
Bakteriofagiterapia

Jussi Tervonen*

Erikoisproviisori (sairaalfarmasia)
Vastaava proviisori
HUS Apteekki
jussi.tervonen@hus.fi

Saija Kiljunen

Tutkija
HUS Diagnostiikkakeskus,
tutkimus ja tuotekehitys
FT, mikrobigenetiikan dosentti
Helsingin yliopisto
Lääketieteellinen tiedekunta, Ihmisen
mikrobiomit -tutkimusohjelma

*Kirjeenvaihto

Tervonen J, Kiljunen S: Bakteriofagiterapia.
Dosis 38: 102–119, 2022

Tiivistelmä

Bakteriofagit eli faagit ovat kaikkialla ympäristössämme esiintyviä bakteerisoluja infektoivia viruksia, joiden vaikutusta infektiosairauksiin on tutkittu jo yli 100 vuotta. Faagien käyttö lääkehoitona perustuu niiden ominaisuuteen infektoida spesifisesti niiden isäntäbakteeria, joka on potilaasta hoitoprosessin alussa eristetty patogeeninen kanta. Laajakirjoiset antibiootit syrjäyttivät bakteriofagit lähes kokonaan, mutta kasvava resistenssiongelma on pakottanut tutkijat etsimään “uusia” ratkaisuja infektiosairauksien hoitoon. Kiinnostus bakteriofagihoidoihin on kasvanut voimakkaasti 2000-luvulla. Hoitoprosessin alussa potilaasta otetun mikrobinäytteen avulla seulotaan faagikokoelmasta mahdollisia infektoivia bakteriofageja, joita viljellään lääkeaineiksi tähän tarkoitukseen erikoistuneessa laboratoriossa. Sairaala-apteekissa faagiliuoksesta valmistetaan haluttu lääkekuori potilaan hoidon tarpeiden mukaisesti. Eri formulaatioita ja annosteluteknologioita on testattu onnistuneesti useissa tutkimuksissa, mutta faagien farmaseuttinen lääketutkimus on vielä alkuvaiheessa.

Lääkehoidon seurauksena faagit vähentävät bakteerin määrää niin pieneksi, että kehon immuunijärjestelmä kykenee hoitamaan infektion loppuun. Hoidon merkittävä etu on haittavaikutusten vähäisyys: bakteriofagi ei voi infektoida ihmisen soluja tai normaaliflooran bakteereja, eikä hoidolla tunneta haitallisia interaktioita esimerkiksi samaan aikaan annettavien antibioottien kanssa. Haasteina terapialle on riittävän laajan faagikokoelman kerääminen, riittävän nopean hoitoprosessin rakentaminen näytteenotosta lääkkeen toimittamiseen ja farmaseuttisen laadunvarmistuksen soveltaminen tähän ympäristöön. Lääkevalmistuksen näkökulmasta lääkeaine on lähes joka potilaan kohdalla uusi, eikä aikaa tai resursseja perinteisille farmakokineettisille tutkimuksille ole käytettävissä. Tämä ei kuitenkaan saa olla este terapian käytölle, vaan on laadittava uusia ohjeistuksia tutkijoiden, sairaalfarmasian asiantuntijoiden ja viranomaisten yhteistyönä, jotta bakteri-infektoiden hoitoon saadaan uusia menetelmiä antibioottihoitojen rinnalle.

Avainsanat: Bakteriofagi, antibioottiresistenssi, bakteri-infektiot, lääkkeiden annostelujärjestelmät, sairaalan lääkevalmistus

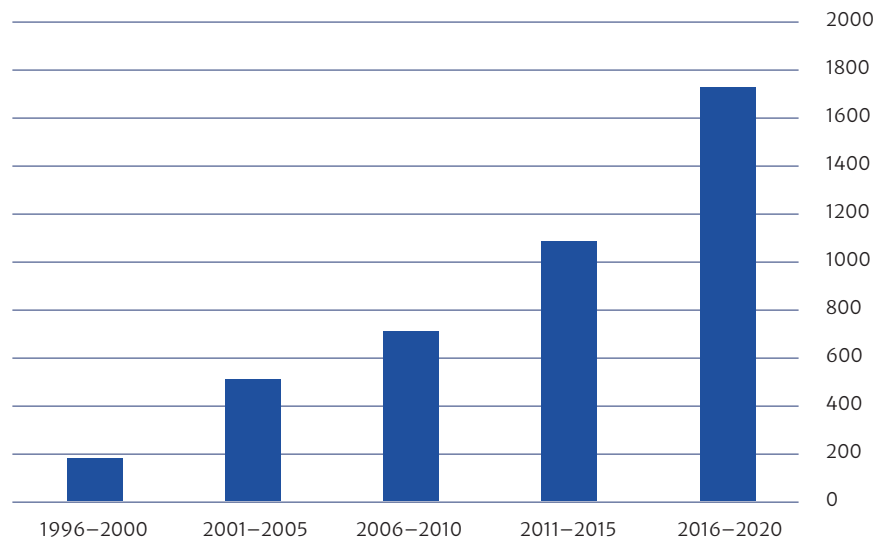
Johdanto

Bakteriofagit eli faagit ovat kaikkialla ympäristössä esiintyviä viruksia, jotka ovat erikoistuneet infektoimaan ja tappamaan bakteerisoluja. Faageja on testattu mikrobi-infektioiden hoidossa jo sata vuotta sitten (Chanisvili 2012), mutta laajakirjoisten antibioottien keksiminen länsimaissa vei lääketieteen huomion pois faageista lähes vuosisadaksi. 2000-luvulla kasvavan antibioottiresistenssin tuomat ongelmat ovat palauttaneet kiinnostuksen tähän ”uuteen” hoitomuotoon. Mikä tahansa bakteeri-infektio voi olla hoidon kohteena, mutta tällä hetkellä mielenkiinto kohdistuu vaikeasti hoidettaviin infektiosairauksiin, kuten antibioottiresistenttien sairaalabakteerien aiheuttamiin tai vaikeisiin palovammapotilaiden infektioihin. Faagien käytöllä pyritään myös vähentämään antibioottien käyttöä maatalouden tuotantoeläinten kasvatuksessa.

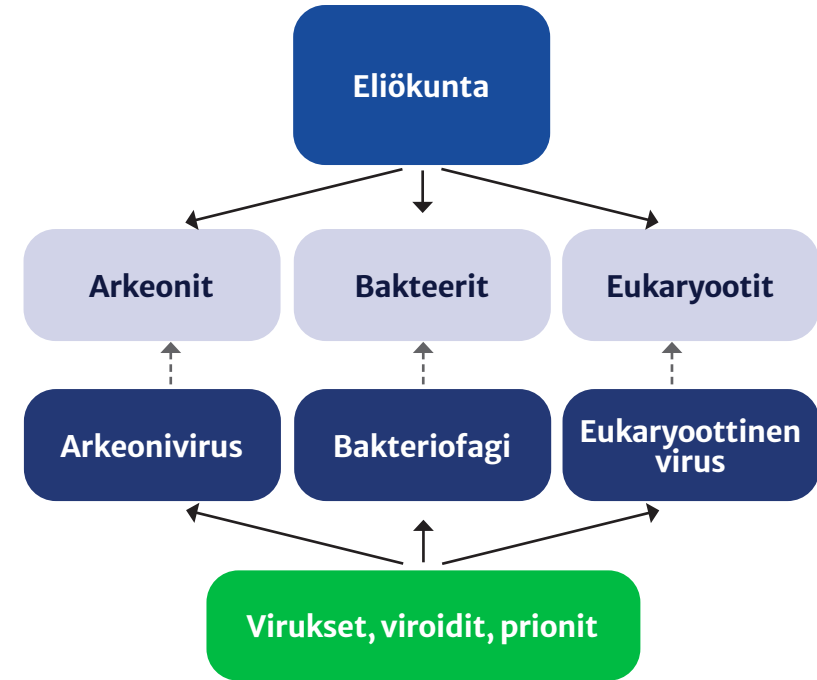
Faagihoidossa potilaasta otetun mikrobinäytteen avulla voidaan seuloa kyseistä bakteerikantaa infektoivia faageja laboratoriossa säilytettävistä kirjastoista, ja sopivan faagin löytyessä viljellä sitä samassa bakteerikannassa potilaan hoitoa varten. Hoidossa käytettävä viljelty faagi toimii kuin erittäin kapea-

