

# Fágová terapie využití a budoucnost

Filip Růžička

Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity  
a  
Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno



M U N I

ČESKO-SLOVENSKÝ KONGRES

MEZIOBOROVÉ PŘÍSTUPY V HOJENÍ RAN

28. – 29. listopadu 2019, hotel Galant, Lednice

# Bakteriofág

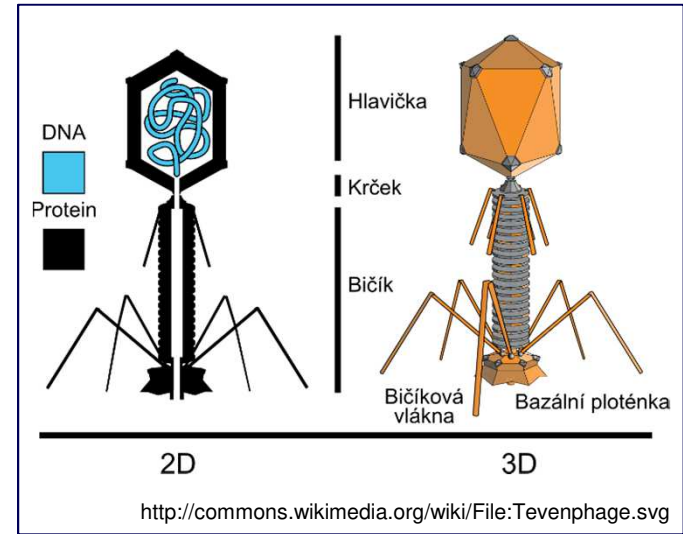
bakterie + fagein (φᾱγεῖν)

Viry infikující bakterie

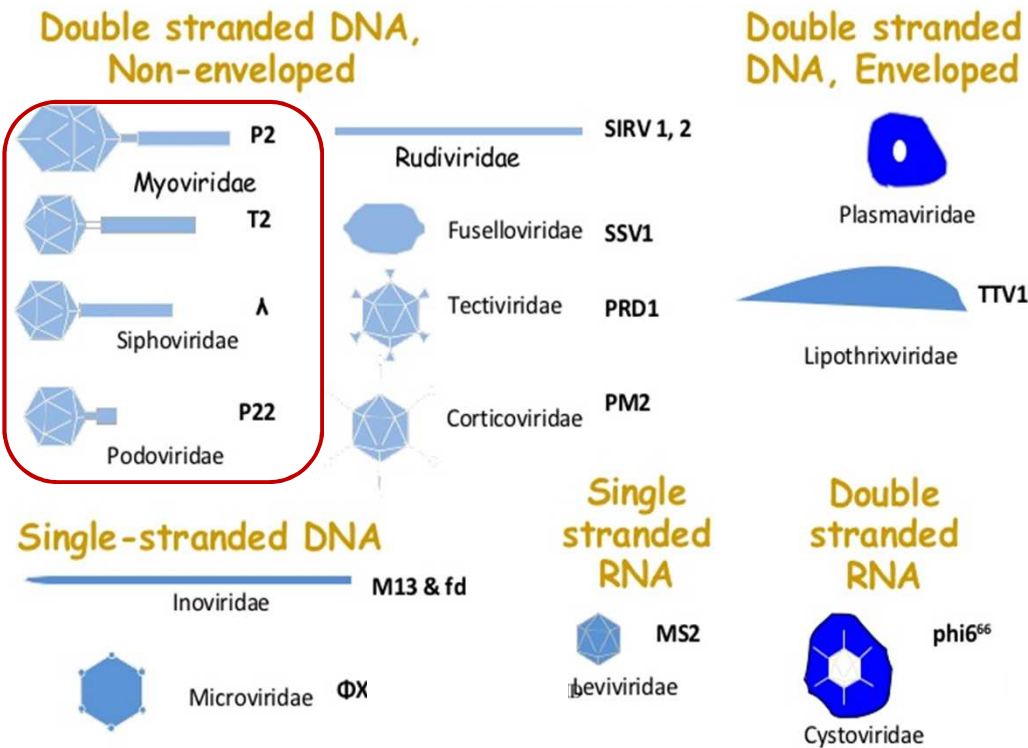
Široce rozšířené v biosféře -  $10^{31}$  částic  
(mořská voda - až  $9 \times 10^8$  virionů /ml)

