

活体生物药：生物技术推动的创新药研发前沿

邹丹阳¹，董雨萌²，陈晶瑜^{1*}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083

2 苏州优信合生技术有限公司，江苏 苏州 215000

邹丹阳，董雨萌，陈晶瑜. 活体生物药：生物技术推动的创新药研发前沿[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1275-1289.

ZOU Danyang, DONG Yumeng, CHEN Jingyu. Live biotherapeutic products: the forefront of innovative drug development driven by biotechnology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1275-1289.

摘要：随着微生物组学研究的深入，越来越多的研究证据显示微生物与人的健康密切相关。20世纪，人们发现了益生菌，并将其作为有健康功效的食品或膳食补充剂使用。21世纪以来，随着人体微生物组学、DNA合成与测序，以及基因编辑等技术的飞速发展，微生物在人体健康方面展示出更为广阔的应用前景。近年来，在新药研发上，提出了“下一代益生菌”的概念，将微生物作为“活体生物药(live biotherapeutic products, LBP)”进行研究和开发。简单地说，LBP是活菌药物，可以用于预防或治疗人类的某些疾病和适应症。LBP因其独特的优势，成为了新药研发领域的前沿方向，具有十分广阔的发展前景。本文着重从生物技术角度介绍LBP的类型和研究进展，并总结了LBP开发所面临的挑战以及对未来的展望，以期LBP技术的发展与产品开发提供参考。

关键词：活体生物药；下一代益生菌；新药研发；微生物；基因编辑

Live biotherapeutic products: the forefront of innovative drug development driven by biotechnology

ZOU Danyang¹, DONG Yumeng², CHEN Jingyu^{1*}

1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 U-Synbio Technologies Co., Ltd., Suzhou 215000, Jiangsu, China

Abstract: As human microbiome research advances, a large body of evidence shows that microorganisms are closely related to human health. Probiotics were discovered and used as foods or dietary supplements with health benefits in the last century. Microorganisms have shown broader application prospects in human health since the turn of the century, owing to the

资助项目：北京市自然科学基金(L202045)

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (L202045).

*Corresponding author. E-mail: chenjy@cau.edu.cn

Received: 2022-08-22; Accepted: 2022-11-02; Published online: 2022-11-09

rapid development of technologies such as microbiome analysis, DNA synthesis and sequencing, and gene editing. In recent years, the concept of “next-generation probiotics” has been proposed as new drugs, and microorganisms are considered as “live biotherapeutic products (LBP)”. In a nutshell, LBP is a living bacterial drug that can be used to prevent or treat certain human diseases and indications. Because of its distinct advantages, LBP has risen to the forefront of drug development research and has very broad development prospects. This review introduces the varieties and research advances on LBP from a biotechnology standpoint, followed by summarizing the challenges and opportunities for LBP clinical implementations, with the aim to facilitate LBP development.

Keywords: live biotherapeutic products (LBP); next generation probiotics; drug discovery; microorganism; gene editing

人体是多种微生物群落的宿主，宿主与微生物之间复杂的相互作用对人类健康有着重要的影响^[1]。人体胃肠道内的微生物群落可能会导致多种代谢和免疫相关的疾病，例如肥胖、营养不良、炎症性肠病等^[2-7]。这些宿主-微生物之间相互作用的发现为通过调节微生物群落的结构和功能来解决疾病提供了新的思路，将微生物以一种具有针对性和可控性的方式递送至人体内进行疾病的治疗^[8]。益生菌是活的细菌物种，能够在胃的酸性环境中生存和繁衍，并对宿主的健康产生有益的影响^[9]。在益生菌被发现和应用的前 100 年里，人们只将益生菌作为食品或者膳食补充剂使用。进入 21 世纪，人们逐渐认识到微生物特别是细菌在疾病治疗上的潜力，同时受生命科学领域组学技术、DNA 合成与测序、基因编辑等技术的推动，一个创新药研发的新领域逐渐崭露头角，即活体生物药(live biotherapeutic products, LBP)，也被称为“下一代益生菌”。活体生物药是利用正常微生物或促进微生物生长的物质制成的活的微生物制剂^[10]，具有安全性高、疗效好、成本低的优势，有望成为未来创新药研发领域的一匹“黑马”。活体生物药主要分为天然活菌药物和基因编辑活菌药物两类，前者又可细分为单菌种药物和多菌种复配药物^[11]。目前，LBP 的研发已

在癌症、炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、艾滋病、糖尿病、焦虑症、苯丙酮尿症等多种类型疾病中有所报道^[12-17]。活体生物药应用范围之广，极具开发的潜力和价值。本文将从生物技术角度介绍活体生物药的研究进展，并对活体生物药在疾病治疗上的发展前景以及所面临的挑战进行讨论，以期为活体生物药的开发提供参考。

1 活体生物药概述

1.1 活体生物药的定义与开发指导原则

2016 年美国食品药品监督管理局生物制品评价与研究中心(Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research, FDA/CBER)发布了全球第一部明确将活体生物药作为药物使用的指南^[10]，该指南侧重的是活体生物药早期临床阶段化学制造和控制(chemical manufacturing and control, CMC)相关技术要求，明确了活体生物药的定义。活体生物药是一种生物活性药物，具有以下的特点：(1) 含有活的生物体，如细菌；(2) 具有预防、治疗人类疾病或适应证的功能；(3) 不是疫苗。其核心要素是要按新药的标准开发，明确适应症并进行系统的菌株安全性、药效、CMC 以及临床评价。除了生物制品的一些共同特征以外，食品药品监

督管理局(Food and Drug Administration, FDA)指南突出了活菌药物特有的研究重点,如鉴定菌株的稳定性、抗生素敏感性、耐药性、是否转移以及存在移位的可能,还有产品的生产控制与稳定性等^[18]。

1.2 活体生物药的主要类型

目前开发的活体生物药可分为单菌药物、复合菌药物、工程菌药物 3 类。单菌药物即利用天然的单菌种微生物制成活体生物药,其药效明确、成分单一。复合菌药物由 2 种或多种天然菌种复配而成,成分和药效模型都更为复杂。随着合成生物学的发展,人们开始着力于人工设计和改造微生物,使之具有疾病治疗功效,并可实现靶向给药、生物遏制等功能,称为工程菌药物^[19-20]。工程菌活体生物药相较于前 2 种药物具有智能响应、表达高效、靶向明确、功能多样等优势。这 3 种类型的活体生物药在疾病治疗方面已逐步展现出明确的疗效和临床应用价值。例如:单菌药物脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*) BF839 在肿瘤、自闭症、癫痫、银屑病、帕金森等疾病的治疗中均有报道^[21-22];著名的活体生物药公司 Seres Therapeutics 正在研制的复合菌药物 SER-109 可有效治疗复发性艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infections, CDI)^[23];美国合成生物学公司 Synlogic 研制的工程菌药物 SYN1618 能显著降低苯丙酮尿症患者血清中苯丙氨酸水平^[14]。

2 活体生物药的研究进展

利用微生物来干预疾病是目前基础和转化研究的热门方向,国际上涌现了一批科研机构及企业正致力于将活菌作为治疗手段开发利用,特别是开发成活体生物药。严格按照 FDA 或欧洲药典对活体生物药的标准衡量,目前全球活体生物药研发尚处于临床前和临

