



工程噬菌体治疗多重耐药细菌感染*

陈玉颖^{1,2)**} 黄春梅^{1)**} 潘金枝^{1,2)**} 刘德亮²⁾ 周 决²⁾ 戴桂琴²⁾
赵鹏飞^{2)***} 卢洪洲^{2)***} 郑明彬^{1,2)***}⁽¹⁾ 广东医科大学, 药学院, 东莞市药物设计与制剂技术重点实验室, 广东医科大学纳米药物制剂重点实验室, 东莞 523808;⁽²⁾ 深圳市第三人民医院, 国家感染性疾病临床医学研究中心, 深圳市结核病临床医学研究中心, 肝病研究所, 深圳 518112)

摘要 由多重耐药 (MDR) 细菌引发的感染已成为全球公共卫生的重大挑战。传统抗生素药物研发乏力、疗效下降, 亟须开发新型抗菌策略。噬菌体作为天然杀菌剂, 具有特异性强、可自我复制及生产成本低等显著优势。然而, 野生型噬菌体在临床应用中仍面临宿主谱呈现高度多样性、易被免疫系统清除、难以穿透生物膜等瓶颈。随着合成生物学、纳米技术与基因编辑技术的融合发展, 工程噬菌体技术取得长足进步, 为突破上述局限提供了可编程、可扩展且具临床转化潜力的技术路径。本文系统综述了工程噬菌体的化学修饰、体内编辑、体外合成及定向进化等核心构建策略, 重点介绍了其在破坏细菌生物膜、削弱病原菌毒力、恢复抗生素敏感性、递送纳米药物及调控微生态平衡等方面的治疗应用与作用机制, 深入分析了其在宿主匹配、细菌耐受、药代动力学、给药途径、生产质控及临床剂量确定等方面面临的挑战, 并展望了多学科交叉背景下工程噬菌体的智能化设计、标准化制备及临床转化前景, 旨在为 MDR 细菌感染的新型生物疗法提供理论参考与技术支撑。

关键词 工程噬菌体, 工程化技术, 耐药细菌, 生物治疗

中图分类号 Q5, Q81, R9

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0552

CSTR: 32369.14.pibb.20250552

多重耐药 (multidrug resistance, MDR) 细菌带来的全球威胁日益严重, 导致相关疾病发病率、死亡率和医疗费用显著增加。《柳叶刀》(*The Lancet*) 最新分析报告显示, 细菌感染已成为仅次于缺血性心脏病的全球第二大死因, 全球每年有约 800 万人死于 33 种常见细菌感染, 其中耐药菌感染直接造成约 130 万人死亡^[1]。然而, 目前抗生素研发管线日益萎缩, 葛兰素史克、默沙东等全球领先抗生素制药公司已停止抗生素的开发管线^[2-4], 导致针对 MDR 细菌的新抗菌药物研发严重滞后。噬菌体 (bacteriophage, phages) 是一类专门感染细菌的病毒, 也是地球上最丰富的生物实体之一, 由弗雷德里克·图尔特 (Frederick Twort) 和费利克斯·德赫雷尔 (Felix dHerelle) 分别在 1915 年和 1917 年独立发现, 并在 20 世纪 30 年代曾被广泛应用于治疗人类和动物的细菌感染^[5-9]。传统抗生素作用靶点单一, 细菌易通过基因突变产生耐药性^[10]。噬菌体则不同, 作为活体抗菌制剂, 其尾

部受体结合蛋白 (receptor binding protein, RBP) 能精准识别宿主菌表面的特定受体, 并通过注入遗传物质特异性裂解宿主菌^[11-12]。这一独特机制绕开了传统抗生素的耐药路径, 从而有效克服细菌耐药问题, 实现精准杀菌。随着 MDR 危机的加剧, 噬菌体疗法研究在 21 世纪得以重视。欧洲联盟和美国分别于 2013 年和 2016 年启动了噬菌体疗法的临床试验, 初步验证了噬菌体治疗耐药细菌感染的

* 国家重点研发计划 (2023YFA0915600), 深圳市医学研究专项 (D250402006), 国家自然科学基金 (82372271), 广东省高校重点领域项目 (2022DZX2022), 广东省医学科研基金 (A2024400) 和深圳市科技计划 (JCYJ20240813102021028, JCYJ20240813102012017, JCYJ20250604143832042) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

赵鹏飞 Tel: 0755-61222333, E-mail: pengfeizhao@aliyun.com

卢洪洲 Tel: 0755-61222333, E-mail: luhongzhou@fudan.edu.cn

郑明彬 Tel: 0755-61222333, E-mail: mingbinzheng@126.com

收稿日期: 2025-12-18, 接受日期: 2026-04-18

安全性^[13]。美国国立犹太健康中心联合科罗拉多大学和匹茨堡大学于2022年利用噬菌体成功治疗了一名合并难治性脓肿分枝杆菌肺部感染的囊性纤维化患者。该患者在常规抗生素治疗失败后,经静脉输注噬菌体鸡尾酒,显著改善临床感染症状,证实噬菌体能够有效治疗临床的超级耐药菌感染^[14]。噬菌体因生产简单、快速且成本低,被认为在人类细菌感染治疗、病原体检测、兽医医学、食品工业等领域具有巨大潜力^[15-22]。

与抗生素不同,噬菌体通常对特定菌株具有高度特异性,可避免对微生物群产生非靶向效应。首先,尽管野生噬菌体宿主谱呈现高度多样性,但在面对特定耐药菌感染时,其宿主范围往往难以满足临床精准匹配的需求。其次,使用野生型噬菌体进

行治疗仍面临诸多挑战,包括潜在的免疫反应、生物膜清除能力不足、细菌毒素(如内毒素)释放以及细菌间基因转移等风险^[23-25]。此外,噬菌体在自然进化中以自身繁殖为优化方向,并非针对治疗目的的设计,限制了其在生物医学领域的应用潜力。因此,迫切需要对噬菌体进行功能改造,从而克服噬菌体在实际应用中的诸多缺陷。随着生物合成和纳米科学的快速发展以及噬菌体基因组和结构数据库的完善,通过化学修饰、材料改进和遗传进化等策略,有望克服噬菌体的天然局限性。工程噬菌体通过化学修饰、体内编辑、体外合成和定向进化等策略的制备方法,在破坏细菌生物膜、恢复药物敏感、精准药物递送以及调控菌群平衡等领域发挥重要的作用(图1)。

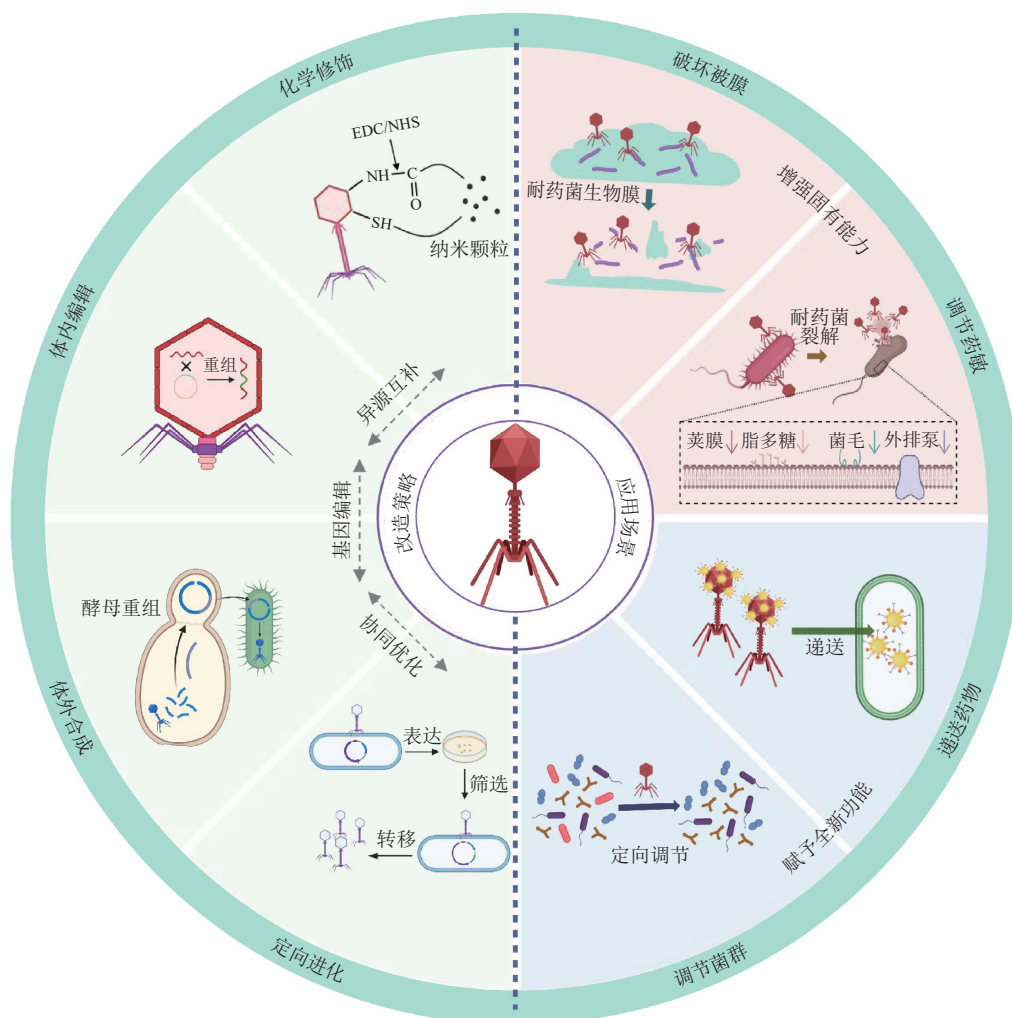


Fig. 1 Design strategies and primary applications of engineered bacteriophages

图1 工程噬菌体的设计策略和主要应用

1 工程噬菌体的设计策略

野生型噬菌体在宿主范围、免疫兼容性 & 生物膜穿透等方面存在固有局限, 难以直接满足临床治

疗需求。而工程噬菌体则能通过化学修饰、体内编辑、体外合成及定向进化等手段, 对噬菌体进行系统性工程化设计, 从而为构建功能可控、适应复杂感染环境的工程噬菌体奠定基础 (表1)。

