

Fajların Antimikrobiyal Tedavide Kullanımı

Applications of Phages in Antimicrobial Therapy

^{1b} Ece TÜRKMEN^a, ^{1b} Sevda ŞENEL^a

^aHacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET Antimikrobiyal direnç [Antimicrobial resistance (AMR)], artan morbidite, mortalite ve tedavi maliyetleriyle ilişkili ekonomik ve sosyal maliyetler nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. AMR artışı, bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotik tedavisinden tarihsel olarak önce gelen bakteriyofaj tedavisine olan ilginin yeniden artmasına neden olmuştur. Bakteriyofajlar, Doğu Avrupa’da çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde 10’larca yıldır başarıyla kullanılmakta olup, bugüne kadar bakteriyofajların yol açtığı herhangi bir ciddi advers etki bildirilmemiştir. Bakteriyofajlar, DNA ya da RNA içeren, insan veya hayvan hücreleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan bakterileri enfekte ve lize edebilen virüslere sahiptir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, tek başlarına veya antibiyotiklerle kombine hâlde kullanılmaktadır. Ancak kullanılan fajların uluslararası kabul edilmiş resmi kılavuzlarda belirtilen gerekliliklere uygun kalite, etkinlik ve güvenlik çalışmasının tamamlanmaması nedeniyle bazı Doğu Avrupa ülkeleri dışında, rutin klinik uygulamaları henüz onaylı değildir. Bakteriyofaj çözümlerinin stabilitesiyle ilgili karşılaşılan sorunları çözmek amacıyla, fajlar dondurarak kurutma (liyofilizasyon) veya püskürterek kurutma yöntemleriyle toz formlarda hazırlanmış, ayrıca lipozomlar, polimerik mikro ve nanopartiküller gibi farklı taşıyıcı sistemler içine enkapsüle edilmiştir. Bu derlemede, faj tedavisi ve güncel durumu özetlenecek, formülasyon ve standardizasyon yönünde neler gerektiği tartışılacaktır.

ABSTRACT Antimicrobial resistance (AMR) is a significant public health concern due to the economic and social costs associated with increased morbidity, mortality, and treatment costs. The rise of AMR has resulted in an increased interest in bacteriophage therapy, which historically preceded antibiotic treatment against bacterial infections. To date, there have been no reports of serious adverse effects caused by bacteriophages, and they have been used successfully for decades to treat human diseases in Eastern Europe. Bacteriophages (phages) are viruses that contain DNA or RNA that can infect and lyse bacteria without causing any adverse effects on human or animal cells. They are used alone or in combination with antibiotics in the treatment of bacterial infections. However due to the lack of quality, efficacy and safety studies based international regulatory guidelines, phages are not officially approved for clinical applications other than some East European countries. Hence, in order to meet the regulatory requirements, studies demonstrating quality and safety of the phages are needed to be completed. To enhance their stability, phages are freeze-dried (lyophilized) or spray dried to get dry forms or they are encapsulated into delivery systems such as polymeric micro or nanoparticles, and liposomes. In this review, the current bacteriophage therapy will be reviewed and the needs in regard to standardization and formulation of bacteriophage therapy will be discussed.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal direnç; bakteriyofaj tedavisi; bakteriyel enfeksiyon; formülasyon

Keywords: Antimicrobial resistance; bacteriophage therapy; bacterial infection; formulation

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporları, antimikrobiyal direncin dünyanın her bölgesinde artmakta olduğunu ve insan sağlığı, gıda üretimi ve sürdürülebilir kalkınma için uzun vadeli bir tehdit oluşturduğunu göstermektedir.^{1,2} Bu tehdit ile mücadelede ulusal düzeyde antimikrobiyal direnç [antimicrobial resistance (AMR)] surveyansı çalışmaları büyük önem arz etmektedir. Ülkemizde 2011 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu koordinasyonunda Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi kurulmuştur. Bu sistemin hedefi,

ülkemizin kıyaslanabilir ve güvenilir AMR verilerinin toplanmasıdır. Bu elde edilen veriler yerel, bölgesel ve ulusal düzeyde antimikrobiyallerin akılcı kullanımı, AMR’nin önlenmesi ve kontrolü için gerekli programların geliştirilmesi ve yürütülmesi amacıyla kullanılmaktadır.³ Uzmanlar, AMR verilerine göre hastane kaynaklı antimikrobiyal ajanların biyosidal etkisinden kaçabilen 6 patojene [*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* (ESKAPE) türleri] karşı

Correspondence: Sevda ŞENEL

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: sselnel@hacettepe.edu.tr



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 04 Feb 2020 **Received in revised form:** 13 Mar 2020 **Accepted:** 18 Mar 2020 **Available online:** 29 Dec 2020

2630-5569 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

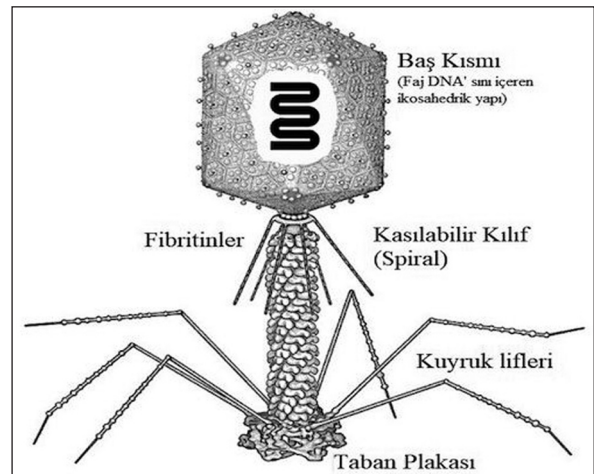
artan ilaç direnci senaryolarına dayanarak, 2050 yılına kadar AMR'nin yükünün yılda 10 milyon kişinin ölümüne ve 100 trilyon dolarlık ekonomik bir maliyete yükseleceğini tahmin etmektedir.² DSÖ tarafından 2018 yılında yayınlanan Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı raporuna göre Türkiye'de izole edilen en yaygın patojen %24 oranında *Escherichia coli* olarak belirlenmiştir.⁴ Dünya çapında antibiyotiklere karşı görülen çoklu dirençli olan bakterilerin hızla yükselişi, bakteriyel enfeksiyon tedavisi için antibiyotikler dışında farklı tedavi yöntemleri geliştirilmesi düşüncesi üzerine odaklanılmasına neden olmuştur.⁵ Bakteriyel enfeksiyonlar için antibiyotiklerin kombine hâlde veya etkinliğini artıran adjuvantlarla birlikte kullanımı, fekal mikrobiyota transplantasyonu, antimikrobiyal peptidler, nanopartiküller ve fotodinamik ışık tedavisi alternatif tedavi olarak bildirilmektedir. Diğer bir alternatif ise yüzyıldır var olan fajların kullanımınıdır.^{6,7}

Antibiyotiklere alternatif olarak kullanılan faj tedavisi üzerine çok sayıda klinik çalışmalar yapılmış olup, son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, fajlar herhangi bir formülasyon olmadan basit faj süspansiyonları şeklinde kullanılmış ve faj stabilitesi, ikincil endişe edilecek konu olmuştur.^{8,9} Bununla birlikte, fajların çözelti içinde stabilitelelerinin düşük olması nedeniyle proses ve saklama sırasında faj titrelerinde önemli bir düşüş meydana gelmektedir.⁸ Faj stabilitesini artırmak için liyofilize edilmiş veya püskürtürek kurutulmuş toz formülasyonları, mikropartiküller, emülsiyonlar, tabletler gibi çeşitli formülasyon stratejiler geliştirilmiştir.¹⁰⁻¹⁵ Bu çalışmalarda uygulanan faj konsantrasyonu (doz), hedef bakterileri öldürme yeteneği, bakteriyel üremeyi durdurması ve enfeksiyonu yok etmesi özellikleri incelenmiştir.⁸ Ancak faj tedavisi için henüz standartlaştırılmış resmî düzenlemelerin olmaması aşılması gereken bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır.¹⁶

Bu derlemede ilk olarak faj tedavisi ve tarihsel sürecinden bahsedilip, sonrasında klinikteki faj uygulamaları üstünlükleri ve kısıtlamaları vurgulanarak özetlenecek ve faj tedavisinin geleceği için neler gerektiği tartışılacaktır.

