

Klinička ispitivanja pripravaka s bakteriofagima: problemi i rješenja

Lukač, Marija Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:202917>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marija Magdalena Lukač

**Klinička ispitivanja pripravaka s
bakteriofagima: problemi i rješenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen unutar Zavoda za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc Maji Šegvić Klarić na pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada kao i na prenesenom znanju unutar kolegija Mikrobiologija s parazitologijom i izbornog kolegija Primijenjena mikrobiologija preko kojih je svojim predavanjima i znanjem na mene prenijela interes za mikrobiologiju. Zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i ljudima koji su bili uz mene kroz studij, svima onima koji su svojim riječima podrške i smijehom učinili da se sve prepreke učine manjima. Neizmjereno hvala mojim roditeljima koji su mi bili velika podrška kroz studij, hvala vam što ste se zajedno samnom radovali, plakali i što ste mi pružili bezuvjetnu podršku koja je omogućila da danas postanem ovo što jesam.

Ovaj rad je, osim mojim roditeljima, posvećen i onim članovima obitelji koji više nisu tu, a koji su uz moje roditelje postavili temelje onoga što danas jesam i koji su s velikom vjerom i podrškom pratili svaki moj korak kroz život i studij.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ANTIBIOTICI I REZISTENCIJA	1
1.2. BAKTERIOFAGI	2
1.2.1. LITIČKI I LIZOGENI CIKLUS	3
1.2.2. PREGLED KLINIČKIH ISPITIVANJA BAKTERIOFAGA	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. FARMAKOKINETIKA BAKTERIOFAGA	12
4.1.1. APSORPCIJA	12
4.1.2. DISTRIBUCIJA	14
4.1.3. ELIMINACIJA: IMUNOSNI ODGOVOR NA BAKTERIOFAGE	15
4.2. SIGURNOST PRIMJENE BAKTERIOFAGA	16
4.3. BAKTERIOFAGI I BIOFILM	17
4.4. REZISTENCIJA NA BAKTERIOFAGE	19
4.5. REGULATORNE PREPREKE ZA TERAPIJSKU PRIMJENU BAKTERIOFAGA	22
4.5.1. PHAGOBURN KLINIČKA STUDIJA	24

4.6. DOBRA PROIZVOĐAČKA PRAKSA BAKTERIOFAGA	25
4.6.1. PRIRODNI I MODIFICIRANI BAKTERIOFAGI	26
4.6.2. STABILNOST FORMULACIJE S BAKTERIOFAGIMA	27
5. ZAKLJUČCI	29
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	31
7. LITERATURA	32
8. SAŽETAK/SUMMARY	40
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	44
BASIC DOCUMENTATION CARD	45

1. UVOD

1.1. Antibiotici i rezistencija

Antibiotici su prirodni metaboliti nekih bakterija i gljivica čija je glavna svrha zaštita domaćina od raznih čimbenika okoliša u kojem se nalazi. Antibiotici djeluju toksično na određene vrste bakterija na način da sprječavaju njihov rast i razmnožavanje (bakteriostatsko djelovanje) ili ubijaju bakterijsku stanicu (baktericidno djelovanje). Pod pojmom antibiotika osim prirodnih metabolita podrazumijevamo i njihove polusintetske i sintetske derivate (Kalenić i sur., 2019).

Prema mehanizmu djelovanja, antibiotici se dijele u četiri glavne skupine:

1. **Antibiotici koji djeluju na staničnu stjenku bakterijske stanice** (β -laktamski antibiotici i inhibitori β -laktamaze, glikopeptidni antibiotici, lipoglikopeptidni antibiotici).
2. **Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu** (polimiksini, lipopeptidi, smjese peptida).
3. **Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina** (aminkoglikozidi, tetraciklini, amfenikoli, linkozamidi, oksazolidinoni, makrolidi, streptogramini).
4. **Antibiotici koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina** (rifamicini).

Iako su se antibiotici pokazali uspješnima u liječenju bakterijskih infekcija, bakterije imaju sposobnost razvoja mehanizama rezistencije. Antibiotička rezistencija normalna je pojava do koje dolazi zbog prilagodbe bakterija na uvjete okoline, a nju uzrokuju genetske mutacije te izmjene genetskog materijala među bakterijama (Tambić Andrašević, 2018).

Enzimska inaktivacija antibiotika, smanjenje permeabilnosti bakterijske stijenke, promjena u ciljnom mjestu vezanja antibiotika te aktivni transport efluksnom pumpom četiri su glavne grupe u koje svrstavamo mehanizme rezistencije bakterija na antimikrobne lijekove (Kosalec i sur., 2021).

Na problem antimikrobne rezistencije upozorio je i sam Alexandar Fleming kratko nakon otkrića penicilina, a krajem dvadesetog stoljeća stavljen je naglasak na globalnu opasnost koju antibiotička rezistencija predstavlja (Rosenblatt-Farrell, 2009).

Grupa znanstvenika 2019. godine provela je sistematsku analizu kojom je pokazano da je u toj godini detektirano ukupno 1.27 milijun smrtnih slučajeva na teritoriju od 204 države uzrokovano rezistentnim bakterijskim infekcijama. Istraživanja predviđaju da bi do 2050. godine na godišnjoj razini moglo umirati 10 milijuna ljudi upravo zbog neučinkovitosti do sad otkrivenih antimikrobnih lijekova (Murray i sur., 2022). Veliki problem predstavljaju višestrukorezistentne bakterije (engl. Multi-drug resistant bacteria) koje su stekle rezistenciju na najmanje jedan lijek u tri ili više skupina antibiotika (Abram i sur., 2018).

Infekcije višestrukorezistentim bakterijama se uglavnom povezuju s nozokomijalnim infekcijama, no primjećen je trend porasta i vanbolničkih infekcija uzrokovanim tim bakterijama (Duin i Paterson, 2016).

Enterobacter, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, bakterijske vrste objedinjene pod akronimom ESKAPE, uzročnici su dvije trećine ukupnih bakterijskih infekcija te vrste koje pokazuju višestruku rezistenciju na antimikrobne lijekove (Abram i sur., 2018).

2017. godine Svjetska zdravstvena organizacija postavila je kritičan prioritet za pronalaskom djelotvorne terapije za ESKAPE bakterije, a uz njih velika je potreba za otkrićem novih antibiotika i za vrste *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. (<https://www.who.int>).

1.2. Bakteriofagi

Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije. Otkriće bakteriofaga pripisuje se dvama znanstvenicima, Fredericku Twortu 1915. godine te Felixu d'Herelleu 1917. godine. Osim terapijskog potencijala koji je ustanovljen kratko nakon njihovog otkrića, bakteriofagi su poslužili kao izniman alat za otkriće i razumijevanje temeljnih postulata u svijetu živih organizama (Salmond i Fineran, 2015).

Nakon otkrića elektronskog mikroskopa znanstvenici Helmut Ruska te Pfankuch i Kausche prvi su u svojim radovima prikazali strukturu bakteriofaga te se pretpostavlja da je tada opisana struktura T7 koli-faga (Almeida i sur., 2018). Bakteriofagi su strukturno jednostavne jedinice prosječne veličine od 30 do 200 nm (Paczesny i Bielec, 2020). Sastoje se od genetskog materijala, jednostruke ili dvostruke uzvojnice ili DNA ili RNA molekule, koji je smješten u proteinsku kapsidu (Naureen i sur., 2020).

Stopa bioraznolikosti koju pokazuju bakteriofagi je iznimna, utvrđeno je da na Zemlji postoji preko 10^{31} bakteriofaga što znači da ih ima više nego i samih bakterija (Jurczak-Kurek i sur., 2016).

Za taksonomsku podjelu bakteriofaga odgovoran je Međunarodni odbor za taksonomiju virusa. Unazad nekoliko godina taksonomska podjela bakteriofaga temeljila se na vrsti genoma, morfološkim karakteristikama te vrstama domaćina koje bakteriofagi ciljaju dok se od 2018. godine taksonomska podjela temelji se na zaključcima genomskih istraživanja. Većinu do sada otkrivenih i opisanih bakteriofaga ubrajamo u red Caudovirales. Morfološki, bakteriofagi iz reda Caudovirales spadaju u skupinu bakteriofaga s repom te dvostrukom uzvojnicom DNA molekule (Dion i sur., 2020).

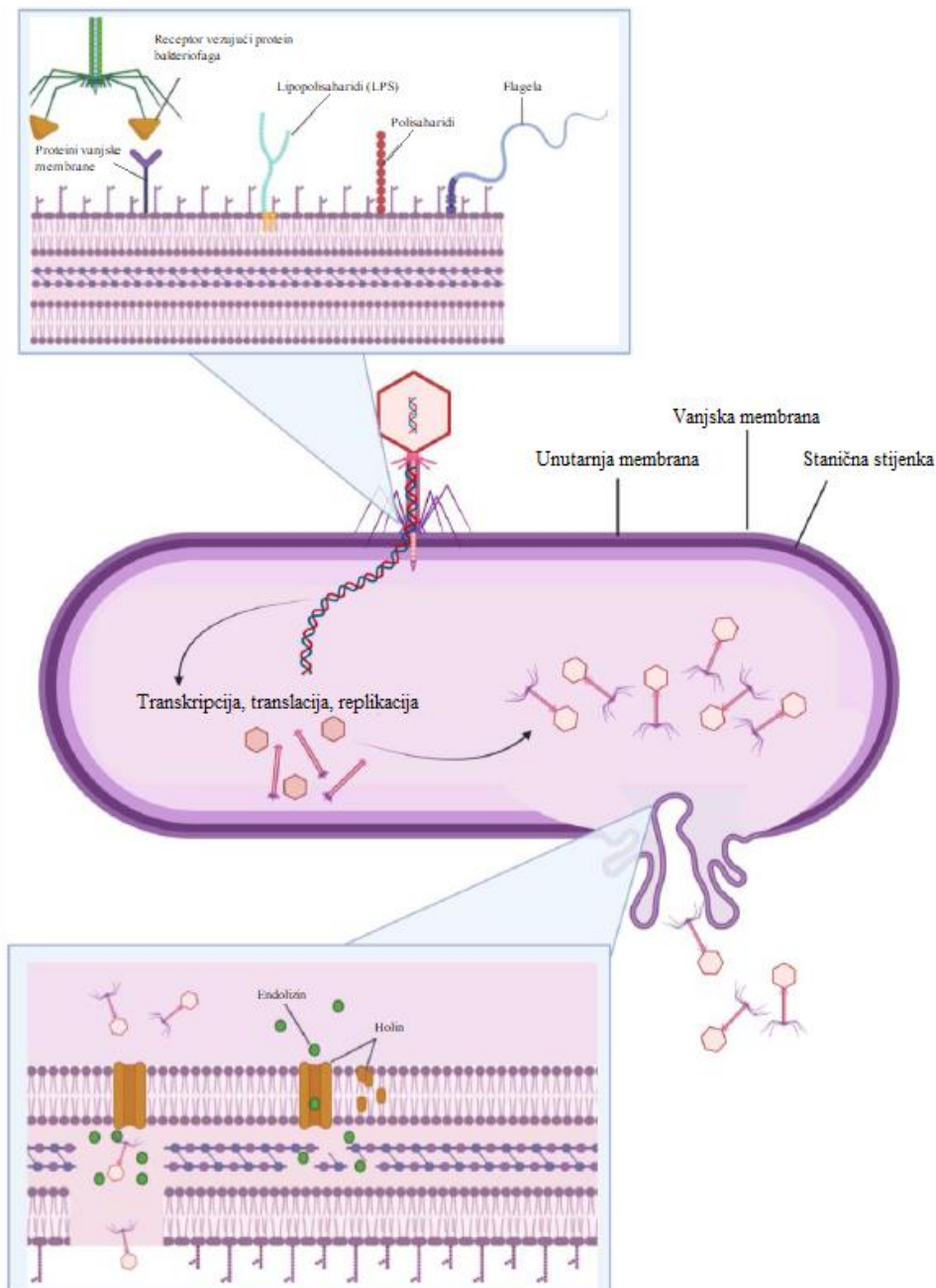
1.2.1. Litički i lizogeni ciklus

Najvažniji i najproučeniji životni ciklusi bakteriofaga su litički i lizogeni. Uz njih postoje i pseudolizogene i kronične interakcije bakteriofaga i bakterija (Makky i sur., 2021).

Prije nego bakteriofag inficira bakterijsku stanicu mora se odviti proces adsorpcije kod kojeg se najprije stvaraju reverzibilne veze između receptor-vezujućih proteina na bakteriofagu te receptora na bakteriji. Nakon inicijalnog nastanka reverzibilnih veza dolazi do morfoloških promjena viriona zbog kojih veza između bakteriofaga i bakterije postaje ireverzibilna. Nakon uspješne adherencije bakteriofaga na ciljne receptore na bakteriji odvija se proces genomskog injektiranja, gdje se genetski materijal iz viriona prenosi u stanicu domaćina (Elois i sur., 2023).

Nakon što bakteriofag injektira svoj genetski materijal u bakterijsku stanicu, taj se genetski materijal u litičkom ciklusu odmah eksprimira čime nastaju nove jedinice (Elois i sur., 2023). Prilikom lize bakterijske stanice bitna je interakcija holina i endolizina. U stadiju sastavljanja čestica bakteriofaga u citoplazmi dolazi i do nakupljanja endolizina, hidrolaza koje su ključne za razgradnju peptidoglikanskog sloja koji izgrađuje stanični zid bakterijske stanice. Kako bi endolizin ispoljio svoje djelovanje membranski proteini, holini, oligomeriziraju čime dolazi do formacije pora unutar stanične membrane kroz koje endolizini dopijevaju do periplazmatskog prostora gdje uzrokuju razgradnju peptidoglikanskog sloja te posljedičnu lizu bakterijske stanice (Wu i sur., 2021). Bakteriofage koji ulaze u litički ciklus nazivamo virulentnim bakteriofagima (Klumpp i sur., 2023).

