht zeigt das Projekt, dass die Bakteriophagentherapie für die GKV-Versorgung erstens dringend erforderlich ist und zweitens realisierbar sein könnte.

Überführung der erzielten Ergebnisse in die Versorgung:

Die alleinige Publikation der in dem Projekt erarbeiteten Erkenntnisse wird in der Versorgungslandschaft keine Änderung herbeiführen. Eine Veränderung der Versorgung der Solidargemeinschaft wird nur dann erreicht werden, wenn die im Projektbericht beschriebenen Aspekte berücksichtigt und die daraus abgeleiteten Maßnahmen auch tatsächlich ergriffen werden. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, dass der Konsortialführer auch der Verfasser des von der Bundesagentur für Sprung-Innovation (SPRIND) in Auftrag gegebenen Validierungsberichtes zum Projekt PHAGE2030 ist, in dem alle Maßnahmen genannt werden, die erforderlich sind, um eine Versorgung der Solidargemeinschaft mit Phagen bis in das Jahr 2030 zu ermöglichen.

Erweiterung bzw. Unterschiede zur derzeit bestehenden Regelversorgung:

Die Bakteriophagentherapie ist bisher in Deutschland nicht zugelassen, das heißt, es gibt keine zugelassenen Phagenprodukte im Sinne des Arzneimittelgesetzes. Es gibt keinen GMP-konform laufenden Herstellungsbetrieb für Phagen in Deutschland. Bakteriophagentherapie kann unter dem ethischen Schutzschirm des individuellen Heilversuches durchgeführt werden. Im Gegensatz hierzu wurde im Rahmen des Projektes PhagoFlow zum ersten Mal in Deutschland, eine Bakteriophagentherapie mit GMP-konform in Deutschland hergestellten Phagen durchgeführt!

Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Leistungserbringern, Netzwerken:

Das Projekt PhagoFlow wurde ermöglicht durch eine intensive Zusammenarbeit mit der DSMZ, dem Fraunhofer ITEM (Braunschweig) und drei Abteilungen des Bundeswehrkrankenhauses Berlin (Unfallchirurgie, Mikrobiologie, Apotheke). Zudem entwickelte sich während des Projektes ein umfangreiches internationales Netzwerk mit zahlreichen Kontakten, die immer wieder bereichernd und wegweisend für die Durchführung des Projektes waren.

Übertragung der Ergebnisse auf andere Populationen, Regionen, Indikationen oder Versorgungsszenarien:

Im Rahmen des Projektes PhagoFlow wurden Patienten mit septischen Wunden im Bereich der unteren Extremität und an der Driveline eines Kunstherzes sowie mit chronischem Harnwegsinfekt, chronischen Lungeninfektionen und chronischer Otitis externa behandelt. Eine Ausweitung auf andere Indikationen ist vor dem Hintergrund dieser Erfahrungen auf jeden Fall möglich. Diese Aussage deckt sich auch mit den Ergebnissen und Beobachtung der Literatur. Die Ergebnisse des PhagoFlow-Projektes erscheinen auch nach Diskussion innerhalb des genannten Netzwerkes für die Ausrichtung der Bakteriophagentherapie für alle europäischen Populationen nutzbar, nicht nur für GKV-Versicherte in Deutschland.

Konkrete nächste Schritte für eine Änderung der Regelversorgung:

- Ausschreibung eines Forschungsprojektes zur besseren Implementierung der Phagogramm-Technik (Suszeptibilitätstestung) in den mikrobiologischen Routine-Alltag. Hierzu müsste die Phagogramm-Technik schneller durchführbar und weiter verbreitet in Deutschland einsetzbar sein.
- Adaptation der Regulatorik für die Herstellung von Phagen-Wirkstoffen an den tatsächlichen Sicherheitsbedarf. Hierfür sollte eine zielführende Orientierung an den

derzeitigen Standard der belgischen Kollegen im Queen Astrid Military Hospital in Brüssel erfolgen.

- Die regulatorische Voraussetzung für eine Herstellung von Phagenwirkstoffen muss in Deutschland bundesweit einheitlich erfolgen und kann nicht in der Verantwortung der einzelnen Bundesländer liegen.
- Zielführend ist eine finanzielle Unterstützung (Ausschreibung wissenschaftlicher Studien), um randomisiert-kontrollierte klinische Studien für einzelne Indikationen durchzuführen.
- Es muss möglich werden, bei einer Therapie mit magistralen Phagenprodukten ein Zusatzentgelt zu erhalten.

Versichertenpotenzial, Spanne der Vergütungshöhe der Einzelleistungen, ggf. gesundheitspolitische Auswirkungen:

Es wird davon ausgegangen, dass über 60.000 Patienten pro Jahr mit Infektionen durch multiresistente Erreger behandlungspflichtig werden. Für diese Patienten stehen bislang nur noch wenige Antibiotika oder teilweise Reserveantibiotika zur Verfügung. In einzelnen Situationen besteht aufgrund einer Panresistenz keinerlei Möglichkeit einer Therapie mit Antibiotika. Die Therapie mit Reserveantibiotika ist sehr teuer (Behandlungskosten pro Tag von 1000 - 2000 €). Oftmals bedingt die notwendige Applikationsform zusätzlich die stationäre Aufnahme des Patienten, wodurch die Therapie in der Gesamtbetrachtung aller Aufwendungen extrem teuer wird. Hinzu kommt die Notwendigkeit in vielen Fällen ein therapeutisches Drug Monitoring (TDM) durchzuführen, um den optimalen Wirkspiegel des Reserveantibiotikums zu finden, was zusätzliche Ressourcen bindet. Folglich kann eine mehrtägige stationäre Antibiotikatherapie mit Reservetherapeutika finanzielle Aufwendungen im Bereich von 10.000 - 30.000 € erfordern. Dies macht nachvollziehbar, warum eine in diesem Jahr in Frankreich zu Ende gehenden Studie zur Erforschung der Bakteriophagentherapie dazu führte, dass die Phagenprodukte herstellende Firma pro Therapie eines Patienten eine Erstattung von ca. 20.000 - 25.000 € erhielt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in Georgien eingekaufte Phagenprodukte für die Therapie eines Patienten Kosten in der Größenordnung von 1.500 – 2.500 € erzeugen. Solange in Deutschland noch keine fertigen Cocktails (commercial off-the-shelf Produkte) zugelassen sind und daher eine patientenindividuelle magistrale Herstellung erfolgt, sollte es eine Kostenerstattung für die Herstellung der Phagenprodukte durch die Gewährung eines Zusatzentgeltes (NUB-Verfahren, InEK) geben.

In der Gesamtsicht kann die Bakteriophagentherapie hinsichtlich der anzunehmenden und prognostizierten katastrophalen gesundheitspolitischen und wirtschaftlichen Auswirkungen der Multiantibiotikaresistenz erheblich zur Dämpfung der Ausgabenseite beitragen.

Bisherige eigene Maßnahmen und Vorhaben:

- Mitarbeit bei dem Technologie-Folgenabschätzungs-Gutachten für den Bundestag zum Thema Bakteriophagentherapie in Deutschland
- Durchführung des Validierungsgutachtens zum SPRIN-D Projekt PHAGE2030

- Kontaktaufnahme zur Abteilungsleitererebene im Bundesministerium für Gesundheit. Mehrere Sitzungen mit Staatssekretär Steffen und Professor Broich (BfArM) zur Unterstützung und Beschleunigung der Implementierung der Bakteriophagentherapie in die Versorgungslandschaft in Deutschland
- Mitarbeit bei der Erstellung der S2k-Leitlinie „Personalisierte Bakteriophagen-Therapie in Deutschland“

7 Erfolge bzw. geplante Veröffentlichungen

Paper:

Dannheim, A., Korf, I., Wienecke, S., Ziehr, H. (2021); Herstellungsverfahren von Phagen für eine alte Therapie in neuen Kleidern, PHARMAKON, Band 9, Nummer 6, November 2021, S. 448-453 DOI:10.1691/pn.20210045

Willy, C., Würstle, S., Häfner, M., Müller, M., Classen, A. Y., Vehreschild, M., Bugert, J., Ziehr, H. (2021), Magistrale Anwendung von Bakteriophagen Magistrale Anwendung von Bakteriophagen, PHARMAKON, Band 9, Nummer 6, November 2021, S. 476-484(9); DOI: <https://doi.org/10.1691/pn.20210049>

Willy, C., Bugert, J., Classen, A., Deng, L., Düchting, A., Gross, J., Hammerl, J., Korf, I., Kühn, C., Lieberknecht-Jouy, S., Rohde, C., Rupp, M., Vehreschild, M., Vogeles, K., Wienecke, S., Witznath, M., Würstle, S., Ziehr, H., Moelling, K., Broecker, F. (2023) Phage Therapy in Germany-Update 2023. Viruses. 2023 Feb 20;15(2):588

Wittmann, J., Bunk, B., Korf, I. et al. (2023). Therapie-Phagen: Voraussetzung für die Anwendung geschaffen. Biospektrum 29, 222 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12268-023-1917-8>

Geplante Paper:

Rieper, F., Wittmann, J., Bunk, B., Spröer, C., Häfner, M., Willy, C., Ziehr, H., Korf, I., Jahn, D. Systematic bacteriophage selection for the lysis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* strains

Poster:

Korf, I., Rohde, C., Wittmann, J., Hebecker, S., Wienecke, S., Ross, A., Ziehr, H., Gatzler, R., Lang, B., Ahrens, R., Wenzel, W., Müller, M., Garbe, D., Vogt, D., Stichling, M., Häfner, M., Willy, C. (2019); PhagoFlow – The German approach for magistral phage preparation for therapy of infected wounds; Phages Europe 2019

Korf, I., Wienecke, S., Hebecker, S., Ziehr, H., Rohde, C., Wittmann, J., Lang, B., Wenzel, W., Müller, M., Garbe, D., Stichling, M., Häfner, M., Willy, C. (2021); PhagoFlow - Practicability and hurdles of individualized phage therapy in Germany ; MBDC 2021

Korf, I., Wienecke, S., Ziehr, H. (2023); GMP - compliant production of phages; DGHM 2023

Korf, I., Häfner, M., Wienecke, S., Rohde, C., Wittmann, J., Leddin, M., Wenzel, W., Halama, K., Garbe, D., Stichling, M., Ziehr, H. and Willy, C. (2024). PhagoFlow – Practicability of Phage Therapy in Germany, DGHM 2024

Rieper, F., Korf, I., Wienecke, S., Jahn, D., Ziehr, H. (2023); Isolation and characterisation of Pseudomonas aeruginosa phages with therapeutic potential; VOM 2023

Vorträge:

Häfner, M., Korf, I., Wienecke, S., Rohde, C. Wittmann, J., Leddin, M., Wenzel, W., Halama, K., Garbe, D., Stichling, M., Ziehr, H., Willy, C. (2024). PhagoFlow – Praktikabilitätstestung der Bakteriophagentherapie in Deutschland, BCG Kongress Berlin 2024

Häfner, M., Korf, I., Hagmann, J., Schwartz, J., Wienecke, S., Rohde, C. Wittmann, J., Leddin, M., Wenzel, W., Halama, K., Garbe, D., Stichling, M., Ziehr, H., Willy, C. (2024). PhagoFlow – Praktikabilitätstestung der Bakteriophagentherapie am Bundeswehrkrankenhaus Berlin, DGWMP Jahreskongress, Augsburg, geplant in 2024

IV Literaturverzeichnis

Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res, 36(6), 697-705. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.009

Alt, V., Gessner, A., Merabishvili, M., Hitzenbichler, F., Mannala, G. K., Peterhoff, D., . . . Rupp, M. (2024). Case report: Local bacteriophage therapy for fracture-related infection with polymicrobial multi-resistant bacteria: hydrogel application and postoperative phage analysis through metagenomic sequencing. Frontiers in Medicine, 11. doi:10.3389/fmed.2024.1428432

Arzneimittelgesetz. (2024). Retrieved from https://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/

Bekanntmachung zu EPC 5.31 (06/04/2023). Retrieved from https://www.edqm.eu/en/-/public-consultation-on-new-general-chapter-on-phage-therapy-active-substances-and-medicinal-products-for-human-and-veterinary-use-in-pharmeuropa-35.2?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3Dbacteriophage

Bhargava, K., Nath, G., Bhargava, A., Aseri, G. K., & Jain, N. (2021). Phage therapeutics: from promises to practices and prospectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(24), 9047-9067. doi:10.1007/s00253-021-11695-z

Bretonneau L, Tremblais K, Aubrit F, Meichenin M, Arnaud I. Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products. Front Microbiol. 2020 Jun 4;11:1161. doi: 10.3389/fmicb.2020.01161. PMID: 32582101; PMCID: PMC7287015.

Cassini, A., Hogberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., . . . Burden of, A. M. R. C. G. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. Lancet Infect Dis, 19(1), 56-66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4

Chanishvili, N. (2016). Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the Soviet and post Soviet experiences. Current drug delivery, 13(3), 309-323.

ClinicalTrials.gov. (2024). Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/search?intr=phage&sort=StudyFirstPostDate&aggFilters=phase:3>

Cook, M. A., & Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Sci Transl Med*, 14(657), eabo7793. doi:10.1126/scitranslmed.abo7793

D'Herelle, F. (1929). Studies upon Asiatic cholera. *The Yale journal of biology and medicine*, 1(4), 195.

d'Herelle, F. (1931). Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull N Y Acad Med*, 7(5), 329-348. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19311785>

d'Hérelle, F. (1921). *Le bactériophage: son role dans l'immunité*: Masson et cie.

D'Herelle, F., & Malone, R. H. (1927). A Preliminary Report of Work Carried out by the Cholera Bacteriophage Enquiry. *Ind Med Gaz*, 62(11), 614-616. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29010807>

Eaton, M. D., & Bayne-Jones, S. (1934). Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association*, 103(23), 1769-1776.

EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Retrieved from https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en

EU-Richtlinie 2001/83/EG. (2001). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ%3AL%3A2001%3A311%3A0067%3A0128%3ADE%3APDF>

EU-Verordnung 536/2014. (2014). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0536>

[GenBank \(NCBI\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

George Eliava Institute of Bacteriophages, M. a. V. About Us. Retrieved from <https://eliava-institute.org/about/?lang=en>

GMP-Navigator. Retrieved from <https://www.gmp-navigator.com/>

GMP-Verlag Peither. Retrieved from <https://www.gmp-verlag.de/de>

Gratia, A. (1921). Studies on the d'Herelle Phenomenon. *J Exp Med*, 34(1), 115-126. doi:10.1084/jem.34.1.115

Gratia, A. (1922). The Twort-D'herelle Phenomenon : II. Lysis and Microbic Variation. *J Exp Med*, 35(3), 287-302. doi:10.1084/jem.35.3.287

Gratia, A. (1936). Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophages. Paper presented at the *Annales de l'Institut Pasteur*.

Hancock, R. E. W., & Knowles, D. (1998). Are we approaching the end of the antibiotic era? *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), 493-494. doi:[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80079-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80079-9)

Häusler, T. (2006). *Viruses vs. Superbugs, a Solution to the Antibiotic Crisis*. In: MacMillan, New York.