床阶段。

2.1 天然菌株 LBP 研发现状

近年来,随着测序与分离技术的发展,人们不断发现了更多与疾病密切相关、但尚无人体应用历史的天然新菌种,并将其按照药物进行开发,成为天然菌株 LBP,其包含单菌 LBP 和复合菌 LBP,这 2 种类型的 LBP 已在多种疾病治疗的临床试验中有所报道。表 1 总结了目前天然菌株 LBP 研发项目的进展情况。

2.1.1 单菌 LBP 的开发

单菌 LBP 已在癌症、消化道疾病等多种疾病的研究领域中有所报道。在癌症治疗方面,英国 4D pharma plc 公司基于鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)开发了活体生物药 MRx0518,该药物可以与 pembrolizumab 单抗联合治疗实体瘤,其机理是 MRx0518 的鞭毛蛋白可以激活细胞受体 TLR5 和核因子(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)并诱导 HT29-MTX 细胞产生 IL-8,引发强烈的促炎反应,从而抑制肿瘤细胞的生长^[30]。目前,在一项正在进行的 I/II 期临床试验中已初步取得成效^[25]。还有研究报道,MRx0518 可以与放射疗法联合治疗胰腺癌^[25],受试者将在放射治疗开始前一周时每天服用 MRx0518,且在整个放射治疗期间一直服用直至患者进行肿瘤切除手术,该研究现处于临床 I 期阶段。

在消化道疾病方面,广州知易生物科技有限公司基于脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)开发了 SK08 药物,该药物可有效治疗肠应激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC),并在临床前研究中展现出了良好的药效与安全性,目前已启动 II 期临床研究。前期多项研究表明,脆弱拟杆菌产生的多聚糖可调节辅助性 T 细胞 1(Th1)/(Th2) 比例的平衡,增强机体 T 细胞的功能,同时可

表 1 天然菌株 LBP 研发项目

Table 1 Development of LBPs made from natural strains

| Type | Drug name/No. | Disease | Microbe | References | |
|---------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|------|
| Singal-strain | MSB-01 | Atopic dermatitis | <i>Staphylococcus hominis</i> | [24] | |
| LBPs | Thetanix | Crohn's disease | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | [25] | |
| | MRx-4DP0004 | Asthma | <i>Bifidobacterium breve</i> | [25] | |
| | MRx-0518 | Tumour | <i>Enterococcus gallinarum</i> | [25] | |
| | SK08 | IBS/UC | <i>Bacteroides fragilis</i> | [26] | |
| | LACTIN-V | Bacterial vaginosis | <i>Lactobacillus crispatus</i> | [27] | |
| | XIa1 | Obesity | <i>Christensenella minuta</i> | [27] | |
| | GEN-001 | Tumour | <i>Lactobacillus lactis</i> | [27] | |
| | Blautix | IBS | ND | [27] | |
| | MRx-0005 | Parkinson's disease | <i>Parabacteroides distasonis</i> | [25] | |
| | MRx-0029 | Parkinson's disease | <i>Megasphaera massiliensis</i> | [25] | |
| | MRx-1299 | Tumour | <i>Megasphaera massiliensis</i> | [25] | |
| | Multi-strain LBPs | SER109 | CDI | <i>Firmicutes</i> | [23] |
| | | SER401 | Melanoma | ND | [27] |
| RBX2660 | | CDI | ND | [28] | |
| CP-101 | | CDI | ND | [28] | |
| MaaT013 | | Graft versus host disease | ND | [29] | |
| US-APR2020 | | Chronic kidney disease | ND | [27] | |
| VE800 | | Tumour | ND | [28] | |
| VE202 | | UC | ND | [28] | |
| VE303 | | CDI | ND | [28] | |
| VE416 | | Food allergy | ND | [28] | |
| BMC128 | Tumour | ND | [27] | | |

ND: Not detected; IBS: Irritable bowel syndrome; UC: Ulcerative colitis. Whether fecal microbiota transplantation (FMT) is LBP is still controversial, but more and more literatures attribute FMT to LBP, so this paper also summarizes it as LBP.

以诱导 Treg 细胞分化并产生 IL-10, 抑制炎症因子 IL-17, 从而达到调节机体的免疫功能的效果^[26]。4D pharma plc 公司开发了一种治疗克罗恩病(Crohn's disease, CD)的 LBP 药物——thetanix^[25], 该药物由一株多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)构成, 其作用机理是抑制与多种炎症性疾病相关的 NF- κ B 活化, 产生的 pirin-like 蛋白已成为候选效应分子^[31], 该药物在 Ib 期临床试验中展现出良好的安全性, 达到了预期结果, 更大规模的 II 期临床试验正在进行中。

除此之外, 单菌 LBP 在呼吸系统疾病、妇

科疾病以及神经系统疾病的治疗中也有所报道, 由短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)制成的单菌药物 MRx-4DP0004 可治疗哮喘, 目前研究人员正在通过 I/II 期临床研究进一步评估该药物的安全性、耐受性和免疫调节功效^[27,32]。OSel 公司基于干酪乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)开发了一种活体生物药 Lactin-V, 该药物可以治疗复发性阴道炎, 研究人员在 228 名接受过甲硝唑阴道凝胶治疗的患者阴道中施用了该药物, 结果表明, 经过 11 周的施用, 患者复发阴道炎的概率显著降低^[27]。由马赛巨型球菌(*Megasphaera massiliensis*)构成的 MRx-0029 以

及由狄氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*)构成的 MRx-0005 在临床前均表现出治疗帕金森症的潜力,这 2 种菌株可以降低神经系统炎症反应,保护神经元免受氧化应激损伤并且恢复肠壁屏障完整性,目前这 2 款 LBP 的在研新药(investigational new drug, IND)申报已获得了 FDA 批准,即将进入临床试验阶段^[33-34]。

综上所述,单菌 LBP 作为肿瘤免疫治疗的辅助用药极具开发前景;同时,其消化道给药的特点使其在治疗消化道相关疾病方面具有突出的优势;而对于像阴道炎这类菌群失调类型的疾病来说,相比于抗生素,单菌 LBP 更加安全、不易产生耐药性,而且可以迅速恢复菌群之间的平衡,减轻患者的生理和心理负担;MRx-0029 和 MRx-0005 的 IND 申报获得批准也标志着 LBP 的临床项目已扩展到神经系统疾病领域。

2.1.2 复合菌 LBP 的开发

宿主-微生物群落的相互作用构成了微生物和宿主免疫系统之间的复杂生态系统,而免疫系统功能紊乱是多种疾病的病因,因此利用菌群干预进行疾病治疗成为了当下的另一个新药研发热点,许多研究人员开始致力于复合菌 LBP 的开发。

21 世纪初以来,CDI 一直是全球主要的公共卫生问题之一^[35-36],基于粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)的微生物组疗法在临床试验中对 CDI 疗效显著。Seres Therapeutics 公司研发的复合菌药物 SER-109 是一种由纯化的厚壁菌门孢子组成的微生物组治疗剂,可以有效治疗 CDI,其核心逻辑是厚壁菌孢子有机体与艰难梭菌竞争性代谢生长所必需的营养素和胆汁酸,从而抑制艰难梭菌的繁殖^[37]。III 期床结果显示, SER-109 可显著降低 CDI 的复发率,且其安全性与安慰剂相似^[23]。