Litički životni ciklus bakteriofaga prikazan je na Slici 1.

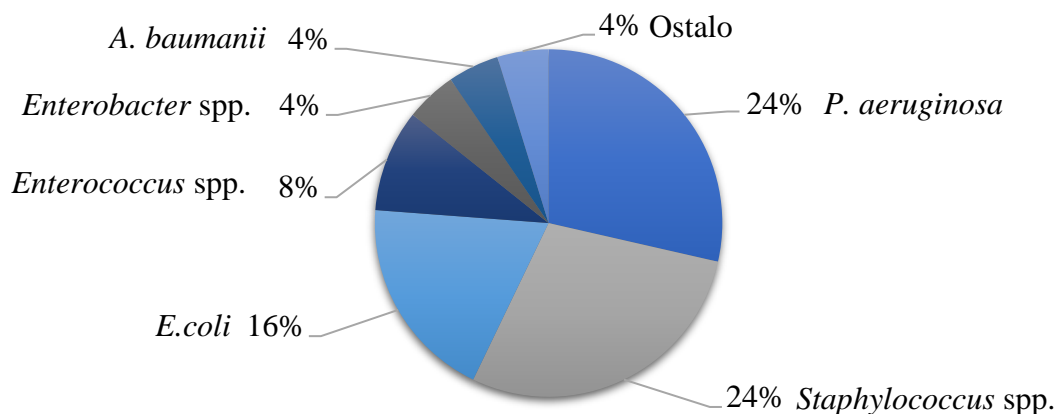


Slika 1. Prikaz litičkog ciklusa bakteriofaga (preuzeto i prilagođeno iz Hitchcock i sur., (2023) uz dopuštenje izdavača).

Nakon što bakteriofag u bakterijsku stanicu ispusti svoj genetski materijal, on se, za razliku od litičkog ciklusa, ne mora odmah eksprimirati nego se integrira u bakterijski genom ili u plazmid, takav životni ciklus nazivamo lizogenim, a bakteriofage pritajenima. Genetski materijal bakterije gdje se DNA ili RNA bakteriofaga inkorporirala u genetski materijal bakterije nazivamo profagom, a on se dalje replicira zajedno s genomom ili plazmidom bakterijske stanice (Makky i sur., 2021).

1.2.2. Pregled kliničkih ispitivanja bakteriofaga

Nedovoljno velik interes, nedostatak regulatorne pozadine oko terapije bakteriofagima te manjak sponzora neki su od razloga zašto je u razdoblju između 2000. i 2015. godine provedeno je samo 7 kliničkih studija o njihovoj učinkovitosti, no zbog sve veće osviještenosti o potrebi za novim terapijskim opcijama za liječenje rezistentnih bakterijskih infekcija taj se broj unazad nekoliko godina znatno povećao (Hitchcock i sur., 2023). Prema podacima o kliničkim studijama dostupnim na web stranici ClinicalTrials.gov trenutno je aktivno ili u procesu uključivanja pacijenata ukupno 23 kliničke studije na području Sjedinjenih Američkih Država, Kanade, Francuske, Belgije, Danske, Češke, Gruzije, Irana, Uzbekistana te Kine. Ciljne bakterije koji su dio intervencijskih studija ovise o tipu bolesti koji se liječi, ali najveća zastupljenost u studijama pripada bakterijskoj vrsti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ili drugim bakterijskim vrstama ESKAPE patogena, primarno bakterijskoj vrsti *E. coli*.



Graf 1. Bakterijske vrste prisutne u studijama terapije bakteriofagima. Pod ostalim bakterijskim vrstama koje su dio kliničkih studija su *Shigella*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.* i *Klebsiella oxytoca*.

Ako analiziramo status studija koje su trenutno registrirane na stranici Clinicaltrial.gov od 17 intervencijskih studija, njih 14 se trenutno nalazi u prvoj ili drugoj fazi kliničkih studija, dok se 2 studije nalaze u trećoj fazi. Pojediniosti vezane uz trenutno aktivne studije sažete su u Tablici 1. (www.classic.clinicaltrials.gov).

Tablica 1. Pregled aktivnih kliničkih studija terapije bakteriofagima

Naziv studije	Status studije	Stanje koje se tretira	Faza studije	Tip studije	Mjesto provedbe studije
Učinkovitost i sigurnost pripravka bakteriofaga „ShigActive“ na eksperimentalnom modelu šigeloze	Aktivna	Šigeloza	Faza I/II	Interventna	SAD
Učinkovitost i sigurnost pripravka bakteriofaga „EcoActive“ u tretiranju invazivne <i>E.coli</i> u pacijenata s inaktivnom Chronovom bolešću	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Chronova bolest	Faza I/II	Interventna	SAD
Terapija bakteriofagima u pacijenata s infekcijom umjetnog zgloba uzrokovanom bakterijskom vrstom <i>S. aureus</i>	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcija umjetnog zgloba kuka Infekcija umjetnog zgloba koljenu	Faza II	Interventna	Lyon, Francuska
Terapija bakteriofagima u liječenju tonzilitisa	Aktivna	Akutni tonzilitis	Faza III	Interventna	Tashkent, Uzbekistan
Sigurnost i učinkovitost terapije bakteriofagima u liječenju kroničnog zatvora	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Refraktorna konstipacija	Nije primjenjivo	Interventna	Shanghai, Kina
Primjena terapije bakteriofagima kod kroničnih infekcija urinarnog trakta nakon transplantacije bubrega	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcije urinarnog trakta Poremećaji uzrokovani transplantacijom bubrega	Faza III	Interventna	Tehran, Iran
Terapija osteomijelitisa u pacijenata s dijabetičkim stopalom	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Osteomijelitis	Faza II	Interventna	SAD

Primjena bakteriofaga u liječenju infekcija urinarnog trakta	Aktivna	Kronične urinarne infekcije	Faza I/II	Interventna	Toronto, Kanada
Primjena inhalacijskog pripravka bakteriofaga u pacijenata s cističnom fibrozom i kroničnom plućnom infekcijom uzrokovanom <i>P. aeruginosa</i>	Aktivna	Kronična infekcija uzrokovana <i>P. aeruginosa</i> Cistična fibroza	Faza I/II	Interventna	SAD
Kohortna studija o sigurnosti bakteriofaga	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcije umjetnih zglobova Ozbiljne infekcije	/	Opservacijska	Lyon, Francuska
Kvantifikacija zahtjeva za primjenom terapije bakteriofagima	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Koštane infekcije	/	Opservacijska	Lyon, Francuska
Primjena terapije bakteriofagima kod infekcija koje se teško liječe	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcije muskuloskeletnog sustava Kronični rinosinusitis Sepsa Gnojni hidradenitis Plućne infekcije	/	Opservacijska	Leuven, Belgija
Primjena bakteriofaga u eliminaciji štetnih bakterija kod bolesnika s alkoholnim hepatitisom	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Alkoholni hepatitis	/	Opservacijska	Hvidovre, Danska
Terapija koktelom bakteriofaga TP-102 kod pacijenata s infekcijom dijabetičkog stopala	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcija dijabetičkog stopala	Faza II	Interventna	SAD Indija

Studija o sigurnosti, farmakokinetici i učinkovitosti inhalata bakteriofaga AP-PA02 kod pojedinaca s bronhiektazijama kod ne-cistične fibroze i kronične plućne infekcije uzrokovane <i>P. aeruginosa</i>	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Bronhiektazije <i>P. aeruginosa</i> Plućne infekcije	Faza II	Interventna	SAD
Deskriptivna studija o primjeni terapije bakteriofagima kod teških infekcija	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Teške infekcije	/	Opservacijska	Lyon, Francuska
Sigurnost fekalne transplantacije bakteriofaga u nedonoščadi kao metoda pojačane maturacije gastrointestinalnog trakta	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Nekrotizirajući enterokolitis Nadomjestak mikroorganizama	Rana faza I	Interventna	Kopenhagen, Danska
Sigurnost, tolerancija i učinkovitost intravenske administracije bakteriofaga AP-SA02 u pacijenata s potvrđenom bakterijemijom uzrokovanom <i>S. aureus</i>	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Bakterijemija <i>S. aureus</i> Bakterijemija uzrokovana <i>S. aureus</i>	Faza I/II	Interventna	SAD Australija
Sigurnost i učinkovitost oralno administriranog koktela bakteriofaga VRELysin™ kod kolonizacije s vankomicin-rezistentnim enterokokima	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Vankomicin-rezistentna kolonizacija s enterokokima	Faza I/II	Interventna	SAD

Kohortna studija o sigurnosti bakteriofaga	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcije kosti i zglobova Infekcije umjetnih zglobova	/	Opservacijska	Lyon, Francuska
Sigurnost i mikrobiološka aktivnost terapije bakteriofagima kod pacijenata s cističnom fibrozom i potvrđenom kolonizacijom s <i>P. aeruginosa</i>	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Bakterijska infekcija <i>P. aeruginosa</i> Cistična fibroza	Faza I/II	Interventna	SAD
Učinkovitost koktela bakteriofaga LBP-EC01 u liječenju ne kompliciranih urinarnih infekcija uzrokovanih rezistentnom <i>E.coli</i>	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcija urinarnog trakta	Faza II	Interventna	SAD
Sigurnost i učinkovitost koktela bakteriofaga DUOFAG®	Proces uključivanja pacijenata u tijeku	Infekcije kirurških rana Infekcije kirurškog mjesta intervencije Infekcija uzrokovana <i>P. aeruginosa</i> Infekcija uzrokovana <i>S. aureus</i> Bakterijske infekcije	Faza I/II	Interventna	Brno, Češka

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bakteriofagi su visokospecifični virusi koji inficiraju bakterije, a mehanizam njihovog terapijskog djelovanja temelji se na upotrebi virulentnih bakteriofaga koji imaju sposobnost infekcije ciljne bakterijske vrste što dovodi do nastanka novih jedinki bakteriofaga, posljedične lize ciljne bakterijske stanice te reinfekcije drugih bakterijskih stanica ciljne vrste (Hibstu i sur., 2022). Danas se u većini razvijenih država primjena bakteriofaga svodi na milosrdnu uporabu („compassionate use“), primjenu lijeka kod pacijenata kod kojih su sve terapijske opcije iskorištene te se pozitivan terapijski ishod pokušava postići s lijekovima koje regulatorna tijela još nisu odobrila za primjenu (Garcia-Contreras i sur., 2022; Hitchcock i sur., 2023). Multicentričnom, multinacionalnom, retrospektivnom, opservacijskom studijom analizirani su učinci personalizirane primjene terapije bakteriofagima u periodu od 1. siječnja 2008. godine do 30. travnja 2022. godine u 100 slučajeva bakterijskih infekcija koje su pokazivale poteškoće prilikom liječenja standardnom antibiotskom terapijom. Poboljšanje stanja pacijenata detektirano je u 77.2% ukupnih slučajeva, a potpuna eradikacija ciljne bakterijske vrste postignuta je u 61.3% ukupnih infekcija, gdje je prilikom primjene terapije bakteriofagima u nekim slučajevima primijenjena i konkomitantna terapija antibioticima (Pirnay i sur., 2024).

Obzirom da je terapijski potencijal bakteriofaga više nego očit te da se pripravci bakteriofaga u terapijske svrhe koriste na području zemalja kao što su Rusija, Poljska, Gruzija i Belgija, pod regulativnim pravilima navedenih država, postavlja se pitanje zašto terapija bakteriofagima nije u većoj mjeri zastupljena nego što trenutno je (Yang i sur., 2023).

Cilj ovog rada je na pregledan i sažet način predstaviti najveće probleme koji su detektirani prilikom provedbe kliničkih studija ili koji su zamijećeni prilikom neovisnih *in vitro* i *in vivo* istraživanja, a koji su potencijalni uzrok smanjene implementacije terapije bakteriofagima prilikom liječenja bakterijskih infekcija.

3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovog preglednog rada korišteni su relevantni preglednici znanstvene literature poput baza podataka PubMed, Science Direct, ClinicalTrials.gov, društvena mreža Research Gate, mrežne stranice Europske agencije za lijekove, Američke agencije za hranu i lijekove te službene stranice regulatornog tijela Poljske. U izradi rada korištene su i znanstvene te stručne knjige.

Više od 97% ovog preglednog diplomskog rada temeljeno je na radovima objavljenima u znanstvenim časopisima.

Metode rada primijenjene u izradi ovog diplomskog rada uključivale su pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za glavnu temu odnosno pojedino poglavlje te potpoglavlje.

Pretraga baze PubMed uključivala je sljedeće ključne riječi: bacteriophage, bacteriophages, bacteriophage therapy, bacteriophage hurdles, regulatory issues, biofilm, clinical trials, bacteriophage pharmacokinetics, good manufacturing practice.

U ovom diplomskom radu su prikazani i diskutirani podaci, rezultati i zaključci relevantnih znanstvenih radova te su na kraju rada izneseni zaključci.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Farmakokinetika bakteriofaga

Apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija farmakokinetička su obilježja koja su kod bakteriofaga, za razliku od jednostavnijih kemijskih supstanci kao što su antibiotici, vrlo slabo opisana u literaturi. Poteškoće prilikom opisa farmakokinetičkih svojstava bakteriofaga uzrokovane su primarno njihovom strukturom, bakteriofagi su u odnosu na kemijske supstance velike strukture sastavljene od različitih proteina koji uzrokuju prepoznavanje i aktivaciju imunskog sustava putem mononuklearnih fagocita te neutralizaciju protutijelima usmjerenima prema proteinima bakteriofaga (Luong i sur., 2020).

