



Catarina Pereiros Gromicho

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Phage therapy: a promising alternative in the treatment of bacterial infections” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Ana Patrícia Rei, da Dra. Ana Leite e Silva e da Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Catarina Pereiros Gromicho

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Phage therapy: a promising alternative in the treatment of bacterial infections” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Ana Patrícia Rei, da Dra. Ana Leite e Silva e da Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Catarina Pereiros Gromicho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013146776, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Phage therapy: a promising alternative in the treatment of bacterial infections” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 29 de Agosto de 2018.

Catarina Pereiros Gromicho

(Catarina Pereiros Gromicho)

## Agradecimentos

*Aos meus pais, por me terem proporcionado esta oportunidade e por todo o apoio ao longo destes 5 anos.*

*À Maria, Mariana, Catarina, Soraia, Inês e Nádia, por terem realizado este percurso comigo e por terem tornado todos os momentos mais especiais.*

*Ao Carlos, por ter acreditado sempre em mim, e por ter feito de Coimbra a minha casa longe de casa.*

*Aos amigos de sempre, porque não sou eu sem eles.*

*À Patrícia, Matilde, Ana Catarina, Carolina e a todo o pessoal do BD, pela melhor primeira experiência profissional que poderia ter tido.*

*A toda a equipa técnica da Farmácia Coimbra, por tudo aquilo que me ensinaram.*

*À Professora Doutora Ana Miguel Matos, por toda a ajuda, simpatia e disponibilidade.*

*A Coimbra e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por tudo o que aqui vivi e aprendi.*

# Índice

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Abreviaturas.....	7
Introdução.....	8
Análise SWOT.....	9
1. Pontos Fortes.....	10
2. Pontos Fracos.....	16
3. Oportunidades.....	16
4. Ameaças.....	19
Conclusão.....	20
Bibliografia.....	21

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Abreviaturas.....	23
Introdução.....	24
Análise SWOT.....	25
1. Pontos Fortes.....	26
2. Pontos Fracos.....	29
3. Oportunidades.....	30
4. Ameaças.....	31
Conclusão.....	33
Anexo I – Documentação relativa à preparação do medicamento manipulado.....	34

## MONOGRAFIA - Phage therapy: a promising alternative in the treatment of bacterial infections

Abstract.....	38
Resumo.....	38
Abbreviations.....	39
1. Introduction.....	40
2. Bacteriophages – Characterization.....	41
2.1. Taxonomy and morphology.....	41
2.2. Life cycles.....	43
2.3. Distribution.....	45

3. Phage therapy .....	45
3.1. Historical context .....	45
3.2. Advantages and potential limitations .....	47
3.2.1. Advantages .....	47
3.2.2. Potential limitations.....	48
3.3. Conventional phage therapy.....	51
3.3.1. Production.....	51
3.3.2. Applications.....	51
3.3.3. Administration.....	52
3.3.4. Reports.....	52
3.4. Other approaches.....	53
3.4.1. Modified phages.....	53
3.4.2. Phage enzymes.....	54
3.4.3. Combination with antibiotics .....	55
3.4.4. Biocontrol.....	56
3.5. Approved products and clinical trials.....	57
4. Conclusion .....	59
References.....	60

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Ana Patrícia Rei

## Abreviaturas

**AIM** - Autorização de Introdução no Mercado

**AM** - Assuntos Médicos

**BCS** - *Biopharmaceutical Classification System*

**BPC** - Boas Práticas Clínicas

**BPF** - Boas Práticas de Fabrico

**CEIC** - Comissão de Ética para a Investigação Clínica

**CF** - Ciências Farmacêuticas

**CRO** - *Contract Research Organization*

**EC** - Ensaios Clínicos

**EMA** - *European Medicines Agency*

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**HME** - *Hot Melt Extrusion*

**ICH** - *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

**ID** - Investigação e Desenvolvimento

**IDI** - Investigação, Desenvolvimento e Inovação

**IF** - Indústria Farmacêutica

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**QP** - *Qualified Person*

**SOPs** - *Standard Operating Procedures*

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças



## Introdução

A unidade curricular Estágio Curricular é a etapa final do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e consiste no primeiro contacto do estudante com o mundo profissional. O estágio é uma oportunidade crucial não apenas para integrar e aplicar os conhecimentos adquiridos durante todo o curso mas também para desenvolver novas competências, o que apenas é possível experienciando o dia-a-dia em contexto profissional.

Além do estágio em farmácia comunitária, optei por realizar também um estágio numa empresa farmacêutica, já que tinha interesse em explorar outra área das Ciências Farmacêuticas (CF). Durante os 9 semestres do MICF, diferentes vertentes foram abordadas nas várias unidades curriculares e, tendo em conta que aquelas que me despertavam mais curiosidade se inseriam no contexto da indústria farmacêutica (IF), candidatei-me a um estágio curricular na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica com sede em S. Martinho do Bispo, Coimbra. Iniciou a sua atividade em Fevereiro de 2001, na sequência da aquisição, por um grupo de profissionais ligados ao sector, de uma unidade industrial pertencente à multinacional alemã Bayer e é atualmente uma das empresas mais empreendedoras e inovadoras do setor farmacêutico<sup>1</sup>. A atividade da Bluepharma percorre toda a cadeia de valor do medicamento desde a Investigação e Desenvolvimento (ID) até ao mercado - investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos, produção de medicamentos próprios e para terceiros e comercialização de medicamentos genéricos<sup>1,2</sup>.

Após uma breve entrevista que tinha como objetivo definir o meu perfil e a área que mais se adequava a mim, foi-me proposto um estágio no departamento de Investigação e Inovação. O estágio curricular na Bluepharma decorreu entre 8 de janeiro de 2018 e 29 de março de 2018 no departamento de Investigação e Inovação, no setor de Assuntos Médicos (AM), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Ana Patrícia Rei. A atividade dos AM consiste maioritariamente na gestão de ensaios clínicos de fase I, elaboração de planos de desenvolvimento clínico e contacto com entidades externas (parceiros, clientes e entidades contratadas).

## Análise SWOT

O presente relatório tem como finalidade descrever as atividades realizadas e conhecimentos adquiridos durante o estágio sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*). A análise SWOT é uma ferramenta de gestão largamente utilizada pelas empresas, independentemente da área em que atuam, e divide-se em duas vertentes: análise interna (Pontos fortes e Pontos fracos) e análise externa (Oportunidades e Ameaças). Assim, o relatório consiste numa análise dos fatores que marcaram tanto positivamente como negativamente o estágio, das oportunidades adicionais que este me proporcionou e ainda dos fatores que possam ter ameaçado o seu sucesso.

**Tabela I – Análise SWOT**



## I. Pontos Fortes

### I.1. Acolhimento e integração

O estágio curricular na Bluepharma teve início com uma breve reunião com todos os estagiários e novos colaboradores, na qual foram explicados alguns detalhes relativos ao funcionamento da empresa e à realização do estágio, seguida de uma visita às instalações onde foram apresentados os diferentes departamentos e respetivos colaboradores, assim como os espaços comuns da empresa. Além do acolhimento inicial, o programa da Bluepharma inclui formações em diversas áreas durante as primeiras semanas, nomeadamente formações sobre o Sistema informático, Sistema documental e de gestão de processos, Boas Práticas de Fabrico (BPF), Ambiente, saúde e segurança, Melhoria contínua, Farmacovigilância e Investigação, desenvolvimento e inovação (IDI). Considero que o plano de acolhimento foi decisivo na minha rápida integração ao proporcionar o contacto com os vários departamentos e setores, além de ter possibilitado o enquadramento no funcionamento de uma empresa farmacêutica e na política e valores específicos da Bluepharma.

### I.2. Ambiente de trabalho

Desde o primeiro dia que a minha experiência na Bluepharma foi marcada pela simpatia e disponibilidade de todos aqueles com quem contactei. Desta forma, penso que o excelente ambiente de trabalho em que o meu estágio decorreu foi fundamental para o seu sucesso. Ao longo de 3 meses e, mais concretamente no setor de Assuntos Médicos, convivi diariamente com uma equipa extraordinária, unida, jovem e dinâmica. Neste contexto, acompanhada por profissionais que sempre estiveram recetivas e disponíveis para me ensinar e ajudar e que sempre me orientaram e motivaram, desenvolvi extensamente os meus conhecimentos e capacidades.

### I.3. Aquisição de conhecimentos e realização de atividades no âmbito da gestão de Ensaios Clínicos

Inicialmente, comecei por me familiarizar com alguns dos documentos de relevo para o setor, nomeadamente os procedimentos internos ou SOPs (*Standard Operating Procedures*) relativos aos ensaios clínicos (EC) promovidos pela Bluepharma e as Boas Práticas Clínicas (BPC), *guideline* da ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) que compreende os *standards* segundo os quais os EC devem ser desenhados, conduzidos, monitorizados, auditados, documentados e relatados. Esta

*guideline* visa também assegurar que os direitos, a integridade e a confidencialidade dos sujeitos são protegidos.

Durante o estágio recebi formação por parte das várias colaboradoras do setor sendo que a primeira destas formações foi relativa às bases de dados utilizadas. Nela tive oportunidade de conhecer a base de dados Cortellis, uma plataforma que integra informação sobre fármacos no mercado ou ainda em desenvolvimento, e onde é possível ter acesso a informação relativa a inúmeros conteúdos nomeadamente os ensaios clínicos realizados ou a decorrer. Ao ser possível pesquisar não apenas pelo nome do fármaco mas também por produto, forma farmacêutica ou indicação terapêutica, entre outros critérios, assim como aplicar diversos filtros, esta ferramenta revelou-se de extrema utilidade para a recolha de informação sobre produtos específicos assim como sobre possíveis competidores. Nesta formação contactei também com os *sites* de relevo para o setor, nomeadamente as bases de dados de fármacos da FDA (*Food and Drug Administration*) e da EMA (*European Medicines Agency*), e o ClinicalTrials.gov, o registo de EC da *U.S. National Library of Medicine*. Esta formação serviu de base a grande parte do trabalho que desenvolvi durante o estágio, a elaboração de documentos resumo sobre um determinado produto/molécula. Este documento resumo é preparado aquando da análise de uma nova ideia de produto ou na fase inicial de um projeto e permite avaliar o seu potencial e os riscos de desenvolvimento. Posteriormente, estes documentos servem de apoio para a elaboração de planos de desenvolvimento clínico preparados no setor de AM.

No que diz respeito à gestão de ensaios clínicos propriamente dita, o setor de AM da Bluepharma gere essencialmente EC que servem como base à submissão de AIMS (Autorização de Introdução no Mercado) para medicamentos genéricos, ou seja, maioritariamente EC de fase I e, dentro destes, de bioequivalência. Os ensaios de fase I são realizados com um pequeno número de voluntários, normalmente saudáveis, e têm como principais objetivos traçar o perfil farmacocinético do fármaco, analisar a sua tolerabilidade e, por vezes, avaliar a existência de interações com outros fármacos ou o efeito dos alimentos na biodisponibilidade. Não é exigido aos medicamentos genéricos que estes realizem os mesmos ensaios clínicos e não-clínicos que os produtos inovadores, mas sim que seja demonstrado a sua bioequivalência. Dois medicamentos que contenham a mesma substância ativa são considerados bioequivalentes se forem equivalentes farmacêuticos (medicamentos que contêm a mesma substância ativa, na mesma dose e na mesma forma farmacêutica) ou alternativas farmacêuticas e se as respetivas biodisponibilidades (velocidade e extensão de absorção) após administração na mesma dose molar estiverem dentro de

certos limites predefinidos. Estes limites têm como objetivo assegurar comparabilidade *in vivo*, ou seja, em termos de eficácia e segurança<sup>3</sup>. É por isso extraordinariamente importante analisar em detalhe o produto inovador, sendo que a informação pertinente é incluída nos documentos resumo acima mencionados. A elaboração destes consiste no preenchimento de um *template* Excel com informação detalhada relativa ao produto de referência, informações gerais como dosagens e indicações terapêuticas e características físico-químicas da molécula, dados de farmacocinética, segurança, bioanálise e ensaios clínicos. É também incluída informação da *Product-Specific Guidances for Generic Drug Development* e da *Product-specific bioequivalence guidance, guidances* da FDA e da EMA, respetivamente, que representam para aquele produto em específico, as recomendações destas autoridades para a condução dos ensaios de Bioequivalência e Biodisponibilidade. Estas recomendações incluem o número e o tipo de estudo (com ou sem alimentos), o desenho, as dosagens, os sujeitos (saudáveis ou doentes, o sexo e outras condições especiais), os analitos (fármacos e metabolitos) que devem ser medidos, entre outras informações e são, por isso, recomendações valiosas para promover o sucesso do ensaio clínico e conseqüentemente a aprovação do medicamento genérico.

No início do estágio recebi também uma formação indispensável no âmbito dos procedimentos internos associados à atividade da Bluepharma enquanto promotor de EC, onde tive oportunidade de compreender todas as responsabilidades inerentes a essa função, incluindo aquelas que são delegadas a CROs (*Contract Research Organization* - pessoas ou organizações contratadas para realizar uma ou mais funções do promotor na realização do ensaio clínico). Um gestor de EC tem como responsabilidade ser o ponto de contacto interno com os vários setores da Bluepharma e externo com todas as entidades subcontratadas e parceiros. Nesta formação conheci também todo o processo desde a elaboração do documento resumo, passando pela aprovação do ensaio (em Portugal pelo Infarmed e pela CEIC – Comissão de Ética para a Investigação Clínica), pela sua realização (incluindo o envio do medicamento, a individualização da medicação e a retenção de amostras) até à submissão do relatório final às autoridades competentes. Além disso, tive contacto com os diversos documentos relevantes do ensaio clínico, nomeadamente os contratos entre a Bluepharma e as várias CROs e o protocolo clínico (documento que descreve os objetivos, desenho, metodologia, considerações estatísticas e organização de um ensaio clínico).

