

以红细胞为载体的治疗性酶递送系统

郑梦园, 荣若男, 邱明丰*, 苏靖*

上海交通大学 药学院, 上海 200240

【摘要】 治疗性酶是一类具有药效的酶,随着生物技术的发展被广泛应用于疾病的治疗中。酶对底物具有很高的亲和力和特异性,而且能催化多种目标分子转化为所需产物,这2种特性使得酶可作为一种特殊药物进行治疗性生物化学反应。然而,治疗性酶的代谢和临床疗效往往受到多种因素的限制,如存在体内稳定性和免疫原性较差、过敏反应以及药物诱导的抗体灭活等缺点。近年来,新载体和新技术在优化治疗性酶方面取得了一定进展,特别是红细胞负载治疗性酶已被广泛研究。本文综述了红细胞负载的酶在不同疾病治疗过程中的相关临床前/临床研究,期望为红细胞负载治疗性酶的进一步转化应用提供一定参考。

【关键词】 红细胞载体;治疗性酶;药物输送;临床前研究;临床研究

【中图分类号】 Q814.9;R943

【文献标识码】 B

【文章编号】 1672-3384(2021)08-0048-08

Doi: 10.3969/j.issn.1672-3384.2021.08.010

Delivery system of erythrocytes as carriers of therapeutic enzymes

ZHENG Meng-yuan, RONG Ruo-nan, QIU Ming-feng*, SU Jing*

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

治疗性酶是一种生物催化药物,与传统合成药物相比更易被机体吸收,且疗效确切、不良反应小,对遗传性酶缺乏症、急性中毒、癌症和心血管疾病等均有治疗作用。治疗性酶可以通过天然来源提取或重组DNA技术生产^[1-3],例如来自大肠杆菌的天冬酰胺酶(商品名:Elspar)。同时也可对天然酶进行化学修饰(如聚乙二醇化),以实现提高稳定性、降低免疫原性,以及将酶定向到适合的细胞室等多种目的^[4]。目前,治疗性酶的临床疗效仍然有限,其原因主要包括:①在分子水平上,该类分子易受到自身三维结构及亲水/疏水性的限制,导致其在体内的扩散较慢;②治疗性酶较大的分子量使其不易穿透细胞膜,且易被水解而丧失活性;③存在稳定性差、半衰期短、过敏反应和免疫原性等缺点^[5]。

红细胞载体作为一种克服治疗性酶应用限制和提高治疗效果的有效策略,目前已得到广泛研究。红细胞是哺乳动物体内最大的血细胞群,血液中红细胞

的寿命为100~120 d,之后由脾脏清除,其主要功能是将氧气转移到细胞和身体组织^[6-7]。成熟的红细胞无细胞核和大多数细胞器,其双凹形状提供了良好的弹性,允许红细胞变形并通过狭窄的毛细血管^[8]。目前,红细胞载药方式主要包括2类:①将药物负载到细胞内;②偶联在细胞表面^[9-10]。

负载酶红细胞是由Ihler等^[11]首先提出,自1973年以来一直作为循环系统中输送治疗性蛋白质的生物反应器。当前研究人员已开发出了不同的治疗技术,均基于红细胞膜形状的可逆变化和膜上毛孔的瞬间开放这一特性^[12-13]。重新密封的红细胞具有生物相容性,在人体内具有19~29 d的正常循环半衰期。因此,通过有效避免蛋白酶、抗酶抗体和肾脏清除等途径的血浆清除以及最小化免疫反应,有望延长负载酶的半衰期和降低免疫原性。本文综述了红细胞负载酶在不同疾病治疗过程中的相关临床前/临床研究及应用,期望为红细胞负载治疗性酶的进一步转化应

*通信作者:邱明丰, E-mail:mfqiu@sjtu.edu.cn; 苏靖, E-mail:jingsu@sjtu.edu.cn

用提供一定参考。

1 红细胞负载酶策略

1.1 作为生物反应器

该方法将红细胞作为循环生物反应器,将酶负载到红细胞内。目前主要的负载方法包括低渗预膨胀法、低渗透析法、高渗法、电穿孔法、穿膜肽介导法、渗透脉冲法和化学物质诱导内吞法等。就效率和获得的细胞载体性质而言,低渗法最适合于将酶负载入红细胞^[14-15]。目前较为成熟的低渗载药技术包括低渗预膨胀法和低渗透析法。低渗预膨胀法(图1a)基于红细胞的渗透特性原理,将红细胞置于梯度低渗溶液中使其达到溶血临界点,细胞膜上出现孔道^[16-17],细胞外物质经由孔道进入红细胞内,药物负载入红细胞后恢复双凹形状^[18-20]。低渗透析法(图1b)的原理与前者相似,不同之处在于红细胞与调节渗透压的溶液以半透膜分隔开^[21-22]。这一策略与先天性酶缺乏症的治疗、暴露于有毒化学物质后的解毒以及营养缺乏性肿瘤的治疗有关^[23-24]。