Temelj određivanja farmakokinetičkih parametara je određivanje doze pripravka, odnosno primijenjenog broja čestica bakteriofaga (Nang i sur., 2023). Osim nespecifičnih faktora koji povećavaju klirens bakteriofaga kao što je aktivacija urođenih imunskih stanica ili spontana inaktivacija virusnih čestica, prilikom određivanja doze treba obratiti pažnju na činjenicu da se amplifikacija bakteriofaga u ciljnoj bakterijskoj populaciji može mijenjati tijekom vremena stoga se farmakokinetika najbolje prati modifikacijom doze simultano s primjenom terapije (Khatami i sur., 2022). Dok je različitim kliničkim studijama faze I i faze II te izvještajima o upotrebi terapije bakteriofagima kod pacijenata dobro opisana sigurnost bakteriofaga, isto ne vrijedi za farmakokinetičke karakteristike njihove primjene. Studija provedena u Bangladešu gdje su djeca s dijarejom uzrokovanom enterotoksičnom *E. coli* liječena s oralnim pripravcima kolifaga pokazala je slabu crijevnu amplifikaciju bakteriofaga te gotovo nikakvo poboljšanje simptoma dijareje. Analizom studije uočena je slaba *in vivo* osjetljivost *E. coli* na korištene kolifage te je zaključeno da su potrebne dodatne *in vivo* studije kako bi se razjasnio utjecaj fizičkih barijera, kao što su povećana peristaltika crijeva u toku proljeva, stupanj difuzije bakteriofaga kroz mukozni sloj te utjecaj biofilma na kretanje bakteriofaga unutar organizma (Sarker i sur., 2015).

4.1.1. Apsorpcija

Ekperimentalni podaci dostupni iz relevantnih izvora daju za zaključiti kako su najveće farmakokinetičke prepreke apsorpcije zamijećene prilikom peroralne primjene bakteriofaga te kod lokalne primjene u tretiranju bakterijskih infekcija u kojima je došlo do stvaranja biofilma (Dabrowska i Abedon, 2019). U ovom su poglavlju detaljnije

opisane prepreke peroralne primjene bakteriofaga dok su prepreke u distribuciji bakteriofaga kroz biofilm prikazane u poglavlju „Bakteriofagi i biofilm“ ovog diplomskog rada.

Bioraspoloživost lijeka u velikoj mjeri ovisi o načinu njegove administracije. Za određivanje bioraspoloživosti bakteriofaga potrebno je uzeti u obzir njegova morfološka obilježja, veličinu te mjesto infekcije (Nang i sur., 2023). Iako je peroralna primjena lijeka ona koja osigurava veću adherenciju pacijenta, uzevši u obzir da su bakteriofagi uglavnom sastavljeni od proteina i genetskog materijala koji se nalazi unutar kapside, za pretpostaviti je da takva primjena pripravka neće biti dovoljno učinkovita zbog izrazito kiselog medija unutar želuca koji može dovesti do denaturacije proteina kapside bakteriofaga te posljedično do njegove deaktivacije. Istraživanja su pokazala da je stabilnost bakteriofaga u uvjetima niskog pH varijabilna te da je posljedica interindividualnih razlika među pojedinim bakteriofaga, neki od njih pokazuju visoku toleranciju na ekstremno kisele uvjete dok su drugi osjetljivi kod niskog pH (Jonczyk i sur., 2011). U pojedinim studijama prilikom primjene pripravka bakteriofaga korišteni su neutralizatori želučane kiseline kako bi se povišenjem pH osigurali uvjeti koji bi pogodovali većoj stabilnosti bakteriofaga prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, no rezultati nisu pokazali značajnije očuvanje broja bakteriofaga te penetraciju bakteriofaga kroz gastrointestinalnu stijenku (Dabrowska, 2019). U istraživanju primjene terapije bakteriofagima kod pacijenata inficiranim bakterijskom vrstom *Vibrio cholerae* gdje je osam pacijenata tretirano koktelom bakteriofaga u dozi od 2×10^{12} PFU/ml (Phage Forming Units) pokazano je da je broj bakterija unutar crijeva rapidno pao kod polovice pacijenata dok je kod druge polovice taj broj sporije padao. Na temelju rezultata studije se da zaključiti kako su bakteriofagi u dovoljnoj količini uspješno pristigli na mjesto infekcije unatoč niskom pH želuca. Iako je dokazano uspješno *in situ* djelovanje bakteriofaga kod polovice pacijenata, unutar studije mjerena je i koncentracija bakteriofaga u krvi čime je pokazano kako je sistemska bioraspoloživost koktela bakteriofaga znatno manja, iako je primjenjena vrlo visoka doza bakteriofaga koncentracija bakteriofaga u krvi bila je samo 10^2 PFU/mL (Dabrowska i Abedon, 2019; Monsur i sur., 1970).

Bakteriofag pVp-1 korišten je u *in vivo* studiji gdje je ispitivana učinkovitost bakteriofaga u liječenju miševa s infekcijom uzrokovanom pandemičnim sojem bakterijske vrste *Vibrio parahaemolyticus*. U studiji su korišteni peroralni i intraperitonealni pripravci bakteriofaga u dozi od 2.0×10^8 PFU po mišu. Farmakokinetičke studije pokazale su bržu

intraperitonealnu apsorpciju u odnosu na peroralnu, čak jedan sat nakon primjene intraperitonealne injekcije bakteriofagi su detektirani u krvi, dok je kod peroralne primjene proteklo više od jednog sata (Jun i sur., 2013). Veliki broj istraživanja pokazao je kako je parenteralna primjena bakteriofaga najučinkovitiji put primjene bakteriofaga. Unutar različitih parenteralnih oblika primjene, intraperitonealna primjena pripravka bakteriofaga pokazala se kao najučinkovitija jer rezultira najvećim titrom bakteriofaga te je prilikom testiranja na životinjama dokazan najmanji rizik od letalne septikemije (Dabrowska i Abedon, 2019).

4.1.2. Distribucija

Najveća distribucija bakteriofaga nakon intravenozne primjene pripravka detektirana je u tkivima jetre i slezene (Nang i sur., 2023; Dabrowska i Abedon, 2019). Akumulacija bakteriofaga u tkivima slezene i jetre konzistentno je prijavljena u različitim istraživanjima neovisno o vrsti bakteriofaga, dozi i putu primjene (Kang i sur., 2024). Bakteriofagi ulaze u jetru i slezenu iz krvi u vrlo kratkom vremenu nakon intravenozne primjene, a najveći titar, koji je često veći od onoga u krvi, postižu za jedan do tri sata nakon intravenske primjene (Dabrowska i Abedon, 2019). Slezena i jetra ključni su organi mononuklearnog fagocitnog sustava te se distribucija bakteriofaga u te organe promatra kao nespecifični mehanizam eliminacije od strane Kupfferovih stanica prisutnih u jetri i makrofaga slezene (Kang i sur., 2024).

Osim slezene i jetre gdje je distribucija bakteriofaga najveća, *in vivo* studija na miševima kojima je intravenski apliciran pripravak filamentoznog bakteriofaga fd-tet potvrdila je distribuciju bakteriofaga u različita druga tkiva kao što su bubrezi, pluća, mozak, jajnici, crijeva, gušterača, mokraćni mjehur te srčano tkivo, no, koncentracija bakteriofaga varirala je ovisno o tkivu (Kang i sur., 2024).

Iako je u navedenim studijama dokazana prisutnost bakteriofaga u raznim tkivima, nepoznato je dostižu li oni dovoljan titar na određenim mjestima bakterijske infekcije samom apsorpcijom i distribucijom (Dabrowska i Abedon, 2019). Provedene studije pokazale su kako distribucija bakteriofaga unutar organizma može biti optimizirana načinom primjene i dozom primijenjenog pripravka bakteriofaga (Kang i sur., 2024).

4.1.3. Eliminacija: imunosni odgovor na bakteriofage

Mehanizmi inaktivacije i eliminacije bakteriofaga u literaturi najviše su opisani djelovanjem imunosnog sustava nespecifičnim odnosno specifičnim imunosnim mehanizmima (Dabrowska i Abedon, 2019). Razumijevanje imunosnog odgovora naspram bakteriofaga koji se koriste u terapijske svrhe bitno je kako bi se optimizirala učinkovitost terapije bakteriofagima kao alternative antibioticima. Imunosni sustav ima sposobnost smanjivanja koncentracije bakteriofaga unutar organizma, ali također može i poboljšati antibakterijsku aktivnost u organizmu stimulirajući urođeni imunosni odgovor bakterijskom lizom na mjestu infekcije (Nang i sur., 2023; Krut i Bekeredjian-Ding, 2018). Iako je broj studija kojima je ispitivan utjecaj imunosnog sustava domaćina prema bakteriofagima korištenima u terapiji bakterijskih infekcija ograničen, u većini dostupnih studija opisano je kako terapijskom aplikacijom visokog titra bakteriofaga dolazi do aktivacije imunosnog sustava domaćina (Bekeredjian-Ding, 2018). U nastavku su navedeni mehanizmi koji mogu uzrokovati smanjenje titra bakteriofaga u organizmu djelovanjem imunosnog sustava.

Komplement, kao dio urođenog imunosnog sustava, utječe na vrijeme koje bakteriofagi provode u cirkulaciji kod ljudi i životinja. Istraživanjem imunosnog odgovora miša prema bakteriofagima ϕ X174 i T2, serumske komponente komplementa pokazale su se važne za neutralizaciju T2 bakteriofaga, ali ne i ϕ X174 (Hajek i Mandel, 1966). Osim što sastavnice komplementa uzrokuju direktno uništenje viriona, njihovom aktivacijom olakšava se proces fagocitoze čime djeluju kao opsonini (Dabrowska i Abedon, 2019). Slezena i jetra glavni su organi koji akumuliraju bakteriofage iz cirkulacije, no govoreći o sposobnosti fagocitoze, *in vivo* istraživanjem na modelu miša ustanovljeno je kako su čestice bakteriofaga zastupljene dvanaest puta više unutar tkiva jetre nego slezene, također, mjereći gubitak signala radioaktivno označenog bakteriofaga T4 ustanovljeno je kako se signal brže gubi unutar jetre u usporedbi sa slezenom. Prema provedenom istraživanju, unatoč činjenici da se bakteriofagi u velikoj mjeri akumuliraju unutar i jetre i slezene, zaključuje se kako jetra većom brzinom inaktivira bakteriofage (Inchley, 1969; Dabrowska i Abedon, 2019).

Antigen specifična metoda inaktivacije bakteriofaga opisana je na životinjskim modelima i kod ljudi (Dabrowska i Abedon, 2019). Proizvodnja neutralizirajućih protutijela specifičnih za bakteriofage ovisi o načinu administracije pripravka bakteriofaga, mjestu infekcije, imunosnom statusu domaćina, trajanju terapije te ima potencijal smanjenja titra

bakteriofaga te posljedično smanjenja učinkovitosti terapije (Nang i sur., 2023). Korištenje koktela bakteriofaga pokazalo se kao bitna stavka koja može pridonijeti jačoj aktivaciji stečenog imunskog odgovora u slučajevima kada se u koktelima nalaze bakteriofagi koji ekspimiraju više različitih antigena. U *in vivo* istraživanju na modelu miševa koloniziranih s vankomicin-rezistentnim enterokokima korišten je koktel bakteriofaga porodica *Myoviridae* i *Siphoviridae*. Koktel bakteriofaga pokazao je minimalnu aktivaciju urođenog imunskog odgovora, no nakon dva terapijska ciklusa aktiviran je stečeni imunski odgovor te stvaranje specifičnih neutralizirajućih antitijela koja su dovela do smanjenja učinka koktela bakteriofaga (Berkson i sur., 2024). Nije sa sigurnošću utvrđeno postoji li povezanost između prisutnosti neutralizirajućih antitijela i uspjeha liječenja, jer postoje prijavljeni slučajevi gdje ta antitijela nisu utjecala na ishod terapije. (Bernabeu-Gimeno i sur., 2024).

U slučaju tri pacijenta s cističnom fibrozom i infekcijom uzrokovanom vrstama *S. aureus* i/ili *P. aeruginosa*, kod kojih je terapija bakteriofagima primijenjena milosrdnom upotrebom, prijavljen je razvoj neutralizirajućih protutijela u razdoblju od 10 do 42 dana nakon prve inhalacijske doze kod sva tri pacijenta. Kod dva pacijenta simptomi kašlja i proizvodnje sluzi značajno su smanjeni dok se kod trećeg pacijenta stanje prije primijenjene terapije nije poboljšalo. Prema navedenoj studiji slučaja zaključuje se kako je utjecaj antitijela usmjerenih prema terapijskim bakteriofagima na ishod liječenja varijabilan. Dodatno saznanje ustanovljeno u analizi slučajeva, koje potencijalno ima učinak na ishod terapije, je prisutnost IgM i IgG antitijela usmjerenih na terapijske bakteriofage prije primijenjene prve doze. Prisutnost antitijela specifičnih prema terapijskim bakteriofagima prije primijenjene terapije mogla bi biti uzrok lošijeg ishoda (Bernabeu-Gimeno i sur., 2024). Oprečni izvještaji o učinku neutralizirajućih antitijela na ishod terapije naglašavaju potrebu za dodatnim istraživanjima o odnosu imunskog sustava i terapijskih bakteriofaga.