BAKTERİYOFAJ NEDİR?

Bakterileri enfekte eden virüsler, bakteriyofaj veya faj olarak adlandırılmaktadır.¹⁷ Dünyada, tahmini olarak mevcut 10^{31} virüsün içerisinde çoğunluğu fajların oluşturduğu bilinmektedir.¹⁷ Gezegenimizdeki en bol bulunan varlıklar olan fajlar; deniz suyu, tatlı su, toprak, hastane ve benzeri yerlerde, insan etkisi altındaki alanlar gibi yapay yerlerde, sindirim sistemi, vajina ve deri gibi insan vücudunda yani enfekte edecek bir konağın olduğu hemen hemen her yerde bulunmaktadır.^{17,18} Fajlar etkilerini sadece prokaryot yapıdaki hücrelerde göstermekte olup, ökaryot yapıdaki hücreleri etkilememektedir. Bu nedenle hedef bakteriyel konakçıları dışındaki tüm organizmalar için zararsızlardır.¹⁹ Bu hedef bakteriler, faj partiküllerinin yapısı sayesinde tanınabilmektedir. Faj partikülleri, 3 boyutlu yapıdadır. Bu 3 boyutlu yapı, ikosahedral kapsid ile DNA'sını koruyan bir baş kısmından, bir spiral kasılabilir kılıftan, enfeksiyon için optimal koşulları tanıyan sensörler olan fibrinlerden, taban plakası ve buna bağlı bakteriyel membran yüzeyindeki spesifik molekülleri tanıtmaktan sorumlu reseptör bağlayıcı proteinleri içeren 6 kuyruk lifinden oluşmaktadır (Şekil 1).¹⁹ Fajlar, genetik materyalin türüne (DNA veya RNA), morfolojilerine, enfekte etme siklusuna veya konakçı aralığına göre sınıflandırılabilir.¹⁷ Fajlar bakterileri, litik ve lizojenik olmak üzere 2 temel enfeksiyon siklusu ile enfekte etmektedir. Litik siklusta, ilk olarak fajın konak üzerinde yer alan reseptörleri tanıyarak bağlanması gerçekleşmektedir.²⁰



ŞEKİL 1: Faj partikülünün yapısı. (Submission ID: 981945)¹⁹

Bağlanmanın ardından faj, viriyon çıktısı üreterek bakterinin ölümünü sağlamaktadır. Bunun için konakçı hücrenin replikasyon sisteminden yararlanmakta ve proteinleri, viral bileşenleri oluştuğunda hücre lizise uğramaktadır. Buna karşılık lizojenik siklusa ise faj, kendi genetik materyalini konak hücrenin genomuna entegre etmektedir. Replikasyon döngüsünün sonunda yeni viriyonlar elde edilmez, ancak tempere fajlar şeklinde faj genetik materyali olan bakteriyel hücreler oluşturulmaktadır.¹⁸ Lizojenik fajlar genlerini konakçı hücrenin genomuna doğrudan aktardıkları için tedavi kullanımında risk oluşturacaklarından dolayı tedavide sadece litik fajlar kullanılmaktadır.^{5,21} Sonuç olarak fajlar, spesifik oldukları bakterilerin üremesini kontrol etmektedir. Ancak fajlar arasındaki değişkenlik nedeniyle her bir terapötik uygulamada, bakterilerin üremesinin kontrolü için hangi fajın uygun olacağını belirlemek gerekmektedir.^{18,19}

Fajların, veteriner ve beşerî alanda patojenik bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanımının yanı sıra gıda ve tarım alanlarında da çeşitli uygulamaları bulunmaktadır.²¹⁻²⁷ Gıda endüstrisinde, patojenlere karşı fajlar ile mücadele kavramı üretimin her aşamasında, tüm besin zinciri boyunca ele alınmaktadır. Hayvancılıkta, ürünlerin dekontaminasyonu, ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu, bozulabilir gıdaların korunmasında kullanılabilir. Bununla ilgili olarak, Ağustos 2006 tarihinde, yemeye hazır et ve kümes hayvanı ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'e karşı ayrı ayrı saflaştırılmış 6 fajdan (LMP-102) oluşan bir faj preparatının Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu tarafından onaylanması fajların gıda alanında kullanımı için önemli bir gelişmedir.²⁶

BAKTERİYOFAJ TEDAVİSİ

İngiliz bir bakteriyolog olan Ernest Hankin, 1896 yılında Hindistan'daki Ganj ve Jumna nehirlerinin sularında gözlemlediği belirgin antibakteriyel aktivitenin (*Vibrio cholerae*'ye karşı) varlığını bildirmiş ve kolera salgınlığının yayılmasının önüne geçen şeyin tanımlanamayan bir madde olduğunu bildirmiştir.²⁸ Yaklaşık 20 yıl sonra İngiliz bakteriyolog Frederick Twort 1915 yılında bakteri kültürlerinin filtratında bir "bakteriyolitik ajan" olduğunu göster-

miş, Felix d'Herelle ise 1917 yılında insan dışkılarından "bakteriyofaj" olarak adlandırdığı ajanları izole etmiş ve laboratuvar koşullarında bakterileri öldürmek için kullanmıştır.²⁸ Bu tarihten sonra pek çok hastanede dizanteri, kolera vb. hastalıklarının tedavisinde faj tedavisi denenmiş ve hastalarda iyileşmenin olduğu ve ölüm oranlarının düştüğü gözlenmiştir. 1923 yılında d'Herelle, George Eliava ile birlikte bugün hâlen Gürcistan'da hizmet veren Eliava Faj Tedavisi Enstitüsünü kurmuştur. Eliava Enstitüsünün ürettiği fajlar yüz binlerce insanın tedavisinde kullanılmakta olup, haftada yaklaşık 2 ton faj üretmektedir.^{7,25} Enstitü tarafından üretilen ve pek çok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde rutinde kullanılan Pyo bacteriophage, Intesti bacteriophage, Staphylococcal bacteriophage, SES bacteriophage, FERSISI bacteriophage ve ENKO bacteriophage olmak üzere 6 farklı faj kokteyli ve 100'den fazla faj kütüphanesi bulunmaktadır.²⁹ Penisilinin, 1928 yılında keşfi ve ilk kez 2. Dünya Savaşı sırasında kullanılmasının ardından rağbet göremeyen faj tedavisi, hâlihazırda Gürcistan ve Polonya'daki 2 faj tedavi merkezinde uygulanmaktadır.³⁰

Hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı etkili olması ve etki mekanizmalarının antibiyotiklerden farklı olması nedeniyle fajlar, çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilere karşı aktivitelerini sürdürebilmektedir.^{31,32} Fajların en ilgi çekici özelliği, tek bir türe veya bazı durumlarda bir tür içindeki tek bir suşa sınırlı bir etkiye sahip olmaları, yani etkilerinin spesifik olmasıdır. Ancak bu özelliğinden dolayı faj tedavisinden önce hastalığa neden olan bakteri/bakterilerin belirlenmesi çok önemlidir. Genellikle fajların kokteyl hâlinde uygulanması tedavinin başarısını artırmaktadır.³²

Antibiyotik tedavisi sırasında karşılaşılan potansiyel olarak yararlı bakterilerin ortadan kaldırılması, ikincil patojenlerin üremesi ve dirençli bakterilerin ortaya çıkması gibi sorunlar, çok dar etki spektrumuna sahip fajlar için geçerli değildir.^{5,32} Bugüne kadar uygulanan faj tedavilerinde herhangi bir ciddi yan etki bildirilmemiştir.³² Fajlar antibiyotiklerin aksine doğal mikrobiyom elamanlarını minimum düzeyde etkilemektedir.³¹ Fajların sadece hedef bakteride çoğaldıkları, memeli hücrelerini enfekte etmedikleri için yan etkilerinin bulunmadığı, daha güvenli

ve daha iyi tolere edildiği bildirilmiştir.⁵ Ayrıca fajlar, özellikle konakçıların bulunduğu yerlerde replike olmakta ve nerede ihtiyaç varsa orada çoğalmaktadır (oto-dozlama). Bu özellikleri nedeniyle antibiyotiklerden farklı olarak, fajlar küçük dozlarda ve uzun zaman aralıklarıyla uygulanabildikleri için etkileri sadece enfeksiyon bölgesi ile sınırlı kalmaktadır.^{18,20}

