

# Bakteriofagi – nanocząstki o szerokich zastosowaniach

Bożena SZERMER-OLEARNIK, Janusz BORATYŃSKI\* – Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław; Akademia im. Jana Długosza, Częstochowa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, 68, 9, 761–765

Historia odkrycia bakteriofagów sięga 1896 r., kiedy to brytyjski bakteriolog Ernst Hankin zaobserwował antibakteryjne właściwości wody Gangesu. Po zbadaniu wpływu wody na obecność bakterii z gatunku *Vibrio cholerae* Hankin stwierdził, że substancje w niej zawarte zapobiegają rozprzestrzenianiu się epidemii cholery [1]. Dwa lata później rosyjski bakteriolog Gamaleya oraz kilku innych badaczy, zaobserwowało podobne zjawisko w przypadku Gram-dodatniej laseczki *Bacillus subtilis* [2]. Jednak dopiero 20 lat później brytyjski bakteriolog Frederick Twort wysunął hipotezę, że czynnikiem antibakteryjnym może być wirus [3]. Twort nie kontynuował jednak badań i dwa lata później mikrobiolog Felix d'Herelle ponownie zainteresował się bakteriofagami. D'Herelle jako pierwszy wyizolował fagi, a następnie użył ich do leczenia czerwonki bakteryjnej u dzieci [4].

Bakteriofagi są wirusami infekującymi bakterie. Częstka faga jest nazywana wirionem i składa się ona z białkowego lub białkowo-lipidowego kapsydu otaczającego genom. Ważną cechą fagów jest ich wysoka specyficzność względem gospodarza związana z obecnością odpowiedniego receptora na powierzchni komórki bakteryjnej [5]. Po zakażeniu bakterii bakteriofag może niszczyć komórkę gospodarza na drodze cyklu litycznego lub może włączyć kwas nukleinowy do chromosomu bakterii rozpoczynając cykl lizogenny. Podczas cyklu litycznego, fag uaktywnia procesy prowadzące do tworzenia potomnych cząstek wirusa, powodując lizę komórki bakteryjnej i uwolnienie fagów potomnych. W cyklu lizogennym bakteriofaga dochodzi do integracji DNA fagowego z chromosomem bakterii. W warunkach stresowych uruchamiany jest cykl lityczny [6, 7].

Bakteriofagi, będąc w równowadze ze światem bakterii, stanowią istotny element ekosystemu. Ich liczbę na Ziemi szacuje się na około  $10^{31}$  cząstek o dużym zróżnicowaniu genotypów [8]. W tak dużej puli wirusów można oczekiwać istnienia nanocząstek o szerokim spektrum zastosowań. Dlatego też intensywne badania z zakresu wykorzystania tych wirusów skupiają się na poszukiwaniu cząstek o potencjalnym zastosowaniu w terapii zakażeń bakteryjnych.

Bakteriofagi były wykorzystywane w terapii już w latach trzydziestych i czterdziestych ubiegłego stulecia, przegrały jednak konkurencję z antybiotykami. Od wielu lat zainteresowanie fagami, jako cząstkami o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym wzrasta, między innymi ze względu na fakt, że nieuzasadnione stosowanie antybiotyków przez całe dziesięciolecie doprowadziło do powstania nowych, opornych na nie szczepów bakterii [9, 10]. Pierwsze centrum terapii bakteriofagowej na terenie Unii Europejskiej zostało utworzone w 2005 r. przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. W skład kolekcji Instytutu Immunologii, której utworzenie zainicjował w 1948 r. Profesor Ludwik Hirszfeld, wchodzi ponad 500 wirulentnych fagów różnego pochodzenia [9]. Bezpieczeństwo fagoterapii wymaga kompleksowego poznania zjawiska oddziaływań cząstek bakteriofagowych w układach *in vivo*. W tym celu ważne jest bliższe poznanie specyfiki oddziaływań fag:bakteria, farmakokinetyki preparatów bakteriofagowych, właściwości fizykochemicznych bakteriofagów, wpływu zanieczyszczeń

i substancji stabilizujących na właściwości biologiczne preparatu. Szczególnie istotny jest fakt, że w przypadku preparatów bakteriofagowych, mamy do czynienia z samo powielającym się układem i wyniki badań *in vitro* nie mają bezpośredniego przełożenia na warunki panujące *in vivo* [11].

Rozwijane są nowe aspekty zastosowania bakteriofagów w terapii zakażeń bakteryjnych, np. rekombinowane fagi nieposiadające zdolności do lizy komórki bakteryjnej, ale powodujące jej śmierć [12]. Nowym podejściem jest zastosowanie bakteriofagów jako adiuwantów w antybiotykoterapii. Zaletą takiej mieszanej terapii jest zmniejszenie prawdopodobieństwa pojawienia się szczepów bakterii antybiotykooopornych [13, 14].