4.2. Sigurnost primjene bakteriofaga

Pojava nuspojava primjenom visokih titara bakteriofaga, oslobađanje endotoksina bakterijskom lizom i negativni utjecaj lizogenih bakteriofaga glavni su neželjeni učinci do kojih može doći terapijskom primjenom bakteriofaga. Iako pojava nuspojava povezanih s primjenom bakteriofaga nije učestala, kroz nekoliko studija uočene su nuspojave kao što su

upala, pojava crvenila, hipotenzija i groznica koja su povezane s primjenom bakteriofaga (Chung i sur., 2023).

Lipopolisaharidi su sastavni dio membrane gram-negativnih bakterija te se radi svog toksičnog učinka smatraju endotoksinima (Harper i sur., 2021). Lipopolisaharidi ne ispoljavaju toksični učinak kada se nalaze u sklopu bakterijske stanične stijenke, do njihovog toksičnog učinka može doći prilikom razaranja bakterijske stanice. Kako su endotoksini visokopotentni aktivatori citokina, može doći do razvijanja nuspojava kao što su crvenilo, nepravilni otkucaji srca, nestabilan tlak, dispneja, edem, urtikarija i osip. Iako oslobađanje endotoksina može predstavljati rizik prilikom primjene terapije bakteriofagima, istraživanje oslobađanja endotoksina prilikom raspada bakterijske stanice *E. coli* djelovanjem beta-laktama te djelovanjem bakteriofaga pokazalo je kako se djelovanjem bakteriofaga brže smanjuje rast bakterijskih stanica nego što je to slučaj kod beta-laktama čime se zaključuje kako se djelovanjem bakteriofaga endotoksini oslobađaju u manjoj mjeri (Dufour i sur., 2017). Bakteriofagi koji se koriste u terapijske svrhe virulentni su bakteriofagi koji osiguravaju ulazak u litički ciklus te posljedičnu lizu bakterijske stanice (Klumpp i sur., 2023). Primjena prirodno izoliranih lizogenih bakteriofaga u terapijske svrhe izbjegava se kako se njihovom primjenom povećava rizik horizontalnog transfera gena, odnosno, preuzimanja gena za antibiotsku rezistenciju i virulenciju iz primarno inficirane bakterije čime se ti geni aktivacijom lizogenog bakteriofaga mogu prenijeti unutar genoma druge bakterije (Chung i sur., 2023; Fernández i sur., 2019). Navedeni rizik nije dovoljno dobro opisan u literaturi zbog čega su potrebna dodatna istraživanja.

Iako je sigurnost primjene bakteriofaga pokazana u većem broju izvještaja slučaja i provedenih studija, važno je navesti potencijalne rizike vezane uz primjenu bakteriofaga kao terapije bakterijskih infekcija.

4.3. Bakteriofagi i biofilm

Kod velikog broja patogenih bakterija, sposobnost stvaranja biofilma važan je virulentni faktor koji praveći barijeru između patogena i imunskog sustava onemogućuje njegov učinkovit odgovor, a na isti način uvelike smanjuje djelotvornost antimikrobne terapije (Wu i sur., 2015; Gordon i Ramirez, 2024).

Iako je u provedenim *in vitro* i *in vivo* studijama prijavljena zadovoljavajuća učinkovitost bakteriofaga u smanjenju biofilma, možemo izdvojiti i određene prepreke koje bi mogle biti

uzrok njihove slabije djelotvornosti.

Biofilm je kompleksan sustav čiji je volumen sačinjen od 2 do 30% bakterijskih stanica, a ostatak, koji još nazivamo i ekstracelularnom polimernom tvari, sadrži polisaharide, proteine, ekstracelularnu DNA, lipide kao i tvari koje omogućavaju komunikaciju među samim bakterijama (Gliźniewicz i sur., 2024). Kompleksni sastav matriksa, čija kompleksnost ovisi i o stupnju maturacije samog biofilma, otežava penetraciju bakteriofaga do bakterijske stanice odnosno djeluje kao mehanička zapreka bakteriofagima. Na samom putu prema bakterijskoj stanici bakteriofag nailazi na zapreke sačinjene od sastavnica matriksa kao što su primjerice lipoteikoična kiselina i polisaharidi što dodatno usporava njegovu difuziju bakterijskoj stanici (Gordon i Ramirez, 2024). U *in vitro* istraživanju Hu i suradnika (2010), mjereći brzinu difuzije kroz agaroznu membranu različitih koncentracija agara, zaključeno je da brzina difuzije bakteriofaga ovisi o gustoći agara i morfologiji bakteriofaga. Prema provedenom istraživanju da se pretpostaviti da je situacija s biofilmom jednaka, štoviše u biofilmu se osim polisaharida nalaze i mnoge druge sastavnice koje mogu otežavati difuziju bakteriofaga. Rezistencija bakterija na terapiju bakteriofagima dodatno se komplicira kod biofilm-producirajućih vrsta. *In vitro* istraživanjem provedenog 2010. godine, gdje su bakteriofagom M4 tretirani uzorci biofilma vrste *P. aeruginosa* razvijeni na kateterima, dokazani su izolati rezistentni na bakteriofag M4. Deset od ukupno jedanaest izolata pokazivalo je potpunu rezistenciju prema bakteriofagu M4, dok je jedan izolat pokazivao parcijalnu rezistenciju (Fu i sur., 2010). Osim problema rezistencije koji je prepoznat i mnogim drugim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, postoji rizik i od pojave rezistentne sub-populacije koja ima sposobnost bržeg rasta pa time i stvaranja novog biofilma. Istraživanjima je pokazano da se rizik od navedenog problema može umanjiti korištenjem koktela bakteriofaga (Chegini i sur., 2020).

Quorum sensing (QS) naziv je za međustaničnu komunikaciju bakterija unutar biofilma. Bakterijske stanice komuniciraju na način da proizvode, oslobađaju pa zatim prepoznaju signalne molekule kako bi koordinirale niz bakterijskih procesa u ovisnosti o okolišu. Prisutnost bakteriofaga može biti okidač koji će potaknuti produkciju signalnih molekula koje posljedično mogu aktivirati neki od mehanizama koji će onemogućiti djelovanje bakteriofaga kao što je aktivacija CRISPR-Cas sustava unutar bakterije (opisano pod 4.4.), smanjenje ekspresije bakterijskih površinskih receptora, povećanje ekspresije raznih proteaza ili indukciju autodestrukcije bakterijske stanice (Leon-Felix i Villicana, 2021). Osim što bakterije smanjuju metaboličku aktivnost zbog nedostatka hranjivih tvari unutar biofilma, moguće je da se metabolička aktivnost smanjuje i zbog prisutnosti bakteriofaga (Chegini i sur., 2020).

Biofilm je u većini slučajeva polimikrobna zajednica bakterija. Takve zajednice bakterija čest su problem u kirurgiji kod implantanata, kroničnih infekcija rana te bolesti kao što su cistična fibroza te infektivni endokarditis. Biofilm polimikrobne zajednice kompleksniji je zbog prisutstva različitih vrsta bakterija koje luče, svaka svoju, ekstracelularnu polimernu tvar što pruža dodatan otpor djelovanju antimikrobnih tvari uključujući i same bakteriofage (Gliźniewicz i sur., 2024). Melo i suradnici (2019) proveli su *in vitro* ispitivanje učinkovitosti dva novootkrivena bakteriofaga, Zip (siphovirus vB_EfaS-Zip) i Max (podovirus vB_EfaP-Max). Ispitivanje su proveli na *in vitro* modelu biofilma kronične rane koji je sadržavao dvije bakterijske vrste enterokoka, *E. faecium* i *E. faecalis*. Rezultati su pokazali smanjenje biofilma odnosno smanjenje koncentracije bakterijskih stanica za 2.5 log CFU/mL nakon tri sata od infekcije. Smanjenje koncentracije bakterija opaženo je i u mjerenjima uzorkovanim 6 i 8 sati nakon infekcije, ali s manjom učinkovitošću. Uzorkovanjem nakon 24 sata od infekcije smanjenje koncentracije bakterijskih stanica iznosilo je 1 log CFU/mL. Veliko smanjenje u učinkovitosti bakteriofaga Zip i Max uočeno 24 sata nakon infekcije povezuje se s rezistencijom bakterija unutar biofilma (Melo i sur., 2019). Primjena koktela bakteriofaga (PT07,14/01 i PNM) u kombinaciji s antibiotskom terapijom (ceftazidim-avibaktam) prijavljena kod pacijenta s infekcijom vaskularnog grafta uzrokovanom višestruko rezistentnim sojem *P. aeruginosa* rezultirala je pojavom rezistentnih bakterijskih mutanata s većom proizvodnjom biofilma (Blasco i sur., 2023). Primjena koktela bakteriofaga strategija je kojom se smanjuje pojava rezistencije bakterija prema bakteriofagima i u slučaju bakterija koje tvore biofilm, no, prema navedenim istraživanjima pojava rezistencije moguća je i u tom slučaju s posljedičnim intenzivnijim stvaranjem biofilma.

4.4. Rezistencija na bakteriofage

Razvoj rezistencije bakterija na bakteriofage naveden je u mnogim izvještajima o eksperimentalnoj primjeni terapije bakteriofaga kod ljudi. U izvještaju slučaja pacijenta kod kojeg je plućna infekcija uzrokovana višestruko rezistentnom bakterijskom vrstom *K. pneumoniae* gdje je tretiran prvotno s bakteriofagom ΦKp_GWPB35, a zatim s koktelom bakteriofaga (ΦKp_GWPB35+ΦKp_GWPA139), nakon primijenjenog koktela bakteriofaga zamijećena je pojava rezistencije čiji je uzrok bio modifikacija lipopolisaharida koji je služio kao receptor za bakteriofage (Li i sur., 2023). Iako se znanstvena zajednica u velikoj mjeri okreće istraživanju bakteriofaga kao odgovor na bakterijsku rezistenciju, evolucijom bakterijskog genoma bakterije su također stekle mehanizme koji dovode do rezistencije i

prema bakteriofagima. Jedan od najzanimljivih mehanizama koje su bakterijske stanice evolucijski razvile je CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaces Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins) sistem koji im omogućuje razvijanje memorije na prijašnje infekcije pa ga se zbog toga poistovjećuje sa stečenim imunim odgovorom kod višestaničnih organizama (Orzechowska i Mohammed, 2019; Teklemariam i sur., 2023). Mehanizmi rezistencije su u nastavku sažeto opisani.

Adsorpcija. Ključan proces koji se mora ispravno odvijati kako bi bakteriofag uspješno inficirao bakterijsku stanicu je proces adsorpcije. Bakterije su razvile nekoliko mehanizama koji sprječavaju uspješnu adsorpciju bakteriofaga kao što su skrivanje površinskih receptora lučenjem ekstracelularnog matriksa, sinteza kompetitivnih inhibitora za receptore na bakterijskoj stanici te mutacije unutar bakterijskog genoma na mjestima koja kodiraju za stanične receptore čime se njihova struktura mijenja (Teklemariam i sur., 2023). Mehanizam mutacije unutar gena koji kodiraju za molekule bitne za adheziju i vezanje bakteriofaga onemogućava vezanje, a posljedično i injektiranje genskog materijala čime se bakteriofag neće moći replicirati te neće doći do lize bakterijske stanice. Osim modifikacije receptora koje bakteriofag koristi za adheziju, ona može biti spriječena i kompetitivnom inhibicijom. *In vitro* i *in vivo* istraživanjem Destoumieux-Garzon je zajedno sa svojim suradnicima dokazala kako mupirocin J25, bakteriocin kojeg sintetizira *E. coli* AY25, kompetitivnom inhibicijom blokira vezanje bakteriofaga T5 za siderofor FhuA prisutan na staničnoj površini bakterije. Siderofor FhuA je transporter za željezo koji bakteriofag T5 koristi za adheziju prilikom infekcije bakterijske stanice (Destoumieux-Garzón i sur., 2005).

Inhibicija superinfekcije. Superinfekcija je pojava gdje više istih ili sličnih viralnih čestica uzrokuje infekciju istog domaćina. Mehanizmom inhibicije superinfekcije primarnom infekcijom domaćina onemogućuje se sekundarna infekcija s potencijalno virulentnim bakteriofagom. Mehanizam inhibicije superinfekcije je potvrđen kod mnogih bakterijskih vrsta, ali je samo kod nekolicine detaljno opisan (Teklemariam i sur., 2023; Hunter i Fusco, 2022). Infekcijom *E. Coli* bakteriofagom T4 vrlo brzo nakon injektiranja genetskog materijala dolazi do ekspresije Spackle (gp 61.3 gen) i Imm (imm gen) proteina. Istraživanjima je postavljena hipoteza kako Spackle i Imm proteini inhibiraju aktivnost lizozima kodiranog gp5 (gene product 5) genom čime je onemogućena razgradnja peptidoglikanskog sloja te posljedično injektiranje genetskog materijala bakteriofaga (Shi i sur., 2020).

Restriksijsko-modifikacijski sustavi. Ukoliko se strani genetski materijal bakteriofaga uspješno injektira u bakterijsku stanicu restriksijska endonukleaza, koja je dio restriksijsko-

modifikacijskog sustava bakterijske stanice, će „pokidati“ genetski materijal virusa. Sustav restriksijske-modifikacije dio je ne-specifičnog odgovora bakterijske stanice prema stranoj DNA, a temelji se na detekciji mjesta prepoznavanja na genetskom materijalu bakteriofaga te djelovanju restriksijske endonukleaze kidanjem fosfodieterskih veza između udaljenosti četiri do osam parova baza (Teklemariam i sur., 2023).

