

DOI: 10.13376/j.cbbs/2025081

文章编号: 1004-0374(2025)07-0808-10



王艳丽,中国科学院生物物理研究所研究员,中国科学院大学教授。1996年,获得武汉大学学士学位;1999年,获得中国农业科学院硕士学位;2005年,获得中国科学技术大学博士学位,并进入中国科学院生物物理研究所任职助理研究员;2006年2—8月,以访问学者身份在美国佐治亚大学生物化学系进修;2006年9月起,在美国斯隆-凯瑟琳癌症研究中心从事博士后工作,出站后先后任职副研究员、高级研究员;2010年10月入选中国科学院“百人计划”,进入中国科学院生物物理研究所任职研究员,并于2015年3月起同时在中国科学院大学任职教授。

王艳丽研究员主要从事蛋白质与RNA复合物的结构与功能研究,对CRISPR-Cas系统效应蛋白和Argonaute蛋白有着多年的研究经验。在非编码RNA调控基因表达、抵御病毒入侵等作用机理方面取得了卓越的成果。研究成果以通讯或共同通讯作者在*Cell*、*Nature*、*Mol Cell*、*PNAS*等国际期刊发表多篇研究论文;多个项目获得国家自然科学基金、科技部及中国科学院等的支持,荣获HHMI国际学者、长江学者、国家杰出青年、“万人计划”科技创新领军人才等多项荣誉称号,获得国际RNA学会职业中期研究奖、谈家桢生命科学奖创新奖、中国青年女科学家奖、北京市科学技术奖二等奖等奖项。此外,还担任中国生物物理学会理事、中国生化学会核糖核酸(RNA)专业分会委员、中国遗传学会基因组编辑分会委员,以及*CRISPR J*杂志副主编、*J Mol Biol*杂志编委等。

噬菌体疗法的研究现状及前景

吴庄怡[#], 莘佳怡[#], 王艳丽^{*}

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要: 抗生素的过度使用导致细菌耐药性问题日益严重,而噬菌体疗法作为一种潜在的替代方案受到广泛关注。临床研究表明,噬菌体疗法对多重耐药菌感染具有显著疗效,尤其在噬菌体鸡尾酒疗法和噬菌体-抗生素联合治疗中表现出色。然而,噬菌体疗法仍面临诸多挑战,包括天然噬菌体狭窄的宿主谱和快速进化的病原菌免疫系统等。通过对噬菌体基因组进行改造,扩大噬菌体的宿主范围,增强裂解能力,能够提高噬菌体治疗效果,这也促进了噬菌体基因工程技术的发展。此外,靶向药物递送等前沿领域也为抗菌治疗提供了新的思路。

关键词: 噬菌体疗法; 多重耐药性; 抗微生物药物耐药性; 基因编辑; 噬菌体合成

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A

收稿日期: 2025-06-18

基金项目: 北京市自然科学基金项目(F251015, 5232022); 北京市科技计划项目(Z231100007223004)

[#]共同第一作者

^{*}通信作者: E-mail: ylwang@ibp.ac.cn

Current developments and future trends in phage therapy

WU Zhuang-Yi[#], XIN Jia-Yi[#], WANG Yan-Li^{*}

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Antimicrobial resistance due to antibiotic overuse is a growing crisis, consequently, one of the alternatives, bacteriophage therapy, has drawn wide concern. Clinical studies indicate its effectiveness against multidrug-resistant bacterial infections, especially when multiple phages or phage-antibiotic combinations were used as therapeutic agents. However, phage therapy faces several challenges, including the narrow host spectrum of natural phage and the rapidly evolved immune system of pathogenic bacteria. Increasing phage therapeutic efficiency by broadening its host range and enhancing the lysis capability has driven the developments of phage genetic engineering technology. Additionally, other advanced research related to phage therapy, like targeted delivery of phage, provides new insights into treating bacterial infections.

Key words: phage therapy; multidrug resistance; anti-microbial resistance; genetic modification; phage synthesis

噬菌体是一类特异感染细菌的病毒,其结构简单,主要由核酸和蛋白质外壳组成。根据其对宿主的侵染方式不同,分为烈性噬菌体和温和噬菌体两种。烈性噬菌体感染细菌后,会在短时间内完成裂解周期,并导致宿主细胞死亡;温和噬菌体则将其DNA整合到宿主细胞的基因组中,并随宿主复制而稳定遗传。噬菌体能够侵染并裂解细菌细胞,因此可以作为一种潜在的抗菌药物。1917年,D'Herelle首次提出了噬菌体的概念,随后将其应用于感染性疾病的预防^[1]。20世纪30年代,苏联等国家开展了大量噬菌体疗法的临床尝试^[2]。然而,随着抗生素的发现和广泛应用,噬菌体疗法在西方国家长期被忽视,研究进展缓慢^[1,2]。

抗生素在医疗及农牧业的滥用促使细菌产生抗生素耐药性^[3]。这些抗生素耐药基因通过质粒等可移动遗传元件(MGEs)在细菌间传播与流行,严重影响抗生素的治疗效果^[4]。耐药性细菌感染已成为全球公共卫生的重大挑战。2019年,全球约有127万人直接死于耐药菌感染,约495万人的死亡与耐药菌感染间接相关,显著增加了社会医疗成本^[5]。2020年,世界卫生组织将抗微生物药物耐药性列为十大公共卫生威胁之一^[6]。为应对“后抗生素时代”的到来,迫切需要开发替代性抗菌策略,以对抗日益严重的耐药菌感染^[7]。近年来,噬菌体疗法重新受到关注。

