

合成生物活性物质的生物安全风险 和应对策略研究*

宁峻涛¹ 邹诗施² 左锟澜³ 吴宗震³ 李 晶⁴ 徐雁龙⁵ 刘 欢^{3,6**}

(1 国家知识产权局知识产权发展研究中心 北京 100088 2 武汉大学 武汉 430072)

(3 中国科学技术大学 合肥 230026 4 中国疾病预防控制中心 北京 102206)

(5 中国科学院大学 北京 100049 6 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 生物代谢工程以微生物为载体,以生命系统各个阶段形成的代谢产物为天然模板和设计蓝图,采用合成生物技术合成活性物质。这些活性物质中部分有害或具有潜在安全威胁,如毒素和蛋白质复合物、可用于临床治疗也可危害健康的药物分子及其衍生物、国际公约限制使用的化学制剂等,可能对生物安全产生不利影响。通过对采取天然代谢通路与非天然代谢通路生物合成的活性物质、化学合成的活性物质和活性物质递送技术相关的合成生物学安全风险的梳理分析,为促进活性物质的合成生物创新发展和应用提出科学应对策略。

关键词 生物安全 合成生物学 活性物质

中图分类号 Q819

合成生物技术中一般通过载体建模来预测代谢途径和酶催化条件来实现目标活性物质的获取和功能改善,与微生物代谢工程密切关联。活性物质合成广泛应用于工业、农业、环境、医药、国防等领域,根据活性物质合成的对象可分为生物活性物质(如酶类、肽分子、蛋白质复合物)和化学活性物质(如小分子药物、有毒制剂等),根据生物活性物质的获取途径又可分为天然代谢途径和非天然代谢途径/合成代谢。生命系统是一个非常复杂的调控网络,各个阶段形成的代谢产物为合成生物技术提供了天然模板和设计蓝图,在生物代谢工程中指导作为载体的微生物合成活性物质。

活性物质释放和应用的环境复杂,影响条件多样,活性物质递送技术是决定合成生物技术中生物安全性的关键要素。通常生物合成以获取所需活性物质、提

高产量或产率、改造增强活性功能相关的代谢途径、筛选特殊条件下的目标产物等为目标,但产生的活性物质中可能涉及有害或具有潜在安全威胁者,如对人类和动植物具有毒性的蛋白质复合物、可用于临床治疗也可危害健康的药物分子及其衍生物、国际公约限制使用的化学制剂等,将通过活性物质递送技术对种群或环境造成不利影响。新型纳米材料、环境科学、自动化和信息科学等交叉学科的飞速发展,在促进活性物质合成生物学发展和创新产品开发的同时,合成活性物质与先进递送技术融合所带来的潜在生物安全风险也需要予以科学关注和持续跟踪。从微生物代谢和递送技术等角度出发,整体分析活性物质合成的生物安全风险要素和对总体国家安全潜在的威胁因子,对促进活性物质的合成生物创新发展和应用具有实践意义及科学前瞻性。

1 天然代谢通路生物合成活性物质

不同于维持生命活动的初级代谢产物,通过天然代谢通路生物合成的活性物质是在特定条件下产生的次级代谢小分子,产量小但具有重要的生物活性。基于合成生物学的天然产物异源生产,一般通过选择合

收稿日期:2022-09-26 修回日期:2022-11-11

* 国家重点研发计划(2018YFA0902402)、中国科学院“高质量数据池和数据产品服务体系建设”项目(2019WQZX012)、中国疾病预防控制中心“总体国家安全观下病原微生物实验室生物安全史研究”(BB2110240075)资助项目

**通讯作者,电子信箱:liuhuans20@ustc.edu.cn

适的生物合成底盘,迭代设计、构建、测试周期,直到达到预期产率和产量,从而实现目标活性物质的合成。其滥用和错用给天然产物的合成改造增加了不确定生物安全风险^[1]。

随着绿色生物技术的发展,以生物催化转化和利用合成生物学技术创建从头合成目标产物的微生物细胞工厂取代化学合成成为制药工业的趋势。全合成途径以微生物为载体,将存在于不同种类、生理特性生物的关键酶等元件,在人工细胞内组装并以全新机制表达,这种情况经常存在微生物载体与元件兼容性欠佳及所合成活性物质代谢副产物干扰生物正常生理过程的安全风险。生物活性物质调控关系复杂,细胞合成本身具有细胞毒性的生物活性物质,往往需要打破细胞的代谢稳态,通过基因编辑改变其抗原性和毒理学特征,可能使原先的解毒措施失效;同时,载体生物的耐受性随之大幅提升,对多种毒性物质具有抵抗作用的微生物能逃避被杀灭的危险,一旦其产生对生物、环境有害的突变后应对非常困难。

1.1 阿片类药物

阿片类药物的靶标是分布于中枢和外周神经系统的阿片受体,基于微生物的药物或药物前体制造逐渐成为主要合成手段。苄基异丙嗪生物碱(BIA)是阿片类药物的主要活性成分^[2]。大肠杆菌发酵系统可从简单的碳源中产生关键的BIA中间体(S)-网状番荔枝碱^[3]。目前,来自啮齿动物、植物、细菌和酵母的20多种酶在工程酵母中成功表达,酿酒酵母也可从葡萄糖出发生产关键的(S)-网状番荔枝碱^[4]。阿片类药物的全合成途径在提高生物合成效率的同时,也带来未知生物安全风险:(1)天然产物成分不确定性。天然产物是复杂的混合物,通常具有部分不确定的成分和分子构效关系,些许偏离都可能导致生理特性的改变,产生潜在风险。(2)天然产物生物合成逻辑不确定性。天然产物合成步骤或已知基因在给定生物中表达途径改变。(3)生物底盘设计不确定性。为从内源性代谢中隔离反应性生物合成中间体,生物底盘设计需要将特定的途径区分开,由此可能造成代谢负担或毒性,引起生长缺陷^[5]。