1.2 治疗性酶偶联到红细胞表面

单个红细胞膜表面积约为 $160\ \mu\text{m}^2$,可作为良好的载药平台^[25]。通过生物素-亲和素偶联技术^[26]、红

细胞搭便车技术(red blood cell-hitchhiking, RH)^[27]以及静电相互作用等方法可将治疗性酶偶联于红细胞的表面进行递送^[28]。其中,RH技术是将药物纳米颗粒吸附到红细胞上,该药物递送系统的器官靶向能力显著优于目前常用的亲和配体方式^[29]。Lorentz等^[30]的最近一项研究把大肠杆菌 *L*-天冬酰胺酶表面负载到红细胞载体上,结果表明酶与红细胞结合可使抗体滴度降低 1000 倍以上,并使酶类药物的药效学效应延长了约 10 倍。这项研究表明,红细胞的酶传递比简单的活性酶传递更有优势,同时免疫原性的降低使表面负载方法具有更显著的治疗效果(图1c)。

1.3 基因工程化红细胞表达治疗性酶

最近,Rubius Therapeutic 宣布其将开发的产品基于苯丙氨酸解氨酶(phenylalaninammonio-lyase, PAL)表达红细胞(RTX-134)^[31]。该技术通过包含编码目标酶构建体的慢病毒载体或基因盒对 CD_{34}^+ 细胞进行基因工程改造,以便在细胞内表达 PAL,然后将这些细胞暴露在生物反应器中的培养基中,以促进进一步的扩张和分化,直到细胞核被排出,从而产生成熟的网织红细胞,供有需要的患者使用(图2)。这一方法在血浆代谢物的新陈代谢和单核巨噬细胞系统的靶向方面均有潜在的应用^[32]。

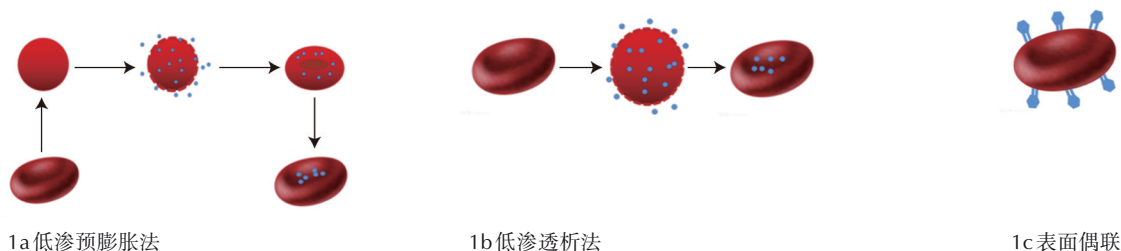
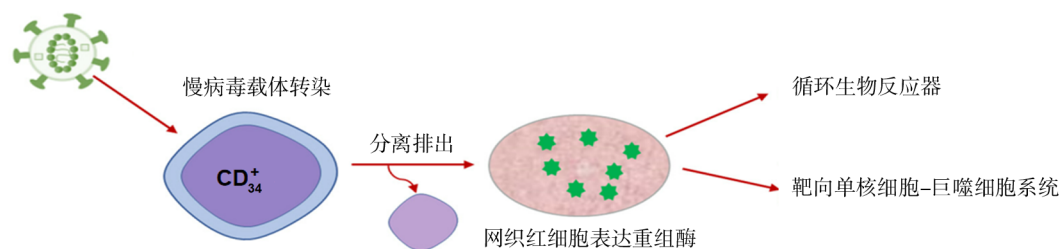


图1 红细胞负载酶策略示意图



注:本图改编自 Khanualkar 等^[32]

图2 基因工程化红细胞表达治疗性酶示意图

2 临床前/临床研究

红细胞负载治疗性酶递送系统的应用可分为4个主要的研究领域:溶栓、外源性化学解毒、代谢性疾病和抗肿瘤治疗。本文主要针对目前研究较多的疾病及其临床前/临床研究进行综述与讨论(表1)。

表1 红细胞负载治疗性酶递送系统的临床前研究

临床前研究模型	治疗性酶	靶标
酒精中毒小鼠 ^[33-36]	醇脱氢酶/醛脱氢酶	乙醇
	乙醛脱氢酶	
	酒精氧化酶	甲醇
	甲酸脱氢酶	
血栓小鼠/大鼠 ^[6]	组织型纤溶酶原激活剂	纤溶酶原
高氨血症小鼠 ^[37-39]	L-谷氨酸脱氢酶	血氨
	谷氨酸脱氢酶/丙氨酸转氨酶	
	谷氨酰胺合成酶	
线粒体神经胃肠脑肌病小鼠/狗 ^[40]	胸苷磷酸化酶	胸腺嘧啶核苷 2'-脱氧尿嘧啶核苷
苯丙酮尿症小鼠 ^[41-42]	苯丙氨酸解氨酶	苯基丙氨酸
	苯丙氨酸羟化酶	
癌症小鼠/狗 ^[43-45]	蛋氨酸γ-裂解酶	甲硫氨酸
	精氨酸脱亚胺酶	精氨酸
	天冬酰胺酶	天冬酰胺