Faj tedavisi için topikal, parenteral, oral gibi farklı uygulama yolları kullanılmaktadır.^{22,24,33-38} Fajlar antibiyotikler ile kombine edilerek de uygulanmaktadır.⁶ Gürcistan'daki araştırmacılar (Gürcistan Teknik Üniversitesi) ve Maryland Üniversitesi (ABD) Tıp Fakültesinin birlikte yaptıkları çalışmada, enfekte venöz ülser ve yaraların tedavisi için litik faj kokteyli ve antibiyotik emdirilmiş biyobozunur bir polimer matrisi olan Phago-BioDerm'i uygulamışlardır.³⁹ Bu vaka çalışmasında, 96 hastada yara iyileşmesi gözlemlenmiş olup, hastaların 67'sinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra, çoklu ilaca dirençli *S.aureus* ile enfekte yarası olan 2 hastanın PhagoBioDerm™ (Gürcistan)'in kullanımı ile iyileştiği bir başka vaka çalışması yayımlanmıştır.⁴⁰

Son yıllarda antibiyotiklere karşı görülen dirençin ciddi boyutları ulaşması nedeniyle Batı Avrupa ve Amerika'da da antibiyotiğe dirençli bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde ve antibiyotik kullanımının kontrendike olduğu durumlarda faj tedavisine ilgi yeniden artmaya başlamıştır.^{25,38} Henüz Avrupa Birliği veya Amerika Birleşik Devletleri'nde fajları içeren herhangi bir ilacın onay almamış olmasına karşın kontrol edilemeyen bir antimikrobiyal direnç durumunda faj tedavisi, Helsinki Bildirgesi'nin 37. maddesi (klinik uygulamada kanıtlanmamış müdahalelerin kullanımı) doğrultusunda uygulanmaktadır.⁴¹ 37. maddeye göre: "Kanıtlanmış bir girişimin bulunmadığı ya da bilinen diğer girişimlerin etkisiz kaldığı bir hastanın tedavisinde hekim, uzman görüşünü aldıktan sonra, hastanın ya da yasal temsilcisinin aydınlatılmış onamıyla, yaşam kurtarabileceğini, sağlığı geri getirebileceğini ya da acıları hafifletebileceğini düşündüğü henüz kanıtlanmamış bir girişimi uygulayabilir. Böyle bir girişim daha sonra güvenliliği ve etkililiği açısından araştırma konusu yapılmalıdır. Her durumda, yeni bilgiler kayda geçirilmeli ve uygun olduğunda kamuoyunun erişimine açık kılınmalıdır."⁴¹ Ancak hâlen faj tedavisi

için resmî düzenlemelerin (ulusal veya uluslararası direktif, kılavuz, yönetmelik) bulunmayışı, Avrupa ve Amerika'da faj tedavisinin uygulanmasında engel oluşturmaktadır.⁴²

Polonya, Avrupa Birliğine katıldıktan sonra, Wrocław'da İmmünoloji ve Deneysel Tedavi Enstitüsünde, Faj Tedavi Ünitesi açılmıştır. Bu tedavi ünitesinde, bağımsız bir biyoetik kurul tarafından onaylanan protokole göre hastalara faj tedavisi uygulanmaktadır.⁴³ Belçika'da ise 2018 yılından bu yana fajların majistral olarak hazırlanarak tedavide kullanımı başlamıştır.^{7,42} Faj tedavisinin uygulamasına katkı sağlayan bir diğer Faz I çalışmasında, venöz bacak ülserlerinin tedavisinde *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı bir faj kokteyli (WPP-201) uygulanmış ve fajların etkinliği ve güvenliliği gösterilmiştir.³⁴ Aynı yıl içinde Fransa'da kurulmuş bir biyoteknoloji firması olan Pherecydes Pharma (Fransa) tarafından Avrupa Birliği 7. Araştırma ve Geliştirme Çerçeve Programı kapsamında 2013-2017 yılları arasında yürütülen PhagoBurn projesinde, çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan yanık hastalarında 12 faj kokteyli test edilmiştir. Bu projede, hem iyi imalat uygulamaları (GMP), hem de iyi klinik uygulamaları uygulanmış olması ve bu alanda yapılan ilk prospektif çok-merkezli, randomize, tek kör ve kontrollü klinik çalışma olması nedeniyle önemlidir.^{23,44} Çalışma, 3 ülkenin ilaç ajansı (Fransa Ulusal İlaç ve Sağlık Ürünleri Güvenliği Ajansı, Belçika-İlaç ve Sağlık Ürünleri Federal Ajansı ve İsviçre-Swissmedic) ile iş birliği içerisinde yürütülmüştür.³³ İngiltere'de yapılan bir başka klinik çalışmada, kronik otiti olan hastalarda antibiyotiğe dirençli *P. aeruginosa*'ya karşı terapötik bir faj preparatı olan Biophage-PA'nın etkililiği ve güvenliliği gösterilmiştir.⁴⁵ Mart 2016 tarihinde ABD'de yapılan bir başka çalışmada, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu ile komplike olan ve hiçbir tedaviye cevap vermeyen nekrotizan pankreatitli hastaya, faj bazlı kişiselleştirilmiş bir tedavi uygulanmış ve hastada çok hızlı iyileşme sağlandığı bildirilmiştir.³⁶ Bu olgunun, ABD'de ilk intravenöz faj tedavisi uygulaması olarak literatüre geçmiş olması faj tedavisinin güvenirliliği ile ilgili kaygıları azaltması bakımından etkili olmuştur. Mayıs 2019 tarihinde ise İngiltere'de yaygın *Mycobacterium abscessus* enfek-

siyonu olan kistik fibrozisli 15 yaşında bir hasta, bilateral akciğer transplantasyonu gerçekleşikten 2 yıl sonra 3 faj kokteyli ile tedavi edilmiş ve intravenöz faj tedavisi sonrasında hastada klinik iyileşme gözlenmiştir.⁴⁶ Ülkemizde henüz yayımlanmış klinik çalışmalar bulunmamakla birlikte fajların tanımlanması ve saflığı konusunda in vitro çalışmalar yürütülmektedir.²⁰

FAJLARIN ÜRETİMİ

Bir önceki bölümde belirtildiği üzere son yıllarda faj tedavisinin Batı Avrupa ve Amerika’da yeniden kullanımının başlamasına karşın henüz resmî kılavuzlarda [ICH (Uluslararası Harmonizasyon Konseyi), EMA (Avrupa İlaç Kurumu), DSÖ, vb.] belirtilen gerekliliklere uygun olarak üretilen faj ve/veya faj formülasyonu mevcut değildir. Zira fajların ve faj formülasyonlarının üretiminde kalite, etkinlik ve güvenliliğini tanımlayan kılavuzlar, yönetmelikler yoktur. Fajların, bu doğrultuda spesifikasyonlarının belirlenmesi ve standardizasyonu da mümkün olmamıştır. Öte yandan fajların stabilitesinin düşük olması da sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.^{7,44,47}

Faj ürünleri, hem Avrupa hem de Amerika’da ilaç (tıbbi ürün) olarak değerlendirmeye alınacaktır. Bu doğrultuda, bir ilacın ruhsatlandırılması için gerekli tüm kalite, etkinlik ve güvenilirlik ile ilgili tüm resmî gereklilikleri karşılamak zorundadır. Öte yandan fajların, doğal ürün olmaları nedeniyle fikrî mülkiyet korumasındaki kısıtlamalar diğer bir deyişle patentlenememesi ve bakteriye spesifik olması endüstrinin ilgisini azaltmaktadır.