Powstało wiele firm biotechnologicznych zainteresowanych zastosowaniem wirusów bakteryjnych. Przykładem jest firma Omnilytics, która uzyskała zgodę Agencji Ochrony Środowiska US na stosowanie produktu AgriPhage przeciwko chorobotwórczym bakteriom roślin. Firma EBI Ford Safety wprowadziła na rynek produkt o nazwie handlowej Listex™P100 do kontrolowania rozwoju bakterii *Listeria* w mięsie i serze [15]. W 2006 r., amerykańska rządowa instytucja ds. żywności i leków FDA (US Food and Drug Administration) wyraziła zgodę na dodawanie do żywności preparatu fagowego LMP 102 (Intralix, Inc.) zwalczającego groźną bakterię *Listeria*. W Polsce działa firma Proteon Pharmaceuticals, zajmująca się konstruowaniem produktów bazujących na bakteriofagach.

Bakteriofagi znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii genetycznej, np. jako wektory. Fagi służą również do prezentacji modyfikowanych białek na powierzchni kapsydu. Technika ta nazywana *phage-display* pozwala na konstruowanie bibliotek peptydowych, które mogą być testowane pod względem oczekiwanych cech [16, 17].

Rozwijane są również metody identyfikacji bakterii, wykorzystujące wysoką specyficzność fagów w wiązaniu się i infekowaniu określonych gatunków mikroorganizmów, np. test wykorzystujący infekcję fagową do wykrywania *Staphylococcus aureus* (Gronkowiec złocisty) opornego na metycylinę. W przyszłości takie metody, w powiązaniu z terapią fagami, mogą stać się skutecznym, szybkim i relatywnie tanim sposobem walki z bakteriami [18, 19].

Ważnym aspektem badań nad bakteriofagami jest zdefiniowanie i poznanie właściwości zanieczyszczeń preparatów fagowych, których źródłem mogą być składniki pożywki oraz produkty rozpadu bakterii. Najistotniejszym zanieczyszczeniem w przypadku preparatów otrzymywanych z wykorzystaniem bakterii Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd (endotoksyna, pirogen), który jest silnym immunostymulatorem. Jego podwyższony poziom w krwioobiegach powoduje wiele patofizjologicznych reakcji [20]. W warunkach fizjologicznych organizm ludzki jest nieustannie narażony na kontakt z endotoksynami, są one wszechobecnym elementem otaczającego nas środowiska. W przypadku preparatów iniekcyjnych normy stężenia endotoksyn są zależne od rodzaju produktów i tak, we wdychanym powietrzu jest to  $20 \text{ ng m}^{-3} \approx 200 \text{ EU m}^{-3}$  [21]. Termin EU (*Endotoxin Unit*) określa pirogenne właściwości preparatu. 1 EU jest równoważna 120 pg/ml endotoksyny *Escherichia coli* O111:B4 [22]. W przypadku preparatów podawanych dożylnie normę określa Farmakopea i jest to 5 EU kg<sup>-1</sup> masy ciała na godzinę (European Pharmacopoeia, 1997)

Autor do korespondencji:

Prof. dr hab. inż. Janusz BORATYŃSKI, e-mail: borat@iitd.pan.wroc.pl

[23]. W przypadku preparatów podawanych do centralnego układu nerwowego stężenie endotoksyn w preparacie nie może przekraczać 0,2 EU kg<sup>-1</sup> masy ciała na godzinę.

Istnieje wiele metod usuwania endotoksyn z preparatów. Sporządzenie apirogennych wodnych roztworów soli nie nastręcza problemów, natomiast usuwanie zanieczyszczeń z preparatów biologicznych, np. białkowych, wymaga każdorazowo indywidualnych rozwiązań. Dobierając metodę oczyszczania należy uwzględnić źródło, strukturę i masę cząsteczkową endotoksyny oraz naturę i masę cząsteczkową oczyszczanej biomolekuły. Stosowane są procedury, takie jak ultrafiltracja, filtracja żelowa na nośnikach policukrowych, czy separacja fazowa. Metody te wykorzystują różnice w masach cząsteczkowych, oddziaływaniach z ligandami oraz różnice we właściwościach hydrofilowych i hydrofobowych [24÷29].