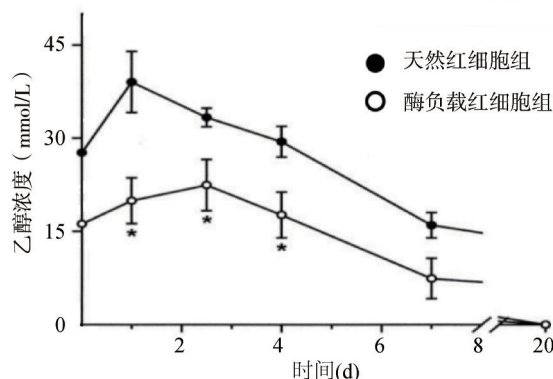
2.1 溶栓治疗

Flynn等^[46]报道了米曲霉 Brinase 负载在兔红细胞中,在体外能够溶解凝结的血液。纤溶剂与红细胞载体表面的偶联被认为是一种比包埋更好的选择^[47]。Murciano等^[6]将与红细胞结合的抗凝血药组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)进行静脉注射,结果表明与红细胞结合的tPA纤溶活性在循环中持续时间至少为游离tPA的10倍。在小鼠和大鼠的脑血管血栓栓塞和缺血模型上,也检验了这种方法在预防脑血管血栓形成中的效果,因此红细胞结合的tPA是一种有效的血栓预防方法^[48]。除此之外,最近一些研究将红细胞载体作为诊断治疗热力学纳米平台系统。该系统由来自红细胞的囊泡组成,囊泡包裹了近红外荧光团,被称为近红外红细胞衍生换能器(near-infrared erythrocyte-derived transduc-

ers, NETS),其具有近红外成像和溶解凝块的双重功能^[49]。

2.2 外源性化学品的解毒

目前已有数种解毒酶利用类似生物反应器的方法被红细胞负载。例如红细胞负载硫氰酸酶和有机硫代磺酸盐用于氰化物解毒^[50]。在小鼠体内的研究表明,负载硫代硫酸钠和硫氰酸酶的红细胞可以迅速将氰化物代谢为毒性较低的硫氰酸盐,并能拮抗致死剂量氰化钾的影响^[51]。除此之外,红细胞载体包裹重组的磷酸三酯酶,可将氧磷水解为毒性较小的4-硝基苯酚和二乙基磷酸酯,在小鼠体内可显著对抗氧磷的致死作用^[52]。而在体内和体外,负载脱氢酶的红细胞被证明能够作为生物反应器改善乙醇和乙醛的新陈代谢,从而用于戒酒和酒精中毒的解救。静脉注射单剂量天然红细胞和电穿孔乙醇脱氢酶+乙醛脱氢酶负载入红细胞后,中毒小鼠体内乙醇降解情况见图3^[53]。



注:本图改编自 Lizano 等^[53]

图3 两组酒精中毒小鼠体内乙醇浓度比较

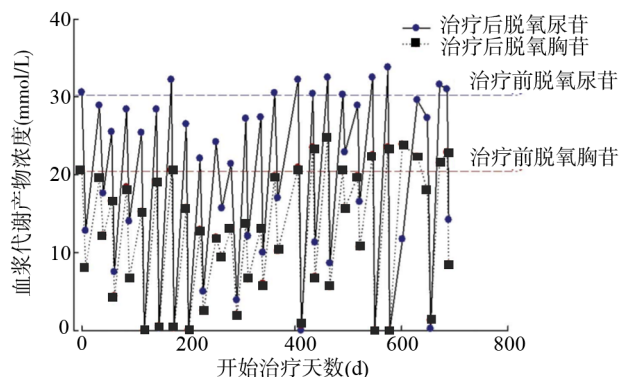
2.3 代谢性疾病的治疗

代谢性疾病即因代谢问题引起的疾病,致病原因包括代谢障碍和代谢旺盛。红细胞作为酶载体应用于治疗遗传性代谢性疾病和其他代谢紊乱引起了广泛关注,下面针对几类典型代谢性疾病的治疗进行概述。

2.3.1 线粒体神经胃肠脑肌病 线粒体神经胃肠脑肌病(mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy disease, MNGIE)是一种胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TYMP)缺乏引起的常染色体