Fajlar günümüzde, özellikle Belçika örneğinde olduğu üzere majistral ürün olarak yani “bir eczanede bireysel bir hasta için tıbbi reçeteye uygun olarak hazırlanan bir tıbbi ürün” bir tıp doktorunun ve eczacının doğrudan sorumluluğunda altında kullanılmaktadır.⁴² Fajların özellikleri ve niteliklerinin, içinde tedarikçi tarafından hazırlanan bir monografıta tanımlanması istenmektedir. Eczacı etkin maddeyi kullanmadan önce, analiz sertifikasının “Onaylı Laboratuvar” tarafından onaylandığından emin olmalıdır.⁴² Majistral faj üretimi, faj bankasından alınan ve karakterize edilen tek bir faj tohum lotundan hareketle başlamaktadır. Daha sonra bu faj tohum lotun-

dan, belirlenmiş bir monografa göre bir faj etkin maddesi üretilip, Belçika’da “Onaylı Laboratuvar” tarafından, etkin maddenin özelliklerini ve kalitesini değerlendirmek için Dış Kalite Değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu üretilen fajların her bir serisi, o seri için üretim prosesini detaylı olarak tarif eden bir seri kaydına sahip olmalıdır. Seri kayıt protokolü ve Dış Kalite Değerlendirmelerinin sonuçları ile birlikte faj etkin maddesi eczacıya aktarılmaktadır.⁴² İdeal olarak, faj etkin maddeleri hedef bakterilere karşı seçilmektedir. Bir antibiyogram gibi bir “fagogram” yapılmalıdır. Günümüzde, majistral faj ilaçlarının klinik kullanımı (örneğin tıbbi endikasyonları, formülasyonlar ve pozoloji) ile ilgili resmî bir kılavuz bulunmamaktadır.

Onaylı ürünlerle tedavi seçeneklerin tükendiği durumdaki hastaların tedavisi için klinik çalışmaların dışında onaylanmamış ilaçların insani nedenlerle kullanımı (compassionate treatment) mümkün olmaktadır. Faj tedavisi de bu gibi durumlarda ilgili resmî otoritelerin onayıyla kullanılabilir. Fajlar, biyoteknoloji şirketleri tarafından klinik kullanım için aşamalı olarak geliştirilmektedir. Pherecydes Pharma, Amplphi Biosciences (ABD, Avustralya) ve Adaptif Faj Terapötikleri (ABD) gibi bazı firmalar, bakteriyel kökenli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere faj preparasyonları hazırlamaktadır.⁴⁸

FAJLARIN FORMÜLASYONU

Fajların formülasyonunda en önemli husus hem in vitro hem de in vivo stabilitelerinin sağlanmasıdır. In vivo olarak, gastrointestinal enfeksiyonların ve bazı durumlarda sistemik enfeksiyonların tedavisinde oral yoldan uygulandığında, midenin düşük pH’si ve enzimlerin varlığı nedeniyle fajın parçalanması söz konusudur. Diğer uygulama yollarında da (dermal, parenteral vb.) stabilitenin korunması önemlidir.

Sistemik enfeksiyonların tedavisinde genellikle fajlar intraperitoneal yolla uygulanmaktadır.^{25,49} Parenteral yoldan uygulanacak formülasyonlarda fajlar, genellikle çözelti ve süspansiyon şeklinde hazırlanmaktadır.^{8,50} Ayrıca faj kokteyli içeren lipozomal sistemler de intraperitoneal uygulama için geliştirilmiştir.⁵¹

Oral yoldan uygulanacak fajların, midenin asiditesinden korunması için fajların bir polimer içine ya da lipozomal bir yapının içine enkapsülasyonu mümkündür.^{37,49,52-54} In vitro olarak fajların stabilitesine bakıldığında, pH, sıcaklık, nem gibi çevresel koşullara göre değişiklik göstermektedir.^{8,47} Çözelti hâlinde olan fajlar, uzun süre bekletildiğinde stabiliteilerinin azalması nedeniyle potensleri de düşmektedir. Faj çözeltileri, derin dondurucuda ya da 4 °C’de saklandığında stabiliteilerinin tam olarak korunamadığı görülmüştür.⁵⁵ Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) veya püskürterek kurutma yöntemleri kullanılarak, kuru toz hâline getirildiğinde stabilite önemli ölçüde artmıştır.^{9,11} Bu 2 yöntemle hazırlanan kuru toz formülasyonlarında farklı yardımcı maddeler (eksipyanlar) formülasyonlara dâhil edilmektedir. Bu amaçla, kurutma sırasında kristalizasyonu önlemek için amino asitler (örneğin glisin, L-lösin); çözünürlüğü artırmak için yüzey aktif maddeler (örneğin PEG 6.000); liyoprotektan (liyofilizasyon aşamasında koruyucu), kriyoprotektan (dondurma aşamasında koruyucu) ve termoprotektan (ısıya karşı koruyucu) olarak sakkaritler (örneğin glukoz, manitol, sükroz, trehaloz) kullanılmaktadır.^{11,26} Fajların oral yolla uygulanması amacıyla *Klebsiella oksitosa*’ya spesifik faj içeren bir pastil formülasyonu geliştirilmiştir.⁵⁶ Geliştirilen pastillerin, 4 °C’de saklandığında litik kapasitesinin en az 49 gün korunduğu bildirilmiştir.

Öte yandan özellikle topikal (özellikle dermal) uygulamalarda, fajların hem stabiliteilerini artırmak hem de deriden nüfuzu ve hücrel alımını artırarak etkinliğini artırmak için emülsiyon, jel, lipozom ve polimerik mikro/nanopartikül sistemleri geliştirilmiştir.^{14,15,51,52,57} Fajların, formülasyonlarının hazırlanmasında sentetik (örneğin akrilatlar, poliesterler, akrilamidler, hidroksipropilmetil selüloz, polivinilpolidon, polivinil alkol ve doğal polimerler (örneğin kitosan, aljinat, pektin) kullanılmaktadır.^{10,13,52,54,58-66} Bu polimerlerin bir kısmı, mukoadezif özelliğe sahip olmaları nedeniyle formülasyonun uygulama bölgesinde daha uzun süre kalmasını ve aynı zamanda fajların formülasyondan salımını kontrol edilmesine olanak sağlarlar. Mukoadezif özelliğe sahip olan ve alglerden elde edilen doğal bir polimer olan aljinat ile yapılan bir çalışmada, faj enkapsüle edilmiş alji-

nat/CaCO₃ kapsüllerin *Salmonella*’ya karşı oral yoldan etkinliği gösterilmiştir.⁵² Başka bir çalışmada, aljinat-whey proteininden hareketle hazırlanan mikroküre formülasyonu içinde uygulanan faj K’nin, *S.aureus*’a karşı oral olarak etkinliği gösterilmiştir.⁶⁵ Mikroküre formülasyonu, faj K’nin mide ortamının olumsuz etkilerinden korumuştur.

Bir başka çalışmada, kabuklu deniz hayvanlarının kabuğundan elde edilen mukoadezif ve penetrasyon artırıcı özelliklerinin yanı sıra kendisinin, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bir biyopolimer olan kitosan ile aljinat kombinasyonu kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonu içinde *E. coli* O157:H7 fajları enkapsüle edilmiştir.^{63,67} Hazırlanan kitosan-aljinat mikrokürelerinin simüle gastrointestinal koşullarında fajların canlılığı üzerinde koruyucu etkisi olduğu, mikrokürelerden faj salımının kontrol edildiği ve etkinliğin artırıldığı bildirilmiştir.

Aljinat ile sentetik bir polimer olan akrilat türü Eudragit S100 kombinasyonundan hareketle pH’ye duyarlı kompozit mikropartiküller hazırlanmış ve *E. coli* fajları yüklenmiştir.⁶⁸ Hazırlanan formülasyonların, fajların canlılığını önemli derecede koruduğu ve bakterinin öldürülmesinde etkinin arttığı in vitro olarak gösterilmiştir.

Fajların, oral kullanımının yanı sıra özellikle yara enfeksiyonlarının tedavisinde topikal yoldan uygulanması için formülasyonlar geliştirilmiştir.⁵⁹ Özellikle, doğal veya sentetik polimerlerden hareketle hazırlanan hidrojel, fajların enfeksiyon kaynaklı yaraların iyileşmesinde güvenli şekilde kullanılmaktadır. Kuru ağırlıklarının %10-1000 katına kadar su tutabilen hidrofilik polimer ağı yapısında olup, istenilen düzeyde faj yüklemesi ve faj salımı sağlanabilmektedir.⁶⁹ Hidrojel sistemin başarıyla kullanıldığını gösteren bir örnek olarak PhagoBioderm verilebilir.³⁹ Bu preparatta, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Streptococcus* enfeksiyonlarına karşı faj kokteyli ve antibiyotikler, L-fenilalanin ve L-lösin poli (ester amit)den hareketle hazırlanan hidrojele inkorpore edilmiştir.