Bakteriofagi to nanocząstki o zróżnicowanej wielkości, zbudowane z makrocząstek różniących się ładunkiem i hydrofobowością. Złożoność biochemiczna wirionu fagowego oraz jego wielkość, sięgająca nawet setek nanometrów, sprawia, że nie wszystkie procedury oczyszczania stosowane w biotechnologii i chemii mogą znaleźć zastosowanie. Różnorodność cząstek tworzących kapsydy bakteriofagów sprawiać może, że silne oddziaływanie z panelem matryc chromatograficznych utrudni lub uniemożliwi elucję czystych preparatów. Wyjątek stanowi złoże celulozowe charakteryzujące się niewielką prezentacją do środowiska negatywnie naładowanych grup siarczanowych. Złoże dzięki ograniczonej liczbie wiązań jonowych z bakteriofagami umożliwia elucję oczyszczonej frakcji w wysokiej sile jonowej [30]. Nowe podejście, zastosowane do oczyszczania preparatów bakteriofagowych wykorzystuje powinowactwo endotoksyn do białka fagowego. Przykładem jest komercyjny preparat EndoTrap® [31].

W Laboratorium Chemii Biomedycznej „Neolek” IITD PAN, obok chromatografii jonowymiennej [30] wykorzystano ekstrakcję heterofazową, która pozwala na efektywne usunięcie pirogenów rozpuszczalnikami trudno mieszanymi się z wodą [32]. Zastosowana w dalszych etapach filtracja membranowa pozwala na otrzymanie praktycznie wolnych od pirogenów preparatów bakteriofagowych. Metoda pozwala na usuwanie pirogenów z preparatów bakteriofagowych namnażanych w bakteriach Gram-ujemnych z 99% efektywnością.

Spełnienie wymagań stawianych preparatom farmaceutycznym jest dużym wyzwaniem w przypadku bakteriofagów. Nie chodzi tu tylko o czystość produktu, ale i o jego stabilność. Wykazano, że wysokooczyszczone preparaty w ubogich mediach szybko tracą aktywność przeciwbakteryjną, a w obecności trójblokowego kopolimeru (pluronic) znacznie ogranicza utratę aktywności [33].

Stosowane technologie powinny gwarantować powtarzalność szarż. Bakteriofagi należy traktować jako nanocząstki zbudowane z wielu białek o różnych cechach decydujących o ich właściwościach fizykochemicznych. Poznawanie tych właściwości może okazać się kluczowe dla opracowania metod oczyszczania, warunków przechowywania, sterylizacji i stabilizacji preparatów fagowych.

Badania nad lizatami bakteriofagowymi są realizowane w ramach grantu NCBiR nr 13-0089-06