Outra formação que importa salientar foi a formação que recebi relativamente à monitorização de EC. A monitorização consiste na supervisão do progresso do ensaio

clínico e tem como objetivo assegurar que este é conduzido de acordo com o protocolo, os SOPs, a BPC e os requisitos regulamentares aplicáveis. A monitorização de EC é uma atividade subcontratada pela Bluepharma a uma CRO. No entanto, é da responsabilidade do promotor rever os relatórios de monitorização elaborados pelo monitor. No decorrer do ensaio clínico, o monitor realiza várias visitas de monitorização, sendo que o número, frequência e duração das visitas é impactado pelo desenho do estudo. Após cada uma das visitas o monitor elabora um relatório que é enviado ao promotor para revisão. Nas diferentes visitas são analisados diferentes parâmetros, as inconsistências encontradas são relatadas e o seu estado atualizado no relatório seguinte. Além destas atividades, o setor de AM realiza também co-monitorização, visitas ao local onde está a ser realizado o estudo, acompanhando o monitor no decorrer das suas tarefas.

Por último, considero oportuno fazer referência a uma das atividades que realizei, a elaboração do *draft* de um *form* para a libertação final de um lote para ensaio clínico. A libertação de um lote para utilização num ensaio é feita em dois passos: em primeiro lugar o lote é libertado pela QP (*Qualified Person*), que atesta a qualidade do seu fabrico; em segundo, e após o seu envio para o local de realização do ensaio clínico e análise dos registos de temperatura e humidade durante o transporte, o lote é libertado pelos AM e é autorizada a individualização da medicação. Sendo que a libertação pela QP é realizada através de um documento próprio, o meu trabalho tinha como objetivo desenvolver um documento específico para a libertação pelos AM, incluindo nele informação sobre o produto, o ensaio clínico e as condições durante o transporte.

Além das formações específicas e atividades que desenvolvi, importa destacar que durante os 3 meses que passei no setor de AM acompanhei diariamente as comunicações com diversas entidades e o progresso dos diversos projetos em desenvolvimento.

#### 1.4. Participação num grupo de trabalho de análise de ideias

O grupo de trabalho de análise de ideias é um grupo multidisciplinar que tem como objetivo estudar o potencial de desenvolvimento de produtos inovadores e do qual fazem parte colaboradores dos departamentos de Investigação e Inovação, do Desenvolvimento do Negócio e do Desenvolvimento Analítico e Galénico. Em conjunto, e em reuniões periódicas, são apresentadas diferentes ideias de projeto e o seu potencial de desenvolvimento é analisado tanto na vertente tecnológica como comercial e estratégica.

Paralelamente à realização de atividades específicas do setor de AM, e desde o início do estágio, colaborei também com este grupo de trabalho. A minha participação consistiu maioritariamente na análise primária de algumas ideias com o objetivo de serem selecionadas para apresentação nas reuniões seguintes. Esta análise incluía diversos pontos, nomeadamente um estudo dos produtos já comercializados, recolha de dados de mercado, dados de farmacocinética e características físico-químicas da molécula, análise de informações contidas em patentes e referência a possíveis competidores. Uma dessas ideias foi escolhida para uma análise posterior mais detalhada e, por isso, tive oportunidade de continuar a acompanhar este projeto e realizar a fase seguinte, que consiste no preenchimento de um documento interno com os dados já reunidos e também com informação adicional relativa à formulação, processo de fabrico, dados clínicos, entre outros aspetos. Durante a minha colaboração com este grupo, acompanhei sobretudo ideias de projetos a serem desenvolvidos com recurso a uma tecnologia designada por *Hot Melt Extrusion* (HME).

Foi sem dúvida um enorme privilégio ter participado neste projeto e ter tido oportunidade de entender o percurso de uma ideia desde o início até se transformar num produto, assim como compreender a dificuldade que uma empresa farmacêutica tem em tomar decisões acerca do desenvolvimento de produtos inovadores.

### 1.5. Formação contínua

Além das formações específicas que recebi no âmbito da gestão de EC, tive também oportunidade de estar presente em diversas formações tanto do setor de AM como transversais a vários departamentos da empresa. A participação nestas formações foi uma mais-valia já que permitiu ampliar os meus conhecimentos noutros domínios além das atividades específicas dos AM, tendo assim enriquecido a minha formação como futura profissional. De entre elas destaco a formação em Propriedade Intelectual, a formação numa base de dados de *Patent Intelligence* e um *Webinar* sobre correlação *In Vitro In Vivo*.

### 1.6. Promoção da autonomia e do sentido crítico

Um dos pontos fortes deste estágio foi sem dúvida o facto de ter permitido desenvolver a minha autonomia e sentido crítico e penso que o facto de o estágio ter sido extremamente prático e não observacional foi essencial neste processo. Assim sendo, e apesar de todas as minhas tarefas terem sido devidamente orientadas, tive o espaço necessário não só para as realizar mas também para procurar soluções para os obstáculos que surgiram. Além disso,

no decorrer dos diversos trabalhos de pesquisa que efetuei tive contacto com bases de dados e *sites* inicialmente desconhecidos, o que também desenvolveu a minha autonomia ao ter que me familiarizar com os mesmos. Relativamente à promoção do sentido crítico, grande parte do trabalho que realizei envolveu selecionar e compilar informação, tarefas que pressupõem uma análise detalhada da informação e a opção por aquela considerada adequada.

Considero que estas duas características são fulcrais para qualquer farmacêutico, mas em particular para um farmacêutico que exerça funções na área de ID na indústria farmacêutica, um domínio onde é constantemente necessário tomar decisões em relação ao futuro dos projetos com base em informação recolhida e resultados obtidos. Como exemplo, no grupo de trabalho de análise de ideias, tive oportunidade de analisar vários fármacos com base em alguns critérios com o intuito de selecionar aqueles com potencial para serem desenvolvidos, processo que obviamente requer um forte sentido crítico.

## 1.7. Comunicação e execução de tarefas em Língua Inglesa

O domínio da Língua Inglesa é atualmente uma competência fundamental para qualquer profissional e, portanto, ter tido a possibilidade de a desenvolver foi sem dúvida uma vantagem.

No setor de AM todas as comunicações (quer seja com clientes, CROs, e independentemente de serem ou não portugueses) são feitas em inglês e ao longo do meu estágio acompanhei as comunicações relativas a diferentes projetos em desenvolvimento. Também no decorrer das várias pesquisas que efetuei foi necessário utilizar os meus conhecimentos nesta língua já que tanto as bases de dados utilizadas como os *sites* de relevo para o setor estão em inglês. Contudo, considero que o fator principal que promoveu o desenvolvimento desta competência foi o facto de todo o trabalho realizado ter sido em inglês, quer os documentos resumo como as apresentações no âmbito das análises de ideias, mesmo quando o objetivo era apenas a partilha com outros colaboradores da empresa. Sendo assim, acredito que os meus conhecimentos de inglês foram decisivos para a execução com sucesso das tarefas delegadas e que foi sem dúvida benéfico ter tido oportunidade de os pôr em prática e aperfeiçoar a sua aplicação.

## 1.8. Colaboração com profissionais de diferentes áreas

Ao longo dos 3 meses que estagiei na Bluepharma colaborei não só com farmacêuticos mas também com profissionais com formações variadas, o que me permitiu perceber o



quanto esta colaboração é positiva para todos e, conseqüentemente, para a empresa. Profissionais distintos têm conhecimentos diferentes e, por isso, esta junção promove a partilha de conhecimentos e enriquece todos os colaboradores, incluindo eu própria que durante o estágio beneficiei deste dinamismo e pude aprender com todos aqueles com quem contactei.

## 2. Pontos Fracos

### 2.1. Duração do estágio

No final deste estágio reconheço que embora o ideal fosse o aluno ter a possibilidade de percorrer vários setores ou departamentos para ter uma percepção ainda melhor do funcionamento de uma IF, seria inviável que isto ocorresse num estágio curricular e, sendo assim, é mais proveitoso que o estudante esteja inserido apenas num setor e possa adquirir conhecimentos mais extensos e realizar atividades numa área específica.

No entanto, mesmo decorrendo apenas num setor, na minha opinião o estágio numa empresa farmacêutica deveria ter uma duração maior para que tanto o aluno como a empresa pudessem usufruir ainda mais desta experiência já que ao fim de 3 meses o estagiário já está totalmente integrado e os conhecimentos adquiridos permitem-lhe desempenhar cada vez mais funções.

## 3. Oportunidades

### 3.1. Desenvolvimento de competências de informática na ótica do utilizador

Uma das oportunidades que o estágio me proporcionou foi desenvolver as minhas competências de informática na ótica do utilizador, que são atualmente uma mais-valia para profissionais nas mais variadas áreas. Na execução das minhas tarefas utilizei maioritariamente a folha de cálculo Microsoft Excel<sup>®</sup>, sendo que esta utilização diária possibilitou o aumento da minha destreza na utilização do programa e também a descoberta de inúmeras funcionalidades úteis especialmente na construção de tabelas. Além da folha de cálculo Microsoft Excel<sup>®</sup> tive contacto com outra ferramenta com a qual não estava

familiarizada, o Microsoft Outlook<sup>®</sup>, sendo este o meio utilizado nas comunicações e no planeamento de reuniões e outras tarefas.

### 3.2. Compreensão do funcionamento de uma empresa farmacêutica e de um departamento de Investigação e Inovação

No decorrer do meu estágio fiquei a conhecer não só o funcionamento do setor de AM, mas também de todo o departamento de Investigação e Inovação, o que foi facilitado pela minha presença em diversas reuniões, nomeadamente a reunião geral de departamento, onde pude entender melhor a sua organização assim como as tarefas específicas de cada setor e os diferentes projetos em desenvolvimento.

Além disso, durante o quotidiano na empresa, ao ter contacto com outros departamentos que colaboram com o setor de AM e ao ter participado nas várias formações de acolhimento, compreendi também a organização geral de uma IF e o papel de cada departamento, conhecimento que considero extremamente valioso para alguém que tenha interesse em integrar uma empresa farmacêutica enquanto futuro profissional.

### 3.3. Contacto com uma vertente distinta das CF

A oportunidade mais valiosa que o estágio me proporcionou foi inquestionavelmente o contacto com o universo dos ensaios clínicos e com o dia-a-dia de um profissional enquanto gestor destes. Desde o início do estágio que esta vertente das CF, anteriormente pouco conhecida por mim, me despertou imenso interesse e sempre me senti motivada a aprender mais sobre ela.

Penso que esta é a grande vantagem de um estágio relativamente à componente teórica lecionada durante o MICF, permitir conhecer novas realidades e experienciar áreas menos convencionais das CF, assim como definir ideias e objetivos mais assertivos do profissional que cada um pretende ser enquanto futuro farmacêutico.

### 3.4. Familiarização com a tecnologia de *Hot Melt Extrusion*

No âmbito da análise de ideias colaborei com um grupo de trabalho que se dedica à aplicação da tecnologia de HME no desenvolvimento de fármacos e, assim sendo, tive possibilidade de a estudar e compreender a sua utilização na IF.

Esta tecnologia consiste no processamento de materiais poliméricos acima da sua temperatura de transição vítrea para alcançar uma mistura a nível molecular dos compostos

ativos com os polímeros. O princípio ativo e os excipientes são depositados no extrusor e todos os componentes são misturados e posteriormente moldados através da passagem sob pressão num orifício<sup>4</sup>.

HME é um processo bem conhecido, desenvolvido para produzir polímeros de densidade e forma uniformes. A sua aplicação a nível industrial teve início nos anos 30, e atualmente é um dos processos mais utilizados nas indústrias alimentar, da borracha e do plástico<sup>5</sup>. Na indústria farmacêutica esta tecnologia é utilizada desde 1971, sendo extremamente versátil, é aplicada na produção de diversas formas farmacêuticas como comprimidos, implantes, transdérmicos ou formulações orodispersíveis<sup>6</sup>.

Atualmente, estima-se que mais de 50% dos fármacos em desenvolvimento pertençam à BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) Classe 2, ou seja, são caracterizados por terem baixa solubilidade, e conseqüentemente, dão origem a formulações com baixa biodisponibilidade. Existe, por isso, uma necessidade crítica na IF de desenvolver formulações que aumentem a solubilidade e a biodisponibilidade destes compostos<sup>7</sup>.

Foi neste contexto que se desenvolveu o meu trabalho com esta tecnologia, na tentativa de desenvolver por HME fármacos com conhecida baixa biodisponibilidade. Ao longo do estágio, além de ter adquirido conhecimento sob a tecnologia em si, tive também oportunidade de compreender que HME é assim reconhecida como uma tecnologia promissora não só para o desenvolvimento de novas entidades químicas mas também para a melhoria de produtos já existentes no mercado.

### 3.5. Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos durante o MICF

Embora os meus conhecimentos relativamente à gestão de EC fossem limitados, a formação durante o MICF foi sem dúvida útil no decorrer do trabalho que realizei. De entre as unidades curriculares que contribuíram para essa formação destaco Farmacologia Geral e Biofarmácia e Farmacocinética pelos conhecimentos adquiridos relativamente às áreas de farmacocinética, administração, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos, sendo que estes eram pontos fundamentais das diversas análises que realizei, a formação aprofundada que tenho destes conceitos revelou-se fundamental. Além destas, saliento ainda as unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica pelos conhecimentos adquiridos no âmbito das diferentes formas farmacêuticas, formulações e processos de fabrico, já que principalmente no decurso da minha participação no grupo de trabalho de análise de ideias, e

ao ter contacto com produtos muito variados, tive necessidade de os aplicar e estes foram também a base para a minha aprendizagem subsequente.

## 4. Ameaças

### 4.1. Formação limitada na área de EC durante o MICF

A escassa formação na área de EC incluída no plano de estudos do MICF foi a principal ameaça que senti durante o estágio já que apenas tinha noções básicas de conceitos como a classificação e os diferentes tipos de EC. A maioria dos conhecimentos que possuía neste âmbito foram lecionados nas unidades curriculares de Deontologia e Legislação Farmacêutica e Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia e, sendo assim, enquadravam-se nas vertentes da ética e regulamentação da realização de EC e na segurança e farmacovigilância dos mesmos. Assim, embora tivesse apreendido alguns conceitos como os de promotor, investigador e monitor, a perspetiva de gestão de EC enquanto promotor dos mesmos e todo o processo subjacente eram totalmente desconhecidos por mim.

Apesar de compreender que nem todas as saídas profissionais possam ser extensivamente abordadas ao longo do curso, penso que poderia ser mencionado o ponto de vista da IF na realização de EC, ou seja, o papel do farmacêutico enquanto promotor e não apenas como monitor ou regulador. Isso iria certamente despertar alguns alunos para este aspeto dos EC, além de também dar a conhecer uma vertente menos evidente da IF, já que a indústria é frequentemente retratada apenas na sua dimensão laboratorial e muitas áreas como a gestão de EC não são exploradas.

