

Poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych w zwalczaniu opornych zakażeń bakteryjnych

Tadeusz Głąbski, Dorota Rusek-Atkinson, Jerzy Mikołajczyk

Zakład Antybiotyków Modyfikowanych II Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie

Adres do korespondencji: Tadeusz Głąbski, Zakład Antybiotyków Modyfikowanych II, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa, e-mail: glabskit@iba.waw.pl

Wstęp

Wzrost oporności bakterii na antybiotyki ze wszystkimi jej konsekwencjami spowodował rozwój badań nad wykorzystaniem innych opcji terapeutycznych, takich jak: terapia przy użyciu bakteriofagów czy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jak i prób wykorzystania przeciwciał monoklonalnych czy szczepionek przeciwbakteryjnych. Jednocześnie nieustannie trwają prace poszukiwawcze nad nowymi związkami chemicznymi o odmiennym mechanizmie działania na komórkę bakteryjną niż znane antybiotyki.

Problem lekooporności bakterii

Konsekwencją nadużywania i nieprawidłowego stosowania antybiotyków, zarówno w medycynie ludzkiej, jak i w weterynarii oraz rolnictwie, jest szybkie rozprzestrzenianie się bakterii opornych na te leki, w tym szczepów wielolekoopornych, wśród których są szczepy niewrażliwe na żaden z dostępnych preparatów, co wiąże się z ryzykiem powrotu czasów, kiedy np. gruźlica czy zakażenia ran pooperacyjnych były śmiertelne [1-4].

Bakterie stają się częściowo lub całkowicie odporne na dany antybiotyk w wyniku rozwinięcia się kilku zasadniczych mechanizmów lekooporności, a mianowicie poprzez:

- hydrolizę enzymatyczną cząsteczki antybiotyku przez enzymy (np. β -laktamazy) produkowane przez bakterie – dotyczy to szerokiej grupy leków posiadających w swojej budowie wiązanie β -laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy);
- zmniejszenie zdolności przenikania leku przez ścianę i błonę komórkową bakterii;
- tzw. efflux – „wypompowywanie” antybiotyku z wnętrza komórki bakteryjnej;

Searching for new therapeutic options for treatment of resistant bacterial infections

In the present paper ongoing research aimed at finding novel therapeutic options for treatment of resistant bacterial infections has been described. This report attempts to review the efforts within several fields, mainly: phage therapy, antimicrobial peptides, therapeutic antibodies as well as acyldepsipeptides – an emerging class of antibiotics. Several candidates from groups mentioned above are currently being evaluated in clinical trials, but so far none have been approved for market authorization.

Keywords: phage therapy, antimicrobial peptides, therapeutic antibodies, acyldepsipeptides.

© Farm Pol, 2014, 70(7): 385-394

- zmianę ilości lub konformacji receptora (lub/i jego otoczenia) dla chemioterapeutyku – najważniejszym przykładem tego typu oporności jest powstawanie szczepów gronkowców opornych na metycylinę, tzw. MRSA (metycylinooporne szczepy gronkowca złocistego); istotą tworzenia się metycylinoopornych szczepów gronkowca jest synteza przez odporny szczep nowego białka (PBP2a), które nie ma zdolności wiązania z antybiotykami β -laktamowymi.

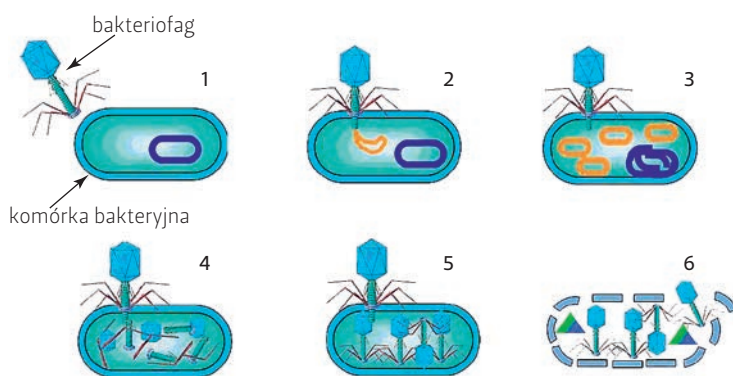
Oporność bywa łatwo przekazywana między różnymi szczepami bakteryjnymi. Drobnoustroje potrzebują niekiedy tylko kilka miesięcy na wytworzenie nowego mechanizmu oporności, podczas gdy wprowadzenie na rynek nowego leku trwa 5-7 lat.

W celu skutecznego zwalczania chorobotwórczych bakterii nadal poszukuje się nowych leków, a także innych opcji terapeutycznych, do których można zaliczyć: zastosowanie bakteriofagów (wirusów bakteryjnych) i lizyn, próby

wprowadzania peptydów przeciwbakteryjnych, zastosowanie przeciwciał monoklonalnych, szczepionek czy zastosowanie biomateriałów przeciwbakteryjnych [5].

Terapia fagowa

Bakteriofagi („pożeracze bakterii”) odkryto pod koniec XIX w., kiedy w 1896 r. Ernest Hankin, brytyjski chemik, zauważył przeciwbakteryjną aktywność wody z rzeki Ganges przeciw *Vibrio cholerae* (Hindusi pijący wodę z Gangesu nie chorowali na cholera) [6]. Jednak dopiero na początku lat 20. XX w. Félix d’Herelle, kanadyjski mikrobiolog, podjął pierwsze próby leczenia czerwonki bakteryjnej z użyciem bakteriofagów i zainteresowanie tym rodzajem terapii trwało do lat 40. XX w. W latach 30. produkowano we Francji (laboratorium bakteriofagowe d’Hérelle) nawet komercyjne preparaty fagowe aktywne wobec wielu typów bakterii, tzw. koktajle fagowe (mieszanina kilku gatunków fagów zdolnych do niszczenia wielu gatunków bakterii chorobotwórczych): Bacté-Coli-Phage, Bacté-Intensi-Phage, Bacté-Dysentérie-Phage, Bacté-Pyo-Phage, Bacté-Rhino-Phage [7]. W czasie II wojny światowej wykorzystywano fagi do leczenia czerwonki u żołnierzy. Do lat 40. XX w. bakteriofagi uznawane były za obiecujące narzędzie do walki z bakteriami. Wprowadzenie do lecznictwa antybiotyków spowodowało, że prace nad bakteriofagami zostały zahamowane. Po 1990 r. zainteresowanie terapią fagową powróciło, a było to związane z pojawianiem się coraz to nowych szczepów bakterii opornych na antybiotyki.