Table 1 Design strategies for engineered bacteriophage
表1 工程噬菌体的设计策略

分类	核心特点	优势	局限	适用场景	联合应用案例
化学修饰	表面氨基与NHS酯发生酯化反应 [26-27]	产物稳定、易于纯化、应用广泛	可能影响噬菌体尾部纤维结构与裂解活性	药物递送、荧光标记	与体内编辑结合, 引入非天然氨基酸, 实现噬菌体位点特异性精准修饰 [28]
	表面羧基与伯胺形成酰胺键 [29-30]	反应温和、操作简便、可规模化制备	位点选择性差、易发生非特异性修饰	微凝胶构建、表面功能化	
	表面巯基与马来酰亚胺偶联 [31-37]	特异性高、反应速率快、可精准固定	需引入巯基位点、对氧化环境敏感	精准固定、金属配位、杂化材料	
体内编辑	紫外光或诱变剂随机引入突变 [38-41]	操作简便、高通量、全基因组覆盖	难以精准识别有益突变、筛选工作量大	构建突变体库、表型筛选	与定向进化结合, 快速构建高多样性噬菌体突变文库, 实现对目标表型的精准筛选 [42]
	通过同源重组实现精准碱基编辑 [43-44]	突变可设计、结果可预测、精准编辑	依赖长同源臂、效率有限	精准编辑、重组噬菌体构建	
	将噬菌体基因组与编辑片段共转入宿主 [45-46]	无需感染步骤、实验周期短、PCR直接鉴定	依赖宿主重组蛋白表达	无标记基因缺失、快速构建突变体	
	CRISPR-Cas9 在 CRISPR RNA (crRNA) 引导下识别切割噬菌体DNA实现精准编辑 [47-51]	精准高效、程序化设计、可引入异源功能模块	技术门槛高、缺乏有效编辑工具、存在脱靶风险	精准基因敲除、合成生物学改造、基因回路设计	
体外合成	利用Gibson等温组装无缝拼接基因组 [52]	无细胞体系、操作简便、适配性广	依赖体外酶促体系效率	从头合成基因组、无宿主克隆、高通量工程化	与体内编辑结合, 在酵母系统中实现噬菌体宿主范围重编程 [53]
	利用酵母重编程扩宽宿主谱 [54]	重组高效、大片段组装、宿主范围扩展	技术门槛高、需回收基因组后电转化	扩宽宿主范围、合成噬菌体构建	
定向进化	突变文库筛选噬菌体RBP新受体 [55-57]	不依赖结构解析、发掘适应路径、高通量筛选	筛选工作量大、难以精准定位有益突变	构建突变文库、扩宽宿主范围	与体内编辑结合, 将进化获得的优势突变整合至野生型噬菌体基因组 [54]
	人工干预筛选优势RBP突变体 [58-59]	依赖先验结构与功能信息、精准改造、结果可预测	依赖结构解析、需已知功能域信息	构建嵌合蛋白、宿主范围重编程	

1.1 化学修饰噬菌体

噬菌体表面衣壳蛋白含有丰富的氨基酸, 可提供氨基、羧基、巯基等多种活性基团用于化学修饰 [28, 60-64]。其中, 氨基与 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (N-hydroxysuccinimide ester, NHS ester) 可在温和条件下反应, 产物稳定且易于纯化, 是目前最常用的生物偶联方法 [26-27]。羧基则可被 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC) 活化, 进一步与伯胺反应形成稳定酰胺键, 实现噬菌体间的交联并形成微凝胶结构 [29-30]。此外, 巯基与马来酰亚胺的“点击化学”反应在生理

条件下具有高特异性, 其偶联速率远高于胺基反应, 不仅可以通过形成稳定硫醚键将荧光探针、药物分子、金纳米棒或量子点精准固定在噬菌体表面, 还能与金、银等金属配位构建杂化纳米材料 [31-37]。尽管化学修饰策略功能强大, 但在同一反应条件下多个同源或异源氨基酸残基易发生非特异性反应, 导致位点选择性不足, 进而可能影响噬菌体的形态结构、理化性质及生物活性。因此, 在目标位点精准引入特定氨基酸残基 (如半胱氨酸或非天然氨基酸), 可实现单点、特异性的修饰, 从而在拓展功能的同时维持噬菌体的结构完整性和生物活性。在 M13 噬菌体衣壳蛋白 pIII 的 N 端精准修

饰硒代半胱氨酸残基,可将腺苷 A1 受体配体共价连接至该位点,使修饰后的噬菌体能够借助 A1 受体配体与细胞表面的腺苷 A1 受体特异性结合,显著提升噬菌体对靶细胞的亲和力并激活下游 AKT 信号通路^[65]。

1.2 体内编辑噬菌体

体内编辑噬菌体技术主要包括随机诱变、同源重组、重组工程(含电穿孔介导的噬菌体重组工程)以及成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins system, CRISPR-Cas system)编辑。随机诱变利用紫外光或化学诱变剂随机引入突变,操作简便,但产生的突变体库需通过表型筛选鉴定,难以精准识别有益突变^[38-41]。Huss 等^[39]报道,通过紫外辐照或化学诱变剂(如甲磺酸乙酯和羟胺)对噬菌体基因组进行随机诱变,可在连续进化实验中高效引入全基因组范围的单核苷酸突变,从而实现对噬菌体表型多样性的高通量筛选和突变体库功能表征。同源重组则通过引入与目标基因组部分同源的 DNA 片段,在预定位置实现精准的碱基替换或片段插入、删除,具有突变可设计、结果可预测的优点,克服了随机诱变的盲目性,但其依赖较长的同源臂序列,效率有限^[43-44]。Beier 等^[66]让两种表型不同的噬菌体共同感染同一宿主细菌,经基因组同源重组,获得兼具双亲性状的重组噬菌体,由此证实噬菌体 RNA 聚合酶的模板特异性由其编码基因的羧基编码端区域决定。利用 λ 噬菌体 Red 系统进行的重组工程可大幅缩短同源臂长度,显著提升重组效率,并可引入外源蛋白质表达,但宿主自身的 DNA 修复系统可能削弱其效果^[67]。电穿孔介导的噬菌体重组工程将纯化的噬菌体基因组与编辑片段共电转入宿主细胞,无需感染步骤,阳性重组子可通过 PCR 直接鉴定,大幅缩短实验周期^[45-46]。Marinelli 等^[46]通过电穿孔介导的噬菌体重组工程,在表达 Che9c 重组蛋白的宿主菌中,将噬菌体 DNA 与含短同源臂的重组底物共电穿孔,实现了对必需基因 *lysA* 的无标记缺失,仅需两轮 PCR 筛选即可获得突变体。

CRISPR-Cas 系统是广泛存在于细菌和古菌中的适应性免疫系统。该系统通过 CRISPR RNA 引导 Cas 核酸酶识别并切割外源 DNA,通常包括间隔序列获取、CRISPR RNA (crRNA)成熟以及干扰 3 个阶段。依据系统发育与作用机制的差异,

CRISPR-Cas 系统可分为两大类^[68-70]。第 1 类系统(包括 I 型、III 型和 IV 型)依赖多亚基组成的效应复合物,如 I 型系统中的 Cas 蛋白与 crRNA 组装形成 Cascade 复合物,在识别靶标 DNA 后募集 Cas3 核酸酶进行切割,从而诱导细胞通过同源重组修复机制实现基因编辑^[53]。第 2 类系统(包括 II 型、V 型和 VI 型)则仅需单一效应蛋白即可执行功能,结构更为精简。其中,II 型系统应用最为广泛,其核心蛋白 Cas9 可在 crRNA 引导下识别带有前间隔区邻近基序的 DNA 序列,并切割形成双链断裂,若同时提供同源修复模板,则可通过同源定向修复机制实现精准的基因编辑^[71]。这一“定向切割-可控修复”的特性,使得 Cas9 成为当前噬菌体基因工程中高效且常用的编辑工具。Cas9 凭借其定向切割和可控修复的特点,已成为噬菌体基因工程中的高效编辑工具,该系统已成功用于大肠杆菌噬菌体、肺炎克雷伯菌噬菌体、枯草芽孢杆菌噬菌体及李斯特菌噬菌体等多种噬菌体的基因组编辑,实现了基因删除、插入、点突变及替换等精准基因改造^[47-51]。

1.3 体外合成噬菌体

在噬菌体合成生物学中,Gibson 等温组装与酵母同源重组是实现体外合成噬菌体的两大核心策略。Gibson 等温组装依托无细胞酶促反应体系,在体外完成多片段噬菌体基因组的高效、无缝拼接,无需依赖宿主胞内重组机制,操作简便、适配性广,可快速完成基因组的从头合成与定向改造^[52]。Mitsunaka 等^[52]将噬菌体基因组 DNA 片段经 Gibson 组装在体外完成完整基因组的高效拼接,随后通过电穿孔将组装产物导入宿主细菌中实现噬菌体的有效复苏,对野生型噬菌体基因组进行定点敲除和外源基因插入等定向改造,实现噬菌体基因组的体外合成、模块化设计与功能重塑,并结合无细胞转录翻译体系完成噬菌体的全流程体外构建与制备。酵母同源重组系统则凭借胞内高效同源重组机制,在酵母细胞中完成多片段线性 DNA 的一步精准组装,能将完整噬菌体基因组以酵母人工染色体形式稳定保存,有效规避细菌宿主的限制修饰系统与复制依赖,为噬菌体基因组的模块化重构与长期存档提供稳定平台。Ando 等^[54]利用酵母同源重组系统,在酿酒酵母中将外源宿主识别基因(如尾丝蛋白基因)一步组装入噬菌体基因组,实现跨属宿主范围的重编程,使原本感染大肠杆菌的噬菌体能够靶向耶尔森菌或克雷伯菌,成功构建了宿主范围

可调的合成噬菌体, 并用于混合菌群中耶尔森菌或克雷伯菌的精准清除。相较于传统依赖细菌内同源重组的编辑方法, 体外合成策略避免了噬菌体基因在宿主内表达毒性蛋白质所带来的克隆不稳定问题, 且可在一次转化中完成多片段、多位点的同步编辑, 显著提升了噬菌体工程化的通量与可控性。

1.4 噬菌体定向进化

噬菌体的宿主范围主要由其RBP决定, 这一局限性是制约其实际应用的关键。目前, 扩展宿主范围主要依靠人工选择与合理设计两类策略。人工选择的核心在于通过突变和筛选获得所需表型: 首先构建受体结合蛋白基因的突变文库, 人为提高序列多样性; 随后在目标宿主上进行筛选, 最终分离出能识别新受体的噬菌体突变株^[55-57]。Suga等^[72]基于人工选择策略鉴定出T4噬菌体长尾纤维gp37蛋白中关键氨基酸位点, 并针对其RBP构建人工突变体文库, 筛选出能同时吸附于大肠杆菌O157外膜蛋白C (O157 OmpC) 及K-12脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 突变体, 从而实现对T4噬菌体宿主特异性的定向改造, 克服了天然T4噬菌体无法利用O157 OmpC及K-12 LPS作为感染受体的限制。这种方法适用于探索未知的宿主适应路径。合理设计则基于已知结构功能信息进行精准改造, 主要有两种途径: 一是构建嵌合受体结合蛋白, 融合不同噬菌体的功能域; 二是对天然蛋白质进行定点突变或序列修饰, 使其获得新识别能力^[58-59]。Peng等^[73]通过合理设计策略将M13噬菌体g3p的受体结合域与其他丝状噬菌体RBP交换, 成功构建了5种嵌合噬菌体, 实现对铜绿假单胞菌和霍乱弧菌等非天然宿主菌的特异性识别, 从而拓展噬菌体的宿主识别范围。这种方法依赖先验知识与结构解析, 适合定向、快速实现宿主范围的重编程。两种策略各具优势: 人工选择适用于发掘未知可能性, 合理设计更擅长实现目标明确的改造。实际应用中, 二者结合可更高效推动噬菌体工程化, 平衡探索与设计的效率。