## Conclusão

A possibilidade de realizar mais do que um estágio curricular, e em áreas além da farmácia comunitária ou hospitalar, é sem dúvida uma mais-valia proporcionada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Tendo em conta que o farmacêutico é um profissional extremamente versátil e que as atividades por si desempenhadas se estendem a todo o ciclo de vida do medicamento, é um desafio muito grande para a Faculdade conseguir explorar todas as vertentes. Assim, a realização de um estágio adicional permite aos alunos ter contacto com áreas nas quais têm interesse em desenvolver os seus conhecimentos e também conhecer outras em que o papel do farmacêutico é menos claro.

Considero que esta experiência foi uma etapa fundamental do meu percurso enquanto futura farmacêutica e que foi realmente um privilégio ter conhecido o quotidiano de uma empresa com grande foco no IDI como a Bluepharma, assim como de um departamento de ID e de um setor de Assuntos Médicos. Além de ter adquirido imensos conhecimentos no âmbito dos EC, realizei também atividades transversais a outras áreas e desenvolvi competências como a autonomia e o espírito crítico, sendo que toda esta formação contribuiu significativamente para o meu enriquecimento tanto profissional como pessoal. Penso também que o estágio me conferiu uma preparação adicional para o contacto com o mercado de trabalho, já que tive a possibilidade de adquirir experiência em contexto profissional, algo que não é possível ser transmitido durante a formação teórica no MICE. Globalmente, esta experiência superou as minhas expectativas e marcou de forma positiva aquela que é etapa final do meu percurso académico.

## Bibliografia

1. **Bluepharma – About.** [Acedido a 26 de março 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about.php>
2. **Bluepharma Group.** [Acedido a 26 de março 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/bluepharmagroup.php>
3. **European Medicines Agency – Guideline on the Investigation of Bioequivalence.** [Acedido a 1 de abril de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf)
4. **Thermo Fisher Scientific – Hot Melt Extrusion.** [Acedido a 5 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/pharmabiopharma/drug-formulation-manufacturing/hot-melt-extrusion.html>
5. **Particle Sciences – Hot Melt Extrusion.** [Acedido a 5 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/hot-melt-extrusion.html>
6. REPKA, M.A., BANDARI, S., KALLAKUNTA, V.R., VO, A.Q., MCFALL H., PIMPARADE M.B., BHAGURKAR, A.M. – **Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review.** Int J Pharm. 535, 1-2 (2018) 68-85.
7. PATIL, H., TIWARI, R.V., REPKA, M.A. – **Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation.** AAPS PharmSciTech. 17, 1 (2016) 20-42.

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



farmácia coimbra

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Ana Leite e Silva

## Abreviaturas

**CF** - Ciências Farmacêuticas

**FC** - Farmácia Coimbra

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças



## Introdução

O estágio curricular constitui o último semestre do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e é por isso o culminar de 5 anos de formação e a primeira experiência dos estudantes enquanto profissionais. Apesar de já ter realizado um estágio de verão em farmácia comunitária, considero que devido à duração e condição de estágio curricular, este é o estágio que permite viver realmente o dia-a-dia de um farmacêutico comunitário e desempenhar todas as atividades inerentes a esta profissão. Por estas razões, penso que esta é uma etapa imprescindível na formação dos futuros farmacêuticos e proporciona oportunidades excecionais de formação académica e crescimento pessoal.

O estágio decorreu na Farmácia Coimbra (FC), que se localiza no CoimbraShopping e é propriedade da empresa Walk on By, Lda. A farmácia pertence ao grupo STS (Still the Same), um grupo gestor de farmácias com funções essencialmente na área financeira e do qual fazem parte outras farmácias do país, nomeadamente farmácias localizadas no Porto, em Braga, Leiria e Faro.

O estágio curricular na Farmácia Coimbra decorreu entre 2 de abril e 21 de julho de 2018, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Ana Leite e Silva.

## Análise SWOT

O presente relatório tem como finalidade descrever as atividades realizadas e conhecimentos adquiridos durante o estágio sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*). A análise SWOT é uma ferramenta de gestão largamente utilizada pelas empresas, independentemente da área em que atuam, e divide-se em duas vertentes: análise interna (Pontos fortes e Pontos fracos) e análise externa (Oportunidades e Ameaças). Assim, o relatório consiste numa análise dos fatores que marcaram tanto positivamente como negativamente o estágio, das oportunidades adicionais que este me proporcionou e ainda dos fatores que possam ter ameaçado o seu sucesso.

**Tabela I – Análise SWOT**



## I. Pontos Fortes

### I.1. Estruturação do plano de estágio

O planeamento do estágio por parte da Dr.<sup>a</sup> Ana Leite foi sem dúvida um fator decisivo no sucesso do mesmo e permitiu que todo o processo decorresse de forma lógica com o objetivo de proporcionar a melhor formação possível e de acordo com a evolução dos meus conhecimentos e capacidades enquanto estagiária.

No início do estágio, comecei por desempenhar tarefas de *back office*. Estas consistiam maioritariamente no processo de receção de encomendas e reposição de medicamentos no *robot* e nas gavetas e prateleiras. Esta fase foi especialmente importante porque me permitiu ter contacto com a maioria dos produtos da farmácia, o que agilizou posteriormente o atendimento ao balcão pois nesta fase já me encontrava completamente familiarizada com os produtos e os seus respetivos locais.

Outra atividade que realizava diariamente era a receção das reservas. A Farmácia Coimbra utiliza a função do Sifarma 2000<sup>®</sup> que permite criar reservas durante o atendimento. Assim, no caso de a farmácia não possuir o produto pretendido é realizada uma encomenda instantânea e criada uma reserva na ficha do cliente, posteriormente, quando a encomenda é recebida, é possível consultar as reservas pendentes para cada produto e marcá-las como recebidas. Em seguida, cada cliente é informado de que o medicamento reservado já se encontra disponível e estes medicamentos são colocados numa zona específica e divididos por reservas pagas ou não pagas e por ordem alfabética para facilitar a sua identificação durante a entrega. Esta tarefa revelou-se fulcral já que este é um processo complexo e entendê-lo numa fase precoce foi essencial para poder realizar todas as ações subjacentes.

Desde o início do estágio que também colaborei com as farmacêuticas responsáveis pela conferência do receituário neste processo. Apesar de as receitas manuais já não serem tão comuns, estas ainda surgem na farmácia e é necessário certificar que todos os parâmetros estão corretos antes do seu envio. No caso da FC, como pertence a um grupo, as receitas não são enviadas diretamente ao Centro de Conferência de Faturas mas sim a uma unidade do grupo que faz o envio de todas as receitas posteriormente. Outra atividade na qual também colaborei diversas vezes foi a preparação de um medicamento manipulado, uma Solução Oral de Cloridrato de Propranolol a 0.5% (m/V), que é frequentemente preparada na farmácia (Anexo I).

Durante as primeiras semanas, além das tarefas acima mencionadas, realizei também alguns serviços farmacêuticos que a farmácia disponibiliza como a medição da tensão arterial, glicémia e colesterol total. Estas atividades constituíram o primeiro contacto com os utentes da farmácia e foram fundamentais na aprendizagem de relacionamento com o público.

Após esta fase, comecei a assistir aos atendimentos de alguns elementos da equipa técnica. Esta atividade foi extremamente importante visto que me permitiu conhecer as rotinas do atendimento, entender o funcionamento básico do Sifarma 2000<sup>®</sup> e compreender algumas especificidades da FC, como a ficha de pontos. Além disso, adquiri formação indispensável relativa ao aconselhamento de medicamentos e outros produtos. Assim, quando iniciei o atendimento ao balcão já me encontrava familiarizada com os produtos, as rotinas e as dinâmicas da farmácia, o que possibilitou uma transição fluida do *back office* para o balcão.

Importa ainda referir que ao longo do estágio realizei várias reuniões com a Dr.<sup>a</sup> Ana com o objetivo de perceber aquilo que já tinha aprendido e as dificuldades sentidas e também delinear o plano para as semanas seguintes. Durante estas reuniões eram também esclarecidas diversas dúvidas e partilhada informação pertinente relativa a novas atividades.

## 1.2. Dimensão da Farmácia

Um dos pontos fortes do estágio foi inquestionavelmente o facto de ter ocorrido numa farmácia de grandes dimensões. Este aspeto permitiu o contacto com uma grande diversidade de produtos, o que não aconteceria numa farmácia de menores dimensões. Além do grande número de MSRM (Medicamentos Sujeitos a Receita Médica) permanentemente em *stock*, a Farmácia Coimbra possui uma ampla variedade de MNSRM (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica), produtos de dermocosmética, puericultura, higiene oral, cuidados capilares, o que possibilitou não só desenvolver os meus conhecimentos sobre inúmeros produtos mas também proporcionar um aconselhamento mais personalizado de acordo com as necessidades de cada utente.

## 1.3. Localização e horário da Farmácia

A localização e horário da Farmácia são também duas características que considero decisivas para o sucesso do estágio. Embora o cliente-tipo da maioria das farmácias seja o idoso, e esse seja também o caso da FC, a localização da farmácia num centro comercial em conjunto com o horário alargado promove uma grande diversidade de clientes, o que permite ao estagiário ter contacto com pessoas de diferentes faixas etárias, com

necessidades e expectativas muito diversas. Assim, foi necessário adaptar-me a variadas situações e aprender a lidar com cada uma delas, o que contribuiu para a minha formação enquanto estagiária. Além disso, ao contactar com pessoas muito diferentes e com a respetiva medicação ou necessidade de aconselhamento, tive também oportunidade de me familiarizar com um maior número de produtos e também ter contacto com alguns cuja venda é menos frequente.

#### 1.4. Formações externas

Ao longo do estágio participei em diversas formações dadas por elementos das próprias marcas, nomeadamente das marcas Isdin<sup>®</sup>, Bioderma<sup>®</sup>, Uriage<sup>®</sup>, Curaprox<sup>®</sup>, La Roche-Posay<sup>®</sup>, entre outras. Estas formações foram uma oportunidade fundamental para desenvolver os meus conhecimentos acerca das respetivas marcas e produtos já que me permitiram adquirir conhecimentos adicionais àqueles transmitidos pela equipa técnica. Estas formações têm como objetivo dar a conhecer uma nova gama ou simplesmente mostrar as diferentes linhas da marca e além da informação teórica que é dada relativamente à composição, propriedades, conselhos de utilização e orientações para o aconselhamento dos produtos, é também possível experimentar alguns e assim ter uma melhor perceção das suas características como a textura e o cheiro, o que é especialmente útil para o posterior aconselhamento dos mesmos.

#### 1.5. Promoção da autonomia e do sentido crítico

Tendo em conta as características práticas de um estágio em farmácia comunitária, é natural que este permita desenvolver extensivamente a autonomia e o sentido crítico do estagiário. O atendimento ao balcão é uma atividade que implica que o estagiário seja autónomo na realização de todo o processo subjacente ao mesmo e tome variadas decisões tendo em conta os seus conhecimentos, embora sempre com o apoio da equipa técnica quando necessário. Além disso, o aconselhamento e a dispensa de medicamentos pressupõem um forte sentido crítico visto que é necessário tomar decisões de acordo com as características específicas de cada situação.

Considero assim que o desenvolvimento destas duas capacidades foi um ponto forte do estágio, visto que ambas são uma mais-valia para qualquer profissional e esta foi uma das várias formas em que o estágio contribuiu extensivamente para a minha formação enquanto futura farmacêutica.

## 1.6. Equipa técnica jovem

O facto de a equipa técnica da Farmácia Coimbra ser constituída por farmacêuticos jovens facilitou a minha integração e permitiu a partilha de conhecimentos de forma espontânea. Além disso, esta proximidade fez com que todos estivessem sempre disponíveis para esclarecer qualquer dúvida ou ajudar no que fosse necessário.

## 2. Pontos Fracos

### 2.1. Inexistência de alguns serviços farmacêuticos

A Farmácia Coimbra disponibiliza alguns serviços farmacêuticos, nomeadamente a administração de alguns medicamentos e a existência de consultas de nutrição. Apesar disso, não possui outros como programas de adesão à terapêutica, revisão da medicação ou acompanhamento farmacoterapêutico. Tendo em conta que estes são serviços para os quais é dada formação em diversas unidades curriculares durante o MICF, seria benéfico para o estagiário poder colocar esses conhecimentos em prática durante o estágio curricular. Além disso, estes serviços são uma mais-valia para a comunidade e podem ter um grande impacto na qualidade de vida das pessoas em questão. Por estas razões, considero que a sua inexistência foi um ponto fraco do estágio.

### 2.2. Preparação reduzida de medicamentos manipulados

A Farmácia Coimbra pertence a um grupo de farmácias e, dado que a preparação de medicamentos manipulados está centralizada numa das farmácias do grupo, esta ocorre apenas num pequeno número de situações na farmácia Coimbra. Assim, durante o estágio curricular, apenas observei e participei na preparação de um único medicamento manipulado cuja preparação é feita 2 vezes por mês. Sendo que o conhecimento e experiência relativos à preparação de manipulados são uma vantagem para qualquer farmacêutico, gostaria de ter tido a oportunidade de participar na preparação de diferentes medicamentos e, por esse motivo, penso que este foi um ponto fraco do estágio.

### 3. Oportunidades

#### 3.1. Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos durante o MICF

Ao longo do MICF, diversas unidades curriculares contribuíram para a minha formação enquanto estagiária em farmácia comunitária. De entre elas destaco as unidades curriculares de Farmacologia, Farmacoterapia e Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia, uma vez que considero que estas foram as unidades curriculares que me forneceram os conhecimentos necessários para o desempenho das funções de farmacêutico comunitário. O estágio curricular foi sem dúvida uma excelente oportunidade para os integrar, aplicar em contexto real e ainda ampliá-los.

#### 3.2. Compreensão do funcionamento de uma farmácia e do quotidiano de um farmacêutico comunitário

Ao longo do estágio tive a possibilidade de entender o funcionamento de uma farmácia desde as principais rotinas às tarefas desempenhadas pela equipa técnica além do atendimento ao balcão. Assim, foi possível ter uma visão geral daquilo que é o dia-a-dia numa farmácia e também do trabalho desempenhado pelo farmacêutico neste contexto.

