

İnfeksiyonlara Antibiyotik Dışı Tedavi Yaklaşımları:

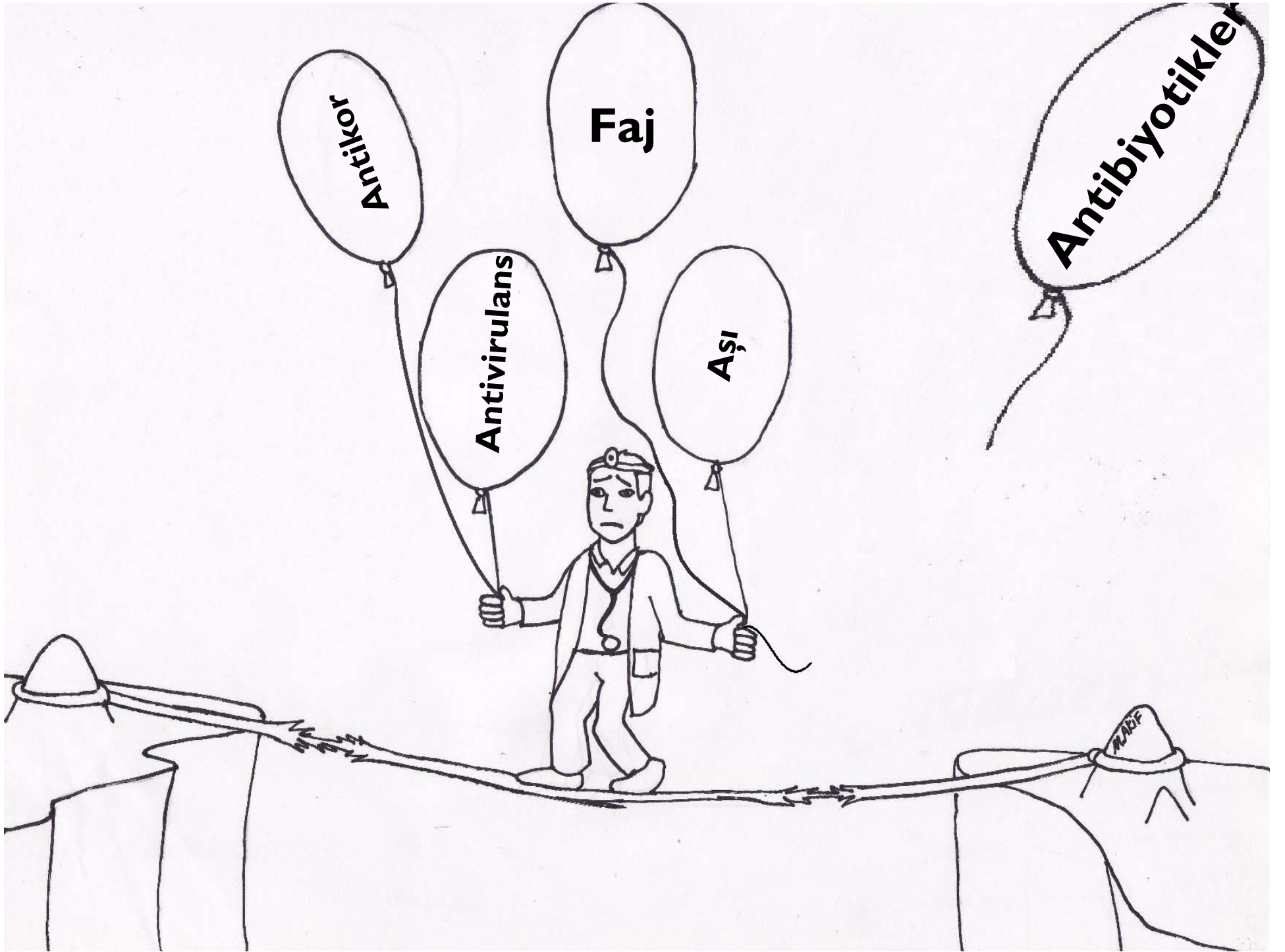
Bakteriyofaj ve Mikro-RNA Kullanımı

Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı







Açmazlar

- Panresistan bakteriyel etkenler
- İnfeksiyonlara yatkın nüfusta artış
- Salgınlar
- Biyoterörizm
- Resmi düzenlemelerin giderek sıkılaşması
- Yeni ilaçların geliştirilmesinde yavaşlama