kirjoinen antibiootti, jolle bakteerin on vaikea kehittää resistenssiä etenkin lyhyen hoitajakson aikana (Nilsson 2014). Bakteriofageja voidaan formuloida lähes mihin tahansa lääkemuotoon hoidettavan kohteen ominaisuuksien perusteella. HUS Helsingin yliopistollisessa sairaalassa (HUS) koko prosessi näytteenotosta valmiiseen lääkkeeseen on saatu parhaimmillaan tiivistettyä lähes viikkoon, mutta prosessin tehokkuus olisi parempi, jos saatavilla olisi asianmukaiset tilat, laitteet ja henkilöstö. Faagit eivät ole antibiootteja täysin syrjäyttäviä ihmelääkkeitä, mutta ne tarjoavat uusia keinoja vähentää kasvavia antibioottiresistenssistä aiheutuvia ongelmia (Granowitz ja Brown 2008).

Ensimmäisiä dokumentoituja havaintoja bakteriofaageista julkaisi Ernest Hankin 1896, kun hän oli aiemmin havainnut Intian Ganges-joesta otetuilla näytteillä olevan kolera-bakteeria tappava ominaisuus (Hankin 1896, Sulakvelizde 2001). Kaksikymmentä vuotta myöhemmin Félix d'Hérelle julkaisi systemaattisemman tutkimuksen ja nimesi ainesosan bakteriofagiksi (bakteerin syöjä) sekä ehdotti faagien käyttämistä terapiassa infektioita vastaan (d'Hérelle 1917). Ensimmäiset raportit ihmisillä tehdyistä tutkimuksista jul-



Kuva 1. Uusien Pubmed-julkaisujen määrän kehitys 25 vuoden aikana aiheesta ”Bacteriophage therapy ja phage therapy”.



Kuva 2. Elämän jakautuminen maapallolla ja jokaista pääryhmää spesifisesti infektoivat (punainen nuoli) virukset.

kaistiin 1921 ja faagihoidoja tutkittiin innokkaasti 1920-luvulla. Mikrobilääkkeiden nousun myötä mielenkiinto faageihin katosi länsimaissa lähes täysin vuosisadan loppuun asti. Itä-Euroopassa tutkimus jatkui aktiivisesti etenkin Puolassa ja Georgiassa läpi 1900-luvun, mutta julkaisut jäivät pimentoon, kunnes kiinnostuksen nousu 2000-luvulla länsimaissa johti useisiin yhteenvetojulkaisuihin (Skurnik, Kiljunen 2016).

Lisääntyvät antibioottiresistenssin aiheuttamat ongelmat ovat nostaneet faagihoidot takaisin valokeilaan, ja tutkimusjulkaisujen määrä on kasvanut voimakkaasti viimeisen 25 vuoden aikana (Kuva 1). Ensimmäinen satunnaistettu faasi I kontrolloitu tutkimus kroonisten jalkahaavainfektioiden hoidosta faageilla julkaistiin 2009, ja tässä turvallisuustutkimuksessa todettiin, ettei terapian käytölle ole vasta-aiheita (Rhoads ym. 2009). Faagien esiintyvyys kaikkialla ympäristössä ja ihmisen suolistossa yhdistettynä lisääntyneeseen tietoon suoliston mikrobiflooran vaikutuksesta eri sairauksiin on

lisännyt kiinnostusta tutkia faagihoidoja muun muassa maksan sairauksissa (Duan ym. 2019) ja Parkinsonin taudissa (Santos ym. 2019) sekä eri sairauksien diagnostiikassa (Manrique ym. 2017, Tetz ja Tetz 2018).

Faageja on testattu profylaktisesti rokotteina antibioottiresistenttejä mikrobeja vastaan herkistämällä kehon immuunijärjestelmää reagoimaan voimakkaammin resistentteihin *Pseudomonas aeruginosa* haavainfektioihin (Sweere ym. 2019). Lääkkeellisen käytön ulkopuolella faageja on myös testattu aerosolina infektioyksikön huoneiden puhdistamiseen karbapeneemi-resistenttiä *Acinetobacter baumannii* -kanta vastaan (Ho ym. 2016). Faageja voidaan käyttää myös virusvektoreina lääkeaineiden kuljettamiseen (Huh ym. 2019).

Suomessa faageja on käytetty lääkkeellisesti vasta yksittäisille potilaille. Helsingin yliopisto (HY) ja HUS ovat suunnitelleet lääkevalmistuksen laajentamista tasolle, jossa faagilääkkeitä voidaan valmistaa usean eri sairaalan potilaiden tarpeisiin jatkuvasti ja nopeasti lääkeval-

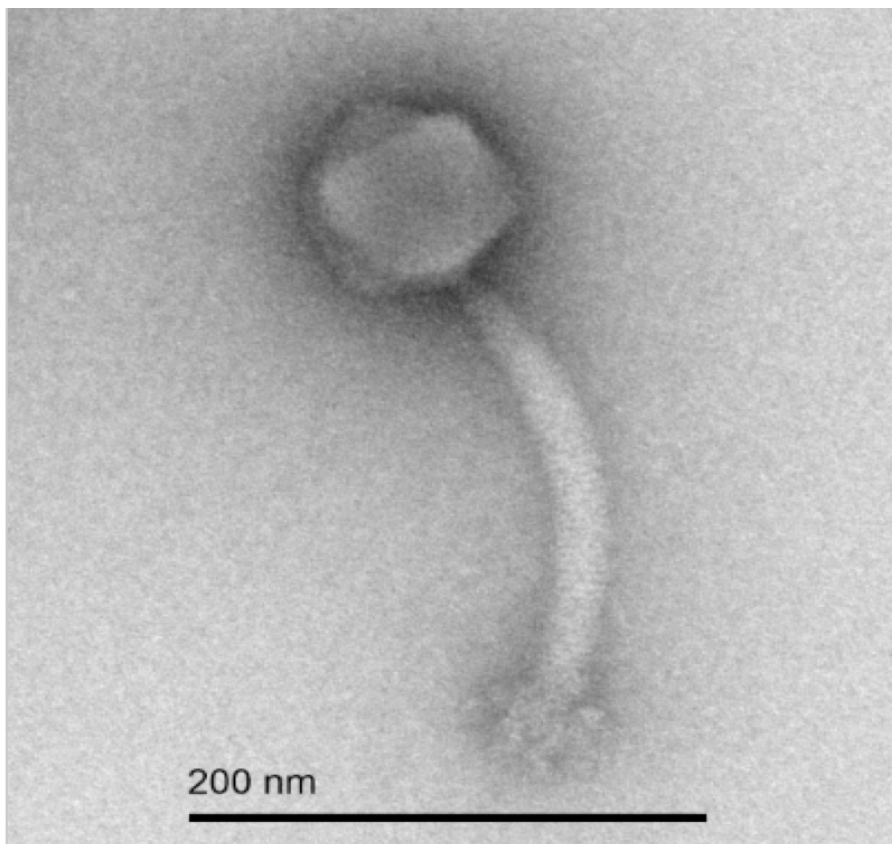
mistuksen standardeja noudattaen. Tässä katsauksessa esitellään bakteriofagihoidon periaate ja mahdollisuudet sekä aiheeseen liittyvän farmaseuttisen tutkimuksen nykytilanne.

Bakteriofagit

Elämä maapallolla jakautuu kolmeen soluperäiseen eliökuntaan, eukaryootit, bakteerit ja arkkeliöt, sekä viruksiin (**Kuva 2**). Viruksia ei luokitella samalla tavalla, mutta jokaiselle solueliökunnalle on olemassa omat viruksensa, jotka eivät infektoi toisen yläkunnan soluja (Nasir ym. 2014). Bakteriofagit ovat viruksia, joiden kantajana toimii bakteerisolun, ja ne ovat lukumäärällisesti yleisin eliömuoto maapallolla. Merissä ja järvissä faageja esiintyy 105–107 kpl/ml vettä ja maaperässä jopa 109 kpl/g. (Dion ym. 2020).

