

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.011

· 综述 ·

白喉毒素及其衍生物在脑胶质瘤靶向治疗中作用的研究进展

Research progress on the role of diphtheria toxin and its derivatives in targeted therapy of glioma

方桢^{1,2}综述;杨峰^{1,2},王欢²审阅(1.上海理工大学 健康科学与工程学院,上海 200093;2.海军军医大学 药理学系,上海 200433)

[摘要] 白喉毒素(DT)及其衍生物可通过受体介导的胞吞转运作用穿越血脑屏障(BBB),并将毒素或药物靶向递送至肿瘤细胞,是有前景的靶向治疗脑胶质瘤的策略之一。目前,用于靶向治疗脑胶质瘤研究的DT衍生物主要有CRM107、DT389-EGF、CRM197、DTAT/DTAT13/DTEGF和DTEGF13。其中,CRM107和DT389-EGF已经进入临床II期试验,其余衍生物尚处于临床前研究阶段。根据现有研究进展,CRM107和CRM197是最有希望在脑胶质瘤治疗中取得突破的两种衍生物,但关键在于降低其毒副作用和提高靶向性。因此,明晰DT及其衍生物在靶向治疗脑胶质瘤的关键作用机制及应用现状,可为促进开发高效低毒的脑胶质瘤治疗药物提供新的思路。

[关键词] 脑胶质瘤;白喉毒素(DT);白喉毒素受体(DTR);血脑屏障(BBB);受体介导的胞吞转运(RMT);靶向治疗
[中图分类号] R739.41;R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)01-0075-06

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在是导致脑部疾病传统药物治疗效果不佳的主要原因之一^[1]。多项研究表明,构成BBB的脑毛细血管内皮细胞(brain capillary endothelial cell, BCEC)上存在多种特异性受体。以白喉毒素(diphtheria toxin, DT)及其衍生物等作为这些受体的配体,构建载药复合物,可通过受体介导的胞吞转运(receptor-mediated transcytosis, RMT)作用穿越BBB,增加药物入脑效率^[2],是目前较成熟的一种脑靶向递送策略之一^[3]。DT是含有溶原性β噬菌体的白喉棒状杆菌产生的细菌毒素,具有较强的细胞毒性^[4]。随着研究的不断深入,以减毒和增加脑部靶向为目的,研究者已构建了多种DT衍生物(即DT的突变体和截断式),主要通过改变DT衍生的易位域或选定的细胞特异性受体^[5]来增加脑部靶向递送药物的有效性。因此,开发基于DT的药物对于脑胶质瘤的治疗具有重要价值。本文主要总结了近年来DT及其衍生物用于靶向治疗脑胶质瘤的研究现状,旨在为脑胶质瘤的靶向治疗提供参考依据。

1 DT及其衍生物穿BBB胞吞转运的作用机制

1.1 DT穿越BBB的作用机制

DT由具有催化结构域(C结构域)的A亚基(N端)和包含易位结构域(T结构域)、受体结构域(R结构域)的B亚基(C端)组成^[6](图1A)。C端的突变可减弱其递送应用中的毒副作用^[7]。R结构域则能与BCEC腔面上的白喉毒素受体(diphtheria toxin receptor, DTR)结合^[8],经DTR介导的RMT途径实现

穿越BBB转运。DTR,也称为肝素结合表皮生长因子膜结合前体(pro-heparin-binding-epidermal growth factor, proHB-EGF),是一种穿膜糖蛋白,在平滑肌细胞、血管内皮细胞、BBB、神经元中均有表达^[9]。DT的R结构域被BCEC腔面的DTR识别,以DT-DTR复合物的形式通过胞内运输经血管穿越BBB入脑。DT-DTR复合物内吞进入BCEC后首先形成内体,接着内体的酸性条件会导致DT的T结构域和细胞膜的构象变化,有助于C结构域从内体转移到细胞质中^[4,10]。DT内化到细胞质后,与之结合的DTR重新转运到BCEC的腔面膜上(图1B)。DTR的独特之处在于其无内源性结合配体,在转运过程不会受到内源性结合配体的竞争抑制,同时还降低了破坏BBB平衡的风险^[11]。此外,在脑胶质瘤等病变条件下,DTR在BBB中的表达大幅度上调^[12],因此DT靶向DTR进行药物递送是脑部靶向给药的有效策略。已有研究^[13]验证了这种途径递送药物的可行性,如SUGIMAN-MARANGOS等^[14]利用含有DTR结合域的DT融合蛋白通过受体内化途径成功地将治疗性酶递送到溶酶体中。DT靶向DTR进行药物递送在脑胶质瘤靶向治疗研究中已经显示出巨大的应用潜力。

