

УДК 579.61

БАКТЕРИОФАГИ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ЧТО СДЕРЖИВАЕТ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Обзор

© 2020 В.В. Власов*, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: vvlassov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020

После доработки 18.08.2020

Принята к публикации 18.08.2020

Все более широкое распространение бактериальных патогенов, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам, требует разработки новых подходов для борьбы с инфекциями. Одним из подходов, на который возлагаются большие надежды, является фаготерапия. В последние годы научные организации и ряд фармацевтических компаний активизировали исследования, направленные на создание терапевтических препаратов на основе бактериофагов. В США и европейских странах созданы центры, в которых фаготерапия в экспериментальном режиме применяется для лечения пациентов, не поддающихся терапии антибиотиками. В настоящем обзоре описаны особенности бактериофагов как средств терапии, критически обсуждаются результаты клинических испытаний препаратов бактериофагов и оцениваются перспективы применения фаготерапии для лечения отдельных видов инфекционных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, фаготерапия, бактериальные инфекции, множественная лекарственная устойчивость, синтетические бактериофаги.

DOI: 10.31857/S0320972520110068

ВВЕДЕНИЕ

Множественная антибиотикоустойчивость патогенных бактерий в настоящее время рассматривается как глобальная проблема. Смертность от инфекций, вызываемых такими бактериями, с каждым годом растет, и, по оценкам специалистов Всемирной организации здравоохранения, к 2050 г. может достичь 10 млн смертей в год и превысить смертность от онкологических заболеваний (<https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report>). К наиболее опасным относят обладающие множественной лекарственной устойчивостью бактерии из группы ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter species*. В сложившейся ситуации ведется интенсивный поиск новых препаратов и подходов для борьбы с патогенными бактериями. В качестве одного из таких перспективных подходов в настоящее время рассматривается фаготерапия. Впервые терапия бактериофагами была применена столетие назад для лечения острых кишечных заболеваний и кожных инфекций [1, 2].

Наиболее активно и успешно использовали бактериофаги в СССР преимущественно для лечения раневых инфекций, включая послеоперационные осложнения [3–5], и кишечных заболеваний, в том числе и во время вспышек холеры [6–8].

После появления антибиотиков, с помощью которых в первые годы их применения удавалось успешно решить проблему бактериальных инфекций, интерес к фаготерапии угас, в том числе и в связи с недостаточной готовностью науки и технологий того времени для производства сложных биофармацевтических препаратов бактериофагов. В 1960–2000 гг. фаготерапия применялась лишь в нескольких центрах – в Польше и в Грузии, а единственной страной, где бактериофаги для медицинских целей производились промышленно, был СССР и впоследствии Российская Федерация. Терапевтические препараты бактериофагов применяли в виде монотерапии [9–11] или в комплексном лечении совместно с антибиотиками [10, 12, 13].

Все изменилось в последние годы. Современные методы позволяют детально характеризовать бактериофаги, вносить изменения в их геномы и даже конструировать синтетические бактериофаги, производить препараты индиви-

* Адресат для корреспонденции.

дуальных бактериофагов в условиях GMP. Интерес к фаготерапии в последние годы был подогрев рядом сообщений об успешном применении бактериофагов для лечения пациентов в критическом состоянии, зараженных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [14–17]. Второй год в США и в Европе проводятся крупные конгрессы по фаготерапии, тематика которых ориентирована на практическое применение бактериофагов (<https://www.kisacoresearch.com/events/phage-futures-europe>; <https://phage-futures.com/events/phage-futures-2019>). Появился ряд компаний, разрабатывающих препараты бактериофагов; во многих странах ведутся клинические испытания таких препаратов. Однако, по мнению авторов обзора, рассмотрение свойств бактериофагов, критический взгляд на результаты исследований бактериофагов в экспериментальных моделях инфекций и результаты клинических испытаний не дают поводов для эйфории и указывают на значительные трудности, которые исследователям предстоит преодолеть для создания действительно эффективных методов фаготерапии.

СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Вирусы бактерий – бактериофаги – являются одной из наиболее распространенных форм жизни на планете. Они присутствуют повсеместно, в воде и на суше, и, вероятно, для каждого бактериального штамма можно найти специфичный бактериофаг. Бактериофаги чрезвычайно эффективны как бактерицидные агенты и как потенциальные терапевтические препараты, они обладают рядом достоинств. Бактериофаги – это природные объекты, при их применении не возникает экологических проблем. Они не приносят вреда клеткам высших организмов, не токсичны, высокоспецифичны и, убивая целевые патогенные бактерии, не приносят вреда нормальной микрофлоре макроорганизма. Бактериофаги регулируют состав микробиоты, у здоровых людей в кишечнике насчитывают более 1000 разновидностей фагов. Наиболее распространенные фаги, обнаруживаемые в кишечнике, принадлежат к порядку Caudovirales (семейства Myoviridae, Siphoviridae и Podoviridae), к тому же порядку, представители которого используются в фаготерапии [18, 19].

Бактериофаги способны проникать через слои клеток эпителия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) по механизму трансцитоза – они

могут перемещаться через слизистые оболочки в кровь и далее в органы дыхания, в выделительные органы или к месту размножения бактерий в организме. В мочевой пузырь бактериофаги могут попадать напрямую из кишечника. Полагают, что ежедневно в организме человека из кишечника трансцитозом попадает в другие ткани и органы около 10^9 фаговых частиц, формируя фаговое сообщество, влияющее на здоровье и иммунитет [20, 21]. Бактериофаги способны проникать через некоторые физиологические барьеры, например гематоэнцефалический барьер, а также попадать в пораженные остеомиелитом кости [22]. В присутствии целевых бактерий фаги размножаются в пораженных участках организма, например в инфицированной ране, а после уничтожения патогена фаги разрушаются тканевыми макрофагами, в процесс выведения бактериофагов вовлечены печень и почки [23].

Высокая специфичность бактериофагов является не только их достоинством, но и недостатком. Для надежного подавления инфекционного агента требуется целый набор фагов, специфичных ко всем штаммам инфекционного агента, или для успешного лечения пациента необходимо подбирать препарат фага, специфичный именно к тому штамму, который вызвал инфекцию. Более того, существует возможность возникновения устойчивости целевой бактерии к применяемому бактериофагу в процессе терапии, и в этом случае необходимо искать новый бактериофаг [13, 14]. В этом заключается одна из проблем фаготерапии, приводящая к тому, что бактериофаги не могут рассматриваться как препараты первой линии терапии. Лечение бактериальной инфекции в большинстве случаев может быть успешно проведено применением одного-двух антибиотиков, которые дешевы в производстве, хорошо хранятся и обладают широкой специфичностью. Бактериофаги становятся необходимыми лишь в случае неудачи антибиотикотерапии, и рынок для них меньше. Важно, что бактериофаги можно применять совместно с антибиотиками [24, 25].

У бактерий существует множество механизмов защиты от бактериофагов, блокирующих каждый из этапов инфицирования клеток. К наиболее известным механизмам защиты относятся: изменение рецептора – поверхностного белка бактерии, узнаваемого фаговой частицей, что препятствует адсорбции фага на бактерии; изменение белков, функции которых необходимы для проникновения нуклеиновой кислоты бактериофага в клетку; системы рестрикции-модификации, защищающие от ферментов рестрикции бактериальную ДНК и позволяющие этим

ферментам избирательно расщеплять фаговую ДНК; а также системы типа CRISPR-Cas, обеспечивающие распознавание и избирательное разрушение ранее встречавшихся бактериям фаговых нуклеиновых кислот [26]. Бактерии могут защищаться от бактериофагов также, как и от антибиотиков и от клеток иммунной системы — формируя физический барьер, биопленки. Некоторые бактериофаги обладают способностью разрушать биопленки с помощью специальных ферментов и лизировать содержащиеся в них бактерии [27, 28]. Одним из способов борьбы с устойчивостью бактерий является использование коктейлей бактериофагов [29–31]. Если фаги убивают бактерии быстрее, чем они реплицируются, риск возникновения устойчивости снижается.