Bakteriofageja on jo vuosikymmeniä luokiteltu morfologian perusteella, mutta nopeiden ja edullisten DNA-sekvensointimenetelmien kehittyessä luokittelu on siirtymässä genomipohjaiseen tarkempaan jaotteluun (Krupovic ym. 2019, Turner ym. 2021). Faagien morfologia kuitenkin vaikuttaa niiden kemiallisiin ominaisuuksiin, jolloin morfologista ryhmittelyä voidaan hyödyntää formuloinnissa ryhmän kanssa parhaiten yhteensopivien apuainoiden valinnassa.

Faagihoidossa tutkijoita kiinnostaa kohdebakteeriin tehoavan faagin nopea löytäminen, joten terapiaa tutkivat yksiköt laativat omia faagikirjastoja potilashoitokäyttöön. Tyypillisin hoidoissa käytetty faagien lahko on Caudovirales, jolle tyypillistä on genominsisältävä ikosaedrin muotoinen pää ja häntärakenne, jonka avulla virus tunnistaa isäntä-



Kuva 3. Tunnelointielektronimikroskoopi (TEM) –kuva bakteriofagista (Kuva: Kiljunen S).

Taulukko 1. Bakteriofagien ominaisuuksien terminologiaa.

Lyyttinen sykli	Bakteerisolun hajottava/tappava
Lysogeeni	Bakteerisolun, jonka kromosomi on integroitunut profagi
Lysogenia	Tila, jossa faagin genomi replikoituu osana isäntäbakteerin genomia
Profagi	Faagin genomi, joka on integroituneena isäntäbakteerin genomiin
Virulentti faagi	Vain lyyttisen syklin omaava virus
Temperaatti faagi	Lauhkea: johtaa joko lysogeeniseen tai virulenttiin sykliin

bakteerinsa ja infektoi sen perimäaineksellaan (**Kuva 3**). Infektoituneen bakteerin aineenvaihdunta valjastetaan faagin genomien monistukseen ja viruspartikkelien rakenteisiin tarvittavien proteiinien tuotantoon. Näistä osista syntyvät uudet faagit hajottavat isäntäbakteerilyysiinien ja holiinien avulla vapauttaen virukset ympäristöön infektoimaan lisää bakteereja. Infektoitavien bakteerien puuttuessa faagi ei voi replikoitua ja esimerkiksi ihmiskehossa tämä johtaa niiden eliminoitumiseen (Danis-Wlodarczyk ym. 2020).

Faagien farmakodynaaminen vaikutus voidaan jakaa kolmeen eri päätyyppiin: passiivinen läpäisy, aktiivinen läpäisy ja aktiivinen infektio (Danis-Wlodarczyk ym. 2020). Passiivisessa läpäisyssä faagit tappavat bakteerit bakteriosidisesti takertumalla suurina määrinä isäntämikrobin pintaan ja vaurioittamalla bakteerin pintarakennetta. Tässä hoidossa lääkkeen annostelua jatketaan, kunnes infektio on saatu vähennettyä sellaiselle tasolle, että kehon immuunijärjestelmä kykenee tuhoamaan jäljelle jääneet bakteerit.

Aktiivisessa läpäisyssä faagit aiheuttavat bakteerisolujen lyyttisen hajoamisen ilman viruspartikkelien monistumista ja tätä bakterisidistä vaikutusta voidaan hyödyntää tiivi-

den mikrobikasvustojen eli biofilmien hajottamisessa. Mikrobit voivat erittää niiden kiinnittymistä edistävää limaa muodostaen vaikeasti läpäisevän kalvorakenteen, minkä on havaittu aiheuttavan ongelmia muun muassa sydänten keinoeläimissä ja muissa kehon sisään asennettavissa keinoeläimissä materiaaleissa. Faagien hajottaessa biofilmin pinnan mikrobeja paljastuu uusia bakteereja infektoitavaksi ja hoito voi näin hajottaa biofilmiä ja esimerkiksi tehostaa antibioottien pääsyä kasvuston sisään.

Hoidon kannalta tehokkain dynamiikka on aktiivinen infektio, jossa faagit monistavat itseään bakteerisolussa ja monistusvaiheen lopussa aktivoituvat bakteriolyyttiset proteiinit hajottavat bakteerin seinän, jolloin hajoamisen seurauksena faagit vapautuvat infektoimaan uusia mikrobeja. Kahdessa ensimmäisessä tapauksessa faageja tulee annostella potilaalle tasaisesti riittävän faagi-mikrobi-kontaktin saavuttamiseksi, kun taas aktiivisessa terapiassa lääkeaine valmistaa itse itsensä isäntäbakteereissa, kunnes uusia mikrobeja ei enää ole saatavilla.

Farmakokineettisesti faagit käyttäytyvät passiivisessa dynamiikassa kuten muut biomolekyylit tai antibiootit, kun taas aktiivisessa infektiossa kinetiikan mallintaminen

on haastavampaa, koska lääkeaineen määrä lisääntyy itsestään hoitokohteessa (Payne ja Jansen 2003). Jokaiselle faagille ei voida suorittaa farmakokineettisiä tutkimuksia niiden suuren määrän vuoksi, mutta mallinnusta voidaan tehdä eri morfologisille ryhmille ja antoreiteille (Dabrowska 2019). Merkittävin rajaava tekijä faagin käytölle hoidossa on sen infektiosyklin tyyppi (Skurnik ja Kiljunen 2016) (**Taulukko 1**). Temperaatteja eli lauhkeita faageja ei käytetä terapiassa, koska temperaatti faagi voi lyyttisen syklin sijaan mennä lysoogeeniseen tilaan, jossa viruksen perimä integroituu osaksi bakteerisolun perimää. Tällöin bakteerin tappava lyyttinen sykli ei käynnisty, ja bakteeri voi muuttua resistentiksi faagille tai jopa patogeenisemmäksi. Temperaattisuus tunnustetaan faagista tutkimalla sen perimää eikä temperaatteja faageja lisätä terapeutiseen kokoelmaan.

Geeniteknologian nopean kehityksen arvioidaan vaikuttavan voimakkaasti myös faagitutkimukseen (Pirnay 2020). Synteettisellä

valmistuksella tai esimerkiksi CRISPR-Cas-menetelmällä muokkaamalla voidaan faageille räätälöidä haluttuja ominaisuuksia, kuten laajempi isäntäkirjo tai parempi biofilmien hajotuskyky (Guo ym. 2021).

Faagihoito ja käytettävät lääke muodot

Hoidon toimintaperiaate

Faagien käyttö terapiassa perustuu faagin saattamiseen kontaktiin isäntämikrobin kanssa ja kontaktiajan maksimointiin, jolloin lääkehoitoa suunniteltaessa tulee huomioida infektion sijainti ja luonne. Ihon, keuhkojen tai limakalvojen pinnallisten infektioiden hoidossa topikaalinen tai pulmonaarinen antoreitti on usein suorien tie mikrobikasvuston luo. Systemiset infektiot voidaan tavoittaa oraalisesti tai pulmonaarisesti, mutta parenteraalinen annostelu takaa nopeasti suuremmat faagipitoisuudet kudoksissa ja verenkierrassa. Ihmis-

ten hoidossa faagihoito ei vielä sovellu ensilinjan hoitoon, vaan terapiaa tulee aina käyttää muun hoidon tukena (Lin ym. 2017). Bakteerinfektiota heikennetään faageilla ja antibiooteilla sille tasolle, että kehon oma immuunijärjestelmä voi poistaa jäljelle jääneet mikrobit.