2 工程噬菌体用于细菌感染治疗

传统抗生素在对抗多重耐药细菌时面临多重限制, 例如易受生物膜阻碍、难以快速降低细菌毒力等。而工程噬菌体则能通过突破细菌被膜、削减细菌毒力及递送纳米药物等方式, 恢复抗生素敏感性, 清除致病细菌并调控菌群平衡, 为协同治疗创造条件。

2.1 突破细菌被膜, 增强噬菌效能

细菌生物膜是由细菌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS) 如胞外多糖、蛋白质与DNA等成分构成的致密复合体, 形成类似“菌体堡垒”的结构。传统抗生素或游离噬菌体常因受到EPS的物理屏障、电荷排斥及代谢陷阱效应的影响, 难以有效渗透并清除膜内细菌。工程噬菌体作为一种新兴抗菌策略, 可通过利用噬菌体表面衣壳蛋白上的胺基、羧基或巯基等活性基团, 采用酯化反应、点击化学等化学偶联方法构建的噬菌体递送系统, 可显著提升噬菌体对生物膜的穿透能力与杀菌效率, 克服了野生型噬菌体的渗透局限。

Jin等^[74]通过酰胺键将温和噬菌体M13与钯纳米粒(~10 nm) 共价偶联形成phage@Pd纳米酶。该复合体可在感染微环境(低pH与高H₂O₂条件下) 精准吸附于宿主菌表面, 同时激活钯纳米酶, 原位释放大量的羟基自由基(•OH), 实现“靶向定位-原位催化”双效协同, 高效破坏生物膜并杀灭细菌。体外实验表明, phage@Pd可在4 h内清除超过99.99%的大肠杆菌, 并能有效穿透成熟生物膜, 对膜内菌的杀灭效率较游离Pd纳米酶提高2~3个数量级。在小鼠急性肺炎及皮下脓肿模型中, 单次给药即可清除超过95%的病原菌, 并显著降低炎症因子水平^[74](图2a)。Wang等^[75]通过二苯并环辛炔-叠氮“点击化学”将负载抗生素的脂质体与携带EPS解聚酶的噬菌体Sb-1共价偶联, 构建了Lip@Phage纳米偶联物。该体系首先借助噬菌体分泌的解聚酶“打孔”瓦解生物膜骨架, 随后引导脂质体沿孔道精准递送至菌体表面, 实现“先破膜-后释药”的级联杀菌。在小鼠假体关节感染模型中, 经14 d局部重复给药, Lip@Phage可使细菌载量降低超过1 000倍, 并显著降低系统性炎症指标, 显示出良好的生物膜穿透与协同抗菌效果^[75](图2b)。

水凝胶凭借其质地柔软、生物相容性好、伤口附着性强, 以及具有定向缓释和环境响应性释放等特性, 成为负载噬菌体的理想递送平台。水凝胶包埋不仅能实现噬菌体在感染部位的精准递送与持续释放, 还能有效保护其活性, 为慢性感染性伤口的靶向治疗提供了高效、安全的载药方案^[76-77]。例如, Tao等^[76]开发的生物响应水凝胶(ΦxGel) 将双噬菌体鸡尾酒包埋于明胶-席夫碱网络中, 当铜绿假单胞菌分泌的明胶酶浓度升高时, 水凝胶按需

降解释放噬菌体, 实现“感染-触发-杀菌”闭环。体外实验表明, 该体系可在4 h内有效清除游离菌, 24 h内使成熟生物膜中的活菌数减少2个数量级, 且对人皮肤成纤维细胞无毒性^[76] (图2c)。此外, Park等^[77]通过静电自组装技术, 将广谱抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的裂解性噬菌体K与阳离子聚氧杂降冰片烯 (guanidinium-functionalized poly (oxanorbornene) imide, PONI-

Guan) 偶联, 构建噬菌体-聚合物纳米组装体 (phage-polymer nanoassemblies, PPNs)。该组装体凭借正电外壳中和生物膜EPS中负电荷的排斥作用, 并利用“电荷-疏水”协同效应撬开EPS网络, 显著提升噬菌体在生物膜内的渗透效率, 使其穿透通量较游离噬菌体大大提高, 同时促进噬菌体在生物膜内部持续裂解细菌。在体外MRSA成熟生物膜模型中, PPNs仅需6 h即可杀灭99.9%的细菌, 其杀菌效率比游离噬菌体提高约1 000倍^[77] (图2d)。

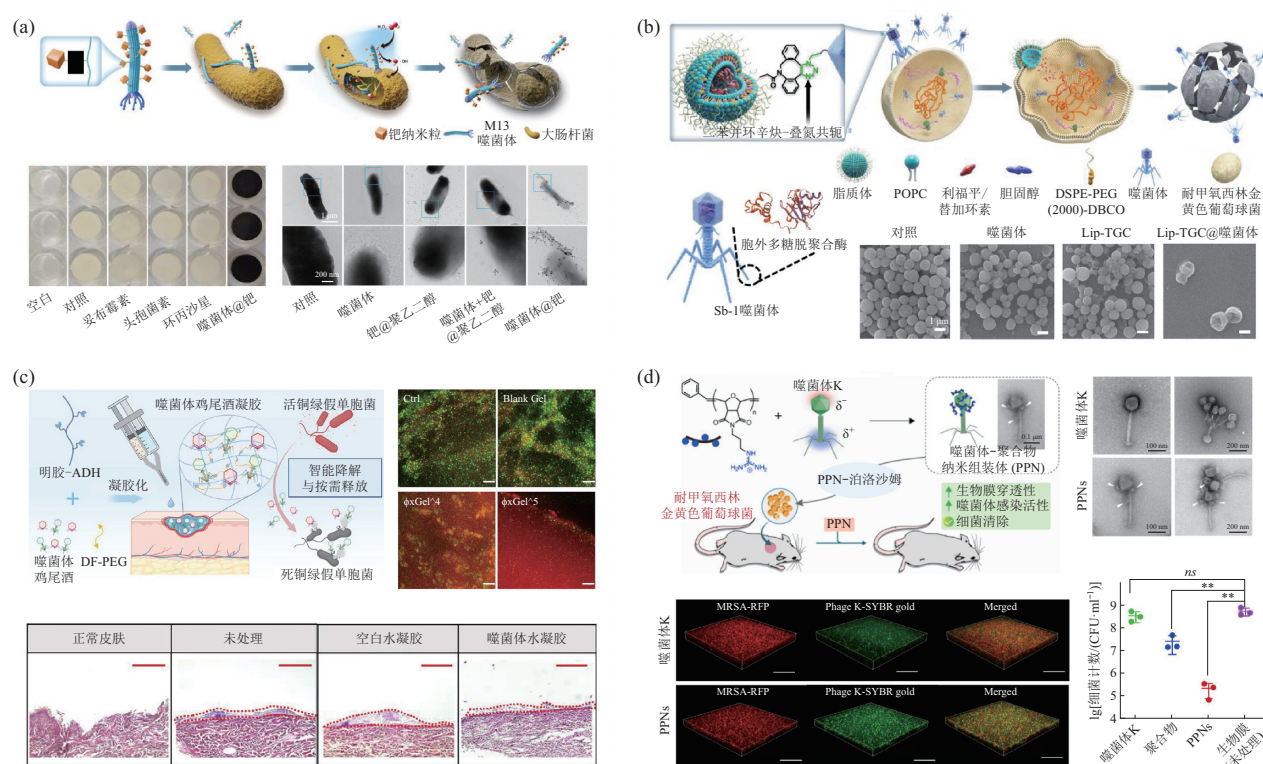


Fig. 2 Engineered bacteriophages break through the bacterial cell membrane and enhances the phage's efficacy

图2 工程噬菌体突破细菌被膜, 增强噬菌效能

(a) 噬菌体M13与纳米钯通过化学键合形成phage@Pd, 噬菌体裂解酶降解生物膜胞外多糖基质, 纳米钯在感染部位酸性微环境激活类过氧化物酶活性, 催化 H_2O_2 原位生成羟基自由基, 氧化破坏细菌膜结构并持续杀菌, 实现生物膜瓦解与杀菌增效^[74]; (b) 噬菌体-脂质体偶联物通过尾纤维蛋白特异性锚定细菌, 利用其携带的EPS解聚酶水解胞外多糖以破坏生物膜结构, 进而引导脂质体与细菌膜融合并释放抗生素, 实现“识别-破膜-释药”的靶向协同杀菌^[75]; (c) 明胶酶响应型水凝胶DF-PEG负载双噬菌体鸡尾酒, 借助噬菌体裂解酶持续破坏胞外基质, 触发噬菌体滴度指数级扩增, 体内外瓦解成熟生物膜并高效杀伤细菌^[76]; (d) 噬菌体K与PONI-Guan静电自组装形成PPNs, 噬菌体裂解酶降解生物膜胞外多糖基质, PONI-Guan与细菌外膜及EPS静电结合, 物理破坏膜结构并锚定噬菌体, 持续裂解细菌, 实现EPS瓦解与杀菌效率倍增^[77]。

2.2 削减细菌毒力, 恢复药物敏感

细菌毒力是指细菌通过产生毒素、形成荚膜等毒力因子引起宿主疾病的能力, 其强弱直接反映病原体致病、突破宿主屏障及造成组织损伤的能力^[78-79]。传统抗菌治疗多聚焦于直接杀灭细菌, 往往难以迅速清除已释放的毒力因子或有效削弱病原

菌的侵袭力。工程噬菌体作为一种新型干预手段, 通过下调耐药基因或使致病因子失活等方式, 在治疗中并非立即杀死细菌, 而是像特洛伊木马一样在细菌内部递送调控指令, 从内部降低其毒力, 恢复其对现有抗生素的敏感性。