Tendo em conta a versatilidade de um curso como o MICF, conhecer aprofundadamente uma das suas inúmeras saídas profissionais é sem dúvida uma mais-valia e, embora esta seja a vertente mais abordada das Ciências Farmacêuticas (CF) durante o curso, a experiência prática é sempre um complemento valioso à formação teórica recebida.

#### 3.3. Desenvolvimento de conhecimentos na área da suplementação alimentar

O setor dos suplementos alimentares é uma área complexa e na qual considero que a formação recebida durante o MICF é insuficiente. Esta lacuna dificulta o aconselhamento dos mesmos, sendo isto especialmente relevante porque estes são produtos muito solicitados pela população em geral. Tendo em conta estes fatores, a questão da suplementação alimentar foi abordada durante uma das reuniões com a Dr.<sup>a</sup> Ana que, após alguns esclarecimentos, propôs a elaboração de um trabalho neste âmbito.

A Farmácia Coimbra dispõe de um grande variedade de suplementos alimentares com indicações muito diferentes e por vezes existia a dificuldade de ter uma visão geral de todos os suplementos disponíveis. Assim, em conjunto com a minha colega também a realizar

estágio curricular, elaborei uma compilação dos suplementos alimentares existentes na farmácia, categorizando-os por indicação e composição. No final da sua realização, concluímos que ambas tínhamos desenvolvido extensamente os nossos conhecimentos relativamente à suplementação e, além disso, existia agora um documento de fácil consulta para esclarecer qualquer dúvida.

Considero que a realização deste trabalho foi uma oportunidade valiosa na minha formação já que me permitiu desenvolver conhecimentos complementares àqueles adquiridos durante o MICF. Adicionalmente, também me preparou para o aconselhamento destes produtos durante o atendimento, o que melhorou o meu desempenho enquanto estagiária.

### 3.4. Contacto com diferentes marcas e estratégias de *marketing*

Considerando a situação atual das farmácias e a necessidade de estas se diferenciarem noutras áreas além da venda de medicamentos, penso que esta foi uma excelente oportunidade que o estágio me proporcionou, ficar a conhecer as diferentes técnicas de cada marca e a forma como estas se refletiam posteriormente nas vendas.

Ao longo do estágio na farmácia Coimbra, tive contacto não só com uma grande variedade de produtos e marcas, mas também com as diferentes estratégias de *marketing* utilizadas pela equipa técnica e pelas marcas. Este conhecimento foi-me transmitido pela equipa técnica especialmente durante a receção de encomendas e posterior disposição dos produtos tendo em conta os locais com mais visibilidade na farmácia, a rotação dos produtos e a organização dos lineares. Adicionalmente, durante as formações das marcas e também através dos seus promotores adquiri conhecimentos relativos não só à distribuição dos produtos mas também de outras estratégias como a existência de cartazes, panfletos e promoções.

## 4. Ameaças

### 4.1. Formação limitada em algumas áreas da Farmácia Comunitária durante o MICF

No final deste estágio, considero que as principais dificuldades que senti durante os 4 meses estão relacionadas com a formação limitada em algumas áreas durante o MICF. De entre elas, destaco a dermocosmética, a veterinária e a suplementação alimentar como



aquelas em que senti que a escassez dos meus conhecimentos possa ter sido uma ameaça ao sucesso do estágio. Embora estes sejam domínios abordados durante o curso, considero que a formação não é dada com o detalhe necessário para que os alunos possam posteriormente aconselhar estes produtos.

Apesar disso, penso que ao longo do estágio adquiri os conhecimentos necessários para aconselhar corretamente produtos de dermocosmética, medicamentos de uso veterinário e suplementos alimentares, através dos conhecimentos transmitidos pela equipa técnica, das várias formações a que assisti, do trabalho que realizei referente aos suplementos e da experiência que obtive durante os atendimentos.

#### 4.2. Conhecimento insuficiente do funcionamento do programa Sifarma 2000<sup>®</sup>

Outro fator que considero que possa ter sido uma ameaça ao sucesso do estágio foi sem dúvida a falta de conhecimentos relativamente ao programa Sifarma 2000<sup>®</sup>. Embora este não seja o único programa informático disponível para as farmácias, é o mais utilizado em todo o país e, por essa razão, seria lógico existir uma maior formação nesta área durante o MICE. Além disso, o Sifarma 2000<sup>®</sup> é um programa extremamente complexo e com inúmeras funcionalidades, sendo que mesmo durante um estágio longo não é possível explorar todas as suas potencialidades. Assim, penso que seria benéfico para todos os futuros estagiários receber formação aprofundada sobre este programa antes de iniciar o estágio curricular.


## Conclusão


O estágio curricular é uma fase extremamente importante do percurso académico de qualquer futuro farmacêutico e considero que esta foi uma experiência que contribuiu imenso para a minha formação profissional e pessoal. O estágio em farmácia comunitária é um desafio enorme já que enquanto estagiários somos confrontados com situações diferentes todos os dias que requerem a aplicação de conhecimentos e a tomada constante de decisões.

Considero que este estágio foi uma oportunidade fundamental não só para pôr em prática os conhecimentos adquiridos durante o MICE, mas também para adquirir experiência noutras domínios e ter contacto com aquela que é a vertente das CF em que mais farmacêuticos desenvolvem a sua atividade profissional. Os farmacêuticos comunitários são aqueles que estão mais próximos da população em geral e, como tal, têm um grande impacto nesta e possuem a capacidade de fazer a diferença através dos serviços prestados. O estágio foi por isso uma excelente oportunidade de fazer parte de um grupo de profissionais que se dedicam diariamente a garantir o bem-estar da população. Além disso, durante 4 meses, desenvolvi capacidades que seriam impossíveis de evoluir durante a formação teórica do MICE, especialmente a relação com o público. Para finalizar, termino este estágio com a certeza que esta etapa final prepara inquestionavelmente os alunos do MICE para o exercício da profissão de farmacêutico.



# Anexo I – Documentação relativa à preparação do medicamento manipulado

Receita Médica N°

REPÚBLICA PORTUGUESA 







MM


Doente:   R.C.: \* 3 5 5 0 0 2 2 2 8 \*

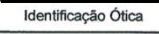
Especialidade Responsável: SNS

de Beneficiário:

  C.H.U.C. C.H.C.-H.P.-CEXT

Especialidade:  


Telefone: 


DCI / nome, dosagem, forma farmacêutica, embalagem, posologia	N.º Extenso	Identificação Ótica
Manipulado de Propranolol suspensão oral 5mg/ml Posologia: 4ml de 8h/8h	2 Duas	

Validade: 30 dias

Data: 2018-03-21

**Manipulado**

Doente: 

Médico: 

Lote: 006/18  
Data de Preparação: 28/03/18  
Válido até: 28/05/18  
Preço: 25,08€

Denominação do medicamento: Solução Oral de Cloridrato de Propranolol a 0.5% (m/V)

Fórmula: Solução  
Teor em substância(s) ativa(s) 5 mg/ml  
Quantidade dispensada: 200 ml (2x100 ml)

Condições de conservação: Frigorífico, frasco bem fechado

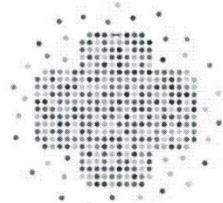
Via de administração: Oral

Advertências (precauções de manuseamento, etc.):  
Prazo de utilização: 2 meses

Referência a matérias-primas cujo conhecimento seja eventualmente necessário para a utilização conveniente do medicamento: Cloridrato de Propranolol ; xarope simples

Uso externo (caso se aplique) (fundo vermelho)  
Manter fora do alcance das crianças

**farmácia coimbra**



Dir. Técnica: Ana Silva  
Coimbra Shopping loja 119/121 COIMBRA  
Av. Dr. Mendes Silva nº211/251 tel: 239 912 219



**Ficha de Preparação de Medicamentos  
Manipulados**

Lote Nº:  
006/18

Data:  
28/03/18

MEDICAMENTO MANIPULADO: Solução Oral de Cloridrato de Propranolol 5mg/ml (0.5%(m/V))

NOME DO DOENTE/CLIENTE: [REDACTED]

NOME DO/A MÉDICO/A: [REDACTED]

FORMA FARMACÊUTICA: Solução Oral

QUANTIDADE A PREPARAR: 200ml

VERIFICAR A LIMPEZA/ARRUMACÃO DO LABORATÓRIO ANTES DE INICIAR

Rubrica Operador:

MATÉRIAS – PRIMAS	FABRICANTE/ DISTRIBUIDOR	Nº DE LOTE	VALIDADE	QUANTIDADES PESADAS/ MEDIDAS (em mg, g ou ml)	RUBRICA DO OPERADOR	VERIFICAÇÃO (Farmacêutico)
Inderal 40mg	Astrazeneca	72572	12/19	1000 mg		
Água Purificada	Alvita	17100065	10/2019	50 ml		
Xarope Simples	Laborspirit	68430	07/2018	qbp 200ml		

**PREPARAÇÃO:**

Rubrica do Operador

1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar;	
2. Pulverizar em almofariz 25 comprimidos de Inderal até obtenção de um pó fino;	
3. Adicionar água purificada e cerca de 10ml de xarope simples;	
4. Misturar até obtenção de uma dispersão homogénea;	
5. Adicionar 30ml de xarope simples e homogeneizar;	
6. Transferir o preparado para uma proveta graduada, lavando o almofariz com 20 ml de xarope simples.	
7. Completar o volume de 200 ml com xarope simples;	
8. Transferir para frasco de vidro âmbar;	
9. Lavar e Secar o material utilizado.	

FORMA DE ACONDICIONAMENTO, EMBALAGEM E CAPACIDADE: Frasco de vidro âmbar, tipo III (FPVII): 2 frascos de 100ml

PRAZO DE UTILIZAÇÃO: 2 meses

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO: conservar no frigorífico, com o frasco bem fechado

NOME DO OPERADOR: Diana Ferreira

**CONTROLO DO PRODUTO ACABADO:**

CARACTERÍSTICAS	RESULTADO		OBSERVAÇÕES
	Conforme	Não Conforme	
Caracteres organolépticos (cor, cheiro, aspecto geral..)			Solução límpida incolor ou ligeiramente rosada, homogénea após agitação.
pH			
Quantidade/massa/volume conforme com a prescrição			200 ml (±5%)

CONCLUSÃO: Aprovado

Data: 28/03/2018

RUBRICA DO OPERADOR:

**VERIFICAÇÃO:**

FARMACÊUTICO:

Data: 28/03/2018

## Farmácia Coimbra

Direcção Técnica: Dr.ª Ana Carina Gomes Leite

Lote 006/18 Manipulado Solução de Cloridrato de Propanolol 0,5%

Cálculo do preço de venda

**MATÉRIAS-PRIMAS:**

mterias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar (g ou ml)	factor multiplicativo	valor da matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço			
Xarope Simples	1000	6,92 €	g	0,00692	150	1,6	€ 1,66
Inderal (comparticipado)*	1	0,00 €		0	0	FALSO	€ 0,00
<b>subtotal A</b>							<b>€ 1,66</b>

Farmacia Coimbra

150

**HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:**

	forma farmacêutica	quantidade	F(€)	factor multiplicativo	valor
valor referente à quantidade base	Solução	-----	€ 4,92	3	€ 14,76
valor adicional			€ 4,92	0,007	€ 0,00
<b>subtotal B</b>					<b>€ 14,76</b>

**MATERIAL DE EMBALAGEM:**

materiais de embalagem	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor
frasco de vidro ambar tipo III (FPVII)	€ 0,74	2	1,2	€ 1,78
<b>subtotal C</b>				<b>€ 1,78</b>

PREÇO DO MEDICAMENTO MANIPULADO: 1,3 x (A+B+C)      € 23,66

+ IVA      € 1,42

**subtotal D      € 25,08**

dispositivos auxiliares de administração	preço unitário	quantidade	valor
			€ 0,00
<b>subtotal E</b>			<b>€ 0,00</b>

**PREÇO FINAL: D+E      € 25,08**

\* Inderal com receita médica

Operador \_\_\_\_\_

Supervisor \_\_\_\_\_

Rubrica do Director Técnico 	Data 28/03/2018
---------------------------------	--------------------

# **MONOGRAFIA**

**Phage therapy: a promising alternative in the treatment of bacterial infections**

**Orientadora: Professora Doutora Ana Miguel Matos**

## Abstract

The rise in antibiotic resistance has prompted the need for alternative antibacterial strategies. Bacteriophages, viruses that infect bacteria, were discovered in the beginning of the 20<sup>th</sup> century and were successfully employed to treat bacterial infections during a few decades. However, interest in phage therapy decreased after the discovery of antibiotics. Nowadays, phages are once again regarded as a possible option and several advantages over antibiotics are already recognized. Despite this, there are still some challenges to overcome in order for phage therapy to be routinely used. One solution to surpass some of the limitations of this therapy could be the improvement of conventional phage therapy – administration of modified phages, phage enzymes or combination with antibiotics. Conducted clinical trials suggest that phage therapy is safe and effective. Furthermore, there are already phage related products approved for food safety applications and several phase II and III clinical trials are currently ongoing.

**Keywords:** Bacteriophage, antibiotic resistance, bacteria, phage therapy.

## Resumo

O aumento das resistências aos antibióticos tem motivado a necessidade de procurar estratégias antibacterianas alternativas. Os bacteriófagos, vírus que infetam bactérias, foram descobertos no início do século XX e foram utilizados com sucesso no tratamento de infecções bacterianas durante algumas décadas. Contudo, o interesse na terapia fágica diminuiu depois da descoberta dos antibióticos. Atualmente, os fagos são novamente apontados como uma possível opção e várias vantagens sobre os antibióticos são já reconhecidas. Apesar disso, existem ainda alguns desafios a superar de forma a que a terapia fágica possa ser utilizada rotineiramente. Uma solução para ultrapassar algumas das limitações desta terapêutica poderá ser a melhoria da terapia fágica convencional – administração de fagos modificados, enzimas fágicas ou combinação com antibióticos. Os ensaios clínicos realizados indicam que a terapia fágica é segura e eficaz. Além disso, já existem produtos aprovados para aplicações relacionadas com a segurança alimentar e vários ensaios clínicos de fase II e III estão atualmente a decorrer.