Bir başka çalışmada, polisakkarit yapıya sahip doğal bir polimer olan agaroz ve hiyalüronik asit metakrilat (HAMA) kombinasyonu kullanılarak, çift katmanlı hidrojel formülasyonu geliştirilmiştir.⁵⁸ Aga-

roz jel içerisinde *S. aureus* 'a spesifik faj emdirilmiş ve hidrojel 2. katmanına hiyaluronidaz enzimine (*S. aureus* suşlarının çoğunluğu tarafından salgılanan bir enzim) duyarlı çapraz bağlanabilir HAMA eklenmiştir. Bu şekilde fajların, dokunun daha derinlerine nüfuz etmesi sağlanarak etkinlik artırılması hedeflenmiştir.

Fajların topikal yoldan uygulanması amacıyla merhem veya krem şeklinde formülasyonlar geliştirilmiştir.⁷⁰ Bir çalışmada, *Propionibacterium acne*'ye spesifik faj için geliştirilen hidrofilik krem formülasyonu örnek olarak verilebilir. Çalışmada, hazırlanan kremin 4 °C'de saklandığı durumda fajın en az 90 gün etkili olduğu gözlenmiştir.

Topikal uygulamada diğer tercih edilen dozaj şekilleri emülsiyonlar ve lipozomlardır.^{71,72} Emülsiyonlar, sıvı damlacıkların başka bir sıvı içerisinde dağılmasıyla birbiriyle karışmayan 2 sıvıdan oluşan dispers sistemler olup, temel bileşenleri yağ fazı, emülsiyon yapıcı madde (sürfaktan) ve su fazıdır.⁷³ Etkin maddenin doku içine daha iyi nüfuz edebilmesi ve bu şekilde emilimin artırılarak, etkinliğin artırılması için damla boyutu daha küçük olan (20-500 nm) nanoemülsiyonlar hazırlanmaktadır. Nanoemülsiyon formülasyonlarında, fajların etkinliğinin ve stabilitesinin artırıldığı gösterilmiştir.¹⁴ Nanoemülsiyon hazırlanmasında yağ fazı olarak soya yağı, sürfaktan olarak polioksietilen (10) oleil eter ve sulu faz olarak bir tampon kullanılmıştır.

Hücre zarının yapısına benzer şekilde, çok katlı fosfolipid tabakasından oluşan küresel veziküller olarak tanımlanan lipozomlar, hidrofilik ya da hidrofobik yapıdaki maddeleri tabakalar arasına ya da içine enkapsüle edebilmektedir. Nanoboyutta olan lipozomlar, kullanılan materyale göre katyonik veya nötr yüzey yüklü olabilmektedir. Hem boyutları hem de yapısal özellikleri nedeniyle kolaylıkla doku içine nüfuz edebilmektedir.⁷² Ayrıca sistemik olarak uygulandıklarında da retikuloendotelial sistem tarafından hemen alınmadığı için dolaşımda daha uzun süre kalabilmektedir. Fajların formülasyonu için farklı lipozomal sistemler geliştirilmiştir.⁷⁴ Bu amaçla, ilaç enkapsülasyon etkinliğinin artırılması ve partikül büyüklüğünün istenilen boyutta olması için farklı hazırlama yöntemleri (ince film hidrasyonu, sonikas-

yon, çözücü dispersiyonu, deterjan uzaklaştırılması, dilüsyon, mikroakışkan) denenmiştir.⁷⁵ Özellikle katyonik lipozomlara yüklenen fajlarla daha yüksek yükleme yüzdesi ve dokuya daha iyi nüfuz edebilmesi nedeniyle daha yüksek etkinlik sağlandığı bildirilmiştir.^{37,51}

Dermal enfeksiyonlarda kullanılmak amacıyla fajlar için geliştirilen diğer bir dozaj şekline örnek olarak, dokunmamış kumaşa emdirilmiş faj yüklü nanoküreler verilebilir.⁵⁹ Bu amaçla nanoküreler poli (N-izopropilakrilamid) ile hazırlanmış ve bakteriyofaj K nanokürelere inkorpore edilmiştir. Bu sayede kontrollü faj salımı sağlanmıştır.

Oral ve dermal kullanımın yanı sıra vajinal ve rektal yoldan uygulama amacıyla fajlar için *Rhodococcus equi* bakterisine karşı etkili ovul ve supozituar dozaj şekilleri hazırlanmış ve bakterileri öldürme kapasitesi araştırılmıştır.⁵⁷ Çalışma sonucunda fajların stabilitesinin korunduğu, etkinin arttığı görülmüş ve genitoüriner enfeksiyonların tedavisi için uygun olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde *K. oksitosa*'a karşı geliştirilen supozituar formülasyonlarının bakteriler üzerindeki litik kapasitesinin bozulmadan korunduğu gösterilmiştir.⁵⁶ Fajların formülasyonu üzerine yapılan çalışmalar Tablo 1'de özetlenmiştir.

SONUÇ

Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, insanlık tarihi boyunca ölümcül hastalıkların ana nedenlerinden biri olmuştur. 1915 yılında fajlar, birçok enfeksiyonun tedavisinde etkili olarak kullanılmıştır. 1928 yılında ise penisilin keşfiyle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yeni bir çağ açılmış ve faj tedavisine ilgi genel olarak azalmıştır. Ancak son yıllarda antibiyotiklere karşı mikropların gösterdiği direnç küresel tehdit hâline gelmiş olup, enfeksiyonların tedavisinde yeni alternatifler araştırılmasına neden olmuştur. Bu alternatiflerden bir tanesi yüzyıllık bir geçmişi olan faj tedavisi yaklaşımıdır. Günümüzde faj tedavisi Rusya, Gürcistan ve Polonya'da güvenli, etkili bir şekilde kliniklerde kullanılmakta olup, Batı Avrupa ülkelerinde ve Amerika'da ise rutin kullanımı olmayıp, küçük gruplar ya da tek olgular şeklinde araştırma seviyesinde uygulanmaktadır. Fajların ürün olarak onay alabilmesi için resmî kılavuz-

TABLO 1: Fajların formülasyonu üzerine yapılan çalışmalar.

