

· 综 述 ·

活体生物药的应用及在遗传性代谢缺陷病治疗中的展望

陈钊炜¹, 郭敏^{1,2}, 郑华军^{1*}

1 复旦大学 上海市生物医药技术研究院 国家卫生健康委员会计划生育药具重点实验室, 上海 200032

2 华东理工大学 鲁华生物技术研究所 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

陈钊炜, 郭敏, 郑华军. 活体生物药的应用及在遗传性代谢缺陷病治疗中的展望[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1290-1303.

CHEN Zhaowei, GUO Min, ZHENG Huajun. Application of live biotherapeutic products and perspective in the treatment of inherited metabolic disease[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1290-1303.

摘 要: 活体生物药(live biotherapeutic products, LBPs)是指来自于人体肠道内或自然界中能够治疗人类疾病的活性菌。但天然筛选的活菌存在治疗效果不明显、差异性较大等缺点, 难以满足个性化诊疗的需要。近年来, 随着合成生物学的发展, 研究者利用生命科学及工程科学手段, 设计并构建了若干可响应外界复杂环境信号的工程菌株, 加快了活体生物药的研发和应用过程。遗传性代谢缺陷病(inherited metabolic disease)是因体内某些酶的遗传缺陷致使体内相应的代谢物不能正常代谢而引发一系列临床症状的一类疾病, 因此利用合成生物学技术, 针对特定缺陷的酶设计重组活体生物药, 未来有望用于遗传性代谢缺陷病的治疗。本综述以活体生物药为切入点, 并结合国内外文献综述, 来探讨活体生物药在疾病治疗中的应用, 以及对遗传性代谢缺陷病治疗的潜力。

关键词: 活体生物药; 遗传性代谢缺陷病; 合成生物学; 基因编辑; 工程菌

资助项目: 上海市卫生健康委员会青年基金(20204Y0273)

This work was supported by the Clinical Research Project of Health Industry of Shanghai Municipal Health Commission (20204Y0273).

*Corresponding author. E-mail: zhenghj@sibpt.com

Received: 2022-07-31; Accepted: 2022-10-31

Application of live biotherapeutic products and perspective in the treatment of inherited metabolic disease

CHEN Zhaowei¹, GUO Min^{1,2}, ZHENG Huajun^{1*}

1 National Health Commission Key Laboratory of Reproduction Regulation, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Fudan University, Shanghai 200032, China

2 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, New World Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Live biotherapeutic products (LBPs) refer to the living bacteria derived from human body intestinal gut or in nature that can be used to treat the human disease. However, the naturally screened living bacteria have some disadvantages, such as deficient therapeutic effect and great divergence, which fall short of the personalized diagnosis and treatment needs. In recent years, with the development of synthetic biology, researchers have designed and constructed several engineered strains that can respond to external complex environmental signals, which speeded up the process of development and application of LBPs. Recombinant LBPs modified by gene editing can have therapeutic effect on specific diseases. Inherited metabolic disease is a type of disease that causes a series of clinical symptoms due to the genetic defect of some enzymes in the body, which may cause abnormal metabolism the corresponding metabolites. Therefore, the use of synthetic biology to design LBPs targeting specific defective enzymes will be promising for the treatment of inherited metabolic defects in the future. This review summarizes the clinic applications of LBPs and its potential for the treatment of inherited metabolic defects.

Keywords: live biotherapeutic products (LBPs); inherited metabolic disease; synthetic biology; gene editing; engineered strain

随着人类微生物组计划的开展,越来越多的研究表明肠道微生物组与宿主之间的相互作用可以影响人体的健康^[1]。特定的细菌可以通过改变宿主的免疫、代谢等途径来影响疾病,因此可用于疾病的治疗^[2-4]。2012年美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)发布了开发活体生物药的指南,为基于微生物组的治疗铺平了道路^[5]。

但相对于活体生物药,益生菌这一概念更为人知,它是对宿主健康有益的活的微生物^[6],已经广泛地应用到了各领域,包括食品、畜牧、渔业等行业^[7-8]。因此,随着菌群功能研究的深

入,当众多不属于传统意义益生菌的新菌种被发现可用于疾病治疗时,它们也被称为“下一代益生菌”,即相比于用作传统食品,更适合用于疾病治疗方面的益生菌^[9]。但“活体生物药”这一名词可能比“下一代益生菌”更贴切,因为作为药物使用与益生菌的使用上是有明显区别的。益生菌可作为食品膳食补充剂添加使用,对人体健康起到保健作用。而作为药物使用的活体生物药需要有明确的对症疾病和治疗效果,投入使用前需进行严格的临床前和临床研究。

基因编辑技术以及合成生物学技术的突破,为“编程”微生物提供了可靠的工具和坚实

的理论基础,让构建可以执行特定功能的工程菌成为了可能。许多的遗传性代谢缺陷病已被证实与人体代谢通路中某一关键酶突变失活而导致中间产物大量积累有关。例如异戊酸血症患者由于先天缺乏异戊酰辅酶 A 脱氢酶,导致异戊酸及其代谢物在血液中浓度升高,从而引发疾病^[10]。通过构建能高效代谢异戊酸及其代谢物的工程菌株,可以治疗异戊酸血症等遗传性代谢缺陷病。

1 活体生物药

1.1 活体生物药的定义

联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的联合专家委员会在 2001 年首次明确了益生菌的科学定义,即益生菌是指:当摄取足够数量时,对宿主健康有益的活的微生物^[6]。此后,2012 年美国 FDA 在一份指南中为含有生物活性微生物的产品创造了一个新术语,即活体生物药(live biotherapeutic products, LBPs),也称为活菌药物,其具有如下特征:(1) 含有活性生物,如细菌;(2) 适用于预防或治疗人类疾病;(3) 不是疫苗^[11]。活体生物药既包含活性菌,也可以含有死菌及其代谢产物。而活菌可分为原生菌制剂和共生菌制剂,原生菌制剂所使用的菌株来自于人体肠道内的固有菌群(native bacteria),通过补充原生菌发挥作用,如双歧杆菌和乳杆菌等;共生菌制剂所用菌株来自于人体肠道之外,与人体肠道细菌共生,能够促进人体细菌的生长与繁殖或直接发挥作用,如枯草芽孢杆菌等^[12]。这一定义将活体生物药和益生菌进行了划分,明确了活体生物药的功能以及开发活体生物药的目的是治疗特定的人类疾病,因其针对特定疾病使用,需要进行严格的