Autodestrukcija bakterijske stanice. Kako dolazi do smrti bakterijske stanice na ovaj se mehanizam ne gleda u cijelosti kao mehanizam rezistencije nego kao strategiju kojom se bakterijska stanica služi kako bi spriječila daljnje propagaciju bakteriofaga kako bi spriječila širenje infekcije. Abortive infection (Abi) sustavi raznoliki su mehanizmi kojima svaka bakterijska stanica pokreće vlastitu smrt, ali svaki učinkovit Abi sustav zahtjeva dvije komplementarne funkcije, jednu koja detektira progresiju infekcije unutar citoplazme i drugu koja pokreće proces smrti bakterijske stanice kada svi mehanizmi kontrole infekcije zakažu (Arias i sur., 2022). Infekcija bakterijske stanice *E. coli* T4 bakteriofagom prvi je detaljno opisani Abi sustav. Nakon uspješne infekcije bakterijske stanice i nastanka kompleksa koji se sastoji od proteina bakteriofaga i DNA, dolazi do aktivacije unutarstaničnih proteina, u ovom slučaju RexA i RexB proteina gdje je RexA unutarstanični senzor, a RexB transmembranski ionski kanal koji uzrokuje depolarizaciju stanice. Depolarizacija stanice uzrokuje smanjenje unutarstanične koncentracije ATP-a čime se smanjuje sinteza metabolita i replikacija stanice što dovodi do stanične smrti (Thomason i Court, 2022; Arias i sur., 2022).

Toksin-antitoksin sustavi. Prisutnost bakteriofaga može potaknuti stvaranje toksina unutar bakterijske stanice koji mogu interferirati s infektivnim ciklusom unutar bakterijske stanice. Lokusi koji kodiraju za toksine nalaze se unutar bakterijskog genoma, a isti ne čine štetu bakterijskoj stanici zbog sinteze neutralizirajućeg antitoksina (LeRoux i sur., 2022). Kod *E. coli* opisan je MazF/MazE sustav koji inhibira infekciju T4 bakteriofagom inducirajući ribonukleaznu aktivnost MazF faktora čime se u potpunosti prekida infektivni ciklus bakteriofaga (Teklemariam i sur., 2023).

CRISPR-Cas sustav. Ovaj sustav obrambeni je mehanizam koji predstavlja adaptivni imunosni odgovor koji su arheje i bakterije stekle evolucijski kako bi se obranile od virusne DNA. Bakterijski CRISPR-Cas sustav sastoji se od CRISPR lokusa, kratkih palindromskih sekvenci međusobno odvojenih spacerima, te Cas proteina čiji se lokus za sintezu nalazi u blizini CRISPR lokusa (Teklemariam i sur., 2023). CRISPR-Cas sustavom bakterija ima sposobnost čuvanja kratkih dijelova DNA bakteriofaga čime ih pohranjuje kao razmaknice između kratkih palindromskih sekvenci te time formira imunosnu memoriju (Lopatina i sur.,

2022). Proces razvoja imunosti memorije kod bakterija putem CRISPR-Cas sustava odvija se u tri faze. Prva faza naziva se faza adaptacije koju karakterizira integracija dijela virusne nukleinske kiseline unutar bakterijskog CRISPR lokusa gdje integrirana virusna DNA čini CRISPR spacer. Drugom fazom razmaknice se nakon integracije transkribiraju te prerađuju do kratkih CRISPR RNA (crRNA) molekula koje se slažu u kompleks s Cas proteinima. U zadnjoj fazi nastali kompleks je u neprestanoj potrazi za stranom virusnom nukleinskom kiselinom, protospacerom, koja komplementarno odgovara crRNA (Lopatina i sur., 2022; Dicks i Vermeulen, 2024).

Činjenica da prilikom procesa adaptacije različite bakterije unutar populacije stječu različite virusne razmaknice rezultira velikom raznolikošću razmaknica unutar populacije bakterija čime se umanjuje mogućnost da će mutacije protospacera bakteriofagima omogućiti propagaciju (Rostol i Marraffini, 2019).

4.5. Regulatorne prepreke za terapijsku primjenu bakteriofaga

Terapijska učinkovitost bakteriofaga poznata je koliko i njihovo postojanje, no zbog otkrića visoko djelotvornih antibiotika par desetljeća kasnije, njihova je primjena napuštena u većini zapadnih zemalja, dok je primjena u terapijske svrhe nastavljena i do danas u istočnim zemljama kao što su Rusija, Gruzija i Poljska. U ljekarnama Gruzije i Rusije postoje komercijalno dostupni pripravci koktela bakteriofaga kao što su Pyofag® i Intestifag® koje pacijenti mogu kupiti bez recepta, a regulativa oko personalizirane primjene bakteriofaga je pod kontrolom državnih ministarstava zdravlja u tim zemljama (Yang i sur., 2023).

U Poljskoj je 2005. godine osnovana jedinica za terapiju bakteriofagima unutar Instituta za imunologiju i eksperimentalnu terapiju poljske akademije znanosti u Wrocław-u, unutar kojeg se od 1970-ih pripremaju formulacije bakteriofaga za bolnice širom Poljske, kako bi se daljnja proizvodnja i distribucija pripravaka bakteriofaga mogla nastaviti obzirom da je Poljska u svibnju 2004. godine postala članica Europske unije te time usvojila i regulativna pravila Europske agencije za lijekove (<https://binwit.pl/>). Duga tradicija proizvodnje i postojanje legislativa te infrastrukture vezane za osiguranje kvalitete i sigurnosti pripravaka bakteriofaga omogućilo je Poljskoj nastavak eksperimentalne primjene takvih pripravaka iako za nju moraju biti zadovoljena pravila postavljena od strane poljskog regulatornog tijela te primjena mora biti u skladu s Helsinškom deklaracijom (<https://hirszfeld.pl/>). Situacija nije jednaka u ostalim zemljama članicama gdje u većini država ne postoje regulatorni okviri ni infrastruktura koja bi poduprla takvu proizvodnju, a situaciju dodatno komplicira i činjenica da su pripravci bakteriofaga prema Europskoj agenciji za lijekove definirani kao medicinski

proizvodi te kao takvi moraju biti u skladu s pripadajućim zahtjevima sigurnosti i kvalitete te prilikom proizvodnje moraju pratiti stroga načela dobre proizvođačke prakse (www.ema.europa.eu). Biologija bakteriofaga uzrokuje niz prepreka koje je teško prevladati kako bi načela dobre proizvođačke prakse, onako kako medicinski proizvodi to zahtijevaju, bila zadovoljena. Bakteriofagi su infektivni mikroorganizmi, virusi, koji su podložni evolucijskim promjenama, te ih se ne može proučavati na način kao i kemijske supstance koje također spadaju u kategoriju medicinskih proizvoda. Ugledanjem na regulativne okvire koji vrijede u provedbi studija po prirodi sličnijih tvari, kao što su primjerice virusna vektorska cjepiva ili neutralizirajuća antitijela, olakšala bi se provedba kliničkih ispitivanja, a time potencijalno i implementacija terapije bakteriofagima u praksi (Yang i sur., 2023).

Obećavajući model terapije bakteriofagima kojim se izbjegavaju regulatorni zahtjevi, koje medicinski proizvod zahtjeva, ponudila je Belgija. Belgijski ministar socijalne politike i javnog zdravstva prepoznao je probleme koje nosi industrijska proizvodnja bakteriofaga te je predložio postavljanje regulatornog okvira na razini Belgije kojim će se pripravci bakteriofaga regulirati kao magistralni pripravci pripremljeni u bolničkoj ljekarni prema zahtjevima postavljenim farmakopejskom monografijom (Pirnay i sur., 2018). Belgijski model je model kojim terapija bakteriofagima postaje dostupnija pacijentima, no i on nosi svoje izazove koji dovode u pitanje njegovu stvarnu učinkovitost. Prepreke koje se povezuju s magistralnim pripravcima bakteriofaga najčešće se tiču stabilnosti pripravka pa posljedično i učinkovitosti. Istraživanje stabilnosti otopine bakteriofaga prije terapijske aplikacije pacijentima s kroničnim rinosinusitisom, sepsom, plućnim i muskuloskeletnim infekcijama pokazalo je odabirom neodgovarajuće primarne ambalaže titar bakteriofaga može pasti što može biti uzrok neučinkovitosti aplicirane terapije (Uyttebroek i sur., 2024).

U većini se država svijeta primjena bakteriofaga svodi na milosrdnu uporabu („compassionate use“), primjenu lijeka kod pacijenata kod kojih su sve terapijske opcije iskorištene te se pozitivan terapijski ishod pokušava postići s lijekovima koje regulatorna tijela još nisu odobrila za primjenu (Garcia-Contreras i sur., 2022; Hitchcock i sur., 2023). Milosrdna uporaba lijeka ne podliježe nikakvim regulatornim okvirima postavljenima od strane Europske agencije za lijekove, ona je koordinirana od strane države članice na temelju vlastitih procedura i pravila (<https://www.ema.europa.eu/>). Kako je primarna svrha milosrdne upotrebe lijeka primjena u svrhu pomoći pacijenta, ona se ne koristi kao relevantan izvor informacija o učinkovitosti i sigurnosti koja bi mogla biti korisna prilikom kliničkih studija ili odobrenja lijeka (Hitchcock i sur., 2023). Uspješnost terapije bakteriofagima koja je pokazana kod nekolicine pacijenata koji su terapiju bakteriofagima primili u vidu upotrebe iz milosti te

veći angažman znanstvene zajednice koja se bavi proučavanjem bakteriofaga faktori su koji značajno mogu pridonijeti razvoju bakteriofagnih terapijskih sustava u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama (McCallin i sur., 2019).

Izostanak regulatornih okvira te neujednačenost oko postojećih veliki je faktor koji otežava međusobnu suradnju znanstvenika iz različitih dijelova svijeta koja bi značajno pridonijela bržim i jasnijim odgovorima na većinu pitanja vezanih za sigurnost, stabilnost i učinkovitost terapije bakteriofagima.

4.5.1. Phagoburn klinička studija

Iako je provođenje kliničkih studija terapije bakteriofagima zadnjih godina u značajnom porastu, uvid u činjenicu da standardna procedura kliničkih studija predstavlja velik izazov u istraživanju učinkovitosti terapije bakteriofagima ponudila je Phagoburn studija, prva velika klinička studija bakteriofaga proizvedenih pod strogim načelima dobre proizvođačke prakse u svijetu, provedena u Europi pod pokroviteljstvom Europske komisije kao projekt kojim se željelo potaknuti istraživanje potencijalnih terapija u liječenju rezistentnih bakterijskih infekcija (www.cordis.europa.eu). Projekt je započeo 2013. godine, a studija na ljudima započela je tek u srpnju 2015. godine (www.clinicaltrials.gov). U razdoblju između 2013. i 2015. godine znanstvenici su u roku 12 mjeseci htjeli razviti metode dobre proizvođačke prakse u proizvodnji bakteriofaga, no taj se period produžio na 20 mjeseci zbog validacije postupaka proizvodnje i vođenja temeljite dokumentacije koje zahtjevaju načela dobre proizvođačke prakse kako bi sama studija zadovoljila sve potrebne zahtjeve i dobila regulatorna odobrenja za primjenu pripravka na ljudima (www.cordis.europa.eu). Proces proizvodnje i osiguranja kvalitete i sigurnosti bakteriofaga utrošio je značajan dio vremenskog okvira i financijskih sredstava predviđenih za Phagoburn studiju. Proces regrutacije je s predviđenih 24 mjeseca spao na 13 mjeseci zbog poteškoća u proizvodnom i administrativnom procesu. Studija je inicijalno uključivala tretiranje infekcije rana od opekline pacijenata kod kojih su izolirane vrste *E. coli* ili *P. aeruginosa*, no, u studiju se uključio samo jedan pacijent u čijem su izolatu rane utvrdili prisustvo vrste *E. coli* te 27 pacijenata kod kojih je u izolatu utvrđeno prisustvo vrste *P. aeruginosa*. Tada je na pacijentima ispitana učinkovitost koktela bakteriofaga PP1131 sastavljenog od 12 anti-*P. aeruginosa* bakteriofaga (Jault i sur., 2019). Važan faktor koji je utjecao na broj sudionika prikladnih za provedbu studije je učestala polimikrobnost inficiranih rana od opekotina odnosno prisustvo nekoliko različitih mikroorganizama u inficiranoj rani čime takvi pacijenti nisu bili pogodan odabir za ovu studiju iako je u izolatu iz rane dokazana prisutnost vrsta *E.*

coli odnosno *P. aeruginosa* (www.cordis.europa.eu). Studija je okončana u veljači 2017. godine zbog smanjenog učinka koktela bakteriofaga PP1131 gdje je uzrok smanjenog učinka bilo smanjenje titra pripravka koktela bakteriofaga koji je ustanovljen nakon proizvodnje te su pacijenti tretirani s nižom dozom pripravka nego je to bilo planirano. Sporednim studijama provedenim u vezi Phagoburn studije utvrđeno je prisustvo bakterija rezistentnih na niske doze bakteriofaga u pacijenata kod kojih je tretman bio neučinkovit (Jault i sur., 2019). Iako je Phagoburn klinička studija unutar koje su bakteriofagi proizvedeni po načelima dobre proizvođačke prakse kako nalaže Europska agencija za lijekove, propusti identificirani tokom proizvodnje bakteriofaga te poteškoće s uključivanjem pacijenata ukazuju kako forma kliničke studije koja se provodi za kemijske supstance donosi niz poteškoća koje otežavaju njenu provedbu i negativno utječu na ispitivanje stvarnog potencijala terapije bakteriofagima (Patey i sur., 2018).