Введение бактериофагов в организм вызывает иммунный ответ, сила которого определяется природой фага, методом его введения и особенностями организма [32, 33]. Показано, что дендритные клетки реагируют на бактериофаги как на инфекционные агенты, и при контакте с ними происходит стимуляция врожденного и адаптивного иммунного ответа [34–36]. Высказывались предположения, что иммунный ответ организма может снижать эффективность повторного применения одного и того же препарата бактериофага у пациента. Бактериофаги являются частью микробиоты здоровых людей, присутствуют в организме в больших количествах, и их взаимодействие с иммунной системой оказывается весьма сложным и на данный момент недостаточно исследованным [37, 38]. Эксперименты показали, что для достижения клинически значимого иммунного ответа необходимо введение значительного количества бактериофагов, гораздо большего, чем количество необходимое для фаготерапии. В ряде исследований не было найдено связи между продукцией нейтрализующих антител против бактериофагов и клиническим результатом терапии [32, 39–41]. Однако в других исследованиях такая зависимость была обнаружена [39, 42]. Вероятно, лизис бактерий фагами происходит до того, как иммунная система начинает продуцировать антитела против бактериофагов. Сообщалось, что введение фагов может благотворно влиять на функции иммунной системы: введение бактериофагов снижает уровень провоспалительных цитокинов и инфильтрацию лейкоцитов в ткани [36, 38, 43]. Вместе с тем имеются и противоположные наблюдения [44, 45].

Исследования показали, что в ряде случаев при совместном использовании антибиотиков и бактериофагов наблюдался синергический эффект [46]. Возникающая устойчивость к бакте-

риофагу, обусловленная изменениями структуры бактериального рецептора или других белков, может негативно сказаться на жизнеспособности бактерии, так как приводит к повышению ее чувствительности к антибиотикам [47].

ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактериофаги выделяют из самых различных источников окружающей среды. В настоящее время в исследовательских организациях разных стран имеется большое количество бактериофагов, многие из которых исследованы с помощью современных молекулярно-биологических методов: расшифрованы их геномы, исследованы их специфичность и противобактериальные свойства. В ряде стран имеются банки бактериофагов, например Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses at the University of Laval, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures и Bacteriophage Bank of Korea, которые распространяют бактериофаги на коммерческой основе. Компании, разрабатывающие продукты для фаготерапии, имеют собственные коллекции, доступ к которым ограничен.

Практика показала, что для выбора бактериофага, требующегося для лечения конкретного больного, может быть необходим широкий поиск в разных коллекциях. Например, в известном случае успешного излечения пациента, зараженного *A. baumannii* с множественной устойчивостью к антибиотикам, потребовалось девять различных бактериофагов, которые нашли в трех разных коллекциях [14].

Для экстренного поиска нужного бактериофага при лечении конкретного пациента создан координирующий орган — «Каталог» организаций более чем из 20 стран, занимающихся фаготерапией (<https://phage.directory>), позволяющий быстро находить контакты для обмена фагами, требующимися для лечения больных.

При создании препаратов бактериофагов для терапии используется два подхода. Первый из них предусматривает формирование коктейля бактериофагов, действующих на разные штаммы определенного патогена или даже на несколько патогенов, которые участвуют в развитии инфекции определенного типа. В Грузии компанией «Biochimfarm Georgi» (Биохимфарм АО) производятся и обновляются дважды в год препараты «Пиофаг», содержащий бактериофаги против *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* и *Proteus*, а также «Интестифаг», включающий бактериофаги против бактерий, наиболее значимых в этиологии кишеч-

ных заболеваний. Эти коктейли используют для лечения инфекционных и кишечных заболеваний. В Российской Федерации НПО «Микроген» (<http://www.bacteriophage.ru>) производит более десяти различных комплексных препаратов бактериофагов для лечения бактериальных инфекций у людей. Компания НПЦ «Микромир» производит несколько ветеринарных препаратов бактериофагов, а также бактериофаг-содержащие гели, предназначенные для нормализации микробного состава кожи и полости рта (на данный момент гели производства НПЦ «Микромир» не являются лекарственными средствами).

Второй вариант фаготерапии предусматривает персонализированный подход, то есть подбор бактериофага или формирование фагового коктейля против конкретного патогена/патогенов, обнаруженных у пациента. Такой подход давно используется в Польше, «Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy», и в Грузии, «Центре фаготерапии» (<http://medigroup.ge>), где для пациентов подбирают бактериофаги в имеющейся коллекции и даже проводят поиск новых фагов, если в коллекции нужного фага не обнаруживается.

В настоящее время для фаготерапии используют только литические фаги [48, 49], не способные встраивать свой геном в геном бактерий, для того чтобы избежать возможность горизонтального переноса нежелательных генов. Бактериофаг должен быть проверен на отсутствие нежелательных генов, определяющих токсичность и антибиотикоустойчивость, а также генетических элементов, отвечающих за перенос фаговых генов в бактериальный геном, что возможно сделать методами пиросеквенирования [50, 51].

Существуют очевидные современные требования к препаратам бактериофагов для применения в медицине: производство должно осуществляться в условиях GMP; сам препарат должен быть стерильным и не содержать компоненты бактериальных клеток, например пирогенные субстанции, способные вызвать нежелательные эффекты.

В настоящее время не вполне решен вопрос создания лекарственных форм бактериофагов, обеспечивающих их стабильность при хранении и при разных способах введения в организм. Некоторые фаги хорошо хранятся в растворе, другие — в сухих препаратах, получаемых лиофилизацией в присутствии стабилизирующих агентов, таких как сахара (трегалоза, сорбитол) или молочный белок [52, 53]. Для стабилизации фаговые частицы можно заключать в липосомы [54–57], для защиты фагов от действия иммунной системы предлагалось модифицировать их поверхность полиэтиленгликолем [58].

Современные методы синтетической биологии позволяют комбинировать геномы бактериофагов и даже синтезировать полные искусственные геномы [59–61]. Это открывает принципиальную возможность получать бактериофаги с модифицированной специфичностью, а также бактериофаги, несущие гены, кодирующие продукты, токсичные для бактериальной клетки и воздействующие на определенные бактериальные гены [60]. Описано получение химерных бактериофагов, обладающих повышенной литической активностью и поражающих расширенный спектр бактерий-хозяев [62, 63]. Получены бактериофаги, содержащие гены, кодирующие ферменты, разрушающие бактериальные биопленки [64]. В геном фага вводили элементы, обеспечивающие продукцию в бактериальной клетке системы геномного редактирования CRISPR-Cas, что позволяло избирательно повредить бактериальные гены, ответственные за лекарственную устойчивость. С помощью такого фага удалось вызвать гибель бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью, но не оказать повреждающего действия на клетки того же микроорганизма, не содержащего целевые генетические элементы [65, 66].

СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ В ОРГАНИЗМ

Бактериофаги могут быть введены в организм различными методами — пероральным, ингаляционным, местным и инъекционным (внутривенно, внутримышечно и подкожно в место поражения). При пероральном применении фаги подвергаются воздействию кислой среды в желудке, и для снижения повреждающего действия этого фактора необходимо предварительно нейтрализовать кислую среду или поместить препарат бактериофага в соответствующие капсулы. При пероральном введении бактериофаги, хотя и не всегда, могут обнаруживаться в кровотоке [23, 41, 67]. Для ингаляционной доставки фагов обычно используют небулайзеры [25, 68–70]. Местное применение фагов, входящих в состав кремов, мазей, эмульсий и гидрогелей, используют для лечения ожогов, гнойных ран при диабетической стопе, акне и других бактериальных поражениях кожи. Самый простой способ — орошение раны и/или прикладываемой салфетки раствором препарата бактериофага. При внутривенном введении фаги попадают практически во все органы и ткани. В этом случае выведение фагов из кровотока происходит в течение 60 минут.