类似地, Rebiotix 公司研发的复合菌药物 RBX2660 是一种广谱微生物群混悬液,也可以治疗 CDI,该复合菌药物中的克劳氏芽孢杆菌和罗伊氏乳杆菌所分泌的化合物能抑制艰难梭菌的生长,此外该复合菌药物中的梭状芽孢杆菌代谢产生的次级胆汁酸能够增强艰难梭菌定殖抗性,同时提供营养生态位竞争的无毒艰难梭菌也会抑制艰难梭菌感染,该药物在 III 期临床试验中已取得了关键积极的数据^[27-28]。Finch Therapeutics 公司正在研发的 CP-101 是一种胶囊给药的微生物组疗法,基于冻干保存的粪便,也用来防止 CDI 复发,目前该药物处于临床 II 阶段^[28]。

还有许多复合菌 LBP 是从唾液或粪便等生物样本中分离出来的微生物组治疗剂,这些细菌被分离以后可以在克隆细胞库中繁殖。VEDANTA 公司研发的 VE303 包含 8 种共生梭状芽孢杆菌菌株,可以治疗 CDI,该复合菌药物在 II 期临床试验达到了预期效果,III 期试验计划于 2022 年启动^[27-28]。该公司的另一款药物 VE800 是从健康人类供体粪便中分离出的由 11 种细菌菌株组成的联合体,这些菌株可以诱导 CD8⁺ T 细胞的激活、增强免疫系统对肿瘤细胞的攻击能力并显著增强抗 PD-1 治疗的效果^[38],该药物与 Nivolumab 联合治疗多种肿瘤已经取得了一定进展,目前正在进行 II 期临床试验,进一步评估其安全性、耐受性和疗效^[27]。VE202 含有经试验鉴定后的 11 株粪便来源的菌株,该药物可以通过调节肠道菌群诱导免疫耐受进而治疗自身免疫性疾病,例如炎症性肠病(IBD),在 I 期临床试验中,该药物展现出良好的安全性和耐受性,目前 II 期临床研究正在进行中^[27-28]。

除此之外, Biomica 公司研发的复合菌药物 BMC128 含有 4 种来自人类肠道的天然菌株,

它能够通过多种生物学过程增强免疫治疗效果并促进机体抗肿瘤免疫活性,从而抑制肿瘤的生长,目前研究人员正在进行该药物的I期临床试验,进一步评估 BMC128 与 Nivolumab 联合治疗非小细胞肺癌(non-smallcelllungcancer, NSCLC)、黑色素瘤和肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)的安全性和耐受性^[27]。MRM Health 公司基于 CORAL 平台开发了一种复合菌 LBP,该药物包含了经过合理搭配的 9 株肠道共生菌,在动物模型中,它能够改善门静脉高压、胰岛素信号传导、非酒精性脂肪肝活动指数以及预防肝纤维化的发展,除此之外该药物还可以改善血管内皮功能、重塑肠道菌群^[39]。

虽然 FMT 疗法已经有诸多临床试验,但科学家始终无法掌握其明确的作用机制,因此具有一定的风险,包括不可预料的副作用、疗效不稳定和监管困难等。相比之下,成分明确的细菌组合体构成的复合菌 LBP 更加安全、可控,作用机制更加明确,人们更容易接受。

2.2 工程菌 LBP 的研发现状

随着合成生物学的不断发展,研究人员利

用合成生物学技术,在多种微生物底盘细胞中设计不同的基因线路,使构建完成的菌株具备人们所需要的特殊功能,工程菌药物已在多种疾病的临床试验中有所报道,表 2 总结了工程菌 LBP 研发项目的进展情况。

2.2.1 代谢疾病的 LBP 治疗剂开发

部分代谢疾病,如苯丙酮尿症等,是由于患者体内缺少某种代谢所需的酶或酶活存在缺陷引起的,这导致了细胞的正常代谢通路受阻,有毒物质因为无法代谢而积聚在细胞内^[44-45]。许多研究表明特定的酶或包含特定途径的工程益生菌能够缓解生物体的代谢紊乱^[14,42],其机理如图 1 所示^[46]。工程菌可以合成代谢所必需的酶从而恢复代谢,并且可以抑制有毒产物的合成或将其代谢成无毒产物,进而治疗此类代谢疾病。

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是一种常染色体隐性遗传病,是一种罕见的先天性代谢疾病,患者因为体内缺乏苯丙氨酸羟化酶,因此无法将必需氨基酸苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)转化为酪氨酸^[46-47],血液中 Phe 浓度异常升高可

表 2 工程菌 LBP 研发进展

Table 2 Research progress of engineered LBPs

| Drug name/No. | Disease | Engineered microbe | Clinical progress | References |
|---------------|-------------------------------|---|----------------------|------------|
| MucoCept-CVN | AIDS | <i>Lactobacillus jensenii</i> | Preclinical | [40] |
| AG013 | Oral mucositis | <i>Lactococcus lactis</i> | Phaes IIb | [27] |
| ADXS-HOT | Non-smallcelllungcancer | <i>Listeria monocytogenes</i> | Phase I | [41] |
| ADXS-HPV | HPV related cancer | <i>Listeria monocytogenes</i> | Phase I/II | [41] |
| ADXS-PA | Prostate cancer | <i>Listeria monocytogenes</i> | Phase II | [41] |
| SYNB1020 | Hyperammonemia | <i>Escherichia coli</i> Nissle1917 | Clinical termination | [42] |
| SYNB1618 | Phenylketonuria | <i>Escherichia coli</i> Nissle1917 | Phase I/IIa | [14] |
| SYNB1934 | Phenylketonuria | <i>Escherichia coli</i> Nissle1917 | Phase I | [43] |
| SYNB8802 | Enteric hyperoxaluria | <i>Escherichia coli</i> Nissle1917 | Phase I | [27] |
| SYNB1891 | Solid tumour | <i>Escherichia coli</i> Nissle1917 | Phase I | [27] |
| VXM01 | Glioblastoma | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Ty21a | Phase II | [27] |
| ATZ-04 | Rash related cancer treatment | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Phase I | [27] |
| APS001F | Solid tumour | <i>Bifidobacterium longum</i> | Phase I | [27] |

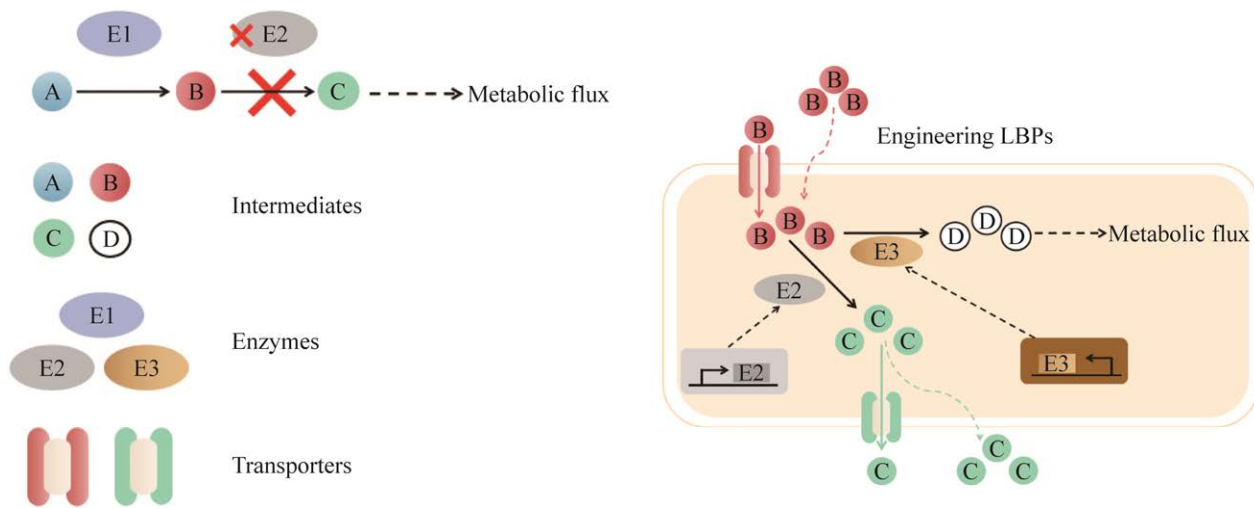


图 1 工程菌 LBP 治疗酶缺乏引起的代谢紊乱疾病的治疗机制^[46]

Figure 1 The therapeutic mechanism of engineering LBPs in the treatment of metabolic disorders caused by enzyme deficiency^[46]. The lack of E2 results in the accumulation of intermediate B and the insufficient supply of intermediate C. The engineered LBPs harboring E2 and/or E3 can be used to resume metabolism and eliminate the accumulation of the intermediate B.