Rycina 1. Działanie bakteriofagu na komórkę bakteryjną [12]

- 1 – adsorpcja bakteriofagu na powierzchni komórki bakteryjnej
- 2 – wstrzyknięcie kwasu nukleinowego – DNA
- 3 – replikacja DNA fagowego; degradacja DNA bakteryjnego
- 4 – dojrzwienie fagów
- 5 – składanie fagów
- 6 – liza (ściana komórkowa bakterii zostaje rozpuszczona przez fagowy lizozym i następuje uwolnienie cząstek fagowych)

Ośrodki prowadzące badania nad bakteriofagami

Pod koniec 2005 r. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu utworzył pierwszy w Unii Europejskiej Ośrodek Terapii Fagowej pod kierunkiem prof. Andrzeja Górskiego, w którym prowadzone jest eksperymentalne leczenie chorych zakażonych antybiotykoopornymi bakteriami [8, 9]. Obecnie pracami nad bakteriofagami zajmuje się również laboratorium Polskiej Akademii Nauk w Łodzi [10]. Do ważniejszych ośrodków na świecie prowadzących badania nad fagami należy zaliczyć: Instytut im. Eliawa w Tbilisi, działający przy Instytucie Mikrobiologii i Wirusologii w Gruzji, Novolytics (W. Brytania), Biophage Pharma (Kanada), Gangagen (Kanada, Kalifornia, Indie), Omnilytics (USA), Phage Biotech (Izrael), Phico Therapeutics (Wielka Brytania) [11].

Budowa i mechanizm działania bakteriofagów

Fagi – to szeroko rozpowszechniona w przyrodzie grupa wirusów, których cykl życiowy związany jest z komórką bakteryjną. Wszędzie tam, gdzie znajdują się bakterie, istnieją swoiste dla danego szczepu fagi; stanowią naturalny czynnik regulujący liczebność populacji bakterii. Dwie podstawowe grupy fagów to: fagi zjadliwe (wirulentne) – te, które namnażają się i zabijają komórki bakteryjne oraz fagi łagodne, które wbudowują własny materiał genetyczny w chromosom bakteryjny, dzięki czemu mogą istnieć przez wiele pokoleń. Za swoistość i zjadliwość fagów wobec bakterii odpowiadają białka wchodzące w skład cząsteczki fagowej: białka adhezyjne (rozpoznające receptory na komórkach gospodarza), enzymy fagowe oraz białka strukturalne [6]. Fagi różnią się od siebie budową i materiałem genetycznym, który stanowi DNA lub RNA w postaci jednoniciowej lub dwuniciowej.

Do zwalczania bakterii chorobotwórczych wykorzystuje się jedynie niektóre szczepy bakteriofagów, gdyż dany bakteriofag oddziałuje ściśle na konkretny szczep bakterii, przy czym spektrum działania obejmuje zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Fagi, przyłączając się do określonych receptorów w ścianie komórkowej bakterii, mają zdolność wbudowywania własnych genów w genom bakterii w taki sposób, że bakteria zaczyna produkować kopie fagów, często do momentu aż komórka bakterii zostanie przez nie rozzerwana (rycina 1).

Mechanizm działania bakteriofagów jest całkowicie odmienny od mechanizmu działania antybiotyków i dzięki temu mogą być stosowane w terapii infekcji opornych na działanie dostępnych antybiotyków. Na rycinie 1 przedstawiono etapy działania bakteriofagu na komórkę bakteryjną [12].

Bakteriofagi w medycynie ludzkiej

Obecnie bakteriofagi mogą stanowić alternatywę dla antybiotyków, np. w leczeniu pooparzeniowych infekcji bakteryjnych spowodowanych *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej), odpornej na różne rodzaje antybiotyków. Często w takich przypadkach stosuje się „koktajl” złożony z wielu gatunków fagów, aby zapobiec uodpornieniu bakterii na danego faga. Koktajl ma postać aerozolu lub roztworu w fiolkach jednorazowego użytku.

Dobre wyniki przynosi leczenie pacjentów z nawracającymi zakażeniami układu moczowego czy też przewlekłymi infekcjami zatok; jest nadzieja, że w przyszłości bakteriofagi będą stosowane u pacjentów z tzw. zespołem stopy cukrzycowej [13].

Statystycznie terapia fagowa jest w 80% skuteczna w przypadku zakażeń *Enterococcus*, a nawet w 90% w przypadku *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* oraz *Klbsiella pneumoniae*.

W Polsce fagoterapia jest powszechnie uważana za leczenie eksperymentalne (idea zastosowania wynika z Deklaracji Helsińskiej w odniesieniu do zasad etycznych dla badań medycznych z udziałem ludzi) i stosowana tylko u tych pacjentów, u których leczenie antybiotykami nie powiodło się. Ogólnie rzecz biorąc, średni sukces terapii fagowej wynosi ok. 85%.

W kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu znajduje się ponad 300 fagów, które mogą być stosowane u chorych z zakażeniami bakteryjnymi wywołanymi przez wiele rodzajów bakterii. Preparaty fagowe są przygotowywane wg zmodyfikowanej procedury prof. Ślopka i wsp. indywidualnie dla danego chorego [9]. Pierwszy etap, tzw. typowanie fagowe, polega na znalezieniu w kolekcji faga wykazującego aktywność lityczną przeciw dostarczonemu szczepowi bakterii (wyzolowanemu od pacjenta) i dostarczonemu do Laboratorium Bakteriofagowego. W drugim etapie wyselekcjonowany rodzaj bakteriofagu namnaża się na szczepie bakterii od pacjenta – uzyskuje się tzw. lizat fagowy, który po odpowiedniej obróbce ampulkuje się. W latach 1981–1986 terapię fagami (Instytut we współpracy z klinikami AM