## Literatura

- Hankin E.H.: *L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera*. Ann. Inst. Pasteur. 1896, 10, 511.
- Van Helvoort T.: *Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon*. Med. Hist. 1992, 3, 243–270.
- Twort F.W.: *An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses*. Lancet. 1915, ii, 1241.
- Summers W.C.: *Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*. Yale University Press, New Haven, Conn. 1999.
- Kutter E.: *Phage therapy: bacteriophages as antibiotics*. Online: <http://www.evergreen.edu/phage/phagetherapy/phagetherapy.html>. 1997.
- Kunicki – Goldfinger W.J.: *Życie bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, Polska. 1998.
- Węgleński P.: *Genetyka molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Polska. 1996.
- Serwer P., Hayes S.J., Thomas J.A., Hardies S.C.: *Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class*. J. Virol. 2007, 4, 1–5.
- Borysowski J., Międzybrodzki R., Górski A.: *Phage therapy current research and applications*. Caister Academic Press Norfolk, UK. 2014.
- Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P., Klak M., Wojtasik E., Górski A.: *Clinical aspects of phage therapy*. Adv. Virus Res. 2012, 83, 73–121.
- Payne R.J., Jansen V.A.: *Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process*. J. Theor. Biol. 2001, 208, 37–48.
- Paul V.D., Sundarajan S., Rajagopalan S.S., Hariharan S., Kempashanaiah N., Padmanabhan S., Sriram B., Ramachandran J.: *Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection*. BMC Microbiol. 2011, 11, 195.
- Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S.: *Bacteriophage resistance mechanisms*. Nat. Rev. Microbiol. 2010, 8, 317–327.
- Lu T.K., Collins J.J.: *Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009, 106, 4629–34.
- Lu T.K., Koeris M.S.: *The next generation of bacteriophage therapy*. Curr. Opin. Microbiol. 2011, 14, 524–31.
- Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J.A., Ruoslahti E.: *A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels*. Nature Med. 2002, 8, 751–755.
- Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K.: *Phage display: concept, innovations, applications and future*. Biotechnol. Adv. 2010, 28, 849–858.
- McCoy M.: *Microphage staph test wins Fda approval*. Chem. Eng. News. 2011, 89, 17.
- Mosier-Boss P.A., Lieberman S.H., Andrews J.M., Rohwer F.L., Wegley L.E., Breitbart M.: *Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species*. Appl. Spectrosc. 2003, 57, 1138–44.
- Rusiecka-Ziółkowska J., Walszewska M., Stekla J., Szponar B.: *Rola endotoksyn w patomechanizmie sepsy*. Pol. Merk. Lek. 2008, 147, 260–265.
- Hasday J., Dubin W., Fitzgerald T., Bascom R.: *Cigarettes are a rich source of bacterial endotoxin*. CHEST. 1996, 109, 63S–64S.
- Hirayama C., Sakata M.: *Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles*. J Chrom B. 2002, 781, 419–432.
- Daneshian M., Guenther A., Wendel A., Hartung T., Von Aulock S.: *In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs*. J Immunol Methods. 2006, 313, 169–175.
- Aida Y., Pabst M.J.: *Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114*. J. Immunol. Methods. 1990, 132, 191–195.
- Fiore G.B., Soncini M., Vesentini S., Redaelli A.: *Mechanisms of Polymyxin B Endotoxin Removal from Extracorporeal Blood Flow: Hydrodynamics of Sorption*. Contrib. Nephrol. 2010, 167, 55–64.
- Jang H., Kim, H.S., Moon, S.C., Lee, Y.R., Yu, K.Y., Lee, B.K., Youn, H.Z., Jeong, Y.J., Kim, B.S., Lee, S.H., Kim, J.S.: *Effect of protein concentration and detergent on endotoxin reduction by ultrafiltration*. BMB reports 2009, 42, 462–466.
- Liu S., Tobias R., McClure S., Styba G., Shi Q., Jackowski G.: *Removal of endotoxin from recombinant protein preparations*. Clin. Biochem. 1997, 30, 455–63.
- Neidhardt E.A., Luther M.A., Recny M.A.: *Rapid, two-step purification process for the preparation of pyrogen-free murine immunoglobulin G1 monoclonal antibodies*. J. Chromatogr. 1992, 590, 255–261.
- Petsch D., Anspach F.B.: *Endotoxin removal from protein solutions*. J. Biotech. 2000, 76, 97–119.

30. Boratyński J., Syper D., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Poźniak., Górski A.: *Preparation of endotoxin-free bacteriophages*. Cell. Mol. Biol. Lett. 2004, 9, 253–9.
31. Merabishvili M., Pirnay J-P., Verbeken G., Chanishvili N., Tediashvili M., Lashkhi N., Glonti T., Krylov V., Mast J., Van Parys L., Lavigne R., Volckaert G., Mattheus W., Verween G., De Corte P., Rose T., Jennes S., Zizi M., De Vos D., Vanechoutte M.: *Quality controlled small-scale production of a welldefined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials*. PLoS ONE. 2009, 4:e4944.
32. Boratyński J., Szermer-Oleatnik B., Weber-Dąbrowska. Górski A. Sposób uzykiwania preparatów bakteriofagowych obejmujący namnażanie bakteriofagów w komórkach bakterii, poddawanie lizie komórek z bakteriofagami Patent nr 213388, Polska.
33. Boratyński J., Górski A., Lipiński T Syper D., Weber-Dąbrowska B.: Preparat bakteriofagowy o podwyższonej trwałości oraz zastosowanie blokowego kopolimeru tlenku etylenu i tlenku propylenu. Patent nr 199642, Polska.

Dr inż. Bożena SZERMER-OLEARNIK ukończyła studia na Politechnice Wrocławskiej na Wydziale Chemii (2005). W 2013 r. uzyskała stopień doktora nauk biologicznych. Jest asystentem w Laboratorium Chemii Biomedycznej „NEOLEK” w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Specjalność - technologie bakteriofagów.

\*Prof. dr hab. inż. Janusz BORATYŃSKI ukończył studia na Politechnice Wrocławskiej na Wydziale Chemii (1972). W 1980 r. uzyskał stopień doktora nauk biologicznych, habilitacja - 2000 r., tytuł profesora - 2009 r.. Jest kierownikiem Laboratorium Chemii Biomedycznej „NEOLEK” w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Specjalność - chemiczne modyfikacje makrocząstek biologicznych.