| Kullanılan faj | Bakteri | Formülasyona giren maddeler | | | Dozaj şekli | Uygulama yolu | In vitro/in vivo çalışmalar | Sonuç | Referans |
|---|---|---|----------------------|-------------|----------------------|--|---|-------|----------|
| | | Formülasyona giren maddeler | Uygulama yolu | Dozaj şekli | | | | | |
| Faj W ^{sa} Faj W ^{sa} | <i>S. aureus</i> Metsilin rezistan <i>S. aureus</i> | Serum fizyolojik | Intravenöz, subkütan | Suspansiyon | Intravenöz, subkütan | In vitro - Hücre içi öldürme aktivitesi (peritoneal fare makrofaj hücreleri) - Faj nötralizasyon testi In vivo Dişi BALB/c fareler (8-10 haftalık) - Doluşmada kalan faj seçimi - Bakteriyel yük ve faj titresini - Enflamasyonun inoelenmesi | - Hücre içi staflokoklar ölmüş - Faj W ^{sa} antikorlar tarafından nötrale edilmiş ve doluşmada kalınmış - Bakteriyel yük tespit edilmiş - IL-6 ekspresyon seviyesi yaklaşık beş kat azalmış - TNF- α ekspresyon seviyesi değişmemiş | (50) | |
| Faj kokteyli (K01, K02, K03, K04 ve K05) | <i>K. pneumoniae</i> B5055 | Fosfotidilkolin Kolesterol Tween 80 Stearilamin | Intraperitoneal | Lipozom | Intraperitoneal | In vivo Erikek BALB/c farelerde (4-6 haftalık, 25-30 g) yanık yarası enfeksiyon modeli - Toksikite testi - Farmakokinetik çalışma - Bakteriyel yük ve faj titresini - Histopatolojik analiz - Stokin analizi - Formülasyonların koruyucu etkinliği | - Letarji veya hastalık belirtileri gözlenmemiş - Daha yüksek faj titresini - Maksimum iyileşme ve stokin düzeylerinde azalma - Koruyucu etkinlik | (51) | |
| Faj kokteyli (UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87) | <i>Salmonella Typhimurium</i> | Ajimat CaCO ₃ MgSO ₄ | Oral | Mikrokapsül | Oral | In vitro - pH 2,8 ve pH 8,0 da faj salımı In vivo Broiler tavuğu (<i>Gallus gallus</i> , Ross strain 308) enfeksiyon modeli - Tavuk çekumunda fajın kalış süresi, bakteriyel yük ve faj titresini | - Enkapsülasyonla pH 2,8 de fajların stabilitesi artırılmış - Enkapsülasyon ile midede salım engellenmiş bağırsakta salım gerçekleşmiş - Enkapsülasyonla çekumda fajın kalış süresi uzamış, | (52) | |
| Faj kokteyli (UAB_Phi20 UAB_Phi78 UAB_Phi87) | <i>Salmonella Typhimurium</i> | DLPC* Chol-PEG600* Chol* Cholesteryl* Trehaloz MgSO ₄ | Oral | Lipozom | Oral | In vitro - pH 2,8 de faj stabilitesi In vivo Broiler tavuğu (<i>Gallus gallus</i> , Ross strain 308) enfeksiyon modeli - Tavuk çekumunda fajın kalış süresi, bakteriyel yük ve faj titresini | - Fajların pH 2,8 de stabilitesi artırılmış - Bağırsakta salım süresi artırılmış - Enkapsülasyonla çekumda faj titresini ve bakteriyel yük azaltılmış | (37) | |

devamı →

TABLO 1: Fajların formülasyonu üzerine yapılan çalışmalar (devamı).

| Kullanılan faj | Bakteri | Dozaj şekli | Uygulama yolu | Formülasyona giren maddeler | In vitro/in vivo çalışmalar | Sonuç | Referans |
|------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------|--|--|---|----------|
| Faj EK1F | <i>E. coli</i> | pH'ye duyarlı Mikropartikül | Oral | Eudragit S100 Aljinat | In vitro - pH 2,0, 2,5, 4,0 ve pH 4-7'de faj salımı ve stabilitesi - Saklama stabilitesi - Liitik aktivite (insan epitel hücreleri ve <i>E.coli</i> hücreleri) | - Fajların pH 2,0'de stabilitesi artırılmış - 4 hafta boyunca 4 °C'de faj saklama stabilitesi sağlanmış - Liitik aktivite korunmuş | (68) |
| <i>E.coli</i> O157:H7 spesifik Faj | <i>E. coli</i> O157:H7 | Mikroküre | Oral | Kitosan Aljinat Tris HCl CaCl ₂ | In vitro - pH 2,0, 2,5'te faj stabilitesi ve pH 7,5'te faj salımı - Liitik aktivite (<i>E. coli</i> hücreleri) | - Fajların asit ortamda stabilitesi artırılmış - Faj salımı artırılmış - Liitik aktivite korunmuş | (63) |
| Faj Z6EC5 | <i>E. coli</i> O157:H7 | Boncuk | Oral | Kitosan Aljinat Jelatin Bal NaCl MgSO ₄ ·7H ₂ O | In vitro - pH 7,5'te faj salımı - Asit ve sıcaklığın faj stabilitesine etkisi - Liitik aktivite tayini (<i>E. coli</i> O157: H7 NCTC 12900 hücreleri) | - pH 7,5' faj salımı sağlanmış - Asit ortamda ve yüksek sıcaklıkta stabilize artırılmış - 4 hafta boyunca 4 °C'de faj saklama stabilitesi sağlanmış - Liitik aktivite uzun süreli artırılmış | (54) |
| Faj KOX1 | <i>K. oxytoca</i> | Supozituar | Rektal | Jelatin Gliserol | In vitro - pH 2,5'de ve pH 6,8'de (safra tuzları çözeltilisinde) faj stabilitesi - Liitik aktivite tayini (<i>Klebsiella oxytoca</i> içeren kültür plakları) | - Safra tuzları varlığında fajlar stabil kalmış - Fajların stabilitesi artırılmış - Liitik aktivite süresi uzatılmış (4 °C'de saklandığında 49 gün boyunca korunmuş) | (56) |
| ΦKAZ14 | Avian patojenik <i>E. coli</i> | Pastil | Oral mukozal | Silik jel Steviosit Akasya Sitrik asit anhidritöz | In vivo Avian patojenik <i>E. coli</i> enfekte COBB 500 Broiler tavuk colibacillosis enfeksiyonu modeli - <i>E. coli</i> 'nin intestinal kolonizasyonu ve feçeste bulunması - Bakteriye yük | - Mortalite oranı düşürülmüş - Feçeste <i>E. coli</i> miktarı ve kolonizasyon düzeyi düşürülmüş - Bakteriye yük azaltılmış - Fajın in vivo stabilitesi artırılmış | (64) |

devamı →

TABLO 1: Fajların formülasyonu üzerine yapılan çalışmalar (devamı).

| Kullanılan faj | Bakteri | Dozaj şekli | Uygulama yolu | Formülasyona giren maddeler | In vitro/vivo çalışmaları | Sonuç | Referans |
|----------------|------------------------|--|------------------------------------|--|---|---|----------|
| Bakteriyofaj-K | <i>S. aureus</i> | Mikroküre | Oral | Whey protein Aljinat Sükroz Maltoz Maltodekstrin Laktöz Gliserol Mısır şurubu Pepton | In vitro - Koriyucu maddelerin faj canlılığına etkisi - pH 2,0, 2,5 ve safra tuzlarında faj stabilitesi ve pH 6,8'de faj salımı - Faj saklama stabilitesi | - Maltoz en iyi koruma sağlamış - pH 2,5'te faj stabilitesi artırılmış - Safra tuzlarında fajlar stabil kalmış - pH 6,8'de faj salımı sağlanmış - Yeş mikroküreler 6 hafta boyunca 4 °C'de, kurutulmuş mikroküreler 2 hafta boyunca 4 °C'de, 1 hafta boyunca 23 °C'de stabil kalmış | (65) |
| Bakteriyofaj-K | <i>S. aureus</i> | Hidrojel | Dermal | HAMA* PEG diakriyat Irgacure Agaroz | In vitro - Litik aktivite (canlı bakterî kültürü) | - Hiyaluronidaz enzimine duyarlı salım - Litik aktivite korunmuş | (58) |
| Bakteriyofaj-K | <i>S. aureus</i> | Nanoemülsiyon | Dermal | Soya yağı Brij O10 SM tamponu* | In vitro - Bakteriyel yük ve faj enfektivitesi - Litik aktivite tayini | - Litik aktivitesi ve faj stabilitesi artırılmış - Faj enfektivitesinde değişimler azaltılmış | (14) |
| Bakteriyofaj-K | <i>S. aureus</i> ST228 | Isya duyarlı polimerle (PNIPAM)* hazırlanmış dokunmamış kumaş nanoküre | Dermal | Dokunmamış kumaş Polipropilen Maleik anhidrit Nanoküre N-izopropilakrilamid Alliamin Etilen-glikol Diakriyat SDS | In vitro - 25 °C ve 37 °C'de litik aktivite (TSA* kültür plakları) | - Faj salımı termal olarak (37 °C) tetiklenerek litik etki elde edilmiş | (59) |
| Faj PAC1 | <i>P. acnes</i> | Krem Merhem Pat | Dermal Dermal Dermal | Sulu krem (anyonik baz) Setrimid sulu krem (katyonik baz) Setomakrogol krem (noniyonik baz) Basit beyaz merhem Ermülsifiye edici merhem Beyaz ve çinko patı | In vitro - Litik aktivite (<i>P. acnes</i> suşuyla hazırlanmış RCM* agar plağı) - Stabilitesi - Fotodegradasyon In vitro - Litik aktivite (<i>P. acnes</i> suşuyla hazırlanmış RCM* agar plağı) - Stabilitesi - Fotodegradasyon In vitro - Litik aktivite (<i>P. acnes</i> suşuyla hazırlanmış RCM* agar plağı) | - Yüksek litik aktivite elde edilmiş - 4 °C'de ışıkta korunarak saklandığında stabilite artmış - Basit beyaz merhem ışıkta korunarak 4 °C'de saklandığında litik aktivite 50 gün sürmüştür - Ermülsifiye merhem 4 °C'de saklandığında litik aktivite 7 günde kaybolmuş - Litik aktivite gözlenmemiş | (57) |