能导致严重的健康问题^[48]。微生物或者植物中存在的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanineammonialyase, PAL)能够将 Phe 转化为氨和反式肉桂酸，可作为 PKU 治疗的潜在酶^[49-50]。通过口服摄入的工程菌 LBP 可以在肠道内发挥作用，对人体通过食物代谢生成的 Phe 进行靶向递送和转化消除，减少其入血，缓解病情。基于此，笔者团队目前正在承担北京市自然科学基金“苯丙酮尿症益生菌活体生物药的研究与评价”项目，在前期对于苯丙酮尿症发病机制的探索研究的基础上，本团队对不同来源的 PAL 进行酶活评价和改造，筛选得到具有优势酶活的 PAL 酶序列(暂未公开披露)，并以益生性乳酸菌为底盘，基于合成生物学技术，构建表达 PAL 酶的工程菌株。通过以 Phe 为底物进行工程菌体催化的体外实验，我们证实了改造后的基因工程菌株具备降解 Phe 的能力，该项目为开发治疗苯丙酮尿症的 LBP 药物提供了强有力的技术支撑(尚未发表)。美国 Synlogic 公司的研究人员通过将

编码苯丙氨酸解氨酶和 L-氨基酸脱氨酶的基因插入到大肠杆菌(*Escherichia coli*) Nissle 1917 (缩写为“ECN”)的基因组中，构建了一株名为 SYN1618 的工程菌^[14]，该菌在厌氧诱导启动子 P_{fms} 的调控下，用染色体整合的 2 个苯丙氨酸内运蛋白基因 *pheP* 和 3 个苯丙氨酸解氨酶基因 *stlA* 进行细菌工程化^[51-52]，为了降低厌氧过程对菌群密度的影响， P_{tac} 启动子控制 2 个额外的 *stlA* 基因，在动物试验中，SYN1618 可显著降低 $Pah^{enu2/enu2}$ 小鼠的血浆 Phe 浓度且防止健康的非人类灵长类动物(NHPs)食蟹猴血浆中 Phe 浓度的激增。I/IIa 期的临床试验结果显示，SYN1618 安全、耐受性良好，所有的参与者在末次注射后的 4 d 内清除了细菌，在健康志愿者和 PKU 患者的胃肠道中，SYN1618 能够消耗 Phe 并将其转化为无毒代谢物^[14,53]。SYN1934 是从 SYN1618 演化出的改良菌株，具有更强的降解 Phe 的能力。I 期临床试验的结果显示，SYN1934 能够剂量依赖性地提高血

浆中 Phe 的降解产物反式肉桂酸(trans-cinnamic acid, TCA)的水平。基于对 Phe 降解生物标志物的测量,SYNB1934 的活性是 SYNB1618 的 2 倍^[27,43]。

高氨血症是一种代谢紊乱疾病,其特征是血液中氨含量过高^[54],该病的诱因是体内缺少参与尿素循环的酶以及转运蛋白,导致无法将游离氨代谢为尿素^[55]。现有的治疗方法是使用乳果糖和抗生素,但其效率不高且具有许多副作用^[56]。研究发现,口服益生菌瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) NS8 菌株可以缓解高氨血症大鼠的认知能力下降和焦虑的行为,这表明了利用肠道菌群减少肠道中氨的含量有望作为高氨血症的有效治疗途径^[57]。除此之外,Kurtz 等^[42]以 ECN 为底盘生物构建了工程菌 SYNB1020,其能够有效地将氨转化为 L-精氨酸,该菌株中编码负调节因子的基因 *ThyA* 和 *ArgR* 被删除,以激活参与精氨酸生物合成和运输的几个基因的转录,编码抗反馈性 N-乙酰谷氨酸合成酶的基因 *ArgA215* 被整合到基因组中以增加精氨酸的生物合成,在 *spf^{ash}* 高氨血症小鼠模型中,施用 SYNB1020 可降低血氨水平并将存活率提高至 50%。不幸的是,该菌株在 Ib/IIa 期临床研究中降低血氨的效果并不理想,主要原因是研究人员选择的适应症为急性高血氨症,工程菌 LBP 无法在 0.5 h 内迅速发挥作用,因而没有达到预期效果,但该工程菌的治疗机制是合理的。这也给 LBP 的研发人员一个启示,在药物的临床试验中,选择适当的适应症尤为重要。

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,病因是由于机体胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损,会导致多种并发症,例如心血管疾病、阿尔茨海默病、中风和神经损伤等^[58],目前它分为 I 型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)和 II 型

糖尿病(type 2 diabetes, T2D)^[59]。目前,使用胰岛素和降血糖药物以及基于细胞因子的疗法是糖尿病的主要治疗方法^[60-61],与这些治疗方法相比,工程菌药物的副作用更小,且能够减轻因注射引起的疼痛。Takiishi 等^[62]设计了一种人类肠道菌株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)来治疗 T1D,修饰的乳酸乳球菌其能够分泌完整的胰岛素原自身抗原和具有生物活性的免疫调节细胞因子白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)。研究人员对非肥胖糖尿病(non obese diabetes, NOD)小鼠进行了该重组乳酸乳球菌和低剂量非特异性免疫调节剂抗 CD3 的联合治疗。结果表明,与对照组相比,59%的实验体 NOD 小鼠血糖水平恢复正常。Robert 等^[63]构建了一株工程化乳酸乳球菌,用其来产生 T1D 自身抗原 GAD 65370-575 和细胞因子 IL-10,与短程低剂量抗 CD3 相结合,即使在严重高血糖的情况下,也可以稳定 NOD 小鼠的胰岛炎症。除此之外,Duan 等^[64]设计了一种重组菌株格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*),其分泌的 GLP-1(1-37)可以降低血糖水平。GLP-1(1-37)能够在体内和体外通过将成人肠上皮细胞转化为功能性胰岛素产生细胞来诱导胰岛素合成^[65]。编码 GLP-1(1-37)的基因与 USP45-LEISS 分泌标记(SEC)以及多组氨酸(HIS)标签融合,由肠激酶位点分隔。在启动子 *PslpA* 控制下的这个表达盒被插入 *L. gasseri* 的染色体中。体外结果表明,GLP-1(1-37)可以将大鼠的肠上皮细胞转化为胰岛素分泌细胞,当将重组 *L. gasseri* 喂给糖尿病模型的大鼠时,在肠上肠中会产生大量分泌胰岛素的细胞。虽然工程菌治疗糖尿病在动物模型上取得了很大进展,但迄今为止临床试验报道很少。