本文将从临床应用和噬菌体改造方法两方面综述噬菌体疗法的最新进展,探讨其优势与挑战,并介绍若干前沿研究方向。

1 噬菌体抗菌效果显著

1.1 噬菌体高特异性及低免疫原性确保临床使用安全

噬菌体感染细菌的过程具有高度特异性。其尾部的受体结合蛋白能够特异性识别并结合宿主细菌表面的蛋白质或多糖等生物大分子,精准靶向目标菌株,从而侵染宿主细菌并导致其裂解和死亡^[8]。这种高度特异性是噬菌体疗法的显著优势,可以减少对人体细胞及正常共生菌群的破坏,降低继发性感染风险,显示出良好的临床安全性。

噬菌体对人体具有低免疫原性,其自身产物对人体影响较小,不会引发强烈的免疫反应或炎症反应^[9,10]。Pirnay等^[9]研究指出,尽管部分患者在接受噬菌体疗法后血清样本中出现了免疫中和噬菌体的抗体,但其中的大多数患者仍能清除细菌感染,且无人出现明显不良反应。目前,噬菌体疗法在治疗和预防抗生素耐药性细菌感染等领域展现出巨大潜力,有望得到广泛应用。

1.2 噬菌体鸡尾酒疗法有效清除细菌感染

多噬菌体联合应用的鸡尾酒疗法对细菌感染具有更好的治疗效果^[11,12]。Hesse等^[11]研究表明,在小鼠模型中,相较于单一噬菌体治疗,噬菌体鸡尾酒疗法可以更有效地应对多重耐药(MDR)肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的感染,并显著降低致病菌产生噬菌体抗性的概率。2019年,Dedrick等^[12]利用噬菌体鸡尾酒治愈了一例肺部感染耐药性脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)的患者。噬菌体鸡尾酒能够扩展宿主范围和减缓细菌抗性发展,为对抗复杂细菌感染提供了有力手段。

1.3 噬菌体与抗生素联合使用限制细菌耐药性发展

噬菌体和抗生素能够协同限制细菌耐药性发展,具有较高的可行性和有效性^[13]。在对鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的研究中发现,噬菌体侵染抗生素耐药菌株的能力显著高于抗生素敏感菌株^[14]。而细菌产生噬菌体抗性的过程通常伴随对部分抗生素敏感性的恢复^[15]。Gordillo Altamirano等^[15]发现,产生噬菌体耐受性的菌株恢复了对 β -内酰胺类抗生素的敏感性。这些研究结果为噬菌体与抗生素联合应用提供了理论依据。噬菌体-抗生素联合疗法克服了噬菌体疗法起效缓慢的缺点,并且能够有效限制细菌的耐药性发展与传播^[13]。

1.4 近年噬菌体疗法的有效案例

近十年来,噬菌体疗法在多重耐药菌感染治疗领域取得显著进展,受到科学界广泛关注。2015年,美国加州大学圣地亚哥分校的Tom Patterson教授感染了多重耐药鲍曼不动杆菌,多种抗生素治疗均显示无效^[16]。在其妻子及全球噬菌体专家的协助下,他成为美国首例接受噬菌体静脉注射治疗的患者,成功治愈了原本危及生命的耐药菌感染^[16]。2019年,Tom Patterson教授夫妇出版了回忆录《The Perfect Predator: A Scientist's Race to Save Her Husband from a Deadly Superbug》,旨在纪念与宣传噬菌体疗法的关键作用,并推动其发展,以助力更多受多重耐药菌威胁的患者^[17]。

多个案例显示了噬菌体疗法在多重耐药菌感染中的有效性,如Rao等^[18]和Qu等^[19]分别通过静脉注射与雾化吸入噬菌体成功治疗重症呼吸道及肺部感染鲍曼不动杆菌的患者。噬菌体疗法也被用于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等耐药菌株感染(见表1),其中大部分案例治疗效果良好。据美国ClinicalTrials.gov网站记录,截至2025年6月,全球已有54项相关临床试验在研或完成,其中4项进入III期临床,多采用静脉注射、雾化、口服等给药途径^[20]。

我国也在积极推进相关研究。2023年发布的《噬菌体治疗中国专家建议》为噬菌体疗法在国内的规范化研究提供了指导意见^[37]。2025年,深圳第三人民医院联合华大研究院报道了噬菌体成功治愈多重耐药黏质沙雷菌(*Serratia marcescens*)感染的首个案例,验证了噬菌体疗法的安全性和可行性^[38]。

2 噬菌体疗法的临床应用瓶颈

2.1 有限的噬菌体资源难以应对致病菌的快速进化

噬菌体对宿主识别的高度特异性限制了其针对的病原菌范围。这种特异性源于噬菌体受体结合蛋白对宿主细菌表面受体的识别与结合,是噬菌体侵染并裂解细菌的前提,导致单一噬菌体通常仅能感染特定菌种或菌株^[8, 39]。同时,为了对抗噬菌体的侵染,细菌通过修饰、遮蔽或丢失噬菌体受体分子,拮抗并逃逸噬菌体的宿主识别机制,进一步压缩噬菌体的潜在宿主范围^[40]。因此,为了确保噬菌体疗法的有效性,必须在体外确定其宿主谱,针对不同的病原菌选择合适的噬菌体^[41]。噬菌体的高度特异性限制了其宿主范围,使其通常只能针对特定细菌,难以实现广谱抗菌效果,从而限制了噬菌体在临床中的应用^[41, 42]。