通过化学修饰及基因工程改造, 工程噬菌体被

赋予精准靶向病原菌的能力, 在感染后迅速抑制细菌关键毒力通路, 大幅削弱细菌感染致病的能力。例如, Zhu 等^[80] 将二氧化铈纳米颗粒共价偶联于噬菌体 P510 尾部构建的 phage@CeO₂ 复合体, 可精准识别碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌, 释放解聚酶软化细菌荚膜、破坏表面结构, 进而下调多个细菌毒力基因 (如 *wbp8*、*hasC*、*pilD*) 的表达, 显著降低细菌黏附与免疫逃逸能力 (图 3a)。类似的, Gencay 等^[42] 通过对噬菌体 $\alpha 15$.T-even 进行尾纤维改造并搭载 CRISPR-Cas 系统, 构建工程噬菌体 $\alpha 15$.2。该噬菌体侵入大肠杆菌后, 快速表达 *cas3* 核酸酶, 靶向剪切 *fimH* 等关键毒力基因。随着 CRISPR-Cas 系统的持续作用, 细菌黏附与定植能力显著下降, 临床耐药菌株数量大幅减少, 毒力表

型得到系统性抑制 (图 3b)。这些研究不仅提出了增强游离噬菌体杀菌效果的新策略, 还为解析噬菌体与细菌毒力之间的相互作用提供了新视角。

近年来, 基于合成生物学的噬菌体精准改造成为研究热点, 噬菌体工程化设计可使噬菌体在感染耐药菌的同时, 主动破坏其耐药机制, 从而显著恢复抗生素疗效。Brödel 等^[81] 利用 λ -K1F 工程噬菌体递送胞嘧啶碱基编辑器, 以不同感染复数梯度处理尿路致病株 UTI89, 精确插入 *clbH*、*clbJ* 和 *cnf1* 等毒力基因的提前终止密码子, 使这些基因的失活率分别达到 92%、83% 和 53%, 此外, 在模型大肠杆菌 MG1655-bla 中, 该系统通过编辑 β 内酰胺酶基因使其失活, 成功恢复了细菌对 β 内酰胺类抗生素 (如卡苯西林) 的敏感性^[81] (图 3c)。Sun 等^[82]

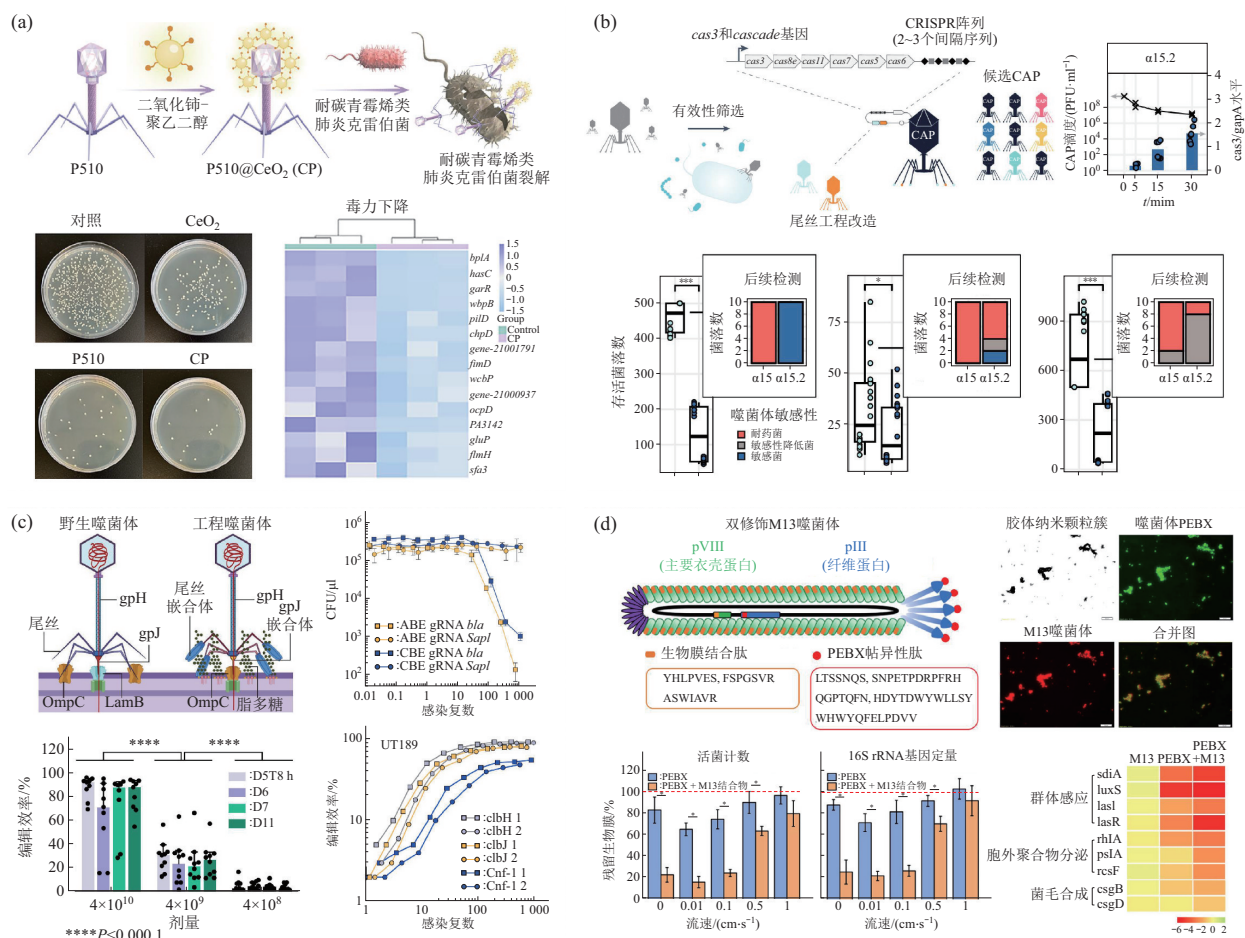


Fig. 3 Engineered bacteriophages attenuate bacterial virulence and re-sensitize bacteria to antibiotics

图3 工程噬菌体削弱细菌毒力, 恢复细菌药敏性

(a) P510噬菌体与PEG-CeO₂酰胺偶联的工程噬菌体CP显著下调CRKP毒力基因, 破坏荚膜, 实现杀菌效果^[80]; (b) 经尾纤维改造并插入CRISPR-Cas的工程噬菌体 $\alpha 15$.2靶向*fimH*等毒力基因, 显著减少大肠杆菌耐药存活, 并伴随*cas3*表达快速上调, 实现杀菌效果^[42]; (c) 经尾纤维与尾尖改造并搭载胞嘧啶碱基编辑器的工程噬菌体 λ -K1F, 靶向*clbH*、*clbJ*与*cnf1*等毒力基因, 在尿路致病性大肠杆菌UTI89中高效引入终止密码子, 实现精准致病基因失活^[81]; (d) 通过外壳修饰生物膜靶向肽和尾部修饰捕获肽的M13工程噬菌体可靶向递送PEBX, 不仅显著降低活菌数, 还下调与毒力基因相关的胞外多糖合成及群体感应系统关键基因的表达, 瓦解生物膜, 恢复细菌抗生素敏感性^[82]。

在 M13 噬菌体衣壳蛋白 pVIII 中插入生物膜靶向肽,并在尾丝 pIII 连接 PEBX 噬菌体捕获肽,构建双功能修饰的 M13-PEBX 复合噬菌体。该递送体系将 PEBX 特异性富集于生物膜外层,通过“感染-裂解-子代扩散”的过程逐层向内推进,使整体活菌量下降 84%,同时下调与毒力基因相关的胞外多糖合成及群体感应系统关键基因的表达,导致生物膜结构松散,并恢复细菌对抗生素的敏感性^[82](图 3d)。工程噬菌体以“基因编辑+精准递送”为核心策略,可有效避免细菌裂解引发的毒素暴发风险。通过恢复现有抗生素的敏感性,使传统药物得以“重新起效”,减轻了新药研发的压力,并提供可编程、可扩展的抗菌新路径,有望成为未来抗感染治疗的重要补充手段。

2.3 递送纳米药物,精准高效抗菌

纳米药物是药物本身或关键结构在 1~100 nm 之间的药物制剂,它利用纳米尺寸效应(如载体表面修饰、靶向设计)优化药物分布,让药物更好地送达目标部位并被身体有效利用,因此具有高靶向性、低毒性、长效给药等优势。然而,其在临床应用中仍面临易被单核吞噬系统清除、组织穿透能力有限及潜在免疫原性等挑战。为此,研究者开发了“噬菌体-纳米药物”集成系统,通过将抗生素、CRISPR 系统或免疫调节剂等封装于噬菌体衣壳内或表面,实现精准递送、可控释放和疗效增强,显著提升治疗效果并降低耐药风险。

提高纳米药物靶向性并构建多重杀菌机制是应对复杂感染环境的有效策略。例如, Wang 等^[27]通过链霉亲和素-生物素桥将镉基量子点固定于噬菌体头部,构建光催化量子点-噬菌体系统 QD@Phage。该系统借助静电作用实现亚微米级精准靶向,识别细菌后在可见光照射下产生活性氧类(reactive oxygen species, ROS),引起细菌膜脂与 DNA 的氧化损伤,同时启动噬菌体裂解周期,实现光动力与生物裂解协同杀菌。体外实验表明,该体系对铜绿假单胞菌的杀菌率超过 99.9%^[27](图 4a)。Yao 等^[83]通过 NHS-PEG-甘露糖共价修饰裂

解性大肠杆菌噬菌体,并在其头部通过静电作用连接 Mn^{2+} ,构建“免疫标记-武装”噬菌体复合体 Mn^{2+} @Man-phage。该杂化体系利用噬菌体对细菌的天然靶向与锚定能力,将 Mn^{2+} @Man-phage 精准递送至感染部位,释放 Mn^{2+} 促进 M1 型巨噬细胞极化,同时,甘露糖被巨噬细胞识别,增强吞噬与抗原呈递,启动 T 细胞免疫应答。该体系实现了“靶向递送-免疫标记-免疫激活”三重协同,在体内外实验中均表现出显著的杀菌效果^[83](图 4b)。

Meng 等^[84]通过静电沉积将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)肽修饰的壳聚糖与环孢素 A 共同负载于噬菌体头部,构建“纳米头盔”式复合系统 RCC@B。该系统利用 RGD 与眼表整合素的特异性结合以及壳聚糖的阳离子特性,实现“双锁”黏附,延长眼表滞留时间。RCC@B 通过靶向裂解耐药菌、缓释环孢素 A 并抑制核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB)通路介导的促炎因子转录,协同发挥抗菌与抗炎作用。在小鼠角膜炎模型中,单次给药 7 d 后眼部临床评分显著下降,细菌载量减少 99%^[84](图 4c)。Chen 等^[85]将光敏剂修饰于噬菌体表面,使其在低氧条件下高效产生 $\cdot OH$ 。噬菌体可精准靶向细菌并富集光敏剂,经白光照射激发 $\cdot OH$ 爆发,实现靶向递送与高效杀菌一体化作用,有效裂解细菌(图 4d)。“噬菌体-纳米药物”平台以亚细胞精度将杀伤元件递送至病原菌,通过光催化、酶促或药物缓释等多重机制,实现高效杀菌与逆转耐药,为耐药菌感染的靶向治疗提供了一种具备临床转化潜力的新型策略。