we Wrocławiu i innymi szpitalami) zastosowano u 550 chorych (w wieku od 1 tyg. do 89 lat) z różnymi spontanicznymi lub pooperacyjnymi ropnymi infekcjami spowodowanymi przez bakterie *Staphylococcus*, *Klbsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, a w latach 1987–1999 terapię fagami zastosowano u ponad 1307 chorych (w wieku od 4 tyg. do 89 lat) z różnymi zakażeniami bakteryjnymi szczepami wieloopornymi rodzajów, jak podano wyżej. Bakteriofagi podawano 1–12 tygodni wg określonego schematu. Całkowite wyleczenie i eliminację bakterii uzyskano u 85,9%, poprawę (bez eradykacji patogenu) u 10,4% pacjentów. Najlepsze wyniki uzyskano (100% całkowitego wyleczenia) u pacjentów z ropnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i zapaleniem kości i szpiku (95%). Terapię fagową z bardzo dobrym skutkiem prowadzono u dzieci – szczególnie skuteczne w przypadku zakażeń przewodu pokarmowego i sepsy (95,2% całkowitego wyleczenia) [9].

Brytyjska firma Novolytix przygotowuje się do wprowadzenia na rynek żelu zawierającego odpowiednie fagi do zwalczania gronkowca złocistego (MRSA) w jamie nosowej pacjentów. Amerykański Intralytix pracuje nad wirusowym plastrem na zainfekowane rany, wzorując się na produkcie stosowanym od dawna w Gruzji [7, 11]. Inne badania nad zastosowaniem bakteriofagów w różnych ośrodkach na świecie (poza Polską) przedstawiono w tabeli 1.

Bakteriofagi w terapii zwierząt, roślin i dekontaminacji żywności

Bakteriofagi wykorzystywane są coraz częściej w terapii zwierząt, roślin oraz do odkażania żywności. Przykładowo, firma Omnilytix uzyskała zgodę Agencji Ochrony Środowiska w USA na stosowanie preparatu AgriPhage przeciwko chorobotwórczym bakteriom roślin, zaś w przemyśle żywnościowym EBI Ford Safety wprowadziła na rynek preparat Listex™P100 do kontrolowania bakterii *Listeria* w mięsie i serze, a w 2006 r. FDA wydała zezwolenie na dodawanie do żywności (spryskiwanie mięsa do hamburgerów oraz produktów drobiowych) preparatu fagowego LMP102 (Intralytix Inc.) zwalczającego bakterie *Listeria*.

Tabela 1. Przykłady badań nad zastosowaniem bakteriofagów w różnych ośrodkach na świecie

Nazwa/symbol fagu	Firma	Działanie/szczep bakterii	Etap badań/piśmiennictwo
BioPhage-PA BioPhage-PR	AmpliPhiBiosciences Corp.	infekcja ucha / <i>P. aeruginosa</i> , mukowiscydoza / <i>P. aeruginosa</i> (preparat w postaci aerozolu)	faza 1/2 i 3/ [14]
BFC-1 (koktajl)	Instytut Eliava w Tbilisi	zainfekowane rany po oparzeniu / <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. aureus</i>	badania pilotażowe (2009, Belgia)/[15, 16]
WPP-201	Intralytix Inc.	żyłne owrzodzenia podudzi	faza 1 bezpieczeństwo użycia/[17]
EcoShield™	Intralytix Inc.	żywność/ <i>Escherichia coli</i>	[17]
ListShield™	Intralytix Inc.	żywność/ <i>Listeria monocytogenes</i>	[17]

Według danych w 2011 r. hodowcy w USA zużyli 13,6 milionów ton antybiotyków, podczas gdy cała medycyna (ludzka) około 3,5 miliona ton (!).

Wśród drobiu często występują zakażenia bakteriami rodzaju *Salmonella*. Szacuje się, że każdego roku na rynek Unii Europejskiej trafia 500 milionów jaj zakażonych tą bakterią [18]. Przemysłowe fermy drobiu stanowią główny rezerwuár bakterii *Salmonella*, a produkcja drobiu na skalę przemysłową doprowadziła do wzrostu liczby zakażeń tą bakterią w ostatnich dekadach. Aby to zjawisko ograniczyć w przeszłości, używano powszechnie antybiotyków jako dodatków paszowych. Antybiotyki te pozostawały w ciele ptaków, a później były obecne w mięsie.

Firma Proteon Pharmaceuticals (Polska, Łódź) opracowała (2010 r.) innowacyjny produkt – Bafasal® (na chwilę obecną w trakcie procedur rejestracyjnych) – dodatek paszowy dla drobiu i trzody chlewnej bazujący na zastosowaniu bakteriofagów jako substancji aktywnej. Preparat hamuje rozwój pałeczek bakterii *Salmonella*, powstrzymując szerzenie się zakażeń wśród zwierząt hodowlanych i jednocześnie chroniąc ludzi przed salmonellozą. Bafasal® jest w 100% biodegradowalny, działa natychmiast, jest łatwy do aplikacji przez dodanie do wody, a koszty produkcji tego preparatu są niskie [18].

Terapia fagowa sprawdziła się również w opianowaniu choroby kurcząt wywołanej przez bakterię *Campylobacter jejuni*, zwalczanej dotychczas antybiotykami. Zakażenia tą bakterią człowieka powodują ostrą biegunkę (szacuje się, że jest odpowiedzialna za 500 mln przypadków rocznie!). Przygotowany odpowiedni fag zmniejsza ilość bakterii *C. jejuni* w przewodzie pokarmowym drobiu w ciągu 3 dni, w zależności o dawki i typu faga – od 100 do 100 tysięcy razy (prace Uniwersytetu w Nottingham, UK) [19].

Produkcja dodatków paszowych dla zwierząt z wykorzystaniem bakteriofagów jest w tej chwili jedyną potencjalnie skuteczną alternatywą dla antybiotyków.