## Aktualności z firm

News from the Companies

Dokończenie ze strony 760

### Lanxess inwestuje w nową linię do produkcji tworzyw specjalistycznych

Niemiecka spółka Lanxess poinformowała o planach rozwoju zakładów produkujących compoundy zlokalizowanych w miejscowości Gastonia (Karolina Północna, USA). Budowa drugiej linii produkcyjnej pochłonie ok. 15 mln USD i pozwoli na podwojenie mocy do poziomu 40 tys. ton rocznie.

Rozpoczęcie inwestycji planowane jest na drugą połowę br. Zgodnie z harmonogramem produkcja miała się rozpocząć na początku 2016 r. W fabryce w Gastonii wytwarzane są tworzywa specjalistyczne: poliamidy Durethan oraz poli(tereftalan butylenu) Pocan. Są one wykorzystywane zwłaszcza w branży motoryzacyjnej do produkcji lekkich komponentów zastępujących dotychczas stosowane elementy metalowe. (kk)

(<http://www.plastech.pl/>, 18.08.2014)

### Synthos S.A. poszerza portfolio

Jednostka produkcyjna Dyspersji i Klejów Boryszew ERG S.A. w Sochaczewie została włączona w strukturę Synthos S.A. Połączenie to jest kolejnym krokiem w budowaniu pozycji wiodącego dostawcy produktów chemicznych i lidera rynku oferującego wysokiej jakości rozwiązania w segmencie dyspersji i klejów, realizowanym przede wszystkim z myślą o odbiorcach i użytkownikach końcowych. (kk)

([http://synthosgroup.com](http://synthosgroup.com/), 25.08.2014)

### Znacząca inwestycja LyondellBasell w USA

Spółka LyondellBasell poinformowała o planach budowy nowej fabryki tlenku propylenu (PO) i tert-butanolu (TBA) w rejonie Zatok Meksykańskiej w USA. Roczne zdolności produkcyjne zakładów będą wynosiły 407 tys. ton PO oraz 906 tys. ton TBA i pochodnych. Harmonogram prac przewiduje uruchomienie zakładów w 2019 r. Realizacja projektu pozwoli w jego szczytowym momencie zatrudnić nawet 1200 osób. (kk)

([http://www.plastech.pl](http://www.plastech.pl/), 26.08.2014)

## KONKURSY, NAGRODY, WYRÓŻNIENIA

### Kolejny sukces Członków Śląskiego Klastra NANO

Kolejne firmy Klastra NANO pozyskały dotacje na innowacyjne technologie z Programu Badań Stosowanych (PBS). ALVO, CERTECH, Instytut Metali Nieżelaznych z Gliwic pozyskały ponad 2,5 mln PLN na projekt „Opracowanie nowych funkcjonalnych, aktywnych biologicznie powłok przeznaczonych na elementy wyposażenia placówek medycznych”. Firma TK NANO wraz z partnerami pozyskała ponad 1,6 mln PLN na projekt : „Opracowanie receptur uszczelnaczy akrylowych i silikonowych o podwyższonej odporności na korozję mikrobiologiczną opartych o wodne i niewodne nanodyspersje srebra”. (kk)

([http://www.imn.gliwice.pl](http://www.imn.gliwice.pl/), 12.08.2014)

### Niemieckie certyfikaty Synthosu

Firma Synthos otrzymała dokumentację Deutschen Instituts für Bautechnik (DIBt), uprawniającą do sprzedaży SYNTHOS XPS oraz SYNTHOS XPS PRIME w Niemczech. Uzyskane certyfikaty potwierdzają, że Synthos XPS, to produkt o najlepszych parametrach, spełniający rygorystyczne wymagania rynku niemieckiego. (kk)

([http://synthosgroup.com](http://synthosgroup.com/), 21.08.2014)

### Lider wśród Liderów

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju rozstrzygnęło V edycję programu Lider. Jednym z jego laureatów jest dr inż. Grzegorz Boczkaj z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, którego projekt nosi tytuł „Badania nad otrzymywaniem i właściwościami sorbentów wytwarzanych z asfaltów”. Celem badań jest opracowanie nowych zastosowań dla sorbentów występujących pierwotnie w ropie naftowej. Po procesie rafinacji ropy ta specyficzna grupa substancji chemicznych w całości występuje w pozostałości po destylacji próżniowej, z której wytwarza się asfalty. Od strony wytwarzania materiałów wynikami pracy dr. Boczkaja zainteresować mogą się firmy przemysłu rafineryjnego i petrochemicznego. Zakres zastosowań jest bardzo szeroki i dotyczy zarówno branży analityki chemicznej, jak i przemysłowych rozwiązań z zakresu ochrony środowiska. (kk)

([http://pg.edu.pl](http://pg.edu.pl/), 22.08.2014)

Dokończenie na stronie 770