Institut, R. K. (15.11.2019). Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Krankenhausinfektionen und Antibiotikaresistenz. Retrieved from https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhausinfektionen-und-Antibiotikaresistenz/FAQ_Liste.html

ICH Guidelines. Retrieved from <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>

Krueger, A. P., & Scribner, E. J. (1941). The bacteriophage: its nature and its therapeutic use. *Journal of the American Medical Association*, 116(20), 2269-2277.

Leupold, F. G. (2018). Die Geschichte des VEB Serum-Werk Bernburg von 1954 bis 1990 unter besonderer Berücksichtigung biogener Arzneistoffe.

Mulzer, J., Trampuz, A., & Potapov, E. V. (2019). Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 57(5), 1003-1004. doi:10.1093/ejcts/ezz295

Northrop, J. H., & Krueger, A. P. (1932). The Role of Intracellular Bacteriophage in Lysis of Susceptible Staphylococci. *J Gen Physiol*, 15(3), 329-332. doi:10.1085/jgp.15.3.329

Peankuch, E., & Kausche, G. (1940). Isolierung und, übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen. *Naturwissenschaften*, 28(3), 46-46.

Pirnay, JP., Blasdel, B.G., Bretaudeau, L. et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharm Res* 32, 2173–2179 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1617-7>

Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Ceysens, P.-J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., & Fauconnier, A. (2018). The Magistral Phage. *Viruses*, 10(2). doi:10.3390/v10020064

Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197(8), 1079-1081. doi:10.1086/533452

Rubalskii, E., Ruemke, S., Salmoukas, C., Boyle, E. C., Warnecke, G., Tudorache, I., . . . Haverich, A. (2020). Bacteriophage Therapy for Critical Infections Related to Cardiothoracic Surgery. *Antibiotics (Basel)*, 9(5). doi:10.3390/antibiotics9050232

Ruska, H. (1940). Die Sichtbarmachung der bakterien Lyse im Übermikroskop. *Naturwissenschaften*, 28(3), 45-46.

Schlesinger, M. (1934). Zur Frage der chemischen Zusammensetzung des Bakteriophagen. *Biochem. Z*, 273, 306.

Spellberg, B. (2008). Antibiotic resistance and antibiotic development. *Lancet Infect Dis*, 8(4), 211-212; author reply 212-214. doi:10.1016/S1473-3099(08)70048-3

Stent, G. S. (1964). Papers on bacterial viruses.

Summers, W. C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*, 55, 437-451. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.437

Theuretzbacher, U., Outterson, K., Engel, A., & Karlén, A. (2020). The global preclinical antibacterial pipeline.

Towse, A., Hoyle, C. K., Goodall, J., Hirsch, M., Mestre-Ferrandiz, J., & Rex, J. H. (2017). Time for a change in how new antibiotics are reimbursed: Development of an insurance framework for funding new antibiotics based on a policy of risk mitigation. *Health Policy*, 121(10), 1025-1030. doi:<https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2017.07.011>

Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra microscopic viruses. *The Lancet*, 1241-1243.

Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127-181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001

Willy, C., Bugert, J. J., Classen, A. Y., Deng, L., DÜchting, A., Gross, J., . . . Broecker, F. (2023). Phage Therapy in Germany-Update 2023. *Viruses*, 15(2). doi:10.3390/v15020588

V Anlagen

- Anlage 1: Apotheke AA Mikrobiologische Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen
- Anlage 2: Apotheke AA Personalhygiene Sterilbereich
- Anlage 3: Apotheke AA Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal
- Anlage 4: Apotheke AA Raumhygiene Sterilbereich
- Anlage 5: Apotheke Aktenvermerk AMÜBBw Inspektion vom 13.04.2019
- Anlage 6: Apotheke FB Dokumentation Raumhygiene Sterilbereich
- Anlage 7: Apotheke FB Hygienemonitoring
- Anlage 8: Apotheke FB Personalhygiene Sterilbereich
- Anlage 9: Apotheke FB Personalvalidierung
- Anlage 10: Apotheke FB Probenliste Hygienemonitoring
- Anlage 11: Apotheke FB Protokoll für die Sterilgut-Herstellung
- Anlage 12: Apotheke FB Raumhygiene Sterilbereich
- Anlage 13: Apotheke HD Phagenwirkkomponenten in isotonischer Kochsalzlösung
- Anlage 14: Apotheke Rechenblatt Phagenverdünnung
- Anlage 15: Phagogramme (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 16: Phagenanforderung Vorlage
- Anlage 17: Behandlungsdaten (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 18: Lyseeffizienz (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 19: Wirtsspektrum_Saureus (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 20: Wirtsspektrum_Ecoli (gesperrt bis 30.09.2025)

- Anlage 21: Wirtsspektrum_Pae (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 22: Details Methodik DSMZ_ITEM (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 23: Phagendatenblatt_Vorlage (gesperrt bis 30.09.2025)
- Anlage 24: Mikrobiologie Auswertung Phagogramm
- Anlage 25: Mikrobiologie Protokoll Testung Phagogramm
- Anlage 26: Mikrobiologie SOP Suszeptilitätstestung



Abt XXIV Apotheke Arbeitsanweisung

Mikrobiologische Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen

AA 301-714-02-01

Seite 1 von 4

gültig ab: Datum der Freigabe

Ziel/Zweck	Regelung der Vorgehensweise zur mikrobiologischen Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen.
Anwendungsbereich	Sterilbereich Raum 4.25 und 4.26
Mitgeltende Dokumente	PB 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-714-01 Durchführung und Dokumentation von Hygienemaßnahmen* AA 301-714-03 Raumhygiene Sterilbereich* AA 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich* FB 301-714-03 Probenliste Hygienemonitoring*
Qualitätsaufzeichnungen	FB 301-714-03 Probenliste Hygienemonitoring*

* in der gültigen Version

erstellt	geprüft	freigegeben
HptBtsm Kriese	OStAp Halama	FIAp Garbe



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Mikrobiologische Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen

AA 301-714-02-01

Seite 2 von 4

gültig ab: Datum der Freigabe

1 Durchführung und Zuständigkeiten

Die mikrobiologische Prozessüberwachung setzt sich aus produktionstäglicher mikrobiologischer Prozesskontrolle und mikrobiologischem Umgebungsmonitoring zusammen.

Die mikrobiologische Prozessüberwachung führt ausschließlich geschultes und eingewiesenes Personal der Apotheke durch.

1.1 Produktionstägliche mikrobiologische Prozesskontrolle

Die produktionstägliche mikrobiologische Prozesskontrolle wird innerhalb des Isolators durchgeführt. Materialien sind gem. AA „Raumhygiene Sterilbereich“ in den Isolator einzubringen. Es werden 5 mL aus einer Infusions-/Injektionslösung (Konnektionsstellen zuvor mit *iso*-Propanol 70 % (V/V) wischdesinfizieren) mit Natriumchlorid-Lösung 0,9 % mit einer sterilen 10 mL-Spritze entnommen und in eine bereitgestellte Caso-Bouillon-Flasche überführt. Dieser Vorgang wird jeweils am Anfang, in der Mitte und am Ende der Herstellung durchgeführt.

Bei einwandfreiem Arbeiten darf es nicht zu einer Kontamination des Produktes bzw. der Caso-Bouillon-Flaschen kommen.

1.2 Mikrobiologisches Umgebungsmonitoring

Die Umgebungsbedingungen im Sterilbereich sollen durch geeignete Kontrollen der Luft, kritischer Oberflächen und des Personals überprüft werden. Die Messpunkte für das Umgebungsmonitoring sind in dem zugehörigen Formblatt (FB „Probenliste Hygienemonitoring“) festgelegt.

1.2.1 Passive Luftkeimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Luftkeimzahl werden Sedimentationsplatten an festgelegten kritischen Messpunkten aufgestellt.

a) Produktionstägliche Luftkeimzahlbestimmung:

Die Sedimentationsplatten verbleiben für die Dauer der Herstellung an den festgelegten Messpunkten innerhalb des Isolators/Reinraum.

b) Wöchentliche Luftkeimzahlbestimmung:

Die Durchführung kann unabhängig von der Herstellung erfolgen. Die Sedimentationsplatten verbleiben über die Zeitdauer von max. 4 Stunden an den festgelegten Messpunkten.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Mikrobiologische Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen

AA 301-714-02-01

Seite 3 von 4

gültig ab: Datum der Freigabe

1.2.2 Abklatschtest von kritischen Oberflächen und Personal

Die Untersuchungen des Personals erfolgen produktionstäglich mittels Abklatschplatten.

Die Untersuchungen der kritischen Oberflächen und des Personals erfolgen einmal wöchentlich mittels Abklatschplatten und können unabhängig von der Herstellung erfolgen.

Die Abklatschplatten werden 5 Sekunden auf die Oberfläche gedrückt. Anschließend wird die Fläche mit *iso*-Propanol 70 % (V/V) desinfiziert.

Zur Überprüfung des Personals drückt der Herstellende die Fingerkuppen beider Hände auf zwei Abklatschplatten (5-Finger-Handschuhabdruck).

1.3 Untersuchung und Auswertung

Die Proben werden durch die Abteilung XXI des Bundeswehrkrankenhauses Berlin (Mikrobiologie) inkubiert und ausgewertet.

1.4 Grenzwerte für die mikrobiologische Kontamination

Die Beurteilung der Untersuchungen erfolgt nach den Empfehlungen gemäß EU-GMP-Guideline Annex 1. Keimzahlen im Betriebszustand.

Empfohlene Grenzwerte für die mikrobiologische Kontamination

Klasse	Sedimentationsplatten KBE/4 Stunden ¹	Abklatschplatten Oberflächen KBE/Platte	Abklatschplatten Handsuhabdruck KBE/Handschuh
A	kein Wachstum		
B	5	5	5
C	50	25	25
D	100	50	50

1) Sedimentplatten sollten für die Dauer des Betriebs ausgelegt und bei Bedarf nach spätestens 4 Stunden gewechselt werden. Die Expositionszeit darf keine Austrocknung der verwendeten Medien zulassen.

Für die Einzelmessungen werden die für die entsprechende Reinraumklasse empfohlenen Grenzwerte (siehe Tabelle) gleichzeitig als Warngrenzen definiert. Bei Überschreitung ist eine erhöhte Aufmerksamkeit erforderlich und der verantwortliche Apotheker über diese Abweichung zu informieren.

Als Aktionsgrenzen werden die Grenzwerte der nächst schlechteren Reinraumklasse bzw. häufiges Überschreiten der Warngrenze definiert (bei Überschreitung ist ein Eingreifen erforderlich, die Ursache muss untersucht und dokumentiert werden). Beim Überschreiten der Aktionsgrenzen bzw. bei häufigem Überschreiten der Warngrenzen müssen die



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Mikrobiologische Prozessüberwachung bei der Herstellung steriler Zubereitungen

AA 301-714-02-01

Seite 4 von 4

gültig ab: Datum der Freigabe

Ursachen untersucht und geeignete Maßnahmen eingeleitet werden. Die Ergebnisse und die ergriffenen Maßnahmen werden dokumentiert.

Klasse	Sedimentationsplatten KBE/4 Stunden		Abklatschplatten Oberflächen KBE/Platte		Abklatschplatten Handschuhabdruck KBE/Handschuh	
	WG	AG	WG	AG	WG	AG
A	-	1	-	1	-	1
B	5	50	5	25	5	25
C	50	100	25	50	25	50
D	100	200	50	100	50	100

1.5 Materialbedarf

- Abklatschplatten Ø 55 mm Caseinpepton-Sojapepton-Agar mit Enthemmer
- Sedimentationsplatten Ø 90 mm Caseinpepton-Sojapepton-Agar
- Caso-Bouillon-Flaschen Caseinpepton-Sojapepton-Bouillon
- NaCl 0,9 % Infusionslösung
- *iso*-Propanol 70 % (V/V)
- sterile Einmalspritzen 10 mL
- sterile Kanülen
- sterile Mullkompressen

1.6 Übersicht durchzuführender Maßnahmen

Maßnahme	Wann?	Wo?	Kapitel
Mikrobiologische Prozesskontrolle	produktionstäglich	Isolator	1.1
passive Luftkeimzahlbestimmung	produktionstäglich	Isolator	1.2.1
passive Luftkeimzahlbestimmung	wöchentlich	Isolator Reinraum	1.2.1
Abklatschtest von kritischen Oberflächen und Personal	produktionstäglich/ wöchentlich	Isolator Reinraum	1.2.2



Abt XXIV Apotheke Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 1 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Ziel/Zweck	Regelung der Maßnahmen zur Personalhygiene bei Betreten und Verlassen des Sterilbereichs sowie während der Herstellung steriler Zubereitungen.
Anwendungsbereich	Sterilbereich Raum 4.25 und 4.26
Mitgeltende Dokumente	PB 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-714-01 Durchführung und Dokumentation von Hygienemaßnahmen* AA 301-714-03 Raumhygiene Sterilbereich* FB 301-714-02 Raumhygiene Sterilbereich* FB 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich*
Qualitätsaufzeichnungen	FB 301-714-01 Dokumentation Reinigung Sterilbereich*

* in der gültigen Version

erstellt	geprüft	freigegeben
HptBtsm Kriese	OStAp Halama	FIAp Garbe



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 2 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

1 Durchführung und Zuständigkeiten

Die Maßnahmen dieser Arbeitsanweisung sind von allen Personen einzuhalten, die den Sterilbereich betreten, dort tätig sind und diesen wieder verlassen.

1.1 Verhaltensregeln in den Schleusen und im Sterilbereich

Die Personalschleusen dienen als Übergang von einem nicht klassifizierten Bereich in den Reinraum (Reinraumklasse D). Der Reinraum 4.26 kann durch den Schleusenraum 4.25 betreten werden.

Das Ein- und Ausschleusen von Personen erfolgt nach einem klar definierten Ein- und Ausschleusungskonzept mit dem Ziel, eine Kontamination des Reinraumes auszuschließen. Die Zutrittsstüre der Schleuse und die Tür zum Reinraum dürfen nie gleichzeitig geöffnet sein.

1.2 Allgemeine Regeln im Sterilbereich

- nicht essen, trinken und kauen
- rauchen ist verboten, ebenso ist 60 Minuten vor Betreten des Sterilbereichs das Rauchen zu unterlassen
- keine künstlichen und/oder langen Fingernägel
- keinen Schmuck, Eheringe und Armbanduhren tragen
- keine oder nur pflegende Kosmetika
- nur notwendige Anzahl an Personen (Raum 4.26 = max. 2 Personen)
- kritische Handlungen im Reinraum vermeiden
(niesen, husten, schnelle Bewegungen)

1.3 Einschleusen von Personen

Der Schleusenbereich ist der Raum, welcher direkt an den Reinraum angrenzt. Der Reinraum ist ausschließlich mit PSA zu betreten (Anlage 1).

