



## 噬菌体抗菌治疗安全性评估体系的建立

崔泽林<sup>1,2\*</sup>, 郭晓奎<sup>3</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 冯婷婷<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>上海市第一人民医院检验医学科, 上海 200080

<sup>2</sup>宾西法尼亚大学佩雷尔曼医学院, 微生物学系, 费城 PA 19104

<sup>3</sup>上海交通大学医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025

<sup>4</sup>上海市第一人民医院临床药学科, 上海 201620

**摘要:** 人类已经进入后抗生素时代, 噬菌体治疗近年来重新备受重视, 噬菌体制剂不同于传统抗菌药物, 已有对传统抗菌药物的安全性评估体系不适合用于对噬菌体治疗制剂的评估, 需要建立对噬菌体治疗安全性评估的体系。本文就噬菌体治疗所涉及的安全性问题进行系统分析研究, 通过噬菌体本身的选择、噬菌体制剂制备、制剂形式、制剂给予途径、剂量和频次等, 以及噬菌体治疗细菌感染性疾病患者选择等所涉及的安全性和噬菌体治疗对周围微环境的影响等进行全面分析。建立噬菌体治疗安全性评估体系, 为噬菌体治疗尽早进入临床奠定基础。

**关键词:** 噬菌体治疗, 抗菌, 安全性, 评估体系

随着细菌耐药性的日益严峻, 人类已经进入无抗生素可用的后抗生素时代<sup>[1]</sup>。噬菌体作为能杀死细菌的病毒, 早在 100 年前就被发现, 随后被尝试用于抗细菌感染的治疗, 并取得了良好的治疗效果, 然而随着抗生素的发现以及规模化工业生产和广泛使用, 噬菌体抗菌治疗逐渐不再受重视。随着东西方世界的冷战, 西方世界对东方世界的抗生素禁用, 使得噬菌体抗菌治疗在前苏联应用广泛, 然而其所取得的成果随着苏联的解体, 不被以当今西方舆论主导的世界所认识<sup>[2-3]</sup>。噬菌

体治疗近年来重新备受重视, 诸多病例报道均显示了其在抗细菌感染治疗方面的有效性, 单个病人噬菌体治疗成功案例报道以及较少的噬菌体治疗临床研究也尚未发现噬菌体在治疗过程中有可观察到的有害作用<sup>[4-6]</sup>。

噬菌体抗菌治疗是以噬菌体为主要有效成分来进行实践的, 噬菌体特异性强, 具有定点清除病原细菌的能力, 不对人体正常功能菌群有杀灭作用, 其在杀灭宿主菌的同时能胁迫宿主菌的代谢途径生成新的子代释放到周围, 作为新的“弹

基金项目: 优秀医学青年人才 A 类计划(06N1702002); 国家青年科学基金(31500154); 上海市卫生和计划生育委员会(201440289)

\*通信作者。E-mail: 崔泽林, czl\_phage@126.com; 冯婷婷, ycttfeng@163.com

收稿日期: 2018-05-27; 修回日期: 2018-07-13; 网络出版日期: 2018-08-19

药”，进而不易被耗竭；其主要杀菌机制是噬菌体感染宿主菌的过程中，合成对宿主细菌细胞壁有破坏作用的裂解酶类来杀死细菌<sup>[7]</sup>。噬菌体作为生物制剂的一种，噬菌体制剂本身、制剂制备以及给予途径等均不同于传统的抗菌药物，噬菌体治疗的安全性迫切需全面考量。本文在基于已有研究报道的基础上就噬菌体治疗可能涉及的安全性问题进行系统分析研究，建立噬菌体治疗安全评估体系，为推进噬菌体抗菌治疗尽快进入临床提供参考。