2.4 清除致病细菌,调控菌群平衡

微生物群落是人体不可或缺的“隐形器官”,持续参与代谢网络的精细调控与免疫稳态的维持。菌群平衡是保障人体正常生理功能的基础,有助于抵御有害微生物入侵并辅助生理活性代谢物的调控。然而,传统抗生素在治疗细菌感染时,常会无差别杀灭有益菌,导致肠道菌群失调,可能引发继发感染或炎症反应。

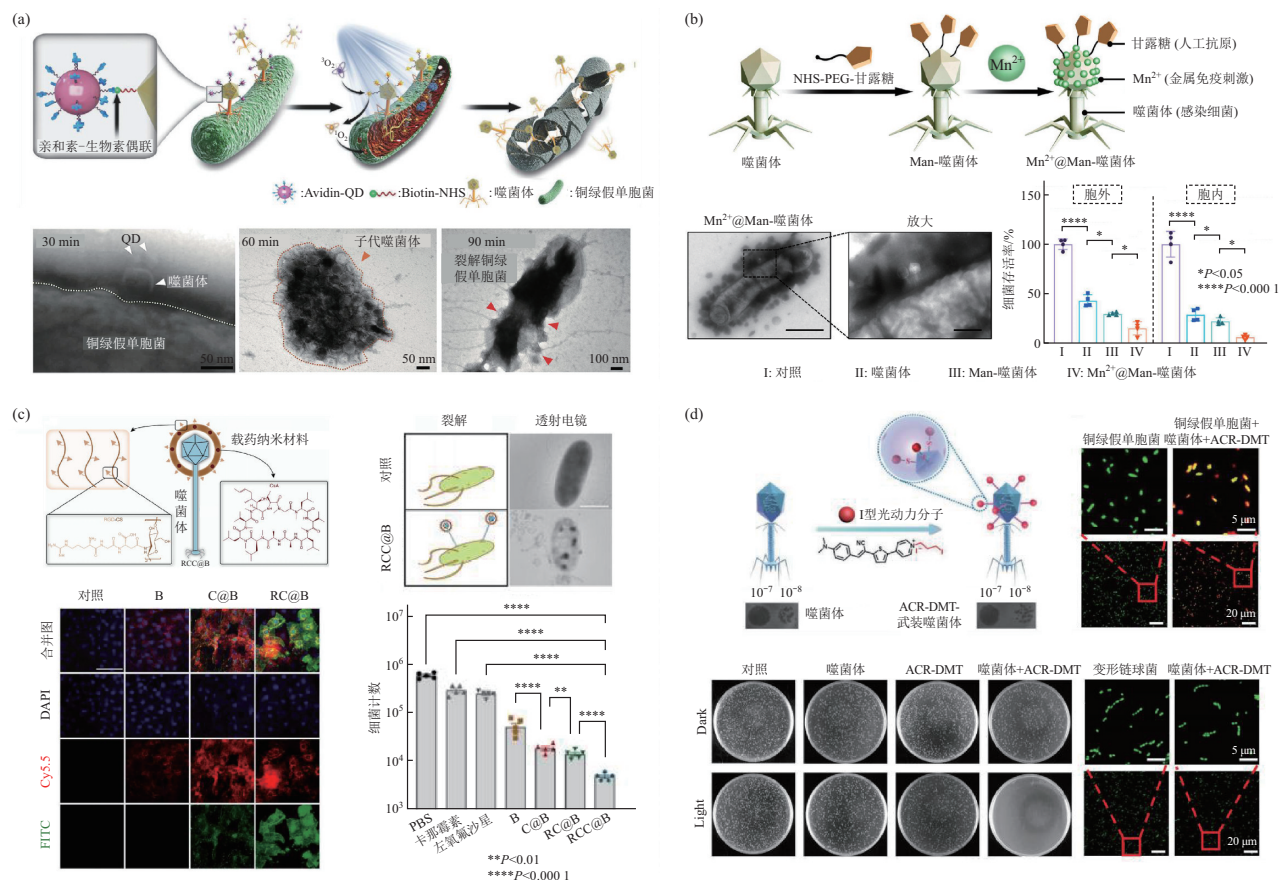


Fig. 4 Engineering phage delivery of nanomedicines for precise and efficient antibacterial effects

图4 工程噬菌体递送纳米药物, 精准高效抗菌

(a) 噬菌体搭载Cd量子点, 可以在光照下精准锚定于细菌表面, 在纳米尺度内产生 $^1O_2$, 协同噬菌体裂解通路, 提高纳米药物的杀菌性能^[27]; (b) 噬菌体共价修饰NHS-PEG-甘露糖并负载 Mn^{2+} , 靶向递送至感染部位后释放 Mn^{2+} , 同时甘露糖被巨噬细胞识别并增强对细菌的吞噬作用, 从而实现协同抗菌效果^[83]; (c) 噬菌体与RGD修饰壳聚糖通过静电自组装形成RCC@B, 壳聚糖与眼表组织静电吸附, RGD与眼表细胞整合素结合, 从而锚定噬菌体, 持续裂解细菌, 同时缓释环孢素A抑制局部炎症, 实现杀菌与抗炎协同增效^[84]; (d) 噬菌体与光敏剂ACR-DMT通过静电自组装形成ACR-DMT@Phage, ACR-DMT与细菌生物膜静电结合, 从而引导噬菌体穿透生物膜并锚定细菌, 在光照下催化生成 $\cdot OH$ 高效杀灭细菌, 实现靶向递送与高效杀菌^[85]。

Hsu等^[86]通过温和噬菌体 λ 构建表达程序化dCas9和靶向 rpf 报告基因的工程噬菌体 λ : dCas9, 并采用基于海藻酸微珠与聚乙烯亚胺/果胶多层膜包覆的口服递送体系, 实现肠道内原位基因调控。该体系可抵抗胃酸侵蚀, 并在肠道菌群富集区域通过果胶酶响应释放噬菌体, 以溶原化方式高效感染目标大肠杆菌, 精准且持久地抑制其报告基因的表达, 同时维持肠道菌群总体组成的稳定^[86](图5a)。Dong等^[87]通过噬菌体展示筛选获得靶向具核梭形杆菌的M13噬菌体株, 并在其衣壳表面通过静电组装负载银纳米颗粒, 构建生物-无机

杂化工程噬菌体M13@Ag。该体系在体外可精准识别并杀灭具核梭形杆菌, 应用于肠道后, 不仅能迅速清除目标病原菌, 还能促使原本受抑制的产丁酸有益菌大量增殖, 从而显著恢复菌群多样性^[87](图5b)。Du等^[88]借助合成生物学手段, 将靶向不同细菌的效应蛋白基因精准嵌入噬菌体衣壳的特定位置。改造后的噬菌体感染目标菌后在其内部大量复制, 裂解释放出高浓度效应蛋白; 这些蛋白质可穿透邻近多种致病菌, 实现跨菌种的协同清除。此外, 由于抗性亚群持续暴露于效应蛋白的作用之下, 其生长受到持续抑制, 菌群不再反弹, 微生态

得以逐步恢复平衡^[88] (图5c)。Zhao等^[89]将ROS清除DNA纳米贴片(DNPs)与噬菌体偶联,经肠溶包衣制成口服制剂rDNPs@P-L。该体系可清除33.7%的活性氧类,用于保护噬菌体活性和促进裂

解炎症结肠病原菌,同时调节有益菌增殖并抑制病原菌定植,恢复肠道菌群 β 多样性和实现微生态重塑(图5d)。

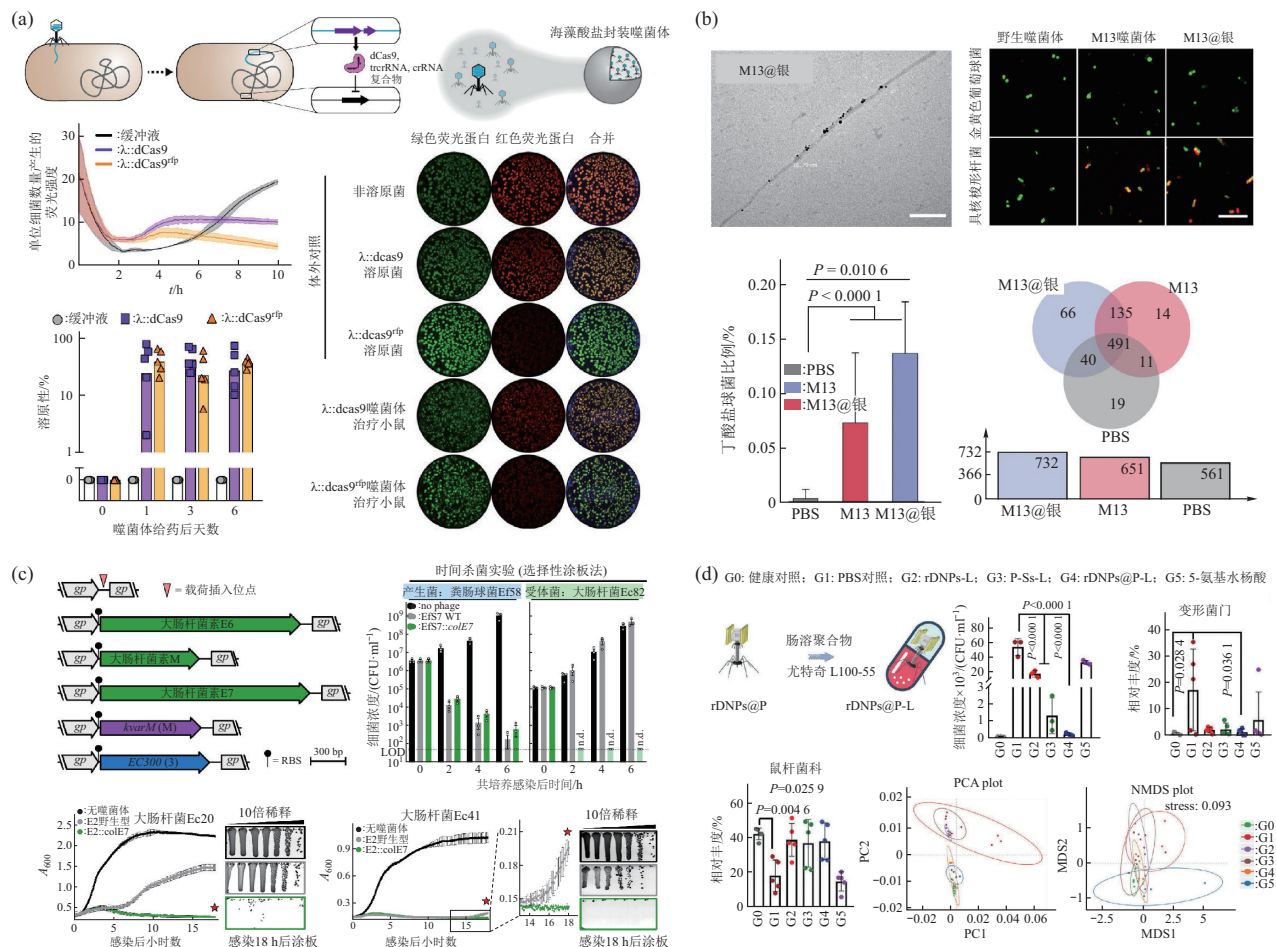


Fig. 5 Engineered bacteriophages eliminate pathogenic bacteria and regulate microbial community balance