1.2 细菌毒素

肉毒杆菌毒素(BoNT)是由梭菌等环境细菌产生的,通过严格保守的链间二硫键连接在一起,具有神经毒性、高度选择性和多种抗原性。神经产毒梭菌在基因组组织、毒素基因聚类及毒素氨基酸序列组成方面

具有广泛的异质性,由此发现了具有不同血清学、遗传和功能特征的肉毒杆菌毒素变体^[6]。BoNT模块化排列和7种血清型提供的自然生化特性,使蛋白质工程改造成为可能:(1)增强毒素的能力。来自混合血清型的肉毒杆菌神经毒素结构域的工程化重排可改变中毒的效率及持续时间。(2)重新定位功能。BoNT的模块化排列可组装功能性肉毒杆菌神经毒素分子,作为转运蛋白、工程化靶向分泌抑制剂,产生新的BoNT衍生应用^[7]。肉毒杆菌毒素氨基酸组成的变化改变抗原性与毒理学特征,使通过免疫学方法监测BoNT的致病性更加困难;加之其可通过空气传播且不易察觉、致死剂量极低且发病和死亡率高,可能造成更严重健康威胁和社会影响。

2 非天然代谢通路生物合成活性物质

细胞内某种代谢产物的合成代谢需要经过由不同的酶系催化的多个高度偶联的生化反应和选择性物质运输,通常利用DNA重组技术对生物细胞内固有的物质、能量代谢和信号转导途径进行重新设计。非天然代谢途径是指自然界不存在的生物分解或合成途径,对理解代谢途径的进化机制、拓展工程菌的代谢能力、构建人工生命体系以及用于生产天然和非天然化学品具有重要意义^[8]。

宿主细胞是代谢途径发挥生物学功能的基础,通过非天然代谢途径引入其他生物体中的(自然)途径或创建新的(非自然)途径等,提升工程菌性能,进而促进目标活性物质生产。以载体微生物合成非天然化合物,意味着非天然基因片段的插入。因为代谢工程本身具有复杂性和未知性,加之基因编辑存在一定的脱靶比例和失败率,使细胞发生有害突变,产生的活性物质与预期不一致,导致难以预料的疾病发生,甚至减少寿命。非天然微生物与野生型同类存在横向基因转移,可导致非天然微生物长期存在于自然环境中而影响原有生态平衡和生物活性物质的代谢与循环,进而影响和破坏物种多样性。非天然代谢途径如商业化扩大生产中生产条件与实验室差异较大,不均一的环境可表现为人工改造的微生物特性不稳定,微生物代谢活性物质产量增大,引起剂量依赖条件下的种群变异等潜在风险。

2.1 磷酸三酯酶——有机磷神经毒剂的解毒剂

有机磷神经毒剂(OPNA)最初是在20世纪30年代合成的,是有史以来发现的毒性最强的化合物之一,

以 S-(2-二异丙基氨基乙基)-甲基硫代磷酸乙酯(VX)的 V 型神经毒剂为代表。OPNA 可迅速灭活乙酰胆碱酯酶,是毒性最强的储备神经毒剂,这些有机磷酸酯与乙酰胆碱结构相近,可以结合乙酰胆碱酯酶且水解非常缓慢。由于化学解毒剂对 OPNA 中毒的保护作用低且具有副作用,目前能够水解 OPNA 的温和、环境友好的催化生物清除剂正在开发中^[9]。理性合成生物学改造已经成功地改善了磷酸三酯酶对毒性更大的对映体的立体化学偏好,系统地提高了对神经毒剂的催化活性。有研究设计了缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)磷酸三酯酶(BdPTE)的工程突变体,其表现出增强的催化活性并在动物模型中证明了解毒作用^[10]。一种融合杂交形式的工程重组人对氧磷酶 1 和细菌有机磷水解酶(GV)有望对抗广泛的有机磷神经毒剂^[11]。酯酶 2(TtEst2)是一种潜在的神经毒剂生物清除剂,人工改造可激发生物清除特性的巨大潜力^[12]。通过枯草芽孢杆菌构建有机磷水解酶重组孢子,虽其环境暴露是否威胁生物安全尚未评估,但增强了有机磷降解酶对各种恶劣条件的抵抗力^[13]。

2.2 1,4-丁二醇——正交性非天然代谢通路

1,4-丁二醇(BDO)是一种重要的有机和精细化工原料,可作为可降解塑料 PBS 和 PBAT 的重要原材料,利用合成生物学技术可以根据天然酶反应和化学逆合成分析方法从头设计构建自然界中不存在的代谢途径合成非天然化学品。在 BDO 非天然代谢通路的生物合成中,人工设计的代谢通路与自然代谢网络正交易受调控^[14]。通过对宿主大肠杆菌代谢的工程改造,以糖为原料可大量生产 BDO,而其新宿主无法厌氧生长^[15]。细胞功能修改对细胞网络状影响和正交性判定,以及非天然代谢通路中底物利用途径和前提调节节点对其网络调控的影响,可能造成未知的生物安全风险。生物合成具有生物毒性化合物,需要提高宿主菌株对目标产物的耐受性,有可能造就超级耐药微生物。从实验室扩大到工厂化生产,培养条件的变化区间大,或可导致新宿主性能不稳定、基因表达不稳定^[15]。