Zalety i wady (ograniczenia) terapii fagami

Zalety

- mogą infekować jedynie komórki określonego gospodarza bakteryjnego, przy czym podawane doustnie nie niszczą naturalnej flory bakteryjnej przewodu pokarmowego człowieka – nie posiadają możliwości namnażania się w komórkach eukariotycznych;
- posiadają silne działanie bakteriobójcze *in vitro* i *in vivo*, zarówno przeciwko bakteriom Gram(+), jak i Gram(-);
- posiadają wąskie spektrum działania, niszczą jedynie „wyznaczony” szczep bakterii;

- posiadają unikatową cechę samoistnego zwiększenia dawki podczas trwania infekcji, co ma szczególne znaczenie w infekcjach zlokalizowanych w słabo ukrwionych tkankach, gdzie antybiotykoterapia nie daje pożądaných rezultatów;
- po podaniu doustnym przenikają do krwi i w szybkim tempie docierają do narządów wewnętrznych; pokonują również barierę krew-mózg;
- po zabiciu wszystkich bakterii patogennych fagi zostają usunięte z organizmu, gdyż nie są w stanie rozwijać się w komórkach eukariotycznych;
- niskie koszty i krótki czas produkcji – fagi mogą być hodowane na niemal każdej standardowej pożywce, a wyizolowane mogą być przetrzymywane przez relatywnie długi okres;
- wysoka skuteczność;
- metoda bezpieczna;
- możliwość zastosowania w zwalczaniu patogenów u ludzi, zwierząt i roślin.

Wady

- zdolność do kodowania genów toksyn bakteryjnych (mogą przekształcać nieszkodliwe bakterie w patogeny) – należałoby eliminować fagi posiadające geny odpowiedzialne za tę właściwość;
- szybko usuwane są z organizmu;
- fagoterapia jest trudna do wdrożenia, np. w rolnictwie – z uwagi na obawę ludzi przed „ingerencją wirusów”.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Jako alternatywę dla konwencjonalnych antybiotyków rozważane jest również zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych (*antimicrobial peptides*, AMP lub *host defense peptides*, HDP).

Zwierzęta i rośliny w toku ewolucyjnego rozwoju wykształciły szereg mechanizmów obronnych – istotnym elementem tej obrony są peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Są one izolowane prawie ze wszystkich organizmów, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych, gdzie stanowią ważny element układu odpornościowego. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe występują na wszystkich powierzchniach ekspozowanych na środowisko zewnętrzne. Pierwsze doniesienia o AMP pojawiły się w latach 80. ubiegłego wieku; wyizolowano wówczas ciekropinę z poczwarki ćmy oraz dwa peptydy magaininy ze skóry żab. U ssaków AMP produkowane są m.in. w neutrofilach, makrofagach i komórkach nabłonkowych. Wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do bakterii Gram(+), w tym mykobakterii, Gram(-),

wirusów, grzybów oraz pasożytów wewnątrzkomórkowych; nie działają wybiórczo i nie są gatunkowo specyficzne.

Obecnie znana jest sekwencja około 1200 peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Związki te są badane pod kątem zastosowań w medycynie, m.in. jako leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Dużą zaletą AMP w przeciwieństwie do antybiotyków konwencjonalnych jest niewystępowanie oporności drobnoustrojów na te peptydy. Problemem jest zabezpieczenie peptydów przed degradacją enzymatyczną oraz wysoki koszt produkcji. Próby zastosowania peptydów ograniczają się na razie do stosowania miejscowego [20–24].

Metody pozyskiwania AMP

Pierwotna metoda polegała na izolacji ze źródeł naturalnych. Tak na przykład poprzez działanie na organizm żaby prądu stałego następuje wydzielenie magaininy, a nakłucie larw owadów igłą zakażoną drobnoustrojami powoduje wyrzut do hemolimfy mieszanki kilkunastu peptydów. Obecnie AMP otrzymuje się głównie na drodze skomplikowanej syntezy chemicznej.

Mechanizm działania

Podstawową cechą AMP jest ich łatwość łączenia się z błoną komórkową bakterii [20–25]. Najczęściej spotykany mechanizm polega na przerwaniu ciągłości błony i ściany komórkowej bakterii. W ten sposób działają m.in. defensyny, katelicyny i protegryny. Fakt, że peptydy są naładowane dodatnio, wynikający z obecności reszt aminokwasowych argininy, lizyny i histydyny, umożliwia oddziaływanie z ujemnie naładowanymi fragmentami błon biologicznych, co prowadzi do powstawania porów w błonie, niekontrolowanego przemieszczania się jonów, ucieczkę ATP (adenozyno-5'-trifosforanu), napływ wody do komórki i w konsekwencji lizę komórki bakteryjnej drobnoustroju. Peptydy nie działają w ten sposób na komórki eukariotyczne (błony komórkowe gospodarza).

Drugim mechanizmem działania AMP jest ingerencja w procesy biochemiczne komórek bakterii, m.in. zatrzymanie syntezy ściany komórkowej, aktywizacja lizyn czy inhibicja syntezy DNA, RNA, białek i enzymów (tak działają m.in. niektóre defensyny, serprocydyny czy lizozym).

Trzecim mechanizmem działania jest wiązanie przez AMP jonów metali: Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , które są niezbędne do życia komórki bakterii. Takie działanie wykazują takie peptydy, jak: laktoferryna, kalprotektyna i hepcydyna.

Na **rycynie 2** przedstawiono sekwencje aminokwasowe niektórych naturalnych i syntetycznych peptydów przeciwdrobnoustrojowych [21].

Badania aktywności AMP na szczepach klinicznych

W badaniach mikrobiologicznych porównano aktywność dwóch peptydów (camel i iseganan) do antybiotyku ciprofloksacyny – uzyskane wyniki MIC wykazały wysoką skuteczność przeciwbakteryjną (z wyjątkiem bakterii *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*), a w przypadku *S. aureus* (MRSA) przewyższały aktywnością ciprofloksacynę [21]. Przeprowadzono również testy peptydów (citropina, camel, demegen, pexiganan, temporyna, uperyna) na kilkuset szczepach klinicznych drobnoustrojów Gram(+) i Gram(-) uzyskiwanych od chorych cierpiących na zapalenie płuc, choroby nowotworowe, infekcje narządów wewnętrznych oraz posiadającymi zakażone rany chirurgiczne. Badane peptydy wykazały bardzo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową; uzyskane wyniki odnoszono do wartości otrzymanych dla konwencjonalnych chemioterapeutyków [21]. Badania kinetyki zahamowania wzrostu dowiodły, że związki te działają bakteriobójczo na drobnoustroje zaledwie w kilka minut. Wyniki te są podstawą do projektowania leków na bazie peptydów do leczenia trudnych zakażeń związanych z upośledzeniem odporności.