Возможно также использование бактериофагов в качестве антибактериального покрытия имплантов для предотвращения инфекций, возникающих при имплантировании протезов в ортопедии [71–73].

ИСПЫТАНИЯ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В ОПЫТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Возможности фаготерапии широкого спектра инфекционных заболеваний изучали на различных животных моделях [55, 74–77]. К сожалению, почти все эти модели не соответствовали реальным моделям заболеваний человека. Бактериemia у человека зачастую развивается как вторичное поражение, возникающее на фоне ранений, вирусных поражений или ослабления иммунной системы. При развитии инфекции бактерии выходят из начального очага поражения и образуют метастатические поражения в различных местах организма. Терапия начинается, как правило, при уже развившемся инфекционном процессе. Почти во всех описанных экспериментах здоровых животных заражали большими дозировками бактерий и одновременно или спустя недолгое время вводили препараты бактериофагов. В такой схеме эксперимента, когда инфекция не успевала распространиться за пределы места инъекции, животные, по сути, играли роль пробирки. Результаты экспериментов показали, что введение бактериофагов оказывало терапевтический эффект в том случае, если фаги вводили сразу или вскоре после заражения животного. При введении бактериофагов через несколько часов после заражения наблюдаемый эффект был в ряде случаев значительно слабее. Важным неожиданным результатом исследований оказалась сильная дозозависимость действия препаратов бактериофагов. Можно было ожидать, что в организме инфицированных животных фаги будут быстро размножаться в бактериях-хозяевах, и для достижения терапевтического эффекта должны требоваться минимальные дозы фагов. Именно такую возможность упоминают всегда, описывая теоретические преимущества фагов как средств терапии. Однако в экспериментах на животных хороший терапевтический результат наблюдали лишь при введении высоких доз бактериофагов, которые не применяли в известных клинических исследованиях [55, 74, 78–89].

Основные результаты экспериментов на животных – бактериофаги безвредны для организма млекопитающих; бактериофаги эффективно

уничтожают бактерии в условиях, когда бактерии им легко доступны (таблица).

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Эффективность лечения бактериофагами обосновывается упоминаниями положительных результатов, описанных в литературе в середине прошлого века, когда не было практики проведения экспериментов с использованием плацебо и контрольных групп, а отрицательные результаты обычно не публиковались [74, 90–93]. Между тем в случае лечения инфекций эффект плацебо может быть велик.

В последние годы интерес к фаготерапии возрос, в том числе и благодаря нескольким широко обсуждавшимся случаям излечения препаратами бактериофагов больных, находившихся в критическом состоянии. Однако значимость этих событий преувеличена прессой; о каждом спасенном бактериофагами пациенте были написаны десятки сообщений, а о неудачных случаях публикаций не было, поскольку для журналистов такие случаи не представляли интереса. Анализ случаев излечения тяжелых больных препаратами бактериофагов показал сложности такого лечения и возникающие проблемы.

Так, описан случай успешного применения фаготерапии для лечения 68-летнего пациента, страдающего диабетом и некротизирующим панкреатитом, осложненным лекарственно-устойчивым штаммом *A. baumannii*. Антибиотикотерапия не помогала, и пациенту провели лечение бактериофагами, подобранными на основе тестирования бактерий, выделенных у самого пациента. Бактериофаги вводили внутривенно и трансдермально в абсцесс. В результате лечения удалось подавить инфекцию *A. baumannii* и добиться выздоровления пациента [14].

Известен еще один случай излечения больного, находившегося в критическом состоянии. Пятнадцатилетнему пациенту с муковисцидозом и диссеминированными микобактериальными абсцессами после трансплантации легких был проведен курс лечения трехкомпонентным фаговым коктейлем. Литические фаги, эффективно убивающие инфекционный штамм *Micobacterium abscessus*, были разработаны методами синтетической биологии. Исследователи отмечали, что внутривенное лечение фагами переносилось хорошо и сопровождалось объективным клиническим улучшением, включая закрытие раны на груди, улучшение функции

Эксперименты по применению бактериофагов в животных моделях

Модель заболевания	Инфекционный агент	Модельное животное	Способ введения бактериофага	Результат введения бактериофагов	Ссылка
Острый и хронический остеомиелит	<i>S. aureus</i>	кролик	инъекция в область поражения	острый остеомиелит – полное излечение; хронический остеомиелит – клиническое улучшение, подтвержденное гистологически	[80]
Раневая инфекция	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	свинья, крыса	местное применение коктейля через 4 дня, 10^8 – 10^9 БОЕ	уменьшение бактериальной нагрузки, значительное улучшение	[83]
Раневая инфекция	MDR <i>A. baumannii</i>	крыса	спрей, 3×10^9 БОЕ	уменьшение бактериальной нагрузки и периода эпителизации, сокращение раневой поверхности по сравнению с контрольными животными, получавшими антибиотикотерапию	[84]
Диабетическая стопа	<i>S. aureus</i>	мышь	инъекция коктейля из 3-х фагов, 10^8 – 10^9 БОЕ каждого фага совместно или без антибиотика через 30 мин после заражения	препарат бактериофагов был эффективен в модели диабетической раны и недиабетической раны; антибиотик был неэффективен в модели диабетической стопы	[89]
Ожог	<i>K. pneumoniae</i>	мышь	местное применение	результаты фаготерапии были лучше, чем при применении антибиотиков и нитрата серебра	[81]
Абсцесс	<i>S. aureus</i>	мышь	подкожное введение однократное или 4 инъекции в день, 10^9 БОЕ	уменьшение размера абсцесса, уменьшение бактериальной нагрузки на 2 порядка (однократное введение) или 4 порядка (4-х кратное введение)	[78]
Абсцесс	<i>S. aureus</i>	кролик	подкожное введение через 0, 5, 12 или 24 ч, 5×10^7 БОЕ	отсутствие результата при введении 5×10^7 БОЕ через 5, 12 или 24 ч; уменьшение размера абсцесса, уменьшение бактериальной нагрузки при введении 5×10^9 БОЕ одновременно с заражением	[88]
Кишечная инфекция	<i>Shigella sonnei</i>	мышь	пероральное введение коктейля фагов	уменьшение бактериальной нагрузки было эффективнее по сравнению с введением ампициллина	[82]
Инфекция легких	<i>Burkholderia cepacia</i>	мышь	ингаляция через нос	уменьшение бактериальной нагрузки	[85]
Инфекция легких	<i>P. aeruginosa</i>	мышь	интраназальное введение, $2,5 \times 10^7$ БОЕ	при одновременном введении бактерии и фага – отсутствие патогена у 100% мышей; при введении фага через 24 ч после заражения – отсутствие патогена у 86% мышей	[84]
Хроническая инфекция легких	<i>P. aeruginosa</i>	мышь	интраназальное введение в различные сроки после заражения	отсутствие патогена у 70% мышей; уменьшение бактериальной нагрузки у 30% мышей	[87]
Хронический отит	<i>P. aeruginosa</i>	собака	введение в ухо фагового коктейля (6 фагов, 10^5 БОЕ каждого)	уменьшение бактериальной нагрузки на 30–97% у разных животных	[79]

БОЕ – бляшкообразующие единицы.

печени и заживление воспаленных лимфоузлов кожи [17].

В описанных случаях больные параллельно с бактериофагами по этическим соображениям продолжали получать антибиотики. Потребовалось длительное лечение высокими дозами фагов. Препараты пришлось подбирать, подключая множество организаций, и даже конструировать фаги, используя методы синтетической биологии.