致病细菌种类的快速增长导致细菌感染病原日益多样化,给噬菌体疗法带来严峻挑战。Bartlett等^[43]研究发现,1980年后年致病菌的发现速度始终保持在高水平。在2011至2020年期间,新发现的197种病原菌占已发现的全部细菌病原体的13%^[43]。不利环境因素(如抗生素、活性氧和高温)能够触发SOS反应等应激响应机制,从而提高突变频率并促进水平基因转移,进而加速进化过程^[44, 45]。致病菌种类增加、新的致病菌不断被发现,导致临床细菌感染风险随之上升^[46]。因此,为有效应对多样化细菌感染,需要开发并利用更多种类的噬菌体资源。

然而,噬菌体的来源主要依赖噬菌体库及自然环境分离,临床上难以快速获得治疗可用的噬菌体^[47, 48]。不同噬菌体库缺乏标准化的表征研究记录,并且伴随新的致病菌的不断发现,这些噬菌体库难以及时更新^[48]。天然噬菌体需经复杂而耗时的筛选,难以高效分离具有裂解细菌能力的噬菌体株^[47, 49]。对于有限的噬菌体来源,通过优化噬菌体库管理和天然噬菌体筛选技术,有望更高效地从现有资源中筛选出具有裂解能力的噬菌体株,从而为噬菌体药物的研发及大规模生产提供支持。

2.2 细菌免疫系统的进化拮抗噬菌体抗菌效果

细菌免疫系统与噬菌体的拮抗作用限制了噬菌体疗法的治疗效果。尽管大多数噬菌体药物在初期能够有效侵染并裂解对应的致病菌,但细菌的突变和水平基因转移能力使其在噬菌体压力下能够快速进化,获得抵御噬菌体的免疫系统,降低噬菌体药

表1 常见多重耐药菌的噬菌体疗法临床案例

感染菌株	感染部位	治疗方案	治疗效果	发表时间	引用
革兰氏阳性菌					
<i>S. aureus</i>	末节指骨骨髓炎	单一噬菌体, 局部注射	溃疡愈合, 骨髓炎完全消除, 长期未复发	2018	[21]
<i>S. aureus</i>	慢性鼻窦炎	2种噬菌体及多种抗生素, 三周期注射治疗	细菌被清除, 长期内未复发	2022	[22]
<i>S. aureus</i>	慢性细菌性前列腺炎	3种噬菌体, 口服及局部应用	疼痛减轻, 细菌被清除, 长期内完全恢复	2021	[23]
<i>S. aureus</i>	Netherton综合征	3种噬菌体, 口服及局部应用	皮肤状况改善, 细菌显著减少	2017	[24]
<i>S. aureus</i>	坏死性筋膜炎	5种噬菌体, 静脉及腹腔注射、局部应用	左腿坏死截肢, 伤口细菌被清除, 并发病恢复	2024	[25]
<i>Enterococcus faecalis</i>	慢性粪肠球菌假体关节感染	单一噬菌体, 静脉及关节注射	感染得到控制, 长期未复发	2023	[26]
革兰氏阴性菌					
<i>K. pneumoniae</i>	尿路感染	5种噬菌体, 局部应用	感染恢复, 无明显不良反应	2024	[27]
<i>K. pneumoniae</i>	尿路感染	多种噬菌体及多种抗生素, 口服及局部应用	感染恢复, 未见复发	2019	[28]
<i>K. pneumoniae</i>	克罗恩病、多部位细菌定植	3周噬菌体治疗, 口服及局部应用	定植被清除, 长期未复发	2020	[29]
<i>K. pneumoniae</i>	严重爆炸伤、骨折相关感染	单一噬菌体及多种抗生素, 局部应用	感染得到控制, 骨折愈合, 未见复发	2022	[30]
<i>P. aeruginosa</i>	复发性人工膝关节感染	3种噬菌体配合环丙沙星, 静脉及局部注射	膝关节状况正常, 无感染复发	2021	[31]
<i>P. aeruginosa</i>	菌血症	BFC1 [*] 噬菌体鸡尾酒, 静脉注射及局部应用	多次复发菌血症, 突发心源性休克死亡	2017	[32]
<i>P. aeruginosa</i>	人工血管移植植物感染	3种噬菌体配合抗生素, 静脉注射	复发感染对抗生素敏感, 治愈后无复发	2023	[33]
<i>P. aeruginosa</i>	慢性支气管扩张症	Inducen-Res TM 诱导性天然噬菌体鸡尾酒 [*] , 口服	症状消失, 无感染复发	2025	[34]
<i>P. aeruginosa</i>	骨折相关感染	BFC 1.10噬菌体鸡尾酒 [*] 配合抗生素, 局部应用	伤口愈合, 无局部或全身感染	2022	[35]
<i>E. coli</i>	慢性细菌性前列腺炎	噬菌体鸡尾酒, 口服及局部应用	主要症状消失, 长期未复发	2023	[36]

注: *标记为预先制备的非个性化制剂的噬菌体鸡尾酒制剂

物在治疗后期的抗菌效果^[50]。借助转座子、质粒及噬菌体等 MGEs, 细菌免疫系统表达基因可以在种内或种间传递, 促进噬菌体免疫机制在细菌群体中的扩散^[50-52]。例如, Oliveira 等^[51]发现在原核生物基因组中,R-M 系统与小型可移动遗传元件 (sMGEs) 的分布高度相关, 能够通过 sMGEs 在细菌间转移。这种水平基因转移能够使受体细胞获得噬菌体防御系统的全套基因, 并促进系统内有利等位基因组合的快速形成, 推动噬菌体防御机制的传递和进化^[52]。噬菌体抵抗机制的快速进化能够增强宿主菌的抗噬

菌能力, 削弱噬菌体作为抗菌药物的有效性, 是噬菌体疗法的重要挑战。为了快速消灭致病菌和延缓噬菌体抗性的发展, 临床上通常使用噬菌体鸡尾酒疗法等策略, 并结合噬菌体改造技术, 增强噬菌体抗菌能力, 提高噬菌体疗法的治疗效果。