图5 工程噬菌体清除致病细菌, 调控菌群平衡

(a) 通过表达程序化dCas9后再被多层膜包裹的噬菌体可在肠道菌群富集区域释放噬菌体,以溶原化方式高效感染目标大肠杆菌且持久抑制其报告基因表达,同时维持肠道菌群的总体组成稳定^[86]; (b) 筛选锁定致病菌的噬菌体并电镀银制成工程噬菌体M13@Ag,可实现精准杀菌,同时促进有益菌回升和菌群多样性恢复^[87]; (c) 通过将效应基因插入噬菌体衣壳构建重组噬菌体HEPT,感染宿主菌后自产杀菌蛋白并释放,清除致病菌的同时持续抑制抗性菌株的生长,在病灶部位实现“去病原-留空位-防反弹”的稳态重建^[88]; (d) 噬菌体改造后不仅能快速清除解噬子酸链球菌,还可重塑肠道菌群结构,显著提升鼠杆菌科(Muribaculaceae)与毛螺菌科(Lachnospiraceae)等产丁酸相关有益菌群的丰度,从而全面恢复肠道微生态多样性^[89]。

3 总结与展望

随着细菌耐药性问题日益严峻,传统抗生素疗效下降,工程噬菌体因其高度的宿主特异性、可编程性和自我复制能力,成为应对MDR细菌感染的重要策略。噬菌体的宿主特异性源自细菌细胞壁结构差异,革兰氏阴性菌具有由脂多糖和外膜蛋白构

成的复杂外膜,工程改造多聚焦于增强受体识别能力或利用纳米材料实现外膜穿透与靶向递送;而革兰氏阳性菌缺乏外膜,细胞壁为厚密的肽聚糖层,改造重点在于提升识别亲和力、增强肽聚糖层渗透及突破生物膜屏障^[90-92]。在技术层面,已建立从分子修饰到基因组编程的多维度工程噬菌体改造体系,强化噬菌体裂解功能并引入新生物学特性。通

过化学偶联与点击化学反应实现了噬菌体表面功能化修饰,借助体内编辑技术完成了噬菌体基因组的精准重构,利用酵母同源重组实现了噬菌体基因组的体外合成与功能重构,运用定向进化策略实现了对宿主识别范围的重编程与功能优化。在治疗层面,工程噬菌体借助功能化修饰与智能载体策略破坏了细菌生物膜并增强了噬菌体杀菌活性,利用基因编辑工具下调细菌毒力基因并恢复了其对抗生素的敏感性,作为纳米药物递送平台实现了精准抗菌治疗,以及通过口服递送系统选择性清除病原菌并有效调节肠道菌群平衡。化学修饰、基因工程、合成生物学与纳米技术的深度融合,使工程噬菌体在拓展宿主谱、增强生物膜穿透、削弱细菌毒力、恢复抗生素敏感性、及调控菌群结构等方面展现出独特优势,为传统抗菌治疗提供了精准、高效、可持续的替代路径。

尽管如此,工程噬菌体的临床转化仍面临多重挑战。首先,噬菌体宿主特异性与临床菌株多样性之间的矛盾,限制了其广泛、即时的临床应用,亟需建立高通量筛选与动态进化监测系统,实现宿主匹配的智能化。其次,细菌已进化出受体突变、CRISPR-Cas 系统介导的免疫及流产感染等多种抗性机制^[93-97],可通过构建双受体识别型广谱噬菌体或引入“合成致死”基因抑制细菌适应性突变效率、定向进化筛选逃逸突变体建立覆盖多种机制的噬菌体库以及设计携带抗性因子的工程噬菌体或开发鸡尾酒疗法,多维度干预细菌抗性突变。此外,临床转化还受限于药代动力学不清、给药途径适配

性差、规模化生产质控缺失及剂量标准化不足等问题。在药代动力学方面,工程噬菌体静脉注射后易被单核吞噬系统快速清除或诱导中和性抗体反应,导致病灶生物利用度低、杀菌效果不持久^[98-99],未来需加强免疫逃逸策略研究以提升循环稳定性与体内滞留能力。在给药途径方面,不同感染部位对递送方式要求各异,未来应针对感染类型建立适配的制剂策略与递送平台,最大化治疗效果^[100-101]。在规模化生产与质量控制方面,目前缺乏统一标准,噬菌体疗法多为个体化定制,效价测定、内毒素去除及基因组稳定性验证体系尚不完善。尽管欧美已逐步推进相关药品生产质量管理规范(Good Manufacturing Practices, GMP)指南,要求全基因组测序及严格的无菌生产与纯度控制,未来仍需构建契合噬菌体特点的标准化生产与质量监管体系^[102]。在临床剂量确定方面,当前多依赖经验性给药,缺乏统一疗效评估标准,未来应结合群体药代动力学-药效学模型,构建定量药理学框架,通过暴露-反应关系建立个体化给药方案,推动从经验性治疗向精准定量治疗转变(表2)。综上所述,攻克药学与工程学关键问题、弥补政策法规与临床研究空白,是工程噬菌体从实验室走向临床的核心目标。未来需整合合成生物学、感染病学、免疫学等多学科力量协同攻关,动态解析噬菌体-宿主共进化的分子机制,构建覆盖“快速筛选-智能设计-体内评价-临床验证”的全链条技术体系,这将有助于突破工程噬菌体临床转化的瓶颈,开创应对多重耐药菌感染的治疗新范式与新路径。

Table 2 Main challenges and countermeasures in the clinical transformation of engineering bacteriophages

表2 工程噬菌体临床转化的主要挑战与应对策略

主要挑战	具体问题	应对策略
宿主匹配	宿主高度特异,精准匹配受限	建立高通量筛选平台、动态进化监测系统、开发广谱噬菌体 ^[99]
细菌抗性	细菌耐受演化,侵染效能衰减	构建多机制噬菌体库、设计含抗性因子噬菌体、开发鸡尾酒疗法 ^[93-97]
药代动力学	免疫清除迅速,生物利用度低	加强免疫逃逸研究、提升循环稳定性、提升靶向富集效率 ^[98]
给药途径	病灶环境复杂,递送要求各异	建立适配的制剂策略、最大化局部精准治疗、减少系统暴露 ^[100-101]
生产质控	生产标准缺失,质控体系不全	推动噬菌体专属GMP指南、建立全流程质控体系 ^[102]
临床剂量	依赖经验给药,剂量评估乏力	结合群体药代动力学-药效学模型,建立个体化精准给药方案 ^[14]

参 考 文 献

[1] Collaborators G 2 A R. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 2022, **400**(10369): 2221-2248

[2] Butler M S, Henderson I R, Capon R J, *et al.* Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. *J Antibiot*, 2023, **76**(8): 431-473

[3] Beyer P, Paulin S. The antibacterial research and development pipeline needs urgent solutions. *ACS Infect Dis*, 2020, **6**(6): 1289-1291

[4] Anderson M, Panteli D, van Kessel R, *et al.* Challenges and

- opportunities for incentivising antibiotic research and development in Europe. *Lancet Reg Health Eur*, 2023, **33**: 100705
- [5] Mu A, Lawley T D. Bacteriophage discovery to advance biotechnology and biotherapeutics. *Nat Rev Microbiol*, 2023, **21**(5): 279
- [6] Keen E C. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 2015, **37**(1): 6-9
- [7] Clokie M R, Millard A D, Letarov A V, *et al.* Phages in nature. *Bacteriophage*, 2011, **1**(1): 31-45
- [8] D'herelle M F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Compte Rendu Academie Sci*, 1917, **165**: 373-375
- [9] Twort F W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*, 1915, **186**(4814): 1241-1243
- [10] Wang B, Zhou L, Guo Y, *et al.* Cyanobacteria-based self-oxygenated photodynamic therapy for anaerobic infection treatment and tissue repair. *Bioact Mater*, 2022, **12**: 314-326
- [11] Hansa R K, Khan M M K, Frangie M M, *et al.* 4-4-(Anilinomethyl)-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-pyrazol-1-ylbenzoic acid derivatives as potent anti-gram-positive bacterial agents. *Eur J Med Chem*, 2021, **219**: 113402
- [12] Attrill E L, Claydon R, Lapińska U, *et al.* Individual bacteria in structured environments rely on phenotypic resistance to phage. *PLoS Biol*, 2021, **19**(10): e3001406
- [13] Pires D P, Costa A R, Pinto G, *et al.* Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol Rev*, 2020, **44**(6): 684-700
- [14] Nick J A, Dedrick R M, Gray A L, *et al.* Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell*, 2022, **185**(11): 1860-1874.e12
- [15] Durr H A, Leipzig N D. Advancements in bacteriophage therapies and delivery for bacterial infection. *Mater Adv*, 2023, **4**(5): 1249-1257
- [16] Gelman D, Yerushalmy O, Alkalay-Oren S, *et al.* Clinical Phage Microbiology: a suggested framework and recommendations for the *in-vitro* matching steps of phage therapy. *Lancet Microbe*, 2021, **2**(10): e555-e563
- [17] Bayat F, Didar T F, Hosseinioust Z. Emerging investigator series: bacteriophages as nano engineering tools for quality monitoring and pathogen detection in water and wastewater. *Environ Sci Nano*, 2021, **8**(2): 367-389
- [18] Wan Y, Zong C, Li X, *et al.* New insights for biosensing: lessons from microbial defense systems. *Chem Rev*, 2022, **122**(9): 8126-8180
- [19] Squires R A. Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. *N Z Vet J*, 2018, **66**(5): 229-235
- [20] Gigante A, Atterbury R J. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virology*, 2019, **16**(1): 155
- [21] Ranveer S A, Dasriya V, Ahmad M F, *et al.* Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *NPJ Sci Food*, 2024, **8**(1): 1
- [22] Imran A, Shehzadi U, Islam F, *et al.* Bacteriophages and food safety: an updated overview. *Food Sci Nutr*, 2023, **11**(7): 3621-3630
- [23] Pires D P, Meneses L, Brandão A C, *et al.* An overview of the current state of phage therapy for the treatment of biofilm-related infections. *Curr Opin Virol*, 2022, **53**: 101209
- [24] Kovacs C J, Rapp E M, McKenzie S M, *et al.* Disruption of biofilm by bacteriophages in clinically relevant settings. *Mil Med*, 2024, **189**(5/6): e1294-e1302
- [25] Wagner P L, Waldor M K. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun*, 2002, **70**(8): 3985-3993
- [26] Liu M Y, Liu X, Wang C Y, *et al.* Inhalable polymeric microparticles for phage and photothermal synergistic therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nano Lett*, 2024, **24**(28): 8752-8762
- [27] Wang L, Fan X, Gonzalez Moreno M, *et al.* Photocatalytic quantum dot-armed bacteriophage for combating drug-resistant bacterial infection. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, **9**(17): e2105668
- [28] Carrico Z M, Farkas M E, Zhou Y, *et al.* N-Terminal labeling of filamentous phage to create cancer marker imaging agents. *ACS Nano*, 2012, **6**(8): 6675-6680
- [29] Tian L, He L, Jackson K, *et al.* Self-assembling nanofibrous bacteriophage microgels as sprayable antimicrobials targeting multidrug-resistant bacteria. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 7158
- [30] Tian L, Jackson K, He L, *et al.* High-throughput fabrication of antimicrobial phage microgels and example applications in food decontamination. *Nat Protoc*, 2024, **19**(6): 1591-1622
- [31] Jendryczko K, Rzeszutko J, Krzyscik M A, *et al.* Drug conjugation via maleimide-thiol chemistry does not affect targeting properties of cysteine-containing anti-FGFR1 peptibodies. *Mol Pharm*, 2022, **19**(5): 1422-1433
- [32] Wall A, Wills A G, Forte N, *et al.* One-pot thiol-amine bioconjugation to maleimides: simultaneous stabilisation and dual functionalisation. *Chem Sci*, 2020, **11**(42): 11455-11460
- [33] Kang M S, Kong T W S, Khoo J Y X, *et al.* Recent developments in chemical conjugation strategies targeting native amino acids in proteins and their applications in antibody-drug conjugates. *Chem Sci*, 2021, **12**(41): 13613-13647
- [34] Zhao X, Zhong X, Yang S, *et al.* Guiding antibiotics towards their target using bacteriophage proteins. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 5287
- [35] Peng H, Borg R E, Dow L P, *et al.* Controlled phage therapy by photothermal ablation of specific bacterial species using gold nanorods targeted by chimeric phages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(4): 1951-1961
- [36] Parent K N, Deedas C T, Egelman E H, *et al.* Stepwise molecular display utilizing icosahedral and helical complexes of phage coat and decoration proteins in the development of robust nanoscale display vehicles. *Biomaterials*, 2012, **33**(22): 5628-5637
- [37] Singh A, Glass N, Tolba M, *et al.* Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosens Bioelectron*, 2009, **24**(12): 3645-3651
- [38] LeClerc J E, Istock N L. Specificity of UV mutagenesis in the lac promoter of M13lac hybrid phage DNA. *Nature*, 1982, **297**(5867): 596-598
- [39] Huss P, Chen J, Raman S. High-throughput approaches to understand and engineer bacteriophages. *Trends Biochem Sci*,