Faagien käytön merkittävin etu on faageista itsestään johtuva haittavaikutusten vähäisyys. Faagit eivät infektoi ihmisen soluja, eivätkä ne voi satunnaisesti mutatoitua sellaisiksi, koska bakteerisolut ja eukaryootiset solut ovat rakenteellisesti ja toiminnallisesti liian erilaisia (Danis-Wlodarczyk ym. 2020). Elimistöön annostellut faagit eivät lisäänty spesifisen isäntäbakteerin häviämisen jälkeen, ja elimistön immuunijärjestelmä eliminoi faagit osana normaalia toimintaansa. Interaktioita muiden lääkkeiden kanssa ei ole raportoitu.

Oraaliset lääke muodot

Oraaliset valmisteet soveltuvat haitallisten suolistoinfektioiden häätämiseen, ja kliinisiä tutkimuksia on julkaistu aina 1930-luvulta lähtien (Lin ym. 2017). Turvallisuustutkimuksissa ei ole havaittu merkittäviä ongelmia (Bruttin ja Brüssow 2005), mutta faagit voivat siirtyä suolen seinämän läpi verenkiertoon, mikä tulee huomioida esimerkiksi immuunipuutteisten potilaiden hoidossa. Oraalinen annostelu mahdollistaa myös systeemisen hoidon, mutta faagien imeytyminen suolistosta verenkiertoon tunnetaan huonosti ja tutkimuksissa saaduissa tuloksissa on paljon hajontaa (Dabrowska 2019). Oraalinen annostelu mahdollistaa myös suoliston mikrobiflooran hoitamisen ja muokkaamisen faagihoidolla, ja tätä antoreittiä on tutkittu sadoissa tutkimuksissa. Faagit kuuluvat suoliston normaaliflooraan (Reyes ym. 2012), mutta haitallisten mikrobien häätämistä varten voidaan antaa niille spesifejä faageja ilman normaaliflooran häiriintymistä. Oraalisina formulaatioina käytetään nesteitä, suspensioita ja kapseleita. Vatsan hapan ympäristö tuhoaa faageja, mutta tätä voidaan ehkäistä käyttämällä enteropäällysteisiä formulaatioita.

Venäjällä ja Georgiassa faagivalmisteita myydään itsehoitolääkkeinä ja terveysjuomina (**Kuva 4**). Valmisteisiin on sekoitettu jopa kymmeniä yleisiä haitallisia suolistomikrobeja infektoivia faageja, ja valmisteiden tarkoitus on

poistaa mahdolliset haitalliset bakteerit elimistöstä. Valmisteiden tehokkuus on kyseenalainen, koska käyttäjä ei voi tietää esimerkiksi vatsavaivan aiheuttajaa. Tällöin juomasta ei välttämättä löydy juuri oikeaa faagia häätämään suolistossa olevaa haitallista kantaa.

Pulmonaariset lääke muodot

Keuhkoihin annostelua on tutkittu sekä paikallishoitona akuuteissa ja kroonisissa keuhkoinfektioissa että systeemisenä annostelureittinä ja tutkimuksissa on saavutettu hyviä tuloksia (Abeldon 2015, Chang ym. 2018). Faagien annostelu keuhkoihin voidaan toteuttaa nebulisaatiolla, mutta eri nebulisointitekniikoilla on vaikutusta faageihin kohdistuvan mekaanisen rasituksen vuoksi. Vertailututkimuksessa ponnekaasuton hitaan lääkesumun tuottava soft mist -tekniikka todettiin vähiten faageja tuhoavaksi. Faagien eri morfologioista johtuvat rakenteelliset ominaisuudet vaikuttavat nebulisaatiokestävyyteen ja passiivinen terapia ei välttämättä toimi, vaan faagin tulee monistaa itseään aktiivisesti in situ keuhkojen syvimpien osien saavuttamiseksi. Nebulisointiville liuoksille tai suspensioille on osoitettu useiden kuukausien säilyvyysaikoja, mutta tutkimuksissa eniten käytetyt fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) ja tris(hydroksimetyyli)aminometaani-puskuri (Tris) tulee korvata inhalaatioon hyväksytyillä apuaineilla (Chang 2018). Myös liposomeilla on saavutettu lupaavia tuloksia aerosolien formuloinnissa (Malik ym. 2017).

Inhalaatiojauheilla on myös saavutettu pitkiä säilyvyysaikoja, mutta faagien kestävyys kylmäkuivausprosessissa on riippuvainen faagin rakenteellisista ominaisuuksista ja formulaation apuaineista (Chang ym. 2018). Inhalaatiojauheet mahdollistavat huoneenlämmössä säilytyksen, mutta ovat alttiita ilmankosteuden aiheuttamalle hajoamiselle. Paineistettujen aerosoli-inhalaattorien käytöstä on hyvin vähän tutkimustietoa.

Topikaaliset lääke muodot

Haavainfektiot ja infektoituvat palovammat ovat merkittävä kiinnostuksen kohde faagihoidon käytölle (Merabishvili ym. 2017). Paikallisesti tapahtuva topikaalinen hoito sisältää vähän riskejä systeemiin annosreitteihin



Kuva 4. Itsehoitoon myytäviä faagivalmisteita: Esim. yhdeksää eri bakteeria infektoivia faageja sisältävä liuos sisäiseen ja ulkoiseen käyttöön, geelimäinen valmiste ihon infektoihin ja nestemäinen valmiste Stafylokokki-infektioita vastaan (Kuva: Kiljunen S).

verrattuna, bakteerinäyte on helppo ottaa hoidettavalta alueelta ja faageja voidaan helposti käyttää muiden hoitokeinojen rinnalla. Haasteena on valmistuksen ja annostelun kannalta sopivimman formulaation valinta.

Nestemäiset formulaatiot ovat olleet suosituimpia helpon formuloinnin vuoksi (Merabishvili ym. 2017, Chang ym. 2020). Faageista voidaan valmistaa puskuriliuoksia, joille on testattu jopa 1–2 vuoden säilyvyyksiä faagipitoisuuksien osalta. Faagien inaktivaatiota aiheuttavat aggregoituminen, adsorptio astioiden pinnalle ja hajoaminen esimerkiksi oksidaation vuoksi. Aggregaatiota voidaan vähentää magnesium- ja kalsiumsuolojen avulla ja stabiloivina säilöntäaineina on testattu muun muassa kinatsoliinia ja parabeeneja. Nestemäinen faagivalmiste voidaan applikoida kaatamalla, suihkuttamalla tai kastamalla haavasidoksia liuokseen. HUS:ssa on testattu suihkutettavaa faagiliuosta palovammapotilaan hoitoon, mutta hoidon tehosta ei voitu tehdä johtopäätöksiä samanaikaisen antibioottihoidon vuoksi (HUS julkaisematon havainto 2018). Liuoksen heikkoutena havaittiin sen nopea poistuminen hoidettavalta alueelta, ja tulevaisuudessa geelimäinen formulaatio voisi palvella tätä tarvetta paremmin.

Vesiliukoinen hydrogeeli kosteuttaa haava-alueita, ja faagit sietävät hydrogeelejä hyvin (Chang ym. 2020). Esimerkiksi hydroksiselloosapohjaiset geelit stabiloivat faageja suojaamalla niitä varauksien aiheuttamalta inaktivoitumiselta, ja lääkeaine vapautuu hitaasti diffuusiolla hoidettavalle alueelle. Geelipohja voidaan valmistaa ensin ja steriloida autoklaavissa, minkä jälkeen steriilisuodatettu faagisuspensio sekoitetaan geeliin aseptisesti. Säilöntäaineiden testaus on vielä ollut vähäistä, mutta parabeeneja on testattu onnistuneesti geelien säilöntäaineina.

Muita testattuja topikaalisia formulaatioita ovat erilaiset voideseokset, liposomit, nanemuulsiot, kuituvalmisteet ja laastarit (Pinto ym. 2020). Kaupallisten voide- ja geelipohjien sekä palovammatuotteiden käyttö yksinkertaisiksi formulaation kehitystä, mutta apuainien yhteensopivuus käytettävän faagityypin kanssa on testattava, sillä apuaineet voivat inaktivoita faageja (Merabishvili ym. 2017). HUS:ssa on myös hoidettu kroonisesta pos-

kiontelotulehduksesta kärsivää potilasta nestemäisellä faagilääkkeellä (HUS julkaisematon havainto 2019). Liuosvalmiste on helppo annostella nenän kautta, ja potilas kykeni annostelemaan lääkettä myös itse nenätippapullon avulla. Krooninen vaiva on kuitenkin hankala hoidettava, koska infektio uusiutuu herkästi ja infektio saattaa aiheutua usean kannan sekakasvustosta.