Alternatif Arayışı

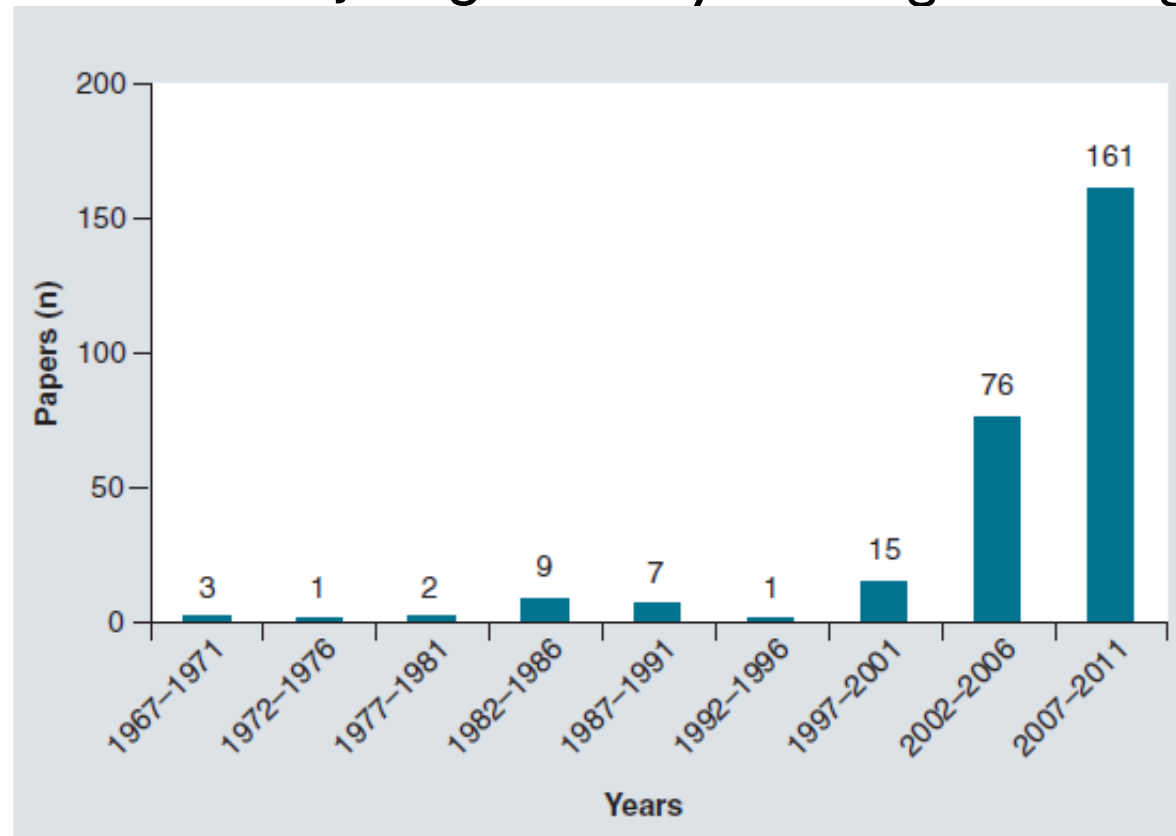
- Yeni tedavi araçları
 - Antivirulans stratejiler
 - Antimikrobik peptidler
 - Terapötik antikorlar
 - Aşılar
 - Antibiyotik güçlendiriceleri
 - Antibakteriyel biyomateriyaller
 - Terapötik oligonükleotidler
 -



Alternatif Arayışı

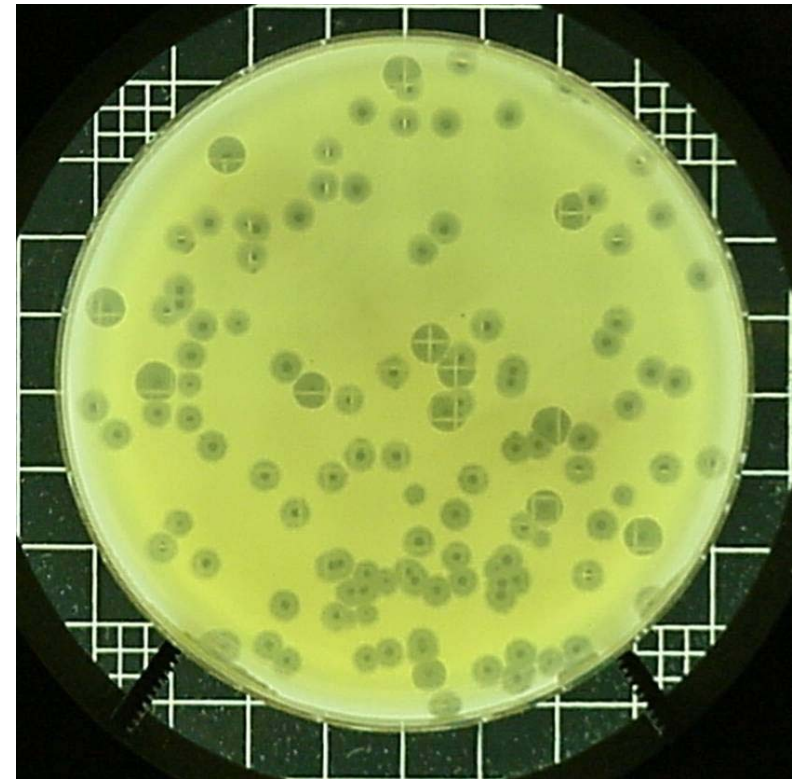
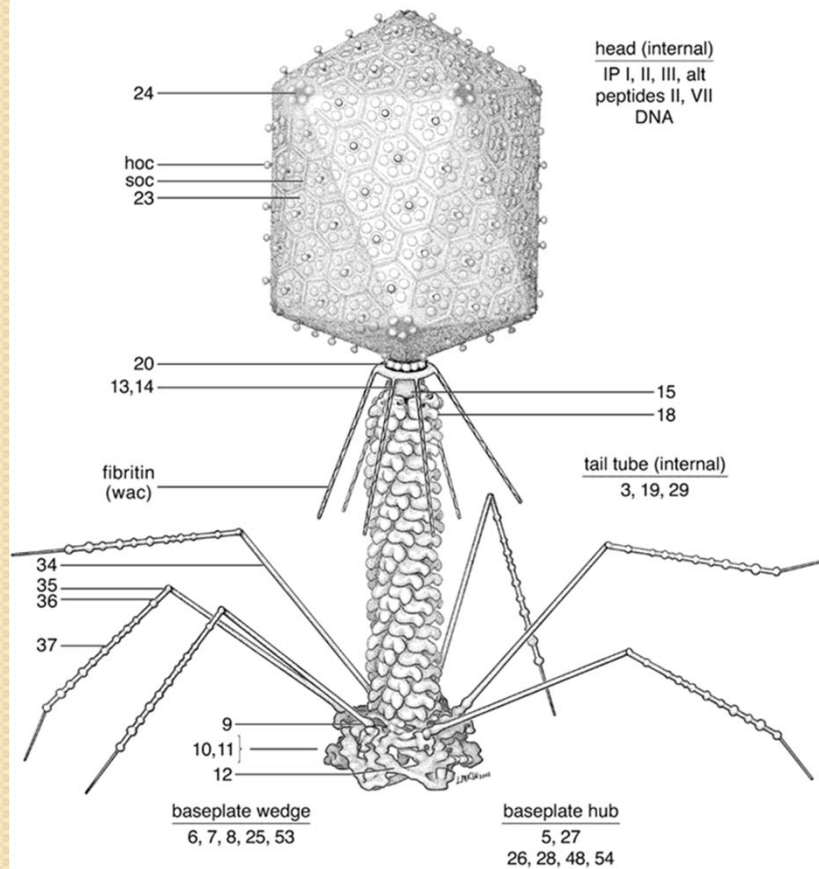
- Eski defterlerin karıştırılması ve bit pazarına nur yağması