**Palavras-chave:** Bacteriófago, resistência aos antibióticos, bactéria, terapia fágica.

## Abbreviations

**EMA** - European Medicines Agency

**EPS** - Extracellular polymeric substances

**FDA** - Food and Drug Administration

**ICTV** - International Committee on Taxonomy of Viruses

**MDR** - Multidrug resistant

**VAPGH** - Virion-associated peptidoglycan hydrolases

**WHO** - World Health Organization



## I. Introduction

The discovery of antibiotics has long been regarded as one of the most significant medical achievements of the twentieth century<sup>1</sup>. Since then, no other class of drugs has so cheaply and effectively prevented death from life-threatening diseases<sup>2</sup>.

However, resistance mechanisms are emerging and spreading globally, threatening our ability to prevent and treat common infectious diseases. Without appropriate antibacterial therapy, medical procedures such as organ transplantation, chemotherapy and surgeries (for example, caesarean sections or hip replacements) would become very high risk proceedings, resulting in prolonged illness, disability, and death<sup>3</sup>.

Although antimicrobial resistance is a natural phenomenon, several factors are accelerating this process, namely the overuse and misuse of antibiotics. It is estimated that up to half of antibiotic use is unnecessary or inappropriate. For example, antibiotics are often prescribed for the treatment of viral infections and are also given as growth promoters in animals or used to prevent diseases in healthy animals<sup>3,4</sup>. Moreover, the development of new antibiotics, considered the main strategy to counter these resistances, has stalled in the last few years and currently, the clinical development pipeline is insufficient to counter the rising resistance. Since 2000, only five novel classes of antibiotics have been marketed and as of May 2017, there were only 42 new therapeutic entities (traditional antibiotics and biologicals) that target critical and high-priority pathogens in the pipeline<sup>1,5</sup>. One of the main reasons for this disinvestment is the fact that the development of new antibiotics is not nearly as profitable as the development of drugs meant to treat chronic conditions. Antibiotics have a relatively low cost, are intended to be used for short periods of time and when they are marketed they aren't promptly prescribed but saved as a reserve for the worst cases<sup>6,7</sup>.

In the United States alone, antibiotic resistance accounts for at least 23,000 deaths and over 2 million illnesses each year<sup>4</sup>. Furthermore, studies conducted for the UK's review on antimicrobial resistance predicted that global deaths due to antimicrobial resistance will rise above 10 million deaths per year by 2050, costing the world up to 100 trillion US dollars<sup>8</sup>.

Antibiotic resistance has spread so rapidly that it has been identified by the World Health Organization (WHO) as one of the greatest current threats to global health<sup>9</sup> so it is now mandatory to consider alternative strategies that may prove helpful to this worldwide

issue. One possible option is the therapeutic use of bacteriophages, viruses that have the ability to infect bacteria<sup>10</sup>. Bacteriophages, also known as phages, are thought to be the most ubiquitous organisms on Earth<sup>11</sup>. They were discovered independently in 1915 by Frederick Twort, a British pathologist, and in 1917 by Félix d’Herelle, a French–Canadian microbiologist that devised the term ‘bacteriophage’ (literally meaning bacteria-eater)<sup>12</sup>. Despite their potential, most of the research was abandoned (with the exception of some countries in the former Soviet Union) after the discovery of the antibiotics and the spread of its use, since this was an apparent effortless and inexpensive solution<sup>10</sup>.

Besides their antibacterial activity, phages are also excellent investigational models and were crucial in the development of molecular biology, namely in the establishment of its central dogma – information is sequentially passed from DNA to RNA to proteins<sup>12</sup>.

The emergence of multiple resistances in the last years has led the scientific community to reconsider this approach as a treatment option for some bacterial pathogens.

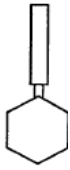
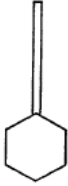








## 2. Bacteriophages – Characterization

### 2.1. Taxonomy and morphology

Viruses infect cells from the three domains of life: *Eukarya*, *Bacteria* and *Archaea*. Those infecting eukaryotes are universally named “viruses” while the ones that infect bacteria are referred to as “bacteriophages” or “phages”. *Archaea* are also infected by viruses, but how these should be named has always been a controversial issue<sup>13</sup>.

Thousands of different bacteriophages have been discovered since the beginning of the twentieth century<sup>14</sup> but the first Archeal virus was only described in 1970s, and that was before *Archaea* was recognized as the third domain of life so *Archaea* viruses were initially referred to as bacteriophages<sup>15</sup>. In recent years there has been a shift to the “virus” designation, meaning that the term “phage” is increasingly used solely to describe viruses of bacteria although it is still employed by some authors to refer to viruses of *Archea*<sup>13,16</sup>. For these reasons, only *Bacteria* viruses will be considered in this classification (Table I).

**Table 1 – Bacteriophage taxonomy and morphology** <sup>17-19</sup>.

Order	Family	Genome configuration	Morphology		Species (Examples)
Caudovirales	Myoviridae	Linear dsDNA	Icosahedral head; Contractile tail		<i>Escherichia virus T4</i>
	Siphoviridae		Icosahedral head; Long and non-contractile tail		<i>Escherichia virus Lambda</i>
	Podoviridae		Icosahedral head; Short tail		<i>Bordetella virus BPP1</i>
Unassigned	Corticoviridae	Circular dsDNA	Icosahedral, internal membrane-containing virions		<i>Pseudomonas virus PM2</i>
	Cystoviridae	Linear dsRNA	Enveloped, spherical virions with two concentric, icosahedrally symmetric protein layers		<i>Pseudomonas virus phi6</i>
	Inoviridae	Circular ssDNA	Flexible filaments or rod-shaped virions		<i>Escherichia virus M13</i>
	Leviviridae	ssRNA+	Icosahedral virions		<i>Escherichia virus Qbeta</i>
	Microviridae	Circular ssDNA+	Icosahedral virions		<i>Spiroplasma virus SpV4</i>
	Plasmaviridae	Circular dsDNA	Enveloped, pseudo-spherical and pleomorphic virions		<i>Acholeplasma virus L2</i>
	Tectiviridae	Linear dsDNA	Non-enveloped, icosahedral virions		<i>Pseudomonas virus PRD1</i>

The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) is the entity responsible for the taxonomic classification of viruses<sup>20</sup>. For the classification of phages, a great number of properties are taken into consideration, namely the nature of the nucleic acid, the morphology and physicochemical properties of the virus and, more recently, genomic information<sup>21</sup>.

The genetic material of phages consists of double-stranded or single-stranded DNA or RNA, and their genome sizes range from a few thousand to several hundred kilobases<sup>17,18</sup>.

Length of phages also varies widely due to their distinctive characteristics (Table 1). Morphologically, phages can be tailed or polyhedral, filamentous or pleomorphic. Tailed phages represent over 96% of all phages and constitute the order *Caudovirales*. This order is divided into 3 families, characterized by their contractile (*Myoviridae*), long and non-contractile (*Siphoviridae*), and short (*Podoviridae*) tails. Polyhedral, filamentous or pleomorphic phages are grouped into several families but not into orders. They are extremely diversified and vary from each other in nucleic acid content and structure, and some of them contain lipids or lipoprotein envelopes<sup>18</sup>.

## 2.2. Life cycles

Like all viruses, phages can replicate only within living cells. To infect a bacterial cell, a phage first attaches to receptors on the host's cells (adsorption) and then injects its genome into the cell cytoplasm. Those receptors can be proteins, lipopolysaccharides, teichoic acids or flagella, and their presence on the host's cell surface is mandatory for the phage to be able to infect the bacteria<sup>12,22</sup>. The specificity to the receptors determines the range of host bacteria, and based on this feature phages can be divided into monovalent (only able to adsorb to specific bacteria) or polyvalent ones (capable of interacting with receptors in different bacteria species)<sup>23</sup>.

Some phages are able to synthesize specific enzymes capable of degrading exopolysaccharide structures, like capsule and slime, which may mask or cover a targeted receptor<sup>24</sup>. The insertion of the phage genetic material into the host cell is a highly variable process. Known strategies include a contraction movement of the tail to inject the genome and degradation of the bacterial cell membrane<sup>25</sup>.

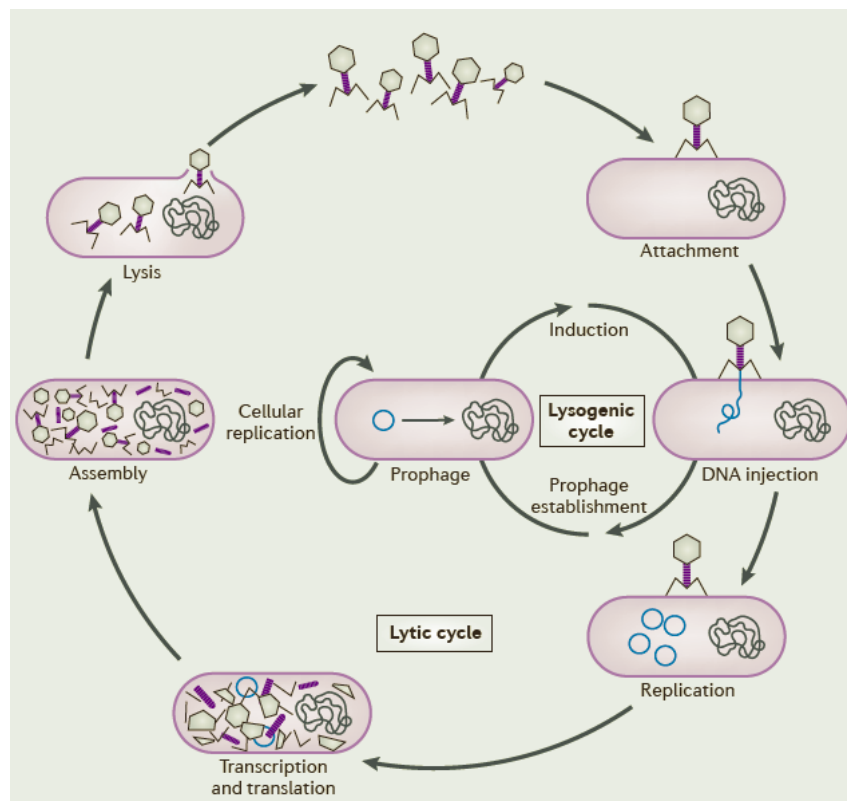
Following these first steps, phages can undergo two possible life cycles: lytic and lysogenic (Figure 1). According to the cycle followed, phages can be classified as virulent or temperate. Virulent phages are only able to replicate through the lytic cycle while temperate phages can follow this path or form a stable association with the host, known as lysogeny<sup>12</sup>.

### Lytic cycle

After attachment and penetration, the lytic cycle comprises the replication of the viral genome and production of viral proteins using the bacterial metabolic machinery. The following steps are the assembly of the synthesized viral components and the release of the virions, resulting in the host's cell death (lysis). These viruses can then infect more healthy cells, spreading the infection<sup>23,25,26</sup>.

### Lysogenic cycle

The lysogenic cycle is characterized by the integration of the viral genetic material in the bacterial genome, which originates the prophage and ensures continued replication of the virus genetic material without fatal consequences to the cell, creating a population of bacteria infected with the prophage. Under conditions of stress, prophages can be induced, shifting to the lytic cycle and initiating production of new phages<sup>12,23,25,26</sup>.



**Figure 1** – Schematic representation of the phage life cycles: lytic and lysogenic cycle<sup>12</sup>.

## 2.3. Distribution

Bacteriophages exist in almost every ecosystem, from hot springs to desert sands to ice glaciers<sup>25</sup>, making them the most abundant organisms on Earth with an estimated number of  $10^{31}$  particles<sup>27</sup>. These viruses can be isolated from the majority of places where bacteria live and their numbers usually reflect those of the bacterial population<sup>28</sup>. Phages are especially abundant in sea water, with concentrations estimated to be around 10 million per milliliter in coastal water, decreasing with depth and distance from the shore<sup>29</sup>. Moreover, they are also plentiful in soil ( $10^7$  phage particles per 1 gram) and in all types of wastewater ( $10^5$ - $10^7$  phage particles per 1 mL)<sup>30,31</sup>. Unsurprisingly, phages have been found in a variety of raw food products such as cheese, chicken, beef and mussels, which suggests that they are consumed daily by humans<sup>32</sup>.

Besides these habitats, phages have also been isolated, for instance, from the skin, oral and vaginal mucous membranes and digestive tracts of animals and humans<sup>33,34</sup>. Considering the high number of bacteria that inhabit the human gut, it is not a surprise that it also contains a diverse and abundant phage community. The human phageome can change depending on age and health condition and is estimated to contain as many as  $10^{15}$  individual phage particles<sup>35,36</sup>. Its possible role in the balance between health and disease is predominantly unknown but it is now the focus of several studies.

## 3. Phage therapy

### 3.1. Historical context

In 1915, Frederick Twort described a filterable substance that was unable to grow in the absence of bacteria. He was not able to definitely conclude on the nature of the substance he found, but he hypothesized that it could be an “ultra-microscopic virus” or an enzyme produced by bacteria<sup>10,37</sup>.

Two years later, in 1917, Félix d’Herelle was investigating an epidemic of dysentery when he made an astonishing discovery. For four consecutive days he collected stools from the same dysenteric patient, made an emulsion, filtered it through a Chamberland filter (that has the ability to retain bacteria) and added a drop of this filtrate to a culture of dysenteric bacillus. On the first three days the culture displayed a normal growth rate, but on the fourth day, after a period of incubation, the agar appeared clear and there were no signs of

bacterial growth. On his first communication, d'Herelle described having found a living organism incapable of surviving on any artificial medium, thus being an obligatory parasite – a Bacteriophage<sup>10,37</sup>.

While Frederick Twort didn't pursue his research, d'Herelle continued investigating and, two years later, he successfully treated dysenteric children using the phage he had isolated earlier, marking the beginning of phage therapy. However, he didn't publish the results right away and the first publication describing phage therapy is from 1921, belonging to Bruynoghe and Maisin, who successfully employed phages in the treatment of staphylococcal skin disease<sup>10,34,38</sup>. Positive results with phage therapy continued to be achieved, such as the treatment of a cholera epidemic in India, prompting several other scientists to study the therapeutic characteristics of bacteriophages. Additionally, d'Herelle began to produce phage preparations in his laboratory in France. These preparations were marketed by the company that later became L'Oréal and were called Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage, and Bacté-staphy-phage. Eventually, some companies in the USA also started to produce therapeutic phages, namely the Eli Lilly Company that in the 40's produced seven different phage-lysates<sup>38,39</sup>.