В последние годы был проведен ряд клинических испытаний препаратов бактериофагов, однако не все исследования проводились в соответствии с современными стандартами [94–103]. Только часть этих исследований показала клиническую эффективность фаготерапии [96–98, 103]. К сожалению, результаты большинства других экспериментов нельзя назвать выдающимися. На сегодня основным результатом проведенных клинических испытаний является только то, что бактериофаги действительно безопасны при различных способах введения, в том числе и при внутривенном введении. Новостью это назвать трудно, так как фаги доказали свою безопасность в течение многих десятилетий применения в медицине.

Институт иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук (Вроцлав, Польша) в 2005 г. начал клинические исследования терапии бактериальных инфекций фагами (клиническое исследование № NCT00945087). Результаты данного исследования к настоящему времени не опубликованы.

В 2009 г. компания «BioContol Ltd.» сообщила о положительных результатах лечения фагами инфекции ушей, вызванной *P. aeruginosa* [98]. Позднее эти результаты нигде не упоминались.

Компания «Nestlé» спонсировала испытания в Бангладеш фагового препарата против *E. coli* для лечения диареи у детей [100–102]. Доказательств эффективности фаготерапии получено не было. Неудачу объяснили тем, что только 60% пациентов имели *E. coli* в фекалиях, для остальных пациентов препарат был бесполезен.

Широко обсуждались клинические испытания фагового коктейля, содержащего 12 бактериофагов, для лечения ожоговых ран, инфицированных *P. aeruginosa* и *E. coli*, – «Phagoburn trial» (<http://www.phagoburn.eu>, European Clinical Trials database, № 2014-000714-65 и Clinical Trials gov, № NCT02116010). Обработка препаратами проводилась местно, ежедневно в течение семи дней. Результаты испытаний не показали эффективного терапевтического действия бактериофагов. Стандартное лечение больных сульфадиазином серебра оказалось эффективнее, чем фаготерапия. Неудачу этих испытаний объ-

яснили нестабильностью фагового препарата и недостаточной концентрацией фагов в препаратах [99].

В 2016–2017 гг. было проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование безопасности и влияния на микробиоту ЖКТ пребиотической добавки «PreforPro», состоящей из четырех бактериофагов (клиническое исследование № NCT03269617, финансируемое Университетом Колорадо, США). В ходе исследования были получены данные о безопасности применения бактериофагов и о некоторых статистически достоверных изменениях в микробиоме ЖКТ после приема препарата [104, 105].

В 2017–2018 гг. было проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование безопасности и эффективности лечения адаптированным препаратом «Пиофаг» инфекций мочевыводящих путей у пациентов, перенесших трансуретральную резекцию предстательной железы. Исследование проводилось на базе Национального центра урологии в Тбилиси, Грузия и финансировалось «Balgrist University Hospital», Швейцария (клиническое исследование № NCT03140085) [106]. В результате была показана безопасность применения препарата и выявлено снижение титров инфекционных бактерий (от 1 до 5 log) у шести из девяти пациентов [107].

Недавно было проведено исследование в «Westmead Hospital», Австралия. Четырнадцать пациентам с инфекционным эндокардитом и сепсисом, вызванным *Staphylococcus*, внутривенно вводили фаговый коктейль AB-SA01, включающий три разных бактериофага производства «AmpliPhi Biosciences», США. Коктейль вводили два раза в день на протяжении двух недель. В результате исследователи наблюдали снижение воспалительных реакций и уменьшение бактериальной нагрузки [103]. Однако контрольной группы в исследовании не было. Компания «AmpliPhi Biosciences» получила разрешение FDA на проведение испытаний внутривенного фагового препарата для лечения гнойных ран и кожных инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA).

На сегодня фаготерапия не является разрешенным для широкого применения методом терапии в США и европейских странах. Вместе с тем в 2018 г. в США был открыт центр IPATH (The Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics), в котором фаготерапия исследуется и применяется как экспериментальный метод лечения (eIND, experimental investigational new drug) в «University of California San Diego

School of Medicine». В Польше в «Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy» применяют фаготерапию в рамках экспериментального лечения в соответствии с Хельсинкской декларацией (Article 37, Unproven Interventions in Clinical Practice of the Declaration of Helsinki, www.wma.net), допускающей применение недоказанных методов терапии для пациентов, которым не помогают официально одобренные препараты и методы лечения [108]. В соответствии с Хельсинкской декларацией возможно проведение терапии бактериофагами и в других европейских странах, однако бюрократический процесс для получения разрешения на экспериментальное лечение не прост. Поэтому в настоящее время пациенты пользуются возможностью получить лечение бактериофагами в Грузии, в Польше, а в последнее время и в США.

ПРОБЛЕМЫ ФАГОТЕРАПИИ

Фаготерапия выглядит как идеальный персонализированный подход к лечению инфекционных заболеваний: принцип действия бактериофагов доказан; в модельных системах показана их эффективность; описаны достоверные случаи, когда терапия бактериофагами была успешной и позволила спасти жизни людей или существенно улучшить их состояние. Бактериофаги безопасны; они классифицированы FDA как «Generally Recognized As Safe» и, следовательно, могут проходить клинические испытания в ряде стран. Однако внедрение фагов в медицинскую практику происходит крайне медленно.

Одна из причин заключается в том, что молекулярные механизмы взаимоотношения бактериофагов с бактериями и их поведение в организме остаются недостаточно изученными. Фаги принципиально отличаются от обычных химиотерапевтических препаратов; они могут размножаться в организме пациента в зависимости от концентрации бактерий-хозяев и изменяться (мутировать), чего не бывает с обычными лекарствами. В связи с этим не ясна ситуация с необходимой дозировкой фаговых препаратов, поскольку если бактериофаг не попадет в соответствующую патогенную бактерию, то его терапевтический эффект будет сведен к нулю. Не вполне изучена фармакокинетика и фармакодинамика бактериофагов. Еще предстоит разработать оптимальные лекарственные формы препаратов на основе бактериофагов для применения при различных типах инфекций.

Не решен практический вопрос о том, каким должен быть одобренный препарат. Дол-

жен ли он содержать только конкретные бактериофаги с точно установленной структурой, прошедшие весь комплекс испытаний, как и химические препараты. Или препарат может включать бактериофаги/коктейли бактериофагов, выделенные специально для конкретного пациента. Какова должна быть стандартная процедура подбора препарата бактериофагов для лечения конкретных пациентов, пораженных определенными бактериальными штаммами? Какими должны быть стандартизованные методы очистки бактериофага, гарантированно обеспечивающие его стерильность и безопасность?

Одной из важнейших задач является создание платформ, позволяющих быстро идентифицировать патогенные бактерии и определять их чувствительность к препарату бактериофага. Пока этот процесс занимает не менее 3–5 дней, что во многих случаях недопустимо долго, и лечащему врачу легче немедленно применить антибиотик широкого спектра действия, который с вероятностью 50% подействует на инфекционный агент.

Именно поэтому большие надежды возлагают на применение методов синтетической биологии для получения бактериофагов с заданными свойствами – расширенной специфичностью, повышенной литической активностью, способностью поражать только бактерии, содержащие целевые генетические элементы, например гены, определяющие лекарственную устойчивость. Опубликован ряд работ, демонстрирующих возможности синтетической биологии для получения фагов с измененными отдельными функциями и характеристиками. Однако проблемы, стоящие на пути создания терапевтических бактериофагов, глубоки и многочисленны. Так, в качестве выдающегося примера дизайна высокоспецифичных бактериофагов приводятся работы, в которых фаги были снабжены генами, кодирующими системы геномного редактирования, которые нарушают лишь заданные гены бактерий [109–111]. Однако снабжение фагов этим высокоточным оружием не решает проблемы создания терапевтического препарата. Со специфичностью поражения бактериальных штаммов бактериофагами проблем не было никогда. Наоборот, проблемой является узкая специфичность бактериофагов.