2.3 温和噬菌体促进细菌致病基因的传递

温和噬菌体的溶原 - 裂解周期转换能够介导水平基因转移, 增加细菌的致病性发展风险^[53]。进入溶原状态的温和噬菌体可整合至宿主基因组形成原噬菌体 (prophage), 并在特定信号刺激下从宿主基

因组中切除出来并进入裂解周期^[54]。在切除过程中，噬菌体可能携带部分宿主基因包装到子代病毒中，作为可移动遗传元件介导水平基因转移，促进毒力基因在细菌间传播，增强宿主致病性^[55-58]。Chen等^[57]发现在侵染金黄色葡萄球菌的部分温和噬菌体中存在侧向转导机制，能够将宿主基因组中较大的片段(数百 kb)高效转移到其他细菌中。另外，Ohnishi等^[58]通过基因组比较分析发现，大肠杆菌 O157 Sakai 基因组中含有能够编码多种致病性相关蛋白的原噬菌体，从而引发出血性肠炎和溶血性尿毒综合征等疾病。这些毒力基因能够随着温和噬菌体基因组在细菌间传递，提高其他菌株的致病性^[58]。因此，为排除潜在的不利影响，在临床治疗中应避免使用温和噬菌体^[59]。通过人工改造温和噬菌体，移除其溶原控制区，能够避免温和噬菌体传播致病基因，从而扩大噬菌体药物的选择范围，为噬菌体疗法提供新策略。

2.4 噬菌体纯化及治疗中的细菌毒素可能干扰患者恢复

致病菌产生的细菌毒素可能会对患者恢复过程产生一定副作用。噬菌体纯化过程难以完全去除细菌碎片和毒素，并且噬菌体快速裂解致病菌可能使细菌内毒素等物质进入患者血液循环^[60]。尽管在 52 项噬菌体疗法临床研究中仅 7% 的患者报告了不良事件，且小鼠体内实验表明噬菌体疗法的细菌内毒素检测值低于抗生素治疗，但是细菌毒素潜在风险仍需重视^[61, 62]。因此，需要更多关于噬菌体疗法耐受性的研究，以证明其影响的有限性。同时，还需要优化噬菌体的设计研发和制备流程，避免细菌毒素污染，为噬菌体疗法大规模临床试验及商业化应用奠定基础。

3 噬菌体定向改造策略突破临床应用限制

噬菌体疗法的临床应用受限于噬菌体狭窄的宿主谱与复杂的筛选过程，细菌免疫系统对噬菌体的拮抗作用亦会削弱噬菌体药物的抗菌效果。为突破这些限制，可以定向改造天然噬菌体，通过同源重组和人工合成等方式，实现噬菌体宿主范围的扩大与裂解能力的提高，从而克服天然噬菌体的固有缺陷，为构建广谱高效的噬菌体抗菌药物提供有力支持。

3.1 改造受体结合蛋白，扩展噬菌体宿主范围

噬菌体受体结合蛋白主要分为尾丝蛋白和尾刺蛋白，能够与细菌细胞表面受体特异性结合并启动

侵染过程^[8, 63]。定向改造受体结合蛋白可以改变噬菌体的宿主识别范围^[64, 65]。Ando 等^[64]通过整体替换大肠杆菌 T7 噬菌体和克雷伯菌噬菌体 K11 的尾部组件，成功交换其宿主范围。Dunne 等^[65]将随机突变和定向筛选结合，改变了李斯特菌噬菌体 PSA 受体结合蛋白的识别对象。另外，将不同受体结合蛋白突变基因整合至同一噬菌体基因组，可以使其宿主范围显著扩大^[65]。替换或增添受体结合蛋白表达基因能够有效改变或扩大噬菌体的宿主范围，增强噬菌体药物的广谱性和有效性，从而扩展噬菌体疗法的应用范围。

3.2 插入外源基因，增强噬菌体抗菌能力

噬菌体可以作为外源基因表达载体，靶向破坏致病菌细胞壁、细胞膜等细胞结构和 DNA，治疗细菌感染^[66-68]。Hagens 等^[66]在大肠杆菌噬菌体 M13 内插入穿孔素 λ S105 和限制酶 BglII 基因，分别破坏细菌细胞膜与 DNA。Kilcher 等^[67]在噬菌体 PSA 内插入外源内溶素表达基因 *ply511*，增强了其降解李斯特菌细胞壁的能力，提高了裂解效率。Park 等^[68]将靶向宿主细菌的 *nuc* 基因的 CRISPR-Cas9 相关基因插入温和噬菌体 ϕ SaBov 基因组，改造后的噬菌体表达 crRNA 与 Cas9 核酸酶，可靶向识别并切割宿主细菌基因组中的互补区域，降解宿主基因组 DNA。通过在噬菌体内表达外源毒力基因和 CRISPR-Cas 等免疫系统，可以主动破坏宿主细菌的细胞结构，提升杀菌效率与针对性，增强噬菌体的抗菌能力。

3.3 敲除溶原控制区，实现温和噬菌体向烈性噬菌体的转化

温和噬菌体基因组内具有溶原控制功能的基因可以调控原噬菌体的整合与维持，移除相关基因能够阻断温和噬菌体进入溶原周期，抑制其介导的致病基因转移，并降低细菌耐药性及致病性的传播^[67]。Kilcher 等^[67]移除温和噬菌体 B025 基因组中裂解周期阻遏蛋白基因以及整个溶原控制区(LCR)，将其转化为烈性噬菌体，在侵染后直接进入裂解周期。通过敲除溶原控制基因，可以将温和噬菌体改造成烈性噬菌体，降低水平基因转移的风险，增强抗菌效果。