1.2 DT衍生物穿越BBB的作用机制

由于DT结构上的R结构域所靶向受体的局限

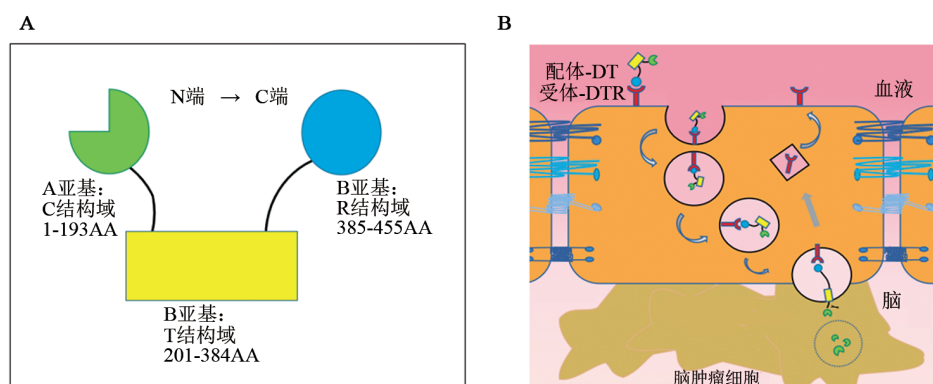
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.82003664);卫勤保障能力创新与生成专项资助(No.20WQ009)

[作者简介] 方桢(1997—),女,硕士生,主要从事白喉毒素受体介导靶向治疗脑胶质瘤的研究,E-mail: fzh731815101@foxmail.com

[通信作者] 王欢,E-mail: wang568855641@163.com

性且C结构域上的有毒部分对正常组织具有较强毒性,因此研究者^[15]构建了多种DT突变体和DT截断式的衍生物以克服靶向受体的局限性及降低其毒性。DT及其衍生物可通过不同受体穿越BBB的RMT作用达到靶向治疗的目的,如人转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)和表皮生长因子受体(EGFR)等。其机制与DTR介导的RMT途径类似,循环中的DT衍生物被细胞膜上的高表达受体所识别,形成受体-配体复合物,然后胞吞形成吞饮小泡,

吞饮小泡携带受体-配体复合物或包含着分离出的配体到达极化的内皮细胞基底并将其释放,发挥药理作用^[16-17]。DT衍生物是对DT的某一片段发生突变或者是DT的不同截断式接洽其他靶向成分获得^[18-19],因此,这些改变使其穿越BBB靶向肿瘤细胞更具高效性的同时,还在一定程度上降低了对正常组织的毒副作用^[20],为脑胶质瘤靶向治疗提供了更好的效果和更多的可能性。



A: DT的基本结构(根据文献[18]改绘); B: DT-DTR复合物通过RMT作用穿越BBB

图1 DT及DTR介导DT穿越BBB入脑的过程示意图

2 DT截断式及突变体在脑胶质瘤靶向治疗中的应用

DT衍生物在脑胶质瘤靶向治疗中的作用是通过优化RMT策略穿越BBB,利用其不同靶向成分(Tf/EGF/CRM197等)靶向脑胶质瘤上所表达的不同受体(TfR/EGFR/DTR等),将所含毒素或所负载的药物内化到肿瘤细胞抑制其生长^[21-23]。这些衍生物的特点相似,都有一定毒性且都可以与BBB上高表达的受体结合实现胞吞转运,不同之处在于其毒性程度以及同受体结合的亲和力。由于DT本身具有较强的毒副作用且靶向受体单一,所以DT衍生物靶向治疗脑胶质瘤的关键在于降低毒副作用以及提高靶向性。就目前研究进展而言,CRM107和DT389-EGF已进入临床II期试验阶段,CRM107和CRM197是脑胶质瘤靶向治疗中毒副作用最小的两种DT衍生物,具有较大的发展前景。