- 2023, **48**(2): 187-197
- [40] Loveless A. Increased rate of plaque-type and host-range mutation following treatment of bacteriophage *in vitro* with ethyl methane sulphonate. *Nature*, 1958, **181**(4617): 1212-1213
- [41] Green D M, Krieg D R. The delayed origin of mutants induced by exposure of extracellular phage T4 to ethyl methane sulfonate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961, **47**(1): 64-72
- [42] Gencay Y E, Jasinskýtė D, Robert C, *et al.* Engineered phage with antibacterial CRISPR-Cas selectively reduce *E. coli* burden in mice. *Nat Biotechnol*, 2024, **42**(2): 265-274
- [43] Hershey A D. The production of recombinants in phage crosses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1958, **23**: 19-46
- [44] Summers W C. History of phage research and phage therapy// Waldor M K, Friedman D I, Adhya S L. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Washington, D. C, USA: PressASM, 2005: 1-17
- [45] Payaslian F, Gradaschi V, Piuri M. Genetic manipulation of phages for therapy using BRED. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, **68**: 8-14
- [46] Marinelli L J, Piuri M, Swigoňová Z, *et al.* BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*, 2008, **3**(12): e3957
- [47] Tao P, Wu X, Tang W C, *et al.* Engineering of bacteriophage T4 genome using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*, 2017, **6**(10): 1952-1961
- [48] He Y, Chen J. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of T4 bacteriophage for high-throughput antimicrobial susceptibility testing. *Anal Chem*, 2024, **96**(45): 18301-18310
- [49] Shen J, Zhou J, Chen G Q, *et al.* Efficient genome engineering of a virulent klebsiella bacteriophage using CRISPR-Cas9. *J Virol*, 2018, **92**(17): e00534-e00518
- [50] Schilling T, Dietrich S, Hoppert M, *et al.* A CRISPR-Cas9-based toolkit for fast and precise *in vivo* genetic engineering of *Bacillus subtilis* phages. *Viruses*, 2018, **10**(5): 241
- [51] Hupfeld M, Trasanidou D, Ramazzini L, *et al.* A functional type II-a CRISPR-Cas system from *Listeria* enables efficient genome editing of large non-integrating bacteriophage. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(13): 6920-6933
- [52] Mitsunaka S, Yamazaki K, Pramono A K, *et al.* Synthetic engineering and biological containment of bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, **119**(48): e2206739119
- [53] Jackson R N, Golden S M, van Erp P B, *et al.* Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*, 2014, **345**(6203): 1473-1479
- [54] Ando H, Lemire S, Pires D P, *et al.* Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst*, 2015, **1**(3): 187-196
- [55] Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, *et al.* Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(50): 19039-19044
- [56] Yu P, Mathieu J, Li M, *et al.* Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82**(3): 808-815
- [57] Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Front Microbiol*, 2016, **7**: 1352
- [58] Peng H, Chen I A. Rapid colorimetric detection of bacterial species through the capture of gold nanoparticles by chimeric phages. *ACS Nano*, 2019, **13**(2): 1244-1252
- [59] Le S, He X, Tan Y, *et al.* Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e68562
- [60] Lee J H, Domaille D W, Cha J N. Amplified protein detection and identification through DNA-conjugated M13 bacteriophage. *ACS Nano*, 2012, **6**(6): 5621-5626
- [61] Lee J H, Cha J N. Amplified protein detection through visible plasmon shifts in gold nanocrystal solutions from bacteriophage platforms. *Anal Chem*, 2011, **83**(9): 3516-3519
- [62] Murugesan M, Abbineni G, Nimmo S L, *et al.* Virus-based photo-responsive nanowires formed by linking site-directed mutagenesis and chemical reaction. *Sci Rep*, 2013, **3**: 1820
- [63] Fujiwara D, Mihara K, Takayama R, *et al.* Chemical modification of phage-displayed helix-loop-helix peptides to construct kinase-focused libraries. *ChemBioChem*, 2021, **22**(24): 3406-3409
- [64] Wang X S, Chen P C, Hampton J T, *et al.* A genetically encoded, phage-displayed cyclic-peptide library. *Angew Chem Int Ed*, 2019, **58**(44): 15904-15909
- [65] Beech J, Saleh L, Frentzel J, *et al.* Multivalent site-specific phage modification enhances the binding affinity of receptor ligands. *Bioconjug Chem*, 2015, **26**(3): 529-536
- [66] Beier H, Hausmann R. T3 times T7 phage crosses leading to recombinant RNA polymerases. *Nature*, 1974, **251**(5475): 538-540
- [67] Oppenheim A B, Rattray A J, Bubunenko M, *et al.* *In vivo* recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 2004, **319**(2): 185-189
- [68] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, **37**: 67-78
- [69] Mohanraju P, Makarova K S, Zetsche B, *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 2016, **353**(6299): aad5147
- [70] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(11): 722-736
- [71] Shmakov S, Smargon A, Scott D, *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**: 169-182
- [72] Suga A, Kawaguchi M, Yonesaki T, *et al.* Manipulating interactions between T4 phage long tail fibers and *escherichia coli* receptors. *Appl Environ Microbiol*, 2021, **87**(13): e0042321
- [73] Peng H, Borg R E, Nguyen A B N, *et al.* Chimeric phage nanoparticles for rapid characterization of bacterial pathogens: detection in complex biological samples and determination of antibiotic sensitivity. *ACS Sens*, 2020, **5**(5): 1491-1499
- [74] Jin L, Cao F, Gao Y, *et al.* Microenvironment-activated nanozyme-armed bacteriophages efficiently combat bacterial infection. *Adv Mater*, 2023, **35**(30): e2301349