➔ Fajların tedavi seçeneği olarak yeniden gündeme gelmesi



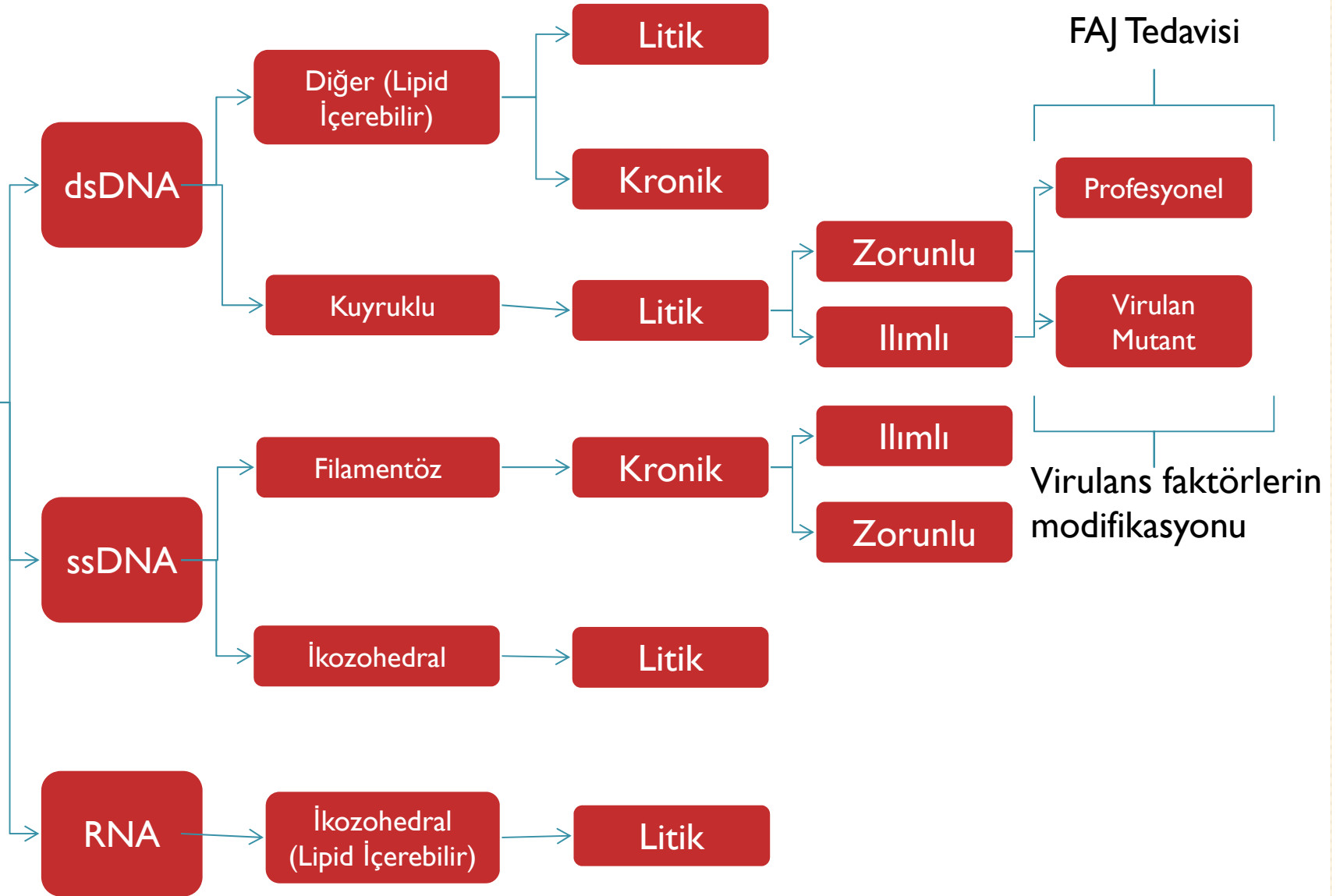
Fajlar

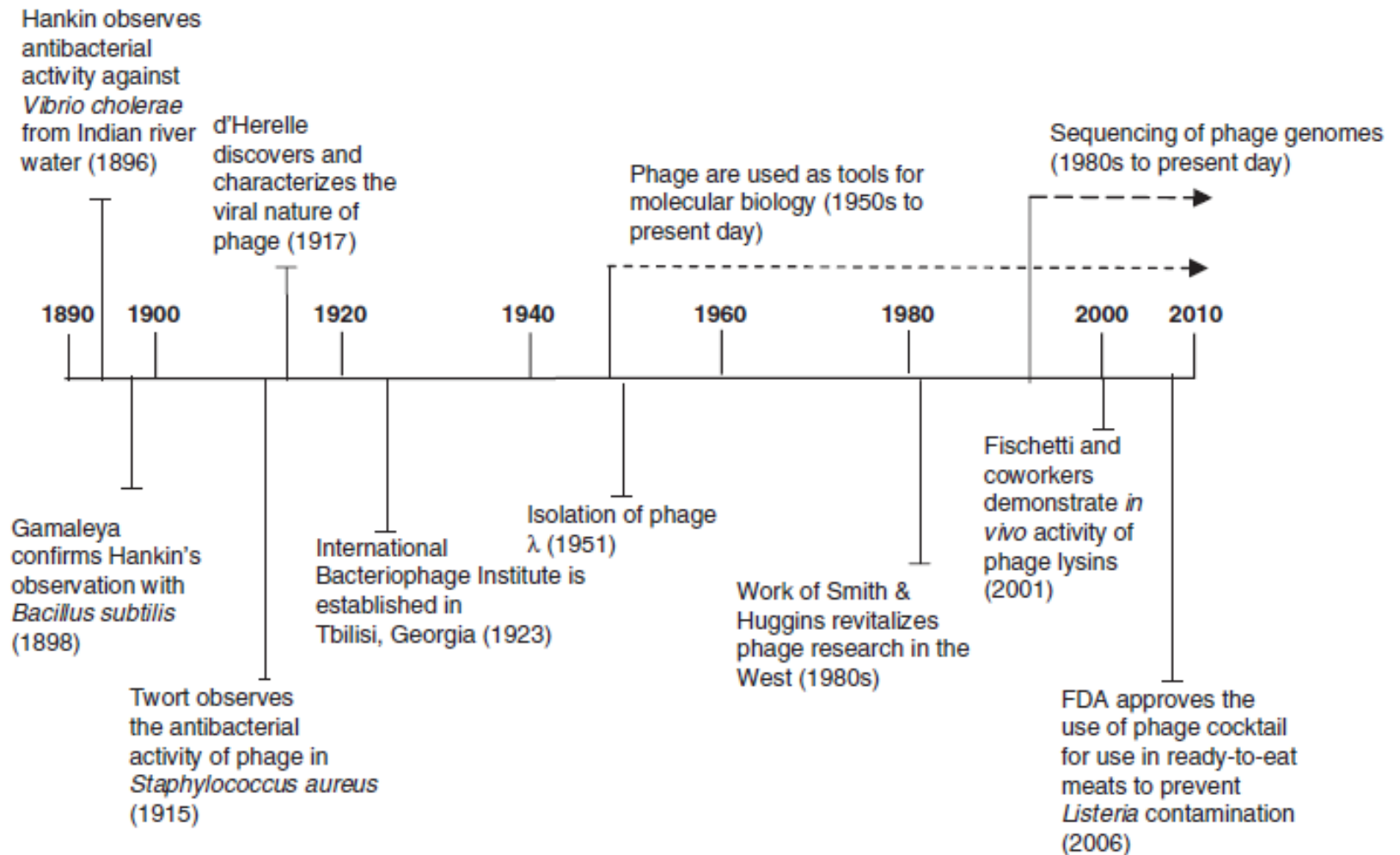
- Bakterilere karşı “canlı”, bir silah





Fajlar





Sarah O'Flaherty, R. Paul Ross, Aidan Coffey. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* [Volume 33, Issue 4](#), pages 801–819, July 2009



FAJLARIN KULLANIMI

- Bakterilerin tanımlanması
- Gen aktarımları
- Aşı aracıları
- Ekspresyon çalışmaları (phage display)
- Tedavi amaçlı
- Biyolojik kontrol amaçlı

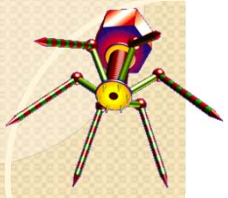


- Fajlar: Çok çeşitli yollardan uygulanm(ış)akta
- Tedavide daha çok:
 - Uzun süreli persistan süpüratif infeksiyonlar
 - GIS infeksiyonları
 - Septisemi
 - Abse
 - Solunum yollarının süpüratif infeksiyonları
 - Peritonit
 - Fronküloz....