Przeprowadzono badania szeregu peptydów (demegen, pexiganan, iseganan, temporyna) pod kątem ich zastosowania do leczenia objawów wstrząsu septycznego [21]. Na świecie z powodu ciężkiej sepsy umiera dziennie 1400 osób. Powikłania septyczne są powodowane przez wyselekcjonowaną populację drobnoustrojów wielolekoopornych, a czynnikiem wywołującym sepsę są lipopolisacharydy (LPS) będące głównym immunologicznie czynnym elementem strukturalnym ściany komórkowej bakterii Gram(-). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe cechuje wysokie powinowactwo do LPS i dzięki temu mogą być skutecznym narzędziem do walki z rozwojem sepsy.

Poważnym problemem klinicznym są zakażenia związane z wprowadzaniem do ciała pacjenta wszelkiego rodzaju implantów (cewników i innych). Drobnoustroje tworzą na ich powierzchniach biofilm, co utrudnia leczenie zakażenia. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe stosowano do zabezpieczania powierzchni różnego rodzaju implantów przed zastosowaniem u pacjenta. W badaniach dotyczących prewencji zakażeń gronkowcowych szczególnie dobre rezultaty osiągnięto, stosując do zabezpieczania powierzchni materiałów medycznych skojarzenia temporyny z linezolidem [21].

Badania kliniczne AMP

W **tabeli 2** zestawiono wybrane preparaty peptydów przeciwdrobnoustrojowych w badaniach klinicznych [21].

Naturalne AMP

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-
-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-NH₂ magainina 2

Gly-Leu-Phe-Asp-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Ala-Glu-Ser-Phe-NH₂ aureina 1.2

Gly-Leu-Phe-Asp-Val-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-Ile-Gly-Gly-Leu-NH₂ citropina 1.1

Arg-Gly-Gly-Arg-Leu-Cys-Tyr-Cys-Arg-Arg-Arg-Phe-Cys-Val-Cys-
-Val-Gly-Gly-Arg-NH₂ protegryna 1

Syntetyczne AMP

Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ camel

Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-NH₂ demegen (P-113)

Arg-Gly-Gly-Leu-Cys-Tyr-Cys-Arg-Gly-Arg-Phe-Cys-Val-Cys-Val-Gly-Arg-NH₂ iseganan (IB-367)

Ile-Leu-Arg-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-Lys-NH₂ omiganan (MBI-226)

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-
-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH₂ pexiganan (MSI-78)

Rycina 2. Sekwencje aminokwasowe niektórych naturalnych i syntetycznych peptydów przeciwdrobnoustrojowych [21]

Tabela 2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach klinicznych [21–27]

Peptyd	Firma	Potencjalne zastosowanie	Etap badań klinicznych
Pexiganan (MSI-78) (analog magaininy)	Magainin Pharm. Inc./ Genaera	owrzodzenia stóp u chorych na cukrzycę	faza 3
Omiganan (MBI-226)	Micrologix Biotech. Inc.	infekcje odcewnikowe	faza 3
Iseganan (IB-367) (analog protegryny)	IntraBiotics	infekcje płucne towarzyszące mukowiscydozie	faza 2
D2A21	Demegen	infekcje ran przy oparzeniach	faza 1
Demegen (P-113) (analog histatyny)	Demegen	zakażenia drożdżakowe jamy ustnej	faza 2
MBI-594 AN	Micrologix Biotech. Inc.	trądzik	faza 2

Prowadzone są również badania nad zastosowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu atopowego zapalenia skóry [22]. Obiecujące wyniki badań przedklinicznych uzyskano również dla peptydu przeciwbakteryjnego nazwanego Plectasin (Novozymes), wykazującego aktywność wobec wieloopornych szczepów bakterii Gram(+), m.in. *Streptococcus pneumoniae*.

Dotychczasowe badania kliniczne obejmują zastosowanie peptydów w terapii miejscowej, ponieważ problemem jest zabezpieczenie peptydów przed degradacją enzymatyczną w przewodzie pokarmowym. Prowadzone są prace nad zastosowaniem odpowiednich form leku, m.in. z wykorzystaniem mikrokapsułkowania, a także rozważane jest podawanie peptydów z inhibitorami peptydaz. Kolejnym krokiem będzie synteza

peptydów zbudowanych z D-aminokwasów, o takiej samej aktywności, lecz opornych na degradację [21].

Zaletą omawianych peptydów jest duża szybkość i szerokie spektrum działania, w tym przeciw patogenom opornym na antybiotyki, oraz niezbyt łatwe powstawanie *in vitro* mutantów opornych.

Natomiast jednym z ważnych ograniczeń stosowania peptydów są koszty produkcji. Alternatywą dla syntezy chemicznej jest synteza rekombinacyjna – najbardziej korzystne wydaje się wytwarzanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w postaci białek fuzyjnych w komórkach bakteryjnych.

Na podstawie przeglądu prac dotyczących peptydów przeciwdrobnoustrojowych można wyciągnąć wnioski, że zarówno peptydy naturalne, jak i syntetyczne mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania bezpiecznych i skutecznych leków przeciwbakteryjnych, z zastosowaniem w monoterapii bądź w terapii skojarzonej z konwencjonalnymi antybiotykami, w leczeniu nawet trudnych klinicznie przypadków (powikłania sepsy).

Przeciwciała monoklonalne

Głównym zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, na chwilę obecną, jest terapia przeciwnowotworowa. Dotychczas żadne przeciwciało nie zostało zatwierdzone do leczenia infekcji bakteryjnych, lecz prowadzone są w tym zakresie liczne badania przedkliniczne i kliniczne [28–37].

Wybrane przeciwciała przeciwbakteryjne (w badaniach klinicznych) zestawiono w tabeli 3.