隐性遗传性疾病,由TYMP基因突变引起^[21, 54]。红细胞负载胸苷磷酸化酶(EE-TP)是一种治疗MNGIE的酶替代疗法,其原理基于将重组大肠杆菌胸苷磷酸化酶体外包裹到患者的自体红细胞中^[55-56]。EE-TP被输注到患者体内后通过替换缺乏的EE-TP,分别生成正常产物胸腺嘧啶和尿嘧啶来纠正MNGIE的基础病变^[41]。Bax等^[57-58]报道了1例患者接受为期27个月的EE-TP治疗,结果表明患者尿液中的脱氧胸苷和脱氧尿苷浓度从治疗前的20.5和30.6 mmol/L分别下降到治疗后的8.1和12.6 mmol/L,且临床评估也有显著改善(图4)。随后有研究者进行一项单中心临床试验,有3例MNGIE成年患者接受了递增剂量的EE-TP治疗,结果表明,2例患者具有显著的临床改善,且无严重不良反应发生^[58]。目前EE-TP已获得英国药品和健康产品管理局批准,进行了一项多中心、多剂量、开放标签的Ⅱ期试验,以确定其在MNGIE患者中的安全性、耐受性、药效学和有效性^[27, 58]。

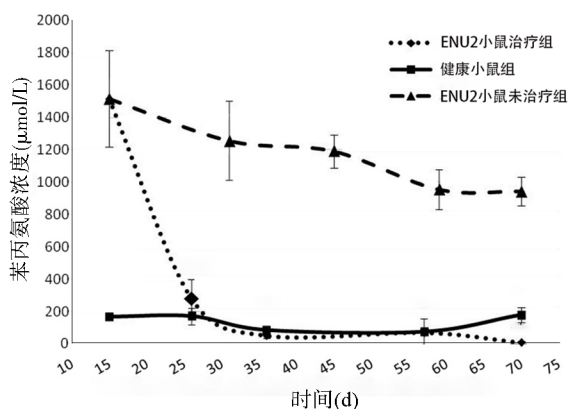
2.3.2 苯丙酮尿症 苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是一种遗传代谢性疾病,由苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)基因突变引起,导致体内缺乏PAH,而PAH可以催化苯丙氨酸转化为酪氨酸,而另一种能够代谢苯丙氨酸的酶为苯丙氨酸解氨酶(*L*-phenylalanine ammonia-lyase, PAL)^[59]。已在小鼠体内进行短期研究证明了红细胞负载酶治疗PKU的有效性。与游离PAH(在血液中存活不到1 h)相比,红细胞负载苯丙氨酸羟化酶(PAH-RBCs)在循



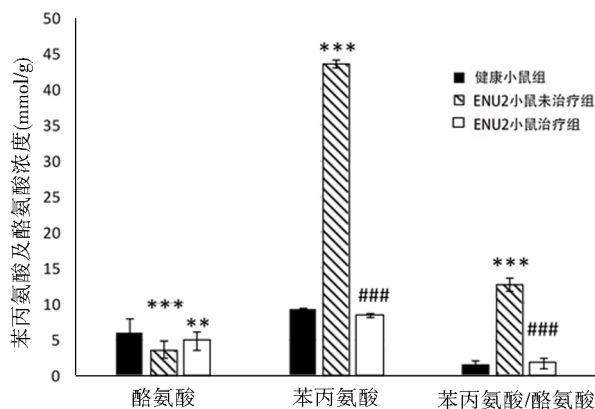
注:本图改编自Bax等^[57]

图4 酶替代治疗前后线粒体神经胃肠脑肌病患者的血浆代谢产物浓度

环中持续存在并至少持续10 d,证实了红细胞负载能够极大地改善治疗性酶的药物代谢动力学。利用红细胞负载重组多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶(rAvPAL-RBCs)治疗PKU小鼠的研究证实了其能够有效降低血液和脑中的苯丙氨酸水平(图5),使血液及脑中苯丙氨酸水平恢复正常,且未观察到不良事件或灭活免疫反应^[60]。一项临床Ⅰb期试验(NCT04110496)^[31]招募了12例血清苯丙氨酸水平 $\geq 600 \mu\text{mol/L}$ 的患者,评估单剂量RTX-134静脉注射后的安全性和耐受性,RTX-134由表达多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶(AvPAL)的异体人红细胞组成。但由于第1例患者的结果无法解释,该试验被终止,并停止红细胞疗法在PKU及其他罕见病治疗中的临床试验,将转向癌症和自身免疫疾病的领域中。



5a 血液中苯丙氨酸浓度



5b 脑中苯丙氨酸及酪氨酸浓度

注:“*”表示与健康小鼠组比较, $P<0.01$;“***”表示与健康小鼠组比较, $P<0.001$;“###”表示与ENU2小鼠未治疗组比较, $P<0.001$;本图改编自Pascucci等^[60]