2.3 解脂耶氏酵母——非天然代谢工业菌

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种产油酵母,可利用内源性乙酰辅酶 A/丙二酰辅酶 A/羟甲戊二酰辅酶 A 途径生产复杂油脂化学品、多元醇、萜烯、聚酮化合物,与常规酿酒酵母相比,该酵母具有多种独特的生化和代谢特征,是基因工程和代谢工程改造中所

用宿主菌株,Po1d 系菌株已成为目前外源蛋白生产中最常用的表达宿主之一。解脂耶氏酵母基因敲除和过表达等静态代谢工程手段,通常会给细胞带来负担而影响细胞生长;在大多数非常规酵母中,精确基因组编辑会受到固有低同源重组效率限制。定点基因组整合和敲除依赖于宿主细胞的同源重组修复,由于解脂耶氏酵母独特的 DNA 双链断裂修复路径选择倾向性,与酿酒酵母相比较,其同源重组修复能力较弱。当非同源末端连接途径中负责 DNA 双链断裂修复的 *ku70* 基因缺失时,短同源臂条件下的同源重组会伴有转化效率的降低^[16]。CRISPR-Cas、Cre-lox P 和 Gateway 等基因编辑技术对解脂耶氏酵母基因组实现了快速编辑,多基因同时编辑仍存在效率不高和脱靶等问题,且解脂耶氏酵母介导带有选择标记的随机整合,导致外源基因在整个基因组的未知位点插入^[17]。

综上,非天然代谢通路的生物合成涉及代谢途径的理论设计、代谢途径关键酶元件的挖掘与改造、代谢途径的适配与平衡,以及外源途径与底盘生物的自身代谢匹配^[8]。合成生物改造是基于理性设计原则和严格方法学的精细调整,应关注代谢网络和代谢产物的生物安全因素。

3 化学合成活性物质

生物合成与化学合成相互交融的研究迅猛发展,由于化学合成优在结构的可变性,生物合成与化学合成的融合使物质合成具有更高的效率与更多样的结构,为合成基于天然骨架的新型活性分子提供了思路,化学合成多变性也是活性物质合成过程可能涉及的生物安全问题。

毒性化学试剂在实际工艺中残余超出一定限度、在动物体内蓄积,可造成非遗传毒性致癌或不可逆毒性反应的潜在风险。活性物质的立体选择性在化学反应中难以控制,官能团间的距离、手性中心及取代基空间排列的改变,能强烈地影响活性物质与血浆蛋白结合的转运过程、通过生理性屏障的效率、与肝药酶结合的代谢等过程。冗长合成路线及复杂反应条件增加了反应不可控性,机制不明不良反应形成的副产物或难以与目标产物分离,副产物本身也可属于毒性杂质;且二者在生物体内可能进一步发生配伍反应,出现相互作用或生物拮抗安全风险。生物合成设计的目标产物为提高其合成途径可行性,通常与天然产物有一定差异具有不同的抗原性,与天然产物在生物体内的结合

位点出现不一致或代谢方式改变,毒性作用与蓄积靶器官增加或改变,甚至造成多器官受累,破坏生物体内稳态。

3.1 吡唑并嘧啶——功能化吡唑的化学合成

吡唑与嘧啶环融合形成新的双环系统,有5种不同的结构异构体。吡唑[1,5-a]嘧啶(PP)结构基序是一个稠合、刚性、平面N-杂环系统,对其外围结构修改,目前已开发不同合成途径用于功能支架制备和功能化^[18]。吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物表现出多种生物活性,如抑制磷酸二酯酶-5(PDE5)、调节人类腺苷受体、抑制革兰氏阳性菌生长等,但抗肿瘤增殖活性的潜在分子机制及具体药物效应强度仍不清楚,如对正常组织的抗增殖能力等^[19]。金属催化等化学方法的改进促进了更多新合成路线的产生,这些改进促进了结构的多样性,但也提示催化副产物产生的可能,不同底物选择导致核心中的可调节取代模式,影响随后合成步骤和衍生物产生等。结构改变可能使分子产生更多不为人知的协同或拮抗效应,既可能影响下一步合成反应,也可能在实际应用中产生副作用。吡唑并[1,5-a]嘧啶骨架类似选择性蛋白抑制剂,其N-杂环核心允许在环构建或后续功能化步骤期间在C2、C3、C5、C6和C7位置进行关键修改,可显著改变化合物的生物学特性,如抗肿瘤和酶抑制活性等。