Popsáno cca 6000 fágů, 40 rodů, 13 čeledí

Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV), <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>



**Rád Caudovirales**  
(96 % známých fágů)



## Využití bakteriofágů

- Modelový organismus
- Transfer genů (transdukce)
- Fagotypizace
- Fágová terapie

# Historie

1896 – Ernst Hankin – přítomnost agens s protibakterálním účinkem (proti epidemii *Vibrio cholerae*) ve vodě Gangy a Jamuny. (termolabilní agens procházející porcelánovým filtrem)



FR3  
Frederick W. Twort (1915)



FR2 FR1  
a Felix d'Herelle (1917)



- izolace fágů

1920 ... – *první klinické experimenty*

d'Herelle F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Acad. Sci. Ser. D 165:373

d'Herelle F. (1925) Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. La Presse Med. 33: 1393-94

1922 - "bacteriophages" - d'Herelle (Pasteur Institute, Paris)

1923 - George Eli UsW3 institut fágové terapie v Tbilisi

1936 - d'Hérelle pozván Stalinem do Eliavova Institutu



F. d'Hérelle

G. Eliava

### Snímek 3

---

**FR1** V roce 1925, d'Herelle obdržel čestný doktorát na univerzitě v Leidenu, stejně jako Leeuwenhoek medaile, který je poskytnut pouze jednou za deset let. Ten byl obzvláště důležité pro něj, jako jeho idol Louis Pasteur obdržela stejný medaili v roce 1895.

V příštích letech, byl nominován osmkrát za Nobelovou cenou, ačkoli on byl nikdy udělen jeden.

Filip Růžička; 10.08.2016

**FR2** Ve dvacátých letech minulého století vyléčil v Indii různými bakteriofágy tisíce lidí s cholerou nebo jinými zánětlivými a průjmovými onemocněními. Roku 1930 se začaly bakteriofágy pro léčbu připravovat i ve Spojených státech a zdálo se, že jim nestojí nic v cestě. Avšak postupně začaly přibývat práce se spornými výsledky a po objevu antibiotik se na fágy téměř zapomnělo. Nyní se ví, že tento počáteční neúspěch způsobila také nedostatečná znalost bakteriofágů.

Filip Růžička; 23.09.2016

**FR3** rojasněné oblasti na koloniích mikrokoka

Filip Růžička; 26.09.2016

**UsW1** román Arrowsmith z roku 1925 od Sinclaira Lewisa

Uživatel systému Windows; 09.11.2018

**UsW3** 1918 až 1921 uskutečnil výzkum v Institutu Pasteur v Paříži

Eliava v Paříži

1923 - Gruzie a založil v Tbilisi laboratoř (přejmenovaný na Institut Eliavy v roce 1988)

V roce 1934 Stalin (na doporučení Eliavy) pozval d'Herelle, do SSSR .- okouzlení komunismem

d'Herelle pracoval v Tbilisi ústavu a dokonce napsal a věnoval knihu "The Bacteriophage and the Phenomenon of Recovery," Stalinovi.

Eliava se zamiloval do gruzínské ženy s ímž hlava tajné policie (Beria!)

1937 Eliava byl popraven a odsouzen jako nepřítel lidu.

d'Herelle se ucházel o jeho život a nikdy se vrátil k Tbilisi

Uživatel systému Windows; 09.11.2018

**30 a 40 léta komerční využití fágů ve Francii a USA** (L'Oréal (Francie): Bacté-intesti-phage, Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-pyo-phage, Bacté-staphylo-phage; Eli Lilly (USA): Colo-lysate, Ento-lysate, Neiso-lysate, Staphylo-lysate)

1952 – Hirzfeldův institut imunologie a experimentální terapie , Wroclav (léčba infekcí vyvolaných rody *Staphylococcus, Klebsiella, Proteus, Escherichia, Shigella, Pseudomonas* nebo *Salmonela*)

Biofyzikální ústav AV ČR (dr. Pilich) → Stafal (Sevafarma – Imuna) – v ČR registrován SUKL v rámci specifického léčebného programu