2.2.2 抗感染 LBP 治疗剂的开发

细菌感染在全世界范围内是导致人类发病和死亡的主要原因之一^[66],使用抗生素是预防

和治疗细菌感染的主要疗法。然而，过度使用抗生素会导致抗生素耐药性，这是极大的公共卫生隐患^[67]。近年来，通过工程菌来治疗细菌感染引起了人们的广泛关注。

Saeidi 等^[68]和 Gupta 等^[69]构建了一种工程化大肠杆菌 TOP10 菌株，该菌引入了由铜绿假单胞菌群体感应分子 N-酰基高丝氨酸内酯 (acyl-homoserine lactones, AHL) 诱导的启动子 P_{LasI} ，以驱动基因回路的表达。如图 2 所示，在该系统中，组成型的 $tetR$ 启动子启动转录，生成的转录因子 LasR 与 AHL 3OC12HSL 结合并激活了杀伤和裂解开关，导致大肠杆菌底盘内产生 Pyocin S5 蛋白和 E7 裂解蛋白。E7 裂解蛋白负责裂解大肠杆菌，使产生的 Pyocin S5 释放到工程菌外并特异性杀死铜绿假单胞菌，体外研究表明，该工程化的大肠杆菌可以显著抑制高达 99% 的浮游铜绿假单胞菌的生长。

在上述基础上，研究人员又对其进行了进一步的改进，以 ECN 作为底盘细胞，并在动物

模型中进行了预防铜绿假单胞菌肠道感染的实验，与之前的工程菌株改造系统相比，引入了额外的抗生物膜蛋白分散素 B 来破坏成熟的生物膜，研究表明，在铜绿假单胞菌感染的秀丽隐杆线虫模型中，治疗组的存活时间增加了 2 倍以上；在铜绿假单胞菌感染的小鼠模型中，治疗组铜绿假单胞菌水平比对照组降低了 77%^[70]。

Holowko 等^[71]和 Duan 等^[72]同样以大肠杆菌设计了一种工程菌株，使其与群体感应进行串扰，从而防止霍乱弧菌产生毒素，该工程菌可提高幼年期小鼠模型的存活率并减少毒素的形成。

2.2.3 IBD 的 LBP 治疗剂开发

IBD 是一种病因尚不明确的慢性、非特异性的肠道炎症性疾病，主要包括 CD 和 UC。近年来，随着人们生活环境、饮食习惯的改变以及诊断水平的提高，全球 IBD 的发病率增长迅速，医疗系统压力增大，形势严峻^[18,73]。肠道微生物的多样性和稳定性是 IBD 的重要影响因素，基于微生物开发 IBD 治疗剂具有发展潜力。

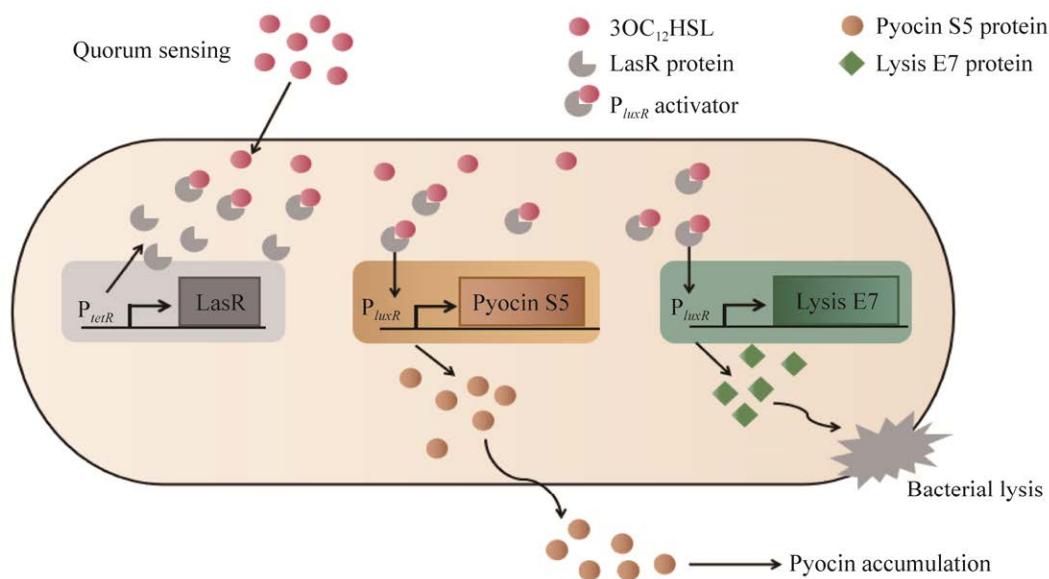


图 2 工程菌特异性杀死铜绿假单胞菌的基因回路设计

Figure 2 Design of gene circuit in *Escherichia coli* for specific killing of *Pseudomonas aeruginosa*.

许多研究人员正在开发用于治疗 IBD 的工程菌株, 目前大部分研究仍处于临床前阶段。

TGF- β 1 是一种重要的肠上皮细胞生长因子, 许多研究证实其是 IBD 治疗的潜在靶点^[74-75]。Hamady 等^[76]通过同源重组将编码 TGF- β 1 基因的序列克隆到卵形拟杆菌(*Bacteroides ovatus*) 木聚糖操纵子中木聚糖酶启动子的下游, 构建了一种工程菌 BO-TGF, 该工程菌在木聚糖的诱导下可以合成并递送 TGF- β , 从而加速受损结肠上皮的愈合, 减少炎症细胞浸润和促炎细胞因子的表达, 并促进富含黏蛋白的杯状细胞的产生, 该工程菌显著改善了小鼠结肠炎的临床症状。

啮齿动物线虫(*Acanthocheilonema viteae*, AvCys)中的胱抑素是治疗 IBD 的有效候选物^[77], Whelan 等^[78]通过对大肠杆菌 ECN 进行基因改造构建了一种工程菌 EcN-AvCys, 该工程菌可以改善猪组织和人类细胞培养物中的肠上皮屏障功能, 并显著抑制小鼠结肠炎模型和断奶后仔猪的肠道炎症。

Elafin 是一种在健康肠黏膜中表达的天然蛋白酶抑制剂, 在体外和动物模型中具有多效抗炎的特性, 研究表明, 在 IBD 患者中, Elafin 的黏膜表达减少。Motta 等^[79]和 Bermúdez-Humarán 等^[80]构建了一种表达 Elafin 的重组 *Lactococcus lactis* (LAB)菌株。在急性和慢性结肠炎小鼠模型中, 通过口服摄入该工程化 LAB 有助于恢复肠道稳态, 降低肠道通透性以及炎症上皮细胞释放的细胞因子和趋化因子, 从而预防炎症性肠病的发生。

3 总结与展望

活体生物药(LBP)在生物技术的推动下应运而生, 成为了一种极具临床应用前景的新型药物。目前, 针对某些疾病治疗的药物显现出

了一些弊端, 包括疗效不理想、易出现超敏反应和耐药性、长期服药造成的副作用以及价格昂贵等等。面对这样的情况, LBP 为药物的开发提供了一种新的思路, 其特异性、靶向性、安全性等优势赋予了它在多种类型疾病中广阔的应用前景。为了进一步促进活体生物药的开发, 充分发挥其优势, 需要注意和改进的方面包括以下几点。