3.2 SI113——前药的化学合成过程

SI113作为一种吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物,能够抑制血清和糖皮质激素调节蛋白激酶1(SGK1)活性,阻碍人癌细胞上皮间质转化并破坏细胞骨架组织。由于其在体外和体内肝细胞癌(HCC)及卵巢癌模型中均具有有效的抗癌活性,因此作为抗癌剂受到了更多关注^[20]。SI113的设计、合成和优化过程对化学合成严谨性和重复性要求严格,并对体外药物代谢动力学特性、血浆稳定性和纤溶酶诱导的母体药物释放方面进行充分评估^[21]。ProSI113-TP对HCC显著的体内抗肿瘤活性,也能增强放疗效果^[22]。合成生物学使得针对所选目标扩展肽配体库成为可能,生物信息学和生物分子工具能够分析与靶受体特异性结合所需的高度保守的基序和最少的蛋白质序列,减少受体特异性蛋白质的复杂性和毒性。不同程度脱靶效应使得药物在人体中剂量水平与效应不一致,非靶向性物理生物损害及剂量过高时可能引起毒性反应。

3.3 神经药物

苄基苯乙胺(NBOMs)是合成化合物,最初源自天

然存在的生物碱美斯卡林。有研究表明苯乙胺不仅作用于血清素受体,同时可激活 μ -阿片受体和大麻素受体1(CB1),并表现出相应的生理作用^[23]。NBOM可导致急性毒性,有时有致命后果,25I-NBOMe、25B-NBOMe和25C-NBOMe被添加到受控物质范畴^[24]。麦角酸二乙酰胺衍生物如1-乙酰-LSD(ALD-52)、1-丙酰-LSD(1P-LSD)、1-丁酰基-LSD(1B-LSD)等会以相对较高的效力诱导小鼠头部抽搐^[25]。麦角酸二乙胺(LSD)是一种典型的血清素5-HT类似物的致幻剂,过量使用或与同类型其他药品同时服用造成人体严重损伤和公共健康威胁^[26]。

4 活性物质递送技术

随着合成生物学发展,新的生物技术方法逐渐在活性物质合成与应用中发挥重要作用,包括微流体技术、气溶胶技术、纳米药物靶向递送系统、3D打印技术、生物信息学等。这些先进生物技术方法既是合成生物学的工具,也是应用广泛的热点,应在递送技术层面评估生物安全性。

在化学合成活性物质过程中,微流体技术提供了纳米级反应平台,存在如非均相反应中抗体等生物分子通过疏水作用吸附在疏水性微通道表面,可引起抗体构相改变导致生物活性受到影响或过敏反应。生物反应过程集成到微型空间内的组织工程和药物递送过程中,微载体、微流控器件和通道设计材料可与反应底物或产物非特异性结合,在纳米微米尺度上的毒性物质渗透入膜细胞内,沿神经细胞突触、血管和淋巴血管扩散,对生命过程本身代谢反应和其自组装过程发生干扰^[27]。在合成过程外,活性物质递送存在生物安全风险,如气溶胶易造成活性物质在空气弥散,气溶胶粒子附着在呼吸道上甚至进入肺部沉积,直接影响人的呼吸危害健康,也增加非给药生物环境暴露风险,造成慢性中毒和耐药性。纳米颗粒被应用于提高药物治疗效果,而作为一种非生物材料自身具有免疫原性引起生物体反应,包括引起凝血或血栓、损伤血液组成成分和功能血液反应,进而导致外源性物质介导的免疫反应以及材料物理和化学性质的改变;部分此类材料难以降解或降解途径未知,可对细胞造成蓄积毒性引起病变。

4.1 微流体

微流体装置作为无细胞基因和蛋白质合成系统成为自下而上生物合成的新装备和技术方法。基于液滴

和囊泡合成人造细胞的微流体技术快速进展,优化人造细胞使其成为多形性、多功能的合成工具^[27]。天然成分和人工成分之间的相互干扰可影响细胞功能使其不同于天然生物系统。微流控芯片通过多个模块的连续组装,控制不稳定中间体的产生,微流体技术作为新兴合成生物学工具系统,控制系统设计是装置安全评估的重要指标^[28]。

4.2 气溶胶

脂质体气溶胶由于缓释受控药物的能力,已成为用于吸入的药物载体,包括抗生素、抗癌药物、基因治疗药物^[29-30]。气溶胶不止向肺内递送活性物质,加压腹腔内气雾化剂疗(PIPAC)是治疗广泛、小体积腹膜转移的一种新方法^[31]。有研究通过合成的 mRNA 向黏膜组织气溶胶递送,引起实验动物体内针对人类免疫缺陷病毒(HIV)的广泛中和抗体持久表达^[32]。气溶胶生物安全主要表现在药物不良反应及环境暴露风险两个方面,即药物本身不良反应与气雾剂输送装置是否靶向紧密相关,包括一般毒性试验、安全性药理试验、特殊安全性试验及特殊毒性试验。气溶胶的弥散性增加了环境暴露风险,如细胞毒药物的致癌风险。

4.3 纳米靶向药物递送系统

4.3.1 有机纳米材料 有机纳米粒子表现为相对较低稳定性,但具有良好生物相容性和药物在其表面或内部空间多种功能化可能性。例如,壳聚糖/聚己内酰胺(PCL-CS)纳米复合物形成自组装的两亲性纳米室,将纳米载体靶向递送至癌细胞系^[33]。有机纳米粒子毒理学表现在具有较高半衰期的持久性 NPs 不易从体内清除而产生不良反应,不同给药方式对药代动力学的影响不同。纳米材料直接与生物表面相互作用,产生导致细胞死亡的自由基,自由基积累会对身体造成伤害。纳米材料可通过与细胞器和大分子相互作用产生遗传毒性与致突变性。新的分析和标准化工具通过表征有机纳米粒子的物理化学特性,制定标准化协议与医学转化安全指南^[34]。

