

归巢穿膜肽的研究进展

苏 畅¹, 梁秋华², 孙 琳^{3*}

¹济宁医学院临床医学院, 山东 济宁

²济宁医学院附属医院内分泌科, 山东 济宁

³济宁市第一人民医院内分泌科, 山东 济宁

收稿日期: 2021年10月2日; 录用日期: 2021年10月29日; 发布日期: 2021年11月5日

摘 要

归巢肽是伴随噬菌体展示技术的发展而被证实具有归巢作用的多肽, 它能特异性地识别和结合一些受体或标志物。研究表明, 部分归巢肽还具有穿膜特性, 能够使蛋白质、RNA、DNA等生物大分子特异性进入到细胞或者组织内发挥作用, 在临床诊断和治疗中具有高效性、特异性等优势。本文简要综述对归巢穿膜肽的概述、筛选、分类以及在临床诊断及治疗应用中所获得的研究进展。

关键词

噬菌体展示技术, 归巢穿膜肽, 靶向治疗, 临床应用

Research Advances of Homing Penetrating Peptide

Chang Su¹, Qiu Hua Liang², Lin Sun^{3*}

¹College of Clinical Medical, Jining Medical University, Jining Shandong

²Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

³Department of Endocrinology, Jining People's Hospital, Jining Shandong

Received: Oct. 2nd, 2021; accepted: Oct. 29th, 2021; published: Nov. 5th, 2021

Abstract

Homing peptide is a polypeptide that has been confirmed to have a homing effect with the development of phage display technology. It can specifically recognize and bind to some receptors or markers. Studies have shown that some homing peptides also have membrane-penetrating prop-

*通讯作者。

erties, allowing biological macromolecules such as protein, RNA, DNA, etc. to specifically enter cells or tissues to play a role, and have the advantages of high efficiency and specificity in clinical diagnosis and treatment. This article briefly reviews the overview, screening, classification of homing penetrating peptide and the research progress obtained in clinical diagnosis and therapeutic applications.

Keywords

Phage Display Technology, Homing Penetrating Peptide, Targeted Therapy, Clinical Application

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在临床治疗中, 细胞膜成为大分子显像剂以及药物发挥临床疗效的阻碍, 如何有效穿透细胞膜进入细胞内发挥作用成为当前研究的热点问题。人体在正常状态下每个组织、细胞几乎都有特异性的分子标志物, 即使在病理条件下也存在特异性的分子标志物, 通过靶向识别细胞表面的分子标志物, 有效穿透细胞膜, 使得疾病的靶向识别和靶向治疗成为可能。

2. 归巢穿膜肽的概述与筛选

归巢肽(homing peptides, HPs)是一类能与组织、细胞表面分子相结合的多肽, 具有体积小, 价格便宜, 低免疫原性, 较高亲和力等优点[1], 通过识别多种细胞共表达的分子标志物从而结合不同细胞。在归巢的基础上, 能够进一步穿透血管和间质, 具有细胞穿透特性, 将蛋白质、多肽物质穿过细胞膜进入细胞内, 进一步发挥生物作用并保持生物活性[2], 这些肽即被称为归巢穿膜肽。

噬菌体展示技术(phage display technology)是一项独特的基因重组表达技术, 将外源蛋白或者多肽的DNA序列插入到噬菌体外壳蛋白中, 在噬菌体表面展示出具有独立的空空间结构以及生物活性的肽或者蛋白, 获得具有高亲和性和选择性的蛋白质或者多肽[3]。1985年起, 噬菌体展示技术被用于鉴定与目标底物高亲和性和选择性结合的短肽序列[4]。通过噬菌体展示筛选技术, 获得与细胞特异性结合的多肽, 即归巢肽, 噬菌体展示技术包括体内噬菌体展示技术、体外噬菌体展示技术和附加体内筛选三种方式。目前通过以上技术, 已特异性识别出许多归巢穿膜肽用于临床, 将归巢肽注入宿主, 可富集于特定的细胞或组织, 用于靶向传递研究[5]。

3. 归巢穿膜肽的分类

目前已发现的归巢穿膜肽多种多样, 分类有多种方式, 可以根据其来源或序列、肽链所含脯氨酸的多少[6]等进行分类。根据归巢穿膜肽的化学性质可将其分为3类: 阳离子型、两亲型和疏水型[7]。

3.1. 阳离子型

目前阳离子型归巢穿膜肽在所有归巢穿膜肽中数量最多, 因为富含带有正电荷的氨基酸, 如精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)等, 在生理PH下呈净正电荷数, 故称作为阳离子型归巢肽, 首个被发现的穿膜肽TAT(序列: YGRKKRRQRRR [8])为阳离子型的穿膜肽, TAT中包含具有穿膜作用的特殊肽段区域, 即蛋白

转导域(protein transduction domains, PTD)。精氨酸是归巢穿膜肽最重要的成分,如 R5、R9 和 R11 [9]。研究表明,富含精氨酸的归巢穿膜肽,即使含有简单的多聚精氨酸序列也具有穿膜能力,并且穿膜的能力与精氨酸数量成正比例关系[10] [11]。因含有不同数量的胍基,富含赖氨酸的归巢穿膜肽的穿膜能力通常差于富含精氨酸的归巢穿膜肽[12]。

3.2. 两亲型

两亲型归巢穿膜肽由疏水性的 N 端、带电结构域和亲水性 C 端组成,在生理 PH 值为 7.0,由极性氨基酸和非极性基团氨基酸构成,从而同时具备亲水性和疏水性。其电荷贡献主要来源于广泛分布的赖氨酸和精氨酸,两亲型归巢穿膜肽又可以根据结构组成分为:一级结构两亲型、二级结构两亲型和富含脯氨酸两亲型[13]。

3.3. 疏水型

目前疏水型归巢穿膜肽数量最少,主要由非极性氨基酸组成,对于细胞膜的疏水结构域具有较高的亲和力,并且能够以能量依赖的方式穿过细胞膜,如 K-FGF [14],通常净电荷含量较少,只有-2 到+1 之间。

4. 归巢穿膜肽的应用

由于归巢穿膜肽能够特异性连接许多生物分子,作为分子载体已被成功地用作靶向显像剂、药物分子、寡核苷酸、脂质体和无机纳米粒子到肿瘤或其他组织的传递工具。具有高效率的穿膜特性、低细胞毒性,以及可以结合不同生物大分子的特点。归巢穿膜肽利用本身归巢和穿膜的特点,在许多疾病的诊断和治疗中发挥重要的作用,研究表明归巢穿膜肽在肿瘤、神经性疾病、感染等疾病的治疗和康复中具有应用潜力。

4.1. 归巢穿膜肽在肿瘤诊断中的作用

根据全球肿瘤流行病学统计数据显示,2018 年全球将新增癌症病例 1810 万,死亡病例 970 万[9]。数据表明,癌症的发病率和死亡率在全球居高,是世界公共卫生迫切攻克疾病。肿瘤的生长过程中,肿瘤血管发挥重要作用[11],肿瘤的血管生成受到血管生成因子(angiogenic factors)和血管生成抑制物(angiogenesis inhibitors)的调控。抗肿瘤药物的靶向输送在肿瘤治疗中尤为重要。归巢穿膜肽已被证明是非常有效的肿瘤治疗药物载体[15]。归巢穿膜肽可以同多种肿瘤血管结合,利用穿膜作用,可进一步穿透肿瘤细胞膜或肿瘤血管,特异性的识别肿瘤细胞。除特异性识别肿瘤血管,归巢穿膜肽也通过表达了一组不同于正常血管的分子和标记物同肿瘤淋巴管结合[16],因此可广泛应用于肿瘤影像学诊断和肿瘤靶向药物递送研究。将归巢穿膜肽与放射性核素通过螯合剂形成放射性核素标记物,靶向运送到组织或血管,并通过正电子发射型断层扫描(positron emission tomography, PET)/单光子发射型计算机断层显像(single photon emission computed tomography, SPECT)技术显示肿瘤的大小、位置和形态等。具有细胞穿透作用的归巢肽 iRGD (序列:CRGDKGPDC),通过体内噬菌体展示技术在小鼠前列腺癌转移异种移植膜型上所获得[17],通过受体介导的内吞作用或类似吞噬作用的过程,使得通过表面上的噬菌体进入到细胞内,归巢穿膜肽可通过 3 个步骤进入肿瘤组织:1) iRGD 通过其特殊序列使归巢肽与整合素相互作用而到达肿瘤血管和肿瘤内皮细胞;2) 与受体结合之后,肿瘤相关蛋白酶对归巢肽进行蛋白裂解处理,使活性 Cend R 序列 CRGDK 最终暴露;3) iRGD 的 CRGDK 片段与 NRP-1 受体结合,触发跨细胞级联,穿透组织,导致肽深入肿瘤组织[18]。在手术期间,用荧光标记的和组织特异性的归巢穿膜肽成像可以非常有助于显示健康和病变组织之间的边缘,用于病变组织的成像[19]。

4.2. 归巢穿膜肽在肿瘤治疗中的作用

抗肿瘤药物最常见的缺点是对肿瘤的渗透性差和药物的非特异性输送。用归巢穿膜肽靶向肿瘤是一种非常有前途的策略,可以特异性地提供细胞内治疗剂量的药物。增加肿瘤内部的药物浓度,可以提高疗效,同时减少副作用[20]。在肿瘤靶向传递应用中使用最广泛的肽是 RGD 和 NGR,这是第一批发现的归巢肽,通过作用与肿瘤坏死因子- α (TNF- α),从而具有强大的抗肿瘤活性,抗癌药用蛋白质 TNF- α ,因具有全身毒性副作用而在临床应用中受到极大限制,运用靶向递送策略能降低这种毒性[21]。F3 (序列: KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK)是早期发现的肿瘤归巢穿膜肽,与受体结合后能够被细胞内化,具有归巢和穿膜特性。荧光素结合的 F3 与肿瘤细胞和肿瘤相关的血液内皮细胞不仅在白血病肿瘤膜型中内化,而且在其他类型的肿瘤中也存在内化。P53 为肿瘤抑制因子,临床中接近半数的肿瘤细胞被证实 P53 基因突变,阳离子型归巢穿膜肽 TAT 与 p53 蛋白(RI-TAT-p53C)连接以及 R11 与 p53 蛋白和血球凝集素 HA-2 (d11R-p53C-riHA2)连接,在淋巴瘤小鼠膜型中可以延长小鼠的寿命,抑制肿瘤细胞的生长[22]。研究表明,脑肿瘤归巢四肽递送纳米治疗剂,用于更有效地治疗胶质母细胞瘤小鼠模型,氨基酸序列为:氨基酸序列丝氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-缬氨酸,其在体外和体内以显著的特异性归巢于多形性胶质母细胞瘤脑肿瘤组织[23] $\alpha v \beta 3$ 整合素受体和神经纤毛蛋白-1 (NRP-1)在肿瘤组织和肿瘤血管中过度表达, iRGD 它能够与 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体结合,并通过酶水解肿瘤衍生蛋白,暴露靶向 NRP-1 的结合序列。当 iRGD 与 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体和 NRP-1 结合时,肿瘤组织的通透性增加,与 iRGD 一起递送的更多药物分子或载药纳米粒可穿透肿瘤组织。因此,药物的抗肿瘤作用明显提高[24]。有研究表明, $\beta 5$ 整合素是 iRGD 穿透肿瘤组织的中介物, $\beta 5$ 整合素以 $\alpha v \beta 5$ (以及 $\alpha v \beta 3$) 的形式存在,被认为是一种肿瘤特异性信号,选择性地引导 iRGD 进入肿瘤血管,作为肿瘤特异性组织穿透的初始步骤[25]。在治疗研究中,反义寡核苷酸(ASOs),一种以核苷酸为基础的药物,在治疗人类疾病方面具有独特的优势。雄激素受体(AR)的异常表达和激活被认为是前列腺癌向去势抵抗、致死形式发展的驱动因素。iRGD 脂质体显著提高了雄激素受体-反义寡核苷酸(AR-ASO)抑制皮下和胫骨内异种移植物生长的疗效。通过在 iRGD 脂质体中递送 AR-ASO,对肿瘤生长的抑制作用也显著延长[26]。

4.3. 归巢穿膜肽在抗病毒方面的应用

腺病毒是一种常见的呼吸道病毒,由于其高转导作用,通常被用作基因递送的载体,腺病毒受体包括柯萨奇-腺病毒受体(coxsackievirus and adenovirus receptors, CAR),本质是细胞间黏附因子, CAR 的表达水平在介导病毒感染方面发挥重要作用,腺病毒与 TAT、富含精氨酸或脯氨酸的归巢穿膜肽结合与未结合的腺病毒相比,在体外对 CAR 阴性细胞的转导增加了数倍[27]。有研究表明,穿膜归巢肽和 IgG 抗体结合,通过在细胞内靶向传递,使 TAT 穿膜肽在乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)抗体 9D11 的重链 C 末端表达,其表达不影响抗原结合活性和 Fc 介导的功能,通过 TRIM21 途径对 HBx 蛋白有很好的清除效果,体内膜型表明,9D11-TAT 能够显著降低转基因小鼠血清 DNA 水平[28]。

4.4. 归巢穿膜肽在皮肤疾病中的应用

皮肤作为人体阻挡外界环境的第一道防线发挥着重要作用,目前临床上一些皮肤疾病不能做到临床治愈。雷公藤及其系列产品在皮肤科得到广泛应用,取得良好效果。归巢穿膜肽 R7 修饰雷公藤甲素(TP)的 C-14 羧基,得到衍生物 TP-二硫-CR7 (TP-S-S-CR7)。该衍生物相比于 TP 具有低毒性,穿透能力更强,可穿过角质层,到达表皮、真皮,增加治疗药物的有效浓度[29]。

4.5. 归巢穿膜肽在药物递送中的作用

临床中大分子药物相比于小分子药物具有更高的靶向特异性, 在人体内停留时间更长, 较少的细胞毒性等特点, 同时也面临细胞内给药效率低下的问题, 有证据表明, 归巢穿膜肽多为阳离子多肽序列, 能够跨生物膜转运, 并在细胞内携带附着的货物, 因此被认为是通用的药物输送工具。归巢穿膜肽与大分子药物(比如药物和成像剂)结合, 可以增加它们的细胞内递送效率[30]。TAT 功能化近红外持久发光纳米粒子(PLNP-TAT)具有深层组织穿透功能, 可跟踪巨噬细胞归巢至炎症组织[31]。归巢穿膜肽作为递送载体将细胞毒性药物、脂质体药物、治疗性蛋白质、促凋亡肽、纳米粒、核酸和放射性核素等物质导入细胞, 提高药物在疾病治疗中的效果, 从而实现有效地靶向治疗。靶向治疗限制了药物对恶性组织的毒性作用, 从而提高药效, 减少药物的不良副作用。在靶向药物治疗中因为可以被细胞内化吸收, 并且能够携带有效物质进入细胞核, 因而发挥着重要的作用。

5. 总结与展望

目前归巢穿膜肽的研究处于发展阶段, 已有数百种归巢穿膜肽被人们发现, 随着对归巢穿膜肽研究的进一步认识, 在临床应用等方面取得了许多突破, 在肿瘤靶向治疗和肿瘤成像、真菌感染、病毒感染[32]、缺氧缺血性脑损伤[33]、增强药物吸收、炎症免疫治疗等研究领域均具有良好的应用前景。目前对于归巢穿膜肽的研究和应用还存在欠缺, 对归巢穿膜肽的归巢、穿膜机制了解得不是很全面, 不能获得高效率的临床应用, 由于归巢穿膜肽具有天然的成孔倾向和高疏水力矩, 不可逆地破坏脂质双分子层, 因此具有细胞毒性作用[34]。此外, 归巢穿膜肽携带分子在囊泡中的释放效率、免疫原性、稳定性[35]等问题还需要解决。

参考文献

- [1] Zhang, D., Wang, J. and Xu, D. (2016) Cell-Penetrating Peptides as Noninvasive Transmembrane Vectors for the Development of Novel Multifunctional Drug-Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, **229**, 130-139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.020>
- [2] Kurrikoff, K., Vunk, B. and Langel, Ü. (2021) Status Update in the Use of Cell-Penetrating Peptides for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **21**, 361-370. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1823368>
- [3] He, B., Dzisoo, A.M., Derda, R. and Huang, J. (2019) Development and Application of Computational Methods in Phage Display Technology. *Current Medicinal Chemistry*, **26**, 7672-7693. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180629123117>
- [4] He, B., Jiang, L., Duan, Y., Chai, G., Fang, Y., Kang, J., et al. (2018) Biopanning Data Bank 2018: Hugging Next Generation Phage Display. *Database*, **2018**, Article No. bay032. <https://doi.org/10.1093/database/bay032>
- [5] 郭超, 左琪, 杨晓峰, 张帆. 体内噬菌体展示技术筛选人髓样乳腺癌 Bcap-37 细胞特异性结合肽及其性质、结合效果研究[J]. *肿瘤研究与临床*, 2020, 32(2): 79-84.
- [6] 梅隽彦. 基于细胞穿膜肽的药物递送研究进展[J]. *广州化学*, 2020, 45(2): 64-75.
- [7] Guidotti, G., Brambilla, L. and Rossi, D. (2017) Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences*, **38**, 406-424. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>
- [8] 彭志荣, 夏新华, 颜红. 细胞穿透肽修饰脂质体的抗肿瘤靶向给药研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(11): 1275-1280.
- [9] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinician*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [10] 谢洋洋, 王邵娟, 袁权, 夏宁邵. 细胞穿膜肽研究应用的新进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1162-1173.
- [11] Diakova, G.B., Du, Z. and Klibanov, A.L. (2020) Targeted Ultrasound Contrast Imaging of Tumor Vasculature with Positively Charged Microbubbles. *Investigative Radiology*, **55**, 736-740.

- <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000699>
- [12] Stanzl, E.G., Trantow, B.M., Vargas, J.R. and Wender, P.A. (2013) Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications. *Accounts of Chemical Research*, **46**, 2944-2954. <https://doi.org/10.1021/ar4000554>
- [13] Nguyen, L.T., Yang, X.Z., Du, X., Wang, J.-W., Zhang, R., Zhao, J., *et al.* (2015) Enhancing Tumor-Specific Intracellular Delivering Efficiency of Cell-Penetrating Peptide by Fusion with a Peptide Targeting to EGFR. *Amino Acids*, **47**, 997-1006. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1928-y>
- [14] Lindgren, M., Rosenthal-Aizman, K., Saar, K., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Sassian, M., *et al.* (2006) Overcoming Methotrexate Resistance in Breast Cancer Tumour Cells by the Use of a New Cell-Penetrating Peptide. *Biochemical Pharmacology*, **71**, 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.048>
- [15] Xu, Y.Y., Cao, X.W., Fu, L.Y., Zhang, T.-Z., Wang, F.-J. and Zhao, J. (2019) Screening and Characterization of a Novel High-Efficiency Tumor-Homing Cell-Penetrating Peptide from the Buffalo Cathelicidin Family. *Journal of Peptide Science*, **25**, Article No. e3201. <https://doi.org/10.1002/psc.3201>
- [16] Laakkonen, P. and Vuorinen, K. (2010) Homing Peptides as Targeted Delivery Vehicles. *Integrative Biology*, **2**, 326-337. <https://doi.org/10.1039/c0ib00013b>
- [17] Sugahara, K.N., Teesalu, T., Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Agemy, L., Girard, O.M., *et al.* (2009) Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell*, **16**, 510-520. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.013>
- [18] Song, Y., Xu, M., Li, Y., Li, Y., Gu, W., Halimu, G., *et al.* (2020) An iRGD Peptide Fused Superantigen Mutant Induced Tumor-Targeting and T Lymphocyte Infiltrating in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*, **586**, Article ID: 119498. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3529437>
- [19] Reissmann, S. and Filatova, M.P. (2021) New Generation of Cell-Penetrating Peptides: Functionality and Potential Clinical Application. *Journal of Peptide Science*, **27**, Article No. e3300. <https://doi.org/10.1002/psc.3300>
- [20] Ciobanasu, C., Dragomir, I. and Apetrei, A. (2019) The Penetrating Properties of the Tumor Homing Peptide LyP-1 in Model Lipid Membranes. *Journal of Peptide Science*, **25**, Article No. e3145. <https://doi.org/10.1002/psc.3145>
- [21] Jiang, W., Jin, G., Ma, D., Wang, F., Fu, T., Chen, X., *et al.* (2012) Modification of Cyclic NGR Tumor Neovascularization-Homing Motif Sequence to Human Plasminogen Kringle 5 Improves Inhibition of Tumor Growth. *PLoS ONE*, **7**, Article ID: e37132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037132>
- [22] Araki, D., Takayama, K., Inoue, M., Watanabe, T., Kumon, H., Futaki, S., *et al.* (2010) Cell-Penetrating D-Isomer Peptides of p53 C-Terminus: Long-Term Inhibitory Effect on the Growth of Bladder Cancer. *Urology*, **75**, 813-819. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.10.002>
- [23] Kang, R.H., Jang, J.E., Huh, E., Kang, S.J., Ahn, D.-R., Kang, J.S., *et al.* (2020) A Brain Tumor-Homing Tetra-Peptide Delivers a Nano-Therapeutic for More Effective Treatment of a Mouse Model of Glioblastoma. *Nanoscale Horizons*, **5**, 1213-1225. <https://doi.org/10.1039/D0NH00077A>
- [24] Zhang, D., Chu, Y., Qian, H., Qian, L., Shao, J., Xu, Q., *et al.* (2020) Antitumor Activity of Thermosensitive Hydrogels Packaging Gambogic Acid Nanoparticles and Tumor-Penetrating Peptide iRGD against Gastric Cancer. *International Journal of Nanomedicine*, **15**, 735-747. <https://doi.org/10.2147/IJN.S231448>
- [25] Hurtado de Mendoza, T., Mose, E.S., Botta, G.P., Braun, G.B., Kotamraju, V.R., French, R.P., *et al.* (2021) Tumor-Penetrating Therapy for $\beta 5$ Integrin-Rich Pancreas Cancer. *Nature Communications*, **12**, Article No. 1541. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21858-1>
- [26] iRGD-Liposomes Enhance Tumor Delivery and Therapeutic.
- [27] Kida, S., Eto, Y., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kawasaki, K. and Maeda, M. (2010) Evaluation of Synthetic Cell-Penetrating Peptides, Pro-Rich Peptide and Octaarginine Derivatives, as Adenovirus Vector Carrier. *Protein & Peptide Letters*, **17**, 164-167. <https://doi.org/10.2174/092986610790225978>
- [28] Zhang, J.F., Xiong, H.L., Cao, J.L., Wang, S.J., Guo, X.R., Lin, B.Y., *et al.* (2018) A Cell-Penetrating Whole Molecule Antibody Targeting Intracellular HBx Suppresses Hepatitis B Virus via TRIM21-Dependent Pathway. *Theranostics*, **8**, 549-562. <https://doi.org/10.7150/thno.20047>
- [29] Tian, T., Song, Y., Li, K., Sun, Y. and Wang, Q. (2018) Synthesis, Characterization, and Evaluation of Triptolide Cell-Penetrating Peptide Derivative for Transdermal Delivery of Triptolide. *Molecular Pharmaceutics*, **15**, 560-570. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00914>
- [30] 夏艳梅, 于思远, 杨晗, 李廷栋. 细胞穿膜肽介导生物大分子入胞机制研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(10): 82-89.
- [31] van der Schot, G. and Bonvin, A.M. (2015) Performance of the WeNMR CS-Rosetta3 Web Server in CASD-NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, **62**, 497-502. <https://doi.org/10.1007/s10858-015-9942-7>

-
- [32] Copolovici, D.M., Langel, K., Eriste, E. and Langel, Ü. (2014) Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano*, **8**, 1972-1994. <https://doi.org/10.1021/nn4057269>
- [33] Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., *et al.* (2015) The Role of Inflammation in Perinatal Brain Injury. *Nature Reviews Neurology*, **11**, 192-208. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.13>
- [34] Kardani, K. and Bolhassani, A. (2021) Exploring Novel and Potent Cell Penetrating Peptides in the Proteome of SARS-COV-2 Using Bioinformatics Approaches. *PLoS ONE*, **16**, Article ID: e0247396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247396>
- [35] Gessner, I. and Neundorf, I. (2020) Nanoparticles Modified with Cell-Penetrating Peptides: Conjugation Mechanisms, Physicochemical Properties, and Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 2536. <https://doi.org/10.3390/ijms21072536>