Muita lääkemuoja

Parenteraalisesti annosteltavien faagivalmisteiden kliinisiä tutkimuksia on tehty jo 70 vuoden ajan (Speck ja Smithyman 2016) ja uusimmissa tutkimuksissa on saatu lupaavia tuloksia muun muassa *S. aureuksen* aiheuttaman sepsiksen hoidossa (Fabijan ym. 2020). Parenteraalinen annostelureitti mahdollistaa laajan systeemisen annostelun, mutta aiheuttaa kuitenkin joitain haasteita valmisteille: mikäli viljelyssä käytettävä isäntäbakteeri tuottaa endotoksiineja, on nämä toksiniitit puhdistettava tehokkaammin kuin esimerkiksi paikallisesti annosteltavista topikaalisista valmisteista. Lisäksi viljelyssä käytettävät elatusaineet eivät voi sisältää hiivaa tai eläinperäisiä raaka-aineita (Nilsson 2014). Bakteriofagit voivat aktivoita kehon immuunijärjestelmää, mutta anafylaksia on julkaisujen perusteella erittäin harvinainen ilmiö. HUS:ssa on hoidettu yhtä potilasta suonensisäisellä faagihoidolla *Mycobacterium abscessus* -bakteerin häätämiseksi (HUS julkaisematon havainto 2021). Yksittäisten potilaiden kohdalla hoidot antavat epäsuoraa tietoa hoidon tehosta etenkin silloin, kun potilas on saanut pitkään antibioottihoitoa ilman vastetta.

Faageja voi teoriassa käyttää kaikissa lääkemuojoissa ja kaikilla antoreiteillä, mikäli se johtaa faagin pääsyyn kontaktiin isäntäbakteerin kanssa. Edellytyksinä ovat bakteerinäytteen saaminen hoidettavasta kohteesta ja faagin stabiilius käytettävässä lääkemuojoissa sekä riittävän nopea lääkeformulaation valmistusprosessi. Eri antoreittejä ja formulaatioita on testattu yksittäisissä tutkimuksissa ja aihetta on käsitelty myös yksittäisissä katsausartikkeleissa (Ryan ym. 2011), mutta useilla antoreiteillä tieteellinen näyttö on vielä heikkoa. Tuloksia on julkaistu annostelusta muun muassa silmään, korvaan, nenään ja rektaali-

sesti. Julkaisuissa tulokset ovat lähes aina positiivisia, mutta potilasmäärät ovat usein pieniä ja yleinen johtopäätös on, että "hoitomuoto on lupaava, mutta tarvitaan lisää tutkimusta". Faagien kapea spesifisyys rajaa yksittäisten faagien tutkimiseen saatavilla olevaa potilasmäärää, ja useiden erilaisten faagien tutkiminen rinnakkain nostaa väkisin kysymyksiä tulosten vertailukelpoisuudesta.

Faagilääkkeiden valmistus

Faagikirjastot

Uusia faageja voidaan etsiä kaikkialta, mistä löytyy mikrobeja (Kiljunen ym. 2020). Ihmisten patogeenisten mikrobien faageja löydetään parhaiten jätevesistä, kuten sairaalan viemäreistä tai vedenpuhdistamoilta, joista faagit eristetään ja puhdistetaan varastointia varten. Mikrobien ja faagien kirjossa on maantieteellisiä alueellisia eroja, mutta muun muassa lisääntynyt turismi lisää antibioottiresistenttien bakteerien leviämistä ympäri maailmaa. Tästä syystä aihetta tutkivien laboratorioden välinen yhteistyö ja faagien jakaminen on tärkeää kattavan saatavuuden takaamiseksi hoitoyksiköissä.

Eri bakteriofaagien määrä on niin suuri, ettei niiden varastointi suurina määrinä ole mahdollista, vaan faageja säilytetään kylmäkuivattuina tai liuoksina syväjäädetyissä kokoelmissa eli kirjastoissa (Lin ym. 2021). Fyysistä faagikokoelmaa hallitaan digitaalisesti luomalla faageista tietokanta hakujen suorittamiseen ja kokoelman ylläpitämiseen (Kiljunen ja Tervonen 2020). Tietokanta voidaan jakaa käyttötarkoitusten mukaan eri alakirjastoihin, kuten tieteellinen kokoelma ja kliininen kokoelma. Uusi faagi voidaan lisätä tieteelliseen kokoelmaan tallentamalla sen perustiedot, kuten löytöpaikka ja arvioitu isäntäkirjo. Tieteellisestä kokoelmasta faagi voidaan siirtää kliiniseen kokoelmaan ennalta määriteltävien ehtojen kautta. Kliininen käyttö edellyttää faagin genomien sekvensointia temperaattien faagien tunnistamiseksi, elektronimikroskooppikuva ja tarkempaa isäntäkirjo-testausta. Laadunvalvontatietojen avulla kliinisessä käytössä olevia faageja voidaan verrata alkuperäisiin kirjaston referensseihin vilje-

lyissä tapahtuvien satunnaisten geneettisten muutosten jäljittämiseksi. Kirjastoon voidaan tallentaa faagin viljelystä saatavaa dataa viljelyolosuhteiden optimoimiseksi kunkin faagin tietueeseen.

Faagiherkkyydesti

Hoitoprosessi alkaa bakteerinäytteen ottamisella potilaasta, ja HUS:ssa näyte lähetetään ensin HUSLAB Bakteriologian yksikköön bakteerin tunnistusta varten. Potilaan mikrobinäyte viljellään, mikrobit tunnistetaan ja patogeenisestä mikrobista lähetetään viljelynäyte Faagihoitoboratorioon faagien seulontaa eli faagiherkkyydestiä varten. Mikrobin tunnistetietojen perusteella etsitään faagikokoelmasta sopivia kandidaatteja, ja mikäli näitä on kokoelmassa, suoritetaan faagiherkkyydesti. Testissä potilaan mikrobia kasvatetaan yhdessä yksittäisten faagien kanssa ja inkuboinnin jälkeen infektoivat virukset voidaan havaita bakteriosidisen vaikutuksen perusteella viljelmästä. Mikäli infektoivia faageja löydetään yksi tai useampi, otetaan ne varsinaiseen tuotantoviljelyyn. Jos sopivia viruskantoja ei ole kokoelmassa, voidaan niitä tiedustella toisilta laboratorioilta, mutta faagihoitoprosessi voi päättyä tässä vaiheessa sopivan faagin puutteeseen, ja potilaan hoito jatkuu muilla menetelmillä.

Isäntäkirjotesti perinteisillä maljausmenetelmillä kestää 3–4 vuorokautta, mutta uusia tehokkaampia ja nopeampia testejä on kehitteillä muun muassa Helsingin yliopistossa (Patpatia 2020). Bakteerinäytteen ottaminen ja toimittaminen Faagihoitoboratorioon nopeasti edellyttää hoito- ja päätöksentekoprosessien päivittämistä hoitavissa yksiköissä ja hoitohenkilöstön koulutusta uuden hoitomuodon käyttöön.

Bakteriofagien tuotanto ja laadunvalvonta

Bakteriofagia tuotetaan viljelemällä sitä faagille spesifissä isäntäbakteerissa. Viljelymenetelmiä on useita erilaisia, eikä niille ole toistaiseksi olemassa virallisia standardeja. Viljelytekniikoiden standardointi on haastavaa, koska jokaiselle isäntämikrobille tulee valita sopiva viljelytekniikka ja olosuhteet mikrobikohtaisesti ja käyttökohde huomioiden. Tuotantopro-

sessin vaiheet voidaan kuitenkin vakioida lääketuotannon kontrollointia varten ja laadunvalvonnan menetelmillä valmistajien laatu voidaan varmistaa.