Помимо проблем, связанных с необходимостью глубоких исследований бактериофагов, на пути широкого внедрения фаготерапии существует ряд экономических и бюрократических барьеров.

Интерес фарминдустрии к бактериофагам ограничен в связи с проблемами защиты интел-

лектуальной собственности. Кроме того, из-за узкой специфичности фаговых препаратов и возникновения к ним устойчивости у бактерий зачастую невозможно долгое время применять неизменный стандартный препарат фага. Чаще всего бактериофаги требуются для применения в критических случаях для относительно узкого круга больных там, где бессильными оказались все виды антибиотиков. По оценкам специалистов, таких случаев в США лишь несколько тысяч в год. Поэтому производство фаговых препаратов для фармацевтических компаний экономически не выгодно.

Принципиальная проблема на пути развития фаготерапии состоит в том, что в большинстве стран разрешительные органы предъявляют к бактериофагам те же требования, что применяются к препаратам на основе химических соединений. Бактериофаги, не являющиеся веществами со строго фиксированной неизменной структурой, в принципе не могут соответствовать этим требованиям. Кроме того, бактериофаги, хотя и не заражают клетки человека, являются вирусами. Само это слово зачастую напрягает медицинских и не медицинских чиновников. При обсуждении возможности использования бактериофагов как терапевтических препаратов выдвигаются надуманные проблемы, опровергнутые многолетним применением бактериофагов в клинике. Повторяются опасения о возможности переноса бактериофагами фрагментов генетического материала между бактериями, хотя организм человека содержит огромное множество разных бактериофагов, и добавление еще одного родственного бактериофага не может создать никаких дополнительных проблем. Тем более что для лечения пациентов не используют бактериофаги, имеющие системы переноса генетических элементов.

В какой-то степени соответствовать стандартным подходам регуляторов могут препараты фиксированного состава – коктейли из определенных детально изученных бактериофагов. Однако такие препараты недостаточно гибки для того, чтобы обеспечивать воздействие на постоянно мутирующие штаммы бактерий. В действительности, в процессе производства препаратов композиция входящих в их состав бактериофагов может изменяться, обеспечивая «адаптацию» препарата к вновь появившимся штаммам инфекционных агентов. Недавние успехи в лечении терминальных пациентов фаговыми препаратами показали, что успешная терапия была достигнута лишь при использовании персонализированных коктейлей фагов и даже подбора или конструирования специальных фагов [14, 17]. Такой вариант фаготерапии

также не может пройти сквозь существующие регулирующие барьеры.

Можно отметить, что имеется пример успешного применения упрощенных правил одобрения препаратов. Речь идет о производстве противогриппозных вакцин, которые требуют регулярной модификации.

В сложившейся ситуации в ряде стран предпринимаются попытки разработать специальные правила для препаратов на основе бактериофагов. В Бельгии внедряется подход, основанный на применении бактериофагов как магистральных препаратов [112], которые фармацевты могут составлять по рецепту лечащих врачей для конкретных пациентов из стандартных бактериофагов. В таких препаратах бактериофаги должны соответствовать требованиям фармакопеи. Однако, кроме стандартных бактериофагов, в составе магистральных препаратов могут применяться не авторизованные бактериофаги, получившие сертификат анализа в лабораториях, аккредитованных в Бельгийских регулирующих органах. Магистральные препараты бактериофагов могут использоваться для лечения конкретных пациентов, и ответственность за их применение лежит на лечащем враче и/или фармацевте. В Грузии персонализированные фаговые препараты также могут изготавливаться как магистральные в аккредитованных аптеках, получивших лицензии от Министерства здравоохранения Грузии.

В Российской Федерации, лидировавшей в производстве и применении бактериофагов, в настоящее время только препараты бактериофагов, производимые ФГУП НПО «Микроген», распространяются через аптечную сеть и применяются как фармако-терапевтические медицинские иммунобиологические препараты, согласно Государственному реестру Министерства здравоохранения РФ. Препараты других производителей не являются лекарственными средствами. Фаготерапия в РФ не развивается, поскольку в стране не разрешено применение персонализированных методов фаготерапии, а препараты бактериофагов производства ФГУП НПО «Микроген» не входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». Кроме того, стандартные препараты, выпускаемые российскими компаниями, не позволяют реализовать главное преимущество фаготерапии – персонализированный подход.

Очевидно, что бюрократические барьеры должны быть устранены в интересах пациентов. Бактериофаги не представляют опасностей для человека, что доказано их столетним применением в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фаготерапия – это, очевидно, перспективный подход для лечения бактериальных инфекций. Ее возможности наиболее ярко были продемонстрированы при персонализированном применении, когда для конкретных пациентов, которым не помогла антибиотикотерапия, подбирались специальные коктейли бактериофагов.

Бактериофаги не смогут стать заменой антибиотиков, которые дешевы, обладают широкой специфичностью, оказываются эффективными в большом количестве случаев и поэтому останутся препаратами первого выбора для лечения инфекционных заболеваний. Однако фаги позволяют справляться с тяжелыми инфекциями, не поддающимися терапии антибиотиками, и открывают возможность персонализированной терапии пациентов, позволяющей щадящим образом воздействовать на их микрофлору. Фаготерапия не сможет полностью решить проблему антибиотикоустойчивых инфекционных агентов. Наиболее перспективные приложения фаготерапии связаны с лечением инфекционных поражений, не поддающихся антибиотикотерапии, при которых наиболее адекватным будет местное применение. Кроме того, фаготерапия будет полезна в тех случаях, когда антибиотики вследствие широты их действия могут нарушить микробиоту или негативно повлиять на и без того ослабленный организм пациента с тяжелым заболеванием. Фаги могут успешно применяться в тех местах, куда их легко доставить и откуда они не будут быстро выводиться.

Для создания эффективных препаратов на основе бактериофагов и разработки технологий лечения требуется проведение фундаментальных исследований. Необходимо детально изучить механизмы ко-эволюции фагов и бактерий, фармакодинамику и фармакокинетику фа-

гов в организме; разработать способы конструирования бактериофагов с заданными свойствами с помощью методов синтетической биологии и создать технологии получения стабильных препаратов бактериофагов и средств их доставки. Требуется проведение полноценных клинических испытаний для выяснения вопросов, связанных с изучением дозировок, способов введения и возможных схем терапевтического применения препаратов бактериофагов.

Необходимо организовать широкое международное сотрудничество с целью создания условий, позволяющих быстро получать бактериофаги, которые необходимы для лечения конкретных пациентов.

Существующие подходы к регистрации терапевтических препаратов не применимы к препаратам бактериофагов и полностью закрывают дорогу к развитию фаготерапии, которая наиболее успешно может быть реализована в варианте персонализированной терапии, предусматривающей подбор бактериофагов для лечения конкретного пациента, зараженного определенными бактериями. Для успешного развития фаготерапии, как и для других видов терапии, основанных на применении вирусов, клеток и клеточных продуктов, должны быть созданы новые принципы разрешительных процедур.

Финансирование. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-29-08015).