临床研究及安全性评价。

1.2 活体生物药的应用

活体生物药正处在一个快速发展的阶段。智发朝等、高倩等和 Garber 先后总结了国内外在研的活体生物药品种(表 1)^[13-15],主要用于治疗消化道疾病、泌尿道感染、皮肤病等疾病。

由于对自身菌群的扰乱,使用广谱抗生素治疗细菌感染是一种严重受限的策略;而活体生物药因其对肠道定植菌群的恢复和控制耐药菌株的扩散,可作为抗生素的替代治疗控制细菌感染,从而减轻炎症反应^[16]。早在 2014 年,就有研究团队发现无症状菌尿(asymptomatic bacteriuria strains, ASB)菌株大肠杆菌作为活体生物药可以用于治疗诸如无症状菌尿(asymptomatic bacteriuria)等泌尿道感染,弥补了现有复发性泌尿道感染和慢性盆腔疼痛治疗方案的缺陷^[17]。在动物实验中发现,ASB 大肠杆菌具有免疫刺激性、类佐剂活性,能有效促进宿主的免疫反应以清除泌尿道病原体^[18]。2018 年, Dausset 等研究表明,含有鼠李糖乳杆菌 lcr35 的活性生物治疗产品 Gynophilus[®](Lcr regenerans[®])可以通过促进内源性乳酸杆菌属的生长来保护妇女的健康阴道菌群,在预防妇女阴道感染,如细菌性阴道炎(bacterial vaginosis, BV)和念珠菌性外阴阴道炎(vulvovaginal candidiasis, VVC)中发挥着重要作用^[19-21]。2020 年之后,活体生物药的研究取得了更多显著成果。例如,通过 RBX7455 活体生物药来治疗艰难梭菌感染,相比于传统治疗,该方法的复发性明显降低^[22]。

活体生物药除了在炎症治疗中得到广泛应用^[23],在其他疾病治疗中也发挥了重要作用。在帕金森病治疗中,活体生物药可以通过脑肠轴来影响大脑的生化行为,从而一定程度上减

轻症状^[24]。经过基因改造的乳酸球菌可作为耐受性免疫治疗的载体,该载体可通过定向自身抗原递送到肠道诱导粘膜免疫耐受来减少自身抗体对 β 细胞的破坏,进而减轻自身免疫性 I 型糖尿病症状^[25]。在肥胖的治疗中,通过构建含有 N-酰基转移酶基因的工程菌,喂饲高脂饮食小鼠催化饱腹因子的前体 N-酰基磷脂酰乙醇胺(N-acylphosphatidylethanolamine, NAPEs)的合成,可明显控制高脂饮食小鼠的体重^[26]。基于活体生物药的肿瘤治疗更是显示出巨大的应用潜力,肿瘤靶向细菌可以单独治疗或者与化疗、放疗、免疫治疗协同作用,解决传统肿瘤疗法的局限性^[27-28]。

值得指出的是,并非所有的干预研究都能显示出临床效果,年龄、遗传和内源性微生物群等环境因素会影响个体对活体生物药的应答效果^[29]。因此,未来的研究需要将潜在健康益处与 LBP 中效应因子联系起来,才能达到更好的治疗效果。

虽然活体生物药在研究上取得了较大的进展,但目前市面上被批准的活体生物药还是很少的,大多的活体生物药都止步在了临床试验阶段。活体生物药的安全性是目前最需要考虑的因素,除了需要明确菌株的来源、评估菌株的耐药性、毒力、基因转移、易位风险等,安全性也需要足够的临床数据进行支撑。另外,还需要建立药代/药效动力学评价方法及相应的菌-细胞共培养体系、疾病动物模型来评估其效果。图 1 给出了风险评估中所需要包含的各个方面^[30];药物开发人员应在开发早期阶段就进行全面的风险分析,用以指导非临床和临床方案的设计、临床试验中需要监测的指标和结局、风险管理计划的定义以及在目标人群中发生严重不良事件时的应急计划^[30]。其次,在工业生产方面,需要开发新的生产工艺,保证活体生物药的活力,以及批次间的一致性等。据统计,国际上进入临床阶段的 LBP 药物约有 60 个,但其中进入临床 III 期的品种仅有 6 个。

表 1 部分国内外临床试验阶段的活体生物药^[13-15]
Table 1 LBPs in clinical trials at home and abroad^[13-15]

Company	Medicine	Development phase	Adaptation disease
4D pharma	Blautix	Clinical phase 2	IBS
	Thetanix	Clinical phase 1	IBD
	Rosburix	Preclinical	UC
	MRx-1299	Preclinical	Cancer
	MRx-0006	Preclinical	Rheumatic arthritis
	MRx-0004	Preclinical	Allergic asthma
	MRx-0002	Preclinical	MS
	MRx-0001	Preclinical	Asthma
	MRx-518	Clinical phase 2	Tumor
Seres therapeutics	MRx-0029	Preclinical	Cancer
	SER-401	Clinical phase 1	Melanoma
	SER-301	Preclinical	IBS
	SER-115	Preclinical	Infection by MDR
	SER-109	Clinical phase 3	rCDI
	SER-287	Clinical phase 2	UC
	SER-262	Suspension	CDI

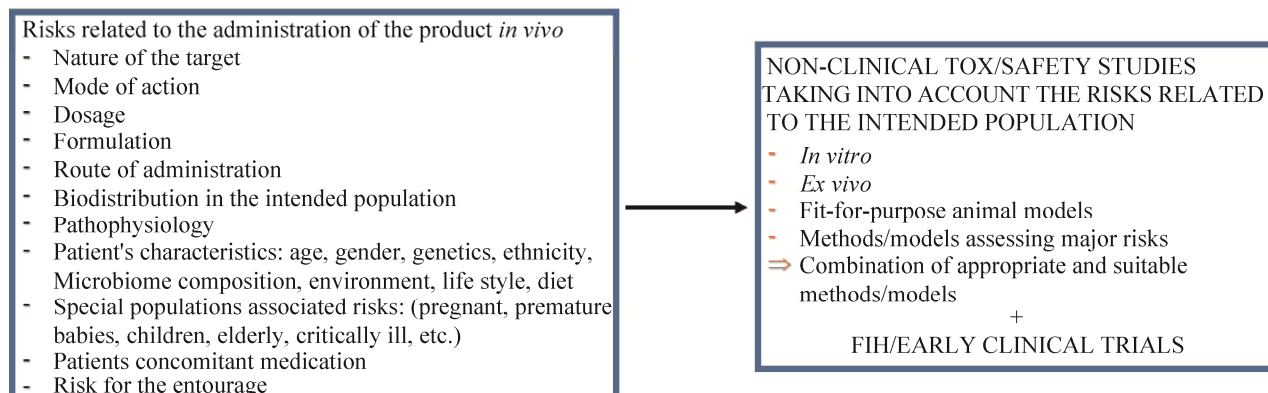
(待续)