## 1 噬菌体本身所涉及的安全性

噬菌体作为包含有蛋白质和核酸等有机大分子的病毒颗粒，与传统抗菌药物安全性问题相比，其本身具有独特的安全风险。噬菌体本身的安全性主要涉及以下 3 个方面：(1) 噬菌体本身是否有有害的组分(毒素，变应原等)：噬菌体是由组成其的蛋白质和核酸(DNA 或 RNA)组成，有部分噬菌体含有脂质成分。通过质谱技术对噬菌体组成进行全蛋白谱系分析，详细解析噬菌体的蛋白谱，并和已知毒素蛋白或变应原蛋白进行比对，分析其组成蛋白及其他组分的潜在不安全性。(2) 噬菌体基因组基因编码遗传信息具有潜在的风险：噬菌体在感染宿主菌时，基因组上编码的遗传信息在感染细菌过程中能表达，倘若噬菌体基因组上携带编码有害产物的基因，如编码有毒素基因时，噬菌体杀死细菌的同时可能会产生毒素<sup>[8]</sup>，这将为噬菌体治疗带来安全风险。(3) 噬菌体可作为有害基因转移的载体<sup>[9]</sup>：如果噬菌体是溶原性噬菌体，其基因组可能会整合到细菌基因组上，如果噬菌体基因组上携带有害基因(耐药基因或毒素基因等)，通过将其基因整合到宿主菌基因组上可能会

使宿主菌毒力或耐药性更强<sup>[10]</sup>，带来潜在的生物安全风险，关于噬菌体遗传信息所涉及安全性问题，本课题组前期也已经建立了基于基因组学对噬菌体安全性的评估体系<sup>[11]</sup>。

## 2 噬菌体制剂制备的安全性

噬菌体制剂的制备不同于传统抗菌药物的制备，前者的制备必须通过噬菌体感染宿主菌和利用宿主菌的新陈代谢来进行自我扩增。噬菌体制剂制备的安全性主要涉及以下两方面：(1) 噬菌体扩增宿主菌的选择：避免所选扩增宿主菌表达毒素基因或有害基因(耐药基因)；在噬菌体治疗制剂制备的过程中，需通过宿主菌扩增才能获得，如果宿主菌表达毒素，在最终制备的噬菌体制剂中可能会含有毒素，而且毒素基因也可能在噬菌体感染宿主菌过程中整合到噬菌体基因组上，带来潜在安全风险。(2) 噬菌体颗粒的纯化富集方法的选择：纯化所得用于治疗噬菌体颗粒不能有细菌组分(lipopolysaccharide, LPS 等)<sup>[12]</sup>，噬菌体纯化富集的方法有密度梯度离心法和色谱法等等<sup>[13]</sup>。在方法的选择上需要经济，且能将杂质去除彻底，比如革兰氏阴性杆菌噬菌体制剂的制备要避免含有 LPS 等，尤其是入血噬菌体治疗制剂，若其携带有毒素或者 LPS 等，应用其来治疗细菌感染会带来安全风险。因此，在噬菌体制剂制备过程中需要谨慎选择宿主菌，并且应选择噬菌体富集佳纯化效果好的方法。

## 3 噬菌体制剂选择和给予途径的安全性

细菌感染性疾病很多，合适的噬菌体制剂和

恰当的给予噬菌体途径对于治疗不同部位细菌感染疾病效果相差很大。单噬菌体制剂相比, 噬菌体鸡尾酒制剂可以防止在治疗过程中噬菌体抵抗菌株的产生<sup>[14-15]</sup>, 能用多株噬菌体的鸡尾酒噬菌体制剂而不用单株噬菌体的噬菌体制剂。临床上应用噬菌体制剂治疗细菌感染病人时需要针对不同感染类别选用不同的噬菌体制剂形式: 比如呼吸道感染可首选噬菌体雾化制剂; 暴露性皮肤细菌感染可以首选噬菌体粉剂、含有噬菌体的洗液和纱布敷料等等; 血流感染可以选用噬菌体注射制剂等<sup>[6]</sup>。噬菌体制剂首选形式和给予途径的能直接接触并杀死感染部位细菌的制剂形式和给予方式。