4 噬菌体基因工程技术的发展现状

为了应对天然噬菌体临床应用的局限性，需要对噬菌体进行针对性改造，因而一系列可以扩大改造范围和提高改造效率的噬菌体基因工程技术得以被开发。噬菌体基因工程主要分为噬菌体基因编辑

和从头合成两大策略^[69]。基因编辑技术通过经典同源重组和电转化 DNA 的噬菌体重组工程 (bacteriophage recombineering of electroporated DNA, BRED) 实现噬菌体基因重组, 随后设计 CRISPR-Cas 反选系统提高重组产物的筛选效率^[69]。合成噬菌体则需要对其基因组进行从头设计与合成, 随后表达噬菌体外壳并装配, 最终获得定制化的基因工程噬菌体^[47]。噬菌体基因组编辑与合成方法的发展能够促进噬菌体改造工具的扩展, 提高噬菌体抗菌剂的研发效率, 显著增强噬菌体疗法的覆盖范围与抗菌效果。

4.1 经典同源重组

噬菌体基因编辑技术依赖同源重组机制^[69]。宿主或噬菌体编码的重组酶可以催化同源 DNA 片段互补配对并发生交换, 实现基因的插入、删除或替换。早期主要采用噬菌体杂交 (phage cross) 技术, 利用宿主细菌的内源重组系统使不同亲代噬菌体的基因片段发生交换, 从而产生具有优势性状的子代噬菌体^[69, 70]。后续引入质粒作为外源基因供体, 能够将其他生物的 DNA 片段引入噬菌体基因组^[69, 71]。如 Tanji 等^[71]通过重组质粒 pUT-GFP/SOC 将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 插入 T4 噬菌体基因组内, 获得了能够表达外源绿色荧光蛋白的 T4 工程噬菌体。

为了提高同源重组效率, 高效的噬菌体重组系统也被开发为基因编辑工具^[72, 73]。Oppenheim 等^[72]利用 λ 噬菌体的 Red 同源重组系统, 将线性 DNA 片段或单链寡核苷酸整合到 λ 噬菌体基因组中, 实现了对噬菌体基因组特定定位点的突变。Jensen 等^[73]利用 λ -Red 同源重组系统, 在 T7 噬菌体基因组特定定位点实现了单碱基突变及 DNA 片段替换。这些研究表明 λ -Red 同源重组系统可以显著提高重组效率, 并扩展基因编辑工具库与可改造噬菌体的种类^[72, 73]。

4.2 电转化DNA的噬菌体重组工程

BRED 技术可以通过电转化将噬菌体基因组与质粒共同递送至宿主细菌, 提高质粒与噬菌体的转化效率^[74]。Marinelli 等^[74]利用 BRED 技术通过同源重组对分枝杆菌噬菌体基因组进行了 DNA 片段的敲除、突变和插入。随后, BRED 技术被用于克雷伯菌、沙门氏菌和肠杆菌噬菌体基因组的编辑, 显示了其在改造抗生素耐药菌噬菌体方面的应用潜力^[75-77]。2019 年, 经过 BRED 改造的分枝杆菌噬菌体 ZoeJ45 被用于临床, 并成功治愈了一位 15 岁的 *M. abscessus* 感染患者, 这是基因编辑噬菌体的首次临床应用^[12]。

尽管 BRED 技术在插入或移除 200 bp 大小的双链 DNA 片段时具有较高的重组效率 (约 10%), 可以直接通过两轮 PCR 扩增筛选获得基因编辑噬菌体, 但进行更大 DNA 片段的敲除、替换和插入会降低 BRED 技术的重组效率, 使筛选耗时费力^[74, 78]。

4.3 CRISPR-Cas反选法: 提高重组噬菌体的筛选效率

重组噬菌体筛选的方式包括正向选择和反向选择, 前者通过引入荧光蛋白等特异性筛选标记提高重组噬菌体的收率, 后者反向消除野生型噬菌体^[69]。提高筛选效率能够缩短噬菌体改造的时间, 然而传统的通用筛选标记 (如抗生素抗性基因) 不适用于重组噬菌体的选择, 这增大了筛选基因编辑噬菌体的难度^[47]。CRISPR-Cas 反选法的出现提高了重组噬菌体筛选效率, 大幅降低了噬菌体改造需要的时间与工作量。

CRISPR-Cas 系统是细菌的一种获得性免疫机制, 当外源 DNA 入侵细菌时, 细菌会将部分 DNA 片段整合到自身的 CRISPR 位点中形成间隔序列^[79]。这些间隔序列转录形成的 crRNA 能够引导 Cas 蛋白识别并切割互补 DNA, 抵御噬菌体等病原体的入侵^[79]。据此, 通过人工设计 sgRNA, 可以引导 Cas 核酸酶靶向噬菌体基因组的特定位置, 切割未突变的噬菌体基因组, 只保留重组后的噬菌体 DNA^[80]。

在此基础上, Kiro 等^[80]将 I-E 型 CRISPR-Cas 系统整合至噬菌体重组工程中, 开发了 CRISPR-Cas 反选法, 通过降解野生型噬菌体的遗传物质提高重组噬菌体在总产物中的比例。另外, Wetzel 等^[78]将 CRISPR-Cas9 与 BRED 技术结合, 开发出 CRISPY-BRED 和 CRISPY-BRIP 系统, 显著提高了 BRED 改造大型噬菌体的筛选效率, 扩大了其编辑范围。