(续表 1)

Company	Medicine	Development phase	Adaptation disease
Synlogic	SYNB1618	Clinical phase 2	PKU
	SYNB1020	Suspension	Gastrointestinal disease
	SYNB1913	Clinical phase 2	PKU
	SYN-MSUD	Discovery	Maple syrup urine disease
	SYN-STING	Discovery	Tumor
Rebiotix	RBX-7455	Clinical phase 1	CDI
	RBX-2660	Clinical phase 3	CDI
	RBX-8225	Clinical phase 1	IBD
	RBX-2477	Preclinical	HE
	RBX-6376	Discovery	Infection by <i>Enterococcus</i>
Second genome	SGM-1019	Clinical phase 2	UC
	SG-B	Discovery	Cancer
	SG-A	Discovery	Cancer
	SG-2-0776	Discovery	IBD
Vedanta biosciences	VE800	Preclinical	Tumor
	VE416	Preclinical	Food allergy
	VE202	Preclinical	UC
	VE800	Clinical phase 1	Tumor
	VE303	Clinical phase 2	CDI
	VE700	Discovery	Infection by MDR
BiomX	BX-001	Discovery	Infection by <i>P. acnes</i>
	BX-002	Discovery	IBD
	AOB103	Clinical phase 2	Lupus erythematosus
Osel	MucoCept	Preclinical	HIV prevention
	LACTIN-V	Clinical phase 2	BV
	CBM 588	Preclinical	IBD
Azitra	ATR-04	Clinical phase 1	Dermatitis
	ATR-05	Discovery	Ichthyosis vulgaris
Finch therapeutics	FIN-524	Clinical phase 3	UC
	CP101	Clinical phase 2	rCDI
Assembly biosciences	ABI-M301	Preclinical	IBD
	ABI-M201	Clinical phase 1	UC
Medicilon	MET-5	Clinical phase 1	Obesity
	MET-4	Clinical phase 1	Tumor
	MET-3	Clinical phase 1	Obesity
	MET-2	Clinical phase 1	CDI
Zypharm	SK08	Clinical phase 2	IBS
	SK10	Preclinical	UC
SciBac	DiffiKil	Discovery	CDI
AOBiome	AOB101	Clinical phase 2	Acne
Oragenics	AG013	Clinical phase 2	OM
ViroPharma	VP20621	Clinical phase 2	CDI
MatriSys bioscience	MSB-01	Clinical phase 2	AD
Evelo biosciences	EDP1066	Clinical phase 1	Psoriasis

IBS: Irritable bowel syndrome; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: Ulcerative colitis; MS: Multiple sclerosis; CDI: Clostridioides difficile infection; rCDI: Recurrent clostridioides difficile infection; PKU: Phenylketonuria; HE: Hepatic encephalopathy; MDR: Multidrug resistance; BV: Bacterial vaginosis; OM: Oral mucositis; AD: Alzheimer disease.

Type of risks to be considered in LBPs' risk analysis => Patient-related



Type of risks to be considered in LBPs' risk analysis => Product-related

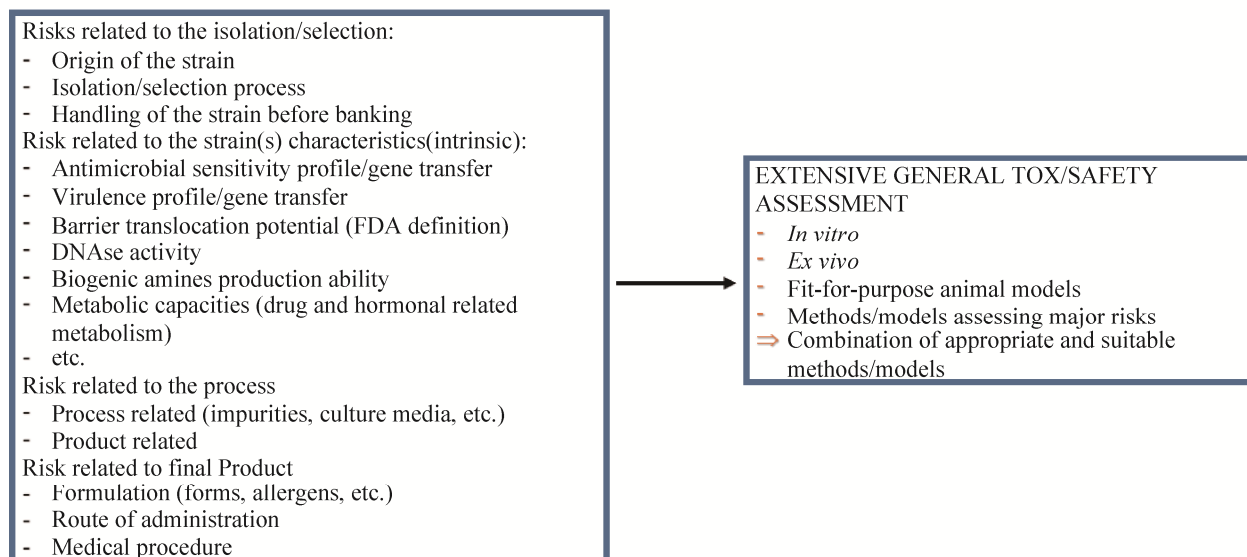


图 1 活体生物药的安全性评价^[30]

Figure 1 Safety evaluation of LBPs^[30].