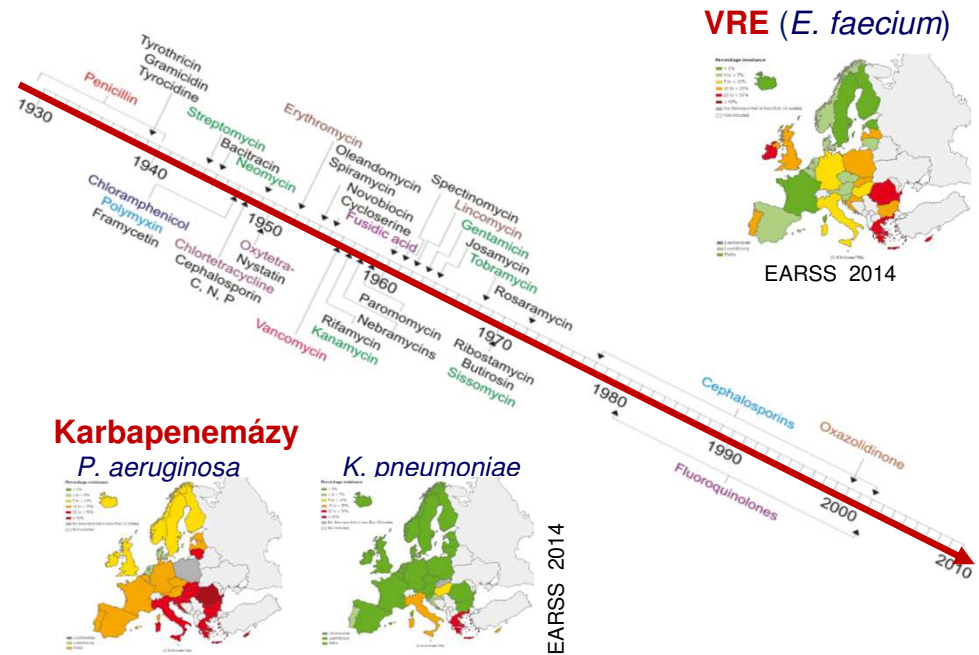
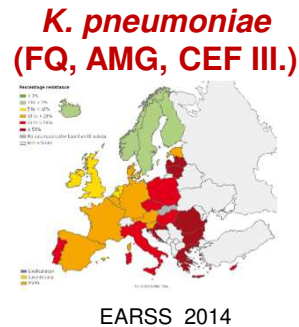
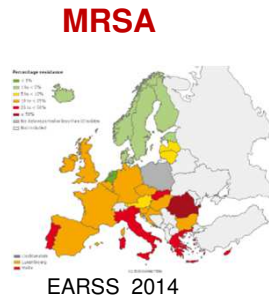
Státní zdravotní ústav (F. Vaníček, L. Mlčochová, K. Raška) - preparáty proti úplavici, pokusy o léčbu břišního tyfu



### **Postupný odklon od fágové terapie (Západ):**

- Nevysvětlený mechanismus působení fágů a jejich specifity, neznalost biologie fágů
- Chybně prováděné experimenty a přehnaná tvrzení o účinnosti (herpes, ekzém aj.)
- Nestandardní testovací protokoly
- Přehnané požadavky a zveličované spektrum léčitelných chorob (léčba viróz, exémů aj.)
- Nestabilita fágových preparátů (uchovávání za nevhodných podmínek)
- **Vzestup ATB**

# Fágy opět na scéně



- Rostoucí rezistence k ATB
- Omezený počet ATB, problémy s vývojem nových preparátů
- Nežádoucí účinky ATB (biologické účinky, toxicita)
- Chronické infekce nereagující na ATB terapii
- Intenzivní rozvoj nových metodických přístupů v oblasti molekulární biologie, strukturní biologie a biotechnologie
- Nové poznatky o interakci fágů s bakteriemi a makroorganismy – základ racionální fágové terapie

# Strategie terapeutického využití fágů

## Klasické využití: koktejl intaktních lytických virulentních fágů

- oplachy a krémy: kůže, oko, ucho, nos
- výplachy - močový měchýř
- rány, popáleniny
- orálně (tbl., roztoky)
- rektálně
- aerosoly, intrapleurální injekce
- intravenózně aplikace (v menší míře)