4.4 噬菌体合成

噬菌体的合成包括四个部分: 根据噬菌体的使用目的设计其基因组序列, 通过 PCR 扩增或化学法合成 DNA 片段, 将片段组装成完整的噬菌体基因组, 以及表达蛋白质外壳并装配获得具有侵染能力的完整噬菌体^[47]。在基因组组装过程中, 人工合成的 DNA 片段利用相邻片段两端的重复序列, 通过同源重组彼此连接, 形成完整的基因组^[69]。组装过程可以分为体内组装与体外组装, 体内组装依赖酵母细胞中的重组系统, 而体外组装则是通过额外添加重组酶或细菌提取物, 使 DNA 片段在无细胞条件下完成组装^[64, 81, 82]。噬菌体基因组表达合成蛋白质外壳并与外壳装配合成完整噬菌体的过程称为

噬菌体重新启动 (rebooting)^[69]。该过程也分为在无细胞蛋白表达系统中完成的体外重新启动和在宿主细菌中完成的体内重新启动两大类^[64, 67, 81]。

目前已有一些研究开发出了全过程无细胞合成噬菌体的体系，提高噬菌体改造效率，缩短开发新型噬菌体的时间。例如，Levrier 等^[81]构建了体外基因表达与选择的噬菌体工程 (phage engineering by *in vitro* gene expression and selection, PHEIGES) 体系，将噬菌体合成时间缩短至 1 天。尽管经济成本较高，但是体外组装和无细胞噬菌体重新启动相结合在无细胞噬菌体合成方法脱离了宿主细菌的限制，因此在研发新型噬菌体药物时可以使用丰富的不同种类的噬菌体作为模板，提高新型噬菌体开发速度。

5 总结与展望

随着抗生素耐药性问题的日益严峻，噬菌体疗法作为一种新型抗菌手段受到广泛关注。噬菌体疗法具有高度特异性与低免疫原性的优势，能够精准靶向耐药菌株且避免破坏人体正常菌群。近年来，噬菌体鸡尾酒疗法和噬菌体 - 抗生素联合治疗在多重耐药菌感染的治疗中取得显著成效，为应对耐药性危机提供了新的思路。然而，噬菌体疗法的广泛应用仍面临诸多难题，例如噬菌体的高度特异性限制了病原菌治疗范围，细菌持续进化的免疫系统拮抗噬菌体抗菌效果，温和噬菌体可能促进致病基因在细菌间传播，以及噬菌体生产中可能混入细菌内毒素杂质。为克服这些挑战，研究者们对天然噬菌体进行改造，扩大其宿主范围，提高其对细菌的裂解效率。为了提高噬菌体改造技术的应用范围和效率，他们开发出多种噬菌体基因编辑与合成方法。

另外，由噬菌体疗法衍生的研究也在不断发展，拓展了噬菌体疗法应用的边界。这些衍生研究的主要方向包括噬菌体内溶素应用^[83-85]、局部递送系统^[86-88]、光动力治疗协同作用^[89]和噬菌体纳米包

被^[90-92]等 (见表 2)。这些创新策略通过增强病原体识别特异性、提高制剂稳定性与生物利用度、拓展适用范围等方式，增强噬菌体抗菌效果，拓展其作用范围，提升噬菌体疗法在复杂人体系统中的稳定性和有效性，尤其是在慢性耐药菌感染和细菌生物膜相关感染治疗中展现出一定优势。这些领域为噬菌体疗法的临床应用提供了新的思路，也为抗菌治疗手段多样化和个性化医疗发展奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, 2: 130-3

[2] Chanishvili N. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res*, 2012, 83: 3-40

[3] Nadgir CA, Biswas DA. Antibiotic resistance and its impact on disease management. *Cureus*, 2023, 15: e38251

[4] Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 2015, 79: 1-7

[5] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 2022, 399: 629-55

[6] World Health Organization. 10 global health issues to track in 2021 [N/OL]. (2020-12-24) [2025-06-18]. <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>

[7] Kwon JH, Powderly WG. The post-antibiotic era is here. *Science*, 2021, 373: 471

[8] Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363: fnw002

[9] Pirnay JP, Djebara S, Steurs G, et al. Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study. *Nat Microbiol*, 2024, 9: 1434-53

[10] Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, et al. Phage therapy of mycobacterium infections: compassionate use of phages in 20 patients with drug-resistant mycobacterial disease. *Clin Infect Dis*, 2023, 76: 103-12

[11] Hesse S, Malachowa N, Porter AR, et al. Bacteriophage treatment rescues mice infected with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. *mBio*, 2021, 12: e00034

表2 噬菌体疗法新兴领域研究

研究方向	关键技术方法	应用实例	优势	挑战
噬菌体内溶素应用	抗生素-抗菌肽交联	N-Rephasin® SAL200 I期临床	高特异性；低耐药风险；易工业化	革兰氏阴性菌外膜屏障；多重耐药机制干扰
局部递送系统	水凝胶纳米颗粒包埋	HydroPhage结肠靶向释放	保护噬菌体活性；精准释放	长期释放稳定性不足
光动力治疗结合	噬菌体-聚集诱导发光分子偶联	AIE-PAP近红外荧光成像 活性氧协同杀菌	实时监测；协同效应	共价修饰可能影响噬菌体吸附功能
噬菌体纳米包被	阳离子聚合物静电包被	PEI@P抑制沙门氏菌胞内定植	逆转噬菌体电荷；促进胞内递送	潜在毒性、普适性及靶向性未经验证