Beim Einschleusen in den Sterilbereich ist folgende Reihenfolge beim Ankleiden einzuhalten:

- betreten des Schleusenraums in Arbeitskleidung
- Schmuck ablegen (z.B. Ringe, Armbanduhr, Armbänder, Ohrringe)
- hygienische Händedesinfektion durchführen (Anlage 2)
- Mundschutz anlegen (Bart vollständig verdecken)
- Kopfhube anlegen (Haare vollständig verdecken)
- Überschuhe über die Bereichsschuhe ziehen



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 3 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

- hygienische Händedesinfektion durchführen (Anlage 2)
- sterilen Einmalschutzkittel anlegen
- hygienische Händedesinfektion durchführen (Anlage 2)
- sterile Handschuhe anziehen und über die Einmalschutzkittelbündchen ziehen (Anlage 1 und 3)
- berühren von Gesicht, Haaren und unbedeckten Hautstellen mit den Handschuhen vermeiden

1.4 Verhalten im Reinraum

- Bewegungen erfolgen ruhig und gleichmäßig
- Bewegungen, die nicht im Zusammenhang mit der Tätigkeit stehen, vermeiden
- nicht am Kopf kratzen
- nicht die Hände reiben
- nicht die Arme verschränken
- kritische Oberflächen nicht mit der Kleidung berühren
- unnötiges Beugen über die Arbeitsflächen und Körperkontakte (Aufstützen, Anlehnen) mit der Arbeitsfläche vermeiden
- beim Arbeiten innerhalb des Isolators die Arme nicht überkreuzen

1.5 Ausschleusen von Personen

Nach Beendigung der Tätigkeiten oder Herstellung erfolgt das Ausschleusen im Schleusenbereich in umgekehrter Reihenfolge zur Einschleusung.

- sterile Handschuhe ausziehen und werfen (Anlage 4)
- sterilen Einmalschutzkittel ablegen und werfen
- Kopfhaube ablegen und werfen
- Mundschutz ablegen und werfen
- Überschuhe ausziehen



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 4 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 1: Persönliche Schutzausrüstung

Reinraum nur in Schutzausrüstung betreten!





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 5 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 2: Hygienische Händedesinfektion

Standard Einreibemethode für die hygienische Händedesinfektion gem. EN 1500

Schritt 1

Handfläche auf Handfläche, zusätzlich gegebenenfalls die Handgelenke

5 Sekunden



Schritt 2

Rechte Handfläche über linkem Handrücken – und umgekehrt

5 Sekunden



Schritt 3

Handfläche auf Handfläche mit verschränkten, gespreizten Fingern

5 Sekunden





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

Seite 6 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Schritt 4

Außenseite der verschränkten Finger auf gegenüberliegende Handflächen

5 Sekunden



Schritt 5

Kreisendes Reiben des rechten Daumens in der geschlossenen linken Handfläche – und umgekehrt

5 Sekunden



Schritt 6

Kreisendes Reiben mit geschlossenen Fingerkuppen der rechten Hand in der linken Handfläche – und umgekehrt

5 Sekunden



Bei der hygienischen Händedesinfektion das Händedesinfektionsmittel in die hohlen, trockenen Hände geben und über 30 Sekunden nach den aufgeführten Schritten bis zu den Handgelenken einreiben. Die Bewegungen jedes Schrittes fünfmal durchführen. Nach Beendigung des 6. Schrittes werden einzelne Schritte bis zur angegebenen Einreibedauer wiederholt. Darauf achten, dass die Hände die gesamte Einreibedauer feucht bleiben. Im Bedarfsfall erneut Händedesinfektionsmittel entnehmen.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

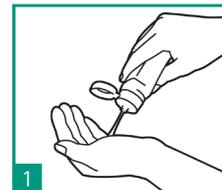
Seite 7 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 3: Anlegen steriler Handschuhe

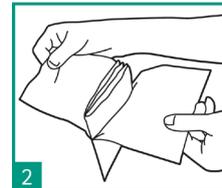
Schritt 1

Führen Sie vor dem Anlegen von sterilen Handschuhen eine hygienische Hände-desinfektion durch.



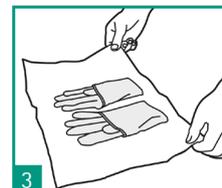
Schritt 2

Prüfen Sie die Verpackung auf Unversehrtheit. Öffnen Sie die unsterile Umverpackung komplett, so dass die sterile Innenverpackung auf einer sauberen und desinfizierten Arbeitsfläche ohne Berührung abgelegt werden kann.



Schritt 3

Öffnen Sie die Verpackung, indem Sie sie vorsichtig an den Ecken anfassen und ausbreiten.



Schritt 4

Nehmen Sie den ersten Handschuh mit Daumen und Zeigefinger an der umgeschlagenen Stulpe auf.



Schritt 5

Ziehen Sie den Handschuh in einer Bewegung über die andere Hand bis zum Handgelenk hoch.





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

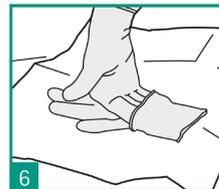
AA 301-714-04-01

Seite 8 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

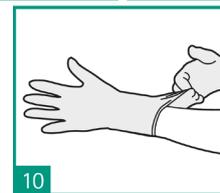
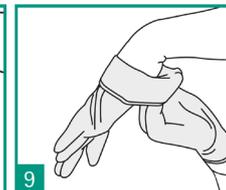
Schritt 6 und 7

Nehmen Sie den zweiten Handschuh auf, in dem Sie die Finger der behandschuhten Hand in die umgeschlagene Stulpe schieben.



Schritt 8 bis 10

Ziehen Sie in einer einzigen Bewegung den zweiten Handschuh an und vermeiden Sie dabei jegliche Berührung der Haut mit den sterilen Außenflächen.



Schritt 11

Wenn notwendig passen Sie die Finger inkl. Zwischenräumen an, bis die Handschuhe richtig sitzen.



Schritt 12 und 13

Führen Sie die Finger der fertig behandschuhten Hand in die noch eingeschlagene Stulpe der anderen Hand und entfalten Sie diese vorsichtig.



Schritt 14

Die behandschuhten Hände dürfen ausschließlich sterile Medizinprodukte und Flächen sowie den zuvor desinfizierten Hautbereich berühren.





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Personalhygiene Sterilbereich

AA 301-714-04-01

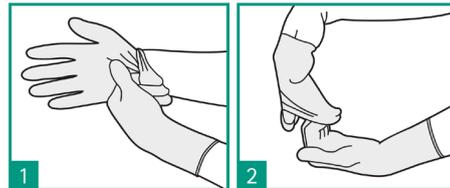
Seite 9 von 9

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 4: Ausziehen steriler Handschuhe

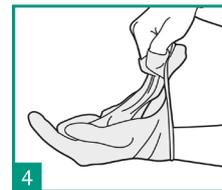
Schritt 1 bis 3

Entfernen Sie den ersten Handschuh, indem Sie ihn mit den Fingern der anderen Hand abziehen. Ziehen Sie den Handschuh aus, indem Sie ihn von innen nach außen, bis zu den zweiten Fingergelenken rollen (nicht vollständig ausziehen).



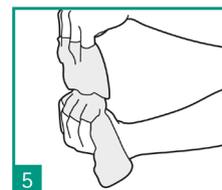
Schritt 4

Halten Sie die Stulpe des halb abgezogenen Handschuhs mit der anderen Hand fest. Entfernen Sie den anderen Handschuh, indem Sie mit den Fingern der teilweise noch behandschuhten Hand in die Stulpe greifen.



Schritt 5

Ziehen Sie den Handschuh aus, indem Sie ihn von innen nach außen kehren. Achten Sie darauf, dass die ungeschützte Haut ausschließlich mit der Innenseite des Handschuhs in Berührung kommt.



Schritt 6

Entsorgen Sie das dabei entstandene Handschuhbällchen (Innenseite der Handschuhe ist jetzt außen) direkt in ein bereitstehendes Abfallbehältnis.



Schritt 7

Abschließend führen Sie eine hygienische Händedesinfektion durch.





Abt XXIV Apotheke Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 1 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Ziel/Zweck	Diese Arbeitsanweisung beschreibt detailliert die Durchführung der Simulation des Herstellprozesses mit Nährmedien zur Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen.
Anwendungsbereich	Herstellung von sterilen Zubereitungen im Sterilbereich Raum 4.25 und 4.26
Mitgeltende Dokumente	PB 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-714-01 Durchführung und Dokumentation von Hygienemaßnahmen* AA 301-714-03 Raumhygiene Sterilbereich* AA 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich* FB 301-714-02 Raumhygiene Sterilbereich* FB 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich* Benutzerinformation BERNER I-[MaxPro] ³
Qualitätsaufzeichnungen	FB 301-714-06 Personalvalidierung*

* in der gültigen Version

erstellt	geprüft	freigegeben
HptBtsm Kriese	OStAp Halama	FIAp Garbe



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 2 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

1 Erläuterungen/Schlüsselbegriffe

Media fill: Nährmedienabfüllung

PTA: Pharmazeutisch-Technische-Assistent

Validierung: Durch die Validierung wird der dokumentierte Beweis erbracht, dass ein Prozess die vorher spezifizierten Anforderungen reproduzierbar im praktischen Einsatz erfüllt.

Prozessvalidierung: Ist eine auf einen definierten Prozess bezogene Validierung zur Sammlung und Auswertung prozessbezogener Daten. Durch sie wird Sicherheit darüber gewonnen, ob der analysierte Prozess kontinuierlich Zubereitungen derselben Qualität herstellt.

2 Durchführung und Zuständigkeiten

2.1 Prozessvalidierung

Die Validierung der aseptischen Herstellungsweise erfolgt durch Simulation der Herstellungsprozesse mittels Abfüllung von Nährmedien (Media fill). Die genaue Beschreibung der Vorgehensweise enthält die Anlage 1. Die Prozessvalidierung ist für jede herstellende Person (z.B.: Apotheker, PTA) in der Sterilherstellung als verpflichtende Erstvalidierung (Eignungsprüfung) durchzuführen. Erst nach Bestehen der Validierung dürfen aseptische Zubereitungen hergestellt werden. Eine Überprüfung (Revalidierung) der aseptischen Arbeitsweise jedes validierten Mitarbeiters erfolgt in festgelegten Zeitintervallen, entweder kontinuierlich (häufige Nährmedienabfüllung in geringem Umfang und summativ Auswertung) oder diskontinuierlich (halbjährlich in größerem Umfang).

Das Durchführungsschema zur Prozessvalidierung der aseptischen Herstellung ist in der Anlage 2 abgebildet.

2.1.1 Erstvalidierung (Eignungsprüfung)

Als initiale Eignungsprüfung führen alle neuen, für die Herstellung vorgesehenen Mitarbeiter eine simulierte Herstellung mit 15 (3 × 5) Nährmedien gemäß den Vorgaben in Anlage 1 durch. Die Eignungsprüfung sollte an drei aufeinanderfolgenden Arbeitstagen durchgeführt werden.

Idealerweise wird die Erstvalidierung des Mitarbeiters am Ende eines Arbeitstages als Zureicher in der Sterilherstellung unter der Sicherheitswerkbank im Reinraum 4.26 durchgeführt.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 3 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Die Prozessvalidierung ist bestanden, wenn in keinem der abgefüllten Nährmedienbeutel eine mikrobielle Kontamination (auftretende Trübung) festzustellen ist.

Erst nachdem die Erstvalidierung bestanden ist, hat der betreffende Mitarbeiter die Qualifikation zur Herstellung von aseptischen Zubereitungen erlangt.

2.1.2 Periodische Revalidierung

Die Revalidierung der herstellenden Mitarbeiter ist im halbjährlichen Turnus erforderlich.

Die periodische Revalidierung besteht aus der Simulation des Herstellprozesses mittels Abfüllung von 5 Nährmedien analog der beschriebenen Vorgehensweise in der Anlage 1. Die Durchführung erfolgt an einem Arbeitstag unter der Sicherheitswerkbank im Reinraum 4.26 nach der routinemäßigen Herstellung der Zubereitungen.

Die Revalidierung ist bestanden, wenn in keinem der abgefüllten Nährmedienbeuteln eine mikrobielle Kontamination (auftretende Trübung) feststellbar ist.

Bei nicht bestehen der Revalidierung, ist die Erstvalidierung (2.1.1) zu wiederholen.

2.1.3 Retrospektive/kontinuierliche Revalidierung

Die periodische Revalidierung kann ausgesetzt werden, wenn der entsprechende Mitarbeiter im Zeitraum der letzten sechs Monate insgesamt an 10 Herstellungstagen jeweils aus einer Nährmedienflasche ein Beutelpaar (A+B) ohne eine feststellbare Kontamination (auftretende Trübung) hergestellt hat. Vorgehensweise wie in Anlage 1 beschrieben.

Wird in einem Beutel ein Keimwachstum nachgewiesen ist eine interventionelle Revalidierung (2.1.4.) notwendig.

2.1.4 Interventionelle Revalidierung

Die interventionelle Revalidierung wird dann vorgenommen, wenn nachvollziehbare Bedenken bestehen, dass der entsprechende Mitarbeiter die aseptische Herstellungsweise in der Herstellung nicht beherrscht. Hinweise hierfür sind das Auftreten von Kontaminationen bei der produktionstäglichen mikrobiologischen Prozesskontrolle oder vermehrte Kontaminationen bei dem 5-Finger-Abklatschtests als herstellende Person.

Die interventionelle Revalidierung besteht aus der Simulation des Herstellprozesses mittels Abfüllung von 5 Nährmedien analog der beschriebenen Vorgehensweise in der Anlage 1.

Die Durchführung erfolgt an einem Arbeitstag unter der Sicherheitswerkbank im Reinraum 4.26 nach der routinemäßigen Herstellung der Sterilzubereitungen.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 4 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Sie ist erfolgreich bestanden, wenn in keinem der abgefüllten Nährmedienbeuteln eine mikrobielle Kontamination (auftretende Trübung) festzustellen ist.

Sollte sie nicht erfolgreich abgeschlossen werden, ist die Erstvalidierung (2.1.1) zu wiederholen.

2.2 Mikrobiologische Kontrolle des Herstellungsprozesses

Die mikrobiologische Kontrolle des Herstellungsprozesses umfasst die produktionstägliche Media Fill Herstellung und die produktionstägliche mikrobiologische Kontrolle der Herstellung.

2.2.1 Produktionstägliche mikrobiologische Kontrolle der Herstellung

Die produktionstägliche Media Fill Herstellung sollte den Herstellungsprozess möglichst genau abbilden. Idealerweise werden komplexe Herstellungen (worst case Prozesse) simuliert. Die Umgebungsbedingungen sollten dabei denen bei der Herstellung der Zubereitungen entsprechen. Während der Nährmedienabfüllung erfolgt ein mikrobiologisches Monitoring mit Sedimentations- und Abklatschplatten. Die Messpunkte innerhalb der Sicherheitswerkbank werden dem FB „Hygienemonitoring“ entnommen (Probennummer 13/15/16).