噬菌体治疗过程中噬菌体制剂给予摄入的安全性问题主要涉及以下四方面: (1) 噬菌体制剂给予途径: 针对不同感染性疾病, 选择不同的给予途径, 通过口服、敷料、静脉和雾化剂等; 需要选择使噬菌体能直接接触到病原细菌制剂形式。(2) 噬菌体制剂给予频次: 摄入给予噬菌体会导致机体产生中和性抗体的可能。所以多次给予噬菌体制剂需要高频次给予, 防止低频次给药产生中和性抗体。(3) 噬菌体制剂给予计量: 首选大剂量给噬菌体, 目前诸多动物试验研究显示大剂量给予噬菌体治愈效果相对较好<sup>[16]</sup>。(4) 噬菌体鸡尾酒制剂的选择: 含有多株噬菌体的噬菌体制剂可以避免治疗过程中噬菌体抵抗菌株的出现, 并能增强疗效<sup>[14-15]</sup>。噬菌体制剂类别的选择、给予途径以及给予频次均会对机体产生重要影响, 针对细菌感染情况的不同, 选择恰当的噬菌体制剂, 并通过恰当的途径, 以及剂量和频次, 是取得良好治愈效果和安全使用噬菌体制剂的保障。

## 4 噬菌体抗菌治疗过程中所涉及的安全性

目前临床上尚无对噬菌体抗菌治疗的系统指导规范, 更缺乏噬菌体抗菌治疗涉及到人体安全性的评估体系; 相反, 抗生素的抗感染治疗已经建立了明确的规范体系, 所涉及的安全性问题的研究也较为彻底。从噬菌体抗菌治疗对人的安全性角度来考虑, 可能涉及到未知的治疗风险。临床上, 在噬菌体抗菌治疗选择方面, 噬菌体治疗不能作为常规抗细菌感染治疗的选择, 常规细菌感染性疾病还是要根据经验用抗菌药物或者病原细菌的抗生素药敏实验进行针对性用药。

截止目前尚未有噬菌体抗菌治疗引起机体安全性问题的报道。为了保障噬菌体抗菌治疗中人的最大安全性, 细菌感染病人选择噬菌体治疗需在 2 个条件下进行: (1) 噬菌体抗菌治疗的选择是在传统抗菌药物感染性疾病治疗无效的情况下进行的: 常规抗菌治疗首选仍是抗生素, 除非出现耐药严峻的细菌感染, 传统抗菌药物无效的情况下, 才会选择噬菌体制剂; 而且噬菌体具有特异性, 在噬菌体治疗之前首先需确认噬菌体制剂对所引起感染的细菌有杀菌作用; 为了防止噬菌体抵抗菌株的出现, 噬菌体鸡尾酒制剂是首选。(2) 噬菌体治疗选择对于细菌感染病人的慎重性: 每个细菌感染患者所患基础疾病不同, 潜在的安全风险各异; 而且噬菌体作为病毒的一种, 由于患者和医务工作者医学专业知识的不对称性, 以及不同患者医学知识背景的差异性, 患者对噬菌体治疗的接受程度不同, 在确定使用噬菌体治疗感染性疾病时, 需对病人的接受度进行宣教, 使病人具有较好的依从性; 并且在治疗

过程中密切观察患者的医学指标,为顺利完成治疗奠定基础(图 1)。

此外,噬菌体抗菌治疗过程中,噬菌体在人体内的清除代谢也是重要考量。众所周知,噬菌体的复制增殖需利用宿主菌的代谢来实现,当引起机体感染的病原细菌被控制和清除之后,噬菌体因其特异性也失去了宿主菌而无法增殖,会被机体新陈代谢系统所清除。然而,监测噬菌体抗菌治疗后其在机体中残留动态也是噬菌体抗菌治疗安全性评估的重要一环,这可以通过对机体不同部位采样样本利用噬菌体定量分析技术(包括定量 PCR 或噬菌体滴度检测等方法)来实现,进而设立噬菌体检测指标来监控治疗过程中噬菌体在人体内的残留程度,完成噬菌体抗菌治疗后其在机体中的残留动态监测。