2 遗传性代谢缺陷病

2.1 定义及发病率

早在 1908 年, Brenton 等就定义了遗传性代谢缺陷病, 将其称为“代谢的先天错误”^[31]。自 1950 年起, 所发现的病例日益增多, 并在发病机理、临床表现、诊断和治疗等方面渐趋深入。现代概念通常将遗传性代谢缺陷病定义为: 因体内某些酶的遗传缺陷致使体内相应的代谢物不能正常代谢而引发一系列临床症状的一类

疾病^[32]。

遗传性代谢缺陷病以常染色体隐性遗传为主^[33], 不同疾病在人群中的发病率存在明显的差异, 例如生物素酶缺乏症的发病率约 1:60 000, 而威尔逊氏病(肝豆状核变性)的发病率为 3:100 000 到 10:100 000^[34]。但是遗传代谢病病种繁多, 目前已发现 3 000 余种, 总体发病率可达活产婴儿的 1/800^[35]。

2.2 诊断及治疗

早先, 遗传病的诊断方法较为直接, 通过

各项实验室检查再根据病史和临床特点由简而繁、由初筛至精确、按一定的步骤选择进行。例如患者尿液的检测、血液的生化检测、氨基酸分析以及有机酸含量分析等^[36]。随着分子遗传学的发展以及基因检测技术的广泛应用,许多新技术层出不穷,从单一到联合应用,从低通量到高通量;包括全外显子测序、胎儿超声检测以及重复序列位点检测等,都在遗传病的诊断中起着重要作用^[37-39]。

早期诊断出的遗传代谢病通常通过饮食控制、药物治疗、酶替代法等进行治疗。但该疗法的先决条件是对遗传性疾病的早期诊断和治疗,在早期阶段中间代谢物或有害物质堆积量少,还未危及到机体的相应组织及器官,在该时期应采用上述方法能对遗传代谢病加以控制,否则很难取得预期的效果。随着基因编辑技术的发展,其在遗传代谢病的治疗中也开始发挥重要的作用^[40]。Hurt 等构建含有艾杜糖苷酶(α -L-iduronidase, IDUA)基因的自体造血干细胞可以对黏多糖贮积症 I 型进行体外基因治疗^[41],将可编程核酸酶(clustered regularly

interspaced short palindromic repeats system, CRISPR 系统)和含有治疗性转基因序列的供体模板 DNA 组成一个系统,可以激活同源定向修复(homologous directed repair, HDR),从而对病人的突变基因进行原位校正(图 2)^[42-43]。但是该技术也存在许多问题,例如编辑效率低、脱靶效应,以及安全性问题。

2.3 活体生物药在遗传性代谢缺陷病治疗中的应用(个案研究)

随着合成生物学的发展,活体生物药的应用价值也更多地被开发出来。通过理性设计改造细菌来感知和响应环境信号,并消耗有害化合物或提供治疗因子可应用于治疗疾病^[43-45]。

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是由于编码苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)的基因缺陷,机体无法将苯丙氨酸转化为酪氨酸而引起的一种遗传性代谢缺陷。为了创造一种适合治疗苯丙酮尿症的活体生物药, Puurunen 等构建了 SYN1618,它是由大肠杆菌 *Escherichia coli*, Nissle 1917 (EcN)改造而来,包含了两条苯丙氨酸降解途径^[46]。第一条途径

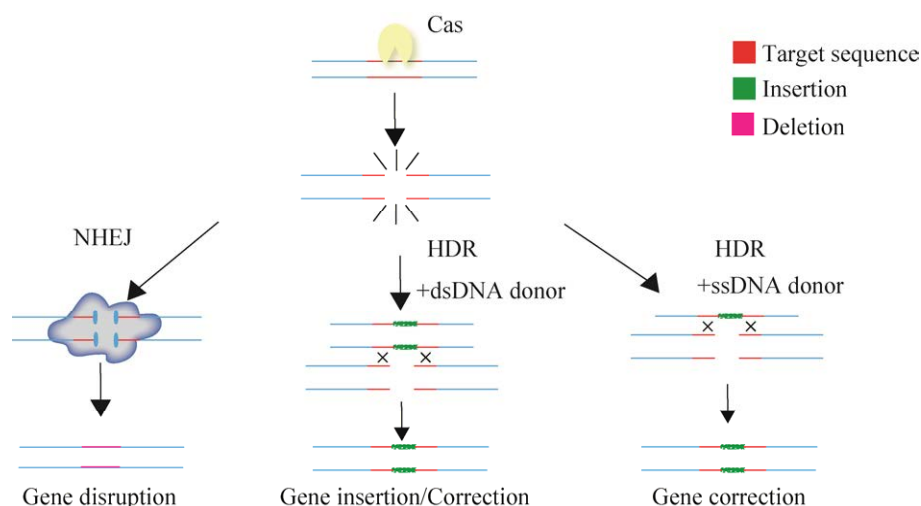


图 2 基于 CRISPR 系统的同源重组修复^[42]

Figure 2 CRISPR-based homologous direct repair (HDR)^[42].

是利用苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)将苯丙氨酸转化为无害的代谢产物反式肉桂酸酯(*trans*-cinnamic acid, TCA)。PAL是一种胞内蛋白,因此还需表达高亲和力的苯丙氨酸转运蛋白 PheP (Phe transporter, PheP)将苯丙氨酸转运到细胞内,增加苯丙氨酸的利用率。第二条途径是利用 L-氨基酸脱氨酶(L-amino acid deaminase, LAAD),该酶定位在细胞膜上,可以将苯丙氨酸转化为苯丙酮酸。编码这些酶和转运蛋白的基因被整合到 EcN 的基因染色体中,并将其置于可诱导启动子的调控中,以便在人类所需的时候可以进行高效控制基因表达(图 3)。最后,在菌株中敲除 *dapA* (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase, DapA) 基因,该基因编码 4-羟基四氢吡啶甲酸合酶,由于缺少该酶使得工程菌只能依赖于外源二氨基吡咯酸来进行细胞壁的合成和生长。该基因的敲除实现了 SYNBI618 菌株的生长控制,只有在 SYNBI618 和二氨基吡咯酸联合使用时,才能保证 SYNBI618 菌株的正常生长。

SYNBI618 在临床试验开始之前进行了广泛的临床前测试,已经证实该药物可以使 $\text{Pah}^{\text{enu2/enu2}}$ PKU 小鼠模型血液中的苯丙氨酸浓度降低^[47]。最初的临床试验是一个在成年健康志愿者和 PKU 患者中进行的 1/2a 阶段的随机、安慰剂对照研究。当前 SYNBI618 已经完成 2 期临床,同时 SYNBI618 已经获得 FDA 颁发的快速通道审评和孤儿药资格,其升级产品 SYNBI934 也已经进入临床。研究结果表明 SYNBI618 是安全的^[46],在 5×10^{10} 、 7×10^{10} 和 1×10^{11} 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)剂量水平时,所引起的不良反应大多是轻微的,其中在 5×10^{10} CFU 和 7×10^{10} CFU 剂量水平时,都有 1/6 参与者具有中度肠道不良反应,而在 1×10^{11} CFU

剂量水平时,则有 1/3 参与者出现中度肠道不良反应。基于临床数据分析, 7×10^{10} CFU 被选为治疗 PKU 的最佳剂量,而最大耐受剂量为 2×10^{11} CFU。另一方面,没有任何参与者患有肠道菌群感染,清除药物时也无需使用任何抗生素,在最后一次服药 4 d 后,粪便样本中的 SYNBI618 低于定量上限^[46]。