2.1 CRM107

CRM107是DT的一种血清学交叉反应突变体(cross-reacting mutant, CRM),是DT的B片段上两个氨基酸突变的双突变体。CRM107一般以Tf-CRM107的形式作为一种靶向蛋白毒素,是人转铁蛋白(transferrin, Tf)和具有点突变的DT(CRM107)的结合物^[24]。研究结果^[25]表明,Tf-CRM107在治疗恶性脑肿瘤(胶质瘤和成神经管细胞瘤)中有显著效果且无

严重的神经或全身毒性。由于DT的转运可不需要DTR,DT的片段B包含所有的膜易位活性,这种活性与毒素B亚基上的受体结合位点不同且可分离。通过连接CRM107和Tf,创建一个受体-配体复合物,可迅速内化到促进毒素转移的环境^[26]。研究^[27]证明,CRM107将毒素的肿瘤特异靶向性提高了10 000倍。YOON等^[28]通过比较野生型Tf-DT、突变型Tf-DT、野生型Tf-CRM107和突变型Tf-CRM107,观察到50%的细胞增殖抑制浓度(IC₅₀)分别为13.4、8.66、36.8和8.20 pmol/L,验证了从野生型Tf转换为突变型Tf的CRM197偶联物大大提高了胶质瘤细胞的靶向特异性。

研究者后续对Tf-CRM107进行了优化,可通过与不同受体的配体缀合以提高它的靶向杀伤效用,同时结合免疫毒素、肿瘤生长因子等再负载药物,通过抑制蛋白质合成作用使免疫毒素有效地杀伤肿瘤细胞。针对Tf-CRM107突变体I/II期临床试验结果表明其在靶向恶性肿瘤,尤其是对胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的效果令人振奋,但目前其临床III期试验因护理标准不足且招募条件受限等多种原因进展有限^[3,20]。

2.2 DT389-EGF

EGFR通常被认为是“原型”受体酪氨酸激酶,是一种典型的穿膜受体,由一个胞外配体结合结构域、

一个疏水穿膜区域、一个胞内受体酪氨酸激酶结构域和一个C端结构域组成,而与胞外结合结构域结合的配体可诱导受体二聚化、内化和受体降解^[21,29]。由于有效内化以及EGFR在许多恶性肿瘤(如胶质瘤)组织中高表达,EGFR被认为是递送细胞毒性化合物的有效靶点。SHAW等^[30]通过将DT的酶促结构域(A片段)和易位结构域(B片段)连接到EGF序列中作为靶向部分构建融合蛋白DT389-EGF(DAB389EGF),所构建的免疫毒素对各种表达EGFR的肿瘤细胞有抑制作用,IC₅₀值低至0.1 pmol/L,这一发现表明,DT389-EGF可能是多表达EGFR实体瘤的潜在治疗剂。

COHEN等^[31]的研究结果表明,通过使用对流增强输送技术将高浓度的DAB389EGF输送到脑肿瘤,这避免了许多药物的药理、毒理学限制。LIU等^[32]研究了DAB389EGF治疗GBM效果,经对14种人胶质瘤细胞的细胞毒性测试,显示EGFR的密度和DAB389EGF敏感性之间具有良好的相关性。LIU等^[33]对DAB389EGF进行优化,在给予最大耐受剂量3 mg/2 d时,可以观察到所有荷瘤动物的肿瘤都有减小,1个月后的25%出现复发,且经第二个疗程仍然能有效抑制肿瘤生长。DAB389EGF治疗胶质瘤的临床试验已经进行了I期和II期^[34-35],但对其是否有望最终治疗复发性或难治性EGFR⁺多形性GBM患者至今未见明确报道。

2.3 CRM197

CRM197是通过将DT片段A基因中52位点上的甘氨酸突变为谷氨酸,导致其不能与烟酰胺二核苷酸相连接使得酶失活而失去毒性^[12],但保留了其结合活性。与野生型DT相比,CRM197变化最小且与细胞结合不受三磷酸腺苷影响,其片段A在DT与受体相互作用中也会发挥作用^[36]。