图5 红细胞负载重组多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶治疗后血液中苯丙氨酸和脑中苯丙氨酸及酪氨酸浓度

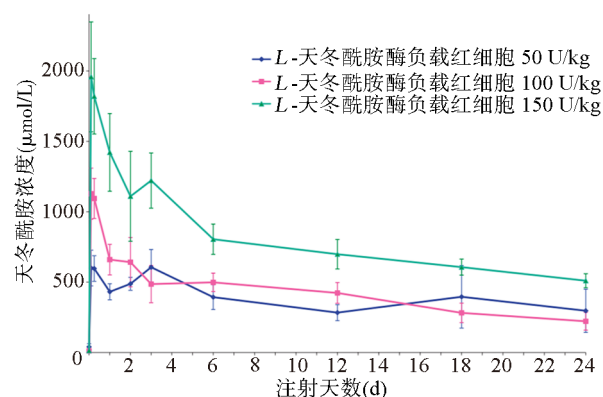
2.3.3 高氨血症 高氨血症(hyperammonemia)是一组以血氨升高为共同特点的新生儿期或儿童期代谢障碍^[61]。氨主要由谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)催化的谷氨酸和谷氨酰胺生物合成来消除。有研究者评估了负载GS的红细胞去除氨的效果,为增加细胞内L-谷氨酸的含量,在负载过程中同时负载L-谷氨酸与GS^[37]。在腹腔注射醋酸铵诱导高氨血症前立即注射负载红细胞(2.5 mmol/kg),在诱导高氨血症后30、60和120 min时血氨水平分别为(0.67±0.26)、(0.59±0.08)和(0.27±0.13)mmol/L,显著低于对照组[分别为(1.02±0.17)、(0.83±0.03)和(0.63±0.05)mmol/L],但其作用时间较短,一段时间后对照组和治疗组血氨水平下降的速度大致相同^[37]。最近,有研究者提出在红细胞中同时负载谷胱甘肽脱氢酶和丙氨酸氨基转移酶,创造了一条 α -酮戊二酸和L-谷氨酸循环产生和消耗的代谢途径。更进一步的关于红细胞负载不同来源GDH的研究正在进行中^[39]。

2.4 癌症治疗

2.4.1 负载天冬酰胺酶 目前临床上主要将红细胞负载酶应用于急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)的治疗^[62]。这一方法是基于肿瘤细胞无法合成足够数量的氨基酸,因此依赖于细胞外来源。通过给予特定的酶可以耗尽血浆氨基酸,使肿瘤细胞“饥饿”,缺乏合成DNA、RNA和蛋白质所需的氨基酸,最终导致细胞死亡^[62]。L-天冬酰胺酶是一种来自于大肠杆菌的酶,是治疗ALL的主要药物。L-天冬酰胺酶将血浆中的L-天冬酰胺转化为L-天冬氨酸和氨。而白血病细胞缺乏天冬酰胺合成酶,导致天冬酰胺缺乏,抑制白血病细胞蛋白质的生物合成,细胞功能发生障碍导致细胞凋亡^[63]。一些重大不良反应的发生往往会导致该酶的过早失活,主要包括免疫过敏反应、凝血障碍、胰腺炎和肝病。目前,已开发出新的天冬酰胺酶制剂和替代来源来解决这一问题,有3种天冬酰胺酶制剂被广泛用于治疗ALL,包括天然大肠杆菌的天冬酰胺酶、共价偶联的聚乙二醇天冬酰胺酶及菊欧文氏菌天冬酰胺酶,但效果并未达到预期^[64]。

为克服目前天冬酰胺酶制剂的局限性,研究者提

出了L-天冬酰胺酶的修饰制剂^[65]。L-天冬酰胺酶负载红细胞(商品名Graspa)是一种新的红细胞负载L-天冬酰胺酶平台,红细胞膜消除L-天冬酰胺酶与抗天冬酰胺酶抗体的相互作用,在降低天冬酰胺浓度的同时,减少了过敏反应的发生^[65]。Domenech等^[65]和Anderson等^[66]最先进行了一项临床I/II期试验(NCT00723346),以首次复发的ALL成人和儿童患者为对象,研究了3种不同剂量(50、100、150 IU/kg)的L-天冬酰胺酶负载红细胞对于患者体内天冬酰胺的消耗(图6)。结果表明其显著延长了其半衰期达40 d。当给药剂量为150 IU/kg时,可以更长时间保持更低的天冬酰胺浓度。此外,与天然酶相比,L-天冬酰胺酶负载红细胞表现出过敏反应的数量和严重程度降低,凝血障碍减少^[65]。目前还有一项将红细胞负载L-天冬酰胺酶用于对聚乙二醇天冬酰胺酶具有超敏反应的ALL患者II期临床研究(NCT03267030)正在招募中。