## Řešení problémů fágové terapie

**Vysoká specifita** → fágové koktejly, polyvalentní fágy

**Vychytávání fágů imunitním systémem** → dlouhodobě cirkulující fágy  
(mutantní formy)

### Bezpečnost

**Negativní interakce lyzátů s imunitním systémem** → lytický působící  
purifikované fágové částice

**Nebezpečí lysogenie** → sekvenování fágových genomů

**Pomnožovací bakteriální kmen** → sekvenování a výběr vhodných  
pomnožovacích kmenů



# Možnosti využití fágů v zemědělské výrobě a potravinářství

Možná aplikace přímo na potraviny

- Specificita - aplikace fága na konkrétního patogena
- Nižší riziko rezistence než je tomu u dezinfekčních prostředků
  - Ochrana ovoce a zeleniny před bakteriálními infekcemi (*Erwinia*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* aj)
  - Ochrana ryb v akvakulturách (*Lactococcus garviae*, *Pseudomonas putida*)
  - Drůbežářské farmy – ochrana kuřat (*E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* (injekčně, orálně nebo formou aerosolu)
  - Chovy telat – ochrana před enteropatogenními *E. coli* - desinfekce chlěvů

## Biokontrola potravin

*L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* (O 157), *Campylobacter*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *Shigella*, *B. cereus*, *Cronobacter*, aj.

- Aplikace fágů na kůži nebo maso poražených zvířat
- Redukce bakteriální kontaminace čerstvých potravin (listerie, salmonely)
- Přídavek fágů do krmiva před porážkou (ochrana před salmonelami a kampylobaktery)



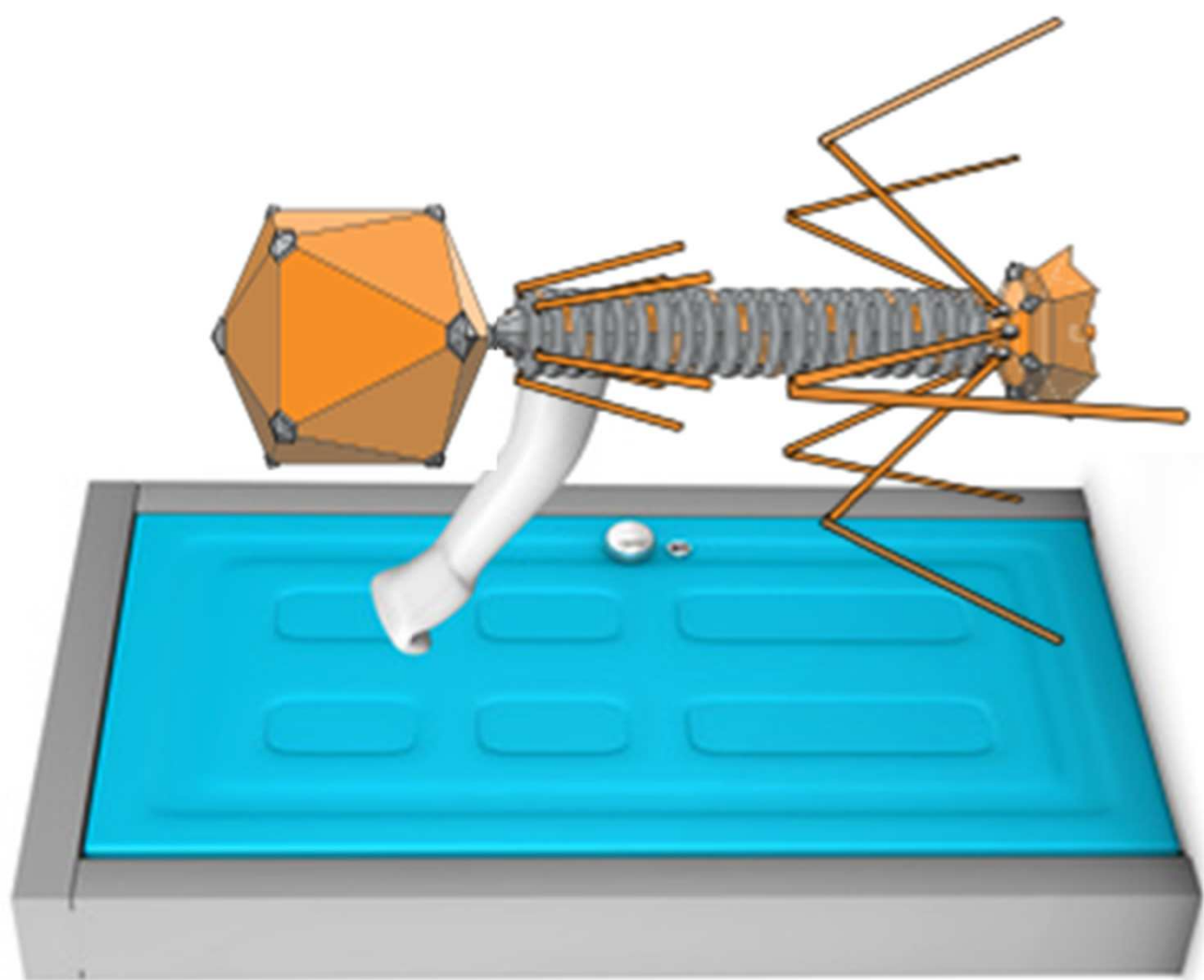
Intralytix, Inc. – výzkumné zařízení Baltimoru, Maryland, USA