肠道高草酸尿(enteric hyperoxaluria, EH)是由于饮食中草酸盐的过度吸收而导致慢性肾结石和肾衰竭的一种常染色体隐性遗传代谢性疾病。草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*, OF)在人类草酸盐代谢中的作用已被广泛研究,表达由草酸/甲酸盐逆向转运蛋白(oxalate:formate antiporter, OxlT),草酰辅酶 A 脱羧酶(oxalyl-CoA decarboxylase, OxdC)和甲酰辅酶 A 转移酶(formyl-CoA transferase, Frc)组成的草酸盐降解途径。OxlT 通过协同甲酸盐的逆向转运将草酸盐转运到细胞质,然后 Frc 将辅酶 A 从甲酰辅酶 A 转移到草酸盐,从而产生草酰辅酶 A 和甲酸。草酰辅酶 A 经 OxdC 脱羧产生甲酰辅酶 A 和 CO_2 ,以进行下一轮循环^[48]。Lubkowitz 等使用 EcN 菌株为底盘,将上述通路涉及的关键基因整合到 EcN 的基因染色体中,并将其置于厌氧诱导型启动子(P_{fms})和厌氧应答转录激活因子 FNR 的调控下,最后敲除胸苷合成酶基因(thymidylate synthase, thyA),以生成在没有外源胸苷补充的情况下不能生长的营养缺陷型菌株 SYNBI8802^[49](图 4)。该活体生物药已在小鼠和非人灵长类动物体内中证实可以消耗肠道内的草酸盐,并且在人体中也建立了多种动力模型。除了上述两种疾病可用活体生物药进行治疗,目前还有多种遗传代谢疾病也可用相同思路设计活体生物药进行治疗(表 2)。

SYNBI618 和 SYNBI8802 的临床效果评估

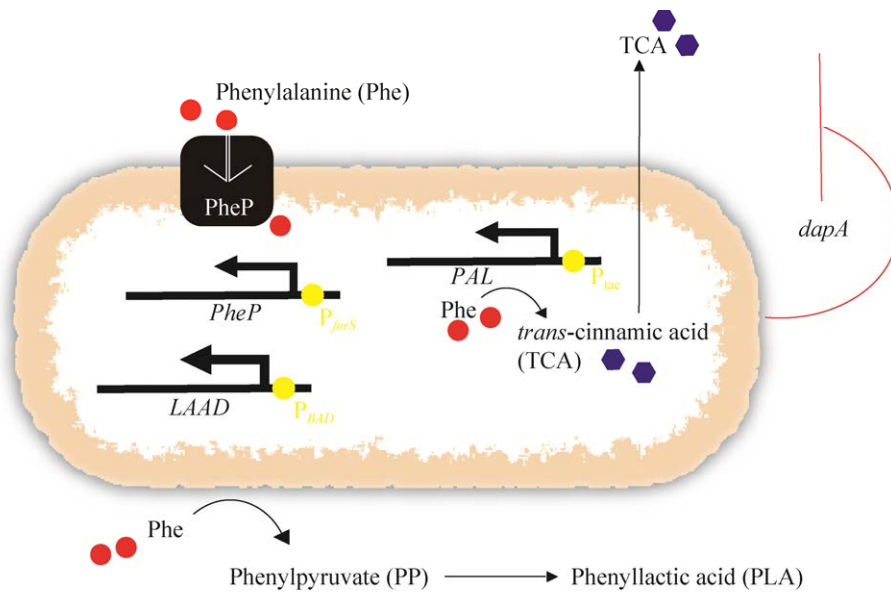


图 3 SYN1618 代谢途径^[46]

Figure 3 SYN1618 metabolic pathway^[46].

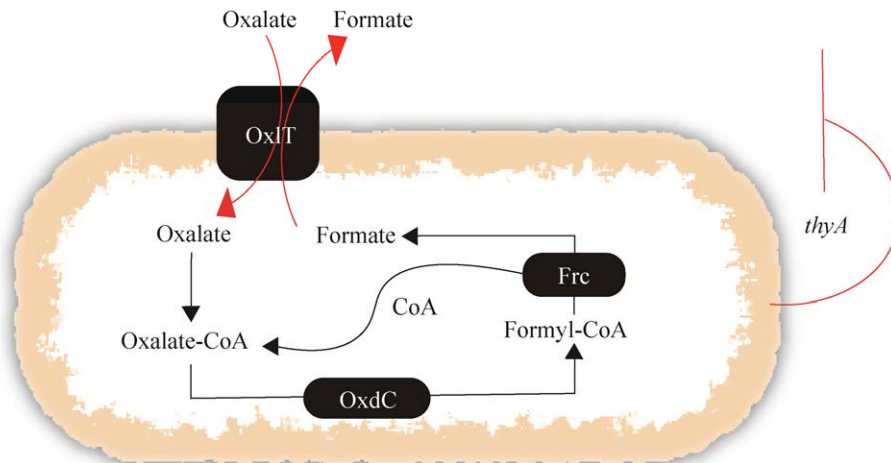


图 4 SYN8802 代谢途径^[49]

Figure 4 SYN8802 metabolic pathway^[49].

在持续进行中, 它也为开发细菌活力动力学、中间代谢物消耗动力学以及细菌排泄动力学的预测模型提供了丰富的数据。这些预测模型分别描述了活菌在何种情况具有最大活力, 底物-产物

转变效率以及活菌在人体的代谢情况, 也可以应用于其他正在开发的合成生物制剂。SYN1618 和 SYN8802 的研究为治疗疾病, 特别是单基因突变的遗传代谢病, 打开了新的大门。

表 2 可菌群治疗的遗传代谢病

Table 2 Genetic metabolic diseases that can be treated by microbiota

Type	Name	Incidence	Pathogenesis
Amino acid metabolic disease	Maple syrup urine disease	1/185 000	Degradation of branched chain amino acids
	Homocysteinemia	1/200 000	Impairment of homocysteine degradation
	Tyrosinemia	1/100 000	Tyrosine degradation disorder
	Hyperphenylalaninemia	1/10 000	Impairment of phenylalanine degradation
Organic acids metabolic diseases	Methylmalonic academia	1/50 000	Methylmalonic acid metabolic disorders
	Propionic acidemia	1/35 000	Abnormal accumulation of propionic acid and related metabolites
	Hypophosphatasia	1/100 000	Glutaric acid accumulates, causing metabolic disorders and brain damage
	Isovaleric acidemia	1/365 000	Disturbance of degradation of isovaleric acid and related metabolites
Carbohydrate metabolic disease	Inherited fructose intolerance	1/23 000	Fructose degradation disorder