- [12] Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*, 2019, 25: 730-3
- [13] Anastassopoulou C, Feros S, Petsimeri A, et al. Phage-based therapy in combination with antibiotics: a promising alternative against multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Pathogens*, 2024, 13: 896
- [14] Chen LK, Kuo SC, Chang KC, et al. Clinical antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* strains with higher susceptibility to environmental phages than antibiotic-sensitive strains. *Sci Rep*, 2017, 7: 6319
- [15] Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol*, 2021, 6: 157-61
- [16] Garnett C. Personal quest resurrects phage therapy in infection fight [N/OL]. (2019-03-22) [2025-06-18]. <https://nihrecord.nih.gov/2019/03/22/personal-quest-resurrects-phage-therapy-infection-fight>
- [17] Strathdee S, Patterson T. The perfect predator: a scientist's race to save her husband from a deadly superbug [M]. New York: Grand Central Publishing, 2019
- [18] Rao S, Betancourt-Garcia M, Kare-Opaneye YO, et al. Critically Ill patient with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infection successfully treated with intravenous and nebulized bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66: e0082421
- [19] Qu J, Zou J, Zhang J, et al. Phage therapy for extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* infection: case report and *in vivo* evaluation of the distribution of phage and the impact on gut microbiome. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1432703
- [20] ClinicalTrials.gov. Phage therapy [EB/OL]. (2025-06-18) [2025-06-18]. <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Phage%20Therapy>
- [21] Fish R, Kutter E, Bryan D, et al. Resolving digital staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage-a case report. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7: 87
- [22] Rodriguez JM, Woodworth BA, Horne B, et al. Case report: successful use of phage therapy in refractory MRSA chronic rhinosinusitis. *Int J Infect Dis*, 2022, 121: 14-6
- [23] Johri AV, Johri P, Hoyle N, et al. Case report: chronic bacterial prostatitis treated with phage therapy after multiple failed antibiotic treatments. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 692614
- [24] Zhvania P, Hoyle NS, Nadareishvili L, et al. Phage therapy in a 16-year-old boy with netherton syndrome. *Front Med (Lausanne)*, 2017, 4: 94
- [25] Van Nieuwenhuysse B, Balcaen M, Chatzis O, et al. Case report: personalized triple phage-antibiotic combination therapy to rescue necrotizing fasciitis caused by Panton-Valentine leukocidin-producing MRSA in a 12-year-old boy. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1354681
- [26] Doub JB, Chan B, Johnson AJ. Salphage: salvage bacteriophage therapy for a chronic *Enterococcus faecalis* prosthetic joint infection. *IDCases*, 2023, 33: e01854
- [27] 朱贝迪, 李娜, 张尧, 等. 噬菌体治疗碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌尿路感染1例. *中华医学杂志*, 2024, 104: 2081-3
- [28] Kuipers S, Ruth MM, Mientjes M, et al. A dutch case report of successful treatment of chronic relapsing urinary tract infection with bacteriophages in a renal transplant patient. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 64: e01281
- [29] Corbellino M, Kieffer N, Kutateladze M, et al. Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom made, lytic bacteriophage preparation. *Clin Infect Dis*, 2020, 70: 1998-2001
- [30] Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Commun*, 2022, 13: 302
- [31] Ferry T, Kolenda C, Batailler C, et al. Case report: arthroscopic "debridement antibiotics and implant retention" with local injection of personalized phage therapy to salvage a relapsing *Pseudomonas aeruginosa* prosthetic knee infection. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 569159
- [32] Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit Care*, 2017, 21: 129
- [33] Blasco L, López-Hernández I, Rodríguez-Fernández M, et al. Case report: analysis of phage therapy failure in a patient with a *Pseudomonas aeruginosa* prosthetic vascular graft infection. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1199657
- [34] Jernigan DA, Hentish RD. Successful treatment of a patient with chronic bronchiectasis using an induced native phage cocktail: a case report. *Cureus*, 2025, 17: e77681
- [35] Racenis K, Rezevska D, Madelane M, et al. Use of phage cocktail BFC 1.10 in combination with ceftazidime-avibactam in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* femur osteomyelitis-a case report. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 851310
- [36] Johri AV, Johri P, Hoyle N, et al. Case report: successful treatment of recurrent *E. coli* infection with bacteriophage therapy for patient suffering from chronic bacterial prostatitis. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1243824
- [37] 中国噬菌体研究联盟, 中国生物工程学会噬菌体技术专业委员会, 中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会. 噬菌体治疗中国专家建议. *中华传染病杂志*, 2023, 41: 631-9
- [38] Duan X, Liu W, Xiao Y, et al. Exploration of the feasibility of clinical application of phage treatment for multidrug-resistant *Serratia marcescens*-induced pulmonary infection. *Emerg Microbes Infect*, 2025, 14: 2451048
- [39] Koskella B, Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses*, 2013, 5: 806-23