Конфликт интересов. Авторы обзора заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д'Эррель Ф. (1935) *Бактериофаг и феномен выздоровления*, Издательство Тифлисского государственного университета, Тифлис.
2. Chanishvili, N. (2012) Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through soviet experience to current approaches, *Adv. Virus Res.*, **83**, 4-40.
3. Покровская М. П., Каганова Л. С., Морозенко М. А., Булгакова А. Г., Скаценко Е. Е. (1941) *Лечение ран бактериофагами*, Медгиз, Москва, Ленинград.
4. Цулукидзе А. П. (1941) К методике применения бактериофага в хирургической практике, *Вестник хирургии*, **6**, 679-685.
5. Кокин Г. А. (1941) Применение бактериофагов в хирургии, *Советская медицина*, **9**, 15-18.
6. Сапир И. Б. (1939) *Наблюдения и замечания по поводу лечения дизентерии бактериофагом*, Издательство Московского областного института инфекционных болезней, Москва.
7. Беликова М. А. (1941) Опыт фагопрофилактики дизентерии детей раннего возраста в Сталинграде, *Ж. Микробиол. Эпидемиол. Иммунол.*, **5-6**, 168-183.
8. Ермольева З. В. (1942) *Холера*, Медгиз, Москва.
9. Жуков-Вережников Н. Н., Пермитина Л. Д., Берилло Э. А., Комиссаров В. П., Бардымов В. М., Хволес А. Г., Угрюмов Л. Б. (1978) Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний, *Советская медицина*, **12**, 64-66.

10. Кочеткова В. А., Мамонтов А. С., Московцева Р. Л., Ерастова Е. И., Трофимов Е. И., Попов М. И., Джубалиева С. К. (1989) Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных, *Советская медицина*, **6**, 23-26.
11. Брюсов П. Г., Зубрицкий В. Ф., Исламов Р. Н., Низовой А. В., Фоминых В. М. (2011) Фагопрофилактика и фаготерапия хирургических инфекций, *Военно-медицинский журнал*, **4**, 34-39.
12. Хайруллин И. Н., Поздеев О. К., Шаймарданов Р. Ш. (2002) Эффективность применения специфических бактериофагов в лечении и профилактике хирургических и послеоперационных инфекций, *Казанский медицинский журнал*, **83**, 258-261.
13. Morozova, V. V., Kozlova, Y. N., Ganichev, D. A., and Tikunova, N. V. (2018) Bacteriophage treatment of infected diabetic foot ulcers, *Methods Mol. Biol.*, **1693**, 151-158, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_13.
14. Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., et al. (2017) Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e00954-17. doi: 10.1128/AAC.00954-17.
15. Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Eleftheriades, J. A., and Narayan, D. (2018) Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Evol. Med. Public Health.*, **1**, 60-66, doi: 10.1093/emph/eoy005.
16. Onsea, J., Soentjens, P., Djebara, S., Merabishvili, M., Depypere, M., et al. (2019) Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: development of a standardized multidisciplinary treatment protocol, *Viruses.*, **11**, 891, doi: 10.3390/v11100891.
17. Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., et al. (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*, *Nat. Med.*, **25**, 730-733, doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
18. Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G., et al. (2014) A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes, *Nat. Commun.*, **5**, 4498, doi: 10.1038/ncomms5498.
19. Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., and De Paepe, M. (2020) New insights into intestinal phages, *Mucosal Immunol.*, **13**, 205-215, doi: 10.1038/s41385-019-0250-5.
20. Górski, A., Wazna, E., Dąbrowska, B. W., Dąbrowska, K., Switała-Jeleń, K., and Międzybrodzki, R. (2006) Bacteriophage translocation, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 313-319, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x.
21. Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., et al. (2017) Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers, *mBio.*, **8**, e01874-17, doi: 10.1128/mBio.01874-17.
22. Fish, R., Kutter, E., Bryan, D., Wheat, G., and Kuhl, S. (2018) Resolving digital Staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage – a case report, *Antibiotics (Basel)*, **7**, 87, doi: 10.3390/antibiotics7040087.
23. Huh, H., Wong, S., St Jean, J., and Slavcev, R. (2019) Bacteriophage interactions with mammalian tissue: therapeutic applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, 4-17, doi: 10.1016/j.addr.2019.01.003.
24. Akturk, E., Oliveira, H., Santos, S. B., Costa, S., Kuyumcu, S., Melo, L. D. R., and Azeredo, J. (2019) Synergistic action of phage and antibiotics: parameters to enhance the killing efficacy against mono and dual-species biofilms, *Antibiotics (Basel)*, **8**, 103, doi: 10.3390/antibiotics8030103.
25. Lin, Y., Chang, R., Britton, W. J., Morales, S., Kutter, E., and Chan, H. K. (2018) Synergy of nebulized phage PEV20 and ciprofloxacin combination against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. Pharm.*, **551**, 158-165, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.024.
26. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 675-687, doi: 10.1038/nrmicro3096.
27. Basu, S., Agarwal, M., Bhartiya, S. K., Nath, G., and Shukla, V. (2015) An *in vivo* wound model utilizing bacteriophage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Ostomy Wound Manage.*, **61**, 16-23.
28. Fong, S. A., Drilling, A., Morales, S., Cornet, M. E., Woodworth, B. A., Fokkens, W. J., Psaltis, A. J., Vreugde, S., and Wormald, P. J. (2017) Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 418, doi: 10.3389/fcimb.2017.00418.
29. Chan, B. K., Abedon, S. T., and Loc-Carrillo, C. (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy, *Future Microbiol.*, **8**, 769-783, doi: 10.2217/fmb.13.47.
30. Yuan, Y., Wang, L., Li, X., Tan, D., Cong, C., and Xu, Y. (2019) Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, *Virus Res.*, **272**, 197734, doi: 10.1016/j.virusres.2019.197734.
31. Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., et al. (2018) Phage therapy: what have we learned? *Viruses*, **10**, 288, doi: 10.3390/v10060288.
32. Łusiak-Szelachowska, M., Zaczek, M., and Weber-Dąbrowska, B. (2014) Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy, *Viral Immunol.*, **27**, 295-304, doi: 10.1089/vim.2013.0128.
33. Majewska, J., Beta, W., Lecion, D., Hodyra-Stefaniak, K., Kłopot, A., et al. (2015) Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood, *Viruses*, **7**, 4783-99, doi: 10.3390/v7082845.
34. Hodyra-Stefaniak, K., Miernikiewicz, P., Drapała, J., Drab, M., Jończyk-Matysiak, E. J., et al. (2015) Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*, *Sci. Rep.*, **5**, 14802, doi: 10.1038/srep14802.
35. Górski, A., Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Dąbrowska, K., Wierzbicki, P., et al. (2012) Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy, *Adv. Virus Res.*, **83**, 41-71, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5.
36. Górski, A., Międzybrodzki, R., Jończyk-Matysiak, E., Zaczek, M., and Borysowski, J. (2019) Phage-specific diverse effects of bacterial viruses on the immune system, *Future Microbiol.*, **14**, 1171-1174, doi: 10.2217/fmb-2019-0222.
37. Sinha, A., and Maurice, C. F. (2019) Bacteriophages: uncharacterized and dynamic regulators of the immune system, *Mediators Inflamm.*, **2019**, 3730519, doi: 10.1155/2019/3730519.
38. Van Belleghem, J. D., Dąbrowska, K., Vanechoutte, M., Barr, J., and Bollyky, P. (2018) Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system, *Viruses*, **11**, 10, doi: 10.3390/v11010010.
39. Dąbrowska, K., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Hodyra, K., Owczarek, B., Lecion, D., Kaźmierczak, Z., Letarow, A., and Górski, A. (2014) Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface, *J. Virol.*, **88**, 12551-12557, doi: 10.1128/JVI.02043-14.