细胞内CRM197可以与HB-EGF及proHB-EGF结合,作为HB-EGF的抑制剂阻断有丝分裂作用^[41],同时可以抑制被HB-EGF影响的几种信号通路,如抑制PI3K/Akt信号转导^[37]。PI3K/Akt信号转导与内皮细胞中的叉头样(Fox)转录因子有关。WANG等^[38]进一步证明了CRM197不仅可以作为一种载体蛋白用于靶向递送药物至大脑,而且还可以通过上调微囊蛋白1、增加胞饮囊泡和脑微血管中紧密连接相关蛋白的重新分布来提高BBB的通透性,从而增加内皮细胞的吞噬作用。HÖBEL等^[39]根据CRM197可与GBM细胞/BBB中高表达的proHB-EGF/DTR结合的机制,通过CRM197偶联修饰过的PEI F25-LMV(低分子量支化聚乙烯亚胺),构建了CRM197-PEG-PEI/siRNA载药复合物用以靶向GBM、CRM197-PEG-

PEI/siRNA复合物和PEG-PEI/siRNA复合物处理小鼠,治疗结果显示,22 d后CRM197-PEG-PEI/siRNA复合物治疗的小鼠肿瘤体积缩减为对照组的60%~70%,而用PEG-PEI/siRNA复合物处理则无显著抑瘤效果。研究表明,CRM197载体蛋白还可以安全有效地转运辣根过氧化物酶通过BBB^[40],当CRM197与之结合时,其中辣根过氧化物酶可作为模型药物分子发挥作用^[12],有助于提高肿瘤细胞对CRM197载体蛋白的吸收。

迄今为止,对于CRM197的研究聚焦于将CRM197修饰在纳米递送载体上^[41],再与DTR结合进行RMT作用来穿越BBB到达脑靶向部位。亦或是通过调节HB-EGF基因表达,使得CRM197靶向HB-EGF高表达的脑胶质瘤从而实现靶向治疗的效果^[42]。

2.4 DTAT/DTAT13/DTATEGF

结合GBM细胞上的不同靶点特性构建双特异性靶向制剂是大分子药物生物治疗中的常见策略。尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)可在GBM细胞和肿瘤新生血管中过度表达^[43],因此uPAR被认为是胶质瘤生物治疗有希望的新靶点。结合前期IL-13R在部分GBM中过度表达构建DT/IL-13融合蛋白靶向治疗GBM的思路^[44],VALLERA等^[45]构建了基于DT和尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)融合蛋白DTAT,其中融合了DT的390个氨基酸部分(DT390)和uPA的非内化氨基末端片段(amino-terminal fragment, ATF)^[27],结果表明,uPAR可作为DTAT融合蛋白靶向治疗GBM的有效靶标^[45]。DTAT通过uPA的ATF与GBM和新血管内皮细胞上的uPAR结合,由uPAR的转胞吞作用进入胞质并在肿瘤细胞内释放DT以抑制肿瘤生长。为进一步确认DTAT在颅内治疗模型中是否会因为颅内压等各种条件的限制而影响其治疗效果。RUSTAMZADEH及其团队^[46]创建了小鼠颅内肿瘤模型来测试DTAT的作用,比较了DTAT和DT390毒素部分与其他成分合成的免疫毒素(DTIL13、DTIL2等),结果表明,表达uPAR量最多的GBM对DTAT最敏感,其IC₅₀值小于0.1 nmol/L,说明DTAT表现出良好的GBM的抑制作用。

为使DTAT的靶向更具有特异性,TODHUNTER等^[47]将uPA的AT片段添加到DTIL13分子中,使得两种配体成分的位点特异性结合,构建了具有双靶向特异性的融合蛋白DTAT13。实验证明,DTAT13保留了DTAT的抗血管生成作用和抗GBM的功效,并且DTAT13比DTAT和DTIL13具有更少的毒副作用。RUSTAMZADEH等^[48]进行的药代动力学及生物分布研究结果表明,DTAT13兼具DTIL13和DTAT的特

性, DTAT13的毒性低于DTAT且对胶质瘤的特异性选择高于DTAT,有望在临床研究中取得更好的疗效。

鉴于EGFR和uPAR两者均在GBM细胞中高表达, HUANG等^[49]在DTAT的基础上结合EGF(与EGFR结合)构建了双特异性融合蛋白DTATEGF。研究表明,DTATEGF和DTAT对多形性GBM的IC₅₀值分别为<1.00 nmol/L和<0.01 nmol/L,裸鼠移植瘤荧光信号检测显示,两治疗组的肿瘤增长均较对照组显著降低,肿瘤微血管密度也明显低于对照组,显著抑制了裸鼠脑内胶质瘤的生长及其血管生成。目前,3种利用uPAR的多靶向免疫毒素(DTAT、DTAT13和DTATEGF)在GBM治疗的基础研究中均取得了积极的疗效,但仍未见开展临床试验的报道^[19]。

2.5 DTEGF13

为扩大DT/IL-13靶向不表达IL-13R的GBM肿瘤类型,除前述将uPA的ATF结合DT/IL13分子构建DTAT13^[47]以外,还可以通过将EGF融合DTIL13构建DTEGF13。研究结果^[50-51]表明,与每种单特异性细胞毒素相比,DTEGF13的IC₅₀值小于0.001 nmol/L,其毒素活性增加了1 000倍以上,且对肿瘤的靶向特异性更高。在给予小鼠0.5 μg/kg DTEGF13治疗肿瘤时并不产生明显的毒副作用,且小鼠的存活率升高。因此,DTEGF13作为同时识别EGFR和IL-13R的新型联合靶向剂比其他单特异性对应物来说,对GBM更具有治疗优势。

3 存在问题与对策

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的致死性原发肿瘤,传统手术和放疗手段对其治疗效果均较有限。因此,基于脑胶质瘤主动靶向的生物治疗策略引起了研究者更多的关注。其中,受体介导的靶向治疗已经是克服BBB、增强药物入脑同时靶向胶质瘤的成熟策略之一。目前,针对DT/DTR的脑靶向策略可简单地概括为两类:(1)针对DT构建重组免疫毒素(DT衍生物),靶向在脑内过表达的不同受体进行穿BBB转运;(2)通过修饰靶向DTR的不同配体实现穿BBB转运。脑靶向递送药物策略的研究,大多聚焦于通过RMT途径穿越BBB实现药物递送,其中发展最为成熟的受体是TfR和EGFR。而对于DTR,虽早有研究表明其作为载体转运体进行脑靶向递送药物的潜力,但对此的研究报道仍较少。因此,构建DT衍生复合物或小分子物质来特异性靶向DTR治疗脑胶质瘤有较大的发展空间,进一步研究DT/DT衍生物及其受体在脑胶质瘤治疗的效果和机制具有重要的意义。

虽然RMT策略弥补了传统药物治疗的一些不足之处,但由于靶向递送过程仍然存在脱靶效应等。以上DT衍生物的研究虽然在靶向治疗脑胶质瘤基础和临床研究方面有一定突破性,但后期进展仍然有限。因此,为增加其靶向治疗脑胶质瘤的效果,进一步优化脑靶向递送药的研究策略非常必要,比如可利用病毒载体/外泌体等的归巢效应增加靶向的精确性同时降低毒性反应^[52-53]、通过分子医学和纳米生物技术相融合构建金属蛋白酶结合放射药物靶向肿瘤细胞^[54]、通过修饰纳米/脂质体/聚合物胶束等载药复合体以及构建小分子多肽靶向BBB和肿瘤内高表达的不同受体来实现多级靶向脑胶质瘤等均是很有临床治疗前景的研究方向。

[参考文献]

- [1] 石竹砚. 靶向纳米递送体系用于重大脑部疾病治疗的研究[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所), 2021.
- [2] 桑丽红, 王东凯. 跨血脑屏障纳米递药系统的研究进展[J]. 中国药剂学杂志, 2021, 19(2): 41-51. DOI:10.14146/j.cnki.cjp.2021.02.002.
- [3] 翁丹芳, 鲁晟, 葛双敏. Angiopep-2用于脑靶向递药系统的研究进展[J]. 药学进展, 2021, 45(2): 153-160.
- [4] MOUSAVI A, SABOURI A, HASSANZADEH ESKAFI A, *et al.* *In vivo* tumor therapy with novel immunotoxin containing programmed cell death protein-1 and diphtheria toxin[J]. *Monoclonal Antib Immunodiagn Immunother*, 2021, 40(3): 113-117. DOI: 10.1089/mab.2020.0043.
- [5] ZHAO S, KARP J M, JOSHI N. Toxin-mediated siRNA delivery[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(8): 511-513. DOI: 10.1016/j.tips.2020.06.006.
- [6] ALKHARABSHEH O, FRANKEL A E. Clinical activity and tolerability of SL-401 (tagraxofusp): recombinant diphtheria toxin and interleukin-3 in hematologic malignancies[J]. *Biomedicines*, 2019, 7(1): 6. DOI:10.3390/biomedicines7010006.
- [7] ARNOLD A E, SMITH L J, BEILHARTZ G L, *et al.* Attenuated diphtheria toxin mediates siRNA delivery[J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(18): eaaz4848[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7195190/>. DOI:10.1126/sciadv.aaz4848.
- [8] WENZEL E V, BOSNAK M, TIERNEY R, *et al.* Human antibodies neutralizing diphtheria toxin *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 571[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6969050/>. DOI:10.1038/s41598-019-57103-5.
- [9] STANIMIROVIC D B, SANDHU J K, COSTAIN W J. Emerging technologies for delivery of biotherapeutics and gene therapy across the blood-brain barrier[J]. *BioDrugs*, 2018, 32(6): 547-559. DOI: 10.1007/s40259-018-0309-y.
- [10] KHIREHGESH M R, SHARIFI J, SAFARI F, *et al.* Immunotoxins and nanobody-based immunotoxins: review and update[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(8): 848-862. DOI:10.1080/1061186X.2021.1894435.
- [11] ANTHONY D P, HEGDE M, SHETTY S S, *et al.* Targeting receptor-ligand chemistry for drug delivery across blood-brain barrier in brain diseases[J/OL]. *Life Sci*, 2021, 274: 119326[2022-07-12]. <https://>

- pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33711385/. DOI:10.1016/j.lfs.2021.119326.
- [12] 蔺扬. 人脑胶质瘤白喉毒素受体表达水平与其病理级别相关性的探讨[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
- [13] TIAN S H, LIU Y, APPLETON E, *et al.* Targeted intracellular delivery of Cas13 and Cas9 nucleases using bacterial toxin-based platforms[J/OL]. *Cell Rep*, 2022, 38(10): 110476[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8958846/>. DOI:10.1016/j.celrep.2022.110476.
- [14] SUGIMAN-MARANGOS S N, BEILHARTZ G L, ZHAO X C, *et al.* Exploiting the diphtheria toxin internalization receptor enhances delivery of proteins to lysosomes for enzyme replacement therapy [J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(50): eabb0385[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7732195/>. DOI:10.1126/sciadv.abb0385.
- [15] TIAN S H, LIU Y, APPLETON E, *et al.* Targeted intracellular delivery of Cas13 and Cas9 nucleases using bacterial toxin-based platforms[J/OL]. *Cell Rep*, 2022, 38(10): 110476[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8958846/>. DOI:10.1016/j.celrep.2022.110476.
- [16] TERSTAPPEN G C, MEYER A H, BELL R D, *et al.* Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 362-383. DOI:10.1038/s41573-021-00139-y.
- [17] AZARMI M, MALEKI H, NIKKAM N, *et al.* Transcellular brain drug delivery: a review on recent advancements[J/OL]. *Int J Pharm*, 2020, 586: 119582[2022-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32599130/>. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119582.
- [18] SHAFIEE F, AUCOIN M G, JAHANIAN-NAJAFABADI A. Targeted diphtheria toxin-based therapy: a review article[J/OL]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2340[2022-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31681205/>. DOI:10.3389/fmicb.2019.02340.
- [19] ANTIGNANI A, HO E C H, BILOTTA M T, *et al.* Targeting receptors on cancer cells with protein toxins[J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): E1331[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563326/>. DOI:10.3390/biom10091331.
- [20] KREITMAN R J, PASTAN I. Immunotoxins: from design to clinical application[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1696. DOI:10.3390/biom11111696.
- [21] 韦笑, 陈仿军, 辛恺, 等. 免疫毒素新进展: 肿瘤靶向治疗与免疫治疗的结合[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(7): 643-648. DOI:10.3969/j.issn.1009-0460.2019.07.016.
- [22] 钱雯川, 王凡. PD-1/PD-L1 免疫治疗在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2020, 27(3): 381-382. DOI:10.13455/j.cnki.cjcor.2020.03.33.
- [23] CONTET A, CAUSSANEL V, BECK A, *et al.* Immunotoxins and immunocytokines[J]. *Med Sci (Paris)*, 2019, 35(12): 1054-1061. DOI:10.1051/medsci/2019205.
- [24] LASKE D W, ILERCIL O, AKBASAK A, *et al.* Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice[J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(3): 520-526. DOI:10.3171/jns.1994.80.3.0520.
- [25] WEAVER M, LASKE D W. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas[J]. *J Neurooncol*, 2003, 65(1): 3-13. DOI:10.1023/a:1026246500788.
- [26] RAINOV N G, SÖLING A. Clinical studies with targeted toxins in malignant glioma[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2006, 1(2): 119-131. DOI:10.2174/157488706776876454.
- [27] LI Y M, VALLERA D A, HALL W A. Diphtheria toxin-based targeted toxin therapy for brain tumors[J]. *J Neurooncol*, 2013, 114(2): 155-164. DOI:10.1007/s11060-013-1157-8.
- [28] YOON D J, CHEN K Y, LOPES A M, *et al.* Mathematical modeling of mutant transferrin-CRM107 molecular conjugates for cancer therapy[J/OL]. *J Theor Biol*, 2017, 416: 88-98[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310938/>. DOI:10.1016/j.jtbi.2017.01.008.
- [29] SABBAH D A, HAJJO R, SWEIDAN K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10): 815-834. DOI:10.2174/1568026620666200303123102.
- [30] SHAW J P, AKIYOSHI D E, ARRIGO D A, *et al.* Cytotoxic properties of DAB486EGF and DAB389EGF, epidermal growth factor (EGF) receptor-targeted fusion toxins[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(31): 21118-21124.
- [31] COHEN K A, LIU T F, BISSONETTE R, *et al.* DAB389EGF fusion protein therapy of refractory glioblastoma multiforme[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, 4(1): 39-49. DOI:10.2174/1389201033378039.
- [32] LIU T F, COHEN K A, RAMAGE J G, *et al.* A diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein is cytotoxic to human glioblastoma multiforme cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(8): 1834-1837.
- [33] LIU T F, HALL P D, COHEN K A, *et al.* Interstitial diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein therapy produces regressions of subcutaneous human glioblastoma multiforme tumors in athymic nude mice[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 329-334.
- [34] MURPHY J R, VANDERSPEK J C. Targeting diphtheria toxin to growth factor receptors[J]. *Semin Cancer Biol*, 1995, 6(5): 259-267. DOI:10.1006/scbi.1995.0034.
- [35] AKBARI B, FARAJNIA S, AHDI KHOSROSHAHI S, *et al.* Immunotoxins in cancer therapy: review and update[J]. *Int Rev Immunol*, 2017, 36(4): 207-219. DOI:10.1080/08830185.2017.1284211.
- [36] BIGIO M, ROSSI R, NUCCI D, *et al.* Conformational changes in diphtheria toxoids. Analysis with monoclonal antibodies[J]. *FEBS Lett*, 1987, 218(2): 271-276. DOI:10.1016/0014-5793(87)81060-8.
- [37] WANG P, XUE Y X, SHANG X L, *et al.* Diphtheria toxin mutant CRM197-mediated transcytosis across blood-brain barrier *in vitro* [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(5): 717-725. DOI:10.1007/s10571-010-9496-x.
- [38] WANG P, LIU Y H, SHANG X L, *et al.* CRM197-induced blood-brain barrier permeability increase is mediated by upregulation of caveolin-1 protein[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 43(3): 485-492. DOI:10.1007/s12031-010-9471-5.
- [39] HÖBEL S, APPELDOORN C C, GAILLARD P J, *et al.* Targeted CRM197-PEG-PEI/siRNA complexes for therapeutic RNAi in glioblastoma[J/OL]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2011, 4(12): 1591-1606[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060103/>. DOI:10.3390/ph4121591.
- [40] 韩金津, 李英鹏, 吕邵娃, 等. 功能基修饰的脑靶向递药系统的研究概况[J]. *中国药房*, 2019, 30(11): 1580-1584. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.28.

- [41] KUO Y C, RAJESH R. Targeted delivery of rosmarinic acid across the blood-brain barrier for neuronal rescue using polyacrylamide-chitosan-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface cross-reacting material 197 and apolipoprotein E[J]. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 228-241. DOI:10.1016/j.ijpharm.2017.05.039.
- [42] 梁博, 王新军, 赵杨, 等. HBEGF 部分通过 LIF 上调胶质母细胞瘤细胞中 PD-L1 的表达水平[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(11): 1585-1592. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2021.11.019.
- [43] YAMAMOTO M, SAWAYA R, MOHANAM S, *et al.* Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator in human astrocytomas *in vivo*[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(14): 3656-3661.
- [44] RUSTAMZADEH E, HALL W A, TODHUNTER D A, *et al.* Intracranial therapy of glioblastoma with the fusion protein DTIL13 in immunodeficient mice[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(10): 2594-2601. DOI:10.1002/ijc.21647.
- [45] VALLERA D A, LI C B, JIN N, *et al.* Targeting urokinase-type plasminogen activator receptor on human glioblastoma tumors with diphtheria toxin fusion protein DTAT[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(8): 597-606. DOI:10.1093/jnci/94.8.597.
- [46] RUSTAMZADEH E, HALL W A, TODHUNTER D A, *et al.* Intracranial therapy of glioblastoma with the fusion protein DTAT in immunodeficient mice[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(2): 411-419. DOI: 10.1002/ijc.22278.
- [47] TODHUNTER D A, HALL W A, RUSTAMZADEH E, *et al.* A bispecific immunotoxin (DTAT13) targeting human IL-13 receptor (IL-13R) and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in a mouse xenograft model[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(2): 157-164. DOI:10.1093/protein/gzh023.
- [48] RUSTAMZADEH E, VALLERA D A, TODHUNTER D A, *et al.* Immunotoxin pharmacokinetics: a comparison of the anti-glioblastoma bi-specific fusion protein (DTAT13) to DTAT and DTIL13[J]. *J Neurooncol*, 2006, 77(3): 257-266. DOI: 10.1007/s11060-005-9051-7.
- [49] HUANG J, YUAN D, LIU D Y, *et al.* Efficacy of antiangiogenic targeted immunotoxin DTAT and DTATEGF against glioblastoma multiforme[J]. *J Central South Univ Med Sci*, 2014, 39(1): 1-5. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.01.001.
- [50] STISH B J, OH S, VALLERA D A. Anti-glioblastoma effect of a recombinant bispecific cytotoxin cotargeting human IL-13 and EGF receptors in a mouse xenograft model[J]. *J Neurooncol*, 2008, 87(1): 51-61. DOI:10.1007/s11060-007-9499-8.
- [51] OH S, OHLFEST J R, TODHUNTER D A, *et al.* Intracranial elimination of human glioblastoma brain tumors in nude rats using the bispecific ligand-directed toxin, DTEGF13 and convection enhanced delivery[J]. *J Neurooncol*, 2009, 95(3): 331-342. DOI: 10.1007/s11060-009-9932-2.
- [52] PANCHOLI S, TRIPATHI A, BHAN A, *et al.* Emerging concepts on the role of extracellular vesicles and its cargo contents in glioblastoma-microglial crosstalk[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(5): 2822-2837. DOI:10.1007/s12035-022-02752-3.
- [53] 孙宇恒, 黄静怡, 虞淦军. 间充质干细胞来源的外泌体: 肿瘤治疗的双刃剑[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(10): 937-943. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.010.
- [54] SINGH S, DRUDE N, BLANK L, *et al.* Protease responsive nanogels for transcytosis across the blood-brain barrier and intracellular delivery of radiopharmaceuticals to brain tumor cells[J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(20): e2100812[2022-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34490744/>. DOI:10.1002/adhm.202100812.

[收稿日期] 2022-07-13

[修回日期] 2022-11-07

[本文编辑] 党瑞山