## 5 噬菌体对环境的安全性

截至目前,噬菌体对整个周围微生境的影响,尤其是菌群微生态影响的研究相对较少,尚未有诸如摄入传统抗菌药物一样有对微生态环境显著影响的类似报道<sup>[17-18]</sup>。然而,噬菌体作为一种生物制剂,其治疗过程中对周围环境尤其是周围微生物环境的影响还尚未清楚,但其所带来的安全性风险需要谨慎评估。

噬菌体具有菌属或菌株特异性,其杀灭目标菌的同时,对正常菌群属或菌种水平不会有杀灭作用。随着细菌高分辨率鉴定检测技术的发展,有研究表明噬菌体对细菌株水平有重要影响<sup>[19]</sup>。相比传统抗菌药物,噬菌体对微生态的影响相对较弱,而且其对环境微生态的影响尚未有系统的评估和

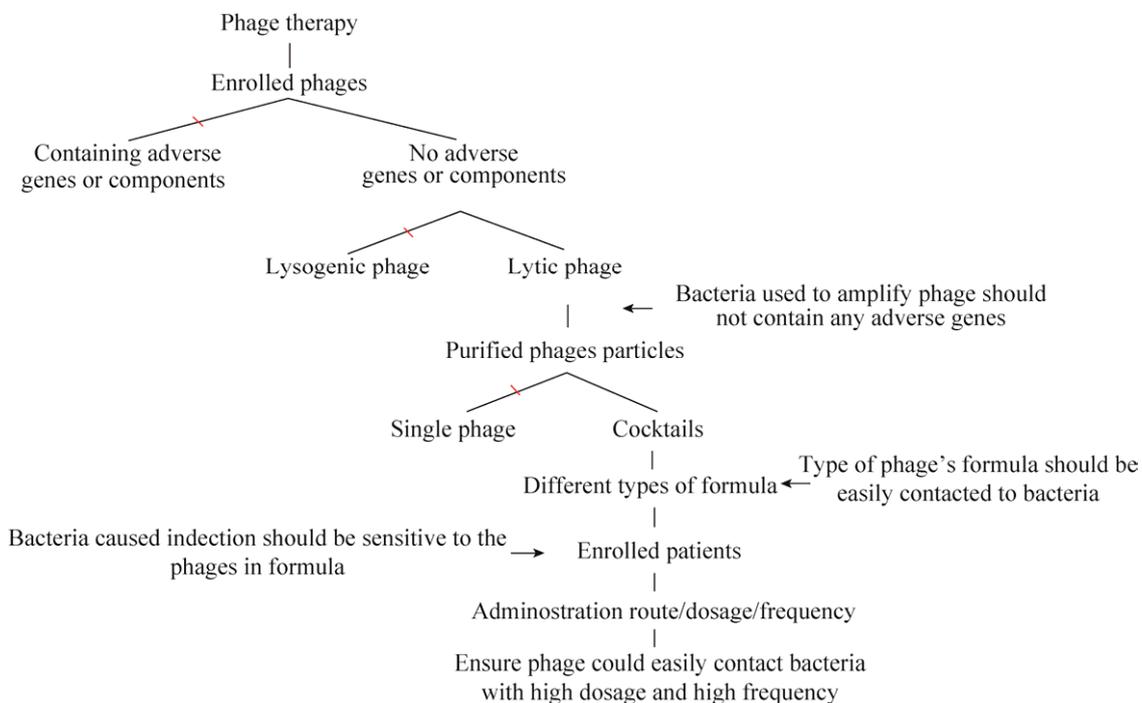


图 1. 噬菌体抗菌治疗安全性评估体系的示意图

Figure 1. The safety assessment system streamline of phage therapy.