- [75] Wang L, Tkilaishvili T, Jiang Z, *et al.* Phage-liposome nanoconjugates for orthopedic biofilm eradication. *J Control Release*, 2024, **376**: 949-960
- [76] Tao S, Hu A, Bavel E, *et al.* Bio-responsive hydrogel for targeted on-demand release of a phage cocktail for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Adv Funct Mater*, 2026, **36**(2): e09360
- [77] Park J, Hassan M A, Nabawy A, *et al.* Engineered bacteriophage-polymer nanoassemblies for treatment of wound biofilm infections. *ACS Nano*, 2024, **18**(39): 26928-26936
- [78] Fila G, Kawiak A, Grinholc M S. Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. *Virulence*, 2017, **8**(6): 938-958
- [79] Chang S F, Chen C N, Lin J C, *et al.* Truncated pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* as a TLR4-antagonizing new drug for chronic inflammatory conditions. *Cells*, 2020, **9**(5): 1183
- [80] Zhu J, Liu Y, Chen T, *et al.* "Precision-guided killer" engineered phage for combating carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* induced inflammatory bowel disease. *Adv Funct Mater*, 2025, **35**(50): e00754
- [81] Brödel A K, Charpenay L H, Galtier M, *et al.* *In situ* targeted base editing of bacteria in the mouse gut. *Nature*, 2024, **632**: 877-884
- [82] Sun R, Yu P, Zuo P, *et al.* Biofilm control in flow-through systems using polyvalent phages delivered by peptide-modified M13 coliphages with enhanced polysaccharide affinity. *Environ Sci Technol*, 2022, **56**(23): 17177-17187
- [83] Yao M, Chen L, Jin X, *et al.* Bacteriophage immunotherapy with artificial antigen-directed immune labeling against bacterial infection. *Sci Adv*, 2025, **11**(35): eadr1911
- [84] Meng L, Yang F, Cao Z, *et al.* Wearing bacteriophages individually with an adhesive drug-loadable nanohelmet for treating ocular infections. *Sci Adv*, 2025, **11**(28): eadx4183
- [85] Chen L, Wu M Y, Chen S L, *et al.* The guardian of vision: intelligent bacteriophage-based eyedrops for clinical multidrug-resistant ocular surface infections. *Adv Mater*, 2024, **36**(38): e2407268
- [86] Hsu B B, Plant I N, Lyon L, *et al.* *In situ* reprogramming of gut bacteria by oral delivery. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5030
- [87] Dong X, Pan P, Zheng D W, *et al.* Bioinorganic hybrid bacteriophage for modulation of intestinal microbiota to remodel tumor-immune microenvironment against colorectal cancer. *Sci Adv*, 2020, **6**(20): eaba1590
- [88] Du J, Meile S, Baggenstos J, *et al.* Enhancing bacteriophage therapeutics through *in situ* production and release of heterologous antimicrobial effectors. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 4337
- [89] Zhao Y, Zhu M, Ling Y, *et al.* Correction to "a DNA nanopatch-bacteriophage system targeting streptococcus gallolyticus for inflammatory bowel disease treatment and colorectal cancer prevention". *Adv Mater*, 2025, **37**(44): e13718
- [90] Danis-Wlodarczyk K M, Wozniak D J, Abedon S T. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: *in vitro*, *in vivo* and clinical application. *Antibiotics (Basel)*, 2021, **10**(12): 1497
- [91] Meng L, Yang F, Pang Y, *et al.* Nanocapping-enabled charge reversal generates cell-enterable endosomal-escapable bacteriophages for intracellular pathogen inhibition. *Sci Adv*, 2022, **8**(28): eabq2005
- [92] Skliros D, Kalatzis P G, Kalloniati C, *et al.* The development of bacteriophage resistance in *Vibrio alginolyticus* depends on a complex metabolic adaptation strategy. *Viruses*, 2021, **13**(4): 656
- [93] Dou L, Li J, Wu W, *et al.* Investigation of the therapeutic efficacy and resistance mechanisms of lytic phages targeting ST218 KL57 CR-hvKP. *mSystems*, 2026, **11**(2): e0147625
- [94] Maestri A, Pons B J, Pursey E, *et al.* The bacterial defense system MADS interacts with CRISPR-Cas to limit phage infection and escape. *Cell Host Microbe*, 2024, **32**(8): 1412-1426.e11
- [95] Merabishvili M, Pirnay J P. CRISPR-Cas3-armed bacteriophages for drug-resistant bacteria. *Lancet Infect Dis*, 2024, **24**(12): 1289-1291
- [96] Aframian N, Eldar A. Abortive infection antiphage defense systems: separating mechanism and phenotype. *Trends Microbiol*, 2023, **31**(10): 1003-1012
- [97] Zhang H, You J, Zhou H, *et al.* The two-component nuclease-active KELShedu system confers broad antiphage activity via abortive infection. *Sci Adv*, 2025, **11**(44): eadv4747
- [98] Echterhof A, Dharmaraj T, Blankenberg P, *et al.* Whole-body distribution of three *Pseudomonas* phages characterized by a translational physiologically based pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2026, **70**(1): e0150625
- [99] Dedrick R M, Freeman K G, Nguyen J A, *et al.* Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary *Mycobacterium abscessus* infection. *Nat Med*, 2021, **27**(8): 1357-1361
- [100] Hübl A, Most J, Hauß C, *et al.* Development of spray-dried phage-aztreonam microparticles for inhalation therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Pharm Biopharm*, 2026, **219**: 114966
- [101] Walji S D, Jun I, Cudmore E, *et al.* Hydrazone-crosslinked poly (oligoethylene glycol methacrylate) -based hydrogels with physically entrapped phage effectively control *Pseudomonas aeruginosa* infections in a burn wound model. *Biomater Adv*, 2025, **177**: 214403
- [102] Bretaudeau L, Tremblais K, Aubrit F, *et al.* Good manufacturing practice (GMP) compliance for phage therapy medicinal products. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 1161

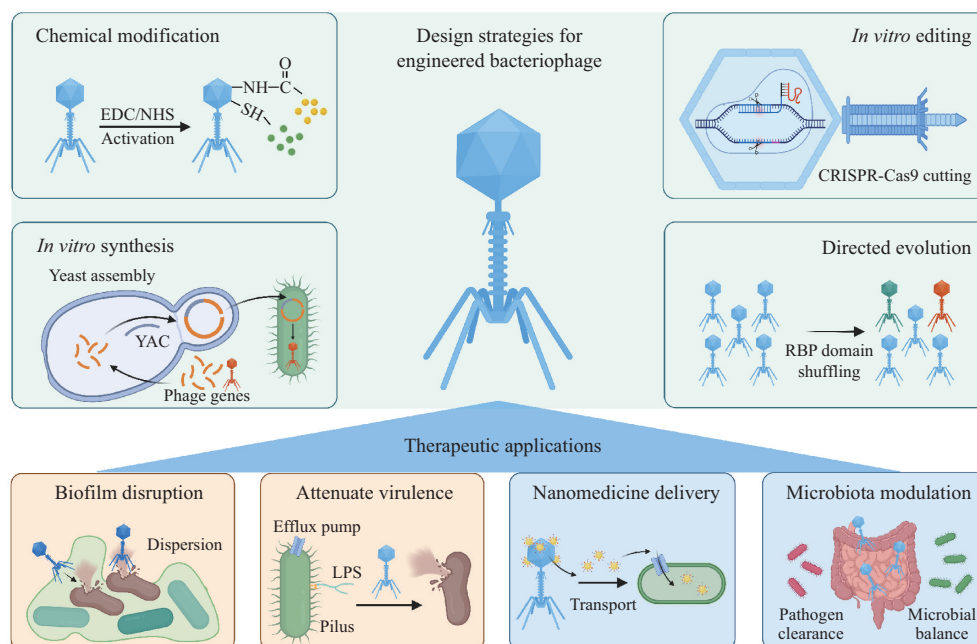
Engineered Bacteriophages for The Treatment of Multidrug-resistant Bacterial Infections*

CHEN Yu-Ying^{1,2)**}, HUANG Chun-Mei^{1)**}, PAN Jin-Zhi^{1,2)**}, LIU De-Liang²⁾, ZHOU Yang²⁾,
DAI Gui-Qin²⁾, ZHAO Peng-Fei^{2)***}, LU Hong-Zhou^{2)***}, ZHENG Ming-Bin^{1,2)***}

⁽¹⁾Key Laboratory of Nanomedicine of Guangdong Medical University, Dongguan Key Laboratory of Drug Design and Formulation Technology, School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

²⁾Institute for Hepatology, Shenzhen Clinical Research Center for Tuberculosis, National Clinical Research Center for Infectious Disease, The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518112, China)

Graphical abstract



Abstract Multidrug-resistant (MDR) bacterial infections have emerged as a serious challenge of global public health crisis. The overuse and misuse of conventional antibiotics have dramatically accelerated the emergence, evolution and worldwide spread of drug-resistant bacterial strains, necessitating urgent exploration of novel

* This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (2023YFA0915600), Shenzhen Medical Research Fund (D250402006), The National Natural Science Foundation of China (82372271), Key Area Projects for Universities in Guangdong Province (2022DZX2022), Guangdong Province Medical Science and Technology Research Fund (A2024400) and Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20240813102021028, JCYJ20240813102012017, JCYJ20250604143832042).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

ZHAO Peng-Fei. Tel: 86-755-61222333, E-mail: pengfeizhao@aliyun.com

LU Hong-Zhou. Tel: 86-755-61222333, E-mail: luhongzhou@fudan.edu.cn

ZHENG Ming-Bin. Tel: 86-755-61222333, E-mail: mingbinzheng@126.com

Received: December 18, 2025 Accepted: April 18, 2026

antibacterial strategies. Bacteriophages serve as natural bacterial predators offering distinct advantages including high host specificity, autonomous self-replication capabilities and cost-effective large-scale production. However, wild-type phages present significant clinical limitations due to their narrow host ranges, susceptibility to rapid immune clearance and poor penetration of bacterial biofilms, which severely restrict their therapeutic applications. The convergence of synthetic biology, nanotechnology and advanced gene editing technologies has accelerated the development of engineered bacteriophage platforms, providing programmable, scalable and clinically translatable pathways to overcome these inherent biological constraints. Here, we systematically delineate four fundamental strategies for engineered bacteriophage development. Chemical modification utilizes reactive functional groups such as amino, carboxyl and thiol moieties on capsid proteins through esterification, amidation or click chemistry reactions to achieve precise drug conjugation and surface functionalization. *In vivo* editing encompasses ultraviolet or chemical mutagenesis for random mutation induction, homologous recombination for targeted genetic alterations, recombineering methodologies including electroporation-mediated bacteriophage recombination engineering, and CRISPR-Cas systems for precise genome editing to enable exact genetic reconstruction and host range reprogramming. *In vitro* synthesis leverages genome engineering platforms where intact phage genomes are transferred into yeast or host bacteria to facilitate highly efficient homologous recombination, enabling large DNA fragment assembly and cross-gene host range expansion without bacterial toxicity constraints. Directed evolution combines artificial selection through mutation library screening with rational design approaches involving chimeric receptor binding protein construction or site-specific mutagenesis, effectively balancing the discovery of unknown adaptive pathways with targeted host specificity modification. Moreover, we comprehensively discuss therapeutic applications across diverse clinical scenarios. Engineered bacteriophage effectively disrupt bacterial biofilms through sophisticated functionalized delivery platforms including nanozyme-conjugated phages, phage-liposome nanoconjugates and bio-responsive hydrogels, demonstrating significantly enhanced bactericidal efficiency compared to unmodified free phages. These bioengineered vectors attenuate bacterial virulence and resensitize pathogens to antibiotics by delivering CRISPR-Cas systems or base editors to disrupt critical virulence factors such as pili, capsule synthesis machineries and quorum sensing systems, or by inactivating antibiotic resistance determinants including beta-lactamase genes. As an intelligent nanomedicine delivery platform, engineered bacteriophage enable precise pathogen elimination through photocatalytic reactive oxygen species generation, immunomodulatory interventions, or controlled release of antibacterial drugs. Furthermore, oral administration of engineered bacteriophage facilitates microbiota modulation, which selectively eliminate intestinal pathogens while preserve beneficial commensal microbiota, thereby restoring microbial community balance and preventing complications associated with dysbiosis. Finally, we critically analyze persistent challenges including host strain matching complexity, evolution of bacterial resistance mechanisms, pharmacokinetic optimization requirements, optimal administration route selection, large-scale production quality control standards and clinical dosing determination protocols. Through multidisciplinary integration of synthetic biology, infectious disease medicine and immunology, future translational medicine studies of bacteriophage should establish comprehensive technical platforms encompassing rapid phage screening, intelligent rational design, rigorous *in vivo* evaluation and standardized clinical validation processes, ultimately advancing engineered bacteriophage from laboratory innovations to clinically approved therapeutics for effectively combating MDR bacterial infections.

Key words engineered bacteriophage, engineering techniques, drug-resistant bacteria, biotherapy

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0552

CSTR: 32369.14.pibb.20250552