TABLO 1: Fajların formülasyonu üzerine yapılan çalışmalar (devamı).

| Kullanılan faj | Bakteri | Dozaj şekli | Uygulama yolu | Formülasyona giren maddeler | In vitro/in vivo çalışmalar | Sonuç | Referans |
|-----------------|--|---------------------------|----------------|---|--|--|----------|
| Faj REQ1 | <i>R. equi</i> | Ovul/supozituar | Vajinal/rektal | Jelatin | In vitro - Litik aktivite tayini (<i>R. equi</i> suşuyla hazırlanmış PYCa* agar plağı) - Stabilitesi - Fotodegradasyon | - 4 °C'de ve ışıktan korunarak saklandığında 60 gün boyunca stabil kalmış, litik aktivite devam etmiş | |
| Faj REQ1 | <i>R. equi</i> | Pastil | Oral mukozal | Silika jel Steviosit Akasya Sitrik asit anhidröz PEG | In vitro - Litik aktivite tayini (<i>R. equi</i> suşuyla hazırlanmış bakteriyel plak) - Stabilitesi - Fotodegradasyon | - 4 °C'de ve ışıktan korunarak saklandığında 90 gün boyunca stabil kalmış, litik aktivite devam etmiş | |
| Faj PAC1 -PAC10 | <i>P. acnes</i> | Krem | Dermal | Setomakrogol krem | In vitro - Litik aktivite tayini (<i>P. acnes</i> hücreleri (ATCC 6919)) - Stabilitesi - Fotodegradasyon | - Litik aktivite gözlenmiş - 4 °C'de ve ışıktan korunarak saklandığında 90 gün boyunca stabil kalmış | (70) |
| Faj CDKM9 | <i>Clostridium difficile</i> | pH'ye duyarlı mikrokapsül | Oral | Eudragit S100 Aljimat Miglyol 840 Poligiserol Polirisinoleat p-toluen sülfonik asit 4-aminobenzok asit | In vitro - pH 2'de ve pH 6-7'de faj salımı - Saklama stabilitesi | - Asit ortamda faj stabilitesi artırılmış - pH'ye duyarlı olarak pH 6-7'de faj salımı sağlanmış - 4 hafta boyunca, 4 °C'de fajla stabil kalmış | (53) |
| Felix O1 | <i>Salmonella enterica</i> | Tablet | Oral | Eudragit S100 D-(-)-trehaloz | In vitro - pH 2 ve pH 7'de faj stabilitesi - Litik aktivite tayini - Faj saklama stabilitesi | - Asit ortamda faj stabilitesi artırılmış - Saklama stabilitesi artırılmış | (15) |
| Felix O1 | <i>S. enterica serovar Typhimurium</i> DT104 | Mikroküre | Oral | Kitosan Aljimat CaCl2 Trehaloz | In vitro - pH 2,0, 2,4, 6,8 ve safra tuzlarında faj stabilitesi ve pH 6,8'de faj salımı - Saklama stabilitesi | - Asit ortamda ve safra tuzları varlığında stabilize artırılmış, (13) sürekliliği sağlanmış - Saklama stabilitesi artırılmış | |

*DLPC: 1,2-dilauroil-raçgliserol-3-fosfokolin; Chol-PEG600: Cholesterini polietilen glikol 600 sebacate; Choi: Kolesterol; Cholesteryl: Kolesteril; 3'-N-(dimethylaminoethyl) carbamate hydrochloride; HAMA: Hiyalüronik asit melakrilat; SM tamponu: (NaCl,MgSO₄·7H₂O, Tris-Cl, jelatin, pH 7,5), PNIPAM: Poli N-izopropilakrilamid; TSA: Triptik soy agar; RCM: Reinforced clostridial medium; PYCa: Peptone yeast calcium, IL-6: Interlökin-6, TNF- α : Tümüör nekrozis faktörü-alfa.

ların gerekliliklerine uygun kalite, etkinlik ve güvenilirliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Kalite yönüyle düşünüldüğünde, fajların spesifikasyonlarının belirlenmesi, stabilite ve etkinliklerinin garanti edildiği uygun formülasyonlarının geliştirilmesi ve gerek fajların gerekse formülasyonların üretimini, GMP koşullarında yapılması gereklidir. Etkinlik ve güvenilirlik yönüyle ise kısa ve uzun dönemli klinik çalışmaların, resmî kılavuzların gereklilikleri doğrultusunda gerçekleştirilmesi ve verilerin belgelendirilmesi gerekmektedir. Belçika, Fransa, İngiltere gibi Avrupa ülkelerinde klinikte özel izinle faj tedavisi uygulamaları devam etmekte olup, ürün resmî onayı almak için resmî otoritelerle iş birliği sürdürülmektedir. ABD’de de özellikle son yıllarda fajlarla sağlanan başarılı birkaç vakadan sonra faj tedavisine ilgi artmıştır. Her ne kadar fajın kendisi doğal canlı materyal olması nedeniyle patentlenemez olsa da formülasyon patenti mümkün olacağı için endüstrinin de fajlara ilgisinin artmakta olduğu görülmekte-

dir. Tüm bu hususlar göz önüne alındığında, fajların tedaviye girmesinin çok uzakta olmadığı düşünülmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma hazırlanırken tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- WHO. "No time to wait: securing the future from drug-resistant infections". (Erişim tarihi: 10.9.2019) [Link]
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. (Erişim tarihi: 10.9.2019) [Link]
- Republic of Turkey ministry of health public health institution. [National antimicrobial resistance surveillance system 2016 annual report]. (Erişim tarihi: 10.9.2019) [Link]
- WHO/Europe. "Central asian and eastern european surveillance of antimicrobial resistance annual report 2018". (Erişim tarihi: 9.9.2019) [Link]
- Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Front Pharmacol.* 2019;8;10:513. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front Microbiol.* 2019;1;10:539. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Moelling K, Broecker F, Willy C. A wake-up call: we need phage therapy now. *Virus.* 2018;5;10(12):688. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladislavjevic GT, et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:100-33. [Crossref] [PubMed]
- Vandenheuvel D, Lavigne R, Brüßow H. Bacteriophage Therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annu Rev Virol.* 2015;2(1):599-618. [Crossref] [PubMed]
- Puapempoonsiri U, Spencer J, van der Walle CF. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(1):26-33. [Crossref] [PubMed]
- Merabishvili M, Vervaet C, Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Mast J, et al. Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PLoS One.* 2013;2;8(7):e68797. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Leung SS, Parumasivam T, Gao FG, Carrigy NB, Vehring R, Finlay WH, et al. Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections. *Pharm Res.* 2016;33(6):1486-96. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, et al. Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4799-805. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Esteban PP, Alves DR, Enright MC, Bean JE, Gaudion A, Jenkins AT, et al. Enhancement of the antimicrobial properties of bacteriophage-K via stabilization using oil-in-water nano-emulsions. *Biotechnol Prog.* 2014;30(4):932-44. [Crossref] [PubMed]
- Vinner GK, Rezaie-Yazdi Z, Leppänen M, Starpley aGF, Leaper MC, Malik DJ, et al. Microencapsulation of salmonella-specific bacteriophage felix O1 using spray-drying in a pH-responsive formulation and direct compression tableting of powders into a solid oral dosage form. *Pharmaceuticals.* 2019;12(43). [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:376. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage: Overview. In: Schmidt TM, ed. *Encyclopedia of Microbiology.* 4th ed. Oxford: Academic Press; 2019. p.441-57.
- Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics (Basel).* 2018;27;7(3):66. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Harada LK, Silva EC, Campos WF, Del Fiol FS, Vila M, Dąbrowska K, et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res.* 2018;212-213:38-58. [Crossref] [PubMed]