40. Zaczek, M., Łusiak-Szelachowska, M., Jończyk-Matysiak, E., Weber-Dąbrowska, B., Miedzybrodzki, R., et al. (2016) Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy, *Front. Microbiol.*, **7**, 1-14, doi: 10.3389/fmicb.2016.01681.
41. Dąbrowska, K. (2019) Phage therapy: what factors shape phagepharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review, *Med. Res. Rev.*, **1**, 1-26, doi: 10.1002/med.21572.
42. Bochkareva, S. S., Aleshkin, A. V., Ershova, O. N., Novikova, L. I., Karaulov, A. V., et al. (2017) Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs), *Infectious diseases*, **15**, 35-40, doi: 10.20953/1729-9225-2017-1-35-40.
43. Weber-Dąbrowska, B., Zimecki, M., and Mulczyk, M. (2000) Effective phage therapy is associated with normalization of cytokine production by blood cell cultures, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **48**, 31-37.
44. Roach, D. R., Chollet-Mmartin, S., Noël, B., and Granger, V., Debarbieux, L., and de Chaisemartin, L. (2019) Human neutrophil response to *Pseudomonas* bacteriophages, *bioRxiv*, 1-10, doi: 10.1101/786905.
45. Roach, D. R., Leung, C. Y., Henry, M., Morello, E., Singh, D., Di Santo, J. P., Weitz, J. S., and Debarbieux, L. (2017) Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen, *Cell Host Microbe*, **22**, 38-47.e4, doi: 10.1016/j.chom.2017.06.018.
46. Dickey, J., and Perrot, V. (2019) Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*, *PLoS One*, **14**, e0209390, doi: 10.1371/journal.pone.0209390.
47. Rodriguez-Gonzalez, R. A., Leung, C. Y., Chan, B. K., Turner, P. E., and Weitz, J. S. (2020) Quantitative models of phage-antibiotic combination therapy, *mSystems*, **5**, e00756-19, doi: 10.1128/mSystems.00756-19.
48. Poglazov, B. F. (1973) *Morphogenesis of T-even bacteriophages*, Karger Publishers.
49. Летаров А. В. (2019) *Современные концепции биологии бактериофагов*, ДеЛи, Москва.
50. Тикунова Н. В., Ворошилова Н. Н., Полыгач О. А., Морозова В. В., Тикунов А. Ю., Курильщикова А. М., Власов В. В. (2016) Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленных серий лекарственного препарата Пиобактериофаг поливалентный очищенный, *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, **15**, 93-100, doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-93-100.
51. Полыгач О. А., Ворошилова Н. Н., Тикунова Н. В., Морозова В. В., Тикунов А. Ю., Крылов В. Н., Юнусова А. А., Дабижева А. Н. (2018) Современные подходы к способам создания фаговой основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, **2**, 37-45, doi: 10.24411/2073-3046-2018-10004.
52. Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., et al. (2017) Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **249**, 100-133, doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
53. Manohar, P., and Ramesh, N. (2019) Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages, *Sci. Rep.*, **9**, 15242, doi: 10.1038/s41598-019-51742-4.
54. Chadha, P., Katare, O. P., and Chhibber, S. (2017) Liposome loaded phage cocktail: Enhanced therapeutic potential in resolving *Klebsiella pneumoniae* mediated burn wound infections, *Burns*, **43**, 1532-1543, doi: 10.1016/j.burns.2017.03.029.
55. Chang, R. Y. K., Wallinb, M., Lina, Y., Leung, S. S. Y., Wang, Y., Morales, S., and Chan, H.-K. (2018) Phage therapy for respiratory infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **133**, 76-86, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
56. Otero, J., García-Rodríguez, A., Cano-Sarabia, M., Maspocho, D., Marcos, R., Cortés, P., and Llagostera, M. (2019) Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy, *Front. Microbiol.*, **10**, 689, doi: 10.3389/fmicb.2019.00689.
57. Singla, S., Harjai, K., Katare, O. P., and Chhibber, S. (2016) Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies, *PLoS One*, **11**, e0153777, doi: 10.1371/journal.pone.0153777.
58. Kim, K. P., Cha, J. D., Jang, E. H., Klumpp, J., Hagens, S., Hardt, W.-D., Lee, K.-J., Loessner, M. J. (2008) PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response, *Microb. Biotechnol.*, **1**, 247-257, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00028.x.
59. Rita Costa, A., Milho, C., Azeredo, J., and Pires, D. P. (2018) Synthetic biology to engineer bacteriophage genomes, *Methods Mol. Biol.*, **1693**, 285-300, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_21.
60. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., and Lu, T. K. (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 523-543, doi: 10.1128/MMBR.00069-15.
61. Ando, H., Lemire, S., Pires, D. P., and Lu, T. K. (2015) Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing, *Cell Syst.*, **1**, 187-196, doi: 10.1016/j.cels.2015.08.013.
62. Lu, T. K., and Koeris, M. S. (2011) The next generation of bacteriophage therapy, *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 524-531, doi: 10.1016/j.mib.2011.07.028.
63. Kilcher, S., Studer, P., Muessner, C., Klumpp, J., and Loessner, M. J. (2018) Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 567-572, doi: 10.1073/pnas.1714658115.
64. Lu, T. K., and Collins, J. J. (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11197-11202, doi: 10.1073/pnas.0704624104.
65. Cobb, L. H., Park, J., Swanson, E. A., Beard, M. C., McCabe, E. M., Rourke, A. S., Seo, K. S., Olivier, A. K., and Priddy, L. B. (2019) CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection, *PLoS One*, **14**, e0220421, doi: 10.1371/journal.pone.0220421.
66. Yehl, K., Lemire, S., Yang, A. C., Ando, H., Mimeo, M., Der Torossian Torres, M., de la Fuente-Nunez, C., and Lu, T. K. (2019) Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis, *Cell*, **179**, 459-469, doi: 10.1016/j.cell.2019.09.015.
67. Barr, J. J. (2017) A bacteriophages journey through the human body, *Immunol. Rev.*, **279**, 106-122, doi: 10.1111/imr.12565.
68. Cooper, C. J., Denyer, S. P., and Maillard, J. Y. (2014) Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery, *Lett. Appl. Microbiol.*, **58**, 118-122, doi: 10.1111/lam.12161.
69. Carrigy, N. B., Chang, R.Y., Leung, S. S. Y., Harrison, M., Petrova, Z., et al. (2017) Anti-tuberculosis bacteriophage D29 delivery with a vibrating mesh nebulizer, jet nebulizer, and soft mist inhaler, *Pharm. Res.*, **34**, 2084-2096, doi: 10.1007/s11095-017-2213-4.
70. Astudillo, A., Leung, S. S. Y., Kutter, E., Morales, S., and Chan, H. K. (2018) Nebulization effects on structural sta-