3 展望

由于益生菌行业和合成生物学的蓬勃发展, 药物疗法的定义也逐渐广泛起来。合成生物学作为一门学科, 将在未来对预防、诊断和治疗等领域产生巨大影响。许多慢性和复杂疾病面临的一个重要挑战是, 存在多种可能发挥作用的生物学途径, 需要多种治疗方法的组合; 但这些组合往往也伴随着较高的医疗成本和毒性风险。合成生物学通过理性设计的方式, 利用编辑工具构建反馈回路, 整合启动子和基因模块元件对细菌进行精准调控表达, 设计出能在人体中产生治疗效果的活菌产品, 实现对疾病的靶向治疗。活体生物治疗主要是通过 3 种途径来起作用: (1) 直接作用于病原微生物, LBP 表达相应的抑制因子以阻止病原微生物的定殖; (2) 作用于可能导致疾病的分子, 即 LBP 吸收代谢相应的疾病因子, 例如炎症因子、聚集的中间代谢物等; (3) 作用于病理组织, LBP 产生治疗分子, 例如蛋白质、多肽以及代谢物^[44,50]。

一些比较特殊的活体生物药起到了类似疫苗的作用, 即让工程菌分泌或在膜表面展示抗

原来引起机体的免疫反应^[51]。随着病理机制研究的深入及活体生物药作用机理的探索, 利用合成生物学技术进行遗传编程的微生物细胞已被证明是诊断和治疗一系列疾病的有效手段。对于活体生物药的发展来说, 最大的挑战是生物学的复杂性以及宿主微生物群落在人类健康和疾病中的作用。细菌影响寄主表型的机制通常是高度多效性的, 因此需要更多的基础研究和临床数据; 活体生物药有治疗效果但不代表就是万用药, 活体生物药的有效性和安全性还需要扎实的临床数据佐证; 许多活体生物药的研发往往在动物试验阶段能取得良好的成效, 但进入临床前阶段的试验效果却不尽如人意, 最终止步于临床。随着精准医疗时代的到来, 也需要根据患者的实际肠道微生态状况, 进行个性化定制(图 5)^[52]。

重组活体生物药可能带来的环境生物安全问题也必须得到重视。在设计活体生物药时, 不仅要防止工程菌扩散到环境中, 还要防止工程菌中基因的水平转移。研究者已经开发了一系列方法, 控制工程菌株只能在特定环境中存活, 如构建营养缺陷型菌株使其只能在添加了特定营养物质的环境中生长, 或者构建温

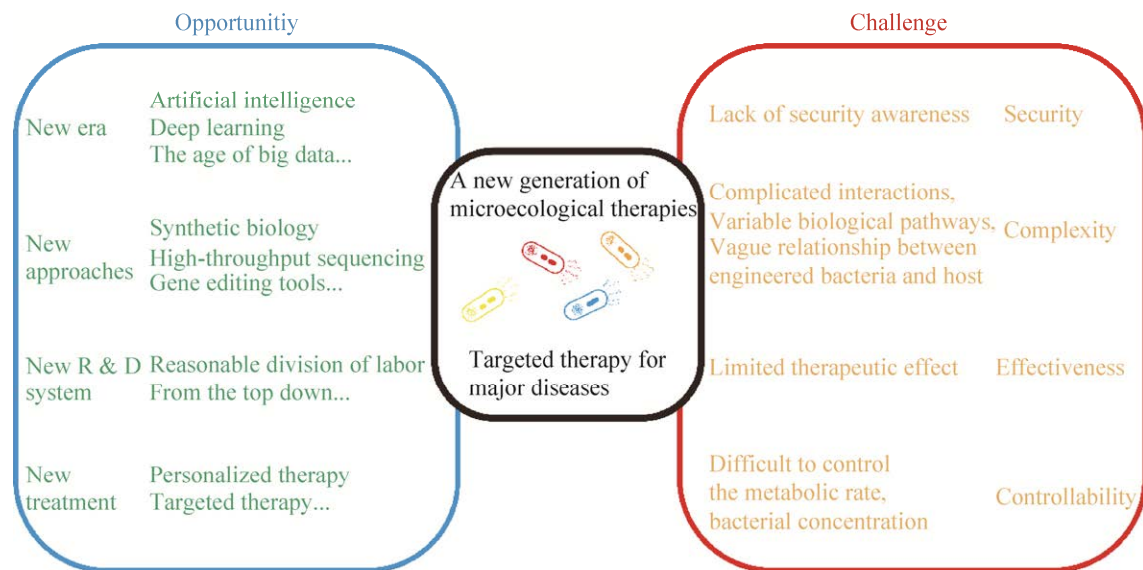


图5 活体生物药面临的机遇及挑战^[52]

Figure 5 Opportunities and challenges faced by LBPs^[52].

度敏感性菌株使其离开肠道(低于 36 °C)就会死亡^[53]。而要阻止工程菌株中的外源 DNA 发生水平转移,则可以让外源质粒携带宿主必需的基因、产生只有宿主菌可以抵抗的毒素,或者使用的质粒必须依赖宿主菌的蛋白才可以复制^[50,53]。

遗传性代谢缺陷病是由基因突变导致的,一直缺乏有效的治疗方法。随着我们对这些疾病潜在病理生理学的深入理解,通过在菌体中编码可替代的降解或合成途径,活体生物药在治疗遗传代谢病方面取得了显著的成果。但是对于机制不明的复杂疾病,仍难通过合成生物学来改造菌株进行治疗。目前,我国活体生物药产业仍处在起步阶段,临床获批的活体生物药数量仍然较少,研究主要集中在消化道疾病、泌尿道感染、皮肤病等有限的领域,在肿瘤、自身免疫类疾病等领域,活体生物药的发展仍有很大的空间。另外临床前研究和临床研究的标准指南也亟需建立。

我们正在进入一个科技飞速发展的时代,

合成生物学和微生物组学交叉促进了重组活体生物药这一新兴领域的发展。人体肠道微生态与人体健康密切相关,全球肠道微生物相关的医药产业存在着巨大的市场;以合成生物学为驱动力发展的活体生物药,将为疾病提供巨大的治疗潜力。