Die Media Fill Herstellung erfolgt immer am Ende eines Herstellungszyklus (im Regelfall arbeitstäglich nach Beendigung eines Produktionstages). Die Vorgehensweise dieser Nährmediensimulationsherstellung erfolgt genau nach den Vorgaben bei der Erstvalidierung und der Revalidierung wie in Anlage 1 beschrieben. So können am ehesten Rückschlüsse auf den mikrobiologischen Qualitätsstatus während des Herstellungszyklus gezogen werden. Hierbei wird eine Nährmedienflasche verwendet und mit deren Inhalt insgesamt 16 Transfers zur Befüllung eines Beutelpaars (A und B) durchgeführt.

Die Bebrütung, der mit Nährmedium befüllten Beutel, erfolgt hinsichtlich Bebrütungsdauer und -temperatur nach den Vorgaben der Monographie 2.6.1. „Prüfung auf Sterilität“ des aktuellen Ph. Eur..

Nährmedium	Keime	Bebrütungsdauer	Bebrütungstemperatur
Sojapepton-Caseinpepton-Medium	Bakterien Pilze	7 Tage	22,5 °C ± 2,5 °C



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 5 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Nach den ersten 7 Tagen Inkubation erfolgt eine Zwischenablesung auf Keimwachstum. Nach der Gesamtdauer der Bebrütung von 14 Tagen werden die Beutel aus dem Brutschrank genommen und auf Keimwachstum kontrolliert. Ist in nur einem Beutel ein Keimwachstum feststellbar (Warngrenze), erfolgt umgehend eine Ursachenanalyse sowie eine Schulung der herstellenden Person mit besonderem Fokus auf die aseptische Verhaltens- und Arbeitsweise bei der Herstellung. Bedenken hinsichtlich der Beherrschung des aseptischen Herstellungsprozesses und Nachschulungsbedarf liegen vor, wenn zusätzlich bei den letzten 10 Kontrollbeuteln mindestens ein Beutel Keimwachstum aufweist (Aktionsgrenze). Die betreffende Person darf dann erst wieder nach einer erfolgreich abgeschlossenen Revalidierung in der aseptischen Herstellung eingesetzt werden.

2.3 Übersicht durchzuführender Maßnahmen

Maßnahme	Häufigkeit/ Rhythmus	Kommentar	siehe Kapitel
Erstvalidierung (Eignungsprüfung)	bei Bedarf	neue herstellende Mitarbeiter negative Revalidierung	2.1.1
Revalidierung	½-jährlich	herstellende Mitarbeiter	2.1.2
Interventionelle Revalidierung	bei Bedarf	herstellende Mitarbeiter	2.1.4
Produktionstägliche mikrobiologische Kontrolle des Herstellprozesses	produktionstäglich	Nährmediensimulations- herstellung	2.2.1



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 6 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 1:

Nährmediensimulationsherstellung

Allgemeine Grundsätze

Bei der Nährmediensimulationsherstellung sollen die Herstellungsprozesse der aseptischen Herstellung parenteraler Arzneiformen möglichst genau imitiert und möglichst komplexe Prozesse abgebildet werden.

Hierzu zählen insbesondere:

- Entnahme von Lösung aus Vials
- Zugabe von Lösung in Infusionsbeutel
- Entnahme von Lösung aus Infusionsbeutel
- Aufziehen von Lösungen auf Spritzen
- Arbeiten mit verschiedenen Hilfsmitteln (z.B. Spikes, PhaSeal®)

Da die äußeren Bedingungen bei der Simulation den bei der Herstellung üblichen Bedingungen entsprechen sollen, sind die Grundlagen des aseptischen Arbeitens zu beachten und die Arbeits- sowie Desinfektionsschritte sind analog derer bei der Herstellung steriler Zubereitungen durchzuführen.

Die Abfüllungen sind unter Betriebsbedingungen durchzuführen.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 7 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Benötigte Materialien für die Nährmediensimulationsherstellung

		Produktionstägliche mikrobiologische Kontrolle Anzahl
Sojapepton-Caseinpepton-Medium Ph.Eur.	CASO-Bouillon Fa. Oxoid Art.-Nr. BO0369M 100 ml	1 Nährmedienflasche
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit 5% Schafblut	Fa. Oxoid Art.-Nr. PB5012A	5 Sedimentationsplatten
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit Enthammer	Fa. Oxoid Art.-Nr. PO5024C	3 Abklatschplatte
Leerbeutel 100 ml	Infusionsbeutel EVA Luerlock 100 ml Fa. IMF Art.-Nr. MF 1660	2 Leerbeutel
PhaSeal® Infusion Adapter	Fa. BD	2
PhaSeal® Injector	Fa. BD	1
PhaSeal® Protector 55	Fa. BD	1
Spritze 50 ml Luer Lock	Apotheke	1
Spritze 10 ml Luer Lock	Apotheke	1
mit Alkohol getränkte Tücher für Reinraumklassen der Kat. A	Hydroflex <i>V3-109-SII Cleanroom Wipe</i>	1 Packung



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

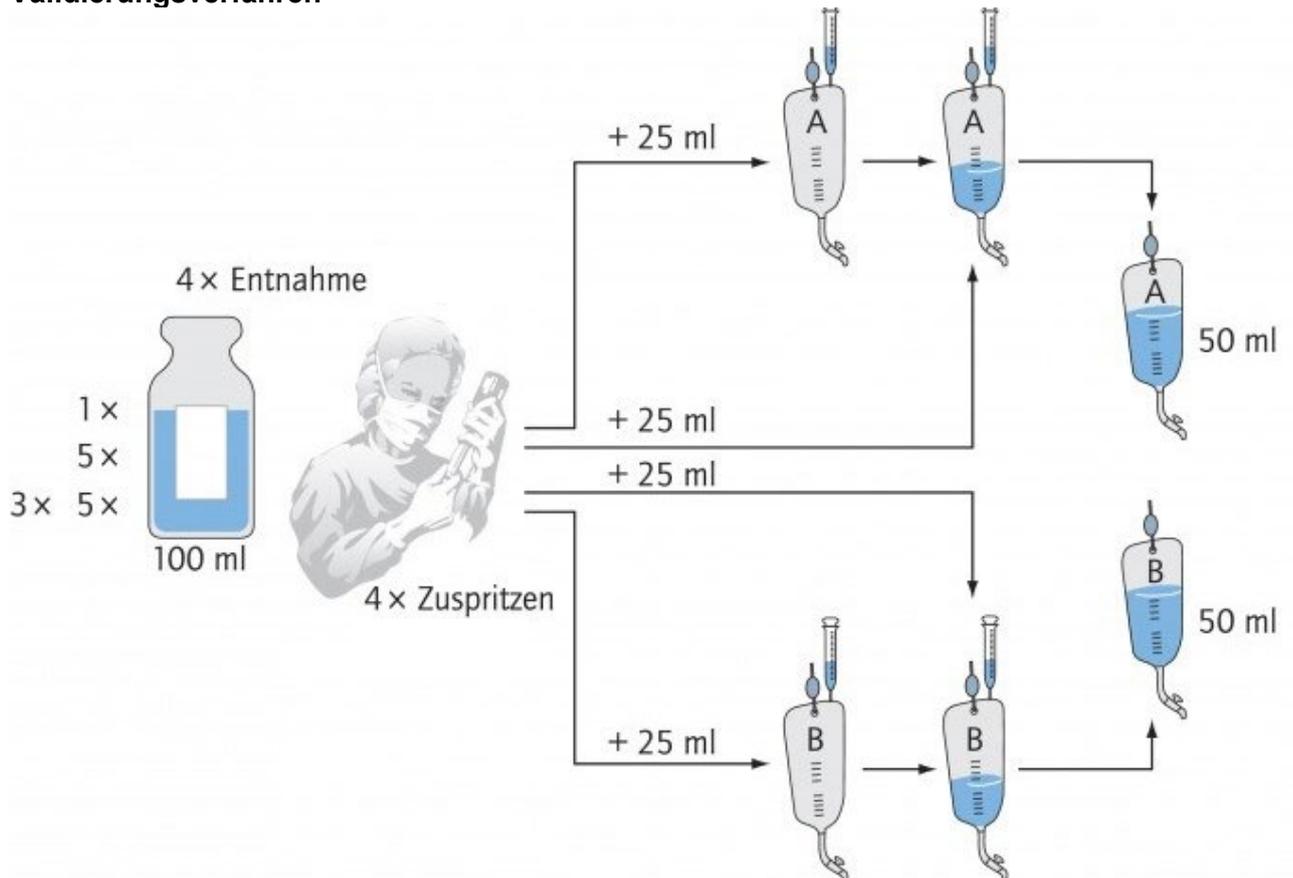
Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 8 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Validierungsverfahren



1 x 100 ml für die **produktionstägliche Kontrolle**
5 x 100 ml für **Revalidierungen** (interventionell)
3 x 5 x 100 ml für die **Eignungvalidierung**

16 Transfers/2 Beutel
80 Transfers/10 Beutel
240 Transfers/30 Beutel



Abt XXIV Apotheke

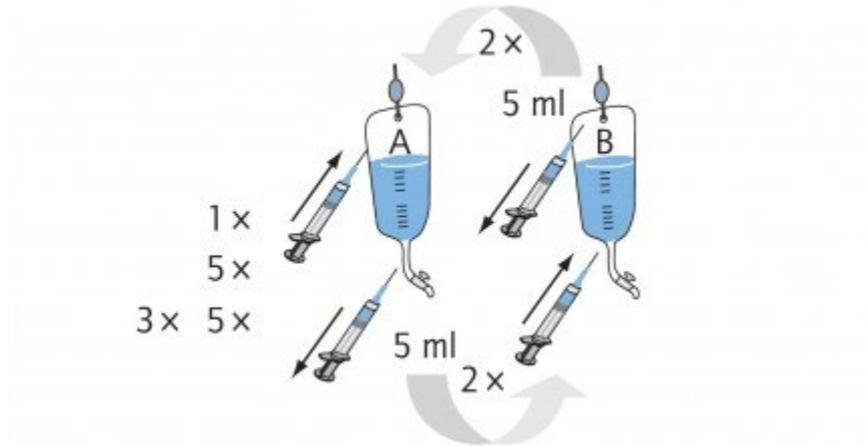
Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 9 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe



Quelle: ADKA-Leitlinie: Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

AA 301-714-05-01

Seite 10 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Durchgeführte **Manipulationen** pro eingesetzter Flasche Nährmedium:

- 4 Entnahmen à 25 mL mit 30 mL Spritze via PhaSeal® Protector 55 aus Infusionsflasche mittels PhaSeal® Injector entnehmen
- 4 Zuspritzungen à 25 mL mit 30 mL Spritze mittels PhaSeal® Injector über PhaSeal® Infusion Adapter in den Beutel zuspritzen
- 4 Entnahmen à 5 mL mit 10 mL Spritze mittels PhaSeal® Injector über PhaSeal® Infusion Adapter aus dem Beutel entnehmen
- 4 Zuspritzungen à 5 mL mit 10 mL Spritze mittels PhaSeal® Injector über PhaSeal® Infusion Adapter in den Beutel zuspritzen

Vorgehen	Manipulationen
<u>Transfer von Infusionsflasche in Beutel A:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Flasche mit Spike versehen. • Mit 50 mL Spritze 25 mL Nährmedium über PhaSeal® Protector 55 aus der Flasche entnehmen. • Spritze mit PhaSeal® Injector versehen. • Beutel A und Beutel B mit PhaSeal® Infusion Adapter versehen. • Nährmedium über PhaSeal® Infusion Adapter in Leerbeutel A einspritzen. • PhaSeal® Injector abdrehen. • Vorgang mit gleicher Spritze und PhaSeal® Injector wiederholen. 	2 Entnahmen via PhaSeal® Protector 55 2 Zuspritzungen mittels PhaSeal® Injector über PhaSeal® Infusion Adapter
<u>Transfer von Infusionsflasche in Beutel B:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Analog der Vorgehensweise wie Transfer in Beutel A 	2 Entnahmen via PhaSeal® Protector 55 2 Zuspritzungen mittels PhaSeal® Injector über PhaSeal® Infusion Adapter
<u>Transfer von Beutel A zu Beutel B/Beutel B zu Beutel A</u> <ul style="list-style-type: none"> • 10 mL Spritze mit PhaSeal® Injector versehen. • 5 mL Nährmedium aus Beutel A entnehmen und über PhaSeal® Infusion Adapter dem Beutel B zuspritzen. • PhaSeal® Injector nach dem zuspritzen dekonnectieren und wieder neu konnectieren. • 5 mL Nährmedium aus Beutel B entnehmen und über PhaSeal® Infusion Adapter dem Beutel A zu spritzen. • Vorgang einmal wiederholen. 	4 Entnahmen über PhaSeal® System 4 Zuspritzungen über PhaSeal® System
<ul style="list-style-type: none"> • Beutel herausreichen und kennzeichnen. (Kennzeichnung mit Datum/A bzw. B/Nummerierung der Buchstaben A bzw. B bei mehreren Beuteln pro Tag/Durchführender) 	



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Prozessvalidierung von pharmazeutischem Personal in der aseptischen Herstellung von sterilen Zubereitungen

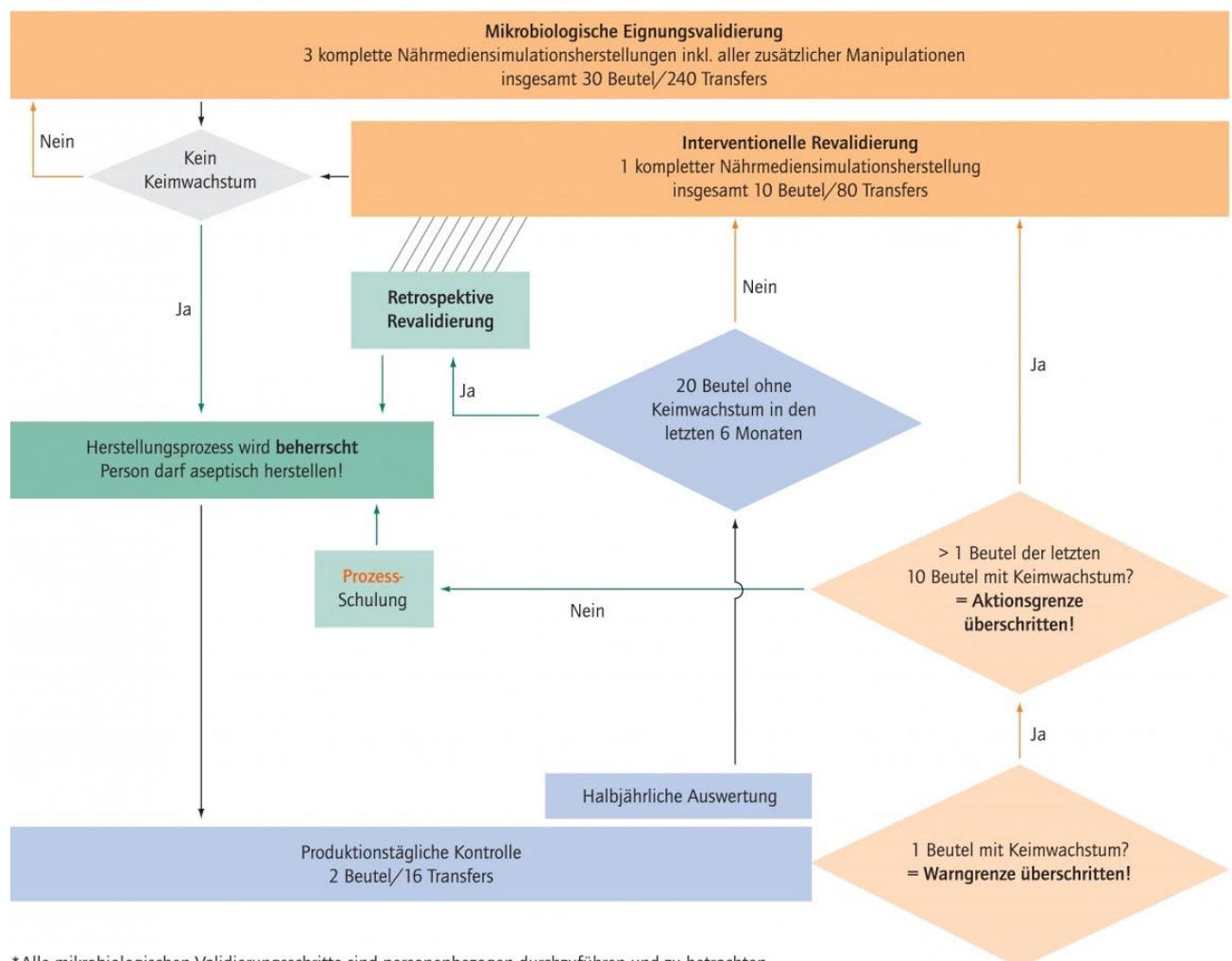
AA 301-714-05-01

Seite 11 von 11

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 2:

Durchführungsschema der Validierung der aseptischen Herstellung



*Alle mikrobiologischen Validierungsschritte sind personenbezogen durchzuführen und zu betrachten

Quelle: ADKA-Leitlinie: Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 1 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Ziel/Zweck	Regelung der Reinigung des Reinraumes für die Herstellung steriler Phagen-Zubereitungen inklusive der Schleusen, Geräte und sonstigen benötigten Materialien zur Vermeidung von Kreuz- und mikrobiologischer Kontamination sowie zur Gewährleistung des Produkt-schutzes.
Anwendungsbereich	Sterilbereich Raum 4.25 und 4.26
Mitgeltende Dokumente	PB 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-851-01 Herstellung von Rezepturarzneimitteln* AA 301-714-01 Durchführung und Dokumentation von Hygienemaßnahmen* AA 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich* FB 301-714-02 Raumhygiene Sterilbereich* FB 301-714-04 Personalhygiene Sterilbereich* Benutzerinformation BERNER I-[MaxPro] ³
Qualitätsaufzeichnungen	FB 301-714-01 Dokumentation Raumhygiene Sterilbereich*

* in der gültigen Version

erstellt	geprüft	freigegeben
HptBtsm Kriese	OStAp Halama	FIAp Garbe



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 2 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

1 Durchführung und Zuständigkeiten

Die Reinigung des Reinraumes inkl. Gerätschaften, der Material-/Personalschleusen sowie des Isolators wird in definierten Reinigungsintervallen durchgeführt. Die Reinigung führt ausschließlich geschultes und eingewiesenes Personal der Apotheke durch. Die wöchentlichen und halbjährlichen Reinigungsmaßnahmen können auch unabhängig von einer Tagesproduktion durchgeführt werden.

1.1 Reinigungsintervalle

Im FB „Raumhygiene Sterilbereich“ werden die produktionstäglichen, wöchentlichen, und halbjährlichen Reinigungsmaßnahmen beschrieben. Der Hygieneplan hängt im Reinraum aus. Die Abfolge der Reinigungsschritte erfolgt gemäß den Tabellen unter 1.1.1, 1.1.2 und 1.1.3.

1.1.1 Produktionstägliche Reinigung

vor Produktionsbeginn:

Nr.	Was	Wie	Womit
1.	zugängliche waagerechte Oberflächen	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V), Reinigungstücher z.B. Vliestuchspendersystem
2.	Türgriffe, Lichtschalter im Reinraum, Stuhl, Waage	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V), Reinigungstücher z.B. Vliestuchspendersystem
3.	Reinraumschleuse	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) Mopp-System, Reinigungstücher z.B. Vliestuchspendersystem
4.	Fußboden (Reinraum)	2-stufiges Nasswischverfahren	Incidin™ OxyFoam S Mopp-System
5.	Isolator (Arbeitsfläche, Rück-, Seitenwände, Frontscheibe innen, Stulpen, Schleusen, Arbeitsmittel)	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V), Mopp-System, sterile Reinigungstücher



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 3 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

nach Produktionsende:

Nr.	Was	Wie	Womit
1.	Isolator (Arbeitsfläche Isolator und Schleusen)	feucht abwischen, trocknen lassen	iso-Propanol 70 % (V/V) sterile Reinigungstücher
2.	Abfälle und Verbrauchsmaterialien	sachgerecht entsorgen	kontaminierte Abfälle: Pacto-Safe nichtkontaminierte Abfälle: Mülleimer

1.1.1.1 Produktionstägliche Reinigung des Isolators

Den Isolator einschalten. Beleuchtung im Nutzraum einschalten. Der Isolator ist betriebsbereit, wenn die grüne Signallampe leuchtet und das akustische Signal nicht mehr ertönt. Bei Störung der Luftströmung leuchtet die Signallampe rot und ein akustisches Signal ertönt.

Die Wischdesinfektion des Isolators erfolgt mit einer Kombination aus mit Alkohol getränkten Mopps für Reinraumklassen der Kat. A (z.B.: *PurMop® EC 20-SV II von der Firma Hydroflex*) und mit Alkohol getränkten Tüchern für Reinraumklassen der Kat. A (z.B.: *V3-109-SII Cleanroom Wipe von der Firma Hydroflex*). Begonnen wird mit der IN-Schleuse (linke Schleuse). Diese wird beginnend mit der linken Seitenwand, über die Rückwand bis zur rechten Seitenwand, dem Boden, dem Rollwagen und der Innenseite der Schleusentür wischdesinfiziert. Danach folgt die Wischdesinfektion des Isolator-Innenraums. Dazu werden die Materialien wischdesinfiziert mit iso-Propanol 70 % (V/V) in den Isolator eingebracht bzw. eingepeelt (siehe 1.3). Die Wischdesinfektion beginnt mit der linken Seitenwand, über die Rückwand bis zur rechten Seitenwand. Es wird von oben nach unten in geraden, langsamen Bewegungen gewischt. Es folgt die Wischdesinfektion der Innenseite der Frontscheibe, inklusive der Armstulpen, mit der Wischrichtung von links nach rechts und von oben nach unten. Im Anschluss wird die Arbeitsfläche von links nach rechts und von hinten nach vorne gewischt. Danach wird mit der OUT-Schleuse (rechte Schleuse) analog zur IN-Schleuse fortgefahren. Zuletzt wird die Außenseite der Frontscheibe des Isolators von links nach rechts in geraden Bahnen von oben nach unten desinfiziert. Allgemein ist darauf zu achten, dass die desinfizierten Bereiche nicht mit dem Arm „übergriffen“ werden um Kontaminationen zu vermeiden. Bei allen Bewegungen der Wischdesinfektion ist darauf zu achten, dass nach jeweils einer gezogenen Bahn das Tuch gefaltet wird bzw. ein neues Tuch genommen wird. Bei der Verwendung des Mopp-Systems ist darauf zu achten, dass immer ein kontinuierlicher Flüssigkeitsfilm an Desinfektionsmittel zurückbleibt. Ist dies nicht mehr möglich, ist der Mopp zu wechseln.

Nach der Wischdesinfektion erfolgt der Handschuhwechsel gemäß Anlage 3.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 4 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

1.1.1.2 Produktionstägliche Reinigung der Fußböden

Zum Reinigen der Fußböden wird Incidin™ OxyFoam S verwendet. Die Reinigung erfolgt nach dem 2-stufigen Nasswischverfahren (siehe Anlage 1). Zuerst wird der Reinraum gewischt, im Anschluss der Vorraum.

1.1.2 Wöchentliche Reinigung

Nr.	Was	Wie	Womit
1.	zugängliche waagerechte Oberflächen	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam/Wipe S
2.	Türgriffe, Lichtschalter, Waschbecken, Tische, Stühle, Edelstahlwagen, Waage	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam/Wipe S
3.	Reinraumschleuse	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam/Wipe S Mopp-System
4.	Fußboden (Reinraum)	2-stufiges Nasswischverfahren Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam S Mopp-System
5.	Isolator (Arbeitsfläche, Auffangwanne, Rück-, Seitenwände, Frontscheibe innen, Schleusen, Arbeitsmittel)	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min Schutzbrille, Atemschutzmaske FFP 3	Klerwipe™ Sporicidal Enhanced Peroxide



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 5 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

1.1.2.1 Wöchentliche Reinigung des Isolators

Den Isolator einschalten (im Reinigungsmodus). Beleuchtung im Nutzraum einschalten. Der Isolator ist betriebsbereit. Die Frontscheibe des Isolators öffnen.

Es erfolgt eine Wischdesinfektion des Isolators mit Wasserstoffperoxid getränkten Tüchern für Reinraumklassen der Kat. A (z.B.: *Klerwipe™ Sporicidal Enhanced Peroxide von der Firma EcoLab*). Es ist eine Schutzbrille und eine Atemschutzmaske FFP 3 zu tragen. Begonnen wird mit der IN-Schleuse (linke Schleuse). Diese wird beginnend mit der linken Seitenwand, über die Rückwand bis zur rechten Seitenwand, dem Boden, dem Rollwagen und der Innenseite der Schleusentür wischdesinfiziert. Danach folgt die Wischdesinfektion des Isolator-Innenraums. Zunächst werden die Arbeitsplatten entnommen. Daraufhin wird die Auffangwanne von links nach rechts in geraden Bahnen von hinten nach vorne wischdesinfiziert. Folgend werden die einzelnen Arbeitsplatten wischdesinfiziert und wieder eingelegt. Dann wird weiter mit der Wischdesinfektion der linken Seitenwand, über die Rückwand bis zur rechten Seitenwand fortgefahren. Es wird von oben nach unten in geraden langsamen Bewegungen gewischt. Im Anschluss wird die Arbeitsfläche von hinten nach vorne und von links nach rechts gewischt. Es folgt die Wischdesinfektion der Innenseite der Frontscheibe, inklusive der Armstulpen, mit der Wischrichtung von links nach rechts und von oben nach unten. Die Frontscheibe des Isolators wird wieder geschlossen. Danach wird mit der OUT-Schleuse (rechte Schleuse) analog zur IN-Schleuse fortgefahren. Zuletzt wird die Außenseite der Frontscheibe des Isolators von links nach rechts in geraden Bahnen von oben nach unten desinfiziert. Allgemein ist darauf zu achten, dass die desinfizierten Bereiche nicht mit dem Arm „übergriffen“ werden um Kontaminationen zu vermeiden. Bei allen Bewegungen der Wischdesinfektion ist darauf zu achten, dass nach jeweils einer gezogenen Bahn das Tuch gefaltet wird bzw. ein neues Tuch genommen wird.

1.1.2.2 Wöchentliche Reinigung der Fußböden

Zum Reinigen der Fußböden wird Incidin™ OxyFoam S verwendet. Die Reinigung erfolgt nach dem 2-stufigen Nasswischverfahren (siehe Anlage 1). Zuerst wird der Reinraum gewischt, im Anschluss der Vorraum.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 6 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

1.1.3 Halbjährliche Reinigung

Nr.	Was	Wie	Womit
1.	Wände, Fenster innen	feucht abwischen, trocknen lassen, Einwirkzeit 60 min Schutzbrille und FFP3 Atemschutzmaske tragen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S Mopp-System,
2.	Heizkörper	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam/Wipe S
3.	Schränke innen und außen	feucht abwischen, trocknen lassen Einwirkzeit 60 min	Incidin™ OxyFoam/Wipe S
4.	Decke	feucht abwischen, trocknen lassen, Einwirkzeit 60 min Schutzbrille und FFP3 Atemschutzmaske tragen	Incidin™ OxyFoam S, Mopp-System

Die Reinigung und Desinfektion der Wände, Fenster und Decken erfolgt von hinten links nach rechts vorn.

1.2 Ansetzen der Reinigungs- und Desinfektionsmittellösungen

Incidin™ OxyFoam S:

Incidin™ OxyFoam S ist gemäß Herstellerangabe als gebrauchsfertige Lösung zu beziehen. Nicht verbrauchte Reste werden verworfen. Die Einwirkzeit (sporozyde Wirkung) der Lösung beträgt 60 Minuten.

iso-Propanol 70 % (V/V):

iso-Propanol 70 % (V/V) wird als gebrauchsfertige Lösung bezogen. Nicht verbrauchte Reste werden verworfen. Die Einwirkzeit der Lösung beträgt 5 Minuten.



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 7 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Vliestuch-Spendersystem:

Zur Bereitstellung des Vliestuch-Spendersystems wird die Desinfektionslösung (*iso*-Propanol 70 % (V/V)) in den Reinigungstuch-Spender umgefüllt und verschlossen. Das Volumen der Lösung (2 bis 2,5 Liter) hängt von der Aufnahmekapazität des verwendeten Spenders ab. Die Vortränkzeit der im Spendersystem befindlichen Tuchrolle beträgt 15 Minuten. Tücher an der Spenderstelle entnehmen und diese wieder verschließen. Das Behältnis wird mit Ansatzdatum, Inhalt, Chargenbezeichnung, Ablauffrist und Einwirkzeit gekennzeichnet. Die Ablauffrist wird auf die Dauer von 4 Wochen festgelegt.

1.3 Einbringen von Material und Geräte in den Reinraum und Sicherheitswerkbänke

Transport und Verpackungsmaterialien wie Kartonagen etc. dürfen nicht in den Reinraum. Materialien und Geräte werden über den Vorraum in den Reinraum eingebracht. Vor dem Einbringen sind die Materialien und Geräte einer Wischdesinfektion mit *iso*-Propanol 70 % (V/V) oder Tauchdesinfektion mit Incidin™ OxyFoam S zu unterziehen.

Vor dem Einbringen in die Sicherheitswerkbank, sind die Materialien und Geräte einer Wischdesinfektion mit *iso*-Propanol 70 % (V/V) oder Tauchdesinfektion mit Incidin™ OxyFoam S zu unterziehen.