研究; 如果排除携带有毒力或耐药等有害基因的溶原性噬菌体的情况下, 其对微环境的影响会更小; 有报道显示, 在欧洲的流行致病性大肠杆菌 0157 携带了前噬菌体编码的毒素基因<sup>[20]</sup>, 产生了严重的社会危害。所以对于携带有害基因(耐药基因和毒力基因等)的噬菌体应排除在治疗用噬菌体之外。

## 6 总结和展望

噬菌体抗菌治疗已有近百年的历史, 噬菌体被发现之后就有研究者尝试应用其来治疗细菌感染性(主要是痢疾和金黄色葡萄球菌的感染)疾病, 并取得了重要进展, 随着抗生素的发现以及随后的规模化工业生产和广泛应用, 噬菌体抗细菌治疗逐渐淡出人们的视野。近年来细菌抗生素耐药性日益严峻, 已经进入无药可用的后抗生素时代, 噬菌体抗细菌治疗也重新倍受重视, 也有诸多应用噬菌体治愈细菌感染的成功案例报道。然而, 已有对传统抗生素进行评价的安全性体系对噬菌体进行评估带来了诸多困难, 也使噬菌体抗细菌治疗因安全性和有效性等问题被部分研究人员和医务工作者所排斥。

噬菌体是病毒的一种, 它可作为生物制剂的一种, 其安全性评估体系与传统抗菌药物有本质的不同<sup>[11]</sup>。本文从噬菌体抗菌治疗所涉及的全过程进行分析研究, 包括噬菌体的筛选以及噬菌体制剂的制备、噬菌体制剂的选择、噬菌体制剂给予途径和噬菌体治疗病人细菌感染疾病的选择等, 针对病人细菌感染不同情况, 针对性地选择噬菌体制剂, 选择噬菌体能直接接触引起感染病原细菌的制剂形式和给予途径; 确定噬菌体制剂中的噬菌体能杀死感染病原细菌的条件下, 在单

噬菌体制剂和噬菌体鸡尾酒制剂之间首选噬菌体鸡尾酒制剂; 在噬菌体给予剂量、频次方面, 应选高剂量高频次给予噬菌体制剂; 在选用噬菌体进行治疗之前, 医务工作者应积极对患者进行宣教, 提高其依从性; 而且需详细开展噬菌体治疗对微生态环境的评估, 评估治疗过程中是否会产生耐药性更强毒力更强的突变菌株, 以及各突变克隆对生态环境产生的潜在安全风险; 以及最后噬菌体对环境的影响等各个方面进行全面系统分析研究, 建立了噬菌体治疗安全评价体系。为今后应用噬菌体治疗感染性疾病走进临床、改善病痛和造福患者奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] Cima G. WHO warns of 'post-antibiotic era'. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2014, 244(12): 1356-1357.
- [2] Stone R. Bacteriophage therapy: Stalin's forgotten cure. *Science*, 2002, 298(5594): 728-731.
- [3] Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, 2(2): 130-133.
- [4] Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, Glonti T, Krylov V, Mast J, Van Parys L, Lavigne R, Volckaert G, Mattheus W, Verween G, de Corte P, Rose T, Jennes S, Zizi M, de Vos D, Vanechoutte M. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4944.
- [5] Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 2009, 18(6): 237-238, 240-243.
- [6] Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. Development and use of personalized bacteriophage-based

- therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(10): e00954–17.
- [7] Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, Klumpp J, Pritchard DG, Dong SL, Donovan DM. Endolysins as antimicrobials. *Advances in Virus Research*, 2012, 83: 299–365.
- [8] Beutin L, Hammerl JA, Strauch E, Reetz J, Dieckmann R, Kelner-Burgos Y, Martin A, Miko A, Strockbine NA, Lindstedt BA, Horn D, Monse H, Huettel B, Müller I, Stüber K, Reinhardt R. Spread of a distinct Stx2-encoding phage prototype among *Escherichia coli* O104:H4 strains from outbreaks in Germany, Norway, and Georgia. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10444–10455.
- [9] Chen J, Novick RP. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*, 2009, 323(5910): 139–141.
- [10] Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, Bouet JY, Cruveiller S, Médigue C, Blanco J, Clermont O, Denamur E, Branger C. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(11): 6550–6557.
- [11] Cui ZL, Guo XK, Dong K, Zhang Y, Li QT, Zhu YZ, Zeng LB, Tang R, Li L. Safety assessment of *Staphylococcus* phages of the family *Myoviridae* based on complete genome sequences. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41259.
- [12] Boratyński J, Syper D, Weber-Dabrowska B, Łusiak-Szelachowska M, Poźniak G, Górski A. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2004, 9(2): 253–259.
- [13] Boulanger P. Purification of bacteriophages and SDS-PAGE analysis of phage structural proteins from ghost particles//Clokie MR, Kropinski AM. Bacteriophages. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 502. New York: Humana Press, 2009: 227–238.
- [14] Fischer S, Kittler S, Klein G, Glünder G. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78543.
- [15] Gu JM, Liu XH, Li Y, Han WY, Lei LC, Yang YJ, Zhao HL, Gao Y, Song J, Lu R, Sun CJ, Feng X. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 2012, 7(3): e31698.
- [16] Henry M, Lavigne R, Debarbieux L. Predicting *in vivo* efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(12): 5961–5968.
- [17] Grønvold AM, L'Abée-Lund TM, Sørsum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(2): 313–326.
- [18] Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*, 2007, 1(1): 56–66.
- [19] Duerkop BA, Clements CV, Rollins D, Rodrigues JLM, Hooper LV. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(43): 17621–17626.
- [20] Park D, Stanton E, Ciezki K, Parrell D, Bozile M, Pike D, Forst SA, Jeong KC, Ivanek R, Döpfer D, Kaspar CW. Evolution of the Stx2-encoding prophage in persistent bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5): 1563–1572.

# Establishment of safety assessment system of phage therapy

Zelin Cui<sup>1,2\*</sup>, Xiaokui Guo<sup>3</sup>, Li Li<sup>1</sup>, Tingting Feng<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Laboratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia 19104 PA, USA

<sup>3</sup> Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

<sup>4</sup> Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai 201620, China

**Abstract:** We have entered into post-antibiotic era, phage therapy has been refocused recently, bacteriophages are different from the normal antibiotics. It is unsuitable to use the established safety assessment system for classical antimicrobial agents to evaluate the safety of bacteriophages for therapy. So, it is necessary to establish the safety assessment system of phage therapy involved in the whole procedures of choosing bacteriophages, including phage production, the choice of bacteriophage products, phage's administration routes, and the bacterial infection patients that enrolled for phage therapy. In this study, we systematically analyzed the safety problem involved in phage therapy and established the safety assessment system of phage therapy. It can provide basis for phages to enter into clinical therapy in the future.

**Keywords:** phage therapy, antibacterial, safety, assessment system

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Outstanding Medical Youth Program A of Shanghai General Hospital (06N1702002), by the National Natural Science Foundation for Young Scientist of China (31500154) and by the Fund of Shanghai Health and Family Planning Committee (201440289)

\*Corresponding authors. E-mail: Zelin Cui, czl\_phage@126.com; Tingting Feng, ycttfeng@163.com

Received: 27 May 2018; Revised: 13 July 2018; Published online: 19 August 2018

**崔泽林**, 上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院, 主管技师, 主要从事噬菌体防控耐药细菌方面的研究。先后鉴定了具有临床应用价值的肺炎克雷伯菌噬菌体 JD001 和金黄色葡萄球菌噬菌体 JD007, 并建立了基于噬菌体基因组学对噬菌体安全性进行评估的方法体系, 而且在小鼠模型中验证了噬菌体防控金黄色葡萄球菌皮肤感染的效果, 并且对噬菌体的杀菌机制做了较为深入的研究。主持多项各级课题。