,



- Litik fajlar bakterilerin üzerinde bulunan reseptörlere tutunur ve genetik materyelini bakteri hücrelerine injekte eder.
- Bakterinin transkripsiyon ve translasyon aktiviteleri fajın kontrolü altına girer. Yeni fajlar oluşur.
- Bakteriler holin-lizin sisteminin etkileri ile erir ve yeni oluşan fajlar serbest kalır; bakteriler ölür.



FAJ DNA'sı İnsan genomuna integre olabilir mi?



- İnsan genomuna integre olmuş faj DNA'sı henüz saptanmamıştır. Ancak evrim sırasında girmiş ve yitirilmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak insan vücudunda faj DNA'sının düzenli olarak bulunduğu ve bağışıklık işlevleri ya da tümör hücreleri ile etkileşime girdiği bildirilmiştir.
- Fajların ökaryotik hücre sistemlerine doğrudan girebilmeleri ve bu hücrelerde çoğalabilmeleri olası görünmemektedir.
- İnsan mitokondri DNA'sında fajla ilişkili polimeraz dizileri saptanmıştır.
- Rickettsia → Mitokondri →



- Fajlar doğal bakteri popülasyonlarının kontrolünde büyük rol oynar.
- ÖRNEK:

KOLERA SALGINLARI VE FAJ
YOĞUNLUKLARI ARASINDAKİ TERS
ORANTI



- Patent yasalarına göre, patent alabilmek için ilgili fajların daha önce izole edilmemiş ya da üretilmemiş olmaları gerekmektedir.
- Oysa literatürde fajların insanda bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kullanılabileceğine ilişkin çok sayıda yayın bulunmakta.
- Genetik açıdan değişikliğe uğratılmış fajların tedavi amaçlı kullanımı ise güvenlikle ilgili pekçok yeni soru ve kaygıyı doğurmakta.



Antibiyotik	Faj	
Bazıları bakteriostatik $\rightarrow$ R gelişimi	Bakterisid etkili	Fajın virulansı ve özgüllüğü değişebilir
Toksik ve istenmeyen etkiler	Hedef bakteriler dışında non-toksik – Flora üzerinde minimal etki	Olen bakterilerden salınan endotoksinler en büyük sorunlardan biri
Doz tekrarı gerekli	Kendi kendine çoğalabildiği için öldürücü etkileri hedef bakteri olduğu sürece devam edebilir	Mammliler tarafından elimine edildikleri için faj dozlarının da tekrarlanması gerekiyor
Birden çok bakteriye etkili	Konak özgüllüğü dar	Ampiriki tedavi seçeneği yok Tedaviden önce etkenin mutlaka belirlenmesi gerekir
Biyo film varlığı etkisini engelliyor	Bazı biyo filmleri aşabildiği ya da biyo film oluşumunu engelledikleri gösterilmiş	Biyofilmler fajları hapsedebilir

Antibiyotik Öncesi Dönem



- D'Herrele
- Eliava
- Delbrück
- İsviçre'de 1960'lara kadar Saphal firması faj içeren preparatlar üretiyor (Coliphagine, Intestiphagine, Pyophagine...)



- Polonyo Bilim Akademisi
İmmunoloji ve Deneysel Tıp Enstitüsü

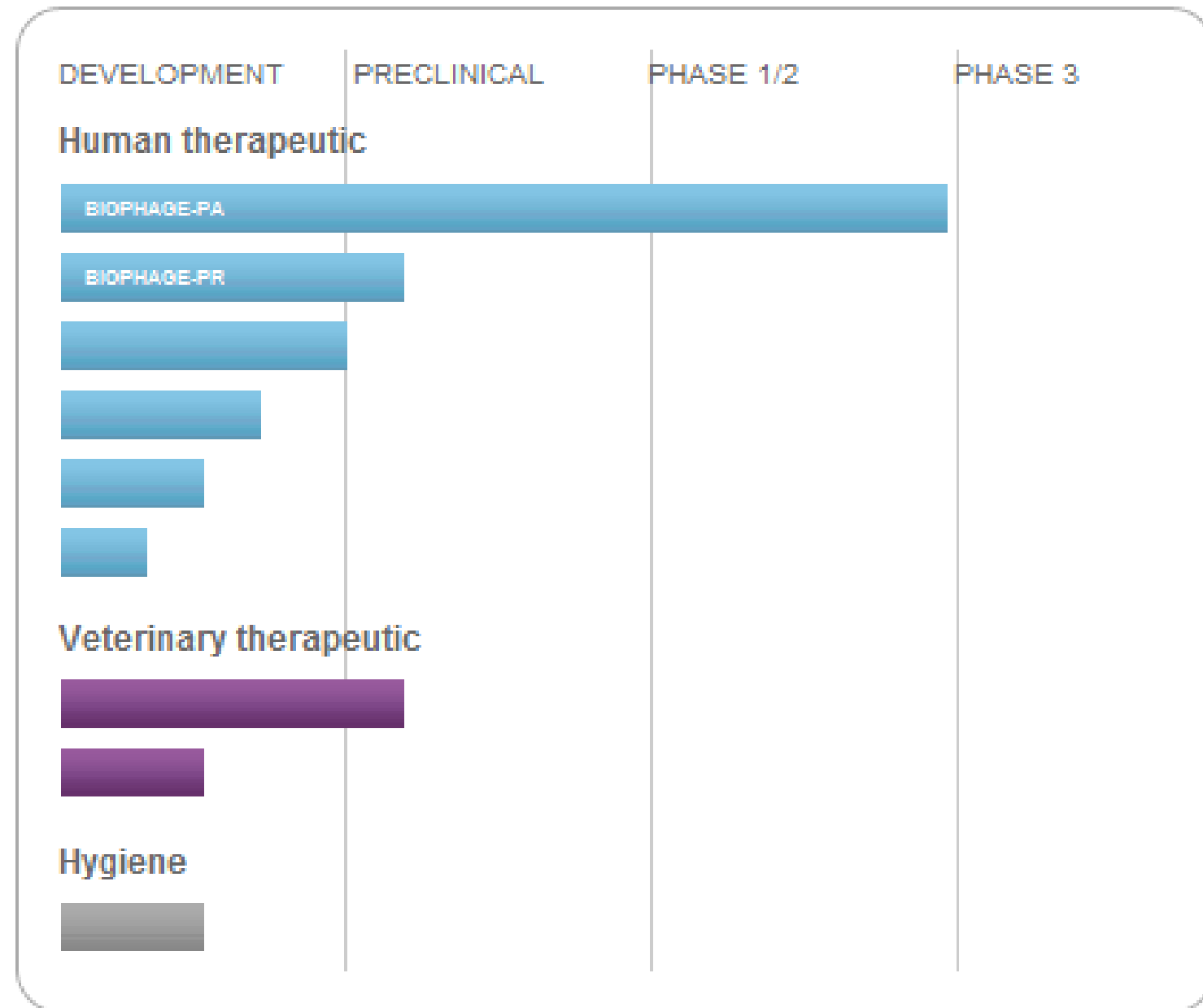
1981-1986 → 550 hastalık seriler ; %92 başarı