4.3.2 生物纳米材料 生物纳米材料是具有增强的生物相容性和对新型治疗分子适应性的替代生物材料。病毒是具有固有免疫原性和自然优化的传递载体,将病毒重新用于药物传递、肿瘤抗原呈递或癌细胞中的选择性复制是用于癌症治疗的方法^[35]。设计优化溶瘤病毒、病毒样颗粒和病毒模拟纳米颗粒以提高肿瘤治疗安全性和有效性,随着病毒生物纳米材料在医学临床中应用,需警惕病毒载体自身生物安全风险。

细胞外囊泡(EV)是由包括肿瘤细胞在内几乎所有类型细胞大量释放进细胞外环境的小囊泡,外泌体是细胞外囊泡的一种亚细胞衍生物聚合物,已有研究显示一种细胞纳米孔化方法用于生产大量含有治疗性 mRNA 和靶向肽的外泌体作为靶向载体^[36]。外泌体靶向给药方式异质性相对较大,作为一种新药递送候选材料在临床中的安全评估值得关注^[37]。

4.3.3 无机纳米材料 无机纳米材料由于其低毒性、尺寸可控等优势常被用于靶向治疗、药物缓释及热疗等研究。介孔氧化硅纳米颗粒(MSNs)具有大表面积、高孔体积和易于化学功能化的特点,稳定性通常高于有机材料,MSNs 可代谢成硅酸盐物质,生物降解速率可能非常缓慢,未降解物质在体内保留较长时间的生物学效应仍然未知。MSNs 可以通过减少细胞内源性活性氧(ROS),上调抗凋亡分子 Bcl-2 表达并抑制 NF- κ B 活化促进人类恶性黑色素瘤生长^[38]。在复杂生物环境中基于 MSNs 无机纳米材料的生物风险因素,如离子表面活性剂可导致严重细胞毒性^[39]。

5 活性物质相关的合成生物学安全风险应对策略

通过生物和化学合成得到天然与非天然活性物质的过程中,不可避免地存在有害活性物质或潜在安全威胁因子的形成。合成活性物质或多或少与天然产物存在差异,造成其抗原性和毒理学特性的改变,探究其作用机制、代谢途径、毒理作用,并与天然物质相比较,设计针对性应对方案是降低生物安全风险的有效措施。

对微生物非天然代谢通路的合成方式及合成的新物质,需建立和完善试错机制和网络反馈。大部分合成副产物并未彻底分离,生物合成活性物质代谢途径和化学合成反应中存在不确定性,可能产生有害物质或新物质带来未知安全风险,应结合前沿分析检测技术对合成全过程进行监控,将人工改造生物体和化学反应局限在可控范围。生物合成将不同来源天然产物的生物合成基因进行重组,在异源微生物体内构建全新的代谢途径,采取化学合成方案替代生物合成中存在的不同天然来源基因或合成基因间匹配欠佳和生物对异源基因表达产物耐受性问题的步骤;通过微生物代谢途径和生物催化高选择性以应对化学合成立体选择性控制问题,生物与化学交叉全合成可以发挥重要

的互补优势^[40]。新型目标对象递送技术存在的风险需持续跟踪交叉领域,建立科技治理框架和风险评估机制。除对生物体和环境造成生物安全风险,合成活性物质还会被生物恐怖主义利用和技术垄断,应充分考虑应用和风险发生场景,在国家法律法规中设立对风险因子的评估监督机制和限制条款,有利于加强对合成活性物质的科技治理。

5.1 已知生物活性物质

通过分子生物学和生物工程技术,使天然微生物合成目标生物活性物质,如通过基因插入和蛋白质表达等产生毒素,但实现功能的复杂代谢通路通常不明确。在已知代谢通路基因编码的情况下,合成物质的自身特性容易受到影响,如代谢产物的数量、达到有效活性功能的效价和投入使用的效益等,故对目标产物的生物风险控制因技术难度高而不易实现^[41]。自然界中已知生物活性的物质非常少,对其潜在危害应采取相应预防措施;对极不易合成的新型毒素或活性酶物质,参照同类物质毒性和生物特征采取应对措施。大规模应用抗原性和毒理学特性有一定变化的合成生物活性物质,有必要进行针对性免疫和毒理学等研究,深入探究其可能产生的毒害机制并采取应对方案。

5.2 天然和非天然代谢通路微生物

基因工程通常会给生物细胞带来代谢负担而驱使细胞逃避选择压力以恢复生长,以响应细胞环境变化的新型诱导型启动子、响应中间代谢物的生物传感器等动态调控方法,是平衡细胞生长和产物合成的有效举措^[42]。对合成生物实时监控和安全控制,如建议荧光素酶报告基因等高灵敏系统评估基因编辑效果;通过增强底盘微生物对合成生物技术的适应性,如基于CRISPR 干扰策略增强同源重组修复效率^[43]。基于天然代谢通路的微生物载体可被用于合成目标活性物质,生物催化常被应用于非天然代谢途径的药物等生物合成工业领域,合成生物技术发展促使蛋白质设计和生物工程标准元件等成为潜在开发对象^[44]。这些代谢途径的合成条件限制具有生物工程设计挑战性,在非天然微生物环境中,需充分考虑试错机制和网络反馈等影响因素。在已知代谢通路的基础上改造和优化,目标活性物质活性和产量是重点考虑因素,并在此基础上评估活性产物的安全风险和环境毒性潜在危害程度。设计或重构代谢通路来制造目标产物或实现特