Viljelytekniikoita on useita, ja Helsingin yliopiston Faagihoitolaboratoriossa on käytössä kolme päätyyppiä: nesteviljelmä, soft-agar viljelmä ja niin sanottu Gabrichievsky-tekniikka (nimetty Moskovalaisen Gabrichievsky-instituutin mukaan). Nesteviljelmässä faagit tuotetaan nestemäisissä elatusainepulloissa, jolloin viljelyn suoritus on suoraviivaista ja tuotto on suuri, mutta suuren elatusainemäärän puhdistaminen on hankalampaa ja faagikonsentraatio voi olla matala suuren tilavuuden vuoksi.

Soft-agar viljelyssä valmistetaan puoliikiinteä agarmassa. Tätä viljelyä käytetään joillekin mikrobeille, joiden viljely muilla tekniikoilla tuottaa huonoja saantoja. Menetelmän heikkous on pieni, vaikeasti kasvatettava mittakaava. Gabrichievsky-menetelmässä viljely tapahtuu erikseen valmistelluissa agar-pulloissa. Menetelmä tuottaa konsentroitua faagiliuosta, mutta valmistelutyö edellyttää enemmän resursseja kuin kaksi muuta menetelmää.

Käytetystä tekniikasta riippumatta valmis faagiliuos puhdistetaan bakteerimassasta sentrifugoinnilla ja suodatuksella. Mikäli isäntämikrobit tuottavat endo- tai eksotoksiineja, voidaan käyttää puhdistusmenetelmiä toksiinien poistamiseksi liuoksesta (Hietala ym. 2019). Valmistetut faagiliokset testataan laadunvalvonnan menetelmillä. PCR-analysillä faagin genomia voidaan verrata alkuperäiseen kirjaston faagiin lääkeaineen tunnistamiseksi ja muutosten seuranta varten. Faagikonsentraatio eli tiitteri määritetään kaikista lopputuotteista. Faagilioksen biologinen kuormitus (ns. bioburden) testataan kontaminointien mikrobien varalta ja tarvittaessa testataan endotoksiinikuormitus, mikäli isäntämikrobit tuottaa toksiineja.

Useita faageja käytettäessä jokainen faagi valmistetaan eri viljelmässä ja puhdistetut faagiliokset yhdistetään yhdeksi yhdistelmäliuokseksi, jota kutsutaan cocktailiksi. Cocktailissa tavoitteena on ekvivalentit määrät jokaista faagia, ja konsentraatiota voidaan säätää laimentamalla liuosta puskuriliuoksella. Cocktail myös steriilisuodatetaan lopulliseen

steriiliin astiaan, joka toimitetaan sairaala-apteekkiin lääkkeen formulointia varten.

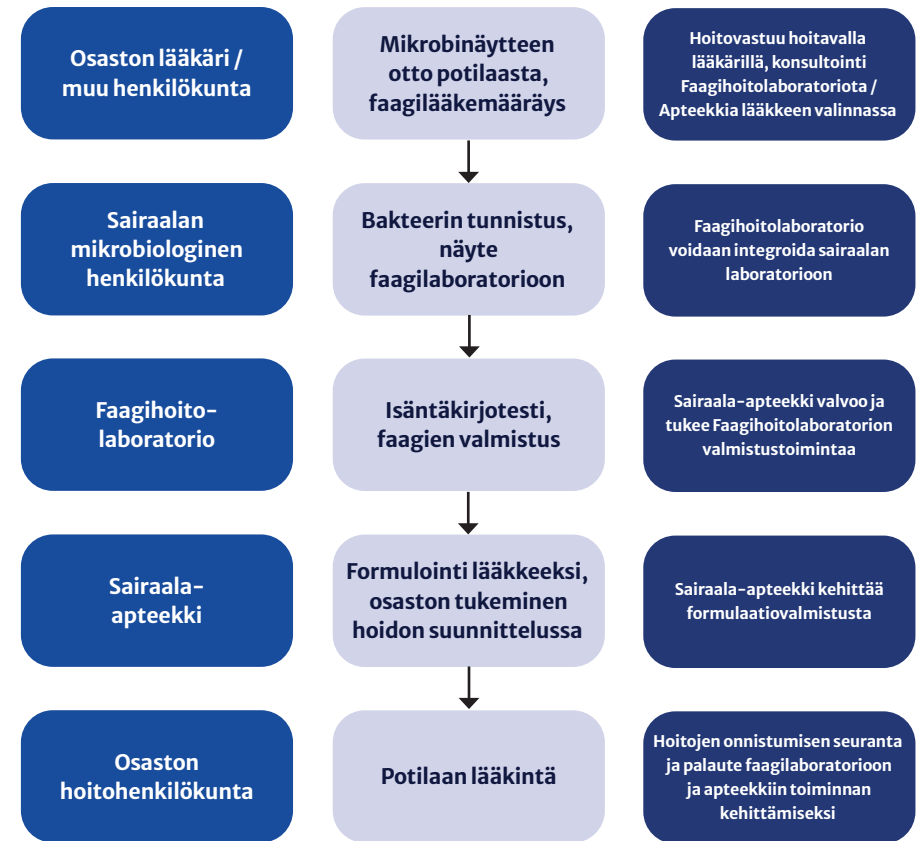
Vuonna 2016 Belgian sosiaali- ja terveysministeriö totesi, ettei faagihoidolle ole spesifisiä säännöksiä Euroopassa ja että faagivalmisteet ovat lääkkeellisiä valmisteita (Pirnay ym. 2018). Tässä vuonna 2018 julkaistussa artikkelissa esitettiin Kuningatar Astridin sotilassairalan ja Belgian kansanterveystieteen laitoksen laatima luonnos monografiasta lääkeaineina käytettäville bakteriofageille. Monografialuonnoksessa esitetään yleiset laatuvaatimukset faagien kirjastoon valmistukselle, faagien lääkeaineiksi valmistukselle ja näiden laadunvalvonnassa tarkastettaville spesifikaatioille. Esitetyt laadunhallintaratkaisut ovat täysin toteutettavissa laadunhallintaa käyttävissä yliopistosairaaloiden laboratorioissa.

Faageja voidaan tuottaa kohtuullisen pienessä tutkimuslaboratoriossa ex tempore -tarpeeseen, mutta laajempi tuotanto edellyttäisi tarkoituksenmukaisen tuotantolaboratorion perustamista (Kiljunen ja Tervonen 2020), koska jatkuva laajamittaisempi valmistus edellyttää riittävää laitekantaa ja henkilöstöä. Vaarallisten mikrobien käsittely ja viljely edellyttäisi lisäksi erillisiä bioturvaluokiteltuja tiloja, mutta nämä eivät ole kliinisen valmistuksen aloittamisen edellytys. Viljelytekniikat ovat hyvin tuottoisia ja materiaalikustannukset vähäisiä.

Ristikontaminaatio faagien välillä ei ole kriittinen riski, koska vieras faagi ei voi lisääntyä ilman sille sopivaa isäntämikrobia. On kuitenkin tärkeää huomioida, että vieraiden faagien läsnäolo voi hankaloittaa laadunvalvonnan tunnistuskokeita. Isäntäbakteerien ristikontaminaatio erien välillä voi aiheuttaa viljelyerän menetyksen, mutta yleensä isäntämikrobit tuhoaa vieraat mikrobit määränemistöllä viljelmästä. Vieras mikrobit puhdistetaan lopputuotteesta kuten isäntämikrobit, jolloin ristikontaminaation aiheuttama riski lopputuotteelle ei ole suuri.

Faagien valmistus lääkkeeksi

Sairaalassa bakteriofagihoidoja voidaan antaa yksittäisille potilaille näyttöä vailla olevana toimenpiteenä ex tempore -valmisteena Maailman Lääkäriliiton eettisten periaatteiden mukaisesti (Helsingin julistus 1964, kohta 37).



Kuva 5. Esimerkki faagihoidon prosessin kulusta kronologisesti ja eri vaiheista vastaavat tahot.