- 259 faj denenmiş
- Daha sonra 1600 hastaya ait sonuçlar
- 1998'den bu yana daha çok faj immunolojisi ağırlıklı



- ELIAVA ENSTİTÜSÜ
- Eski Sovyetler ve Gürcistan'da halen pediyatrik, yanık ve yara infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor
- Hafta da 2 kez 2 ton faj üretimi
- 700 çalışan
- 2000'de PhagoBioDerm → Faj içeren biodegradable polimerik kompozit → 96 hastanın %70'inde tamamen iyileşme

AmpliPhi's product development pathway





☒ **ListShield™**

Targets *Listeria monocytogenes* contamination in foods and food processing facilities.

☒ **EcoShield™**

Targets *Escherichia coli* O157:H7 contamination in foods and food processing facilities.

☒ **SalmoShield™**

Targets contamination with selected, highly pathogenic *Salmonella*-serotypes in foods and food processing facilities. This product is in development.

Probiotic/Nutraceutical Products

☒ **ShigActive™**

Targets *Shigella* species in the gastrointestinal tract. This product is in development.

Animal Health Products

☒ **INT-401™**

Targets *Clostridium perfringens* in live poultry. This product has been licensed out.

☒ **PLSV-1™**

Salmonella bacterin. Provides protection of poultry against colonization with specific, highly pathogenic *Salmonella* serotypes. This product has been licensed out.



- Nazal MRSA dekolonizasyonu → Jel
 - *C. Difficile*
 - Enterokoklar
-
- NESTLE
ORT → T4 faji

**SAY
GOODBYE
TO
CANDIDA**



**100% NATURAL
FAST ACTING
Proven Solution
OR Your Money
Back!**





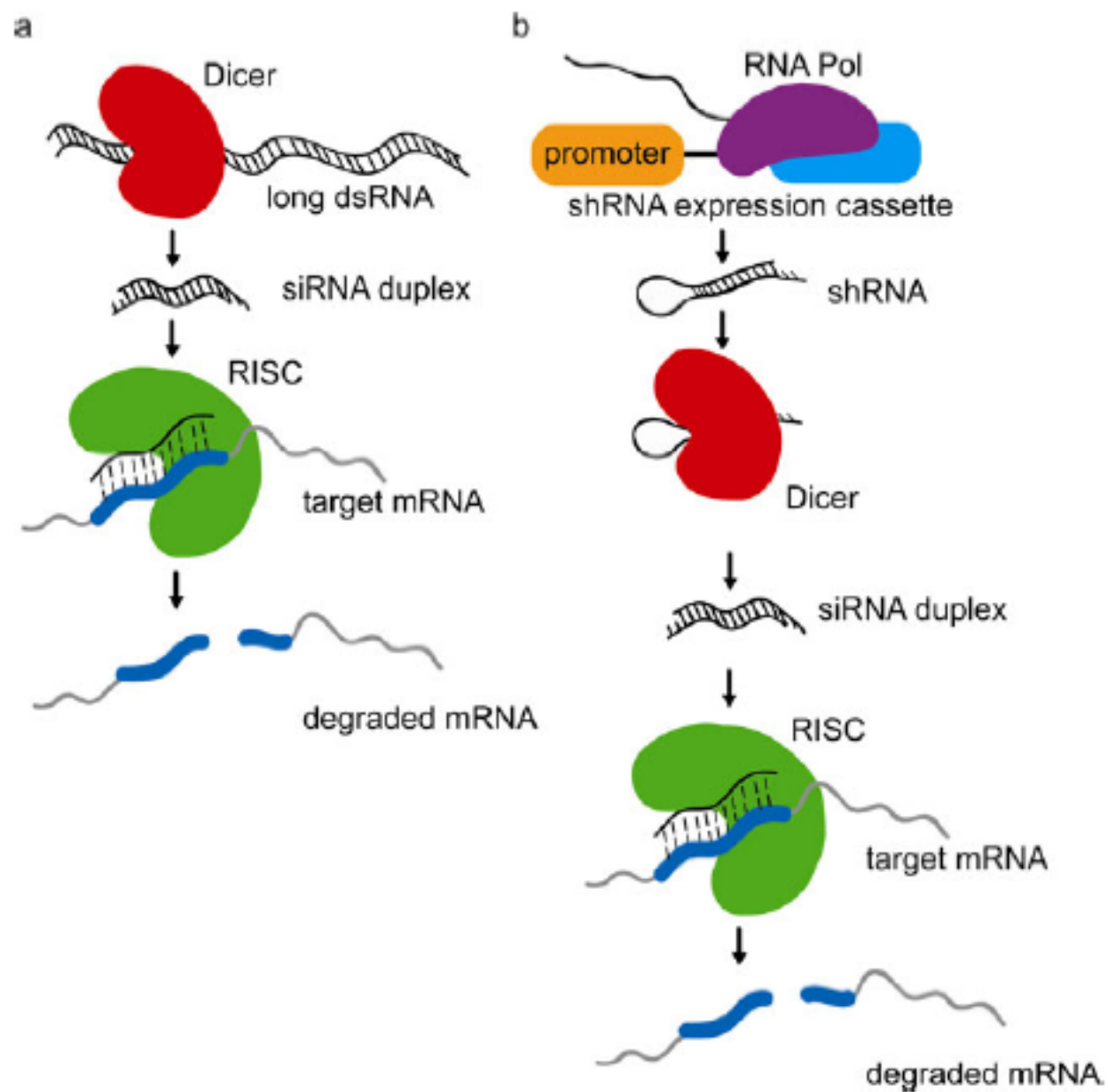
GÜNÜMÜZDE:

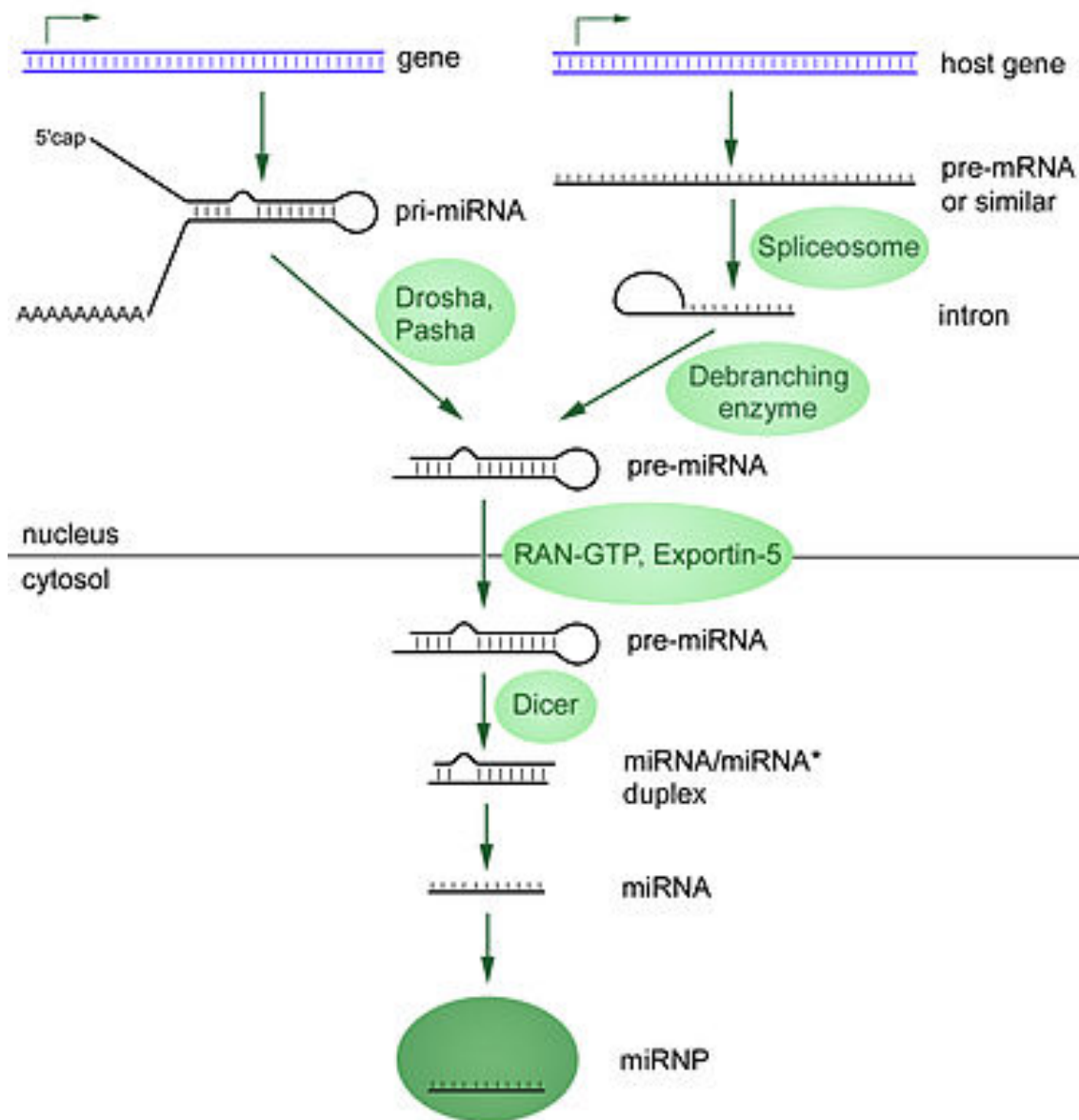
- Modifiye fajlar: Replike olmayan fajlar
vs.
- “Lysine deficient phages”