殊功能活性,所需认知水平难度极高且存在技术瓶颈,应重点关注最新合成技术前沿成果和交叉学科认知突破,在开展类似实验活动时应符合生物安全操作规范和生命伦理准则。

5.3 化学合成活性物质

化学合成活性物质一直被各国安全机构和国防领域高度关注,如神经类药物、生物调节剂等可被用于临床治疗,也是国家安全和反恐行动中使用的失能剂,在《禁止化学武器》公约中对于如防暴执法中可用有毒化学的豁免条款,在已有的化学合成活性物质品种里,对非国家行为者应重点关注合成原料的获取和技术条件限制等因素^[45-46]。合成新化学活性物质原料和条件的不确定因素较多,更需要拥有专业知识和领域技能的专家和试验条件,在科技治理中如审批管理、职业行为准则及风险因子的评估监督机制是重要的安全因素;在医学和工业等领域开发应用中,应促进科技转化交流和科研合作良性互动反馈机制,生命伦理治理教育与预防性政策也是必要的生物安全措施和策略保障。对研究成果的评估和目标在不同群体中所判定原则不一致,化学合成生物技术在两用技术治理中表现明显,应充分考虑应用场景和生物安全风险,在国家法律法规和国际条约中设立监督范畴和限制条款,保障生命基本权益和全球可持续发展。

5.4 目标对象递送技术

无论是天然代谢途径还是非天然代谢途径,生物活性产物及合成技术的化学活性物质,除毒性和有害程度、应用剂量等影响因素之外,目标对象的递送技术是非常重要的生物安全威胁条件,包括应用伤害范围和目标对象群体适应环境,如递送载体可能涉及的食物或水体、人体接触方式的皮肤或气溶胶、环境生存稳定性和传播致病能力等。自动化和微流体技术还可以与纳米技术结合,高效快速实现递送目标和活性物质设计筛选功效,生物元件和纳米材料通过3D 打印方案提供了产品多元化潜在可能性,与天然已知物质结构功能常规方法难以鉴别^[47]。通过微流体检测技术对合成生物及其产生目标活性物质在不同条件下的稳定性和功能物质变化监测预警。创建正交化合成生物元件,防范人工合成生物与自然生物的遗传信息交换,防止底盘微生物逃逸到自然环境中破坏生态环境^[48]。新型递送技术快速发展和领域交叉深度融合,促使在非传统生物安全领域必须有科学界参与并以专业知识为基础,

在生物安全应对策略中需跟踪交叉领域最新进展和潜在风险因素,在科技创新体系中前瞻性布局科技治理框架和风险评估机制,伴随合成生物技术的不断完善和优化,减少有害活性物质递送风险和潜在攻击威胁。

6 小 结

在通过合成生物技术、新型代谢途径和化学手段合成天然和非天然生物化学活性物质,以及过新技术实现活性物质递送的过程中,有很多潜在的生物安全风险成为在各领域安全风险重要影响因素。合成生物标准元件和改造组装修饰可改变毒性或产量,具有生物安全潜在威胁。在微生物载体设计和代谢路径技术路线中,由于人工合成生物工程的理论技术瓶颈和调控反馈机制的复杂网络条件需求,应重点追踪识别活性物质造成群体危害或环境挑战的领域进展,在科学行为规范中遵循伦理原则和优化完善科技治理框架。

在许多已知代谢途径获得活性物质的设计方案中,具有生物安全风险的活性物质递送技术应用场景较广,因此,在安全监管和防范措施方案中需更加注重规范操作标准程序和审批审查制度建设。以活性物质为目标产物的方案中,存在生物材料和培养生产条件、资源配置等因素限制,以及在生物天然代谢路径产物剂量依赖和培养临界瓶颈尚未突破,实际操作和实施的效益更高且难度更大,进行安全威胁等级和风险评估时应综合技术水平和应用场景形成科学应对预案。

创新代谢途径和设计合成生物模型是具有科技挑战性难题,遵循合成生物学自身学科具备技术会聚特征和交叉学科发展规律,新型前沿科技成果将对现代工业、制造业、食品环境、生物医药等行业和领域产生巨大革新能量,并可能催生递送技术相关领域如纳米材料、自动化设备、微流控技术和大数据建模等非传统方式方法。对国际条约条例中涉及的化学制剂进行合成改造以及其衍生物、类似物,可能对国际社会和在国防反恐中构成安全威胁,在总体国家安全框架体系下,在促进科学发展和技术领域应用的同时,应加强科技界参与国家安全政策研究制订和铸建生物安全科技战略智库。

参考文献

[1] 高磊,于欣水,雷晓光.天然产物生物合成:探索大自然合成

次生代谢产物的奥秘.大学化学,2019,34(12):45-53.

Gao L, Yu X S, Lei X G. Biosynthesis of natural products: exploring the secret of how nature produces the secondary metabolites. University Chemistry, 2019, 34(12): 45-53.

[2] Pyne M E, Kevvai K, Grewal P S, et al. A yeast platform for high-level synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids. Nature Communications, 2020, 11: 3337.

[3] Nakagawa A, Minami H, Kim J S, et al. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. Nature Communications, 2011, 2: 326.

[4] DeLoache W C, Russ Z N, Narcross L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (*S*)-reticuline production in yeast from glucose. Nature Chemical Biology, 2015, 11(7): 465-471.

[5] Jamieson C S, Misa J, Tang Y, et al. Biosynthesis and synthetic biology of psychoactive natural products. Chemical Society Reviews, 2021, 50(12): 6950-7008.

[6] Tehran D A, Pirazzini M. Novel botulinum neurotoxins: exploring underneath the iceberg tip. Toxins, 2018, 10(5): 190.

[7] Masuyer G, Chaddock J A, Foster K A, et al. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2014, 54: 27-51.

[8] 陈振. 基于非天然途径的二元醇绿色生物合成//中国生物工程学会青年工作委员会. 中国生物工程学会第二届青年科技论坛暨首届青年工作委员会学术年会摘要集. 2017: 93.

Chen Z. Green biosynthesis of diols based on unnatural pathways // Youth Working Committee on Chinese Society of Biotechnology. Proceedings of China Society of Biotechnology Young Scientists Forum II. 2017: 93.

[9] Jacquet P, Rémy B, Bross R P T, et al. Enzymatic decontamination of G-type, V-type and novichok nerve agents. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 8152.

[10] Job L, Köhler A, Escher B, et al. A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. Toxicology Letters, 2020, 321: 138-145.

[11] Lee N R, Yun H, Lee C, et al. Engineered recombinant PON1-OPH fusion hybrids: potentially effective catalytic bioscavengers against organophosphorus nerve agent analogs. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(1): 144-153.

[12] Bzdrenga J, Trenet E, Chantegreil F, et al. A thermophilic bacterial esterase for scavenging nerve agents: a kinetic, biophysical and structural study. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(3): 657.

[13] Song T Y, Wang F L, Xiong S S, et al. Surface display of

- organophosphorus-degrading enzymes on the recombinant spore of *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 510(1): 13-19.
- [14] Pandit A V, Srinivasan S, Mahadevan R. Redesigning metabolism based on orthogonality principles. *Nature Communications*, 2017, 8: 15188.
- [15] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(7): 445-452.
- [16] 张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 等. 解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 478-505.
- Zhang J H, Cui Z Y, Qi Q S, et al. The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(2): 478-505.
- [17] Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(3): 187-206.
- [18] Arias-Gómez A, Godoy A, Portilla J. Functional pyrazolo[1, 5-a] pyrimidines: current approaches in synthetic transformations and uses As an antitumor scaffold. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(9): 2708.
- [19] He H Y, Zhao J N, Jia R, et al. Novel pyrazolo[3, 4-d] pyrimidine derivatives as potential antitumor agents: exploratory synthesis, preliminary structure-activity relationships, and *in vitro* biological evaluation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2011, 16(12): 10685-10694.
- [20] Rango E, D'Antona L, Iovenitti G, et al. Si113-prodrugs selectively activated by plasmin against hepatocellular and ovarian carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 223: 113653.
- [21] Radi M, Dreassi E, Brullo C, et al. Design, synthesis, biological activity, and ADME properties of pyrazolo[3, 4-d] pyrimidines active in hypoxic human leukemia cells; a lead optimization study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(8): 2610-2626.
- [22] D'Antona L, Dattilo V, Catalogna G, et al. In preclinical model of ovarian cancer, the SGK1 inhibitor SII13 counteracts the development of paclitaxel resistance and restores drug sensitivity. *Translational Oncology*, 2019, 12(8): 1045-1055.
- [23] Åstrand A, Guerrieri D, Vikingsson S, et al. *In vitro* characterization of new psychoactive substances at the μ -opioid, CB1, 5HT1A, and 5-HT2A receptors: on-target receptor potency and efficacy, and off-target effects. *Forensic Science International*, 2020, 317: 110553.
- [24] Gee P, Schep L J, Jensen B P, et al. Case series: toxicity from 25B-NBOMe: a cluster of N-bomb cases. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa)*, 2016, 54(2): 141-146.
- [25] Poulie C B M, Jensen A A, Halberstadt A L, et al. DARK classics in chemical neuroscience: NBOMes. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, 11(23): 3860-3869.
- [26] Wagmann L, Richter L H J, Kehl T, et al. *In vitro* metabolic fate of nine LSD-based new psychoactive substances and their analytical detectability in different urinary screening procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(19): 4751-4763.
- [27] Ai Y J, Xie R X, Xiong J L, et al. Microfluidics for biosynthesizing: from droplets and vesicles to artificial cells. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2020, 16(9): e1903940.
- [28] Dallinger D, Gutmann B, Kappe C O. The concept of chemical generators: on-site on-demand production of hazardous reagents in continuous flow. *Accounts of Chemical Research*, 2020, 53(7): 1330-1341.
- [29] Rudokas M, Najlah M, Albed Alhnan M, et al. Liposome delivery systems for inhalation: a critical review highlighting formulation issues and anticancer applications. *Medical Principles and Practice*, 2016, 25(Suppl. 2): 60-72.
- [30] Qiu Y S, Man R C H, Liao Q Y, et al. Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide. *Journal of Controlled Release*, 2019, 314: 102-115.
- [31] Willaert W, Sessink P, Ceelen W. Occupational safety of pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC). *Pleura and Peritoneum*, 2017, 2(3): 121-128.
- [32] Lindsay K E, Vanover D, Thoresen M, et al. Aerosol delivery of synthetic mRNA to vaginal mucosa leads to durable expression of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2020, 28(3): 805-819.
- [33] Rezvani M, Mohammadnejad J, Narmani A, et al. Synthesis and *in vitro* study of modified chitosan-polycaprolactam nano complex as delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 1287-1293.
- [34] Gupta R, Chen Y, Xie H. *In vitro* dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2021, 13(6): e1732.
- [35] Scher G, Schnell M J. Rhabdoviruses as vectors for vaccines and