(1) 单菌 LBP 的成分单一、药效明确, 但它由自然界筛选而来, 开发具有一定的偶然性; 复合菌 LBP 的药效和菌株的组成、菌株特性以及多菌株之间的相互作用密切相关, 因此复合菌 LBP 的药效模型和稳定性的评价比单菌药物更复杂, 且多种天然菌株的组合使它的开发具有比单菌 LBP 更高的偶然性。一般情况下, 复合菌药物的疗效要比单菌药物更好, 而单菌药物的药效剂量模型比复合菌药物更加简单清晰, 因此更容易控制药效。天然菌株 LBP 一般都是通过消化道给药, 因此它们在治疗消化道疾病上具有突出的优势。随着人们对基因工程编辑药物的认识更加全面和客观, 相信工程菌药物将会越来越受到人们的青睐, 虽然人们对于转基因的安全性一直心存疑虑, 但面对一些严重疾病的治疗剂选择, 例如肿瘤治疗上, 病人的抗风险能力更高, 依从性和接受度更好。且工程菌药物拥有独特的优势, 例如靶向性更好, 可以增加目标部位的药物积累并最大限度地减少脱靶效应; 给药的剂量低, 产生的毒副作用也很小, 最重要的是它可以通过人为改造, 使其具有人们想要的特定功能, 能够“因病制宜”, 因此它的应用范围更广泛。

(2) 工程菌在治疗由酶缺乏引起的代谢疾病时, 通常会在其系统中引入新的酶基因, 因此, 应仔细评估外来引入酶的特异性和活性, 以避免导致其他未预期的代谢紊乱。在构建工

程菌株时，可以将稳定的、定量的菌株功能生物标志物(例如由工程菌株直接产生的代谢物或蛋白质)纳入菌株设计，这些生物标志物可以阐明工程菌的药代动力学和药效学，促进从临床前模型到临床研究的转化。

(3) 工程菌疗法的安全性至关重要,应采用生物遏制策略,例如在工程菌中使用营养缺陷型或杀伤开关;或是在工程菌的质粒中插入毒素基因以防止基因易位;在工程菌中设计一种质粒复制所必需的特定蛋白质也可以防止工程菌的DNA在特定菌株之外的菌株中扩增。研究人员还应该对活体生物药进行严格的安全评估,包括形态学检查、生理生化鉴定、药敏实验以及毒性试验,着重关注其对患者可能造成的短期或长期副作用以及潜在的脆弱性、致病性等。

(4) LBP 疗法的药效稳定性至关重要。由于活体生物药是由活的微生物制成的这一特殊性,其药效可能受多种因素影响,包括药物剂量、运输储存条件、给药的基质类型、封装技术以及给药方式等。因此,需要进一步研究以明晰生产工艺、药物基质和储存条件等对菌株活力的影响。此外,应在不同的环境、饮食方式和给药方案下对 LBP 进行剂量-药效反应评估。以上药效评估是工程菌作为药物主体进行开发的过程中的必要步骤,构成药物开发的时间成本以及资金投入成本,目的是有效地提高活体生物药的药效稳定性,这是药物临床研究申请审批中的关键质量控制点。此外,应对 LBP 销售部门和消费者进行科学培训,在完善的药物使用指南的指导下,保证其对活体生物有一个全面准确的认知,在销售和使用过程中维持活菌数目,以最大限度地保证药效。

(5) 与其他的化学药品和生物制品相比,从临床反应来看,活体生物药的不良反应率较低,安全性较好。其安全风险主要来自以下 3 个方

面:一是可能会引起消化道的不良反应,例如恶心、呕吐、腹痛、腹泻等;二是活体生物药的一些代谢产物可能会引起毒性反应;三是活体生物药作为一种活的细菌可能会引起感染。因此,研究人员在临床试验中应充分考虑到这些不良反应以及突发事件,并提前制定好应急方案,做好药物预警。

未来随着各种技术之间的交叉与相互渗透,活体生物药必将克服目前阻碍其发展的种种壁垒,造福于更多患者,从而进一步促进微生物学、合成生物学等生命学科的发展与应用。

REFERENCES

- [1] SHREINER AB, KAO JY, YOUNG VB. The gut microbiome in health and in disease[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2015, 31(1): 69-75.
- [2] MAZMANIAN SK, ROUND JL, KASPER DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease[J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 620-625.
- [3] TURNBAUGH PJ, LEY RE, MAHOWALD MA, MAGRINI V, MARDIS ER, GORDON JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [4] BLANTON LV, BARRATT MJ, CHARBONNEAU MR, AHMED T, GORDON JI. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics[J]. *Science*, 2016, 352(6293): 1533.
- [5] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER CN, NEZI L, REUBEN A, ANDREWS MC, KARPINETS TV, PRIETO PA, VICENTE D, HOFFMAN K, WEI SC, COGDILL AP, ZHAO L, HUDGENS CW, HUTCHINSON DS, MANZO T, MACEDO MPD, COTECHINI T, KUMAR T, CHEN WS, REDDY SM, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97-103.
- [6] MATSON V, FESSLER J, BAO R, CHONGSUWAT T, ZHA YY, ALEGRE ML, LUKE JJ, GAJEWSKI TF. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 104-108.

- [7] CLEMENTE JC, URSELL LK, PARFREY LW, KNIGHT R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [8] OZDEMIR T, FEDOREC A, DANINO T, BARNES CP. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity[J]. *Cell Systems*, 2018, 7(1): 5-16.
- [9] GAREAU MG, SHERMAN PM, WALKER WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease[J]. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 2010, 7(9): 503-514.
- [10] Early clinical trials with live biotherapeutic products: chemistry, manufacturing, and control information guidance for industry[EB/OL]. [2022-05-01]. <https://www.fda.gov>.
- [11] 智发朝, 王晔, 刘洋洋, 李平, 梁德宝. 国际活菌药物研究现状及展望[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019, 24(2): 109-113.
ZHI FZ, WANG Y, LIU YY, LI P, LIANG DB. Current situation and prospect of international research on living bacteria drugs[J]. *Modern Digestion & Intervention*, 2019, 24(2): 109-113 (in Chinese).
- [12] SAVIGNAC HM, TRAMULLAS M, KIELY B, DINAN TG, CRYAN JF. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain[J]. *Behavioural Brain Research*, 2015, 287: 59-72.
- [13] CHUA KJ, KWOK WC, AGGARWAL N, SUN T, CHANG MW. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40: 8-16.
- [14] ISABELLA VM, HA BN, CASTILLO MJ, LUBKOWICZ DJ, ROWE SE, MILLET YA, ANDERSON CL, LI N, FISHER AB, WEST KA, REEDER PJ, MOMIN MM, BERGERON CG, GUILMAIN SE, MILLER PF, KURTZ CB, FALB D. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 857-864.
- [15] O'TOOLE PW, MARCHESI JR, HILL C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17057.
- [16] LAGENAUR LA, SANDERS-BEER BE, BRICHACEK B, PAL R, LIU X, LIU Y, YU R, VENZON D, LEE PP, HAMER DH. Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*[J]. *Mucosal Immunology*, 2011, 4(6): 648-657.
- [17] LEE HJ, CHOI JK, RYU HS, CHOI CH, KANG EH, PARK KS, MIN YW, HONG KS. Therapeutic modulation of gut microbiota in functional bowel disorders[J]. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2017, 23(1): 9-19.
- [18] NG SC. Epidemiology of inflammatory bowel disease: focus on Asia[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2014, 28(3): 363-372.
- [19] ZHOU Z, CHEN X, SHENG HK, SHEN XL, SUN XX, YAN YJ, WANG J, YUAN QP. Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 56.
- [20] DOU J, BENNETT MR. Synthetic biology and the gut microbiome[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(5): e1700159.
- [21] 张季阶, 张洪梅, 张翼, 张洪桂, 毕邻, 张秀晨, 张洪正, 徐桂兰, 徐灵芝. 脆弱拟杆菌(BF839)菌液的临床应用研究[J]. *中国生物制品学杂志*, 1995, 1995(2): 63-65.
ZHANG JJ, ZHANG HM, ZHANG Y, ZHANG HG, BI L, ZHANG XC, ZHANG HZ, XU GL, XU LZ. Study on clinical application of *Bacteroides fragilis* (BF839)[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1995, 1995(2): 63-65 (in Chinese).
- [22] 林楚慧, 曾婷, 邓宇虹, 杨文林, 熊婧琳. 脆弱拟杆菌 BF839 治疗寻常型银屑病: 一项单臂、开放初步临床试验[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(11): 3828-3835.
LIN CH, CENG T, DENG YH, YANG WL, XIONG JL. Treatment of psoriasis vulgaris using *Bacteroides fragilis* BF839: a single-arm, open preliminary clinical study[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(11): 3828-3835 (in Chinese).
- [23] FEUERSTADT P, LOUIE TJ, LASHNER B, WANG EEL, DIAO L, BRYANT JA, SIMS M, KRAFT CS, COHEN SH, BERENSON CS, KORMAN LY, FORD CB, LITCOFSKY KD, LOMBARDO MJ, WORTMAN JR, WU H, AUNINS JG, MCCHALICHER CWJ, WINKLER JA, MCGOVERN BH, et al. SER-109, an Oral microbiome therapy for recurrent *Clostridioides difficile* infection[J]. *New England Journal of Medicine*, 2022, 386(3): 220-229.
- [24] MatriSys Bioscience[EB/OL]. [2022-05-22]. <https://www.matrisysbio.com>.
- [25] 4D pharma plc-developing science, delivering therapies[EB/OL]. [2022-05-22]. <https://www.4dpharmapl.com/en>.
- [26] SUN F, ZHANG Q, ZHAO J, ZHANG H, ZHAI Q, CHEN W. A potential species of next-generation