Faagien valmistus tulee erottaa formuloinnista erilliseen laboratorioon viljelyssä käytettävien mikrobimäärien vuoksi ja valmis faagicoctail toimitetaan yleensä puskuroituna liuoksena sairaala-apteekkiin formulointia varten. Erillinen muusta toiminnasta eristetty valmistustila ei ole välttämätön, sillä faagien ristikontaminaatiosta ei aiheudu merkittäviä riskejä muulle lääkevalmistukselle, vaikka faagit ovatkin biologisesti aktiivisia molekyylejä. Faagilta puuttuva kyky infektoida ihmisen omia soluja tekee niistä hyvin turvallisia käsittelyn kannalta, ja ihmisen normaalissa elinympäristössä faageja on kaikkialla ja niille altistutaan joka hetki (Huh ym. 2019). Normaalit lääkevalmistuksen puhdistuskontrollit riittävät poistamaan faagit pinnoilta puhdistiloissa.

Käytettävä lääkemuoto valitaan hoidettavan kohteen perusteella, ja tavoitteena on

mahdollisimman kattava kontakti faagien ja infektoivan mikrobien välillä, jolloin lääkehoidon suunnittelua tulee lähestyä fysikaalisesta ja hoitoteknisestä näkökulmasta. Kattava tiedonkulku hoitavan lääkärin, faagilaboratorion ja sairaala-apteekin välillä on edellytys, jotta annettava lääke palvelisi potilasta tehokkaasti. Yleinen tietoisuus terapiasta ja sen käytöstä on vielä vähäistä, ja moniin eteen tuleviin haasteisiin ei vielä löydy vastauksia kirjallisuudesta, mutta terapiaan sisältyvät riskit ovat niin vähäisiä, että kynnyks faagien käyttöön on matala.

Bakteriofagihoidolla on lääkkeiden hyvien tuotantotapojen (Good Manufacturing Practice, GMP) kannalta haastavia ominaisuuksia, jotka edellyttävät säännösten soveltamista ja uusien ohjeistusten suunnittelua. Faagihoidossa käytettävä lääkeaine on käytännössä

lähies aina uniikki, jolloin jokaiselle faagille ei voida laatia yksilöllisiä laatuvaatimuksia tai suorittaa valmistuksen validointia etenkin riittävän lyhyessä ajassa potilaan tarpeita ajatellen. Tuotantoprosessille voidaan kuitenkin asettaa yleisiä prosessikontrolleja ja lopputuote voidaan testata laadunvalvonnan menetelmillä. Lisäksi käytettävät raaka-aineet, tuotantotilat ja -laitteet sekä prosessin dokumentointi voidaan toteuttaa GMP:n perusvaatimusten mukaisesti aivan kuten muussakin lääkevalmistuksessa. Hoidollisesti merkittävä haaste on mitattavien laatuparametrien määrittely. Valmistetun faagiliuoksen konsentraatio voi vaihdella voimakkaasti, eikä hoidossa tarvittavaa minimikonsentraatiota voida spesifioida tarkasti tällä hetkellä. Faagikonsentraatio kuitenkin mitataan jokaisesta erästä ja viljellyt faagit tunnistetaan, jotta saadaan dataa tuotantotoiminnasta sen kehittämiseksi. Myös hoitojen onnistumisesta tulisi raportoida Faagihoidolaboratoriolle, jotta erilaisten mikrobikantojen ja faagien yhteensopivuudesta saadaan kerättyä tietoa faagikirjaston tietueisiin.

Hoidon kokonaisprosessi edellyttää useiden toimijoiden nopeaa yhteistyötä. Sairaala-apteekilla on edellytykset toimia lähes kaikissa vaiheissa prosessia (Kuva 5). Hoidon suunnitteluvaiheessa osastofarmaseutti tai sairaala-apteekin lääkevalmistus voivat tuoda eri lääkemuotojen osaamista hoitavan lääkärin tueksi. Faagien valmistus rinnastuu lääkeaineiden valmistukseen, ja toiminnan GMP:n mukaisuus tulee varmistaa ja valvoa sairaala-apteekin toimesta.

Yhteenveto ja pohdinta

Bakteriofagihoito tuo uusia työkaluja vaikeiden infektiosairauksien hoidon tueksi. Faagihoidoja voidaan käyttää turvallisesti muiden hoitojen rinnalla, sillä terapialla ei ole havaittu merkittäviä faageista johtuvia haittavaikutuksia (Skurnik ja Kiljunen 2016, Pirnay 2020, Sulakvelidze ym. 2001). Faagihoido ei koskaan tule täysin korvaamaan antibiootteja, mutta tutkimustiedon ja prosessien ymmärryksen lisääntyessä terapia tarjoaa uuden keinon vähentää antibioottien käyttöä. Tehohoitopäivä maksaa tuhansia euroja, jolloin infektioista johtuvien päivien vähentäminen jo yhdellä tai kahdella

päivällä säästää resursseja merkittävästi faagituotantoon käytettäviin kustannuksiin verrattaessa. Lisäksi potentiaali vaikeahoitoisten resistenttien bakteerien hävittämisessä voi tuoda merkittävää etua sairaalainfektioiden riskien hallinnan kannalta.

Yksittäinen kliiniseen tuotantoon keskitetty faagilaboratorio voisi palvella useita sairaala-apteekkeja faagivalmistuksen osalta, ja tällaisen yksikön perustamista on suunniteltu Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin sekä ja Helsingin yliopiston yhteishankkeena. Yksikkö suorittaisi isäntäkirjotetit potilaista otetuille näytteille ja valmistaisi faagit lääkeaineen valmistuksena GMP-käytäntöjä noudattaen ja suorittaisi tarvittavat laadunvalvontakokeet valmistetuille faagierille. Sairaala-apteekit formuloivat yksiköstä toimitetut faagiliuokset haluttuihin lääkemuotoihin potilaskäyttöön. HUS:ssa on suunniteltu faagihoidoihin investoimista, jotta toiminnan kustannustehokkuus ja hoidolliset hyödyt voidaan selvittää. Faagihoidoja on annetta yksittäisille potilaille, mutta systemaattisempi toiminta edellyttää infrastruktuuria ja prosessien rakentamista, jotta potilaat saavat lääkkeen mahdollisimman nopeasti tarpeen ilmetessä. Tutkittavaa on paljon varsinkin formulaatioiden kehittämisessä, sillä faagit ovat biologisia molekyylejä ja ryhmän sisällä on valtava kirjo erilaisia virusrakenteita. Morfologisesti erilaiset faagit käyttäytyvät eri tavoin eri apuaineiden kanssa ja erilaisissa formulaatioissa, ja formuloinnin haasteena on käytettävän faagin vaihtuminen lähes jokaisen potilaan kohdalla. Faageja tulee käsitellä rakenteellisina ryhminä tutkittaessa niiden kinetiikkaa ja yhteensopivuutta formulaatioissa, eikä yksittäiselle faagille voida tehdä kattavia kinetiikka- ja säilyvyyskokeita jokaisen potilaan kohdalla.

Bakteriofagihoidolla on merkittävä potentiaali tuoda uusia lääkehoitoja saataville suhteellisin pienillä tuotantokustannuksilla. Maailmalla tutkimus kiihtyy ja lupaavia tuloksia on raportoitu jo vuosikymmenien ajan (Channishvili 2012, Pirnay 2020). Suomessakin tulisi tehdä investointeja osaamisen kasvattamiseksi ja hoitoprosessien perustamiseksi. Formulaatioiden kehittäminen ja tutkimus on farmaseuttisen tutkimuksen ydinosaamista, ja nyt tarjolla olisi kokonainen uusien lääkeaineiden

kirjasto tutkittavaksi. Kansainvälinen yhteistyö muun muassa faagien vaihtamisessa kirjastojen välillä on tärkeää, ja Helsingin yliopiston bakteriofageja tutkiva ryhmä tekee tällaista yhteistyötä jatkuvasti. Toiminnan systemaattinen käynnistäminen ei vaadi valtavia investointeja rakennuksiin tai laitteisiin, vaan tarvitaan tahtotilaa päätöksentekijöiltä ja pysyvää henkilöstöä rakentamaan toimintaa tulevaisuutta varten.

Summary

Bacteriophage treatment

Jussi Tervonen*

M.Sc. (Pharm),
Hospital Pharmacy specialist,
Pharmacist-in-Charge
HUS Apteekki
jussi.tervonen@hus.fi

Saija Kiljunen

Researcher
HUS Diagnostic Center,
Division of Clinical Microbiology
PhD, Title of Docent
University of Helsinki
Faculty of Medicine,
Human Microbiome Research Program

*Correspondence

Bacteriophages are ubiquitous viruses specifically infecting bacterial cells and their effect on infectious diseases have been studied for over 100 years. Broad-spectrum antibiotics superseded bacteriophages almost completely, but the growing problem of resistance has forced scientists to discover “new” solutions on infectious diseases, and interest towards bacteriophage treatment has grown significantly in the 21st century. Treatment process begins with the screening of suitable bacteriophages from a phage collection against a patient microbial sample, and possible infecting phages are cultured in a specialized laboratory as drug compounds. The resulting phage solution is formulated in a hospital pharmacy according to the patient's needs, and several different formulations and technologies have been successfully studied.

During the treatment, bacteriophages only infect their specific host and replicate inside them in order to infect more bacteria, until the immune system can overcome the infection. A major advantage of the therapy is low adverse effects: bacteriophage cannot infect human

cells or normal flora bacteria, and there are no known negative interactions with e.g., simultaneous antibiotic treatment. Challenges to this therapy are collecting a sufficiently large phage collection, developing a sufficiently fast treatment process from sampling to drug delivery, and applying a pharmaceutical quality system in this environment. From a pharmaceutical manufacturing perspective, the drug compound is novel almost every time, and suitable time or resources for traditional pharmacokinetic studies are nearly impossible to allocate. This should not be an obstacle for the use of bacteriophage therapy, and new guidelines must be drafted in collaboration with researchers, hospital pharmacists and authorities, so new methods for reducing antibiotics usage can be introduced to routine clinical use.

Keywords: Bacteriophage, antibiotic resistance, bacterial infections, drug delivery systems, hospital drug compounding

Sidonnaisuudet

Ei sidonnaisuuksia.

Kiitokset

Kirjoittajat kiittävät yliopistonlehtori Marjo Huovista ohjauksesta artikkelin kirjoittamisessa.

Kirjallisuus

Abedon S: Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage* 5:e1020260. DOI: 10.1080/21597081.2015.1020260, 2015

Bruttin A, Brüßow H: Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2874–2878, 2005

Chang R, Wallin M, Lin Y: Phage therapy for respiratory infections. *Adv Drug Deliv Rev.* 133: 76–86, 2018

Chang R, Morales S, Okamoto Y, Chan H-K: Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections. *Transl Res.* 220: 153–166, 2020

Chanisvili N: Phage therapy-- history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res.* 83: 3–40, 2012

Dabrowska K: Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med Res Rev.* 39: 2000–2025, 2019

Danis-Wlodarczyk K, Dabrowska K, Abedon S. Phage Therapy: The Pharmacology of Antibacterial Viruses. *Kirjassa: Bacterial Viruses: Exploitation for Biocontrol and Therapeutics.* S 48–132. Toim. Coffey A ja Colin B. Caister Academic Press, Cork, 2020

D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris)* 165: 373–375, 1917

Dion M, Oechslin F, Moineau S: Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol.* 18: 125–138, 2020

Duan Y, Llorente C, Lang S ym.: Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature* 575: 505–511, 2019

Fabijan A, Lin R, Ho J ym.: Safety of bacteriophage therapy in severe Staphylococcus aureus infection. *Nat Microbiol.* 5: 465–472, 2020

Granowitz E, Brown R: Antibiotic adverse reactions and drug interactions. *Crit Care Clin.* 24: 421–442, 2008

Guo D, Chen J, Zhao X ym.: Genetic and chemical engineering of phages for controlling multidrug-resistant bacteria. *Antibiotics* 10: 202–216, 2021

Hankin E H. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann Inst Pasteur.* 10: 511–523, 1896

Helsingin julistus 1964 (viitattu 1.6.2021).

www.laakariliitto.fi/laakariliitto/etiikka/helsingin-julistus/

Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S: The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Front Microbiol.* 10: 1674, 2019

Ho Y, Tseng C, Wang L ym.: Application of Bacteriophage-containing Aerosol against Nosocomial Transmission of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit. *PLoS One.* 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0168380, 2016

Huh H, Wong S, Jean J, Slavcev R: Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 145: 4–17, 2019

Kiljunen S, Tervonen J, Skurnik M: Practical Issues in Setting Up and Maintaining a Collection of Therapeutic Bacteriophages: the Finnish Experience. Kirjassa: *Bacterial Viruses: Exploitation for Biocontrol and Therapeutics.* s. 645–662. Toim. Coffey A, Buttimer C, Caister Academic Press 2020, Poole, UK 2020

Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV: Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nat Rev Microbiol.* 17: 449–458, 2019

Lin D, Koskella B, Lin H: Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 8: 162–173, 2017

Lin R, Sacher J, Ceysens PJ, Zheng J ym.: Phage Biobank: Present Challenges and Future Perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 68: 221–230, 2021

Malik D, Sokolov I, Vinner G, ym.: Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci.* 249, 100–133, 2017

Manrique P, Dills M, Young M: The Human Gut Phage Community and Its Implications for Health and Disease. *Viruses* 9: 141, 2017

Merabishvili M, Monserez R, van Belleghem J, ym.: Stability of bacteriophages in burn wound care products. *PLoS ONE* 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0182121, 2017

Nasir A, Forterre P, Kim K ym.: The distribution and impact of viral lineages in domains of life. *Front. Microbiol.* 5: 194. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00194, 2014

Nilsson A: Phage therapy – constraints and possibilities, *Ups J Med Sci.* 119: 192–198, 2014

Payne R, Jansen V: Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin Pharmacokinet.* 42: 315–325, 2003

Patpatia S: Development of hydrogel based high-throughput host-range screening for therapeutic bacteriophages. *Publications of the*

University of Helsinki, Master's Thesis in International Master's Program in Translational Medicine, University of Helsinki 2020

Pinto A, Cerqueira M, Banpre-Lopes M, Pastrana L, Sillankorva S: Bacteriophages for chronic wound treatment: From traditional to novel delivery systems. *Viruses* 12: 235. DOI: 10.3390/v12020235, 2020.

Pirnay J-P, Verbeken G, Ceysens P-J ym.: The Magistral Phage: *Viruses.* 10: 64. DOI: 10.3390/v10020064, 2018

Pirnay J-P: Phage therapy in the year 2035. *Front Microbiol.* 11: 1171. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01171, 2020

Reyes A, Semenkovich N, Whiteson K ym.: Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut: *Nat Rev Microbiol.* 10: 607–617, 2012

Rhoads D, Wolcott R, Kuskowski M, Wolcott B, Ward L, Sulakvelidze A: Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care.* 2009; 18: 237–243.

Ryan E, Gorman S, Donnelly R, Gilmore B: Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol.* 63: 1253–1264, 2011

Santos SF, de Oliveira HL, Yamada ES ym.: The Gut and Parkinson's Disease – A Bidirectional Pathway. *Front Neurol.* 10: 574. DOI: 10.3389/fneur.2019.00574, 2019

Skurnik M, Kiljunen S: Bakteriofagihoidon mahdollisuudet. *Duodecim* 132: 712–719, 2016

Speck P, Smithyman A: Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiol Lett.* 363. DOI: 10.1093/femsle/fnv242, 2016

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr: Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 649–659, 2001

Sweere J, Belleghem J, Ishak H ym.: Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* 363: 6434. DOI: 10.1126/science.aat9691, 2019

Tetz G, Tetz V: Bacteriophages as New Human Viral Pathogens. *Microorganisms.* 6: 54. DOI: 10.3390/microorganisms6020054, 2018

Turner D, Kropinski A, Adriaenssens E: A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* 13. DOI: 10.3390/v13030506 506, 2021