LMP-102™- *L. monocytogenes*; ECP-100™-*E. coli* O157:H7; SPLX-1™ a PLSV-1™- proti salmonelám;  
INT-401™ proti *Clostridium perfringens* aj...



# Fágová terapie

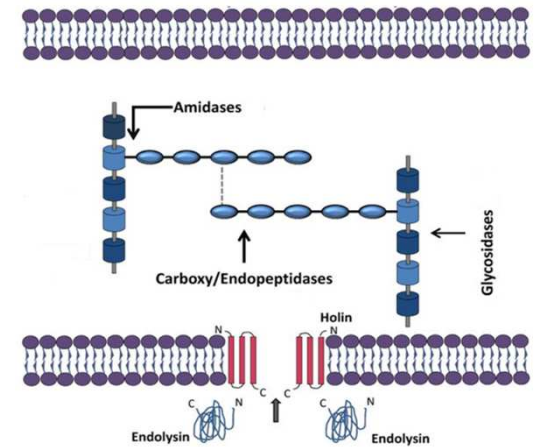
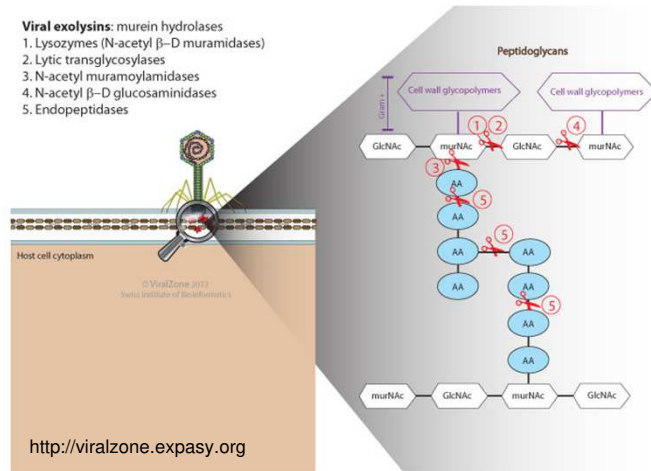
|                                  | Výhody  | Nevýhody  |
|----------------------------------|---|---|
| <b>Úzké spektrum</b>             | <ul style="list-style-type: none"><li>• Nemají vliv na mikroflóru</li><li>• Není zkřížená rezistence</li><li>• Možnost přípravy fágového koktejlu na míru – personalizovaná medicína</li><li>• Nedochází k selekci rezistentních bakterií jiných druhů</li><li>• Účinné i na ATB rezistentní bakterie</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Nutno znát agens a jeho citlivost</li><li>• Sledování vývoje rezistence</li><li>• Používání polyvalentních fágů nebo fágových koktejlů</li></ul>  |
| <b>Farmakologické vlastnosti</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Teoreticky stačí 1 dávka - množí se v místě infekce</li><li>• Fágy se šíří i do okolí – profylaxe</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Pomalý nástup účinku</li><li>• Problém u intracelulárních infekcí</li><li>• Vznik rezistence k fágům</li><li>• Indukce tvorby protilátek - ↓ účinku</li><li>• Nestabilita fágů (uchovávání)</li></ul> |
| <b>Toxicita</b>                  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Minimální toxicita</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Možnost přenosu genů (toxicita, rezistence) a lyzogenie</li></ul>   |
| <b>Biologický efekt</b>          | <ul style="list-style-type: none"><li>• Nemnoží se v eukaryotických buň.</li><li>• Imunomodulace</li><li>• Rezistence k fágu snižuje virulenci bakterie (změny receptorů)</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Alergie a problémy s parenterálním užitím</li></ul>   |
| <b>Cena</b>                      | <ul style="list-style-type: none"><li>• Poměrně levná a snadná výroba</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Nízká cena</li></ul>  |
| <b>Hodnocení účinku</b>          | <ul style="list-style-type: none"><li>• Dobré praktické zkušenosti</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Málo studií odpovídajících s vědeckým standardům</li><li>• Chybí řada znalostí o biologii fágů, např. mechanismus působení a vysoká specifita fágů</li></ul>  |