- [40] Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*, 2010, 70: 217-48
- [41] Kortright KE, Chan BK, Koff JL, et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe*, 2019, 25: 219-32
- [42] Nilsson AS. Phage therapy--constraints and possibilities. *Ups J Med Sci*, 2014, 119: 192-8
- [43] Bartlett A, Padfield D, Lear L, et al. A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans. *Microbiology (Reading)*, 2022, 168: 001269
- [44] Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 465-78
- [45] Poole K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*, 2012, 20: 227-34
- [46] Adouane M, Kadri N, Benzitoune N, et al. Understanding bacterial diversity, infection dynamics, prevention of antibiotic resistance: an integrated study in an Algerian hospital context. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2024, 43: 2093-105
- [47] Strathdee SA, Hatfull GF, Mutalik VK, et al. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions. *Cell*, 2023, 186: 17-31
- [48] Lin RC, Sacher JC, Ceysens PJ, et al. Phage biobank: present challenges and future perspectives. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 68: 221-30
- [49] Ács N, Gambino M, Brøndsted L. Bacteriophage enumeration and detection methods. *Front Microbiol*, 2020, 11: 594868
- [50] Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 113-9
- [51] Oliveira PH, Touchon M, Rocha EP. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10618-31
- [52] Smith WPJ, Wucher BR, Nadell CD, et al. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21: 519-34
- [53] Chanchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, et al. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6: 417-24
- [54] Nepal R, Houtak G, Wormald PJ, et al. Prophage: a crucial catalyst in infectious disease modulation. *Lancet Microbe*, 2022, 3: e162-3
- [55] Brüssow H, Chanchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68: 560-602
- [56] Saunders JR, Allison H, James CE, et al. Phage-mediated transfer of virulence genes. *J Chem Technol Biotechnol*, 2001, 76: 662-6
- [57] Chen J, Quiles-Puchalt N, Chiang YN, et al. Genome hypermobility by lateral transduction. *Science*, 2018, 362: 207-12
- [58] Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol*, 2001, 9: 481-5
- [59] Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, et al. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*, 2020, 15: 2867-90
- [60] Cafilisch KM, Suh GA, Patel R. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2019, 17: 1011-41
- [61] Uyttendaele S, Chen B, Onsea J, et al. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22: e208-20
- [62] Yang X, Haque A, Matsuzaki S, et al. The efficacy of phage therapy in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis. *Front Microbiol*, 2021, 12: 682255
- [63] Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 760-73
- [64] Ando H, Lemire S, Pires DP, et al. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst*, 2015, 1: 187-96
- [65] Dunne M, Rupf B, Tala M, et al. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins. *Cell Rep*, 2019, 29: 1336-50
- [66] Hagens S, Bläsi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37: 318-23
- [67] Kilcher S, Studer P, Muessner C, et al. Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 567-72
- [68] Park JY, Moon BY, Park JW, et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, 7: 44929
- [69] Mahler M, Costa AR, van Beljouw SPB, et al. Approaches for bacteriophage genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2023, 41: 669-85
- [70] Guttman B. Phage crosses [M]/Maloy S, Hughes K. *Brenner's encyclopedia of genetics* (second edition). San Diego: Academic Press, 2013: 270-1
- [71] Tanji Y, Furukawa C, Na SH, et al. *Escherichia coli* detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage. *J Biotechnol*, 2004, 114: 11-20
- [72] Oppenheim AB, Rattray AJ, Bubunenkov M, et al. *In vivo* recombineering of bacteriophage λ by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 2004, 319: 185-9
- [73] Jensen JD, Parks AR, Adhya S, et al. λ recombineering used to engineer the genome of phage T7. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9: 805
- [74] Marinelli LJ, Piuri M, Swigoňová Z, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*, 2008, 3: e3957
- [75] Pan YJ, Lin TL, Chen CC, et al. Klebsiella phage Φ K64-1

- encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types. *J Virol*, 2017, 91: e02457
- [76] Milho C, Sillankorva S. Implication of a gene deletion on a *Salmonella* Enteritidis phage growth parameters. *Virus Res*, 2022, 308: 198654
- [77] Fehér T, Karcagi I, Blattner FR, et al. Bacteriophage recombineering in the lytic state using the λ Red recombinases. *Microb Biotechnol*, 2012, 5: 466-76
- [78] Wetzel KS, Guerrero-Bustamante CA, Dedrick RM, et al. CRISPY-BRED and CRISPY-BRIP: efficient bacteriophage engineering. *Sci Rep*, 2021, 11: 6796
- [79] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467-77
- [80] Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol*, 2014, 11: 42-4
- [81] Levrier A, Karpathakis I, Nash B, et al. PHEIGES: all-cell-free phage synthesis and selection from engineered genomes. *Nat Commun*, 2024, 15: 2223
- [82] Faber MS, Van Leuven JT, Ederer MM, et al. Saturation mutagenesis genome engineering of infective ϕ x174 bacteriophage *via* unamplified oligo pools and golden gate assembly. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 125-31
- [83] de la Fuente-Nunez C, Torres MD, Mojica FJ, et al. Next-generation precision antimicrobials: towards personalized treatment of infectious diseases. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 95-102
- [84] Jun SY, Jang IJ, Yoon S, et al. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61: e02629
- [85] Hong HW, Kim YD, Jang J, et al. Combination effect of engineered endolysin EC340 with antibiotics. *Front Microbiol*, 2022, 13: 821936
- [86] Yang Y, Du H, Zou G, et al. Encapsulation and delivery of phage as a novel method for gut flora manipulation *in situ*: a review. *J Control Release*, 2023, 353: 634-49
- [87] Lin YH, Dharmaraj T, Chen Q, et al. Optimized dosing and delivery of bacteriophage therapy for wound infections. *bioRxiv*, 2024, <https://doi.org/10.1101/2024.05.07.593005>
- [88] Park J, Hassan MA, Nabawy A, et al. Engineered bacteriophage-polymer nanoassemblies for treatment of wound biofilm infections. *ACS Nano*, 2024, 18: 26928-36
- [89] He X, Yang Y, Guo Y, et al. Phage-guided targeting, discriminative imaging, and synergistic killing of bacteria by AIE bioconjugates. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 3959-69
- [90] Zhou Y, Marar A, Kner P, et al. Charge-directed immobilization of bacteriophage on nanostructured electrode for whole-cell electrochemical biosensors. *Anal Chem*, 2017, 89: 5734-41
- [91] Tseng WC, Fang TY, Chang KW, et al. Effects of enhancers and coating substrates on the transgene expression mediated by branched polyethylenimine. *J Appl Polym Sci*, 2009, 114: 2221-5
- [92] 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: eabq2005