Preparaty: Anthim, Raxibacumab i Volortim okazały się skuteczne w leczeniu śmiertelnej postaci płucnej zakażenia laseczką wąglika (*Bacillus anthracis*) – bakterii Gram(+) wytwarzającej przetrwalniki [28–30]. Badania kliniczne potwierdziły skuteczność kilku innych preparatów przeciwciał monoklonalnych w ciężkich zakażeniach bakteryjnych, np.: preparatu Anti-Pseudomonas w zakażeniach *P. aeruginosa* w przebiegu mukowiscydozy, a preparatu CDA1/CDB1 w biegunkach bakteryjnych wywołanych toksynami wytwarzanymi przez *C. difficile* czy preparatu Urtoxazumab w zakażeniach spowodowanych toksynami Shiga wytwarzanymi przez enterokrwotoczne szczepy *E. coli* [31, 34].

Szczepionki

Szczepionki stanowią od wielu lat uzupełniający sposób zwalczania chorób zakaźnych, w tym bakteryjnych. Szczepionki zawierają zabite lub atenuowane (o zmniejszonej zjadliwości) drobnoustroje lub ich frakcje (np. inaktywowane toksyny

Tabela 3. Przeciwciała monoklonalne w badaniach klinicznych i przedklinicznych pod kątem ich działania przeciwbakteryjnego

Nazwa preparatu	Firma	Cel/potencjalne zastosowanie	Faza badań/piśm.
Anthim (ETI-204)	Elusys Ther.	<i>B. anthracis</i> /wąglik, postać płucna	faza 2 / [28]
Raxibacumab	Human Genome Sciences	<i>B. anthracis</i> /wąglik, postać płucna	faza 3 / [29]
Volortim (MDX-1303)	PharmAthene/Medarex	<i>B. anthracis</i> /wąglik, postać płucna	zakończona faza 1 / [30]
CDA1/CDB1	Medarex/MassBiologics Merck	<i>C. difficile</i> /biegunka bakteryjna	[31]
ShigamAbs	Thallion Pharm.	<i>E. coli</i> wytwarzające toksyny Shiga	[32]
Urtoxazumab	Teijin	<i>E. coli</i> wytwarzające toksyny Shiga	[33]
Anti-Pseudomonas IgY	Immunosystem	<i>P. aeruginosa</i> /mukowiscydoza	faza 3 / [34]
KB001	KaloBios Pharm/Sanofi Pasteur	<i>P. aeruginosa</i>	faza 2 / [35]
Panobacumab	Kenta Biotech.	<i>P. aeruginosa</i>	faza 2 / [36]
Pagibaxim	Biosynexus	<i>S. aureus</i>	faza 2/3 / [37]

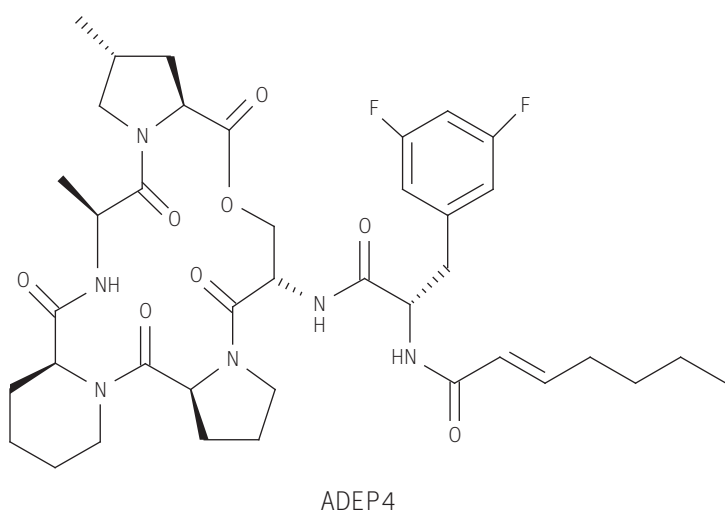
bakteryjne), które po wprowadzeniu do organizmu stymulują układ odpornościowy do wytworzenia swoistej odporności.

Nie ma w chwili obecnej szczepionek przeciw wielu bakteriom chorobotwórczym, takim jak: *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* czy *Mycobacterium leprae*. Na różnym etapie badań są obecnie szczepionki, które będą mogły stanowić ochronę przed wieloma typami chorób zakaźnych [3, 5]. W warunkach laboratoryjnych sprawdzili się w zapobieganiu zakażeniom wywołanym przez bakterie *Helicobacter pylori* i *Clostridium difficile* np. szczepionki tzw. wektorowe, wytworzone na podstawie rekombinowanych szczepów rodzaju *Salmonella* [38].

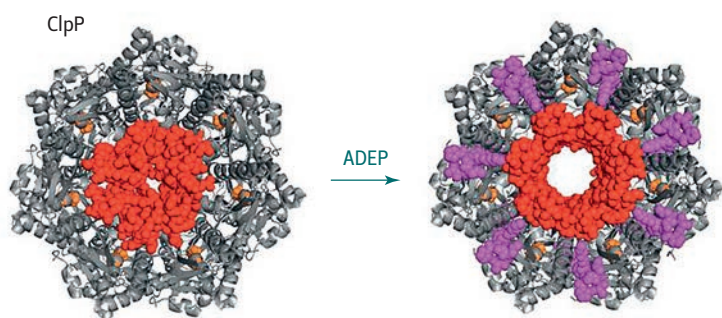
Opracowanie skutecznych, bezpiecznych, łatwych do podania szczepionek przeciwko bakteriom chorobotwórczym powinno wpłynąć na eradykację wielu chorób zakaźnych i spowodować ograniczenie stosowania antybiotyków.

Acylodepsypeptydy – nowa grupa antybiotyków o unikalnym mechanizmie działania

Prawie wszystkie bakterie wytwarzają komórki przetrwalnikowe (*persister cells*); są to uśpione komórki bakterii odporne na większość antybiotyków. Są one źródłem chronicznych i nawracających infekcji bakteryjnych. W najnowszych publikacjach przedstawiono nową klasę związków chemicznych, która skutecznie niszczy formy



Rycina 3. Struktura syntetycznej pochodnej acylodepsyptydu (ADEP4) [40]



Rycina 4. Wpływ acylodepsyptydu (ADEP) na białko podjednostki enzymu proteazy komórki bakteryjnej (ClpP) [39]

przetrawnikowe wielu bakterii, a także wykazuje aktywność przeciwko wielolekoopornym szczepom *Staphylococcus aureus*. Są to acylodepsyptydy (ADEP), których działanie polega na wpływie na funkcjonowanie enzymu komórki bakteryjnej – proteazy [39, 40]. Acylodepsyptydy powodują niekontrolowaną aktywację białka zwanego ClpP – podjednostki enzymu proteazy Clp, w wyniku czego proteaza bakteryjna zaczyna trawić własne białka.