After this early enthusiasm there was a great deal of skepticism surrounding these therapies since there were some incoherencies and ambiguity in its efficacy. Also, the viral nature of phages was not completely accepted at the time, a factor that further increased the controversy<sup>10,12,40</sup>. These concerns, along with the discovery of antibiotics and the beginning of World War II prompted the decrease of interest in phage therapy and its consequent abandonment in the USA and in Western Europe. On the other hand, phage therapy was never discontinued in some Eastern countries like Russia, Georgia and Poland. Some research centers like the Eliava Institute in Georgia (funded by Eliava, a student of d'Herelle) and the Hirzfeld Institute in Wroclaw are still active nowadays<sup>10,12,34,40</sup>.

Phage therapy was “rediscovered” in the 1980's with the work of Smith and Huggings, who conducted several controlled experiments with *Escherichia coli* and Enterotoxigenic *E. coli* infections in mice, calves, pigs, and sheep, showing that an adequate selection and application of phages can provide a successful result. Furthermore, therapeutic phages started to get more exposure as access to the polish and soviet studies increased and as genomic technologies developed. More recently, increasing antibiotic resistance has led to the reappraisal of phages as promising antibacterial resources<sup>39,41</sup>.

## 3.2. Advantages and potential limitations

Several advantages of phage therapy are now widely recognized, making it a promising alternative to conventional antibiotics. However, not all aspects of this therapy are well-known and there are still some challenges to overcome before phages can be available as a treatment option.

### 3.2.1. Advantages

- **Effectiveness against multidrug resistant bacteria**

Phages are active against both gram-positive and gram-negative bacteria and since they have a unique mechanism of action, bacteriophages are not affected by the numerous resistance strategies displayed by bacteria against antibiotics<sup>10</sup>. This factor is especially important because it shows the potential phage therapy can have in the treatment of patients infected with multidrug resistant (MDR) bacteria.

- **Host specificity**

The specificity of virus-bacteria interactions determines that most phages are only able to infect a single species or, sometimes, solely a single strain within a species. Therefore, unlike antibiotics, which target a wide range of bacteria, bacteriophages are only active against the specific pathogen they are intended to be used against, without affecting the normal flora bacteria. Also, by preserving the microbiome, phage therapy does not induce opportunistic infections such as yeast infections, a common side effect of antibacterial therapy<sup>10,42,43</sup>.

- **Low incidence of adverse effects**

Based on available reports, phage therapy appears to be associated with a low incidence of side effects, which is probably due to the fact that bacteriophages only interact with bacterial cells<sup>10</sup>. Although there is a concern that the cell lysis, which occurs at the end of the cycle, releases toxins that can induce an inflammatory response, this is also an issue with several available antibiotics, which disrupt the bacteria's cell membrane. Additionally, since phages need a specific host to replicate, they do it accordingly to the local density of the bacteria and cannot remain on the organism after the bacteria are killed, when they are naturally cleared without causing secondary effects<sup>34,43</sup>.



- **Activity against bacterial biofilms**

Bacterial biofilms are multicellular populations characterized by their spatial order, formation of extracellular polymeric substances (EPS) and enhanced resistance to antibiotics. They are predominantly responsible for nosocomial infections associated with the use of biomaterials in catheters, respirators, cardiac valves and other implants. Over the last years, management of these infections has become even more complicated owing to the emergence of antibiotic resistant bacteria. Phages have proven to be capable of eliminating existing biofilms as well as preventing the formation of new ones, possibly owing to their ability to produce depolymerases that degrade EPS, allowing them to penetrate into the layers of the biofilm and infect bacteria<sup>23,43,44</sup>.

- **Low environmental impact**

Discarded therapeutic bacteriophages will not have a significant impact on bacteria populations due to their narrow spectrum of action. In addition, phages are already an important element of the most diverse habitats unlike the residues of antibiotics that can disrupt the existing balance and promote bacterial resistance<sup>43,45</sup>.

- **Economical viability**

The production of phages is usually fast and inexpensive, with the exception of the situations where host bacteria themselves are difficult to culture. Furthermore, in several studies, phage therapy has demonstrated a lower cost than antibacterial therapy<sup>10,34,43</sup>.

- **Therapeutic versatility**

Phages can be incorporated into diverse dosage forms, making them fit for oral, parenteral, pulmonary and topic administration depending on the target site. Considering the fact that multidrug resistant bacteria are responsible for infections with distinct characteristics, it is fundamental for phage therapy to be able to be versatile and adapt to each infection particularities<sup>43,44</sup>.

### 3.2.2. Potential limitations

- **Identification of the etiological agent**

Even though host specificity is a major advantage of phage therapy, it can also be a limitation since it creates the need to know the exact nature of the etiological agent in order to ascertain proper treatment. To make this determination it is necessary to collect a clinical

sample, isolate the microbiological agent, culture and identify it, a time consuming process and an unachievable procedure in medical facilities with limited resources. In recent years, molecular biology techniques have become more available, turning the screening of pathogens into an easier and faster process. Another option to overcome this limitation is the use of phage “cocktails”, a combination of phages that have the potential to fight different bacteria, widening the range of the treatment<sup>10,44</sup>.

- **Phage selection**

Despite the fact that all phages infect bacteria, not all are suitable for phage therapy and some characteristics are required to ensure they may be employed. The main feature is that a phage must be strictly virulent not only to be able to lyse and kill the bacteria, but also to be incapable of integrating into the bacterial genome. Since this integration can result in the transduction of resistance genes from one bacteria to another, phages that display lysogeny are not suited for phage therapy. Furthermore, phages should be able to reproduce effectively and rapidly, features evidenced by burst size (number of phages released from one infected bacterial cell) and latency time (time from injection of DNA until the release of new phage particles), respectively. Ideally, phages should also have their genome fully sequenced to assure the absence of undesirable genes<sup>43,46</sup>.

- **Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties**

Complex pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of phage therapy are directly linked to phage’s size. Bacteriophages are enormous when compared with antibiotic molecules, posing a challenge to the therapy’s success mainly due to slow rates of absorption and distribution. Consequently, only a small dose of phages can be administered and it should ideally be applied at the exact site where therapeutic effect is required. Fortunately, and unlike other biological therapies, phages are capable of replicating *in vivo* and this amplification is dependent on the bacterial density at the site, which means that if the target pathogen is present at a great concentration, the dose required might be substantially lowered and become feasible in terms of molecular size<sup>44,46</sup>.

- **Inexistent dedicated regulatory framework**

Therapeutic phages are under the same requirements as other biological medicinal products even though they possess features that are unlike any other medicine. For instance, phage therapy involves treatment with a phage or a “cocktail” of phages selected specifically for each situation, meaning that a new combination (considered a new medicinal product) could

be administered in each particular case. Even though it has become evident that phage therapy is not compatible with the conventional approaches to the development and application of medicinal products, neither does the European Medicines Agency (EMA) or the Food and Drug Administration (FDA) have an approval process in place that can meet the specificities of phage therapy. This means that in order for phage therapy to be achievable it is necessary to develop a dedicated framework that includes realistic production and quality and safety requirements for phage therapy products. EMA has already created a similar structure in the past for the approval of human tissue and cells so the creation of a group dedicated to phage therapy would not be unreasonable. Moreover, non-profit organizations like P.H.A.G.E (Phages for Human Application Group Europe) are already working to develop a specific legal framework and help standardize fundamental research, pre-clinical experiments and clinical trials<sup>10,46-49</sup>.

- **Immune response**

Immune response against bacteriophages depends on the location of the bacterial infection and on the administration route used. Oral and topical administrations of phages do not appear to stimulate any reaction probably because phages are present in our environment and are a part of our gut microbiome. On the other hand, the blood stream and other internal organs are not natural environment for phages and, when administered intravenously, phages activate both the innate and adaptive immune system<sup>40,44,46</sup>.

If there are no host bacteria for the phages, they are rapidly removed by phagocytic cells of the innate system. Therefore, therapeutic phage administration must be as close as possible to the infection site, in order to avoid inactivation before reaching the target bacteria. In contrast, adaptive response takes a few days to produce significant antibodies concentrations, providing an ample gap for phages to act. However, the production of memory antibodies may not enable the use of the same phage on the same patient a second time<sup>40,44,46</sup>.

- **Bacterial resistance**

Just like with antibiotics, it is a fact that bacterial resistance to phages is inevitable. The main difference lies in the nature of antibiotics, as inert chemical entities, and phages, as changing live organisms, able to evolve and overcome bacterial resistances. Bacterial resistance mechanisms can include loss, change or masking of the receptor, prevention of phage DNA integration, degradation of phage DNA, blocking of phage replication, transcription,

translation and assembly. For every one of the resistances developed, phages also improve their antibacterial mechanisms in a constant cycle of evolution. For instance, phages adapted themselves to recognize new receptors, to produce enzymes that deteriorate the substances masking receptors and to change their nucleic acids to avoid recognition by endonuclease enzymes. Also, in a therapeutic context, it would be simple to circumvent bacterial resistances, switching to another phage that, for example, targets a more evolutionary conserved receptor, or using a “cocktail” of several phages<sup>10,25,46,50</sup>.

### 3.3. Conventional phage therapy

Standard phage therapy is defined as the administration of virulent phages to the patient with the aim of lysing the bacterial pathogen responsible for the infection<sup>51</sup>. In the last century, hundreds of reports have been published describing the most diversified phage treatments but regardless of each therapy’s characteristics, some basic principles are common to all of them.

#### 3.3.1. Production

Any phage therapy protocol involves steps of phage choice, isolation and purification. Two strategies of phage choice can be considered. In one approach, a pre-made cocktail of multiple phages with a wide range of activity is used. A second approach begins with the isolation of the pathogenic bacteria, which will be tested against a collection of phages and a custom-made preparation is made having those results into consideration. Phage therapy can also be distinguished in terms of the number of phage types used during treatment as monophage or polyphage therapy. Phage isolation is identical despite of the model used and usually involves laboratory amplification. Purification of the phage preparation is typically required before administration and it can vary from the most simple methods (centrifugation or filtration of the lysed cultures) to the most thorough ones (ultra-centrifugation or chromatography) depending on the application desired<sup>39,52</sup>.

#### 3.3.2. Applications

The therapeutic use of phages focus on three key points: treatment of infections involving antibiotic resistant bacteria, treatment of infections that are antibiotic resistant even though the bacteria are antibiotic sensitive in culture (for instance due to poor circulation or biofilm formation) and treatment of bacterial infections in situations where antibiotic therapy is counter-indicated (due to patient’s allergies, for example)<sup>39</sup>.

### 3.3.3. Administration

Bacteriophages have been administered to humans orally (in tablet or liquid formulations), rectally, locally (tampons, rinses and creams on the skin, eye, ear and mucous membranes), as aerosols or intrapleural injections and intravenously<sup>38</sup>.

### 3.3.4. Reports

Phages have been applied in a wide range of situations, including purulent infections, wounds, burns, respiratory tract infections, gastrointestinal infections and urogenital tract infections<sup>39</sup>. Despite the fact that innumerable studies have been carried out since d'Herelle's discovery, only recent clinical trials follow high standards, accurately assessing safety and efficacy. Due to their significance, some of those clinical trials require to be highlighted<sup>51</sup>.

In 2003, the first double-blind, randomized, placebo-controlled phase I study designed to establish the safety of phage therapy took place at the Nestlé Research Center in Switzerland. Fifteen healthy adult volunteers ingested *Escherichia coli* phage T4 in their drinking water for a month. During the study, no significant adverse effects were detected just like there were no changes in the commensal *E. coli* population, supporting phage therapy's expected safety<sup>44,53</sup>.

A few years later, the first controlled clinical trial to evaluate efficacy and safety of a therapeutic bacteriophage preparation was approved in the UK. Patients suffering from antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* chronic otitis for several years, were treated with a topical cocktail of six lytic phages. The vast majority improved after treatment, and 25% experienced an almost complete recovery. Also, no treatment-related adverse events were reported. Other relevant studies included administration of topical preparations to burn wounds in Belgium and to leg ulcers in the US<sup>44,51,54</sup>.

A 2012 retrospective analysis of phage therapy reviewed results from patients treated at the Phage Therapy Unit established at the Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wroclaw. From 2008 to 2010, 153 patients with a wide range of infections resistant to antibiotic therapy, including urinary tract infections, soft tissue infections, osteomyelitis and respiratory tract infections were treated with preparations of specific lytic phages confirmed to be active against the pathogenic bacterial strains. Good results were obtained in 40% of patients, with full recovery and/or pathogen eradication observed in 20% of the treated patients. The best results were obtained in patients that received oral or intrarectal administration, with the highest percentage of good responses to

treatment being found in the case of enterococcal phages. In addition, the highest healing rates were achieved in the treatment of urinary/genital infections and the lowest in respiratory tract infections. Considering that these patients were suffering from otherwise untreatable infections, the results were very positive in general<sup>51,55</sup>.

Overall, properly conducted clinical trials suggest that phage therapy is indeed safe and that infections that are not susceptible to common antibiotics can be treated with phages. However, there are still hurdles to overcome before therapeutic phages may be used routinely with success. Some authors suggest that to get over those challenges some adaptations must be made to phage therapy and other perspectives must be considered<sup>44,51</sup>.

### 3.4. Other approaches

#### 3.4.1. Modified phages

Recent literature describes various cases in which phages were successfully modified to overcome some of the aforementioned obstacles. One of the most straightforward examples is chemical PEGylation (attachment of polyethylene glycol to the phage's surface) in order to increase the circulation time of phages by delaying the immune response, thus enhancing the therapy's efficacy<sup>51,56</sup>.

Genetic engineering has also been used to improve phage properties. Host range is one of the main features subject to manipulation strategies. Studies aiming the extension of T7 phage's host range have been conducted, in order to achieve the expression of endosialidase, an enzyme that breaks down the capsule present in some *E. coli* strains, thereby increasing the phage's adsorption. A different study focused on the recombination of phages T2 and IP008 so that the first one would acquire the wider host range of the second while keeping its own strong lytic characteristics<sup>51,57</sup>.