注:本图改编自 Domenech 等^[65]

图6 注射不同剂量L-天冬酰胺酶负载红细胞后患者体内天冬酰胺平均浓度-时间曲线

2.4.2 负载蛋氨酸 γ -裂解酶 鉴于许多肿瘤细胞表现出外源性氨基酸依赖性,因此限制性氨基酸(amino acid, AA)在癌症干预中发挥重要作用。一项小鼠临床前研究证明,与游离形式相比,恶臭假单胞菌(Erymet)包裹的蛋氨酸 γ -裂解酶具有更强的药物代谢动力学特性,当与吡啶(pyridine, PN)一起给药时,对肿瘤的生长有抑制作用^[67]。在5次累积注射红霉素后,蛋氨酸血浆水平降低了75%,平均绝对肿瘤体积减小了85%。一项平行毒性研究显示,接受恶臭假单胞菌加PN治疗的CD1小鼠中有79%出现中度

不良反应^[43]。而与抗小鼠PD-1抗体联合应用,可显著抑制原位EMT-6同基因乳腺癌小鼠的肿瘤生长。此外,联合治疗的生存时间为35 d,而单独治疗的生存时间为23 d^[2]。

2.4.3 负载精氨酸脱亚胺酶 原核生物精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI)是另一种在恶性肿瘤细胞中影响氨基酸代谢的微生物酶,其将L-精氨酸代谢为瓜氨酸和氨,参与癌症发生的生物合成途径^[68]。与相同剂量的游离酶相比,CD1小鼠注射较高剂量的红细胞负载的ADI(10.4 U/mL)可以在5 d内完全消耗血浆精氨酸,耗竭持续24 h,血浆水平在2.5 d前恢复到基线水平^[44]。从支原体中提纯的ADI在循环中的半衰期较短(大约4 h),且具有较强的免疫原性。目前,聚乙二醇修饰的ADI-PEG20已完成针对晚期肝癌患者的Ⅲ期临床试验(NCT01287585),以及针对无法切除的肝细胞癌(NCT02006030)和黑色素瘤的多项Ⅱ期临床试验(NCT000450372),同时治疗软组织肉瘤的Ⅱ期临床试验正在进行中(NCT03449901)。

3 未来展望

红细胞负载治疗性酶递送系统的优点是通过有效地保护酶不受免疫系统和血浆蛋白酶的影响,避免了与游离酶给药相关的一些关键问题,从而延长了循环半衰期,最大限度地减少了免疫原性反应。但其局限性在于其代谢能力仅限于血管室和单核巨噬细胞系统,这使得酶的底物不能渗透红细胞膜,因此,红细胞负载治疗性酶应用于临床的范围具有一定的局限性^[24]。目前很多学者在研究获得酶表达红细胞的替代方式(例如通过慢病毒转染未成熟的红细胞前体)以及优化酶负载红细胞的控释效果,虽然还未获得许可的红细胞介导酶疗法,但有几种产品正在进行临床前/临床研究,有望在未来几年内有所突破并应用于临床。

【参考文献】

- [1] Silva A C, Costa C P, Almeida H, et al. Hormones, blood products, and therapeutic enzymes[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2020, 171: 115-153.
- [2] Senechal K, Maubant S, Leblanc M, et al. Erymethionase (methionine-γ-lyase encapsulated into red blood cells) potentiates anti-PD-1 therapy in TNBC syngeneic mouse model[J]. Cancer Res, 2019, 79(13): 2258.
- [3] Baruchel A, Bertrand Y, Thomas X, et al. Updated clinical activity of graspa versus native L-asparaginase in combination with coopral regimen in phase 3 randomized trial in patients with relapsed acute lymphoblastic leukemia (NCT01518517) [J]. Blood, 2015, 126(23): 3723.
- [4] Baldo B A. Enzymes approved for human therapy: indications, mechanisms and adverse effects[J]. Biodrugs, 2015, 29(1): 31-55.
- [5] Maximov V, Reukov V, Vertegel A A. Targeted delivery of therapeutic enzymes [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2009, 19(5): 311-320.
- [6] Murciano J C, Medinilla S, Eslin D, et al. Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(8): 891-896.
- [7] Villa C H, Pan D C, Zaitsev S, et al. Delivery of drugs bound to erythrocytes: new avenues for an old intravascular carrier [J]. Ther Deliv, 2015, 6(7): 795-826.
- [8] Villa C H, Anselmo A C, Mitragotri S, et al. Red blood cells: supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 106: 88-103.
- [9] Murciano J C, Muzykantov V R. Coupling of anti-thrombotic agents to red blood cells offers safer and more effective management of thrombosis [J]. Discov Med, 2003, 3(18): 28-29.
- [10] Ji W, Smith P N, Koepsel R R, et al. Erythrocytes as carriers of immunoglobulin-based therapeutics [J]. Acta Biomater, 2020, 101: 422-435.
- [11] Ihler G M, Glew R H, Schnure F W. Enzyme loading of erythrocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973, 70(9): 2663-2666.
- [12] Hoffman J F. On red blood cells, hemolysis and resealed ghosts [J]. Adv Exp Med Biol, 1992, 326: 1-15.
- [13] Hoffman J F. Physiological characteristics of human red blood cell ghosts [J]. J Gen Physiol, 1958, 42(1): 9-28.
- [14] Pierigè F, Serafini S, Rossi L, et al. Cell-based drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 286-295.
- [15] Millán C G, Marinero M L, Castañeda A Z, et al. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers [J]. J Control Release, 2004, 95(1): 27-49.
- [16] Alpar H O, Lewis D A. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes [J]. Biochem Pharmacol, 1985, 34(2): 257-261.
- [17] Magnani M, Rossi L, D'ascenzo M, et al. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1998, 28: 1-6.
- [18] Harisa G I, Badran M M, AlQahtani S A, et al. Pravastatin chitosan nanogels-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for targeting liver cancer [J]. Saudi Pharm J, 2016, 24(1): 74-81.
- [19] Nangare K A, Powar S D, Payghan S A. Nanoerythrocytes: engineered erythrocytes as a novel carrier for the targeted drug delivery [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 10(3): S223-S233.
- [20] Hamidi M, Zarrin A H, Foroozesh M, et al. Preparation and in vitro evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-α 2b [J]. Int J Pharm, 2007, 341(1/2): 125-133.
- [21] Bax B E, Bain M D, Fairbanks L D, et al. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase [J]. Br

- J Haematol, 2000, 109(3):549-554.
- [22] Deloach J, Ihler G. A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 496(1):136-145.
- [23] Way J L, Leung P, Ray L, et al. Erythrocyte encapsulated thio-sulfate sulfurtransferase [J]. *Bibl Haematol*, 1985(51):75-81.
- [24] Bourgeaux V, Lanao J M, Bax B E, et al. Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10:665-676.
- [25] Muzykantov V R. Drug delivery by red blood cells; vascular carriers designed by mother nature [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7(4):403-427.
- [26] Chiarantini L, Droleskey R, Magnani M, et al. In vitro targeting of erythrocytes to cytotoxic T-cells by coupling of Thy-1.2 monoclonal antibody [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 15(2):171-184.
- [27] Anselmo A C, Gupta V, Zern B J, et al. Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells [J]. *Acs Nano*, 2013, 7(12):11129-11137.
- [28] Biagiotti S, Paoletti M F, Fraternali A, et al. Drug delivery by red blood cells [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(8):621-631.
- [29] Brenner J S, Pan D C, Myerson J W, et al. Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2684.
- [30] Lorentz K M, Kontos S, Diaceri G, et al. Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to E. coli asparaginase [J]. *Sci Adv*, 2015, 1(6):e1500112.
- [31] ClinicalTrials. Safety and tolerability of RTX-134 in adults with phenylketonuria [EB/OL]. (2019-10-01)[2021-03-01]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04110496>.
- [32] Khanwalkar U, McLaughlin D, Finnemore E, et al. mRNA/LNP-based engineering of erythroid progenitors to generate allogeneic red cell therapeutics(TM) (RCTs) [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(4):295-295.
- [33] Zhou H, Sealock J M, Sanchez-Roige S, et al. Genome-wide Meta-analysis of problematic alcohol use in 435,563 individuals yields insights into biology and relationships with other traits [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(7):809-818.
- [34] Magnani M, Laguerre M, Rossi L, et al. In vivo accelerated acetaldehyde metabolism using acetaldehyde dehydrogenase-loaded erythrocytes [J]. *Alcohol Alcohol*, 1990, 25(6):627-637.
- [35] Magnani M, Fazi A, Mangani F, et al. Methanol detoxification by enzyme-loaded erythrocytes [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1993, 18(3):217-226.
- [36] Muthuvel A, Rajamani R, Manikandan S, et al. Detoxification of formate by formate dehydrogenase-loaded erythrocytes and carbicarb in folate-deficient methanol-intoxicated rats [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 367(1/2):162-169.
- [37] Kosenko E A, Venediktova N I, Kudryavtsev A A, et al. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification [J]. *Biochem Cell Biol*, 2008, 86(6):469-476.
- [38] Sanz S, Lizano C, Luque J, et al. In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure [J]. *Life Sci*, 1999, 65(26):2781-2789.
- [39] Protasov E S, Borsakova D V, Alexandrovich Y G, et al. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):1455.
- [40] Levene M, Coleman D G, Kilpatrick H C, et al. Preclinical toxicity evaluation of erythrocyte-encapsulated thymidine phosphorylase in balb/c mice and beagle dogs: an enzyme-replacement therapy for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 131(1):311-324.
- [41] Rossi L, Pierigè F, Carducci C, et al. Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pah (enu2) mice [J]. *J Control Release*, 2014, 194:37-44.
- [42] Yew N S, Dufour E, Przybylska M, et al. Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice [J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 109(4):339-344.
- [43] Gay F, Aguera K, Sénéchal K, et al. Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B6 [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6):1437-1452.
- [44] Gay F, Aguera K, Senechal K, et al. Arginine deiminase loaded in erythrocytes: a promising formulation for L-arginine deprivation therapy in cancers [J]. *Cancer Res*, 2016, 76:4812.
- [45] Naqi A, DeLoach J R, Andrews K, et al. Determination of parameters for enzyme therapy using L-asparaginase entrapped in canine erythrocytes [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1988, 10(4):365-372.
- [46] Flynn G, Hackett T J, McHale L, et al. Encapsulation of the thrombolytic enzyme, brinase, in photosensitized erythrocytes: a novel thrombolytic system based on photodynamic activation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1994, 26(2):193-196.
- [47] Muzykantov V R, Sakharov D V, Smirnov M D, et al. Immunotargeting of erythrocyte-bound streptokinase provides local lysis of a fibrin clot [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 884(2):355-362.
- [48] Danielyan K, Ganguly K, Ding S, et al. Cerebrovascular thromboprophylaxis in mice by erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activator [J]. *Circulation*, 2008, 118(14):1442-1449.
- [49] Vankayala R, Corber S R, Mac J T, et al. Erythrocyte-derived nanoparticles as a theranostic agent for near-infrared fluorescence imaging and thrombolysis of blood clots [J]. *Macromol Biosci*, 2018, 18(4):e1700379.
- [50] Petrikovics I, Pei L, McGuinn W D, et al. Encapsulation of rhodanese and organic thiosulfonates by mouse erythrocytes [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1994, 23(1):70-75.
- [51] Cannon E P, Leung P, Hawkins A, et al. Antagonism of cyanide intoxication with murine carrier erythrocytes containing bovine rhodanese and sodium thiosulfate [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1994, 41(3):267-274.
- [52] Pei L, Petrikovics I, Way J L. Antagonism of the lethal effects of paraoxon by carrier erythrocytes containing phosphotriesterase [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1995, 28(2):209-214.
- [53] Lizano C, Pérez M T, Pinilla M. Mouse erythrocytes as carriers for coencapsulated alcohol and aldehyde dehydrogenase obtained by electroporation in vivo survival rate in circulation, organ distribution and ethanol degradation [J]. *Life Sci*, 2001, 68(17):2001-2016.
- [54] Habibzadeh P, Silawi M, Dastsooz H. Clinical and molecular

- characterization of a patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy [J]. BMC Gastroenterol, 2020, 20(1):142.
- [55] Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy [J]. Brain, 2011, 134(Pt 11):3326-3332.
- [56] Martí R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(1):14-18.
- [57] Bax B E, Bain M D, Scarpelli M. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement [J]. Neurology, 2013, 81(14): 1269-1271.
- [58] Bax B E, Levene M, Bain M D, et al. Erythrocyte encapsulated thymidine phosphorylase for the treatment of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: study protocol for a multi-centre, multiple dose, open label trial [J]. J Clin Med, 2019, 8(8):1096.
- [59] Rossi L, Pierigè F, Carducci C, et al. Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pah (enu2) mice [J]. J Control Release, 2014, 194:37-44.
- [60] Pascucci T, Rossi L, Colamartino M, et al. A new therapy prevents intellectual disability in mouse with phenylketonuria [J]. Mol Genet Metab, 2018, 124(1):39-49.
- [61] KIDD J G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum [J]. J Exp Med, 1953, 98(6):565-582.
- [62] Chan W K, Lorenzi P L, Anishkin A, et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells [J]. Blood, 2014, 123(23): 3596-3606.
- [63] Salzer W, Seibel N, Smith M. Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(10):1407-1414.
- [64] Thomas X, Cannas G, Chelghoum Y, et al. Therapeutic alternatives to native L-asparaginase in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia [J]. Bull Cancer, 2010, 97(9): 1105-1117.
- [65] Domenech C, Thomas X, Chabaud S, et al. L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial [J]. Br J Haematol, 2011, 153(1):58-65.
- [66] Anderson B B, Fulford-Jones C E, Child J A, et al. Conversion of vitamin B 6 compounds to active forms in the red blood cell [J]. J Clin Invest, 1971, 50(9):1901-1909.
- [67] Patil M D, Bhaumik J, Babykutty S, et al. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor [J]. Oncogene, 2016, 35(38):4957-4972.

收稿日期:2021-04-10 本文编辑:任洁