- bility of bacteriophage PEV 44, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **125**, 124-130, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.01.010.
71. Самохин А. Г., Козлова Ю. Н., Корнеев Д. В., Таранов О. С., Фёдоров Е. А., Павлов В. В., Морозова В. В., Тикунова Н. В. (2018) Экспериментальное исследование антибактериальной активности литического стафилококкового бактериофага rh20 и литического бактериофага синегнойной палочки rh57 при моделировании их импрегнации в ортопедические полимерные конструкции из полиметилметакрилата (костного цемента), *Вестник РАМН*, **73**, 59-68, doi: 10.15690/vramn905.
 72. Алешкин А. В., Зулкарнеев Э. Р., Киселева И. А., Емельяненко К. А., Емельяненко А. М., Бойнович Л. Б. (2018) Опыт использования органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития STEC-инфекций, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **165**, 473-476.
 73. Morris, J., Kelly, N., Elliott, L., Grant, A., Wilkinson, M., Hazratwala, K., and McEwen, P. (2019) Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Surg. Infect. (Larchmt)*, **20**, 16-24, doi: 10.1089/sur.2018.135.
 74. Gelman, D., Eisenkraft, A., Chanishvili, N., Nachman, D., Glazer, C. S., and Hazan, R. (2018) The history and promising future of phage therapy in the military service, *J. Trauma Acute Care Surg.*, **85**, S18-S26, doi: 10.1097/TA.0000000000001809.
 75. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., and Turner, P. E. (2019) Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria, *Cell Host Microbe*, **25**, 219-232, doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014.
 76. Abedon, S. T. (2019) Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, 18-39, doi: 10.1016/j.addr.2018.06.018.
 77. Principi, N., Silvestri, E., and Esposito, S. (2019) Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections, *Front. Pharmacol.*, **10**, 513, doi: 10.3389/fphar.2019.00513.
 78. Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., and Iannelli, D. (2007) Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 2765-2773.
 79. Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Anggard, E., and Soothill, J. (2010) Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial, *Vet. Microbiol.*, **145**, 309-313.
 80. Kishor, C., Mishra, R. R., Saraf, S. K., Kumar, M., Srivastav, A. K., and Nath, G. (2016) Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model, *Indian J. Med. Res.*, **143**, 87-94.
 81. Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2011) Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055, *J. Med. Microbiol.*, **60**, 205-210.
 82. Mai, V., Ukhanova, M., Reinhard, M. K., Li, M., and Sulakvelidze, A. (2015) Bacteriophage administration significantly reduces *Shigella* colonization and shedding by *Shigella*-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota, *Bacteriophage*, **5**, e1088124.
 83. Mendes, J. J., Leandro, C., Corte-Real, S., Barbosa, R., Cavaco-Silva, P., Melo-Cristino, J., Gorski, A., and Garcia, M. (2013) Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds, *Wound Repair Regen.*, **21**, 595-603.
 84. Pabary, R., Singh, C., Morales, S., Bush, A., Alshafi, K., et al. (2016) Antipseudomonal bacteriophage reduces infective burden and inflammatory response in murine lung, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 744-751.
 85. Semler, D. D., Goudie, A. D., Finlay, W. H., and Dennis, J. J. (2014) Aerosol phage therapy efficacy in *Burkholderia cepacia* complex respiratory infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 4005-4013.
 86. Shivaswamy, V. C., Kalasuramath, S. B., Sadanand, C. K., Basavaraju, A. K., Ginnavaram, V., Bille, S., Ukken, S. S., and Pushparaj, U. N. (2015) Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats, *Microb. Drug Resist.*, **21**, 171-177.
 87. Waters, E. M., Neill, D. R., Kaman, B., Sahota, J. S., Clokie, M. R., Winstanley, C., and Kadioglu, A. (2017) Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *Thorax*, **72**, 666-667.
 88. Wills, Q. F., Kerrigan, C., and Soothill, J. S. (2005) Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 1220-1221.
 89. Albac, S., Medina, M., Labrousse, D., Hayez, D., Bonnot, D., et al. (2020) Efficacy of bacteriophages in a *Staphylococcus aureus* nondiabetic or diabetic foot infection murine model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e01870-19, doi: 10.1128/AAC.01870-19.
 90. Morozova, V. V., Vlassov, V. V., and Tikunova, N. V. (2018) Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans, *Front. Microbiol.*, **9**, 1696, doi: 10.3389/fmicb.2018.01696.
 91. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. (2001) Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 649-659, doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
 92. Chanishvili, N. (2009) *A literature review of the practical application of bacteriophage research*, Nova Science Publishers, New York.
 93. Chanishvili, N. (2016) Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the soviet and post-soviet experiences, *Curr. Drug Deliv.*, **13**, 309-323, doi: 10.2174/156720181303160520193946.
 94. Schmidt, C. (2019) Phage therapy's latest makeover, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 58-586, doi: 10.1038/s41587-019-0133-z.
 95. Altamirano, F., and Barr, J. (2019) Phage therapy in the postantibiotic era, *Clin. Microbiol. Rev.*, **32**, e00066-18, doi: 10.1128/CMR.00066-18.
 96. Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., and Sulakvelidze, A. (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial, *J. Wound Care*, **18**, 240-243.
 97. Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J. G., and Sulakvelidze, A. (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**, 453-458, doi: 10.1046/j.1365-4362.2002.01451.x.
 98. Wright, A., Hawkins, C. H., Anggård, E. E., and Harper, D. R. (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a preliminary report of efficacy, *Clin. Otolaryngol.*, **34**, 349-357, doi: 10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.
 99. Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., et al. (2018) 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, *Lancet Infect. Dis.*, **19**, 35-45, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1.

100. Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A. C., et al. (2012) Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh, *Virology*, **434**, 222-232, doi: 10.1016/j.virol.2012.09.002.
101. Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., et al. (2016) Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh, *EBioMedicine*, **4**, 124-137, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
102. McCallin, S., Sarker, S. A., and Barretto, C. (2013) Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects, *Virology*, **443**, 187-196, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.022.
103. Petrovic Fabijan, A., Lin, R. C. Y., Ho, J., Maddocks, S., Ben Zakour, N. L., and Iredell, J. R. (2020) Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection, *Nat. Microbiol.*, **5**, 465-472, doi: 10.1038/s41564-019-0634-z.
104. Febvre, H. P., Rao, S., Gindin, M., Goodwin, N. D. M., Finer, E., et al. (2019) PHAGE study: effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults, *Nutrients*, **11**, E666, doi: 10.3390/nu11030666.
105. Gindin, M., Febvre, H. P., Rao, S., Wallace, T. C., and Weir, T. L. (2019) Bacteriophage for gastrointestinal health (PHAGE) study: evaluating the safety and tolerability of supplemental bacteriophage consumption, *J. Am. Coll. Nutr.*, **38**, 68-75, doi: 10.1080/07315724.2018.1483783.
106. Leitner, L., Sybesma, W., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkhotua, A., et al. (2017) Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial, *BMC Urol.*, **17**, 90, doi: 10.1186/s12894-017-0283-6.
107. Ujmajuridze, A., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Leitner, L., Mehnert, U., Chkhotua, A., Kessler, T. M., and Sybesma, W. (2018) Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections, *Front. Microbiol.*, **9**, 1832, doi: 10.3389/fmicb.2018.01832.
108. Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Wojciech Fortuna, W., Letkiewicz, S., et al. (2012) Clinical aspects of phage therapy, *Adv. Virus Res.*, **83**, 73-121, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7.
109. Goren, M., Yosef, I., and Qimron, U. (2017) Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system, *Drug Resist. Updat.*, **30**, 1-6, doi: 10.1016/j.drug.2016.11.001.
110. Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., and Seo, K. S. (2017) Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*, *Sci. Rep.*, **7**, 44929, doi: 10.1038/srep44929.
111. Pursey, E., Sünderhauf, D., Gaze, W. H., Westra, E. R., and Van Houte, S. (2018) CRISPR-Cas antimicrobials: challenges and future prospects, *PLoS Pathog.*, **14**, e1006990, doi: 10.1371/journal.ppat.1006990.
112. Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceysens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., and Fauconnier, A. (2018) The magistral phage, *Viruses*, **10**, 64, doi: 10.3390/v10020064.

BACTERIOPHAGES AS THERAPEUTIC PREPARATIONS: WHAT RESTRICTS THEIR APPLICATION IN MEDICINE

Review

V. V. Vlassov*, N. V. Tikunova, and V. V. Morozova

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: vlassov@mail.ru*

Received June 15, 2020
Revised August 18, 2020
Accepted August 18, 2020

The increasing prevalence of bacterial pathogens with multiple antibiotic resistance requires development of new approaches to control infections. Phage therapy is one of the most promising approaches. In recent years, research organizations and a number of pharmaceutical companies have intensified investigations aimed at developing bacteriophage-based therapeutics. In the United States and European countries, special centers have been established that experimentally apply phage therapy to treat patients who do not respond to antibiotic therapy. This review describes the features of bacteriophages as therapeutic tools, critically discusses the results of clinical trials of bacteriophage preparations, and assesses the prospects for using phage therapy to treat certain types of infectious diseases.

Keywords: bacteriophages, phage therapy, bacterial infections, multidrug resistance, synthetic bacteriophages