20. Gündoğdu A, Ulu-Kılıç A. [Bacteriophage therapy: an forgotten source of cure]. *Klimik Derg.* 2018;31(2):78-87. [[Link](#)]
21. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(1):16-21. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
22. Hawkins C, Harper D, Burch D, Anggård E, Soothill J. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Vet Microbiol.* 2010;15;146(3-4):309-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Merabishvili M, Pirnay JP, Vogele K, Malik DJ. Production of phage therapeutics and formulations: innovative approaches. In: Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, eds. *Phage Therapy: A Practical Approach.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p.3-41. [[Crossref](#)]
24. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2874-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage.* 2011;1(2):66-85. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. García P, Martínez B, Obeso JM, Rodríguez A. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(6):479-85. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Svircev A, Roach D, Castle A. Framing the Future with bacteriophages in agriculture. *Viruses.* 2018;25;10(5):218. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
28. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):649-59. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Gündoğdu A, Kılıç H, Ulu Kılıç A, Kutateladze M. [Susceptibilities of multidrug-resistant pathogens responsible for complicated skin and soft tissue infections to standard bacteriophage cocktails]. *Mikrobiyol Bul.* 2016; 50(2):215-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Debarbieux L, Pirnay JP, Verbeken G, De Vos D, Merabishvili M, Huys I, et al. A bacteriophage journey at the European Medicines Agency. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(2): fnv225. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
32. Wittebole X, De Rook S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014;1;5(1): 226-35. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, et al. 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.* 2019;19(1):35-45. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A, et al. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care.* 2009;18(6):237-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(3):fnv242. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;22;61(10):e00954-17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
37. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, Maspocho D, Llagostera M, et al. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against salmonella spp. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(14):4841-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from bangladesh. *EBioMedicine.* 2016;5;4:124-37. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
39. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. 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.* 2002;41(7):453-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
40. Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, Mgaloblishvili I, Tsitlanadze G, Katsarava R, et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(1):23-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Pirnay J-P, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G. Bacteriophage production in compliance with regulatory requirements. In: Azeredo J, Sillankorva S, eds. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice.* New York, NY: Springer New York; 2018. p.233-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
42. Pirnay JP, Verbeken G, Ceysens PJ, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The magistral phage. *Viruses.* 2018;6;10(2):64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. Phage therapy unit of the medical centre of the institute of immunology and experimental therapy PAS. (Erişim tarihi: 15.9.2019) [[Link](#)]
44. Schmidt C. Phage therapy's latest makeover. *Nat Biotechnol.* 2019;37(6):581-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. 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.* 2009;34(4):349-57. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Detrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019; 25(5):730-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
47. Cooper CJ, Koonjan S, Nilsson AS. Enhancing whole phage therapy and their derived antimicrobial enzymes through complex formulation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018;11(2): 34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
48. McCallin S, Sacher JC, Zheng J, Chan BK. Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses.* 2019;11(4):343. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
49. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(10):1253-64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
50. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(8):2765-73. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
51. Chadha P, Katara OP, Chhibber S. Liposome loaded phage cocktail: enhanced therapeutic potential in resolving *Klebsiella pneumoniae* mediated burn wound infections. *Burns.* 2017;43(7):1532-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
52. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Ari-ez-Soriano J, Cortés P, Maspocho D, et al. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: a strategy for improved phage therapy. *Sci Rep.* 2017;25;7:41441. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
53. Vinner GK, Vladislavjević GT, Clokie MRJ, Malik DJ. Microencapsulation of *Clostridium difficile* specific bacteriophages using microfluidic glass capillary devices for colon delivery using pH triggered release. *PLoS One.* 2017; 12; 12(10):e0186239. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]

54. Abdelsattar AS, Abdelrahman F, Dawoud A, Connerton IF, El-Shibiny A. Encapsulation of E.coli phage ZCEC5 in chitosan-alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express*. 2019;17;9(1):87.[Crossref] [PubMed] [PMC]
55. Lobočka MB, Glowacka A, Golec P. Methods for bacteriophage preservation. In: Azeredo J, Sillankorva S, editors. *Bacteriophage therapy: From lab to clinical practice*. New York: Springer New York; 2018. p.219-30.[Crossref] [PubMed]
56. Brown TL, Petrovski S, Hoyle D, Chan HT, Lock P, Tucci J, et al. Characterization and formulation into solid dosage forms of a novel bacteriophage lytic against *Klebsiella oxytoca*. *PLoS One*. 2017;17;12(8):e0183510.[Crossref] [PubMed] [PMC]
57. Brown TL, Thomas T, Odgers J, Petrovski S, Spark MJ, Tucci J, et al. Bacteriophage formulated into a range of semisolid and solid dosage forms maintain lytic capacity against isolated cutaneous and opportunistic oral bacteria. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(3):244-53.[Crossref] [PubMed]
58. Bean JE, Alves DR, Laabei M, Esteban PP, Thet NT, Enright MC, et al. Triggered release of bacteriophage K from agarose/hyaluronan hydrogel matrixes by *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Chem Mater*. 2014;26(24):7201-8.[Crossref]
59. Hathaway H, Alves DR, Bean J, Esteban PP, Ouadi K, Sutton JM, et al. Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release of Bacteriophage K. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;96:437-41.[Crossref] [PubMed]
60. Abdulmir AS, Jassim SA, Abu Bakar F. Novel approach of using a cocktail of designed bacteriophages against gut pathogenic *E. coli* for bacterial load biocontrol. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13:39.[Crossref] [PubMed] [PMC]
61. Dai M, Senecal A, Nugen SR. Electrospun water-soluble polymer nanofibers for the dehydration and storage of sensitive reagents. *Nanotechnology*. 2014;6;25(22):225101.[Crossref] [PubMed]
62. Salalha W, Kuhn J, Dror Y, Zussman E. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*. 2006;17(18):4675-81.[Crossref] [PubMed]
63. Kim S, Jo A, Ahn J. Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50(4):913-8.[Crossref]
64. Kaikabo AA, AbdulKarim SM, Abas F. Evaluation of the efficacy of chitosan nanoparticles loaded Φ KAZ14 bacteriophage in the biological control of colibacillosis in chickens. *Poult Sci*. 2017;1;96(2):295-302.[Crossref] [PubMed] [PMC]
65. Tang Z, Huang X, Sabour PM, Chambers JR, Wang Q. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60(1):263-70.[Crossref]
66. Dini C, Islan GA, Castro GR. Characterization and stability analysis of biopolymeric matrices designed for phage-controlled release. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;174(6):2031-47.[Crossref] [PubMed]
67. Şenel S. Current status and future of chitosan in drug and vaccine delivery. *React Funct Polym*. 2020;147:104452.[Crossref]
68. Vinner GK, Richards K, Leppanen M, Sagona AP, Malik DJ. Microencapsulation of enteric bacteriophages in a pH-responsive solid oral dosage formulation using a scalable membrane emulsification process. *Pharmaceutics*. 2019;14;11(9):475.[Crossref] [PubMed] [PMC]
69. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:18-23.[Crossref]
70. Brown TL, Petrovski S, Dyson ZA, Seviour R, Tucci J. The formulation of bacteriophage in a semi solid preparation for control of propionibacterium acnes growth. *PLoS One*. 2016;10;11(3):e0151184.[Crossref] [PubMed] [PMC]
71. Shakeel F, Ramadan W, Faisal MS, Rizwan M, Faiyazuddin M, Mustafa G, et al. Transdermal and topical delivery of anti-inflammatory agents using nanoemulsion/microemulsion: an updated review. *Curr Nanosci*. 2010;6(2):184-98.[Crossref]
72. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-60.[Crossref] [PubMed]
73. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. 3 *Biotech*. 2015;5(2):123-7.[Crossref] [PubMed] [PMC]
74. Cinquerrui S, Mancuso F, Vladislavjević GT, Bakker SE, Malik DJ. Nanoencapsulation of bacteriophages in liposomes prepared using microfluidic hydrodynamic flow focusing. *Front Microbiol*. 2018;12;9:2172.[Crossref] [PubMed] [PMC]
75. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev*. 2015;14;115(19):10938-66.[Crossref] [PubMed]