4.6. Dobra proizvođačka praksa bakteriofaga

Dobra proizvođačka praksa (DPP) predstavlja niz minimalnih standarda koje proizvođač mora osigurati tijekom proizvodnog procesa medicinskog proizvoda (<https://www.ema.europa.eu/>). Proizvodni proces pripravaka bakteriofaga pokazao se izazovnim kao i njegova standardizacija prvenstveno zbog sklonosti bakteriofaga evolucijskim promjenama te poteškoćama s reproducibilnošću proizvodnog procesa (Hitchcock i sur., 2023; Harper i sur., 2021). Najbolji primjer koliko je proces proizvodnje i standardizacije terapijskih bakteriofaga izazovan predstavila je Phagoburn studija gdje je veliki dio vremena i sredstava predviđenih za studiju utrošen upravo na razvoj standarda DPP (www.cordis.europa.eu). Najveća prepreka u provedbi DPP prilikom proizvodnje pripravaka je nedostatak infrastrukture unutar većine zemalja. DPP zahtjeva postojanje rigoroznih smjernica koje će osigurati dizajn, održavanje, kontrolu proizvodnje kao i aparaturu potrebnu za proizvodnju bakteriofaga unutar, za to, predviđenog objekta (Bretaudeau i sur., 2020). Unutar Ujedinjenog Kraljevstva većina bakteriofaga, koji se koriste u svrhe istraživanja i liječenja pacijenata kod kojih su sve terapijske opcije iskorištene, uvezena je iz drugih država koje posjeduju laboratorije koji se bave njihovom proizvodnjom. Proizvodnja uvezenih bakteriofaga ne mora ispunjavati zahtjeve DPP države u koju je pripravak uvezen iako se provodi osiguranje kvalitete i karakterizacija bakteriofaga od strane institucije preko koje je terapija osigurana. Takva dostupnost bakteriofaga dugoročno je neisplativa, a postavlja se pitanje njihove kvalitete i sigurnosti (Suleman i sur., 2024). Situacija u Ujedinjenom Kraljevstvu slična je kao i u većini drugih država u kojima bakteriofagi nisu registrirani kao medicinski proizvodi te ne postoji

infrastruktura koja bi mogla osigurati proizvodnju bakteriofaga po načelima DPP postavljene od strane regulatornog tijela pripadajuće države.

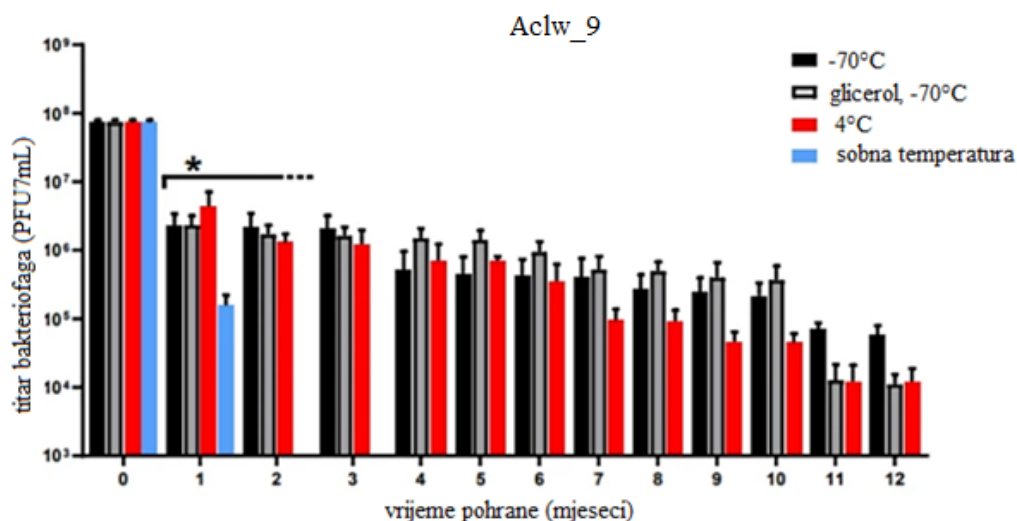
DPP temeljni je zahtjev provedbe relevantnih kliničkih studija, posebice kada je medicinski proizvod namijenjen za masovnu proizvodnju, no raznolikost bakterijskih infekcija, specifičnost bakteriofaga naspram bakterijske vrste i razvoj rezistencije nameće preispitivanje potrebe i isplativosti proizvodnje pripravaka bakteriofaga na velikoj skali (Bretaudeau i sur., 2020).

4.6.1. Prirodni i modificirani bakteriofagi

U većini, do danas, provedenih istraživanja i terapijskih aplikacija primijenjeni su prirodno izolirani litički bakteriofagi. Prirodno izolirani bakteriofagi mogu biti uzrok nekoliko problema kao što su neutralizacija bakteriofaga djelovanjem imunosnog sustava koja se povećava prilikom primjene koktela bakteriofaga, poteškoće prilikom izolacije visokospecifičnih bakteriofaga s obzirom na ciljnu bakterijsku vrstu, razvoj rezistencije ili poteškoće povezane s prisustvom biofilma (Bretaudeau i sur., 2020). Dodatan problem uzrokuje činjenica da su bakteriofagi prirodno prisutni entiteti te kao takvi ne podliježu patentiranju. Kako se prirodno izolirani mogu jednostavno kopirati odnosno kako se iz formulacije pripravka bakteriofaga oni mogu izolirati te se formulacija može modificirati, investicije korporacija u razvoj pripravka bakteriofaga za njih predstavlja rizik neisplativosti zbog čega je potpora istraživanja bakteriofaga od strane farmaceutske industrije slaba (Suleman i sur., 2024; Bretaudeau i sur., 2020). Zbog navedenih prepreka sve se veća pažnja pridaje proizvodnji genetski modificiranih bakteriofaga čijom se modifikacijom može poboljšati vezanje bakteriofaga za ciljnu bakterijsku stanicu, neutralizirati mehanizmi rezistencije od strane bakterije, poboljšati učinkovitost bakteriofaga unutar biofilma ili uzrokovati ponovna senzitivizacija bakterija na antibiotike. Primjena genetski modificiranog koktela bakteriofaga (Muddy, BPs33ΔHTH-HRM10 i ZoeJΔ45) zabilježena je kod 15-godišnjeg pacijenta s cističnom fibrozom te infekcijom uzrokovanom bakterijskom vrstom *Mycobacterium abscessus*. Intravenska primjena genetski modificiranog koktela bakteriofaga pokazala je značajnu djelotvornost te značajno poboljšanje pacijenta (Dedrick i sur., 2019). Unatoč izvještaju slučaja 15-godišnjeg pacijenta, proizvodnja i primjena genetski modificiranih bakteriofaga nailazi na dodatne regulatorne prepreke u usporedbi s prirodno izoliranim bakteriofagima povezanih s upotrebom genetski modificiranih tvari (Bretaudeau i sur., 2020).

4.6.2. Stabilnost formulacije s bakteriofagima

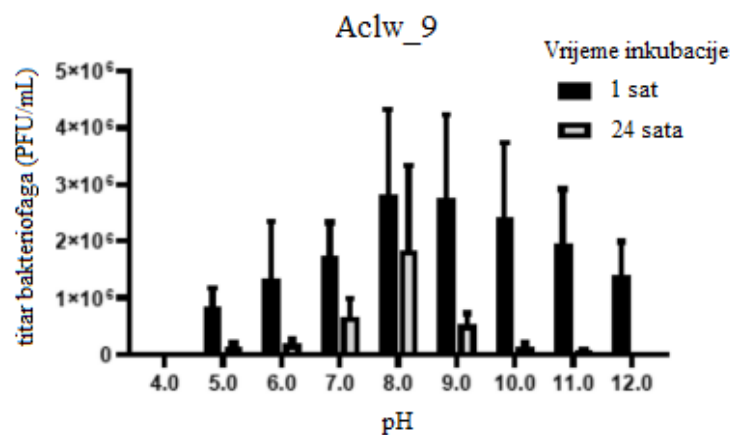
Phagoburn studija primjer je za mnoge aspekte koje je potrebno optimizirati kako bi terapijski potencijal primjene bakteriofaga bio u potpunosti iskorišten. Veliki problem ustanovljen u toj studij bio je gubitak titra bakteriofaga nakon proizvodnje i pohrane pripravka. Smanjeni udio titra ustanovljen je na kraju studije te je moguće da je uzrokovao nezadovoljavajući ishod same studije (www.cordis.europa.eu). Nedavnom studijom, provedenom od strane Bagińska i suradnika (2024), ispitivana je stabilnost dvanaest različitih bakteriofaga specifičnih za bakterijsku vrstu *Acinetobacter baumannii* u različitim uvjetima koji mogu uzrokovati promjene u stabilnosti bakteriofaga. Studijom je opisano kako varijacije u pH vrijednosti i temperaturi te prisutnost surfaktanta, esencijalnih ulja i komercijalno dostupnih dezinficijensa utječe na njihovu stabilnost. Zbog opširnosti studije u nastavku su prikazani eksperimentalni rezultati vezani za utjecaj pH i temperature na stabilnost jednog od ukupno dvanaest bakteriofaga koji su korišteni u studiji. Bakteriofagi su unutar studije inkubirani u periodu od dvanaest mjeseci na temperaturama od 4°C, sobnoj temperaturi (25°C), -70°C te na temperaturi -70°C uz dodatak 25% glicerola. Na Slici 2., prikazana je ovisnost titra bakteriofaga Aclw_9 o vremenskom periodu unutar kojeg je praćena stabilnost.



Slika 2. Prikaz stabilnosti bakteriofaga Aclw_9 prilikom inkubacije u periodu od 12 mjeseci na različitim temperaturama (preuzeto i prilagođeno iz Bagińska i sur., (2024) uz dopuštenje izdavača).

Rezultati su pokazali da je sobna temperatura (25°C) najmanje pogodna za pohranu bakteriofaga Aclw_9, titar bakteriofaga nakon dva mjeseca pohrane smanjen je s početnih 7.4×10^7 PFU/mL na 1.75×10^1 PFU/mL. Prema provedenom istraživanju najoptimalnija temperatura za pohranu bakteriofaga Aclw_9 je -70°C. Najoptimalnija temperatura pokazana ovom studijom za ispitane bakteriofage bakterijske vrste *A. baumannii* je -70°C.

Ispitivanje utjecaja pH na titar provedeno je inkubacijom bakteriofaga u otopinama različitih pH vrijednosti u vremenskim intervalima od 1 sata i 24 sata. Slika 3. prikazuje ovisnost titra bakteriofaga Aclw_9 u periodu inkubacije od 1 i 24 sata pri danoj pH vrijednosti.



Slika 3. Prikaz stabilnosti bakteriofaga Aclw_9 prilikom inkubacije u periodu od 1 i 24 sata u uvjetima različitih pH vrijednosti (preuzeto i prilagođeno iz Baginska i sur., (2024) uz dopuštenje izdavača).

Nakon jednog sata inkubacije u otopini pH 3 nisu detektirane čestice bakteriofaga Aclw_9, a nakon 24 sata inkubacije čestice istog bakteriofaga nisu detektirane pri pH 4. Ukupni rezultati studije pokazali su kako su bakteriofagi bakterijske vrste *A. baumannii* korištenih u ovoj studiji pokazali najveću stabilnost u otopinama pH vrijednosti od 7 do 9. Provedenom studijom da se zaključiti kako je prilikom izrade formulacije bakteriofaga potrebno detaljno ispitati stabilnost bakteriofaga u različitim uvjetima kako bi se osigurala učinkovitost terapije.

5. ZAKLJUČCI

- Farmakokinetička svojstva bakteriofaga predstavljaju veliki izazov u razvoju terapijskih sustava s bakteriofagima zbog njihove kompleksne strukture koja izaziva imunološke reakcije u organizmu. Ovo uključuje prepoznavanje od strane imunološkog sustava, neutralizaciju protutijelima, te varijabilnu stabilnost u različitim fiziološkim uvjetima.
- Put primjene bakteriofaga značajno utječe na njihovu apsorpciju i učinkovitost terapije. Peroralna primjena često pokazuje ograničenu učinkovitost zbog kiselog pH želucu, dok je parenteralna primjena, posebno intraperitonealna, efikasnija jer omogućava bržu apsorpciju i viši titar bakteriofaga u cirkulaciji.
- Nuspojave terapije bakteriofagima su rijetke, ali može doći do upale, crvenila, hipotenzije i groznice. Rizik je povezan s oslobađanjem endotoksina tijekom bakterijske lize. Upotreba lizogenih bakteriofaga može povećati rizik od horizontalnog prijenosa gena, što dodatno komplicira terapiju.
- Bakterije mogu razviti rezistenciju na bakteriofage kroz nekoliko mehanizama, uključujući stvaranje biofilma, modifikaciju površinskih receptora, inhibiciju superinfekcije, restrikcijsko-modifikacijske sisteme i autodestrukciju stanica. CRISPR-Cas sustav omogućava bakterijama adaptivni imunitet, stvarajući memoriju na prethodne infekcije i dalje povećavajući otpornost na bakteriofage.
- Primjena bakteriofaga u terapiji je ograničena zbog nedostatka odgovarajućih regulatornih okvira u mnogim zemljama, što komplicira međunarodnu suradnju i standardizaciju. Iako zemlje poput Poljske, Gruzije i Rusije imaju uspostavljene sustave za primjenu bakteriofaga, većina zemalja, posebno unutar Europske unije, nema infrastrukturu ni regulative koje bi omogućile široku primjenu bakteriofaga.