- probiotics? The dark and light sides of *Bacteroides fragilis* in health[J]. Food Research International, 2019, 126: 108590.
- [27] U.S. National Library of Medicine[EB/OL]. [2022-05-27]. <https://www.clinicaltrials.gov>.
- [28] FITZGERALD MJ, SPEK EJ. Microbiome therapeutics and patent protection[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 806-810.
- [29] MaaT pharma-building a leading microbiome company in oncology[EB/OL]. [2022-05-27]. <https://www.maatpharma.com>.
- [30] LAUTE-CALY DL, RAFTIS EJ, COWIE P, HENNESSY E, HOLT A, PANZICA DA, SPARRE C, MINTER B, STROOBACH E, MULDER IE. The flagellin of candidate live biotherapeutic *Enterococcus gallinarum* MRx0518 is a potent immunostimulant[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 801.
- [31] DELDAY M, MULDER I, LOGAN ET, GRANT G. *Bacteroides thetaiotaomicron* ameliorates colon inflammation in preclinical models of crohn's disease[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2019, 25(1): 85-96.
- [32] RAFTIS EJ, DELDAY MI, COWIE P, MCCLUSKEY SM, SINGH MD, ETTORRE A, MULDER IE. *Bifidobacterium breve* MRx0004 protects against airway inflammation in a severe asthma model by suppressing both neutrophil and eosinophil lung infiltration[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12013-12024.
- [33] AHMED S, BUSETTI A, FOTIADOU P, JOSE NV, REID S, GEORGIEVA M, BROWN S, DUNBAR H, BEURKET-ASCENCIO GLORIA, DELDAY MI, ETTORRE A, MULDER IE. *In vitro* characterization of gut microbiota-derived bacterial strains with neuroprotective properties[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2019, 13: 402.
- [34] 4D pharma announces FDA clearance of IND application for live biotherapeutics MRx0005 and MRx0029 for the treatment of Parkinson's disease. [EB/OL]. [2022-05-31]. <https://www.biospace.com/article/releases/4d-pharma-announces-fda-clearance-of-ind-application-for-live-biotherapeutics-mrx0005-and-mrx0029-for-the-treatment-of-parkinson-s-disease->.
- [35] COLLINS J, AUCHTUNG JM. Control of *Clostridium difficile* infection by defined microbial communities[J]. Microbiology Spectrum, 2017, 5(5): <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0009-2016>.
- [36] van NOOD E, VRIEZE A, NIEUWDORP M, FUENTES S, ZOETENDAL EG, VOS WMD, VISSER CE, KUIJPER EJ, BARTELSMAN JFWM, TIJSSEN JGP, SPEELMAN P, DIJKGRAAF MGW, KELLER JJ. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 368(5): 407-415.
- [37] KHANNA S, PARDI DS, KELLY CR, KRAFT CS, DHERE T, HENN MR, LOMBARDO MJ, VULIC M, OHSUMI T, WINKLER J, PINDAR C, MCGOVERN BH, POMERANTZ RJ, AUNINS JG, COOK DN, HOHMANN EL. A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. Journal of Infectious Diseases, 2016, 214(2): 173-181.
- [38] TANOUE T, MORITA S, PLICHTA DR, SKELLY AN, SUDA W, SUGIURA Y, NARUSHIMA S, VLAMAKIS H, MOTOO L, SUGITA K, SHIOTA A, TAKESHITA K, YASUMA-MITOB E K, RIETHMACHER D, KAISHO T, NORMAN JM, MUCIDA D, SUEMATSU M, YAGUCHI T, BUCCI V, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity[J]. Nature, 2019, 565(7741): 600-605.
- [39] MRM health reports preclinical results showing a 9-strain bacterial consortium delays non-alcoholic fatty liver disease progression and liver fibrosis[EB/OL]. [2022-06-08]. <https://www.biospace.com/article/releases/mrm-health-reports-preclinical-results-showing-a-9-strain-bacterial-consortium-delays-non-alcoholic-fatty-liver-disease-progression-and-liver-fibrosis/>.
- [40] Osel is pioneering a new class of medicines, live biotherapeutic products to restore health by modulating the body's microbiome[EB/OL]. [2022-06-11]. <https://oselinc.com/mucocept-technology-platform/>.
- [41] A clinical-stage biotechnology company[EB/OL]. [2022-06-11]. <https://www.advaxis.com/>.
- [42] KURTZ CB, MILLET YA, PUURUNEN MK, PERREAULT M, CHARBONNEAU MR, ISABELLA VM, KOTULA JW, ANTIPOV E, DAGON Y, DENNEY WS, WAGNER DA, WEST KA, DEGAR AJ, BRENNAN AM, MILLER PF. An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans[J]. Science Translational Medicine, 2019, 11(475): eaau7975.
- [43] ADOLFSSEN KJ, CALLIHAN I, MONAHAN CE, GREISEN PJ, SPOONAMORE J, MOMIN M, FITCH LE, CASTILLO MJ, WENG L, RENAUD L, WEILE CJ, KONIECZKA JH, MIRABELLA T, ABIN-FUENTES A, LAWRENCE AG, ISABELLA VM. Improvement of a synthetic live bacterial