REFERENCES

- [1] KINROSS JM, DARZI AW, NICHOLSON JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease[J]. *Genome Medicine*, 2011, 3(3): 14.
- [2] CHO I, BLASER MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(4): 260-270.
- [3] HERTEL J, FÄSSLER D, HEINKEN A, WEIß FU, RÜHLEMANN M, BANG C, FRANKE A, BUDDE K, HENNING AK, PETERSMANN A, VÖLKER U, VÖLZKE H, THIELE I, GRABE HJ, LERCH MM, NAUCK M, FRIEDRICH N, FROST F. NMR metabolomics reveal urine markers of microbiome diversity and identify benzoate metabolism as a mediator between high microbial alpha diversity and metabolic health[J]. *Metabolites*, 2022, 12(4): 308.
- [4] RUSSO GI, BONGIORNO D, BONOMO C, MUSSO N, STEFANI S, SOKOLAKIS I, HATZICHRISTODOLOU

- G, FALCONE M, CAI T, SMARRAZZO F, VERZE P. The relationship between the gut microbiota, benign prostatic hyperplasia, and erectile dysfunction[J]. International Journal of Impotence Research, 2022: Online ahead of print.
- [5] SUN X, FIALA JL, LOWERY D. Patent watch: modulating the human microbiome with live biotherapeutic products: intellectual property landscape[J]. Nature Review Drug Discovery, 2016, 15(4): 224-225.
- [6] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. Nature Review Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(8): 506-514.
- [7] 徐晴, 李若铭, 王桂芹. 益生菌对鱼类黏膜免疫影响的研究进展[J]. 饲料工业, 2022, 43(6): 5-8.
- XU Q, LI RM, WANG GQ. Research progress of the effect of probiotics on mucosal immunity of fish[J]. Feed Industry, 2022, 43(6): 5-8 (in Chinese).
- [8] 周敏, 汪凯歌, 张濂, 马曦. 微生物-肠-肌轴调节骨骼肌代谢和功能的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(9): 2845-2857.
- ZHOU M, WANG KG, ZHANG L, MA X. Advances in microbiota-gut-muscle axis regulating skeletal muscle metabolism and function[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(9): 2845-2857 (in Chinese).
- [9] O'TOOLE PW, MARCHESI JR, HILL C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 1-6.
- [10] 赵云飞, 祝莎莎, 黄新文. 异戊酸血症的研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2022, 39(1): 99-102.
- ZHAO YF, ZHU SS, HUANG XW. Current understanding and progress of research on isovaleric academia[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2022, 39(1): 99-102 (in Chinese).
- [11] Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information [EB/OL]. [2022-10-20]. Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information; Guidance for Industry (fda.gov).
- [12] 王蕾, 梁自超, 孙瑞涛. 活菌制剂作为反刍动物添加剂的应用进展[J]. 中国奶牛, 2018(3): 9-13.
- WANG L, LIANG ZC, SUN RT. The application of living bacteria preparation as a ruminant feed additive[J]. China Dairy Cattle, 2018(3): 9-13 (in Chinese).
- [13] 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, 104.
- ZHI F(C/Z), WANG Y, LIU YY, LI P, LIANG DB. Present situation and prospect of international research on live bacteria drugs[J]. Modern Digestion & Intervention, 2019, 24(2): 109-113, 104 (in Chinese).
- [14] 高倩, 张宏翔, 江洪, 叶茂. 全球微生态药物研发现状及发展趋势[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(S1): 166-173.
- GAO Q, ZHANG HX, JIANG H, YE M. Current status and trend of R & D of microecological drugs[J]. China Biotechnology, 2020, 40(S1): 166-173(in Chinese).
- [15] GARBER K. First microbiome-based drug clears phase III, in clinical trial turnaround[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2020, 19(10): 655-656.
- [16] DUCARMON QR, KUIJPER EJ, OLLE B. Opportunities and challenges in development of live biotherapeutic products to fight infections[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2021, 223(Supplement_3): S283-S289.
- [17] RUDICK CN, TAYLOR AK, YAGGIE RE, SCHAEFFER AJ, KLUMPP DJ. Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* are live biotherapeutics for UTI[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e109321.
- [18] SEGEV G, SYKES JE, KLUMPP DJ, SCHAEFFER AJ, ANTAKI EM, BYRNE BA, YAGGIE RE, WESTROPP JL. Evaluation of the live biotherapeutic product, asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* 2-12, in healthy dogs and dogs with clinical recurrent UTI[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2018, 32(1): 267-273.
- [19] DAUSSET C, PATRIER S, GAJER P, THORAL C, LENGLET Y, CARDOT JM, JUDLIN P, RAVEL J, NIVOLIEZ A. Comparative phase I randomized open-label pilot clinical trial of Gynophilus® (Lcr regenerans®) immediate release capsules versus slow release muco-adhesive tablets[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2018, 37(10): 1869-1880.
- [20] BAUTISTA CT, WURAPA E, SATEREN WB, MORRIS S, HOLLINGSWORTH B, SANCHEZ JL. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on

- etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhoea infections[J]. *Military Medical Research*, 2016, 3: 4.
- [21] SOBEL JD, FARO S, FORCE RW, FOXMAN B, LEDGER WJ, NYIRJESY PR, REED BD, SUMMERS PR. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1998, 178(2): 203-211.
- [22] KHANNA S, PARDI DS, JONES C, SHANNON WD, GONZALEZ C, BLOUNT K. RBX7455, a non-frozen, orally administered investigational live biotherapeutic, is safe, effective, and shifts patients' microbiomes in a phase 1 study for recurrent *Clostridioides difficile* infections[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2021, 73(7): e1613-e1620.
- [23] OKA A, SARTOR RB. Microbial-based and microbial-targeted therapies for inflammatory bowel diseases[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2020, 65(3): 757-788.
- [24] LORENTE-PICÓN M, LAGUNA A. New avenues for Parkinson's disease therapeutics: disease-modifying strategies based on the gut microbiota[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 433.
- [25] COOK DP, GYSEMANS C, MATHIEU C. *Lactococcus lactis* as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 8: 1961.
- [26] CHEN ZY, GUO LL, ZHANG YQ, WALZEM RL, PENDERGAST JS, PRINTZ RL, MORRIS LC, MATAFONOVA E, STIEN X, KANG L, COULON D, MCGUINNESS OP, NISWENDER KD, DAVIES SS. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(8): 3391-3406.
- [27] LEE J, KEATES AC, LI CJ. Synthetic biology medicine and bacteria-based cancer therapeutics[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2021, 2323: 267-280.
- [28] BAO YW, CHENG Y, LIU W, LUO W, ZHOU P, QIAN D. Bacteria-based synergistic therapy in the backdrop of synthetic biology[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 845346.
- [29] SEGERS ME, LEBEER S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG: host interactions[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(Suppl 1): S7.
- [30] ROUANET A, BOLCA S, BRU A, CLAES I, CVEJIC H, GIRGIS H, HARPER A, LAVERGNE SN, MATHYS S, PANE M, POT B, SHORTT C, ALKEMA W, BEZULOWSKY C, BLANQUET-DIOT S, CHASSARD C, CLAUS SP, HADIDA B, HEMMINGSEN C, JEUNE C, et al. Live biotherapeutic products, a road map for safety assessment[J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 237.
- [31] BRENTON DP, ISENBERG DA, CUSWORTH DC, GARROD P, KRYWAWYCH S, STAMP TC. The adult presenting idiopathic Fanconi syndrome[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1981, 4(4): 211-215.
- [32] 宋力. 遗传性代谢缺陷病研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2003, 2: 7-8.
SONG L. Advances in hereditary metabolic defects[J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2003, 2: 7-8 (in Chinese).
- [33] BEAUDET AL, SCRIVER CR, SLY WS, VALLE D. Genetics, Biochemistry, and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes[M]. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. New York, NY; McGraw-Hill Education, 1995: 53-118.
- [34] ZUDENIGO D, RELJA M. Hepatolenticular degeneration[J]. *Neurologija*, 1990, 39(2): 115-127.
- [35] KRUSZKA P, REGIER D. Inborn errors of metabolism: from preconception to adulthood[J]. *American Family Physician*, 2019, 99(1): 25-32.
- [36] 方俊敏, 王慕逖. 遗传性代谢缺陷病的诊断[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(3): 176-179.
FANG JM, WANG MT. Diagnosis of hereditary metabolic defects[J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2001, 39(3): 176-179. (in Chinese)
- [37] 陈玉兰. 全外显子测序技术在新生儿危重症遗传病诊断中的应用研究[D]. 广州: 广州医科大学硕士学位论文, 2021.
CHEN YL. Detection of inherited diseases in critically ill neonates using whole exome sequencing technology[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangzhou Medical University, 2021 (in Chinese).
- [38] 陈梅, 李惠娟, 李毅. 胎儿超声检查辅助遗传病产前诊断的研究进展[J]. *泰山医学院学报*, 2020, 41(7): 552-555.
CHEN M, LI HJ, LI Y. Research progress of prenatal diagnosis of genetic diseases assisted by fetal ultrasound examination[J]. *Journal of Taishan Medical College*, 2020, 41(7): 552-555 (in Chinese).
- [39] 刘晓丽, 钟青燕, 罗世强, 王秋华, 许泽辉, 覃柳群, 王敬仁, 陈丽竹, 唐宁. 特异性短串联重复序列位点检测在遗传病产前诊断中的应用[J]. *广西医学*, 2020,

- 42(23): 3050-3053, 3067.
- LIU XL, ZHONG QY, LUO SQ, WANG QH, XU ZH, QIN LQ, WANG JR, CHEN LZ, TANG N. Application of specific short tandem repeats locus detection in prenatal diagnosis of genetic diseases[J]. Guangxi Medical Journal, 2020, 42(23): 3050-3053, 3067 (in Chinese).
- [40] 李博文, 梁世倩, 白健, 秦鸿雁. CRISPR-dCas9 转录调控系统及其在遗传病治疗研究中的应用[J]. 生命科学, 2019, 31(6): 628-636.
- LI BW, LIANG SQ, BAI J, QIN HY. The CRISPR-dCas9 system regulating genomic transcription and its application in genetic disease therapy[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(6): 628-636 (in Chinese).
- [41] HURT SC, DICKSON PI, CURIEL DT. Mucopolysaccharidoses type I gene therapy[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2021, 44(5): 1088-1098.
- [42] BRYSON TE, ANGLIN CM, BRIDGES PH, et al. Nuclease-mediated gene therapies for inherited metabolic diseases of the liver[J]. The Yale Journal of Biology and Medicine, 2017, 90(4): 553-566.
- [43] YILMAZ BS, GURUNG S, PEROCHEAU D, COTTLE RN. Gene therapy for inherited metabolic diseases[J]. Journal of Mother and Child, 2020, 24(2): 53-64.
- [44] CUBILLOS-RUIZ A, GUO TX, SOKOLOVSKA A, MILLER PF, COLLINS JJ, LU TK, LORA JM. Engineering living therapeutics with synthetic biology[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20(12): 941-960.
- [45] CABLE J, LEONARD JN, LU TK, XIE Z, CHANG MW, FERNÁNDEZ L, LORA JM, KAUFMAN HL, QUINTANA FJ, GEIGER R, LESSER CF, LYNCH JP, HAVA DL, CORNISH VW, LEE GK, DIANDRETH B, FERRO M, SRIVASTAVA R, de COSTER T, ROYBAL KT, et al. Synthetic biology: at the crossroads of genetic engineering and human therapeutics—a keystone symposia report[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2021, 1506(1): 98-117.
- [46] PUURUNEN MK, VOCKLEY J, SEARLE SL, SACHAROW SJ, PHILLIPS 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.
- [47] 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.
- [48] KNIGHT J, DEORA R, ASSIMOS DG, HOLMES RP. The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease[J]. Urolithiasis, 2013, 41(3): 187-196.
- [49] LUBKOWICZ D, HORVATH NG, JAMES MJ, CANTARELLA P, RENAUD L, BERGERON CG, SHMUELI RB, ANDERSON C, GAO JR, KURTZ CB, PERREAULT M, CHARBONNEAU MR, ISABELLA VM, HAVA DL. An engineered bacterial therapeutic lowers urinary oxalate in preclinical models and *in silico* simulations of enteric hyperoxaluria[J]. Molecular Systems Biology, 2022, 18(3): e10539.
- [50] OZDEMIR T, FEDOREC AJH, DANINO T, BARNES CP. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity[J]. Cell Systems, 2018, 7(1): 5-16.
- [51] YAMAMOTO S, JUN WD, KATAYAMA T, JIKIMOTO T, NAKAMURA M, KINOSHITA S, LEE KM, KAWABATA M, SHIRAKAWA T. Genetically modified *Bifidobacterium* displaying *Salmonella*-antigen protects mice from lethal challenge of *Salmonella* Typhimurium in a murine typhoid fever model[J]. Vaccine, 2010, 28(41): 6684-6691.
- [52] DONG Y, XU T, XIAO G, HU Z, CHEN J. Opportunities and challenges for synthetic biology in the therapy of inflammatory bowel disease[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 909591.
- [53] WRIGHT O, DELMANS M, STAN GB, ELLIS T. GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(3): 307-316.

(本文责编 陈宏宇)