- Proizvodnja bakteriofaga prema standardima DPP predstavlja značajan izazov zbog njihove sklonosti evolucijskim promjenama i poteškoćama u reproducibilnosti proizvodnih procesa. Stabilnost formulacija s bakteriofagima, kao što je pokazano u Phagoburn studiji, ključan je problem, jer gubitak titra bakteriofaga može dovesti do smanjene učinkovitosti terapije.
- Iako bakteriofagi imaju ograničenja, poput razvoja rezistencije i problema s patentiranjem, genetski modificirani bakteriofagi nude mogućnosti za poboljšanje njihove učinkovitosti i prevladavanje bakterijske rezistencije. Međutim, njihova primjena susreće dodatne regulatorne prepreke zbog upotrebe genetski modificiranih organizama, što dodatno komplicira njihovu širu implementaciju u terapiji.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

® - simbol registriranog zaštitnog proizvoda

°C – Celzijev stupanj

Abi- eng. Abortive infection

CFU- eng. Colony Forming Unit

CRISPR-Cas- eng. Clustered Regularly Interspaces Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins

DNA- eng. deoxyribonucleic acid

DPP- dobra proizvođačka praksa

ESKAPE – akronim koji objedinjuje bakterijske vrste *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*

mL - mililitar

PFU – eng. Phage Forming Unit

RNA – eng. ribonucleic acid

spp. – lat. species (plural), taksonomska podjedinica koja označava različite vrste unutar određenog roda

7. LITERATURA

- Abram M, Škrobonja I, Ambrižić D, Repac-Antić D, Bubonja Šonje M., ESKAPE- bakterije koje su uzburile svijet, *Medicina*, 2018, Vol.54, No.3.
- Almeida GMF, Leppanen M, Maasilta IJ, Sundberg L-R., Bacteriophage imaging: past, present and future, *Research in Microbiology*, 2018, 169, 488-494.
- Arias CF, Acosta FJ, Bertocchini F, Herrero MA, Fernández-Arias C., The coordination of anti-phage immunity mechanisms in bacterial cells, *Nature Communications*, 2022, 13, 7412.
- Bagińska N, Grygiel I, Orwat F, Harhala MA, Jędrusiak A, Gębarowska E, Letkiewicz S, Górski A i Jończyk-Matysiak E., Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Scientific Reports*, 2024, 14, 4285.
- Berkson JD, Wate CE, Allen GB, Schubert AM, Dunbar KE, Coryell MP, Sava RL, Gao Y, Hastie JL, Smith EM, Kenneally CR, Zimmermann SK i Carlson PE., Phage-specific immunity impairs efficacy of bacteriophage targeting Vancomycin Resistant *Enterococcus* in a murine model, *Nature Communications*, 2024, 15, 2993.
- Bernabéu-Gimeno M, Pardo-Freire M, Chan BK, Turner PE, Gil-Brusola A, Pérez-Tarazona S, Carrasco-Hernández L, Quintana-Gallego E, Domingo-Calap P., Neutralizing antibodies after nebulized phage therapy in cystic fibrosis patients, *Elsevier Inc*, 2024, 38917792.
- Blasco L, López-Hernández I, Rodríguez-Fernández M, Pérez-Florido J, Casimiro-Soriguer CS, Djebara S, Merabishvili M, Pirnay J-P, Rodríguez-Baño J, Tomás M i López Cortés LE., Case report: Analysis of phage therapy failure in a patient with a *Pseudomonas aeruginosa* prosthetic vascular graft infection, *Frontiers in Medicine*, 2023, 10.
- Bretonneau L, Tremblais K, Aubrit F, Meichenin M i Arnaud I., Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products, *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11.

Chegini Z, Khoshbayan A, Moghadam MT, Farahani I, Jazireian P i Shariati A., Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2020, 19, 45.

Chung KM, Nang SC i Tang SS., The Safety of Bacteriophages in Treatment of Diseases Caused by Multidrug-Resistant Bacteria, *Pharmaceuticals*, 2023, 16(10), 1347.

Compassionate use, www.ema.europa.eu, pristupljeno 05.06.2024.

Dabrowska K i Abedon ST, Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 83.

Dabrowska K, Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review, *Medicinal Research Reviews*, 2019, 39, 2000-2025.

Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF i Spencer H., Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*, *Nature Medicine*, 2019, 25, 730-733

Destoumieux-Garzón D, Duquesne S, Peduzzi J, Goulard C, Desmadril M, Letellier L, Rebuffat S, Boulanger P., The iron–siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11–Pro16 β -hairpin region in the recognition mechanism, *Biochemical Journal* , 2005, 389(3): 869-876.

Development and manufacture of human medicinal products specifically designed for phage therapy - Scientific guideline, 2023, www.ema.europa.eu , pristupljeno 05.06.2024.

Dicks LMT i Vermeulen W., Bacteriophage–Host Interactions and the Therapeutic Potential of Bacteriophages, *Viruses*, 2024, 16(3), 478.

Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny, *Nature Reviews Microbiology* 2020, 18, 125-138.

Duin D, Paterson DL., Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned, *Infectious Disease Clinics of North America*, 2016, 30(2), 377-390.

Dufour N, Dlatte R, Ricard J-D i Debarbieux L., The Lysis of Pathogenic Escherichia coli by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams, *Clinical Infectious Diseases*, 2017, 64(11), 1582-1588.

Elois MA, da Silva R, Von Tönnemann Pilati G, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G., Bacteriophages as Biotechnological Tools, *Viruses*, 2023, 15(2), 349.

Evaluation of phage therapy for the treatment of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa burn wound infections (Phase I-II clinical trial), 2017, www.cordis.europa.eu, pristupljeno 07.06.2024.

Fernández L, Gutiérrez D, García P i Rodríguez A., The Perfect Bacteriophage for Therapeutic Applications—A Quick Guide, *Antibiotics*, 2019, 8(3), 126.

Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM i Donlan RM., Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa on Catheters in an In Vitro Model System, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 397-404.

Garcia-Contreras R, Martinez-Vazquez M, Gonzales-Pedrajo B, Castillo-Juarez I., Editorial: Alternatives to Combat Bacterial Infections, *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13.

Gliźniewicz M, Miłek D, Olszewska P, Czajkowski A, Serwin N, Cecerska-Heryć E, Dołęgowska B i Grygorcewicz B., Advances in bacteriophage-mediated strategies for combating polymicrobial biofilms, *Frontiers in Microbiology*, 2024, 14.

Gordon M i Ramirez P, Efficacy and Experience of Bacteriophages in Biofilm-Related Infections, *Antibiotics*, 2024, 13(2).

Hajek P i Mandel L., Antibody response of young animals to bacteriophages of different immunological behaviour: Φ X 174 and T2, *Folia Microbiologica*, 1966, 11, 282-289.

Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH i McConville BL, Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy, Cham, Springer Nature Switzerland, 2021.

Hibstu Z, Belew H, Akelew Y i Mengist HM., Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections, *Biologics: Targets and Therapy*, 2022, 16, 173-186.

Hitchcock NM, Devequi Gomes Nunes D, Shiach J, Hodel KWS, Barbosa JSV, Alencar Pereira Rodrigues L, Coler BS, Botelho Pereira Soares M, Badaró R., Current Clinical Landscape and Global Potential of Bacteriophage Therapy, *Viruses*, 2023, 15(4), 1020.

Hu J, Miyanaga K, Tanji Y., Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane, *Biotechnology Progress*, 2010, 26, 1213-1221.

Hunter M i Fusco D., Superinfection exclusion: A viral strategy with short-term benefits and long-term drawbacks, *Plos Computational Biology*, 2022, 18(5): e1010125

Hutchings M I, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 51, 96, 72-80.

Inchley CJ., The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage, *Clinical and Experimental Immunology*, 1969, 5(1), 173-187.

Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G., Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial, *The Lancet Infectious Diseases*, 2019, 19, 35-45.

Jonczyk E, Klak M, Miedzybrodzki R, Gorski A., The influence of external factors on bacteriophages—review, *Folia Microbiologica*, 2011, 56, 191-200.

Jun JW, Shin TH, Kim JH, Shin SP, Han JE, Heo, GJ, De Zoysa M, Shin GW, Chai JY, Park SC., Bacteriophage Therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* Infection Caused by a Multiple-Antibiotic-Resistant O3:K6 Pandemic Clinical Strain, *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 20, 72-78.

Jurczak-Kurek A, Gąsior T, Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Dydecka A, Topka G, Necel A, Jakubowska-Deredas M, Narajczyk M, Richert M, Mieszkowska M, Wróbel B, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage, *Scientific Reports*, 2016, 6, 34338.

Kalenić S. i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 111-113.

- Kang D, Bagchi D, Chen IA., Pharmacokinetics and Biodistribution of Phages and their Current Applications in Antimicrobial Therapy, *Advanced Therapeutics*, 2024, 7(3), 2300355.
- Khatami A, Foley DA, Warner MS, Barnes EH, Peleg AY, Li J, Stick S, Burke N, Lin RCY, Warning J, Snelling TL, Tong SYC, Iredell J and the Phage Australia Clinical Network, Standardised treatment and monitoring protocol to assess safety and tolerability of bacteriophage therapy for adult and paediatric patients (STAMP study): protocol for an open-label, single-arm trial, *BMJ Journals*, 2022, 12(12).
- Klumpp J, Dunne M, Loessner MJ., A perfect fit: Bacteriophage receptor-binding proteins for diagnostic and therapeutic applications, *Current Opinion in Microbiology*, 2023, 71, 102240.
- Kosalec I. i suradnici. Antimikrobna rezistencija- IZAZOVI I RJEŠENJA. Zagreb, Profil, 2021. str. 26.
- Krut O i Bekeredjian-Ding I., Contribution of the Immune Response to Phage Therapy, *The Journal of Immunology*, 2018., 200(9), 3037-3044.
- Leon-Felix J i Villicana C., The Impact of Quorum Sensing on the Modulation of Phage-Host Interactions, *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(11).
- Li J, Yan B, He B, Li L, Zhou X, Wu N, Wang Q, Guo X, Zhu T, Qin J., Development of phage resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with reduced virulence: a case report of a personalised phage therapy, *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(12), 1601.
- Li N, Zeng Y, Wang M, Bao R, Chen Y, Li X, Pan J, Zhu T, Hu B, Tan B., Characterization of Phage Resistance and Their Impacts on Bacterial Fitness in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5), e02072-22
- Lopatina A, Tal N, Sorek R., Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy, *Annual Review of Virology*, 2020, 7(1), 371-384.
- Luong T, Salabarria AC, Roach DW., Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going?, *Clinical Therapeutics*, 2020, 42(9), 1659-1680.

Makky S, Dawoud A, Safwat A, Abdelsattar AS, Rezk N, El-Shibiny A., The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria, *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 2, 100050.

Malik DJ, Sokolov IJ, Vinnera GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladislavljevic GT, Clokie MRJ, Garton NJ, Stapley AGF, Kirpichnikovac A., Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 249, 100-133.

McCallin S, Sacher JC, Zheng J, Chan BK, Current State of Compassionate Phage Therapy, *Viruses*, 2019, 11(4): 343.

Monsur KA, Rahman MA, Huq F, Islam MN, Northrup RS, Hirschhorn N., Effect of massive doses of bacteriophage on excretion of vibrios, duration of diarrhoea and output of stools in acute cases of cholera, *Bulletin of the World Health Organisation*, 1970, 42(5), 723-732.

Murray CJL i sur. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 2022, 399, 629-655.

Nang SC, Lin YW, Petrović Fabijan A, Chang RYK, Rao GG, Iredell J, Chan HK, Li J., Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: a major hurdle to clinical translation, *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(6), 702-709.

Naureen Z, Dautaj A, Anpilogov K, Camilleri G, Dhuli K, Tanzi B, Maltese PE, Cristofoli F, De Antoni L, Beccari T, Dundar M, Bertelli M., Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations, *Acta Biomedica Atenei Parmensis* 2020, 91(13), e2020024.

Orzechowska B. i Mohammed M., The War between Bacteria and Bacteriophages, 2019, 87247.

Paczesny J i Bielec K., Application of Bacteriophages in Nanotechnology, *Nanomaterials*, 2020, 10(10), 1944.

Panahi B, Dehganzad B, Nami Y., CRISPR-Cas systems feature and targeting phages diversity in *Lactocaseibacillus rhamnosus* strains, *Frontiers in Microbiology*, 2023, Vol 14.

Patey O, McCallin S, Mazure H, Liddle M, Smithyman A, Dublanchet A, Clinical Indications and Compassionate Use of Phage Therapy: Personal Experience and Literature Review with a Focus on Osteoarticular Infections, *Viruses*, 2018, 11(1), 18.

Phage Therapy Unit, <https://binwit.pl/> , pristupljeno 05.06.2024.

Pirnay JP, Djebara S, Steurs G, Griselain J, Cochez C, De Soir S, Glonti T, Spiessens A, Vanden Berghe E, Green S, Wagemans J, Lood C, Schrevens E, Chanishvili N, Kutateladze M, de Jode M, Ceysens P-J, Draye J-P, Verbeken G, De Vos D, Rose T, Onsea J, Van Nieuwenhuysse B, Bacteriophage Therapy Providers, Bacteriophage Donors, Soentjens P, Lavigne R i Merabishvili M., Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study, *Nature Microbiology*, 2024, 9(6), 1434-1453.

Pirnay JP, Verbeken G, Ceysens PJ, Huys I, De Vos D, Ameloot C, Fauconnier A., The Magistral Phage, *Viruses*, 2018, 10(2), 64

Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis, 2017., <https://www.who.int/>, pristupljeno 25.3.2024.

Rosenblatt-Farrell N. The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environ Health Perspectives*, 2009, 117(6), 244-250.