1.4 Materialbedarf

- *iso*-Propanol 70 % (V/V)
- V3-109-SII Cleanroom Wipe
- Incidin™ OxyFoam S
- Incidin™ OxyWipe S
- Klerwipe™ Sporocidal Enhanced Peroxide
- Reinigungstücher Vliestuch-Spendersystem
- Wischmopp
- PurMop® ICT
- Schutzbrille
- Atemschutzmaske FFP 3



Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 8 von 12

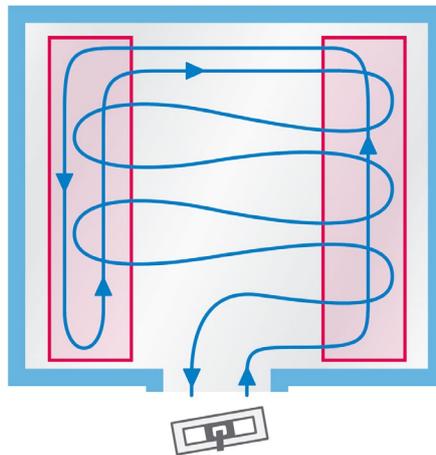
gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 1:

2-stufiges Nasswischverfahren

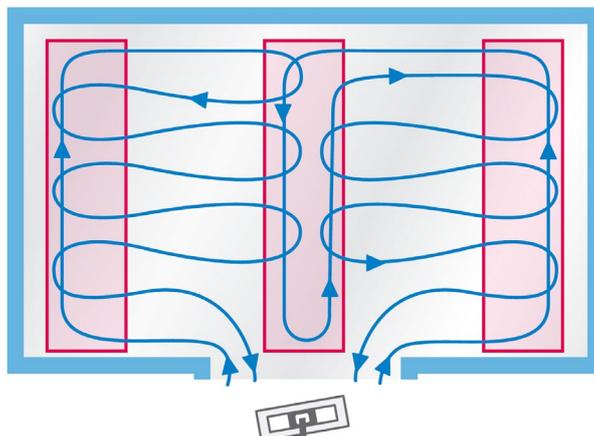
Schmale Flächen:

Desinfektionslösung erst in den Randzonen auftragen, dann Raummitte schlangenförmig reinigen, dabei mit dem Wischgerät immer wieder Desinfektionsflüssigkeit von den Randzonen aufnehmen.



Breite Flächen:

Wischgerät an der rechten Randzone entlang, dann durch die Raummitte führen. Wiederholt Desinfektionsflüssigkeit von den Randzonen aufnehmen! Die Mitte der rechten Raumhälfte schlangenförmig reinigen. Danach entlang der linken Randzone und dann schlangenförmig die linke Raumhälfte reinigen. Grobschmutz entfernen. Generell wird mit dem Wischverfahren auf der diagonal gegenüberliegenden Seite der Tür begonnen.





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 9 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 2:

Vorbereitung der Wischmopps



Schritt 1: Einlegen der neuen Mopps

Vor Beginn des Wischvorgangs wird die benötigte Moppmenge gewählt und in den dafür konzipierten Moppbehälter (Wanne 1) gelegt.



Schritt 2: Dosierung der Flüssigkeit

Nun wird die dafür exakt benötigte Flüssigkeitsmenge im skalierten Flüssigkeitsbehälter (Wanne 2) angesetzt. (Hier Nutzung der fertigen Lösung)





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 10 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Schritt 3: Tränkung der Mopps

Die frische Flüssigkeit wird über ein Dosiersieb auf die Mopps verteilt. Eine gleichmäßige Befeuchtung aller Mopps wird bereits nach wenigen Minuten erreicht.



Schritt 4: Aufnahme der getränkten Mopps

Die präparierten Mopps können nun einzeln aus dem Moppbehälter (Wanne 1) entnommen werden. Eine speziell geformte Moppauflage vereinfacht die Aufnahme ohne Handkontakt.



Schritt 5: Abwurf der gebrauchten Mopps

Nach dem Wischvorgang werden die gebrauchten Mopps in den nun leeren Flüssigkeitsbehälter (Wanne 2) abgeworfen. Durch die Trennung der frischen und gebrauchten Mopps werden Kreuzkontaminationen vermieden.





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 11 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Anlage 3:

Handschuhwechsel

Vorbereitung: Schutzhandschuhe (z.B.: Biogel® Surgeons) in den Isolator einbringen, aus der Verpackung entnehmen und auf den Handschuhring aufziehen.

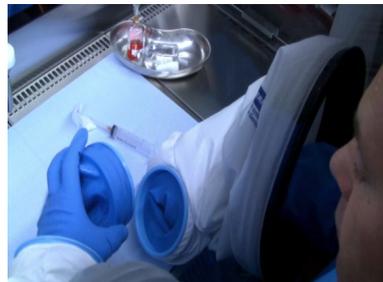
Schritt 1

Handschuh nach Innen ziehen



Schritt 2

Neuen Handschuhring auf den „Alten“ draufsetzen



Schritt 3

Den „alten“ Handschuhring mit dem „Neuen“ herausdrücken





Abt XXIV Apotheke

Arbeitsanweisung

Raumhygiene Sterilbereich

AA 301-714-03-01

Seite 12 von 12

gültig ab: Datum der Freigabe

Schritt 4

Den „alten“ Handschuhring „nach links gedreht“ durch die Armstulpe entfernen. So werden mögliche Kontamination vermieden.



Nachbereitung: Die gebrauchten Handschuhe entsorgen. Der Handschuhring wird nach Dampfsterilisation wiederverwendet.

**Arzneimittelüberwachungsbeauftragter
der Bundeswehr**

München, 30. April 2019
Telefon: 089-1249-6666

Az 42-22-10/BER

Verteiler

**Aktenvermerk über die aufsichtsbehördliche Inspektion der
Bundeswehraphotheke im Bundeswehrkrankenhaus Berlin am
13. April 2019**

1. Gesetzliche und sonstige Grundlagen

Die Wahrnehmung der aufsichtsbehördlichen Überwachung des Verkehrs mit Arzneimitteln und Medizinprodukten ist in den vom Kommando Sanitätsdienst der Bundeswehr (Kdo SanDstBw) herausgegebenen Bereichs- bzw. Zentralvorschriften "Der Betrieb von Bundeswehraphotheken" (C1 841/0 4000), „Der Verkehr mit Arzneimitteln“ (A1 841/0 4001) und „Durchführung des Gesetzes über Medizinprodukte“ (A1 841/0 4002) sowie der Organisationsweisung der Überwachungsstelle für öffentlich-rechtliche Aufgaben des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Süd geregelt.

2. Anlass

Bei der Inspektion der Bundeswehraphotheke (Bw-Apotheke) des Bundeswehrkrankenhauses (BwKrhs) Berlin handelte es sich um eine anlassbezogene aufsichtsbehördliche Besichtigung. Gegenstand der Inspektion waren ausschließlich die von der Bw-Apotheke Berlin angezeigten Änderungen der Apothekenbetriebsräume gemäß Nr. 504 der C1 841/0 4000.

4.1. Raum 4.25 („Vorbereitungsraum/Schleuse“)

Aufgrund fehlender Personal- und Materialschleusen zum Raum 4.26 wurde der Raum 4.25 als Vorbereitungs- und Schleusenraum für den Raum 4.26 eingestuft. Sämtliche nicht erforderlichen Ein- und Anbauten wurden entfernt und im Anschluss eine Reinraumqualifizierung durchgeführt. Danach erfüllt der Raum im Ruhezustand („at rest“) die Anforderungen an die Reinraumklasse D im Sinne des Annex 1 des EU-GMP-Leitfadens.

Auflagen

Da der Zugang zum Raum 4.25 nur über einen unklassifizierten Flur ohne eigene Schleuse möglich ist, sind in diesem Raum keine Tätigkeiten durchzuführen, die eine Verschlechterung der Reinraumklasse besorgen lassen (z.B. **Bekleidungswechsel, Auspacken von Kartonagen etc.**). Die Fenster in diesem dürfen von innen nur im Notfall zu öffnen sein. Es ist in regelmäßigen Abständen zu prüfen und nachzuweisen, dass die Anforderungen an die Reinraumklasse D eingehalten und aufrechterhalten werden. Andere als unmittelbar vorbereitende Tätigkeiten für die Herstellung der Phagenpräparate sind in diesem Raum nicht zulässig. Der Zugang zum Raum ist auf qualifiziertes Personal zu beschränken.

4.2. Raum 4.26 („Herstellungsraum/Isolator“)

Beim Raum 4.26 handelt es sich um den eigentlichen Herstellungsraum, der als Reinraum der Klasse D klassifiziert und qualifiziert wurde. In diesem Raum wurde ein „Bernner FlowSafe®“ Reinraumisolator mit zwei Materialschleusen installiert. Die Qualifizierung des Isolators mit seinem Arbeitsbereich (Reinraumklasse A) und den Materialschleusen (Reinraumklasse B) wurde ebenfalls bereits abgeschlossen.

Auflagen

Der Zugang zu diesem Raum ist ausschließlich über die Verbindungstür vom Raum 4.25 zu gewährleisten. Die vom unklassifizierten Flur in den Raum 4.26 führende Tür ist so zu verschließen und zu versiegeln, dass

- ein Zugang von außen und ein Verlassen des Raumes von innen nur im Notfall möglich sind (z.B. Knauf und Beschilderung außen, Klinke mit Türwächter innen) und

- des Ein- und Ausschleusens von Personal und Material einschließlich des Bereichsbekleidungsregimes und
- der Hygienepläne und -maßnahmen (§ 4a ArbZustO).

5. Bewertung

Seitens AMÜBBw bestehen keine Einwände gegen die Inbetriebnahme der Räume 4.25 und 4.26 zur Vorbereitung bzw. zur Herstellung von Phagenpräparaten.

Die noch erforderlichen Schritte zur Ertüchtigung der Infrastruktur sowie die notwendigen Qualitätssicherungsmaßnahmen werden auch über den Projektbeginn hinaus weiterhin von AMÜBBw eng begleitet werden.

Im Auftrag

**Meyer
Matthias**

Meyer

Oberstapotheker

Digital unterschrieben von
Meyer Matthias

Datum: 2019.05.02

14:25:24 +02'00'

6. Verteiler (nur elektronisch)

Bundeswehrkrankenhaus Berlin
Kommandeur
Abteilung XXIV Apotheke

Kommando Sanitätsdienst der Bundeswehr
Unterabteilungen V und X

	<h2 style="margin: 0;">Dokumentation Raumhygiene Sterilbereich</h2>
---	---

**Raum: 4.25 und 4.26 Sterilraum/Sterilraumvorbereitung
Personal Mitarbeiter Apotheker**

Nr.:	Datum:	produktionstäglich, wöchentlich, monatlich, halbjährlich	Durchführung Hz/Unterschrift
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Bemerkung/Besondere Beobachtung:

Gesehen und geprüft: _____ Datum: _____ Name/Unterschrift Apotheker: _____



Hygienemonitoring

Datum des Monitorings: _____

Durchführende:r: _____

Auswertung Abklatschplatten: _____

Artikel-Nr.:

Chargen-Nr.:

Verfallsdatum:

Proben-Nr.	Probenahmeort	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 7 Datum: _____	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 14 Datum: _____
Isolator Schleuse, links			
<input type="checkbox"/> 1	linke Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 2	Rückwand Mitte	_____	_____
<input type="checkbox"/> 3	rechte Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 4	Arbeitsfläche Rollwagen	_____	_____
Isolator			
<input type="checkbox"/> 5	linke Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 6	Arbeitsfläche links vorn	_____	_____
<input type="checkbox"/> 7	Arbeitsfläche links hinten	_____	_____
<input type="checkbox"/> 8	Arbeitsfläche, Mitte	_____	_____
<input type="checkbox"/> 9	Rückwand, Mitte	_____	_____
<input type="checkbox"/> 10	Arbeitsfläche rechts vorn	_____	_____
<input type="checkbox"/> 11	Arbeitsfläche rechts hinten	_____	_____
<input type="checkbox"/> 12	rechte Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 13	Ansatzgefäß/ _____	_____	_____
<input type="checkbox"/> 14	Frontscheibe, Mitte	_____	_____



Hygienemonitoring

Proben-Nr.	Probenahmeort	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 7 Datum: _____	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 14 Datum: _____
Handschuhe Isolatorstulpen			
<input type="checkbox"/> 15	linker Handschuh	_____	_____
<input type="checkbox"/> 16	rechter Handschuh	_____	_____
Isolator, Schleuse rechts			
<input type="checkbox"/> 17	linke Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 18	Rückwand Mitte	_____	_____
<input type="checkbox"/> 19	rechte Seitenwand	_____	_____
<input type="checkbox"/> 20	Arbeitsfläche Rollwagen	_____	_____
Reinraum			
<input type="checkbox"/> 21	Fensterbank	_____	_____
<input type="checkbox"/> 22	Pacto-Safe	_____	_____
<input type="checkbox"/> 23	linke Isolator-Schleuse außen	_____	_____
<input type="checkbox"/> 24	rechte Isolator-Schleuse außen	_____	_____



Hygienemonitoring

Auswertung Sedimentationsplatten:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

Proben-Nr.	Probenahmeort	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 7 Datum: _____	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 14 Datum: _____
Isolator und Schleusen			
<input type="checkbox"/> 25	Schleuse, links	_____	_____
<input type="checkbox"/> 26	Arbeitsfläche links vorn	_____	_____
<input type="checkbox"/> 27	Arbeitsfläche rechts vorn	_____	_____
<input type="checkbox"/> 28	Schleuse, rechts	_____	_____
Reinraum			
<input type="checkbox"/> 29	Fensterbank	_____	_____

Auswertung Caso-Bouillon-Flaschen:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

Proben-Nr.	Probenahmeort	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 7 Datum: _____	Klimaschrank (25° - 28°C) Tag 14 Datum: _____
Isolator			
<input type="checkbox"/> 30	Anfang Herstellung	_____	_____
<input type="checkbox"/> 31	Mitte Herstellung	_____	_____
<input type="checkbox"/> 32	Ende Herstellung	_____	_____



Hygienemonitoring

Bei Überschreiten der Warn- oder Aktionsgrenzen getroffene Maßnahmen:

Ergebnis: entspricht
 entspricht nicht

Datum:

Unterschrift Apotheker:in:

Hinweis: Eintragung in die Prüfmittelmatrix!



Personalhygiene Sterilbereich

Was?	Wo?	Wie?	Womit?	Wer
Betreten in Arbeitskleidung	Schleusenbereich Raum 4.26			Personal TE Herstellung
Uhr/Schmuck ablegen				
Hygienische Händedesinfektion		Anlage 2 AA „Personalhygiene Sterilbereich“	Desmanol® care	
Mundschutz anlegen		Bart vollständig verdecken		
Kopfhaube anlegen		Haare vollständig verdecken		
Überschuhe über die Bereichsschuhe ziehen				
Hygienische Händedesinfektion		Anlage 2 AA „Personalhygiene Sterilbereich“	Desmanol® care	
sterilen Einmalschutzkittel anlegen				
Hygienische Händedesinfektion		Anlage 2 AA „Personalhygiene Sterilbereich	Desmanol® care	
sterile Handschuhe anziehen		über die Einmalschutzkittelbündchen Anlage 1 und 3 AA „Personalhygiene Sterilbereich		



Personalhygiene Sterilbereich

Was?	Wo?	Wie?	Womit?	Wer
	Reinraum betreten Raum 4.25	Türgriffe nur mit dem Ellenbogen betätigen		Personal TE Herstellung
	Reinraum verlassen Raum 4.25	Türgriffe nur mit dem Ellenbogen betätigen		
sterile Handschuhe ausziehen und verwerfen	Schleusenbereich Raum 4.26	Anlage 4 AA „Personalhygiene Sterilbereich		Personal TE Herstellung
Sterilen Einmalschutzkittel ablegen und verwerfen		sachgerecht entsorgen		
Kopfhaube ablegen und verwerfen				
Mundschutz ablegen und verwerfen				
Überschuhe ausziehen				



Personalvalidierung

Datum der Validierung: _____

Durchführende:r: _____

Caso-Bouillon-Flaschen:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

Infusions-Leerbeutel 100 mL:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

PhaSeal® Infusion Adapter:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

PhaSeal® Injector:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

PhaSeal® Protector 55:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

Spritze 50 ml, Luer Lock:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____

Spritze 10 ml, Luer Lock:

Artikel-Nr.: _____

Chargen-Nr.: _____

Verfallsdatum: _____



Personalvalidierung

Proben-Nr.

Datum:

Klimaschrank (25° - 28°C)
Tag 7 Datum: _____

Klimaschrank (25° - 28°C)
Tag 14 Datum: _____

Tag 2:

A1

B1

A2

B2

A3

B3

A4

B4

A5

B5



Personalvalidierung

Bei Überschreiten der Warn- oder Aktionsgrenzen getroffene Maßnahmen:

Ergebnis: entspricht
 entspricht nicht

Datum:

Unterschrift Apotheker:in

Hinweis: Eintragung in die Prüfmittelmatrix!



Probenliste von Abklatsch-, Sedimentationsplatten und Caso-Bouillon-Flaschen aus Hygienemonitoring

1. Produktionstägliches Hygienemonitoring

1.1 Produktionstägliche mikrobiologische Prozesskontrolle:

Probenahmeort:

Caso-Bouillon-Flasche vom Anfang der Herstellung

Caso-Bouillon-Flasche aus der Mitte der Herstellung

Caso-Bouillon-Flasche vom Ende der Herstellung

1.2 Produktionstägliches mikrobiologisches Umgebungsmonitoring

1.2.1 Passive Luftkeimzahlbestimmung

Probenahmeort

Sedimentationsplatte im Isolator Arbeitsfläche links vorn

Sedimentationsplatte im Isolator Arbeitsfläche rechts vorn

Sedimentationsplatte im Reinraum auf der Fensterbank

1.2.2 Abklatschtest von kritischen Oberflächen und Personal

Probenahmeort

Abklatschplatte vom linken Handschuh

Abklatschplatte vom rechten Handschuh

Abklatschplatte vom Ansatzgefäß/_____



Probenliste von Abklatsch-, Sedimentationsplatten und Caso-Bouillon-Flaschen aus Hygienemonitoring

2. Wöchentliches Hygienemonitoring

2.1 Wöchentliches mikrobiologisches Umgebungsmonitoring

2.1.1 Passive Luftkeimzahlbestimmung

Probenahmeort

Sedimentationsplatte in der linken Schleuse

Sedimentationsplatte im Isolator Arbeitsfläche links vorn

Sedimentationsplatte im Isolator Arbeitsfläche rechts vorn

Sedimentationsplatte in der rechten Schleuse

Sedimentationsplatte im Reinraum auf der Fensterbank

2.1.2 Abklatschtest von kritischen Oberflächen

Probenahmeort

Abklatschplatte in der linken Schleuse von der linken Seitenwand

Abklatschplatte in der linken Schleuse von der Rückwand

Abklatschplatte in der linken Schleuse von der rechten Seitenwand

Abklatschplatte in der linken Schleuse von der Arbeitsfläche des Rollwagens

Abklatschplatte im Isolator von der linken Seitenwand

Abklatschplatte im Isolator von der Arbeitsfläche links vorn

Abklatschplatte im Isolator von der Arbeitsfläche links hinten

Abklatschplatte im Isolator von der Arbeitsfläche in der Mitte

Abklatschplatte im Isolator von der Rückwand

Abklatschplatte im Isolator von der Arbeitsfläche rechts vorn

Abklatschplatte im Isolator von der Arbeitsfläche rechts hinten

Abklatschplatte im Isolator von der rechten Seitenwand

Abklatschplatte im Isolator vom Ansatzgefäß/ _____

Abklatschplatte im Isolator von der Frontscheibe



Probenliste von Abklatsch-, Sedimentationsplatten und Caso-Bouillon-Flaschen aus Hygienemonitoring

Probenahmeort

Abklatschplatte in der rechten Schleuse von der linken Seitenwand

Abklatschplatte in der rechten Schleuse von der Rückwand

Abklatschplatte in der rechten Schleuse von der rechten Seitenwand

Abklatschplatte in der rechten Schleuse von der Arbeitsfläche des Rollwagens

Abklatschplatte im Reinraum von der Fensterbank

Abklatschplatte im Reinraum vom Pacto-Safe

Abklatschplatte im Reinraum von der Oberfläche der rechten Isolator-Schleuse

Abklatschplatte im Reinraum von der Oberfläche der linken Isolator-Schleuse

2.1.3 Abklatschtest von Personal

Probenahmeort

Abklatschplatte vom linken Handschuh

Abklatschplatte vom rechten Handschuh



Protokoll für die Sterilgut-Herstellung (Siegelnahtprüfung/Dampfsterilisation)

Siegelnahtprüfung:

Datum: _____

Durchführender: _____

Gerät: hawo hm 950

Seriennummer: 531009

Siegelparameter:

Siegeltemperatur: 185 °C

Anpressdruck: 100 N

Durchlaufgeschwindigkeit: 8,0 m/min

1. Seal-Check:

bestanden:

nicht bestanden:

2. Tinten-Test:

bestanden:

nicht bestanden:

3. Peel-Test:

bestanden:

nicht bestanden:

Bemerkungen: _____

Ergebnis: entspricht
 entspricht nicht

Maßnahmen: keine



Protokoll für die Sterilgut-Herstellung (Siegelnahtprüfung/Dampfsterilisation)

Dampfsterilisation:

Datum: _____

Durchführender: _____

Gerät: FVA3/A1

Seriennummer: NBG401BC

Verwendetes Prüfmittel: gke Steri-Record®, gke-GmbH, 2022 102327, 05/25

Produkt, Hersteller, Charge, Verwendbarkeitsdatum

Teststreifen hier einkleben

Auswertung des Prüfmittels:

Ergebnis: entspricht
 entspricht nicht

Auswertung der Inprozesskontrolle:

Ergebnis: entspricht
 entspricht nicht

Maßnahmen: keine

Sterilgut verwendbar bis: _____

Datum

Unterschrift Apotheker



Raumhygiene Sterilbereich

Was?	Wann?	Wie?	Womit?	Wer
zugängliche waagerechte Oberflächen	vor Herstellungsbeginn	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) Reinigungstücher	Personal TE Herstellung
Türgriffe, Lichtschalter im Reinraum, Stuhl, Waage		feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) Reinigungstücher	
Reinraumschleuse		feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) Mopp-System, Reinigungstücher	
Fußboden (Reinraum)		2-stufiges Nasswischverfahren	Incidin™ OxyFoam S Mopp-System	
Isolator (Arbeitsfläche, Rück-, Seitenwände, Frontscheibe innen, Schleusen, Arbeitsmittel)		feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) Mopp-System, sterile Reinigungstücher	
Isolator (Arbeitsfläche Isolator und Schleusen)	nach der Herstellung	feucht abwischen, trocknen lassen	<i>iso</i> -Propanol 70 % (V/V) sterile Reinigungstücher	Personal TE Herstellung
Abfälle und Verbrauchsmaterialien		sachgerecht entsorgen	kontaminierte Abfälle: Pacto-Safe, nichtkontaminierte Abfälle: Mülleimer	
Laborschuhe		feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam S Incidin™ OxyWipe S Reinigungstücher	



Raumhygiene Sterilbereich

Was?	Wann?	Wie?	Womit?	Wer
zugängliche waagerechte Oberflächen	wöchentliche Reinigung	feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S	Personal TE Herstellung
Türgriffe, Lichtschalter im Reinraum, Stuhl, Waage		feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S	
Reinraumschleuse		feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S, Mopp-System	
Fußboden (Reinraum)		2-stufiges Nasswischverfahren	Incidin™ OxyFoam S, Mopp-System	
Isolator (Arbeitsfläche, Auffangwanne, Rück-, Seitenwände, Frontscheibe innen, Schleusen, Arbeitsmittel)		feucht abwischen, trocknen lassen Schutzbrille und FFP3 Atemschutzmaske tragen	Klerwipe™ Sporidical Enhanced Peroxide	
Wände, Fenster innen	halbjährliche Reinigung	feucht abwischen, trocknen lassen Schutzbrille und FFP3 Atemschutzmaske tragen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S Mopp-System	Personal TE Herstellung
Heizkörper		feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S	
Schränke innen und außen		feucht abwischen, trocknen lassen	Incidin™ OxyFoam/Wipe S	
Decke		feucht abwischen, trocknen lassen Schutzbrille und FFP3 Atemschutzmaske tragen	Incidin™ OxyFoam S Mopp-System	



**Herstellungsdokument für Rezepturarzneimittel
- Herstellungsanweisung/-protokoll -**

Phagenwirkkomponenten in isotonischer Kochsalzlösung

Name der Rezeptur

11.12.2023

Herstellungsdatum

Herstellungsnummer

**Rezept
hier einkleben!**

siehe Anlage

CD2

Name Patient/Station

OTA Prof. Dr. med. Willy

Verschreibender Arzt



Herstellungsdokument für Rezepturarzneimittel - Herstellungsanweisung/-protokoll -

Plausibilitätsprüfung:

- Rezeptur nach NRF: plausibel Plausibilitätsprüfung gemäß FB 301-851-05-XX durchgeführt
 entfällt da individueller Heilversuch

Verwendbar bis: 14 Tage Aufbrauchsfrist: 4 Tage

Herstellungsanweisung:

- NRF-Rezeptur Nr. _____ Apothekeneigene HA Sonstiges _____

Herstellungstechnik/Herstellungsparameter/Ausrüstungsgegenstände/Packmittel:

In Anlehnung an die Empfehlung der Bundesapothekerkammer zu Arbeitsschutzmaßnahmen.
Standards für die Rezepturherstellung.

- Rezeptur enthält Gefahrstoffe: Gefährdungsbeurteilung liegt vor, Schutzmaßnahmen sind einzuhalten.

Herstellung der Rezeptur nach Rezepturstandard 5
(Nummer eintragen)

Spritzen 20 mL, Spritzen 30 mL, Spritzen 50 mL, PhaSeal®-System, Isolator

Freeflex®-Infusionsbeutel 250 mL isotonische Kochsalzlösung

Vorbereitung des Arbeitsplatzes und Personalhygiene:

Maßnahmen gemäß CL „Personalhygieneplan Galenik/Rezeptur“ sowie CL „Reinigungs- und Desinfektionsplan Galenik/Rezeptur“ in der aktuellen Fassung durchführen.

Inprozesskontrollen:

klare, farblose Lösung ohne sichtbare Partikel

Vier-Augen-Kontrolle des Volumen der Wirkstoff-Lösung

Ansatzmenge:

3 x 250 mL



Herstellungsdokument für Rezepturarztneimittel - Herstellungsanweisung/-protokoll -

Einwaage:

Pos.	Bestandteile	Chargen-/ Prüfnummer	VD	Zusammen- setzung 100 g	Soll- Volumen (ggf. mit <i>f</i>)	Ist- Einwaage	Namens- zeichen
1.	JG004-WK	3067-01	-	∅	12,5 mL		
2.	PTLAW1-WK	3067-02	-	∅	14,5 mL		
3.	22043_B8_1-WK	3125-01	-	∅	25,0 mL		
4.	Isotonische Kochsalzlösung	13QCF051	02/24	∅	198,0 mL		
Tara: _____ g		Gesamt:		∅	250 mL		

Einwaagekorrektur nach NRF (Allg. Hinweise I.2.1.1.) $0,909 \geq f \geq 1,020$	Korrekturfaktor <i>f</i>	Namens- zeichen

<h2 style="margin: 0;">Wägezettel</h2> <p style="margin: 0; color: blue;">entfällt, da volumetrische Herstellung</p>	<input type="checkbox"/> siehe Anlage
--	---------------------------------------



Herstellungsdokument für Rezepturarzneimittel - Herstellungsanweisung/-protokoll -

Packmittel:

Pos.	Packmittel	Chargen-/ Prüfnummer	VD	Menge	Namens- zeichen
1.	PhaSeal®-Infusionsadapter (C100)	2303212	02/27	3	
2.	PhaSeal®-Injector Luer Lock (N35C)	2211001	04/25	6	
3.	Spritze 20 mL Luer Lock	23C06C8	02/28	6	
4.	Spritze 20 mL Luer Lock	23D24C8	03/28	3	
5.	Spritze 50 mL Luer Lock	23B17D8004	01/28	3	
6.	Combi-Stopper	23A20A8171	12/27	9	
7.	Minisart® Sterilfilter 0,2 µm CA	220944103	07/25	1	

Herstellungstechnik/Herstellungsschritte:

Vorbereitung:

Der Isolator wird gemäß AA „Raumhygiene Sterilbereich“ vorbereitet.

Herstellung:

Zur Bereitung der Infusionslösung wird zunächst der PhaSeal®-Infusionsadapter (C100) in den

Infusionsbeutel am blauen Anschluss eingestochen. An diesen wird die Perfusor-Spritze konnektiert.

Mit dieser werden 52,0 mL Infusionslösung entnommen. Im Anschluss werden die einzelnen

Komponenten durch einen Sterilfilter 0,2 µm (CA) in den Infusionsbeutel filtriert.

Der Infusionbeutel wird vorsichtig geschwenkt.



Herstellungsdokument für Rezepturarzneimittel - Herstellungsanweisung/-protokoll -

Inprozesskontrolle	entspricht	entspricht nicht	Namens- zeichen
1. klare Lösung ohne sichtbare Partikel	x		
2. Vier-Augen-Kontrolle Volumen Wirkstoff-Lösung	x		
3. Bubble-Point-Test	x		

Abfüllung:

∅

Kennzeichnung gemäß § 14 ApBetrO:

Auf die Etiketten sind der Patientename, das Herstellungsdatum, das Verfallsdatum,

das Applikationsdatum, die Wirkstoffmenge sowie das Gesamtvolumen zu notieren.

Ein „kühl aufbewahren (+2° bis +8°C)“-Etikett aufkleben.

Ein „nicht zur Injektion“-Etikett aufkleben.

Muster-Etikett
hier einkleben!

Besondere Beobachtungen während der Herstellung:



**Herstellungsdokument für Rezepturarzneimittel
- Herstellungsanweisung/-protokoll -**

Abgabemenge:

3 x 250 mL

Lagerbedingungen:

kühl +2° bis +8°C

11.12.2023

Hergestellt am:

OStAp Halama

Herstellende Person (Name, Unterschrift)



Herstellungsdokument für Rezeptur Arzneimittel - Herstellungsanweisung/-protokoll -

Freigabe der Herstellungsanweisung:

11.12.2023

Herstellungsanweisung geprüft und freigegeben am:

Unterschrift Apotheker

Sensorische (organoleptische) Prüfung, Ergebnis:

<input checked="" type="checkbox"/> Aussehen ohne Öffnen	klare partikelfreie Lösung
<input type="checkbox"/> Sonstiges	

entspricht

entspricht nicht

Freigabe:

ja

nein

Von einer analytischen Prüfung kann abgesehen werden, da die Qualität des Arzneimittels durch das Herstellungsverfahren, die sensorische (organoleptische) Prüfung und, soweit vorgesehen, durch die Ergebnisse der Inprozesskontrollen gewährleistet ist.

11.12.2023

Produkt freigegeben am:

Unterschrift Apotheker



Einsender: _____

Labor Nr.: _____
Auftragsnummer: _____
Datum Ansatz: _____
Name Patient: _____
Geburtsdatum: _____

Testkeim: _____

Methode: Double-Layer
 Spot

Getestete Phagen: _____

Auswertung

- Für den getesteten Patientenstamm zeigt keines der vorhandenen Phagen-Isolate eine In-vitro-Wirksamkeit.
- Für den getesteten Patientenstamm zeigen folgende Phagen-Isolate eine geringe In-vitro-Wirksamkeit.

- Für den getesteten Patientenstamm zeigen folgende Phagen-Isolate eine gute In-vitro-Wirksamkeit.

Bemerkungen:

Titer:

Berlin, den _____

Unterschrift: _____



Protokoll Testung Phagogramm

Datum Ansatz: _____

Kommentare:

Methode: Double-Layer

N.a.= nicht auszählbar

Spot- Methode

N.d.= nicht durchgeführt

Testkeim: _____

Ja = Plaques vorhanden

Labornummer: _____

0 = keine Plaques

Alter Testkeim: __Tage

Verwendete Nährmedien: siehe Laboranweisung

Datum Ablesung: _____

Anzahl Plaques in der Verdünnungsstufe (Double-Layer)

Phage	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Ko

Vorhandene Plaques in der Verdünnungsstufe (Spot- Methode)

Phage	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Ko

Bemerkungen:

Titer:

Name Durchführender: _____

Unterschrift: _____



Verfahren für die Suszeptibilitätstestung von geeigneten Bakteriophagen bei multiresistenten Erregern

Inhaltsverzeichnis

0. Änderungshistorie	2
1. Begriffsbestimmungen und Abkürzungen	2
2. Zweck und Anwendungsbereich.....	2
3. Zuständigkeiten.....	2
4. Beschreibung und Durchführung des Laborprozesses	2
Benötigte Geräte/ Materialien.....	2
Vorbereitung	3
Durchführung	4
Bemerkungen	7
Limitationen.....	8
Dokumentation.....	8
Qualitätskontrolle	8
5. Literaturangaben.....	8
6. Anhang oder Anlagen	8
7. Mitgeltende Dokumente	8

erstellt von: HB Leddin	geprüft von:	QM-Konformität:	genehmigt von:	Gültig für: Abt. XXI	gültig ab:	ungültig ab:	ausgegeben. Exemplare: 1
----------------------------	--------------	-----------------	----------------	-------------------------	------------	--------------	--------------------------------



0. Änderungshistorie

1. Begriffsbestimmungen und Abkürzungen

Begriffsbestimmungen und Abkürzungen sind dem Qualitätsmanagementhandbuch zu entnehmen.

2. Zweck und Anwendungsbereich

Die vorliegende Laboranweisung regelt das Vorgehen bei Bakteriophagen-Resistenztestungen von Erregern. Diese erfolgt nur in Ausnahmefällen auf besondere Anweisung des Laborarztes hin.

3. Zuständigkeiten

Die Zuständigkeiten sind dem Anhang 2 des QMH zu entnehmen.

4. Beschreibung und Durchführung des Laborprozesses

Benötigte Geräte/ Materialien

- **Flüssigmedium**
Müller-Hinton Medium (BD)
(22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE-H₂O)

- **Agarplatten (Bottom Agar)**
Müller-Hinton Agarplatten (Biomerieux)
(1,5 % Agar (OXOID LP0011) und 22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE- H₂O)
 - Bemerkungen: Bei gekühlter Lagerung der Agarplatten müssen diese zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden

- **Softagar (Top Agar)**
Müller-Hinton Softagar (hergestellt durch Abt. A ZINST Kiel Ast. Berlin)



(0,5% Agar (OXOID LP0011) und 22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE- H₂O PH-Wert 7,3)
in Kulturröhrchen (16 x 100mm, mit kappe) à 3 ml

- Frischer Ausstrich des Bakterienstammes auf Agarplatte (nicht älter als 4 Tage)
- Phagensuspension, Lagerung bei 4-8°C
- Wasserbad zum Erhitzen des Softagars
- Heizblock, auf 48°C vortemperiert
- Kolbenhubpipette, 20-200 µl
- Kolbenhubpipette 100-1000 µl
- Transferpipetten 3,5 ml
- Mehrkanalpipetten, 0,5-10 µl
- Impfösen
- Sarstedt-Röhrchen, 3,5 ml zum Verdünnen
- Mikrotiterplatten

Vorbereitung

- gewünschter Test- oder Kontrollkeim von Agarplatte mit Impföse abnehmen und in Flüssigmedium (5ml) überführen
 - dabei Füllstand der Bouillon beachten da dieser teilweise abweicht
- beimpfte Bouillon dann 16-24 h im Brutschrank bei 36°C bebrüten



Durchführung

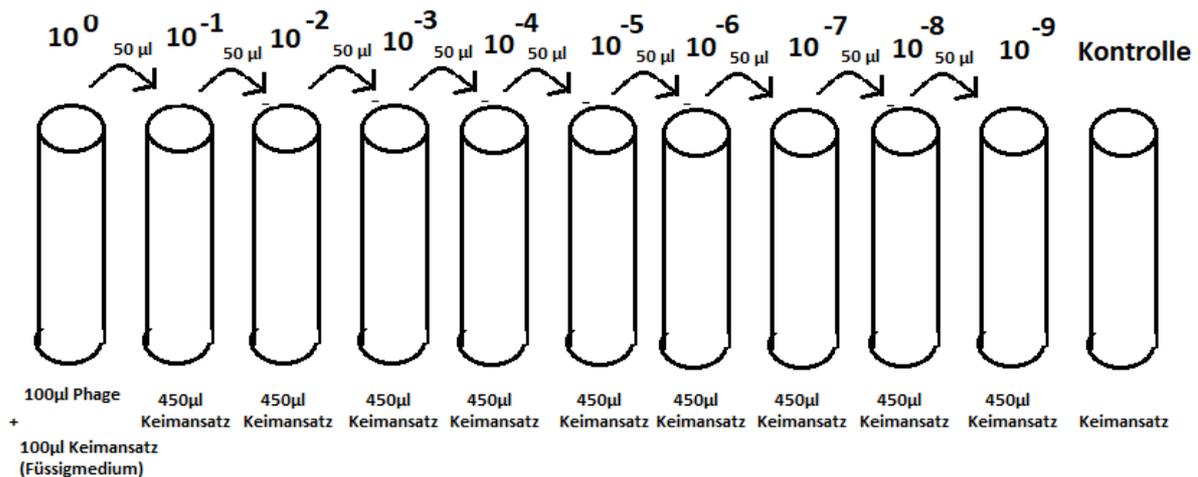
○ Ansatz der Verdünnungsreihe

Mischen von Phagensuspension und Testkeim (Flüssigmedium)
 McFarland 2,6-3,0 in Sarstedt-Röhrchen 3,5ml mittels
 Kolbenhubpipette

Erstellen der Verdünnungsstufe 10^0 durch Mischen von 100µl
 Phagensuspension und 100µl Testkeimansatz (Flüssigmedium)

Erstellen weiterer Verdünnungsstufen durch Vermischen von
 50µl der Vorverdünnungsstufe mit 450µl Testkeimansatz

Pipettenspitzen sind zwischen den Stufen zu wechseln



10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Kontrolle
100µl Phage+ 100µl Testkeim (Flüssigmedium)	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	Testkeim (Flüssigmedium)								

○ Klassischer Agar Overlay Assay

Wenig Material einzelner Kolonien des Bakterienstammes
 werden mit einer Impföse von einem frischen Ausstrich in 5 ml
 Flüssigmedium gebracht und stammspezifisch inkubiert (37°C)

Füllstand kontrollieren da dieser abweichen kann



Von der Phagensuspension wird eine serielle Verdünnungsreihe in Sarstedt-Röhrchen 3,5 ml angelegt mit beimpften Flüssigmedium (bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-9}). Die Verdünnung wird in dem Medium durchgeführt, welches auch für die Stammanzucht verwendet wird .
Top Agar auf 95°C erhitzen (bis Agar sich verflüssigt) und bei 48°C im Heizblock temperieren (nach 3 min von 95°C auf 48°C)
Nun werden je Platte 100 µL der unterschiedlichen Verdünnungsstufen dieser Kultur in den Top Agar pipettiert, durch leichtes Schwenken gemischt (Phagen nie vortexen oder starken Scherkräften aussetzen) und sofort gleichmäßig auf dem Bottom Agar verteilt
Nach dem Verfestigen des Top Agars (ca. 5 min) werden die Platten **upside-down** (Deckel zeigt nach Oben) bei stammspezifischen Bedingungen für 16 - 24h inkubiert (meist 37°C)
Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Titer [PFU/ml]} = (\text{Anzahl der Plaques/Platte} * \text{Verdünnungsfaktor}) / 0,1 \text{ ml}$$

Titerbestimmung ggf. durch Berechnung des Mittelwertes der Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} .

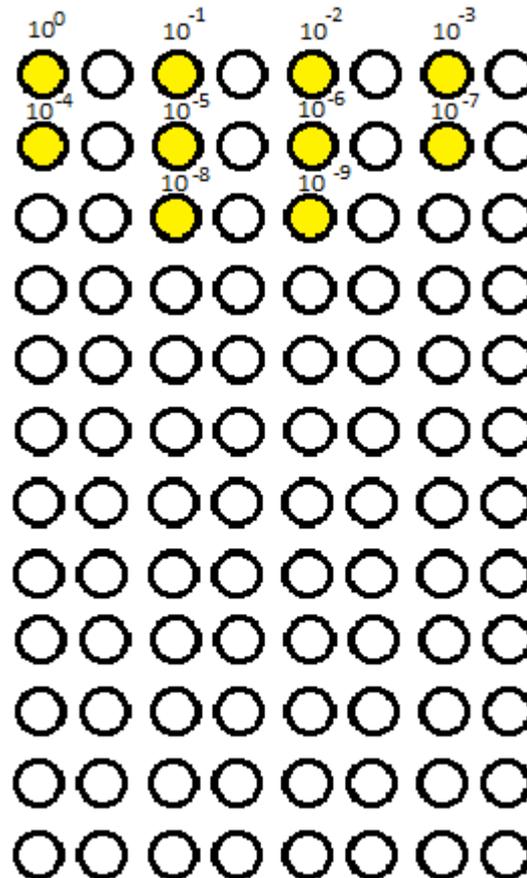
○ **Spot Assay**

Wenig Material einzelner Kolonien des Bakterienstammes werden mit einer Impföse von einem frischen Ausstrich in 5 ml Flüssigmedium gebracht und stammspezifisch inkubiert (37°C,) **Füllstand kontrollieren da dieser abweichen kann**

Von der Phagensuspension wird eine serielle Verdünnungsreihe in Sarstedt-Röhrchen 3,5 ml angelegt (bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-9}). Die Verdünnung wird in dem Medium durchgeführt, welches auch für die Stammanzucht verwendet wird.



Die Verdünnungsreihe wird wie folgt in eine sterile Mikrotiterplatte überführt. (10-15µl)



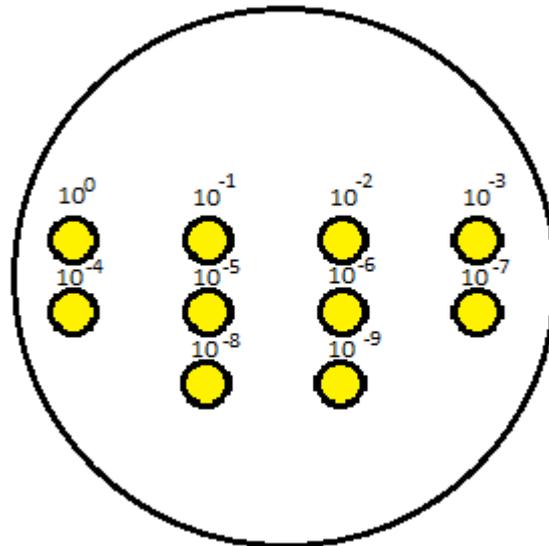
Top Agar auf 95°C erhitzen (bis Agar sich verflüssigt)
und bei 48°C im Heizblock temperieren
(nach 3 min von 95°C auf 48°C)

Von dem Beimpften Flüssigmedium werden je Platte 100 µL
dieser Kultur in den Top Agar pipettiert, durch leichtes
Schwenken gemischt und sofort gleichmäßig auf dem Bottom
Agar verteilt

Nach dem Verfestigen des Top Agars (ca. 5 min) werden mit
Hilfe einer Mehrkanalpipette je 5 µl der Verdünnungsstufen auf
die Double Agar Platten getropft.



Das Pipettierschema ist dabei wie folgt:



Nach dem Antrocknen der Spots werden die Platten **upside-down** bei stammspezifischen Bedingungen für 16 - 24h inkubiert (meist 37°C)

Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Titer [PFU/ml]} = (\text{Anzahl der Plaques/Spot} * \text{Verdünnungsfaktor}) / 0,005 \text{ ml}$$

Bemerkungen

Für eine initiale Titerbestimmung einer Phagensuspension sollten aus allen Verdünnungen Assay-Platten hergestellt werden. Als Kontrolle sollte eine Platte ohne Zugabe von Phagen hergestellt werden.

Die Methode ermöglicht neben der Titerbestimmung:

- die Beurteilung der Homogenität der Plaquemorphologie
- die Einschätzung der bakteriellen Phagenresistenzentwicklung
-

Die Bestimmung der EOP (efficiency of plating), sofern der Titer einer Phagensuspension auf verschiedenen Bakterienstämmen ermittelt wird. Die EOP kann im Zusammenhang mit dem Phagogramm eingesetzt werden, um die Effizienz eines Phagen auf dem zu testenden Patientenisolat zu bestimmen. Dazu sollten die eingesetzten Lysate auf möglichst identische Titer eingestellt werden.



Limitationen

Der Spot Assay ist bei Phagen mit sehr großen Plaques nicht durchführbar, da keine Einzelplaques detektierbar sind.

Dokumentation

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt ausschließlich in der Labor - EDV. Klinisch nichtrelevante Resistenztestungen werden auf Anweisung des Prüfleiters im Befund gesperrt.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle wird parallel zum Patientenerreger mittels geeigneter ATTC-Stämme durchgeführt. (noch zu untersuchen ob möglich)

5. Literaturangaben

entfällt

6. Anhang oder Anlagen

entfällt

7. Mitgeltende Dokumente

F XXX XXX