Strukturę syntetycznej pochodnej acylodepsyptydu (ADEP4) przedstawiono na **rycinie 3**, a mechanizm działania ADEP – na **rycinie 4**.

Podjednostka enzymu proteazy ClpP tworzy dwa heptametryczne pierścienie (**rycina 4**) z centralnie położonym niewielkim otworkiem, przez który przechodzą tylko białka przeznaczone do degradacji (**rycina 4**, lewa strona). Cząsteczki ADEP (na **rycinie 4** oznaczone kolorem fioletowym) przyłączają się do białka ClpP, tworząc z nim kompleks, i rozciągają cząsteczkę ClpP z utworzeniem dużego otworu. To powoduje

niekontrolowaną możliwość „ucieczki” innych białek bakterii, powodując zniszczenie i śmierć komórki bakteryjnej.

Badania wykazały, że kombinacja ADEP z ryfampicyną powoduje całkowitą eradykację *Staphylococcus aureus* (*in vitro*) oraz w testach na modelu mysim [40].

Podsumowanie

Antybiotyki przestają być skuteczne w terapii coraz większej liczby infekcji bakteryjnych wskutek wzrostu oporności bakterii na tę grupę leków. Główną przyczyną jest ich zbyt częste stosowanie, nierzadko niezgodne z zaleceniami lekarza oraz nadmierne stosowanie w weterynarii oraz ochronie roślin.

Jednym z obiecujących narzędzi do walki z bakteriami jest metoda z zastosowaniem bakteriofagów. Bakteriofagi posiadają silne i szybkie działanie bakteriobójcze, zarówno przeciwko bakteriom Gram(+), jak i Gram(-), wąskie spektrum działania, unikatową cechą samoistnego zwiększania dawki podczas trwania infekcji. Wadą jest zdolność do kodowania genów toksyn bakteryjnych – przekształcania nieszkodliwych bakterii w patogeny. W Polsce fagoterapia jest powszechnie uważana za leczenie eksperymentalne i stosowana tylko u tych pacjentów, u których leczenie antybiotykami nie powiodło się. Średnia skuteczność terapii fagowej w przypadku zakażeń *Enterococcus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* wynosi ok. 85%. Obecnie bakteriofagi mogą stanowić alternatywę dla antybiotyków, np. w leczeniu pooperacyjnych infekcji bakteryjnych spowodowanych *P. aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej), odpornej na różne rodzaje antybiotyków. Często w takich przypadkach stosuje się „koktajl” złożony z wielu gatunków fagów. Dobre wyniki przynosi leczenie pacjentów z nawracającymi zakażeniami układu moczowego czy też przewlekłymi infekcjami zatok; jest nadzieja, że w przyszłości bakteriofagi będą stosowane u pacjentów z tzw. zespołem stopy cukrzycowej. Bakteriofagi wykorzystywane są coraz częściej w terapii zwierząt, roślin oraz do odkażania żywności.

Drugą grupą związków badanych pod kątem zastosowania w medycynie jako leki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze są peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Dotychczasowe badania kliniczne obejmują zastosowanie peptydów w terapii miejscowej ze względu na ich łatwą degradację enzymatyczną w przewodzie pokarmowym. Prowadzone są prace nad zastosowaniem odpowiednich form leku, m.in. z wykorzystaniem mikrokapsułkowania, a także rozważane jest podawanie peptydów z inhibitorami peptydaz. Na etapie badań

klinicznych są m.in. preparaty z zastosowaniem w leczeniu wrzodów stopy u chorych na cukrzycę, w meningokokowym zapaleniu opon mózgowych, do zwalczania zakażeń układu oddechowego *P. aeruginosa*, przede wszystkim towarzyszących mukowiscydozie. Zaletą omawianych peptydów jest duża szybkość działania, szerokie spektrum działania, w tym przeciw patogenom opornym na antybiotyki, natomiast jednym z ważnych ograniczeń stosowania peptydów są wysokie koszty produkcji.

Również preparaty niektórych przeciwciał monoklonalnych okazały się skuteczne w wielu ciężkich zakażeniach bakteryjnych: w leczeniu śmiertelnej postaci płucnej zakażenia łaseczką wąglika, w zakażeniach *P. aeruginosa* w przebiegu mukowiscydozy, w biegunkach bakteryjnych wywołanych toksynami wytwarzanymi przez *C. difficile*, a także w zakażeniach spowodowanych toksynami Shiga wytwarzanymi przez enterokrwotoczne szczepy *E. coli*.

Szczepionki stanowią od wielu lat uzupełniający sposób zwalczania chorób zakaźnych, w tym bakteryjnych. Na różnym etapie badań są obecnie szczepionki nowych generacji, które będą mogły stanowić ochronę przed wieloma typami chorób zakaźnych.

Nieustające badania nad nowymi antybiotykami zaowocowały odkryciem nowej grupy związków chemicznych – acylodepsypeptydów, których unikalne działanie na komórkę bakteryjną polega na ich ingerencji w funkcjonowanie proteazy bakteryjnej. Związki te skutecznie niszczą formy przetrwalnikowe wielu bakterii.

W obecnej sytuacji zbliżonej do ery przedantybiotykowej, co dotyczy głównie leczenia zakażeń wielolekoopornych, celowe wydają się dalsze prace nad omówionymi opcjami terapeutycznymi.