Rostøl JT, Marraffini L., (Ph)ighting phages – how bacteria resist their parasites, *Cell Host Microbe*, 2019, 25(2), 184-194.

Salmond GPC, Fineran PC., A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12), 777-786.

Shi K, Oakland JT, Kurniawan F, Moeller NH, Banerjee S, Aihara H., Structural basis of superinfection exclusion by bacteriophage T4 Spackle, *Communications Biology*, 2020, 3, 691.

Suleman M, Clark JR, Bull S i Jones JD., Ethical argument for establishing good manufacturing practice for phage therapy in the UK, *Journal of Medical Ethics*, 2024, 109423

Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u Hrvatskoj, 2018, <https://hrcak.srce.hr/>, pristupljeno 21.3.2024.

Teklemariam AD, Al-Hindi RR, Qadri I, Alharbi MG, Ramadan WS, Ayubu J, Al-Hejin AM, Hakim RF, Hakim FF, Hakim RF, Alseraihi LI, Alamri T, Harakeh S., The Battle between Bacteria and Bacteriophages: A Conundrum to Their Immune System, *Antibiotics*, 2023, 12(2), 381.

Thomason LC i Court DL, Study of Ren, RexA, and RexB Functions Provides Insight Into the Complex Interaction Between Bacteriophage λ and Its Host, *Escherichia coli*, *Phage*, 2022, 3(3), 153-164.

Uyttebroek S, Bessems L, Metsemakers WJ, Debaveye Y, Van Gerven L, Dupont L, Depypere M, Wagemans J, Lavigne R, Merabishvili M, Pirnay JP, Devolder D, Spriet I, Onsea J., Stability of magistral phage preparations before therapeutic application in patients with chronic rhinosinusitis, sepsis, pulmonary, and musculoskeletal infections, *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6), e02907-23

Vázquez R, Díez-Martínez R, Domingo-Calap P, García P, Gutiérrez D, Muniesa M, Ruiz-Ruigómez M, Sanjuán R, Tomás M, Tormo-Mas MA, García P, Essential Topics for the Regulatory Consideration of Phages as Clinically Valuable Therapeutic Agents: A Perspective from Spain, *Microorganisms*, 2022, 10(4):707.

Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?. *Mycologia*, 1947, 39(5), 565-569.

Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song Z-J, Strategies for combating bacterial biofilm infections, *International Journal of Oral Science*, 2015, 7, 1-7.

Wu Z, Zhang Y, Xu X, Ahmed T, Yang Y, Loh B, Leptihn S, Yan C, Chen J, Li B., The Holin-Endolysin Lysis System of the OP2-Like Phage X2 Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Viruses*, 2021, 13(10), 1949.

Yang Q, Le S, Zhu T, Wu N., Regulations of phage therapy across the world, *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14.

8. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Antibiotska rezistencija predstavlja globalni problem koji sve više usmjerava znanstvenu zajednicu prema istraživanju alternativnih metoda za liječenje bakterijskih infekcija. Jedan od potencijalnih pristupa u rješavanju ovog problema jest razvoj i primjena terapijskih sustava baziranih na bakteriofagima.

S obzirom na to da je terapijski potencijal bakteriofaga prepoznat već gotovo stoljeće, te da postoje brojni izvještaji i studije koje potvrđuju njihovu učinkovitost u liječenju bakterijskih infekcija, cilj ovog preglednog diplomskog rada bio je istražiti razloge za ograničenu primjenu fagoterapije u kliničkoj praksi. Prema dostupnim podacima, trenutno je u tijeku ili u procesu uključivanja pacijenata ukupno 23 kliničke studije koje istražuju primjenu bakteriofaga. Ove studije provode se u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Francuskoj, Belgiji, Danskoj, Češkoj, Gruziji, Iranu, Uzbekistanu i Kini, a ciljne bakterije uključuju ESKAPE patogene: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i vrste *Enterobacter*.

Među glavnim izazovima u razvoju terapijskih sustava s bakteriofagima izdvajaju se: 1) farmakokinetička svojstva bakteriofaga, koji zbog svoje kompleksne strukture izazivaju imunološke reakcije i pokazuju varijabilnu stabilnost u različitim fiziološkim uvjetima; 2) ograničena učinkovitost oralne primjene uslijed kiselog pH u želucu, dok je parenteralna primjena, osobito intraperitonealna, učinkovitija jer omogućuje bržu apsorpciju i viši titar bakteriofaga u cirkulaciji; 3) rijetke, ali potencijalne nuspojave koje mogu nastati uslijed oslobađanja endotoksina tijekom bakterijske lize; 4) mogućnost razvoja rezistencije bakterija na bakteriofage kroz mehanizme poput stvaranja biofilma, modifikacije površinskih receptora, inhibicije superinfekcije, restriktijsko-modifikacijskih sustava, autodestrukcije stanica te CRISPR-Cas sustava adaptivne imunosti.

Dodatno, primjena bakteriofaga u terapijske svrhe ograničena je nedostatkom adekvatnih regulatornih okvira u mnogim zemljama, što komplicira međunarodnu suradnju i standardizaciju. Proizvodnja bakteriofaga u skladu sa standardima Dobre proizvođačke prakse (DPP) predstavlja značajan izazov zbog sklonosti ovih virusa evolucijskim promjenama i teškoća u reproducibilnosti proizvodnih procesa. Iako bakteriofagi imaju određena ograničenja, poput mogućnosti razvoja rezistencije i poteškoća s patentiranjem, genetski modificirani bakteriofagi pružaju mogućnosti za poboljšanje njihove učinkovitosti i

prevladavanje bakterijske rezistencije. Ipak, njihova primjena suočava se s dodatnim regulatornim izazovima zbog korištenja genetski modificiranih organizama, što dodatno otežava njihovu širu implementaciju u kliničku praksu.

SUMMARY

Antibiotic resistance represents a global challenge that increasingly directs the scientific community toward the exploration of alternative methods for treating bacterial infections. One potential approach to addressing this issue is the development and application of therapeutic systems based on bacteriophages.

Given that the therapeutic potential of bacteriophages has been recognized for nearly a century, and considering the numerous reports and studies confirming their effectiveness in treating bacterial infections, the aim of this review thesis is to investigate the reasons for the limited clinical implementation of phage therapy. According to available data, there are currently 23 clinical trials investigating the application of bacteriophages, either ongoing or in the process of patient recruitment. These studies are being conducted in the United States, Canada, France, Belgium, Denmark, the Czech Republic, Georgia, Iran, Uzbekistan, and China, targeting ESKAPE pathogens: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species.

The main challenges in the development of bacteriophage-based therapeutic systems include: 1) the pharmacokinetic properties of bacteriophages, which, due to their complex structure, provoke immune responses and exhibit variable stability under different physiological conditions; 2) the limited efficacy of oral administration due to the acidic pH of the stomach, whereas parenteral administration, particularly intraperitoneal, is more effective as it allows for faster absorption and higher bacteriophage titers in circulation; 3) rare but potential side effects that may result from endotoxin release during bacterial lysis; 4) the possibility of bacteria developing resistance to bacteriophages through mechanisms such as biofilm formation, surface receptor modification, superinfection inhibition, restriction-modification systems, cell autodestruction, and the CRISPR-Cas adaptive immunity system.

Additionally, the use of bacteriophages in therapeutic applications is constrained by the lack of adequate regulatory frameworks in many countries, complicating international collaboration and standardization. The production of bacteriophages according to Good Manufacturing Practice (GMP) standards presents a significant challenge due to their propensity for evolutionary changes and the difficulties in achieving reproducibility in manufacturing processes. Although bacteriophages have certain limitations, such as the potential for resistance development and patenting issues, genetically modified

bacteriophages offer opportunities to enhance their efficacy and overcome bacterial resistance. However, their application faces additional regulatory hurdles due to the use of genetically modified organisms, further complicating their broader implementation in clinical practice.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za mikrobiologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KLINIČKA ISPITIVANJA PRIPRAVAKA S BAKTERIOFAGIMA: PROBLEMI I RJEŠENJA

Marija Magdalena Lukač

SAŽETAK

Antibiotska rezistencija predstavlja globalni problem koji sve više usmjerava znanstvenu zajednicu prema istraživanju alternativnih metoda za liječenje bakterijskih infekcija. Jedan od potencijalnih pristupa u rješavanju ovog problema jest razvoj i primjena terapijskih sustava baziranih na bakteriofagima.

S obzirom na to da je terapijski potencijal bakteriofaga prepoznat već gotovo stoljeće, te da postoje brojni izvještaji i studije koje potvrđuju njihovu učinkovitost u liječenju bakterijskih infekcija, cilj ovog preglednog diplomskog rada bio je istražiti razloge za ograničenu primjenu fagoterapije u kliničkoj praksi. Prema dostupnim podacima, trenutno je u tijeku ili u procesu regrutacije pacijenata ukupno 23 kliničke studije koje istražuju primjenu bakteriofaga. Ove studije provode se u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Francuskoj, Belgiji, Danskoj, Češkoj, Gruziji, Iranu, Uzbekistanu i Kini, a ciljne bakterije uključuju ESKAPE patogene: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i vrste *Enterobacter*.

Među glavnim izazovima u razvoju terapijskih sustava s bakteriofagima izdvajaju se: 1) farmakokinetička svojstva bakteriofaga, koji zbog svoje kompleksne strukture izazivaju imunološke reakcije i pokazuju varijabilnu stabilnost u različitim fiziološkim uvjetima; 2) ograničena učinkovitost oralne primjene uslijed kiselog pH u želucu, dok je parenteralna primjena, osobito intraperitonealna, učinkovitija jer omogućuje bržu apsorpciju i viši titar bakteriofaga u cirkulaciji; 3) rijetke, ali potencijalne nuspojave koje mogu nastati uslijed oslobađanja endotoksina tijekom bakterijske lize; 4) mogućnost razvoja rezistencije bakterija na bakteriofage kroz mehanizme poput stvaranja biofilma, modifikacije površinskih receptora, inhibicije superinfekcije, restriktivno-modifikacijskih sustava, autodestrukcije stanica te CRISPR-Cas sustava adaptivne imunosti.

Dodatno, primjena bakteriofaga u terapijske svrhe ograničena je nedostatkom adekvatnih regulatornih okvira u mnogim zemljama, što komplicira međunarodnu suradnju i standardizaciju. Proizvodnja bakteriofaga u skladu sa standardima Dobre proizvođačke prakse (DPP) predstavlja značajan izazov zbog sklonosti ovih virusa evolucijskim promjenama i teškoća u reproducibilnosti proizvodnih procesa. Iako bakteriofagi imaju određena ograničenja, poput mogućnosti razvoja rezistencije i poteškoća s patentiranjem, genetski modificirani bakteriofagi pružaju mogućnosti za poboljšanje njihove učinkovitosti i prevladavanje bakterijske rezistencije. Ipak, njihova primjena suočava se s dodatnim regulatornim izazovima zbog korištenja genetski modificiranih organizama, što dodatno otežava njihovu širu implementaciju u kliničku praksu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranica, 4 grafička prikaza, 1 tablica i 79 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bakteriofag, bakterija, rezistencija, terapija, prepreke, antibiotici, alternativa

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić** redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner** redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Laura Nižić Nodilo viši asistent

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BACTERIOPHAGE THERAPY CLINICAL TRIALS: HURDLES AND SOLUTIONS

Marija Magdalena Lukač

SUMMARY

Antibiotic resistance represents a global challenge that increasingly directs the scientific community toward the exploration of alternative methods for treating bacterial infections. One potential approach to addressing this issue is the development and application of therapeutic systems based on bacteriophages. Given that the therapeutic potential of bacteriophages has been recognized for nearly a century, and considering the numerous reports and studies confirming their effectiveness in treating bacterial infections, the aim of this review thesis is to investigate the reasons for the limited clinical implementation of phage therapy. According to available data, there are currently 23 clinical trials investigating the application of bacteriophages, either ongoing or in the process of patient recruitment. These studies are being conducted in the United States, Canada, France, Belgium, Denmark, the Czech Republic, Georgia, Iran, Uzbekistan, and China, targeting ESKAPE pathogens: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species. The main challenges in the development of bacteriophage-based therapeutic systems include: 1) the pharmacokinetic properties of bacteriophages, which, due to their complex structure, provoke immune responses and exhibit variable stability under different physiological conditions; 2) the limited efficacy of oral administration due to the acidic pH of the stomach, whereas parenteral administration, particularly intraperitoneal, is more effective as it allows for faster absorption and higher bacteriophage titers in circulation; 3) rare but potential side effects that may result from endotoxin release during bacterial lysis; 4) the possibility of bacteria developing resistance to bacteriophages through mechanisms such as biofilm formation, surface receptor modification, superinfection inhibition, restriction-modification systems, cell autodestruction, and the CRISPR-Cas adaptive immunity system. Additionally, the use of bacteriophages in therapeutic applications is constrained by the lack of adequate regulatory frameworks in many countries, complicating international collaboration and standardization. The production of bacteriophages according to Good Manufacturing Practice (GMP) standards presents a significant challenge due to their propensity for evolutionary changes and the difficulties in achieving reproducibility in manufacturing processes. Although bacteriophages have certain limitations, such as the potential for resistance development and patenting issues, genetically modified bacteriophages offer opportunities to enhance their efficacy and overcome bacterial resistance. However, their application faces additional regulatory hurdles due to the use of genetically modified organisms, further complicating their broader implementation in clinical practice.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 4 figures, 1 tables and 79 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Bacteriophage, bacteria, resistance, therapy, obstacles, antibiotics, alternative

Mentor: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Laura Nižić Nodilo, Ph.D. Assistant Professor

The thesis was accepted: