

蛋白质药物的胞质递送策略

黄琳 史永慧 吴军军*

(福建师范大学生命科学学院, 福州 350117)

摘要 蛋白质药物为糖尿病、癌症、心脑血管疾病等难以治愈的疾病带来了新的治疗希望, 因为它们能特异性调节细胞内生化过程, 且具有更高的生物相容性和安全性。但是大多数蛋白质药物分子量大且亲水性强, 难以穿过细胞膜, 仅能针对细胞外靶点, 这一特性使可药化的靶点数目大打折扣。此外, 蛋白质药物精细的三级结构和其特殊的生化性质极易受到外界因素的干扰而失去活性, 这些固有局限严重制约了蛋白质药物在疾病治疗方面的应用。因此, 开发理想的递送体系来弥补蛋白质药物的固有局限就变得尤其重要。各类能高效递送蛋白质进入胞质的定制修饰的递送体系被陆续开发出来, 为蛋白质药物的研究与应用带来新的机遇。该文将介绍基于不同材料的蛋白质递送体系, 如脂质递送系统、肽/蛋白质纳米递送系统、聚合物纳米递送系统和无机纳米递送系统在蛋白质药物胞质递送领域的发展近况。

关键词 胞质递送; 蛋白质药物; 细胞穿膜肽; 聚合物; 脂质体; 内体逃逸; 膜融合

Strategies for Delivering Protein Drugs into the Cell Cytosol

HUANG Lin, SHI Yonghui, WU Junjun*

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract Protein drugs offer promising opportunities for treating complex diseases such as diabetes, cancer, and cardiovascular disorders, owing to their ability to selectively modulate intracellular biochemical processes and their superior biocompatibility and safety. However, the clinical utility of most protein drugs is limited by poor cell membrane permeability, because of their large molecular size and high hydrophilicity. This limits their targeting to extracellular sites and reduces the range of druggable targets. Additionally, the complex tertiary structure and unique biochemical properties of protein drugs make them highly vulnerable to external factors that can compromise their activity. These inherent limitations significantly constrain their application in disease treatment. Therefore, the development of efficient delivery systems to overcome these barriers is essential. Recently, several advanced delivery platforms capable of effectively transporting proteins into the cytoplasm have been developed, opening new avenues for both research and clinical applications. This review will introduce the recent developments in protein delivery systems based on different materials, such as those based on liposomes, peptide/protein nanocarriers, polymers, and inorganic, in the field of cytosolic delivery of protein drugs.

Keywords cytosolic delivery; protein drugs; cell penetrating peptide; polymer; liposomes; endosomal escape; membrane fusion

收稿日期: 2024-11-20 接受日期: 2024-12-30

福建省自然科学基金面上项目(批准号: 2023J01506)、福建省中青年骨干教师教育科研项目(批准号: JAT220044)和厦门大学翔安创新实验室/传染病疫苗研发全国重点实验室科技项目(批准号: 2023XAKJ0101011)资助的课题

*通信作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: junwu@fjnu.edu.cn

Received: November 20, 2024

Accepted: December 30, 2024

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2023J01506), the Fujian Provincial Foundation for Education and Scientific Research Projects of Young and Middle-aged Teachers (Grant No.JAT220044), and the State Key Laboratory of Vaccines for Infectious Diseases, Xiang An Biomedicine Laboratory, Xiamen University, China (Grant No.2023XAKJ0101011)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: junwu@fjnu.edu.cn

蛋白质是由多个氨基酸脱水缩合而成的有机大分子,其含量占人体总重量18%~20%,并在细胞信号转导、细胞代谢、基因转录和翻译、细胞分裂和增殖等生命过程中起着非常重要的作用^[1]。蛋白质功能障碍可导致多种疾病,如癌症、免疫类疾病和心脑血管疾病等^[2-3]。值得注意的是,部分致病蛋白具有相对光滑的表面,缺乏疏水口袋,这使得它们难以成为传统的小分子药物的靶标,但蛋白质药物可通过蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interactions, PPIs)能够高度特异性地靶向疾病相关的生物标志物或细胞表面受体,从而达到更高效的治疗效果^[4]。此外,蛋白质药物可以直接转染到靶细胞中发挥功能,或者通过将编码蛋白质药物序列的DNA或RNA转染到靶细胞中翻译后发挥作用,这类药物兼具传统蛋白质药物和基因药物的优点,能够更加快速和安全地发挥治疗效果。

自1982年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)首次批准重组蛋白质药物-重组胰岛素以来,蛋白质药物领域取得了显著的进展^[5]。至今,已有超过130种蛋白质药物被FDA批准,包括抗PD-1(programmed cell death protein-1)抗体(如帕博利珠单抗、纳武单抗)、抗PD-L1(programmed cell death 1 ligand 1)抗体(如度伐利尤单抗、阿替利珠单抗)和抗CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)抗体(如伊匹单抗)等,预计到2025年,全球蛋白质药物市场规模将达到数千亿美元,展现出巨大的市场潜力和前景。但是,目前临床批准的大部分蛋白质药物主要是针对细胞膜表面靶点的^[3,6]。若能找到理想的递送体系来克服蛋白质药物难以跨膜和稳定性差的固有局限,将显著增加可药物化靶标的数目,为人体健康提供直接的帮助,并为那些传统治疗方式难以治愈的疾病带来新的治疗希望。

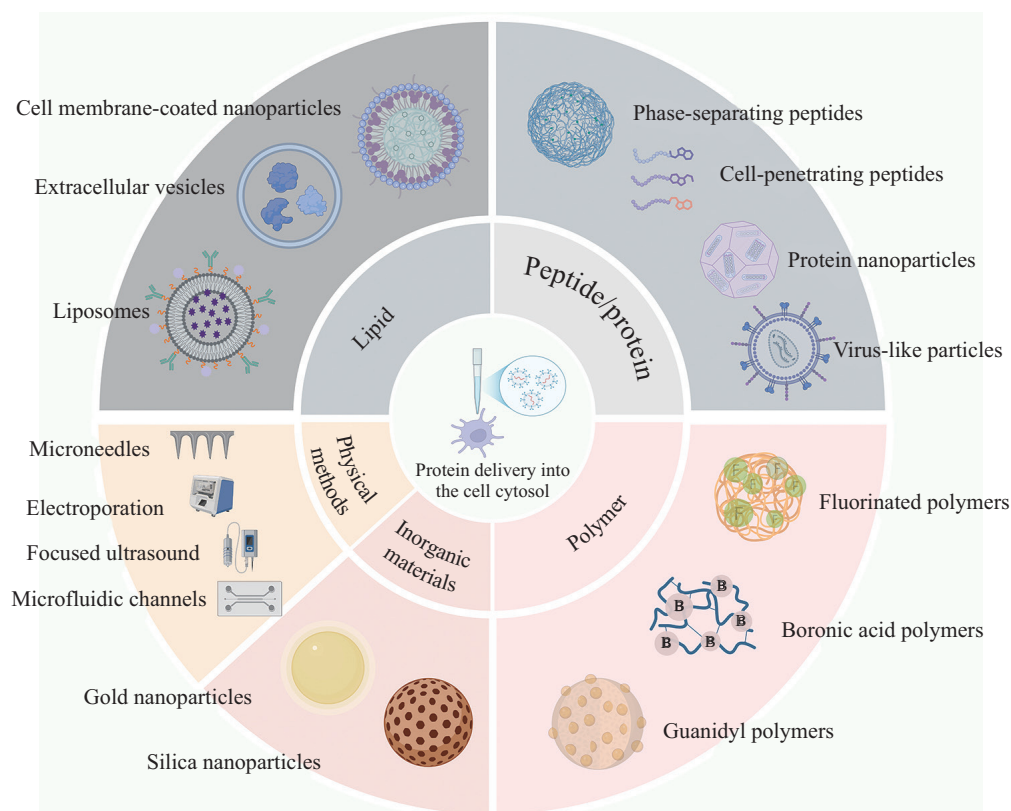
基于针对胞内靶点的蛋白药物突出的应用潜力和固有局限的矛盾,研发高效的蛋白质递送体系已成为该领域的研究热点^[7]。但是,蛋白质药物是由不同氨基酸序列通过特定的排列和折叠形成的,其表面电荷分布不均匀,这使得许多递送体系难以高效地负载蛋白质药物。与小分子药物相比,蛋白质药物作为生物大分子,其有效发挥功能的前提是维持其生理活性。然而,许多药物递送体系需要在

极端条件下(如强酸、强碱或有机溶剂等)进行制备和组装,这往往无法满足蛋白质药物对环境的苛刻要求。此外,蛋白质药物的分子量通常在10 kDa以上,这增加了其装载和递送的难度。尽管超声波、显微注射和电穿孔等物理手段的递送方式能将蛋白质直接递送进胞质中,但这些方法不可避免地对细胞膜造成了损伤,从而限制了它们在大规模临床应用中的可行性。近年来,随着材料科学和仿生学的不断革新,新型载药材料和体系的快速发展为实现蛋白质药物的装载、靶向和释放提供了新的思路,并引领了蛋白质药物发展的新方向。如2023年CHEN等^[8]利用Ugi四组分反应设计了一个具有可调电荷和疏水特性的Gemini两亲性分子库(gemini amphiphiles, GAs),用于广谱蛋白质的胞质递送。2024年GAO等^[9]受细胞基质启发,模拟蛋白质的自然环境,采用透明质酸(hyaluronic acid, HA)和鱼精蛋白(protamine, PRTM)自组装形成蛋白质载荷核心,并将其包裹在ApoE3重组高密度脂蛋白(reconstituted high-density lipoprotein, rHDL)中,形成蛋白-HA-PRTM-rHDL仿生纳米载体,此载体既可保护蛋白质活性,又可促进蛋白质药物穿越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)进入脑细胞。因此,本综述将总结近期蛋白质药物胞质递送领域的研究进展(图1),并深入探讨蛋白质递送体系的递送机制、实际应用、面临的挑战以及未来的发展前景。

细胞膜作为生命活动的重要屏障,巧妙地将细胞内外环境划分开来,形成一道天然的物理屏障。分子量大、亲水性强的蛋白质药物难以穿越细胞膜的“防线”,在到达胞内靶标前可能就被中和或降解,从而丧失疗效。即使跨过细胞膜这重难关,大多数的蛋白质及其递送载体也容易被内体/溶酶体吞噬和滞留,难以逃脱^[10]。为了克服蛋白质在细胞内递送过程中的重重障碍,国内外学者开发出了多种基于不同材料的蛋白质递送体系,旨在促进细胞对蛋白质的摄取,拓宽蛋白质药物的适用范围,并提高其在细胞内的稳定性和疗效。

1 蛋白质胞质递送策略——物理方法

蛋白质胞质递送的物理方法是以膜破坏为基础,通过电穿孔^[11]、超声波^[12]、显微注射^[13],以及微流体挤压^[14]等物理手段,在细胞膜上形成临时孔洞,



蛋白质递送体系可分为物理策略以及非物理策略(包括脂质体递送系统、基于肽/蛋白质纳米递送系统、聚合物纳米递送系统和无机纳米递送系统等)。

Protein delivery systems can be divided into physical strategies, and non-physical strategies (eg. liposome delivery systems, peptide/protein based nanodelivery systems, polymer nanodelivery systems and inorganic nanodelivery systems).

图1 蛋白质药物胞内递送的策略

Fig.1 Strategies for intracellular delivery of protein drugs

使蛋白质药物能自由地进入胞质^[15]。因而,物理给药方法不受递送细胞类型和药物性质的限制,被公认为蛋白质递送领域最直接、最传统的途径。如2018年SHAREI等^[16]使用微流体装置挤压T细胞,在细胞膜上制造临时小孔,从而高效递送靶向PD-1的Cas9和sgRNA复合物(CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins, RNPs),编辑后T细胞群中II型干扰素(interferon- γ , IFN γ)阳性细胞数目增加了79%, IFN γ 的荧光强度增加了90%,再将编辑后的T细胞回输到T淋巴瘤模型小鼠中,能显著减缓肿瘤生长速度。2020年,IBRAHIM等^[17]将nanobody-RING融合蛋白通过电穿孔的方式送入细胞,在几分钟内诱导靶蛋白降解。

然而,这些用于蛋白质递送的物理方法通常是低通量的、破坏性的,需要使用专门的仪器来物理穿透细胞膜,这限制了它们在大规模生产和制药中的应用。此外,这些方法诱导的瞬时细胞通透性可能导致其他蛋白质和生物分子意外流入细胞,带来

潜在的副作用^[18]。

2 蛋白质胞质递送策略——脂质纳米递送系统

脂质纳米递送系统具有与细胞膜相似的双分子层结构,其主要成分磷脂也是细胞膜的核心构成成分。因此,脂质纳米递送系统与细胞膜之间具有较强的亲和力,能够更有效地与细胞膜融合并跨越细胞膜屏障^[19]。此外,脂质纳米递送系统展现出优良的生物相容性,是一类具有广阔应用前景的药物递送体系^[20]。脂质纳米递送系统可由合成、半合成或天然脂质材料构建而成,由此可划分为脂质体、细胞膜包裹的纳米颗粒和细胞外囊泡。

2.1 脂质体

早在20世纪60年代,科学家BANGHAM和HORNE^[21]就发现,脂质体(liposomes)具有典型的球形结构,由两亲性磷脂双分子层和内部水核组成。脂

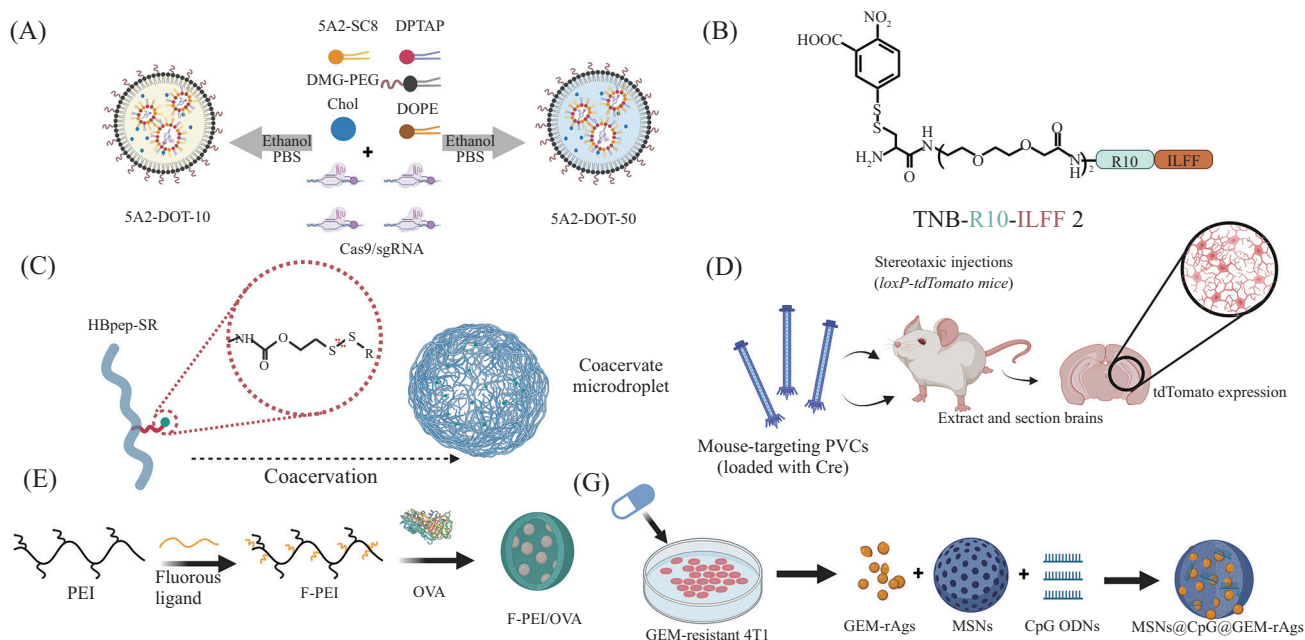
质体展现出良好生物相容性和微环境响应能力,可以有效地填充各种亲水性或疏水性药物,并通过内吞作用或脂质体与细胞膜融合作用递送入细胞^[22]。进入20世纪90年代,随着纳米技术的兴起,研究人员开始使用高压快速将多层系统直接挤压通过孔径为100 nm或更小的聚碳酸酯过滤器,以制备纳米级别的脂质体^[23]。同时,研究人员在传统脂质体的配方上陆续添加了阳离子脂质组分和PEG等新组分,从而赋予脂质体更长的循环寿命、更低的毒性和易修饰的特性。从1987年, MALONE等^[24]首次证明了脂质体能够有效地将mRNA递送到细胞内开始,到新冠疫情大流行期间,基于脂质体的mRNA疫苗在抑制病毒传播、降低感染死亡率方面发挥了突出作用,脂质体在对mRNA的递送方面已经取得了突破性的成就。而脂质体作为蛋白质药物载体首次出现则是在2014年, XU等^[25]使用阳离子脂质递送功能性蛋白,采用阳离子脂质包裹被顺式-乌头酸酐改性的皂草素(saporin)制备纳米颗粒EC16-1/saporin, EC16-1/saporin能积聚在小鼠乳腺癌模型中的肿瘤部位,并有效抑制肿瘤生长。同年, LIU等^[26]使用市售的阳离子脂质RNAiMAX将带有负电荷GFP修饰的RNPs递送到小鼠内耳中成功地修饰了外毛细胞群中的特定基因组位点。而且,这些额外的蛋白质修饰并未损害蛋白质的功能。与mRNA相比,蛋白质药物是由不同氨基酸序列通过特定的排列和折叠形成的,其表面电荷分布不均匀,脂质体难以高效负载单一的蛋白质药物。在这种情况下,通常通过对货物蛋白引入电荷修饰基团或者在递送货物中掺入RNA提高货物的整体带电性,促进脂质体的封装。

目前,脂质体领域的研究热点主要集中在开发具有主动靶向性的脂质体纳米颗粒。2020年 SIEWART等^[27]在传统脂质体体系中加入了第五种脂质分子——阳离子DOTAP,研究发现,随着DOTAP物质的量比的增加,荧光素酶蛋白的表达逐渐从肝脏靶向转移至脾脏靶向和肺部靶向。随后 SIEWART等^[28]选择以5A2-SC8作为可离子化的阳离子脂质,同时在脂质体中掺入不同比例的DOTAP构建肝靶向纳米载体5A2-DOT-5 LNPs和肺靶向纳米载体5A2-DOT-50 LNPs,实现了RNPs的系统递送和器官选择性基因编辑(图2A)。在近期的研究中,经过仿生学改造的脂质体引起了广泛关注。如 WANG等^[29]受丝状肌动蛋白促进细胞膜融合启发,构建

模仿丝状肌动蛋白结构的脂质体,该脂质体可以通过与细胞膜的快速融合,将蛋白质药物递送到细胞质中,并绕过内吞作用避免其被溶酶体降解,实现高效的蛋白质递送并使其保持较高的活性(图3)。蛋白质药物是生物大分子,而发挥功能的前提是保持其生理活性。传统的脂质体制备方法,如薄膜分散法、有机溶剂注入法和逆相蒸发法,通常是先用有机溶剂溶解磷脂,形成磷脂双分子层膜,然后进行水化处理。然而,这些方法中残留的有机溶剂可能会影响蛋白质药物的生物活性,导致其活性降低甚至是丧失。

2.2 细胞膜包裹的纳米颗粒

纳米颗粒极易引发机体的免疫反应,导致其无法发挥预期的疗效。然而,细胞膜包裹的纳米颗粒(cell membrane-coated nanoparticles, CNPs)不仅可以有效逃避免疫系统的攻击,还能够借助膜来源细胞表面特有的蛋白质,实现长循环、靶向释药、免疫调控等功能^[30]。这一细胞膜包裹纳米颗粒的技术最早可以追溯到2011年, ZHANG等^[31]采用自上而下的策略,将完整的天然红细胞膜包裹在可生物降解的聚合物纳米颗粒上,以实现相关膜蛋白的递送。此外,红细胞膜的生物相容性和抗巨噬细胞吞噬能力使其血液循环时间显著延长。基于此技术, ZHANG等^[31]设计的首款细胞膜的生物模仿纳米药物CTI-005已完成所有临床前动物试验、毒理学和药理学研究。细胞膜是生物体中信息交换和信号转导的重要介质,其表面丰富的识别单元赋予了高度的生物特异性。选择不同种类细胞膜包裹纳米颗粒,可以达到不同设计目的^[32]。例如, LIU等^[33]将负载免疫佐剂的纳米颗粒封装在甘露糖修饰的癌细胞膜中用于构建癌症疫苗。癌细胞表面的特异性蛋白可作为肿瘤抗原,这种设计不仅增强了其对同型肿瘤细胞的结合能力,还提高了药物靶向肿瘤的效率,同时大幅减少了对正常细胞的损伤。ZHANG等^[34]将利用基因工程表达病毒融合蛋白的细胞膜来装载mRNA的纳米颗粒,所得到的HA-mRNA-NP能够模拟某些病毒实现内含体逃逸,最终成功将mRNA递送到胞质中并表达出相应蛋白。YANG等^[35]利用树突状细胞(dendritic cells, DCs)的淋巴结归巢特性,开发了一种DCs膜包裹的淋巴靶向载体,该载体能够有效地迁移到脾脏和淋巴结等淋巴器官。细胞膜包裹的纳米颗粒是一种近年来兴起的仿生技



A: 在脂质体原有的四种核心脂质的基础上, 添加不同物质的量比DOTAP制备肝靶向纳米载体(5A2-DOT-5 LNPs)和肺靶向纳米载体(5A2-DOT-50 LNPs)。B: 在原本亲电官能团修饰的CPP尾部连接了疏水的氨基酸作为锚, 来提高该CPP在细胞表面的保留时间。C: 具有还原条件响应特性的HBpep肽在pH6.5下能够相分离, 形成稳定的微滴, 并通过直接跨膜的方式, 实现蛋白质、肽段和mRNA的高效胞质递送。D: 将Cre加载到发光杆菌产生的细胞外收缩注射系统(PVC)中, 并在loxP-tdTomato报告小鼠中进行颅内注射, 之后观察到Cre介导的tdTomato在小鼠海马体中的表达。E: 氟烷接枝的阳离子聚合物F-PEI能够与肿瘤细胞膜抗原通过简单混合自组装形成均匀的纳米颗粒, 在触发抗肿瘤免疫应答方面表现出更高的效率。F: 负载抗原与免疫激动剂CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODNs, TLR9激动剂)的介孔二氧化硅纳米颗粒能有效靶向淋巴结, 增加DCs对抗原的摄取, 促进DCs成熟, 并显著延缓耐药肿瘤的生长。

A: based on the four core lipids originally used in liposomes, different molar ratios of DOTAP were incorporated to prepare liver-targeted nanoparticles (5A2-DOT-5 LNPs) and lung-targeted nanoparticles (5A2-DOT-50 LNPs). B: hydrophobic amino acids are conjugated to act as anchors on the electrophilically functionalized CPP tail to enhance the retention time of the CPP on the cell surface. C: the redox-responsive HBpep peptide can undergo phase separation at pH6.5, forming stable microdroplets. By direct transmembrane transport, it facilitates the efficient cytosolic delivery of proteins, peptides, and mRNA. D: Cre was loaded into the extracellular contractile injection system (PVC) produced by *Photobacterium asymbiotica* and then intracranially injected into loxP-tdTomato reporter mice. Following injection, Cre-mediated tdTomato expression was observed in the hippocampus of the mice. E: the fluorine-grafted cationic polymer F-PEI can self-assemble into uniform nanoparticles by simple mixing with tumor cell membrane antigens, exhibiting higher efficiency for triggering anti-tumor immune responses. F: the mesoporous silica nanoparticles loaded with antigen and CpG oligonucleotides (CpG ODNs, TLR9 agonists) can effectively target lymph nodes, enhance antigen uptake by DCs, promote DCs maturation, and significantly retard the growth of drug-resistant tumors.

图2 以不同核心材料制备蛋白质药物的递送载体(根据参考文献[28,55-56,70,77,86]修改)

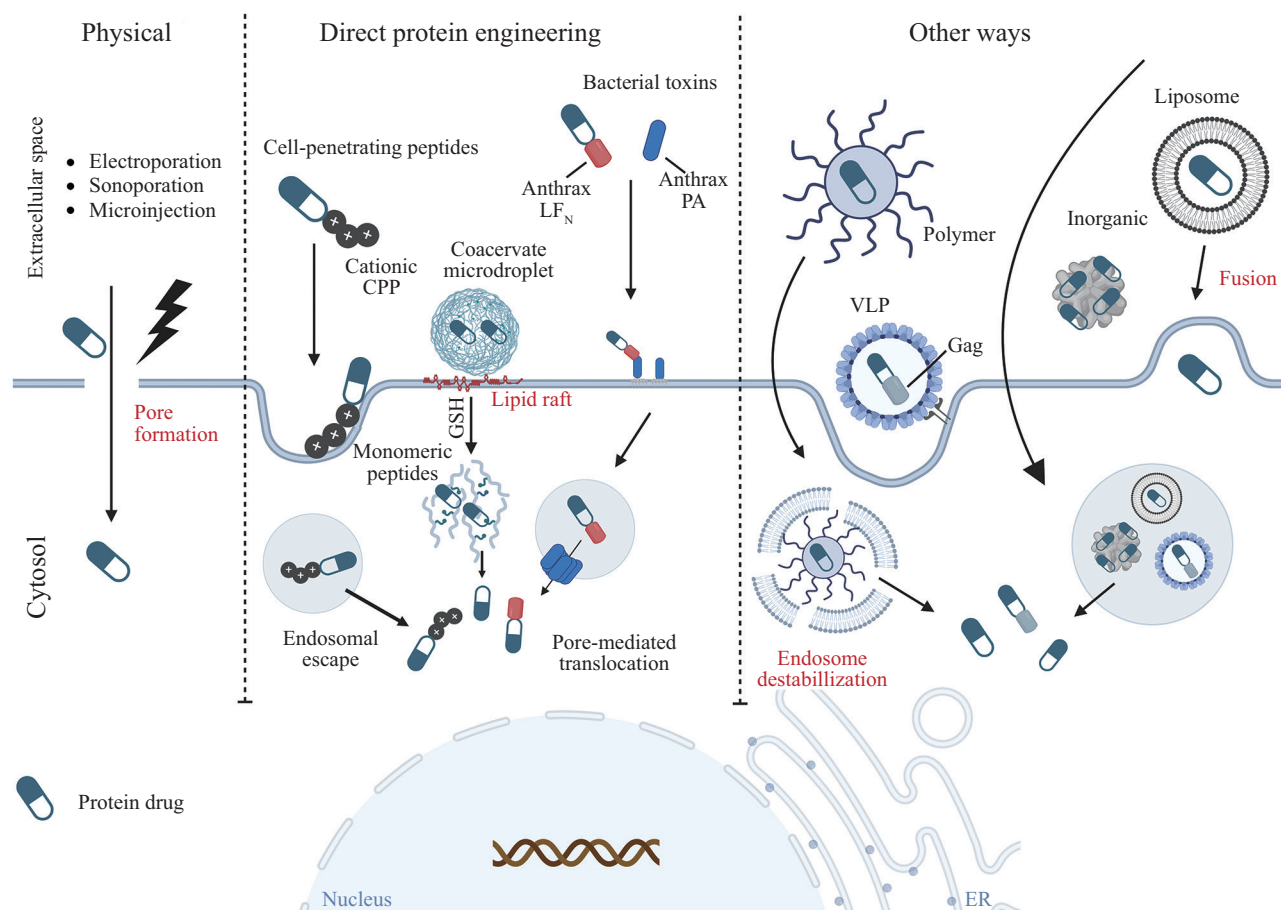
Fig.2 Delivery carriers of protein drugs prepared with different core materials (modified from references [28,55-56,70,77,86])

术, 属于纳米药物递送领域的前沿创新。然而, 尽管其潜力巨大, 但制备这种纳米颗粒需要精确的技术手段, 然而目前仍面临制备过程复杂、规模化生产困难等挑战, 这也限制了其在实际应用中的推广和普及。

2.3 细胞外囊泡

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是由细胞自发释放到外环境中的各种具有膜结构囊泡的统称, 几乎所有的天然细胞包括高等生物细胞(动物、植物)、低等微生物细胞(细菌、真菌)都可以产生EVs^[36-37]。早在20世纪60年代, BONUCCI^[38]在培养软骨细胞时就观察到细胞会分泌直径约100 nm的小

囊泡。2013年, 美国科学家ROTHMAN、SCHEKMAN和德国科学家SUDHOF因揭秘细胞内的囊泡运输调控机制问鼎诺贝尔奖。2021年, 新型细胞外囊泡治疗候选药物exoIL-12进入I期临床试验^[39]。因此, 细胞外囊泡被认为是一种很有应用前景的药物载体。EVs具有良好的生物相容性、免疫原性低、可在生物体内降解、可通过体内屏障, 以及较好的靶向性等特性^[40]。小分子药物需要通过物理化学方法加载到EVs中, 而蛋白质药物则可以通过细胞内源性表达的方式, 直接被装载进EVs。2011年, ERVITI等^[41]首次提出了通过改造树突状细胞(DCs)使其过表达Lamp2b(一种与神经元特异性RVG肽融



不同递送载体介导的蛋白质胞质递送机制概述。物理方法包括电穿孔、超声穿孔和显微注射等技术。直接的蛋白质工程方法主要依赖于病毒和细菌来源的蛋白质转导结构域的融合/生物偶联。需要通过内吞作用的蛋白质工程方法包括脂质体、聚合物、无机材料和生物工程制备的VLPs。

Overview of the cytosolic protein delivery mechanisms mediated by various delivery carriers. Physical methods include techniques like electroporation, sonoporation, and microinjection. Direct protein engineering methods mainly rely on the fusion and bioconjugation of virus- and bacteria-derived protein transduction domains. Protein engineering methods that require endocytosis include liposomes, polymers, inorganic materials, and bioengineered VLPs.

图3 不同递送载体介导的蛋白质胞质递送机制(根据参考文献[93]修改)

Fig.3 Mechanisms of cytosolic protein delivery mediated by different delivery vectors (modified from reference [93])

合的外泌体膜蛋白)来产生神经元靶向EVs。2020年LIU等^[42]通过分离的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)互补技术使水泡性口炎病毒G蛋白(vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G)与功能蛋白或RNP等生物活性大分子主动装载到EVs中,大大提高了货物转运至靶细胞的效率,减少了细胞蛋白的非特异性封装。2022年WANG等^[43]利用慢病毒介导的基因转染技术开发了一种过表达PD-L1的由间充质干细胞衍生的细胞外囊泡(MSC-sEVs-PD-L1),并证明了MSC-sEVs-PD-L1可以通过PD-1/PD-L1通路抑制炎症免疫细胞,显著靶向和修复组织病变。2023年时LEONARD等^[44]在细胞外囊泡表面装载CD2抗体和VSV-G,可以更精准地将Cas9酶递

送至T细胞,提升对T细胞的基因编辑效率。与传统给药系统相比, EVs相关的给药方式通过对供体细胞进行基因工程改造,使其释放的EVs上携带有不同的功能分子。尽管EVs作为新型载药系统具有许多显著优点,但控制EVs转运的途径和机制尚未被完全阐明。EVs的分离和纯化也很复杂,目前常用的方法如超速离心、大小排阻色谱和免疫捕获等,存在效率低、操作复杂和成本高等问题。

3 蛋白质胞质递送策略——基于肽/蛋白质材料的递送系统

肽和蛋白质能够通过特定受体或相互作用位点的结合,精确识别靶细胞或组织,从而显著提高

药物递送的特异性^[7]。这种靶向递送可以有效减少对非靶组织的影响。此外,肽和蛋白质作为天然生物分子,具有较高的生物相容性、较低的免疫原性和易于降解的特性。因此,使用这些材料作为蛋白质药物递送载体能够显著降低对人体的毒性和不良反应^[45]。

3.1 细胞穿膜肽

1988年,FRANKEL等^[46]首次报道人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)转录激活因子(transactivator, TAT)能够独立进入细胞,随后,研究发现TAT蛋白的特定片段能引导外源性蛋白进入细胞。此后,许多来自微生物、噬菌体以及动物中具有穿越细胞膜能力的多肽相继被发现,并被命名为细胞穿膜肽(cell penetrating peptides, CPPs)。这类多肽通常小于30个氨基酸,无需依赖特定膜受体即可独立穿透细胞膜^[47](图3)。同时由于其多肽的固有属性,CPP在进入细胞后会被降解,且具有较好的生物相容性,因此在蛋白质药物胞质递送领域中得到了广泛使用^[48]。

然而,部分携带蛋白质药物的CPP在穿过内体屏障时存在困难,并且其与细胞膜的作用表现出显著的剂量依赖性,此外,许多CPP自身具有较强的正电荷,在系统性给药中可能引起难以预测的毒副作用。因此,目前在蛋白质药物递送领域对CPP的研究主要集中在对现有穿膜肽进行修饰优化,以及开发新型穿膜肽,以提高其治疗效果。HACKENBERGER等^[49]在CPP修饰和优化领域进行了深入研究,并于2008年提出CPP环化和CPP添加剂理论。2014年,他首次发现环化的TAT多肽能够将GFP蛋白成功递送到细胞胞质中,而线性的TAT多肽不能完成^[50]。因为CPP环化会改变多肽上的正电荷的分布,从而显著提高了CPP封装和递送蛋白质药物的效率和速度。这一研究极大地推动了CPP环化修饰的深入发展。在2019年,HACKENBERGER等^[51]又更新了CPP环化的策略,使用乙烯基膦酸盐对携带含叠氮化物的氨基酸和半胱氨酸的肽进行分子内环化,当环化后的肽共价连接到蛋白质货物上时,环化肽能够增强功能性蛋白质向活细胞的递送作用。从而促进细胞对蛋白质的摄取。与此同时,他们提倡的CPP添加剂理论也取得了显著进展^[51]。早在2009年他们通过向富含精氨酸的CPP中添加组织蛋白酶D的可切割序列的部分片段GKPILFF,显著提高了

CPP的内体逃逸效率^[52]。2021年,他们进一步利用4-(4-二甲氨基苯基偶氮)苯甲酸[4-(4-diMethylaminophenylazo) benzoic acid, DABCYL]和硫醇反应性的添加剂来修饰的CPP,通过提高内体逃逸效率和CPP非内吞方式摄取的比例,显著增加了低微摩尔浓度蛋白质的细胞摄取^[53-54]。2023年,HACKENBERGER等^[55]优化了CPP结构,在CPP尾部连接疏水性氨基酸序列作为锚,极大地增强了CPP在细胞膜上的积累,显著降低了膜张力并缩短了蛋白质递送所需时间,最后使用该体系成功递送了一种大环肽CMR19以及Cre重组酶,并证明其都保存了原有的生理活性(图2B)。

目前市面上使用的各种穿膜肽大多具有典型的高阳离子性和疏水性,这些特性虽然能够有效地穿透细胞膜,但往往以破坏细胞膜和造成细胞损伤为代价,从而实现蛋白质的胞质递送。为了解决这一问题,开发新型的细胞穿膜肽已经成为国内外的研究热点。2022年,MISEREZ等^[56]设计了一种具有还原条件响应特性的HBpep肽,在pH6.5下能够相分离,形成稳定的微滴,这些微滴绕过经典的内吞途径,能够直接高效地向细胞质递送各种大分子,包括小到726 Da的治疗肽和大至430 kDa的酶(图2C)。同年,VALLIS等^[57]发现一种由铜催化的三聚炔炔官能化支架B(tri-cTat B)是一种高效蛋白质递送载体,能在不破坏抗体生理活性的前提下将其递送到细胞质和细胞核中。在CPP中引入带负电荷的基团可以中和CPP自身带有的正电荷,降低其对细胞的毒性。FUTAK等^[58]在具有较强的破坏细胞膜活性的阳离子两亲性肽段L17E的疏水表面引入带负电荷的谷氨酸残基,有效地充当了一个安全网来调节该肽的破膜活性,并选择性地扰乱内体膜。2024年时,FUTAKI等^[59]更进一步在胡蜂蜂毒肽(mastoparan, MP)的N-端添加3个谷氨酸残基,在C-端修饰添加上16个组氨酸残基,设计出了一种高效并且低细胞毒性的内溶肽E3MPH16。

迄今为止,研究人员已开发出超过1 800种CPP,并广泛应用于递送各种药物,如成像剂、蛋白质药物、核酸药物,甚至是纳米颗粒。然而,至今尚未有任何一种CPP或CPP/药物复合物获得FDA批准上市。在CPP的临床应用推广过程中,仍面临诸多亟待解决的重要问题。例如CPP在体内缺乏组织特异性和细胞类型特异性,这限制了其靶向递送的效果。

此外, CPP的跨膜机制尚未被完全阐明, 可能涉及多种相互作用和途径, 并受多种因素影响, 这些都极大地制约了其向临床应用的进一步发展。

3.2 蛋白质纳米颗粒

蛋白质纳米颗粒(protein nanoparticles, PNPs)作为药物递送系统的一个重要分支, 相较于传统药物递送系统, 具有独特优势。PNP不仅保留了蛋白质的固有特性, 如原有功能、特异性、易降解性、较好的生物相容性等, 还结合了纳米颗粒的优势, 如通过提高生物利用度和稳定性或者更易于通过重组和化学修饰实现功能化等特性^[60]。正是基于这些优势, PNP在蛋白质药物递送系统中展现了巨大的应用潜力。由病毒结构蛋白自发组装而成的病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是目前研究最多的PNP。2010年, VOELKEL等^[61]通过将货物蛋白克隆到逆转录病毒*Gag-Pol*基因中, 再将蛋白质包装成VLPs的方式来递送GFP和功能性Flp重组酶。次年, KACZMARCZYK等^[62]通过完全去除*Pol*基因来产生具有缺陷的VLPs, 该VLPs无法复制和组装完整的病毒颗粒, 在临床应用中不会引起病毒的传播或感染, 从而大大提高了自身的安全性, 并且该VLPs能成功高效地递送了许多功能蛋白(Cre重组酶、半胱天冬酶)。近年来VLPs也被用于癌症治疗和基因编辑。如2021年DOUDNA等^[63]利用改造的病毒样颗粒同时实现对T细胞的特定基因敲除和抗肿瘤特性的重编程。2022年LIU等^[64]报道了一种无DNA、可高效包装和递送基因编辑蛋白的工程化类病毒颗粒eVLPs, eVLP递送的碱基编辑器的RNP能够有效修复遗传性失明小鼠模型中的基因突变位点, 并部分恢复小鼠的视力。除了来源于细菌和病毒的PNP外, 近年来从动植物中提取的蛋白质作为基质制备的PNP也引起了广泛关注。例如, 白蛋白、丝素蛋白、锌指蛋白等都被用于PNP的开发和应用。2012年BARBAS等^[65]发现锌指蛋白的Cys₂-His₂锌指结构域具有天然的细胞穿透能力。2014年时, BARBAS等^[66]进一步将锌指结构域用于细胞内蛋白质递送, 实验结果表明, 具有两个或三个指锌指结构域的锌指蛋白具有强大的细胞穿透活性, 能够介导EmGFP和萤火虫荧光素酶, 并将其递送到多种原代和癌症细胞中并保留其生理活性。后续研究人员又将锌指蛋白应用于递送CRISPR-Cas9^[67]、肉毒杆菌神经毒素(botulinum neurotoxin serotype A, BoNTA)

^[68]和超氧化物歧化酶(deliver superoxide dismutase, SOD)^[69]。锌指结构域未来有望成为一种具有广泛应用潜力的通用性蛋白质转染试剂, 并在功能上与CPP相媲美。2023年, ZHANG等^[70]通过AlphaFold的结构预测和设计开发功能对发光杆菌产生的细胞外收缩注射系统(photorhabdus virulence cassette, PVC)改造, 使其能将多种功能性蛋白(如Cas9、碱基编辑器及毒素蛋白)靶向人类特定细胞, 并且研究表明该递送系统靶向人类细胞和小鼠效率接近100%, 具有将任何蛋白精准递送到任何指定人类细胞的潜力。这仅仅是AlphaFold在蛋白质药物递送领域应用的起点(图2D)。

PNP的核心组分是蛋白质, 这使得PNP受到蛋白质固有属性的影响, 在储存运输过程中, 环境因素(如温度、pH值、盐浓度等)的改变可能导致其结构不稳定甚至是功能丧失。同时, 目前许多PNP来源于细菌或病毒等致病微生物, 尽管通过基因工程、表面修饰、生产工艺优化等手段降低其免疫原性或毒性, 但仍难以完全保证其长期安全性。尤其是在长期或频繁使用的情况下, 可能会诱发抗体反应甚至是细胞因子风暴。

4 蛋白质胞质递送策略——聚合物

聚合物载体能够提高药物稳定性, 具有良好的靶向性、提高药物溶解度等优点^[71]。截止到2024年, FDA已经批准了超过200种含聚合物参与的治疗方式, 聚合物被公认是一种具有良好应用前景的药物递送载体^[72]。大部分蛋白质药物半衰期短, 稳定性差, 在给药过程中极易受到环境因素(如温度、pH值等)的影响而发生降解失活。聚合物载体的装载可以提高蛋白质药物的稳定性, 并帮助蛋白质药物跨过细胞膜屏障, 使到达靶点且具备治疗作用的蛋白质数量大大增加。目前, 在蛋白质药物递送领域, 聚合物载体的研究热点主要集中在开发新型功能化聚合物, 这是由于蛋白质是由不同序列的氨基酸排列折叠而形成的, 其表面电荷分布不均。未经修饰的聚合物载体与蛋白质之间相互作用力弱, 无法高效结合和递送蛋白质。功能化聚合物通过引入特定官能团, 如氟、胍、硼、杂环等组分, 调整聚合物载体的带电性能, 并通过盐桥和氢键等相互作用增强与蛋白质的结合力, 促进对蛋白质的封装^[73](图3)。

在众多的聚合物修饰策略中,氟化修饰是最为常见的方式。氟(fluorine, F)在鲍林标度上具有最高的电负性(即3.98)和最小的原子半径(不包括氢)。氟链的引入通常会赋予聚合物疏水性和疏脂性,这种双疏性会促进聚合物在溶液中发生自组装和相分离,有助于增强聚合物对蛋白质的有效包裹作用,而且进一步保护蛋白质的生物活性^[74]。在2014年,CHEN等^[75]发现氟化聚合物在基因递送过程中展现出特殊的氟效应,即含氟功能基团可帮助聚合物改善递送药物的稳定性、细胞内吞、内涵体逃逸、胞内核酸释放等性能,进一步揭开了氟化修饰的潜力。在2018年,CHEN等^[76]将研究重点转向蛋白质药物递送领域。他将氟烷基接枝到支链聚乙烯亚胺(polyethylenimines, PEI)上,用于胞质蛋白递送。结果表明,氟化聚合物具有较高的蛋白质封装效率,能够有效保护蛋白质药物,防止其变性失活,同时能促进细胞摄取。此外,这种聚合物修饰对细胞的毒性极低,且蛋白质不需要进行修饰即可进入细胞。在之后的研究中使用氟化聚合物F13-PEI进行个性化肿瘤疫苗的构建,发现其能显著增强机体对肿瘤的免疫记忆,并有效地保护治愈的小鼠免受肿瘤的再次攻击^[77](图2E)。2020年CHEN等^[78]又设计了一种具有氟烷基尾链的富含苯硼酸的树枝状分子(PBA-rich fluorinated dendrimer, PFD)。PFD兼具苯硼酸的聚合物和氟化聚合物在蛋白质递送方面的优势,可以通过氮硼配位和亲氟效应的协同作用,更加有效地与蛋白质形成稳定的复合物,并且在树枝状分子焦点处修饰的氟烷基尾链可以有效诱导聚合物的自组装。

尽管多种功能化修饰的聚合物已经在体内外实验中取得了良好的效果,但仍面临许多亟待解决的挑战。首先就是大部分聚合物材料都面临着内体屏障的难题,为解决这一难题,研究人员在聚合物合成过程中引入对pH值敏感的化学键(如脘键、亚胺键等),这些化学键在酸性条件下断裂,释放出药物并诱发质子海绵效应破坏内体/溶酶体,这也是目前诱导聚合物内体逃逸的主流方法,但这类pH敏感的聚合物可能会在到达目标组织之前,在复杂的生物血清中提前释放或降解,导致蛋白质药物提前失活或效力下降,最终无法达到预期的治疗效果^[79]。其次是许多合成的聚合物材料在体内无法得到及时的降解,随着用药次数和剂量递增,聚合物材料在生物

体内的长期累积,是否具有累加副作用尚未得到充分研究。

5 蛋白质胞质递送策略——无机材料

以二氧化硅、金、钙和碳等无机材料为核心组分制备的蛋白质递送载体,具有尺寸大小可调、长期稳定和光学响应等特性^[80]。另外其易于进行表面改性处理,可通过不同方式与蛋白质药物结合,如静电相互作用、疏水相互作用、酶敏感的共价键等,能够较好封装高分子量的亲水性蛋白质,进而达到响应性释放的目的^[81](图3)。

介孔二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)因其具有大的比表面积、高孔隙率、优异的药物负载释放特性是最常用的二氧化硅递送载体^[82]。蛋白质药物相较于小分子药物或者基因药物而言分子量大得多,通常需要更大的孔径才能容纳。LIN等^[83]使用平均孔径为5.4 nm的MSNs将自身无法跨膜的细胞色素c递送至人宫颈癌HeLa细胞的细胞质中,并观察到从MSNs释放的细胞色素c仍保持其原有的催化活性。这表明,MSN的装载并未影响蛋白质的生理功能。MSNs表面特意修饰的大孔径不仅为递送蛋白质提供了可能,也为同时负载多种药物实现协同治疗提供了一定的空间。ZHANG等^[84]以MSNs作为核心载体,同时负载光热剂聚多巴胺(polydopamine, PDA)、模型抗原卵清蛋白(ovalbumin, OVA)和抗原释放启动子碳酸氢铵(ammonium bicarbonate, ABC)制备癌症疫苗。注射后,可以同时启动光热疗法和免疫疗法,进行协同治疗,实现抗原的快速释放和溶酶体逃逸,显著增强DC细胞的活化和成熟,最终诱导强大的抗肿瘤免疫反应。YANG团队^[85]制备了孔径为15.4 nm的活性氧(reactive oxygen species, ROS)响应MSNs,同时装载由高迁移率核小体结合蛋白1(high mobility group nucleosome-binding protein 1, HMGB1)、瑞喹莫德(resiquimod, R848)和anti-PD-1组成的治疗性癌症疫苗TheraVac。将癌症疫苗与免疫检查点抑制(immune checkpoint blockade, ICB)疗法联合使用,能诱导更强的免疫反应,在治疗荷瘤小鼠时,治愈率高达100%,并且被治愈的小鼠还存有强烈的免疫记忆。最新研究中MIN团队^[86]使用MSNs同时负载吉西他滨(gemcitabine, GEM, 一种模型药物)处理的GEM耐药三阴性乳腺癌4T1细胞抗原和免疫激动剂CpG

寡脱氧核苷酸(CpG ODNs), 验证表明其能显著增加肿瘤内T细胞浸润, 提高对耐药肿瘤的治疗效果(图2F)。

金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)是一种贵金属纳米材料, 具有低毒性、化学惰性、较高的体表面积比和易于表面修饰等优点^[87]。自20世纪90年代出现后, 就被广泛认为是一种有前景的给药体系^[88]。不同氨基酸的侧链(R基团)具有各自不同的电荷特性, 这使得蛋白质表面电荷分布不均匀。具有良好表面修饰特性的AuNPs能够快速有效地修饰上带电荷的基团或配体, 从而增强其对蛋白质药物的封装和递送效率。2010年ROTELLO等^[89]发现使用阳离子肽标签功能化的AuNPs能通过静电相互作用力结合并转运带负电荷的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)到各种细胞系中, 并且能从溶酶体中逃逸, 不损害 β -gal原有的生物活性。2013年ROTELLO等^[90]进一步使用阳离子HKRK(His-Lys-Arg-Lys)肽标签功能化的AuNPs, 发现功能化的AuNPs甚至能将极易失活的Caspase-3酶有效地递送到细胞中, 并且诱导细胞凋亡。2017年ROTELLO等^[91]将掺入谷氨酸肽链的GFP与携带精氨酸封端配体的核心AuNPs通过羧酸盐-胍相互作用自组装生成分层纳米结构, 并评估了5种具有不同的大小和pI值蛋白质的递送情况, 证明该功能化的AuNPs是胞质蛋白递送的通用系统。

无机纳米颗粒在合成、功能化修饰和蛋白质递送效率方面具有显著优势, 但在临床转化过程中仍是困难重重, 最主要的问题是其难以完全降解。尽管研究表明, 无机纳米材料在短期内表现出较低的毒性, 但其在体内的清除能力及是否存在长期毒性仍未得到充分验证^[92]。因此许多相关检测和治疗方法仅仅停留在体内外实验阶段, 难以进入临床阶段。即使有少数几种无机纳米颗粒侥幸进入临床试验阶段, 也多是集中于体内成像, 作为药物递送载体的研究少之又少。

6 总结和展望

胞质蛋白递送可以为肿瘤、心脑血管等疾病提供更加安全、有效的药物。基于不同材料的蛋白质递送载体可以满足蛋白质药物递送的不同需求, 在解决靶向性、稳定性、负载量、生物降解性、生物相容性、生物低毒性上都显示出巨大的优势^[93](图3)。

随着近40年的飞速发展, 该领域已提出了多种递送策略, 但仍然存在几个重要挑战。(1) 尽管经过不断探索, 已成功开发出了多种内体逃逸递送载体, 但在实际应用中, 大部分载体在进入目标细胞后, 往往难以逃脱溶酶体的降解。(2) 不同的蛋白质药物往往具有不同的物理化学性质, 如电荷、分子量和三级结构等, 多数载体难以对具有不同性质的蛋白质药物做到均一稳定的装载和递送。(3) 许多载体自身呈现出高度的阳离子性和疏水性。这些特性容易导致细胞膜破坏, 一旦破坏程度超出细胞自我修复的能力, 可能导致不可逆的细胞损伤, 进而对细胞的正常生理功能甚至生存产生严重影响。尽管如此, 蛋白质递送载体在生物医学领域的应用前景依然广阔, 相信经过科研人员的不懈努力, 以上挑战将在不久的将来得到有效解决。蛋白质递送载体将与蛋白质药物一同, 在新的疾病面前, 为人类安全筑起更加坚固的防护屏障。

参考文献 (References)

- [1] SÁNCHEZ-NAVARRO M. Advances in peptide-mediated cytosolic delivery of proteins [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 171: 187-98.
- [2] 姜佳敏, 李盼盼, 方斌, 等. 蛋白质药物胞内递送纳米载体的研究进展[J]. 材料导报(JIAN J M, LI P P, FANG B, et al. Recent progress in nanocarriers for intracellular protein drug delivery [J]. *Materials Reviews*), 2021, 35(13): 13186-97.
- [3] 陈晓清, 郑怡, 林雄平. 二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J]. 福建师范大学学报(自然科学版)(CHEN X Q, ZHENG Y, LIN X P. Antimicrobial activities of the polysaccharide and protein extracts from two species of microalgae [J]. *Journal of Fujian Normal University, Natural Science Edition*), 2005(2): 76-9.
- [4] HE X, XIONG S, SUN Y, et al. Recent progress of rational modified nanocarriers for cytosolic protein delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15061610.
- [5] 赵子印. 蛋白质前药无载体胞内递送及其在肿瘤治疗中的应用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [6] CHIPER M, NIEDERREITHER K, ZUBER G. Transduction methods for cytosolic delivery of proteins and bioconjugates into living cells [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(6): e1701040.
- [7] QIN X, YU C, WEI J, et al. Rational design of nanocarriers for intracellular protein delivery [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(46): e1902791.
- [8] LE Z, PAN Q, HE Z, et al. Direct cytosolic delivery of proteins and CRISPR-Cas9 genome editing by gemini amphiphiles via non-endocytic translocation pathways [J]. *ACS Cent Sci*, 2023, 9(7): 1313-26.
- [9] HUANG J, FU Y, WANG A, et al. Brain delivery of protein therapeutics by cell matrix-inspired biomimetic nanocarrier [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(31): e2405323.

- [10] HE W, XING X, WANG X, et al. Nanocarrier-mediated cytosolic delivery of biopharmaceuticals [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 30(37): 1855-63.
- [11] LIU X, JIANG J, LIU J, et al. Nanoneedle array-electroporation facilitates intranuclear ribonucleoprotein delivery and high throughput gene editing [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 2024: e2400645.
- [12] TOGTEMA M, PICHARDO S, JACKSON R, et al. Sonoporation delivery of monoclonal antibodies against human papillomavirus 16 E6 restores p53 expression in transformed cervical keratinocytes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50730.
- [13] KOMAROVA Y, PELOQUIN J, BORISY G. Microinjection of protein samples [J]. *CSH Protoc*, 2007, doi: 10.1101/pdb.prot4657.
- [14] ALEX A, PIANO V, POLLEY S, et al. Electroporated recombinant proteins as tools for *in vivo* functional complementation, imaging and chemical biology [J]. *eLife*, 2019, 8: e48287.
- [15] SEVENLER D, TONER M. High throughput intracellular delivery by viscoelastic mechanoporation [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 115.
- [16] DITOMMASO T, COLE J M, CASSEREAU L, et al. Cell engineering with microfluidic squeezing preserves functionality of primary immune cells *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(46): E10907-e14.
- [17] IBRAHIM A F M, SHEN L, TATHAM M H, et al. Antibody ring-mediated destruction of endogenous proteins [J]. *Mol Cell*, 2020, 79(1): 155-66.e9.
- [18] DU S, LIEW S S, LI L, et al. Bypassing endocytosis: direct cytosolic delivery of proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(47): 15986-96.
- [19] MAGAR K T, BOAFO G F, LI X, et al. Liposome-based delivery of biological drugs [J]. *Chin Chem Lett*, 2022, 33(2): 587-96.
- [20] HE H, LU Y, QI J, et al. Adapting liposomes for oral drug delivery [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9(1): 36-48.
- [21] BANGHAM A D, STANDISH M M, WATKINS J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids [J]. *J Mol Biol*, 1965, 13(1): 238-52.
- [22] TENCHOV R, BIRD R, CURTZE A E, et al. Lipid nanoparticles: from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 16982-7015.
- [23] CULLIS P R, FELGNER P L. The 60-year evolution of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(9): 709-22.
- [24] DWARKI V J, MALONE R W, VERMA I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection [J]. *Methods Enzymol*, 1993, 217: 644-54.
- [25] WANG M, ALBERTI K, SUN S, et al. Combinatorially designed lipid-like nanoparticles for intracellular delivery of cytotoxic protein for cancer therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(11): 2893-8.
- [26] ZURIS J A, THOMPSON D B, SHU Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 73-80.
- [27] CHENG Q, WEI T, FARBIK L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(4): 313-20.
- [28] WEI T, CHENG Q, MIN Y L, et al. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3232.
- [29] XIA Y, WU K, LIU C, et al. Filamentous-actin-mimicking nanoplateform for enhanced cytosolic protein delivery [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(10): e2305600.
- [30] 李冬雪, 徐靖淋, 康琳, 等. 细胞膜包裹的纳米颗粒在疾病治疗中的应用[J]. *生物工程学报*(LI D X, XU J L, KANG L, et al. Cell membrane-coated nanoparticles in disease therapy [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2024, 40(5): 1323-37.
- [31] HU C M, ZHANG L, ARYAL S, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(27): 10980-5.
- [32] ZENG Y, LI S, ZHANG S, et al. Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(8): 3233-54.
- [33] YANG R, XU J, XU L, et al. Cancer cell membrane-coated adjuvant nanoparticles with mannose modification for effective anticancer vaccination [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5121-9.
- [34] PARK J H, MOHAPATRA A, ZHOU J, et al. Virus-vimicking cell membrane-coated nanoparticles for cytosolic delivery of mRNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(2): e202113671.
- [35] CAO Y, LONG J, SUN H, et al. Dendritic cell-mimicking nanoparticles promote mRNA delivery to lymphoid organs [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(33): e2302423.
- [36] ILAHIBAKS N F, ARDISASMITA A I, XIE S, et al. TOP-EVs: technology of protein delivery through extracellular vesicles is a versatile platform for intracellular protein delivery [J]. *J Control Release*, 2023, 355: 579-92.
- [37] GAO J, WANG S, WANG Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy [J]. *Biomaterials*, 2017, 135: 62-73.
- [38] BONUCCI E. Fine structure of early cartilage calcification [J]. *J Ultrastruct Res*, 1967, 20(1/2): 33-50.
- [39] KIRWIN K, JANG S C, SIA C, et al. 572 combination therapy of exoSTING, exoIL-12 activates systemic anti-tumor immunity [J]. *J Immunoth Cancer*, 2021, doi: 10.1136/jitc-2021-site2021.572.
- [40] BORRELLI D A, YANKSON K, SHUKLA N, et al. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease [J]. *J Control Release*, 2018, 273: 86-98.
- [41] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341-5.
- [42] ZHANG X, XU Q, ZI Z, et al. Programmable extracellular vesicles for macromolecule delivery and genome modifications [J]. *Dev Cell*, 2020, 55(6): 784-801.e9.
- [43] XU F, FEI Z, DAI H, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles with high PD-L1 expression for autoimmune diseases treatment [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(1): e2106265.
- [44] STRANFORD D M, SIMONS L M, BERMAN K E, et al. Genetically encoding multiple functionalities into extracellular vesicles for the targeted delivery of biologics to T cells [J]. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8(4): 397-414.
- [45] NGUYEN B, TOLIA N H. Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines [J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6(1): 70.

- [46] FRANKEL A D, PABO C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus [J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1189-93.
- [47] 谢洋洋, 王邵娟, 袁权, 等. 细胞穿膜肽研究应用的新进展[J]. *生物工程学报*(XIE Y Y, WANG S J, YUAN Q, et al. *Advances in the research and application of cell penetrating peptides* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2019, 35(7): 1162-73.
- [48] WU J, ROESGER S, JONES N, et al. Cell-penetrating peptides for transmucosal delivery of proteins [J]. *J Control Release*, 2024, 366: 864-78.
- [49] KLEINWEISCHEDE R, HACKENBERGER C P. Chemoselective peptide cyclization by traceless staudinger ligation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(32): 5984-8.
- [50] NISCHAN N, HERCE H D, NATALE F, et al. Covalent attachment of cyclic TAT peptides to GFP results in protein delivery into live cells with immediate bioavailability [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(6): 1950-3.
- [51] KASPER M A, GLANZ M, ODER A, et al. Vinylphosphonites for Staudinger-induced chemoselective peptide cyclization and functionalization [J]. *Chem Sci*, 2019, 10(25): 6322-9.
- [52] TAKAYAMA K, NAKASE I, MICHIEU H, et al. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas) [J]. *J Control Release*, 2009, 138(2): 128-33.
- [53] MANDAL S, MANN G, SATISH G, et al. Enhanced live-cell delivery of synthetic proteins assisted by cell-penetrating peptides fused to DABCYL [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(13): 7333-43.
- [54] SCHNEIDER A F L, KITHIL M, CARDOSO M C, et al. Cellular uptake of large biomolecules enabled by cell-surface-reactive cell-penetrating peptide additives [J]. *Nat Chem*, 2021, 13(6): 530-9.
- [55] ARAFILES J V V, FRANKE J, FRANZ L, et al. Cell-surface-retained peptide additives for the cytosolic delivery of functional proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(45): 24535-48.
- [56] SUN Y, LAU S Y, LIM Z W, et al. Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics [J]. *Nat Chem*, 2022, 14(3): 274-83.
- [57] TIETZ O, CORTEZON-TAMARIT F, CHALK R, et al. Tricyclic cell-penetrating peptides for efficient delivery of functional antibodies into cancer cells [J]. *Nat Chem*, 2022, 14(3): 284-93.
- [58] AKISHIBA M, TAKEUCHI T, KAWAGUCHI Y, et al. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide [J]. *Nat Chem*, 2017, 9(8): 751-61.
- [59] KAWAGUCHI Y, KAWAMURA Y, HIROSE H, et al. E3MPH16: an efficient endosomolytic peptide for intracellular protein delivery [J]. *J Control Release*, 2024, 367: 877-91.
- [60] KALTBEITZEL J, WICH P R. Protein-based nanoparticles: from drug delivery to imaging, nanocatalysis and protein therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62(44): e202216097.
- [61] VOELKEL C, GALLA M, MAETZIG T, et al. Protein transduction from retroviral Gag precursors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 7805-10.
- [62] KACZMARCZYK S J, SITARAMAN K, YOUNG H A, et al. Protein delivery using engineered virus-like particles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(41): 16998-7003.
- [63] HAMILTON J R, TSUCHIDA C A, NGUYEN D N, et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(9): 109207.
- [64] BANSKOTA S, RAGURAM A, SUH S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins [J]. *Cell*, 2022, 185(2): 250-65, e16.
- [65] GAJ T, GUO J, KATO Y, et al. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 805-7.
- [66] GAJ T, LIU J, ANDERSON K E, et al. Protein delivery using Cys2-His2 zinc-finger domains [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(8): 1662-7.
- [67] LIU J, GAJ T, YANG Y, et al. Efficient delivery of nuclease proteins for genome editing in human stem cells and primary cells [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(11): 1842-59.
- [68] WEI X, LI L, WU Y, et al. Cell-penetrating botulinum neurotoxin type a with improved cellular uptake and therapeutic index [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 828427.
- [69] LIU J, LI J, LI J, et al. Delivery of superoxide dismutase using Cys₂-His₂ zinc-finger proteins [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1867: 113-23.
- [70] KREITZ J, FRIEDRICH M J, GURU A, et al. Programmable protein delivery with a bacterial contractile injection system [J]. *Nature*, 2023, 616(7956): 357-64.
- [71] LÜ J, FAN Q, WANG H, et al. Polymers for cytosolic protein delivery [J]. *Biomaterials*, 2019, 218: 119358.
- [72] ZHANG Y, SHI J, MA B, et al. Functionalization of polymers for intracellular protein delivery [J]. *Prog Polym Sci*, 2023, 146: 101751.
- [73] ZHANG Y, SHI J, MA B, et al. Functionalization of polymers for intracellular protein delivery [J]. *Prog Polym Sci*, 2023, 146: 101751.
- [74] LÜ J, HE B, YU J, et al. Fluoropolymers for intracellular and *in vivo* protein delivery [J]. *Biomaterials*, 2018, 182: 167-75.
- [75] WANG M, LIU H, LI L, et al. A fluorinated dendrimer achieves excellent gene transfection efficacy at extremely low nitrogen to phosphorus ratios [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3053.
- [76] ZHANG Z, SHEN W, LING J, et al. The fluorination effect of fluoroamphiphiles in cytosolic protein delivery [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1377.
- [77] XU J, LÜ J, ZHUANG Q, et al. A general strategy towards personalized nanovaccines based on fluoropolymers for post-surgical cancer immunotherapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(12): 1043-52.
- [78] LÜ J, WANG C, LI H, et al. Bifunctional and bioreducible dendrimer bearing a fluoroalkyl tail for efficient protein delivery both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nano Lett*, 2020, 20(12): 8600-7.
- [79] DING H, TAN P, FU S, et al. Preparation and application of pH-responsive drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2022, 348: 206-38.
- [80] 周叶舒, 王燕梅, 张倍源, 等. 无机纳米材料在药物递送中的研究进展[J]. *中国药科大学学报*(ZHOU Y S, WANG Y M, ZHANG B Y, et al. *Research progress of inorganic nanomaterials in drug delivery system* [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*), 2020, 51(4): 394-405.
- [81] ZOU Y, HUANG B, CAO L, et al. Tailored mesoporous inorganic biomaterials: assembly, functionalization, and drug delivery engineering [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(2): e2005215.

- [82] KANKALA R K, HAN Y H, NA J, et al. Nanoarchitected structure and surface biofunctionality of mesoporous silica nanoparticles [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(23): e1907035.
- [83] SLOWING, II, TREWYN B G, LIN V S. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(28): 8845-9.
- [84] HUANG C, ZHANG L, GUO Q, et al. Robust nanovaccine based on polydopamine-coated mesoporous silica nanoparticles for effective photothermal-immunotherapy against melanoma [J]. *Adv Functional Materials*, 2021, 31(18): 2010637.
- [85] HUANG Y, NAHAR S, ALAM M M, et al. Reactive oxygen species-sensitive biodegradable mesoporous silica nanoparticles harboring theravac elicit tumor-specific immunity for colon tumor treatment [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(20): 19740-52.
- [86] PAN W, WANG Y, TIAN S, et al. Gemcitabine resistant triple negative breast tumor derived mesoporous silicon nanovaccine overcame drug resistance [J]. *Adv Funct Mate*, 2024, 34(38): 2405773.
- [87] GODDARD Z R, MARÍN M J, RUSSELL D A, et al. Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(23): 8774-89.
- [88] RANA S, BAJAJ A, MOUT R, et al. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(2): 200-16.
- [89] GHOSH P, YANG X, ARVIZO R, et al. Intracellular delivery of a membrane-impermeable enzyme in active form using functionalized gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(8): 2642-5.
- [90] TANG R, KIM C S, SOLFIELL D J, et al. Direct delivery of functional proteins and enzymes to the cytosol using nanoparticle-stabilized nanocapsules [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6667-73.
- [91] MOUT R, TONGA G Y, WANG L S, et al. Programmed self-assembly of hierarchical nanostructures through protein-nanoparticle coengineering [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 3456-62.
- [92] TANG L, ZHANG A, ZHANG Z, et al. Multifunctional inorganic nanomaterials for cancer photoimmunotherapy [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(2): 141-63.
- [93] CHAN A, TSOURKAS A. Intracellular protein delivery: approaches, challenges, and clinical applications [J]. *BME Front*, 2024, 5: 0035.