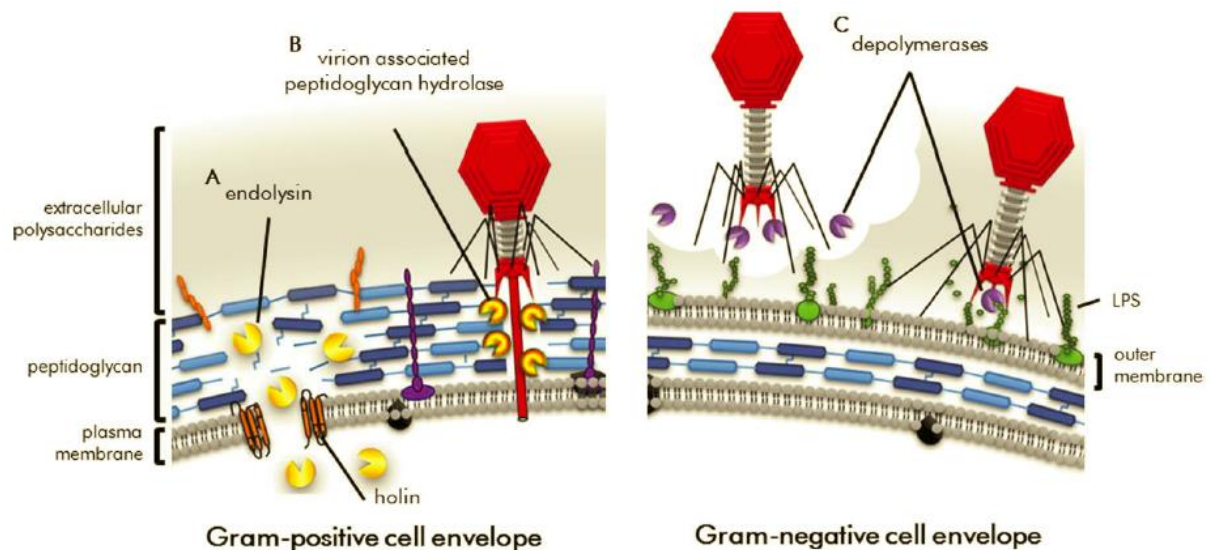
In an attempt to reduce cytotoxicity and immunogenicity, lysis-deficient phages were developed by inactivation of the gene that encodes the hydrolase responsible for bacterial cell degradation. In this way, cell death occurs by destruction of the cytoplasmic membrane without the risk of toxin release. In contrast, genetic modification of temperate phages to become permanently lytic has also been explored since temperate phages are more common and easier to isolate than virulent ones. Such change involves a mutation that prevents repression of phage's DNA transcription and translation, enabling cell lysis<sup>57</sup>.

The activity of phages against biofilms has also been the focus of some investigations, with emphasis on the engineered T7 phage designed to express a biofilm-degrading enzyme (dispersin B) that degrades extracellular polysaccharides, highly enhancing the efficiency of the therapy<sup>57</sup>.

### 3.4.2. Phage enzymes

Another alternative from conventional therapy is the administration of phage-encoded enzymes (Figure 2). Among the several enzymes that seem to be effective against multidrug resistant bacteria, endolysins are by far the most studied<sup>12,51</sup>. Endolysins are peptidoglycan hydrolases responsible for cell lysis during the release of newly formed viral particles, since peptidoglycan degradation causes the cell to burst due to osmotic imbalance<sup>12,58</sup>. Several studies have been conducted involving administration of endolysins with success. For example, a subcutaneous injection of phage endolysins resulted in the elimination of more than 99% of MDR *S.aureus* in the spleens of treated mice. Like phages, the majority of endolysins are also host specific, however, some of them have a wider spectrum like the endolysin PlySs2 that is active against *S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* and even *Listeria* spp. Unfortunately, endolysin activity is predominately limited to Gram-positive bacteria since Gram-negative bacteria have an outer membrane that protects the peptidoglycan from the exogenous endolysins. Therefore, reports of successful use of these enzymes against Gram-negative bacteria are rare. Nevertheless, this is a promising therapeutic approach with several advantages over conventional therapy, such as no resistance to endolysins has been reported so far<sup>51</sup>.

Besides endolysins, certain phages have a second type of peptidoglycan hydrolases named virion-associated peptidoglycan hydrolases (VAPGH). Unlike endolysins, which play a role in the release of new virions, VAPGH act after adsorption, hydrolyzing peptidoglycan and enabling the insertion of the phage's genetic material into the cell's cytoplasm. For this reason, they are a structural component of some phage's tails and are present in phages infecting both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Experiments prove that VAPGH are also effective when applied exogenously to cells, triggering cell lysis<sup>58</sup>.



**Figure 2** – Schematic representation of the interactions between phage-encoded proteins and Gram-positive and Gram-negative bacterial cell envelopes. (A) Endolysins degrade the peptidoglycan from the inside at the end of the replication cycle. Holins allow endolysins to translocate the plasma membrane. (B) Virion-associated peptidoglycan hydrolases degrade the peptidoglycan after attachment, enabling the insertion of the phage’s genetic material into the cell’s cytoplasm. (C) Depolymerases hydrolyze the extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides, which can be barriers to viral adsorption<sup>58</sup>.

Another group of phage-encoded enzymes are polysaccharide hydrolases, named depolymerases. Depolymerases have only been identified in phages belonging to the *Caudovirales* order (tailed phages) and their therapeutic effect is based on the ability to degrade extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides, barriers between phages and cell surface receptors. Extracellular polysaccharides are especially relevant during biofilm formation, therefore the greater potential of depolymerases is their use in the prevention and elimination of biofilms and it has been demonstrated that they can successfully penetrate and disrupt them<sup>58</sup>.

Finally, holins are hydrophobic membrane proteins involved in cell lysis by allowing endolysins to translocate the membrane and degrade the peptidoglycan. Holins alone are unable to cause cell lysis but in combination with endolysins, the lytic potency is improved and the spectrum of the endolysin alone is enhanced, which suggests that their combined use can be a viable therapeutic strategy<sup>58</sup>.

### 3.4.3. Combination with antibiotics

Multiple studies have demonstrated that the combined use of therapeutic phages and antibiotics has a higher success than the use of each strategy alone. Much of the research has been focused on the eradication of biofilms since phages and antibiotics have complementary



actions in this setting, phages disrupt the biofilm's matrix, enabling a deeper penetration of the antibiotics<sup>51,59</sup>.

In the majority of the investigations assessing the effect of a combined treatment in biofilm eradication, the two agents have been administered simultaneously and efficacy has been variable. However, there has been a recent interest in understanding how treatment order influences the outcomes. In 2017, a study investigated how the order affected the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and concluded that treatment with phages before drugs produced the maximum effect. A different study, in 2018, was designed to investigate the ability of phage treatment to enhance the activity of five antibiotics against *Staphylococcus aureus* biofilms. The results demonstrated that this activity was the highest when biofilms were pre-exposed to phage prior to antibiotic treatment. Furthermore, efficacy was also dependent on the antibiotic, its interactions with the phage and the concentration of antibiotic employed (biofilm reduction was not always proportional to the antibiotic concentration)<sup>59,60</sup>.

#### 3.4.4. Biocontrol

The excessive use of antibiotics in animals is one of the main reasons for the development of resistances. Phages have demonstrated to be successful in the treatment of several bacterial infections in animal studies such as those caused by *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* and *Listeria*, as well as in the treatment of food products before they are marketed, proving its use as a suitable alternative to traditional therapies. Bacteriophages have, thereby, proven to be effective as biocontrol agents in the prevention of food-borne diseases. Moreover, resistance to antibiotics is also a concern in agriculture, where phage application on various crops has also been employed to arrest infections. In this way, phage therapy can be applied to reduce bacterial contamination in a range of food products from meat to fruits and vegetables<sup>25,61</sup>.

### 3.5. Approved products and clinical trials

In countries where therapeutic phages are routinely used, namely Georgia and Russia, d'Herelle's two major cocktails (Pyophage<sup>®</sup> and Intestiphage<sup>®</sup>) are still the main available formulations<sup>62</sup>. Pyophage<sup>®</sup> is a solution indicated in the treatment of pyoinflammatory and enteric diseases caused by *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* or *Proteus mirabilis*. The administration is local in case of purulent diseases (of the ear, throat, nose, oral cavity, eyes, surgical wounds and burns) or oral in the case of enteric infections and dysbacteriosis<sup>63</sup>. Intestiphage<sup>®</sup> is a solution indicated in the treatment of salmonellosis, shigellosis, dysbacteriosis, infectious colitis and enterocolitis. It can be administered orally or rectally (in enemas) and contains phages active against *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteric*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*<sup>64</sup>. Intestiphage<sup>®</sup> is used extensively to deal with traveler's diarrhea and to prevent nosocomial infections, especially in pediatric hospitals. Both these products are tested against emerging pathogenic strains every 6 months and the formulation is updated, if necessary<sup>62</sup>.

There are currently no phage products approved for human use by the FDA or the EMA, however, there is one endolysin-based product registered as an over-the-counter medical device in Europe. Staphitekt<sup>®</sup> was developed by Dutch company Microeos and is a recombinant phage endolysin for topical skin application recommended for the early stages of *S. aureus*-related skin infections, such as eczema, acne, and rosacea. It targets both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* and is commercialized under the Gladskin brand as creams and gels. Recent studies demonstrate that Staphitekt<sup>®</sup> can successfully treat *S. aureus*-related dermatoses without inducing resistance<sup>65-67</sup>.

Additionally, there are several FDA-approved phage related products for food safety applications. The first approval allowing the direct use of a bacteriophage product in the food supply was issued in 2006 for ListShield<sup>™</sup><sup>68</sup>. ListShield<sup>™</sup> is a blend of six individual phages isolated from the environment and active against *Listeria monocytogenes*. It can be applied directly to meat and poultry products, or to surfaces and food-processing equipment, reducing *Listeria* contamination<sup>68-70</sup>. Since 2006, Intralytix, Inc. has developed other products such as EcoShield<sup>™</sup>, which targets *E. coli* O157:H7, SalmoFresh<sup>™</sup>, active against pathogenic *Salmonella* serotypes and ShigaShield<sup>™</sup> against *Shigella* spp<sup>68,71</sup>. Other

companies have also developed similar products for food application as well as distinct ones like the AgriPhage™, a biopesticide that prevents and controls harmful bacteria on tomato and pepper plants<sup>68,72</sup>.

Regardless of the fact that there are no FDA or EMA-approved phage products, many are being developed at preclinical and clinical scales. In the European Union Clinical Trials Register only one trial is registered as phage therapy – the PhagoBurn<sup>73</sup>. The PhagoBurn project is a partnership between France, Belgium and Switzerland funded by the European Commission, intended to evaluate phage therapy for the treatment of burn wounds infected with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This is the world's first prospective multicentric, randomized, single blind and controlled clinical trial of phage therapy ever performed according to both Good Manufacturing Practices and Good Clinical Practices, therefore it allowed considerable progress regarding the regulatory framework of phage therapy. The phase I/II clinical trial took place between 2013 and 2017, however, trial results haven't been released yet<sup>74</sup>.

On Clinicaltrials.gov, a database of clinical studies conducted around the world, there are several clinical trials registered involving bacteriophages<sup>75</sup>. Highlighting some of them, the only phase III clinical trial regarding phage therapy aims to investigate the efficacy of a Pyophage formulation (compared to antibiotic treatment) in the treatment of urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate. It is sponsored by a Swiss hospital but takes place in Georgia<sup>76,77</sup>. Another key study is a phase I/II clinical trial sponsored by a French hospital in collaboration with Pherecydes Pharma (a biotechnology company specialized in the research and development of therapeutic lytic bacteriophages that acted as clinical study sponsor in the PhagoBurn project). The primary goal of this study is to compare the efficacy of standard treatment associated with a topical anti-staphylococcal bacteriophage in diabetic foot ulcers infected by *S.aureus*, and it is set to begin in 2019<sup>78</sup>.

## 4. Conclusion

In the beginning of the 20<sup>th</sup> century, bacteriophages were regarded as a promising strategy in the fight against bacterial diseases. Now, 100 years later, bacteriophages are once again being acknowledged for their potential in the treatment of bacterial infections due to the emergence of antibiotic resistances. During decades, antibiotics were thought to be the simple solution to the majority of bacterial pathogens and were administered without regard to the consequences of its overuse and misuse. This unawareness led us to the point where people all over the world are already dying of infections that are not susceptible to any known antibiotic. There is now an urgent need to consider new approaches that may overcome antibiotic resistances and phage therapy has the potential to be part of the solution. Although this is not a new idea, the current knowledge on phages is incomparable to what scientists knew in the 1920s. For that reason, it is now feasible to establish phage therapy as common practice.

Phage therapy has several advantages over antibiotics and those are now widely recognized. Besides being effective against MDR bacteria, phage therapy has a low incidence of side effects and does not interfere with the microbiome. Furthermore, phages can also be used in biofilm eradication. The therapy's known limitations do not deter its use and could possibly be overcome. For instance, the complex pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and the inexistence of a dedicated regulatory framework could be solved by the administration of phage encoded proteins instead of whole phages.

The fact that there are already phage related products approved for food safety applications support the idea that phages are indeed safe for human use. Additionally, pioneer programs like the Phagoburn, developed in partnership between several countries, are crucial to gather further knowledge and promote phage therapy. Following this path, the first phage product for human use could be approved by the regulatory authorities in Europe and the United States of America in the next few years.