# Fágové lytické enzymy (enzybiotika)

Loeffler et al. 2001. (group of Fischetti) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294: 2170-2172.  
Fischetti VA, 2005: Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 13, 491

**Endolyziny** - narušují buněčnou stěnu zevnitř →  
→ uvolnění fágů při lytickém cyklu



Oliveira H et al., 2013, *J Virol.* 2013;87(8):4558-70

**Bičkové hydrolázy** – tvoří vstupní otvor v buněčné stěně při infekci bakt. buňky → injekce fágové DNA

## Výhody používání enzymů:

- působí i na kmeny rezistentní k fágům z důvodu restriční bariéry
- ani po podání opakovaných dávek se nevytváří imunita vůči enzymu

**Potravinářství:** (Callewaert et al., 2011; Oliveira et al., 2012)

**Experimentální klinické použití:** sepse (Schuch et al., 2002; Gilmer et al., 2013), pneumonie (Loeffler et al., 2001; Witzernath et al., 2009), endokarditis (Entenza et al., 2005), meningitis (Grandgirard et al., 2008), inf. nosohltanu (Kiser et al., 1999), pyodermie (Junjappa et al., 2013), endoftalmitis (Singh et al., 2014), dekolonizace kůže a vagíny (Cheng et al., 2005) aj.....

# Preparáty s kombinovaným působením fágů a antibiotik

Preparát „PhagoBioDerm“ (Gruzie): biologicky rozložitelná polymerová matrix (obvaz) obsahující: 1. Imobilizované fágy: směs 5 fágů proti *Pseudomonas aeruginosa*,

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp.

2. Antibiotikum: ciprofloxacin (ATB nesmí mít vliv na proteosyntézu a bránit množení fága)

3. Benzocain (anestetikum)

4. Proteolytický enzym (chymotrypsin nebo trypsin).

Léčba bércových vředů, hnisajících ran, proleženin (70% úspěšnost)

Markoishvili K. et al., 2002: A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 41(7):453-8.

## Fágy v „trojském koni“

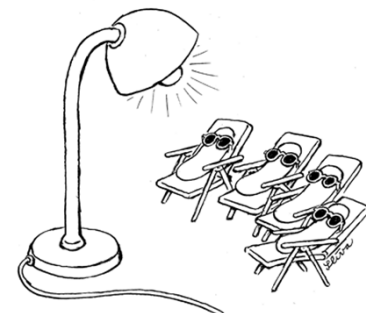
U některých infekcí nejsou fágy schopny následovat patogeny do tkání

Využito avirulentní *M. smegmatis* → doručení fága TM4 do makrofágů v tkáních s intracelulárními *M. avium* a *M. tuberculosis* → redukce počtu bakterií

Broxmeyer et al. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis.* 2002 Oct 15;186(8):1155-60

## Fágy doručující léčiva

Fágy specificky doručují účinné látky k cílovým bakteriálním buňkám → navázání a následné kontrolované uvolnění antibiotik (chloramfenikol, neomycin) či fotosenzitizerů.



# Fágové proteiny bránící bakteriální replikaci nebo transkripci

inhibice činnosti bakteriální DNA- nebo RNA-polymerázy



Inspirace pro vývoj nových organických sloučenin, jejichž struktura imituje funkční místa fágových proteinů - **antibiotika inspirovaná fágy**

## Geneticky upravené lysogenní fágy pro vnášení genů do bakterií

→ killing genes (*doc*) a geny blokující translaci

Westwater et al. 2003. Use of a genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1301-1307.

## Fágy s imunomodulačním efektem

Inhibice aktivace a proliferace T-lymfocytů → snížení buněčné infiltrace u alogenních kožních štěpů

Gorski et al. 2006. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant. Proc.* 38: 31-333.

Děkuji za pozornost