- therapeutic for phenylketonuria with biosensor-enabled enzyme engineering[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6215.
- [44] YEN CL, CHEONG ML, GRUETER C, ZHOU P, MORIWAKI J, WONG JS, HUBBARD B, MARMOR S, FARESE JR RV. Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA: monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(4): 442-446.
- [45] BLAU N, van SPRONSEN FJ, LEVY HL. Phenylketonuria[J]. *Lancet*, 2010, 376(9750): 1417-1427.
- [46] VOCKLEY J, ANDERSSON HC, ANTSHEL KM, BRAVERMAN NE, BURTON BK, FRAZIER DM, MITCHELL J, SMITH WE, THOMPSON BH, BERRY SA. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline[J]. *Genetics in Medicine*, 2014, 16(2): 188-200.
- [47] CHACE DH, MILLINGTON DS, TERADA N, KAHLER SG, ROE CR, HOFMAN LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry[J]. *Clinical Chemistry*, 1993, 39(1): 66-71.
- [48] MITCHELL JJ, TRAKADIS YJ, SCRIVER CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency[J]. *Genetics in Medicine*, 2011, 13(8): 697-707.
- [49] SARKISSIAN CN, SHAO Z, BLAIN F, PEEVERS R, SU H, HEFT R, CHANG TM, SCRIVER CR. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(5): 2339-2344.
- [50] WANG L, GAMEZ A, SARKISSIAN CN, STRAUB M, PATCH MG, HAN GW, STRIEPEKE S, FITZPATRICK P, SCRIVER CR, STEVENS RC. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2005, 86(1/2): 134-140.
- [51] DURAND S, STORZ G. Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small RNA[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1215-1231.
- [52] BOYSEN A, MOLLER-JENSEN J, KALLIPOLITIS B, VALENTIN-HANSEN P, OVERGAARD M. Translational regulation of gene expression by an anaerobically induced small non-coding RNA in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(14): 10690-10702.
- [53] PUURUNEN MK, VOCKLEY J, SEARLE SL, SACHAROW SJ, PHILLIPS 3RD JA, DENNEY WS, GOODLETT BD, WAGNER DA, BLANKSTEIN L, CASTILLO MJ, CHARBONNEAU MR, ISABELLA VM, SETHURAMAN VV, RIESE RJ, KURTZ CB, BRENNAN AM. Safety and pharmacodynamics of an engineered *E. coli* Nissle for the treatment of phenylketonuria: a first-in-human phase 1/2a study[J]. *Nature Metabolism*, 2021, 3(8): 1125-1132.
- [54] BACHMANN C. Mechanisms of hyperammonemia[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2002, 40(7): 653-662.
- [55] LEONARD JV, MORRIS AA. Urea cycle disorders[J]. *Semin Neonatol*, 2002, 7(1): 27-35.
- [56] AURON A, BROPHY PD. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. *Pediatric Nephrology*, 2012, 27(2): 207-222.
- [57] LUO J, WANG T, LIANG S, HU X, LI W, JIN F. Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat[J]. *Science China-Life Sciences*, 2014, 57(3): 327-335.
- [58] LI X, SONG D, LENG SX. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2015, 10: 549-560.
- [59] KLOPPPEL G, LOHR M, HABICH K, OBERHOLZER M, HEITZ PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited[J]. *Survey & Synthesis of Pathology Research*, 1985, 4(2): 110-125.
- [60] BLUESTONE JA, HEROLD K, EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1293-1300.
- [61] van BELLE TL, COPPIETERS KT, von HERRATH MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(1): 79-118.
- [62] TAKIISHI T, KORF H, van BELLE TL, ROBERT S, GRIECO FA, CALUWAERTS S, GALLERI L, SPAGNUOLO I, STEIDLER L, HUYNEMEM KV, DEMETTER P, WASSERFALL C, ATKINSON MA, DOTTO F, ROTTIERS P, GYSEMANS C, MATHIEU C. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(5): 1717-1725.
- [63] ROBERT S, GYSEMANS C, TAKIISHI T, KORF H, SPAGNUOLO I, SEBASTIANI G, HUYNEMEM KV,

- STEIDLER L, CALUWAERTS S, DEMETTER P, WASSERFALL CH, ATKINSON MA, DOTTA F, ROTTIERS P, BELLE TLV, MATHIEU C. Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus lactis* reverses diabetes in recent-onset NOD mice[J]. *Diabetes*, 2014, 63(8): 2876-2887.
- [64] DUAN FF, LIU JH, MARCH JC. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes[J]. *Diabetes*, 2015, 64(5): 1794-1803.
- [65] SUZUKI A, NAKAUCHI H, TANIGUCHI H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(9): 5034-5039.
- [66] MULHOLLAND EK, ADEGBOLA RA. Bacterial infections-a major cause of death among children in Africa[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(1): 75-77.
- [67] RENWICK MJ, BROGAN DM, MOSSIALOS E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics[J]. *Journal of Antibiotics*, 2016, 69(2): 73-88.
- [68] SAEIDI N, WONG CK, LO TM, NGUYEN HX, LING H, LEONG SSS, POH CL, CHANG MW. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 521.
- [69] GUPTA S, BRAM EE, WEISS R. Genetically programmable pathogen sense and destroy[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(12): 715-723.
- [70] HWANG IY, KOH E, WONG A, MARCH JC, BENTLEY WE, LEE YS, CHANG MW. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15028.
- [71] HOLOWKO MB, WANG H, JAYARAMAN P, POH CL. Biosensing *Vibrio cholerae* with genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1275-1283.
- [72] DUAN F, MARCH JC. Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse model[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11260-11264.
- [73] WRIGHT EK, DING NS, NIEWIADOMSKI O. Management of inflammatory bowel disease[J]. *Medical Journal of Australia*, 2018, 209(7): 318-323.
- [74] BARNARD JA, BEAUCHAMP RD, COFFEY RJ, MOSES HL. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(5): 1578-1582.
- [75] BECKER C, FANTINI M, NEURATH M. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2006, 17(1/2): 97-106.
- [76] HAMADY ZZ, SCOTT N, FARRAR MD, WADHWA M, DILGER P, WHITEHEAD TR, THORPE R, HOLLAND KT, LODGE JPA, CARDING SR. Treatment of colitis with a commensal gut bacterium engineered to secrete human TGF-beta1 under the control of dietary xylan 1[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2011, 17(9): 1925-1935.
- [77] SCHNOELLER C, RAUSCH S, PILLAI S, AVAGYAN A, WITTIG BM, LODDENKEMPER C, HAMANN A, HAMELMANN E, LUCIUS R, HARTMANN S. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(6): 4265-4272.
- [78] WHELAN RA, RAUSCH S, EBNER F, GUNZEL D, RICHTER JF, HERING NA, SCHULZKE JD, KUHL AA, KELES A, JANCZYK P, NOCKLER K, WIELER LH, HARTMANN S. A transgenic probiotic secreting a parasite immunomodulator for site-directed treatment of gut inflammation[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(10): 1730-1740.
- [79] MOTTA JP, BERMUDEZ-HUMARAN LG, DERAISON C, MARTIN L, ROLLAND C, ROUSSET P, BOUE J, DIETRICH G, CHAPMAN K, KHARRAT P, VINEL JP, ALRIC L, MAS E, SALLENAVE JM, LANGELLA P, VERGNOLLE N. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(158): 144r-158r.
- [80] BERMUDEZ-HUMARAN LG, MOTTA JP, AUBRY C, KHARRAT P, ROUS-MARTIN L, SALLENAVE JM, DERAISON C, VERGNOLLE N, LANGELLA P. Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF-beta anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 26.

(本文责编 陈宏宇)