## References

1. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis.** Geneva: World Health Organization, 2017. [Accessed May 13, 2018]. Available at: [http://www.who.int/medicines/news/2017/IAU\\_AntibacterialAgentsClinicalDevelopment\\_webfinal\\_2017\\_09\\_19.pdf](http://www.who.int/medicines/news/2017/IAU_AntibacterialAgentsClinicalDevelopment_webfinal_2017_09_19.pdf)
2. BUTLER, M.S., BLASKOVICH, M.A., COOPER, M.A. - **Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015.** *J Antibiot (Tokyo)*. 70, 1 (2017) 3-24.
3. **World Health Organization - Antimicrobial resistance.** [Accessed May 13, 2018]. Available at: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
4. **Centers for Disease Control and Prevention - About Antimicrobial Resistance.** [Accessed May 13, 2018]. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
5. RENWICK, M.J., SIMPKIN, V., MOSSIALOS, E. - **Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development: The need for a One Health – One Europe – One World Framework.** *Health Policy Series*. 45 (2016).
6. **Infectious Diseases Society of America - Facts about Antibiotic Resistance.** [Accessed May 13, 2018]. Available at: [http://www.idsociety.org/AR\\_Facts/](http://www.idsociety.org/AR_Facts/)
7. BARTLETT, J.G., GILBERT, D.N., SPELLBERG, B. - **Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics.** *Clin Infect Dis*. 56, 10 (2013)1445-1450.
8. **Review on Antimicrobial Resistance - Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.** 2014. [Accessed May 13, 2018]. Available at: [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR\\_Review\\_Paper\\_-\\_Tackling\\_a\\_crisis\\_for\\_the\\_health\\_and\\_wealth\\_of\\_nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf)
9. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.** World Health Organization, 2014. [Accessed May 13, 2018]. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1)
10. WITTEBOLE, X., DE ROOCK, S., OPAL, S.M. - **A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of**

- bacterial pathogens.** *Virulence*. 5, 1 (2014) 226-235.
11. SULAKVELIDZE, A. - **Bacteriophage.** *Bacteriophage*. 1,1 (2011) 1-2.
  12. SALMOND, G.P.C., FINERAN, P.C. - **A century of the phage: past, present and future.** *Nat Rev Microbiol*. 13, 12 (2015) 777-786.
  13. ABEDON, S.T., MURRAY, K.L. - **Archaeal viruses, not archaeal phages: an archaeological dig.** *Archaea*. 2 (2013).
  14. ACKERMANN, H-W. - **Bacteriophage Electron Microscopy.** *Adv Virus Res*. 82 (2012) 1-32.
  15. PRANGISHVILI, D. - **The Wonderful World of Archaeal Viruses.** *Annu Rev Microbiol*. 67, 1 (2013) 565-585.
  16. FORTERRE, P. - **Defining life: the virus viewpoint.** *Orig Life Evol Biosph*. 40, 2 (2010) 151-160.
  17. **International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV Report - Virus Properties** [Accessed May 22, 2018]. Available at: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/introduction/w/introduction-to-the-ictv-online-report/418/virus-properties](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/introduction/w/introduction-to-the-ictv-online-report/418/virus-properties)
  18. ACKERMANN, H-W. - **5500 Phages examined in the electron microscope.** *Arch Virol*. 152, 2 (2007) 227-243.
  19. **International Committee on Taxonomy of Viruses - Taxonomy.** [Accessed August 21, 2018]. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
  20. ADAMS, M.J., LEFKOWITZ, E.J., KING, A.M., HARRACH, B., HARRISON, R.L., KNOWLES, N.J., KROPINSKI, A.M., KRUPOVIC, M., KUHN, J.H., MUSHEGIAN, A.R., NIBERT, M.L., SABANADZOVIC, S., SANFAÇON H., SIDDELL, S.G., SIMMONDS, P., VARSANI, A., ZERBINI, F.M., ORTON, R.J., SMITH, D.B., GORBALENYA, A.E., DAVISON, A. - **50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects.** *Arch Virol*. 162, 5 (2017)1441-1446.
  21. ACKERMANN, H-W. - **Bacteriophage taxonomy.** *Under Microsc*. 2011.
  22. RAKHUBA, D.V., KOLOMIETS, E.I., DEY, E.S., NOVIK, G.I. - **Bacteriophage**

- receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell.** Polish J Microbiol. 59, 3 (2010) 145-155.
23. PARASION, S., KWIATEK, M., GRYKO, R., MIZAK, L., MALM, A. - **Bacteriophages as an Alternative Strategy for Fighting Biofilm Development.** Polish J Microbiol. 63, 2 (2014) 137-145.
  24. DRULIS-KAWA, Z., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., MACIEJEWSKA, B., DELATTRE, A-S., LAVIGNE, R. - **Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications.** Curr Protein Pept Sci. 13, 8 (2012) 699-722.
  25. SHARMA, S., CHATTERJEE, S., DATTA, S., PRASAD, R., DUBEY, D., PRASAD, R.K., VAIRALE, M.G. - **Bacteriophages and its applications: an overview.** Folia Microbiol (Praha). 62, 1 (2017) 17-55.
  26. REECE, J.B., URRY, L.A., CAIN, M.L., WASSERMANN, S.A., MINORSKY, P.V., JACKSON, R.B. - **Campbell Biology.** 10<sup>th</sup> Ed. Pearson, 2013. ISBN: 978-0-321-77565-8.
  27. COMEAU, A.M., HATFULL, G.F., KRISCH, H.M., LINDELL, D., MANN, N.H., PRANGISHVILI, D. - **Exploring the prokaryotic virosphere.** Res Microbiol. 159, 5 (2008) 306-313.
  28. SHARP, R. - **Bacteriophages: biology and history.** J Chem Technol Biotechnol. 76, 7 (2001) 667-672.
  29. SUTTLE, C.A. - **Viruses in the sea.** Nature. 437, 7057 (2005) 356-361.
  30. ASHELFORD, K.E., DAY, M.J., FRY, J.C. - **Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil.** Appl Environ Microbiol. 69, 1 (2003) 285-289.
  31. WEINBAUER, M.G. - **Ecology of prokaryotic viruses.** FEMS Microbiol Rev. 28, 2 (2004) 127-181.
  32. SILLANKORVA, S.M., OLIVEIRA, H., AZEREDO, J. - **Bacteriophages and their role in food safety.** Int J Microbiol. 2012.
  33. NAVARRO, F., MUNIESA, M. - **Phages in the Human Body.** Front Microbiol. 8 (2017) 566.

34. DOMINGO-CALAP, P., GEORGEL, P., BAHRAM, S. - **Back to the future: Bacteriophages as promising therapeutic tools.** HLA. 87, 3 (2016) 133-140.
35. LEPAGE, P., LECLERC, M.C., JOOSSENS, M., MONDOT, S., BLOTTIÈRE, H.M., RAES, J., EHRLICH, D., DORÉ, J. - **A metagenomic insight into our gut's microbiome.** Gut. 62, 1 (2013) 146-158.
36. DALMASSO, M., HILL, C., ROSS, R.P. - **Exploiting gut bacteriophages for human health.** Trends Microbiol. 22, 7 (2014) 399-405.
37. DUCKWORTH, D.H. - **"Who Discovered Bacteriophage?"**. Bacteriol Rev. 40, 4 (1976) 793-802.
38. SULAKVELIDZE, A., ALAVIDZE, Z., MORRIS, J.G. - **Bacteriophage therapy.** Antimicrob Agents Chemother. 45, 3 (2001) 649-659.
39. ABEDON, S.T., KUHL, S.J., BLASDEL, B.G., KUTTER, E.M. - **Phage treatment of human infections.** Bacteriophage. 1, 2 (2011) 66-85.
40. CISEK, A.A., DĄBROWSKA, I., GREGORCZYK, K.P., WYZEWSKI, Z. - **Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages.** Curr Microbiol. 74, 2 (2017) 277-283.
41. BAIG, A., COLOM, J., BARROW, P., SCHOULER, C., MOODLEY, A., LAVIGNE, R., ATTERBURY, R. - **Biology and Genomics of an Historic Therapeutic Escherichia coli Bacteriophage Collection.** Front Microbiol. 8 (2017).
42. GOLKAR, Z., BAGASRA, O., PACE, D.G. - **Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis.** J Infect Dev Ctries. 8, 2 (2014) 129-36.
43. LOC-CARRILLO, C., ABEDON, S.T. - **Pros and cons of phage therapy.** Bacteriophage. 1, 2 (2011) 111-114.
44. BARBU, E.M., CADY, K.C., HUBBY, B. - **Phage Therapy in the Era of Synthetic Biology.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 8, 10 (2016).
45. CLOKIE, M.R., MILLARD, A.D., LETAROV, A.V., HEAPHY, S. - **Phages in nature.** Bacteriophage. 1, 1 (2011) 31-45.
46. NILSSON, A.S. - **Phage therapy--constraints and possibilities.** Ups J Med Sci.



119, 2 (2014) 192-198.

47. VERBEKEN, G., PIRNAY, J-P., LAVIGNE, R., JENNES, S., DE VOS, D., CASTEELS, M., HUYS, I. - **Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 62, 2 (2014) 117-129.
48. PIRNAY, J-P., BLASDEL, B.G., BRETAUDEAU, L., BUCKLING, A., CHANISHVILI, N., CLARK, J.R., CORTE-REAL, S., DEARBIEUX, L., DUBLANCHET, A., DE VOS, D., GABARD, J., GARCIA, M., GODERDZISHVILI, M., GÓRSKI, A., HARDCASTLE J., HUYS, I., KUTTER, E., LAVIGNE, R., MERABISHVILI, M., OLCHAWA, E., PARIKKA, K.J., PATEY, O., POUILLOT, F., RESCH G., ROHDE, C., SCHERES, J., SKURNIK, M., VANECHOUTTE, M., VAN PARYS, L., VERBEKEN, G., ZIZI, M., VAN DEN EEDE, G. - **Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products.** Pharm Res. 32, 7 (2015) 2173-2179.
49. **P.H.A.G.E. - Goals.** [Accessed July 3, 2018]. Available at: <http://www.p-h-a-g-e.org/about/our-goal>
50. SHABBIR, M.A.B., HAO, H., SHABBIR, M.Z., WU, Q., SATTAR, A., YUAN, Z. - **Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenals.** Front Microbiol. 7 (2016).
51. VIERTEL, T.M., RITTER, K., HORZ, H-P. - **Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens.** J Antimicrob Chemother. 69, 9 (2014) 2326-2336.
52. CHAN, B.K., ABEDON, S.T., LOC-CARRILLO, C. - **Phage cocktails and the future of phage therapy.** Future Microbiol. 8, 6 (2013) 769-783.
53. BRUTTIN, A., BRÜSSOW, H. - **Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy.** Antimicrob Agents Chemother. 49, 7 (2005) 2874-2878.
54. WRIGHT, A., HAWKINS, C.H., ÄNGGÅRD E.E., HARPER, D.R. - **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. 34, 4 (2009) 349-357.
55. MIĘDZIBRODZKI, R., BORYSOWSKI, J., WEBER-DĄBROWSKA, B., FORTUNA,

- W., LETKIEWICZ, S., SZUFNAROWSKI, K., PAWEŁCZYK, Z., ROGÓZ, P., KŁAK, M., WOJTASIK, E., GÓRSKI, A. - **Clinical Aspects of Phage Therapy**. *Adv Virus Res.* 83 (2012) 73-121.
56. HODYRA, K., DĄBROWSKA, K. - **Molecular and chemical engineering of bacteriophages for potential medical applications**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 63, 2 (2015) 117-127.
57. NOBREGA, F.L., COSTA, A.R., KLUSKENS, L.D., AZEREDO, J. - **Revisiting phage therapy: new applications for old resources**. *Trends Microbiol.* 23, 4 (2015) 185-191.
58. ROACH, D.R., DONOVAN, D.M. - **Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications**. *Bacteriophage*. 5, 3 (2015).
59. KUMARAN, D., TAHA, M., YI, Q., RAMIREZ-ARCOS, S., DIALLO, J.S., CARLI, A., ABDELBARY, H. - **Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against Staphylococcus aureus Biofilms**. *Front Microbiol.* 9 (2018).
60. CHAUDHRY, W.N., CONCEPCIÓN-ACEVEDO, J., PARK, T., ANDLEEB, S., BULL, J.J., LEVIN, B.R. - **Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing Pseudomonas aeruginosa Biofilms**. *PLoS One*. 12, 1 (2017).
61. JASSIM, S.A.A., LIMOGES, R.G. - **Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages “The Living Drugs”**. *World J Microbiol Biotechnol.* 30, 8 (2014) 2153-2170.
62. KUTTER, E., DE VOS, D., GVASALIA, G., ALAVIDZE, Z., GOGOKHIA, L., KUHL, S., ABEDON, S.T. - **Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections**. *Curr Pharm Biotechnol.* 11, 1 (2010) 69-86.
63. **Bacteriophages - Pyophage®**. [Accessed July 14, 2018]. Available at: <http://bacteriophages.info/en/bacteriophage/piofag/>
64. **Bacteriophages - Intestiphage®**. [Accessed July 14, 2018]. Available at: <http://bacteriophages.info/en/bacteriophage/intesifag/>
65. GUTIÉRREZ, D., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ A., GARCÍA, P. - **Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon To Kill Staphylococcus aureus?** *MBio.* 9, 1

(2018).

66. **Gladskin.** [Accessed July 15, 2018]. Available at: <https://www.gladskin.com/en/>
67. TOTTÉ, J.E.E., PASMANS, S.G.M.A., VAN DOORN, M.B. - **Successful Treatment of Chronic Staphylococcus aureus-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphefekt SA.100: A Report of 3 Cases.** Case Rep Dermatol. 9 (2017) 19-25.
68. MOYE, Z.D., WOOLSTON, J., SULAKVELIDZE, A. - **Bacteriophage Applications for Food Production and Processing.** Viruses. 10, 4 (2018).
69. **Intralytix, Inc. - FAQ's.** [Accessed July 14, 2018]. Available at: <http://www.intralytix.com/index.php?page=faq>
70. **Intralytix, Inc. - ListShield™.** [Accessed July 14, 2018]. Available at: <http://www.intralytix.com/index.php?page=prod&id=1>
71. **Intralytix, Inc. - Bacteriophage Products.** [Accessed July 14, 2018]. Available at: <http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>.
72. **AgriPhage™ - Product Info.** [Accessed July 14, 2018]. Available at: <https://www.agriphage.com/product-info/>
73. **EU Clinical Trials Register - Phagoburn.** [Accessed July 15, 2018]. Available at: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-000714-65/BE>
74. **Phagoburn: Evaluation of phage therapy for the treatment of burn wound infections.** [Accessed July 15, 2018.]. Available at: <http://www.phagoburn.eu/>
75. **ClinicalTrials.gov. - List Results - Search of: phage.** [Accessed July 15, 2018]. Available at: [https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=phage&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=&Search=Apply](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=phage&age_v=&gndr=&type=&rslt=&Search=Apply)
76. **ClinicalTrials.gov - Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial.** [Accessed July 15, 2018]. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03140085?term=phage&rank=8>
77. LEITNER, L., SYBESMA, W., CHANISHVILI, N., GODERDZISHVILI, M., CHKHOTUA, A., UJMAJURIDZE, A., SCHNEIDER, M.P., SARTORI, A., MEHNERT,

U., BACHMANN, L.M., KESSLER, T.M. - **Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial.** BMC Urol. 17, 1 (2017).

78. **ClinicalTrials.gov - Standard Treatment Associated With Phage Therapy Versus Placebo for Diabetic Foot Ulcers Infected by S. Aureus.** [Accessed July 15, 2018.]. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02664740?term=phage&rank=1>