- therapeutics. *Current Opinion in Virology*, 2020, 44: 169-182.
- [36] Rahbarghazi R, Jabbari N, Sani N A, et al. Tumor-derived extracellular vesicles: reliable tools for Cancer diagnosis and clinical applications. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 2019, 17(1): 73.
- [37] Wang J, Chen D, Ho E A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2021, 329: 894-906.
- [38] Huang X L, Zhuang J, Teng X, et al. The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials*, 2010, 31(24): 6142-6153.
- [39] He Q J, Zhang Z W, Gao Y, et al. Intracellular localization and cytotoxicity of spherical mesoporous silica nano- and microparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2009, 5(23): 2722-2729.
- [40] 李晓军, 张万斌, 高栓虎. 复杂天然产物全合成: 化学合成与生物合成结合的策略. *有机化学*, 2018, 38(9): 2185-2198.
- Li X J, Zhang W B, Gao S H. Total synthesis of complex natural products: combination of chemical synthesis and biosynthesis strategies. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2018, 38(9): 2185-2198.
- [41] 沈秀敏, 毛淑梅. 对基因工程技术的辩证分析. *医学与社会*, 2001, 14(6): 35-37.
- Shen X M, Mao S M. The dialectical analysis of genetic engineering technique. *Medicine and Society*, 2001, 14(6): 35-37.
- [42] 王凯峰, 王金鹏, 韦萍, 等. 代谢工程改造解脂耶氏酵母生产脂肪酸及其衍生物. *化工学报*, 2021, 72(1): 351-365.
- Wang K F, Wang J P, Wei P, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce fatty acids and their derivatives. *CIESC Journal*, 2021, 72(1): 351-365.
- [43] Wong L, Engel J, Jin E Q, et al. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering Communications*, 2017, 5: 68-77.
- [44] Lee S K, Chou H, Ham T S, et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(6): 556-563.
- [45] 冯长启, 卢彩虹, 郭红艳, 等. 简述与《禁止化学武器公约》相关的生化融合技术. *国防科技*, 2014, 35(2): 53-55, 52.
- Feng C Q, Lu C H, Guo H Y, et al. Discussion of the technics of convergence between chemistry and biology related to the chemical weapons convention. *National Defense Science & Technology*, 2014, 35(2): 53-55, 52.
- [46] 刘磊, 黄卉. 尼克松政府对生化武器的政策与《禁止生物武器公约》. *史学月刊*, 2014(4): 62-71, 136.
- Liu L, Huang H. The Nixon administration's policy on biological and chemical weapons and the biological weapons convention. *Journal of Historical Science*, 2014(4): 62-71, 136.
- [47] Alshawwa S Z, Kassem A A, Farid R M, et al. Nanocarrier drug delivery systems: characterization, limitations, future perspectives and implementation of artificial intelligence. *Pharmaceutics*, 2022, 14(4): 883.
- [48] 马延和, 江会锋, 娄春波, 等. 合成生物与生物安全. *中国科学院院刊*, 2016, 31(4): 432-438.
- Ma Y H, Jiang H F, Lou C B, et al. Synthetic life and biosecurity. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2016, 31(4): 432-438.

Biosafety Risks and Countermeasures of Active Substance in Synthesis Biology

NING Jun-tao¹ ZOU Shi-shi² ZUO Kun-lan³ WU Zong-zhen³ Li Jing⁴ XU Yan-long⁵ LIU Huan^{3,6}

(1 Intellectual Property Development & Research Center, China National Intellectual Property Administration, Beijing 100088, China)

(2 Wuhan University, Wuhan 430072, China)

(3 School of Humanities and Social Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

(4 Office of Laboratory Management, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

(5 College of Humanities, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(6 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract Active substances are often synthesized by microorganisms as carriers in biological metabolic engineering at all times, and the formation of metabolites in all stages of the life system provides a natural template and design blueprint for the development of synthetic biotechnology. If these metabolites involve harmful active substances or potential safety threats, such as toxins and protein complexes that are toxic to humans, animals and plants, drug molecules and their derivatives that can be used for clinical treatment and can also lead to dysfunction and health hazards, and chemicals that are prohibited or restricted by international conventions, they will have adverse effects on biosafety. Through reviewing and analyzing the safety risks in synthetic biology related to active substances such as natural metabolic pathway biosynthetic active substances, non-natural metabolic pathway biosynthetic active substances, chemosynthetic active substances and active substance delivery technology, this paper puts forward countermeasure strategy for promoting the innovative development and application fields of active substances in synthetic biology.

Key words Biosafety Synthetic biology Active substance

广告索引

北京中源合聚生物科技有限公司(封二),东曹(上海)生物科技有限公司(彩1),镇江东方生物工程设备技术有限责任公司(彩2-3),第二十一届世界制药原料中国展(CPHI China)生物医药科技展(目次对页),安琪酵母股份有限公司(封三),江苏省科海生物工程设备有限公司(封底)。