Otrzymano: 2014.05.20 · Zaakceptowano: 2014.05.29

Piśmiennictwo

- Mazur E., Klag S.: Mechanizmy lekooporności bakterii. *Medycyna Rodzinna* 2004, 6: 278–281.
- Dzierżanowska D.: Racjonalna antybiotykoterapia w szpitalu. Prezentacja on-line: <http://malopolskie-zakazenia.pl/pliki/terapia.ppt#278,1>.
- Markiewicz Z., Kwiatkowski A.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN 2012, rozdz. 4 i 6. <http://www.antybiotyki.edu.pl> (stan: marzec 2014).
- Fernebro J.: Fighting bacterial infections – future treatment options. *Drug Resistant Updates*. 2011, 14: 125–139.
- Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2011, 65: 167–176.
- Abedon S.T., Kuhl S.J., Blasdel B.G., Kutter E.M.: Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011, 1(2): 66–85.
- Bazan J.: Terapia fagowa jako alternatywa dla współczesnych metod ochrony przed patogenami; artykuł on-line 2011. <http://biotechnologia.pl>.
- Międzybrodzki R., Borysowski J., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 2006, 3(2): 201–205.
- <http://portalforumfarmaceutyczne.pl/>: artykuł on-line: Bakteriofagi a antybiotyki. 2011.
- Deresinski S.: Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 48: 1096–1101.
- <http://www.hyglos.de/en/technology/technological-background/bacteriophage-biology.html>.
- De Vos D., Verbeken G., Rose T., Jennes S., Pimay J.-P.: Bacteriophages for treatment of severe infections: A 'new' option for the future? *EWMA Journal* 2012, 12(2): 23–28.
- <http://www.ampliphbio.com/> (stan: marzec 2014).
- Merabishvili M., Pirnay J.P., Verbeken G., Chanishvili N., Tediashvili M., Lashkhi N., Glonti T., Krylov V., Mast J., Van Parys L., Lavigne R., Volckaert G., Mattheus W., Verween G., De Corte P., Rose T., Jennes S., Zizi M., De Vos D., Vanechoutte M.: Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* 2009, 4(3): e4944. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654153/>.
- Pirnay J.P., Verbeken G., Rose T., Jennes S., Zizi M., Huys I., Lavigne R., Merabishvili M., Vanechoutte M., Buckling A., De Vos D.: Introducing yesterday's phage therapy in tomorrow's medicine. *Future Virology* 2012, 7(4): 379–90. <http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fvl.12.24>.
- <http://www.intralytix.com/> (stan: marzec 2014).
- <http://www.proteonpharma.com/pl/> (stan: marzec 2014).
- Loc Carrillo C., Atterbury R.J., el-Shibiny A., Connerton P.L., Dillon E., Scott A., Connerton I.F.: Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *App. Environ. Mikrob.* 2005, 71(11): 6554–6563.
- Dawgul M., Kamysz W.: Naturalne antybiotyki peptydowe. *Laboratorium* 2009, 10: 12–16.
- Kamysz W.: Projektowanie, synteza i badanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Rozprawa habilitacyjna. 2007, AM w Gdańsku. Wydział Farmaceutyczny. Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej.
- Wessely-Szponder J., Bobowiec R.: Neutrofilowe obronne białka i peptydy w leczeniu zwierząt i ludzi. *Życie Weterynaryjne* 2011, 86(4): 276–281.
- Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Postępy Hig. Med. Dośw.* (on-line) 2008, 62: 694–707.
- Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A., Deptuła W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – ważny element odporności naturalnej, *Alergia Astma Immunologia* 2010, 15(1): 35–41.
- <http://www.demegen.com> (stan: marzec 2014).
- <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00563433>: MSI-78 topical cream vs. oral ofloxacin in the treatment of infected diabetic ulcers.
- Barańska-Rybak W., Szultka L., Dawgul M., Nowicki R., Roszkiewicz J., Kamysz W.: Potencjalne zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu AZS. *Przegląd Dermatologiczny* 2009, 2 (abstrakt).
- www.elusys.com (stan: marzec 2014).
- Migone T.S., Subramanian G.M., Zhong J., Healey L.M., Corey A., Devalaraja M., Lo L., Ullrich S. et al: Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *NEJM* 2009, 361(2): 135–144.
- www.pharmathene.com (stan: marzec 2014).
- Lowy I., Molrine D.C., Leav B.A., Blair B.M., Baxter R., Gerding D.N., Nichol G., Thomas W.D., Leney M., Sloan S., Hay C.A., Ambrosino D.M.: Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *NEJM* 2010, 362: 197–205.
- Bitzan M., Poole R., Mehran M., Sicard E., Brockus C., Thuning-Roberson C., Riviere M.: Safety and pharmacokinetics of chimeric anti-Shiga toxin 1 and anti-Shiga toxin 2 monoclonal antibodies in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53: 3081–3087.
- Lopez E.L., Contrini M.M., Glatstein E., Gonzalez Ayala S., Santoro R., Allende D., Ezcurra G., Teplitz E., Koyama T., Matsumoto Y., Sato H., Sakai K., Hoshida S., Komoriya K., Morita T., Harning R., Brookman S.: Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with Shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54: 239–243.
- <http://www.immunosystem.com> (stan: marzec 2014).
- www.kalobios.com (stan: marzec 2014).
- Lazar H., Horn M.P., Zuercher A.W., Imbode, M.A., Durrer P., Seiberling M., Pokorny R., Hammer C., Lang A.B.: Pharmacokinetics and safety profile of the human anti *P. aeruginosa* serotype O11 IgM monoclonal antibody KBPA-101 in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53: 3442–3446.

37. Weisman L.E., Thackray H.M., Garcia-Prats J.A., Neshin M., Schneider J.H., Fretz J., Kokai-Kun J.F., Mond J.J., Kramer W.G., Fischer G.W.: Phase 1/2 doubleblind, placebo-controlled, dose escalation, safety, and pharmacokinetic study of pagibaximab (BSYX-A110), an antistaphylococcal monoclonal antibody for the prevention of staphylococcal bloodstream infections, in very-low-birth-weight neonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53: 2879–2886.
38. Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G.: Rodzaje szczepionek przeciwbakteryjnych. *Postepy Farmacji* 2012, 3–4: 10–13.
39. Gerdes K., Ingmar H.: Killing the survivors. *Nature* 2013, 503: 347–349.
40. Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Izabella V.M., Coleman K., Leonard S.N., Smith R.D., Adkins J.N., Lewis K.: Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 2013, 503: 365–370.