RNA İNTERFERANSI



- RNA interferransı (RNAi), dışardan gelen virus ya da transpoze olabilen elemanlara karşı bir doğal savunma mekanizması







- Hedef gene özgüllük
- Doğru hücreye ya da dokuya ulaştırma
- RNAi aktivitesinin süresi
- RNAi dozunun tekrar uygulanabilirliği
- Hedef m-RNA'nın stabilitesi



- İlk uygulamalar sırasında verilen siRNA'ların viral yükü azaltmasının hedef genin sustrulmasının yanı sıra bağışık yanıtı indüklemesiyle de ilişkili olduğunu gösterdi → Sentetik siRNA'ların yapısı değiştirildi ve proinflatuar etkileri engellendi → İmmunomodölatör etkilerden yararlanma seçeneği

• RNAi ile hedef genin susturulması



- Hedef hücreye 21–22 nt siRNA'ların transfeksiyonu
- Diğer bir seçenek 25–27 nt uzunluğunda duplekslerin Dicer tarafından siRNA'lara dönüştürülmek üzere sokulması → 'Dicer-ready siRNAs'
- Bazı durumlarda Dicer-ready siRNA'ların potensi > siRNA
- Her ikisi de ticari transfeksiyon reaktifleri ile etkin bir biçimde hücrelere sokulabilmekte
- Ancak *in vivo* uygulamalar için alternatif paketleme yöntemleri gerekebilmekte



siRNA tasarımı

- Modifiye bazlar ya da şekerler
- RNA'nın uzunluğu
- 5' ve 3' uçlarının özellikleri
- T7 polimeraz ile *in vitro siRNA sentezi sırasında 5' trifosfatlar oluşmakta, bu da IFN yanıtı uyartıyor* synthesis of siRNAs using T7 polymerase creates 5'
- Düz (blunt-ended) siRNA'lar sitoplazmadaki retinoic acid inducible gene I protein (RIGI);ve IFN yapımını uyartabiliyor
- Kimyasal yolla sentezlenenlerde 5' trifosfatlar yok ve bu tarz yanıtlar uyarmıyorlar

RNAi tetikleyicilerinin edkprresyon sistemleri



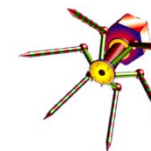
shRNA ve yapay miRNA lar

- **Plasmid** ya da vektörlerle (bakteriyel ya da viral) ekspresyonun sağlanması
- Pre-miRNA ya da pre-miRNA'yı taklit edecek şekilde transkripte oluyorlar ve doğal ile aynı işlemlerden geçiriliyorlar

Methods for the delivery of RNAi triggers to cells and tissues



Species/ formulation	Packaging capacity	Applications and considerations
Viral vector		
Adenovirus	Up to ~35 kb, usually <10 kb	dsDNA vector with large packaging capacity, transient expression, highly immunogenic
Adeno-associated virus (AAV)	~4.5 kb	ssDNA vector, small packaging capacity, mildly immunogenic, lasting expression in nondividing cells, capsid pseudotyping/engineering facilitates specific cell-targeting
Lentivirus	Up to 13.5 kb (larger inserts will decrease titre)	RNA vector, integration competent and incompetent forms available, less immunogenic than adenovirus or AAV, envelope pseudotyping facilitates cell targeting, clinical production more difficult than for adenovirus or AAV
Herpes simplex virus	150 kb	DNA vector, episomal, lasting expression, immunogenic
Bacterial vector species[‡]		
<i>Escherichia coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> [§]		Delivery of short hairpin RNA or small interfering RNA to gut tissue
Non-viral formulations		
Nanoparticle		Self-assembling, may target specific receptors, requires technical expertise to prepare
Stable nucleic acid lipid particle (SNALP)		Stable for systemic delivery, broad cell-type delivery
Aptamer		Targeting of specific receptors, requires sophisticated screening to develop
Cholesterol		Stable for systemic delivery, broad cell-type delivery



Clinical trials for RNAi therapy*

Clinical setting	Drug	Indication(s)	Target(s)	Sponsor	Status
Antiviral	SPC3649	Hepatitis C virus	miR-122	Santaris Pharm	Active, Phase II
	pHIV7-shI-TAR-CCR5RZ	HIV	HIV Tat protein, HIV TAR RNA, human CCR5	City of Hope Medical Center/Benitec	Active, Phase 0
	ALN-RSV01	RSV in volunteers	RSV nucleocapsid	Alnylam Pharm.	Completed, Phase II
	ALN-RSV01	RSV in lung transplant patients	RSV nucleocapsid	Alnylam Pharm.	Completed, Phase I
	ALN-RSV01	RSV in lung transplant patients	RSV nucleocapsid	Alnylam Pharm.	Active, Phase II

