

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-094

类弹性蛋白多肽的生物合成及其药物递送应用

杨兆颖^{1,2}, 张帆^{1,2}, 郭建文^{1,2}, 高卫平¹(¹ 北京大学跨学部生物医学工程系, 北京 100191; ² 北京大学医学部医学技术研究院, 北京 100191)

摘要: 类弹性蛋白多肽 (elastin-like polypeptide, ELP) 是一种衍生于天然弹性蛋白, 可人工合成的多肽聚合物。ELP具有特殊的温度响应性, 它会随温度的变化表现出可逆相转变行为, 并且当它与其他小分子或多肽偶联时, 该温敏特性可以被充分保留。借助基因工程可以人工合成ELP与ELP融合蛋白, 精确调控ELP的结构与功能, 在其序列中添加反应性氨基酸或多肽。同时, ELP由天然氨基酸组成, 其生物相容性好, 易于生物降解, 免疫原性低, 无毒性作用。基于以上优势, ELP已被广泛应用于蛋白的表达纯化、体外诊断、药物递送和组织工程等生物医药领域。本文结合国内外研究报道, 简要介绍了ELP的设计原理、理化特性和生物合成方法, 并列了一些ELP应用于药物递送系统中有代表性的工作, 最后总结了该研究领域面临的挑战和问题。

关键词: 类弹性蛋白; 融合蛋白; 相转变; 生物材料; 药物递送

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Biosynthesis of elastin-like polypeptides and their applications in drug delivery

YANG Zhaoying^{1,2}, ZHANG Fan^{1,2}, GUO Jianwen^{1,2}, GAO Weiping¹

(¹ Biomedical Engineering Department, Peking University, Beijing 100191, China; ² Institute of Medical Technology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract: Elastin-like polypeptides (ELPs) are artificially synthetic peptide polymers inspired by human elastin. ELPs are composed of repeat units of a Val-Pro-Gly-X-Gly, where X can be any amino acid except proline, and they can exhibit different biological functions along with X residue changes. ELPs are thermally responsive and demonstrate lower critical solution temperature phase behavior. They are soluble at temperatures below a characteristic transition temperature (T_c) and reversibly phase separate into an insoluble, coacervate phase above the T_c . Moreover, the phase behavior is retained when the ELP is either genetically fused to peptides or covalently conjugated to small molecules, and this phase behavior can be adjusted through changing X residue and chain length of ELPs. As ELPs are typically produced from synthetic genes, the structure and function of ELPs can be accurately regulated through genetic engineering. The amino acids or peptides with reactive side chains can be incorporated into ELPs through

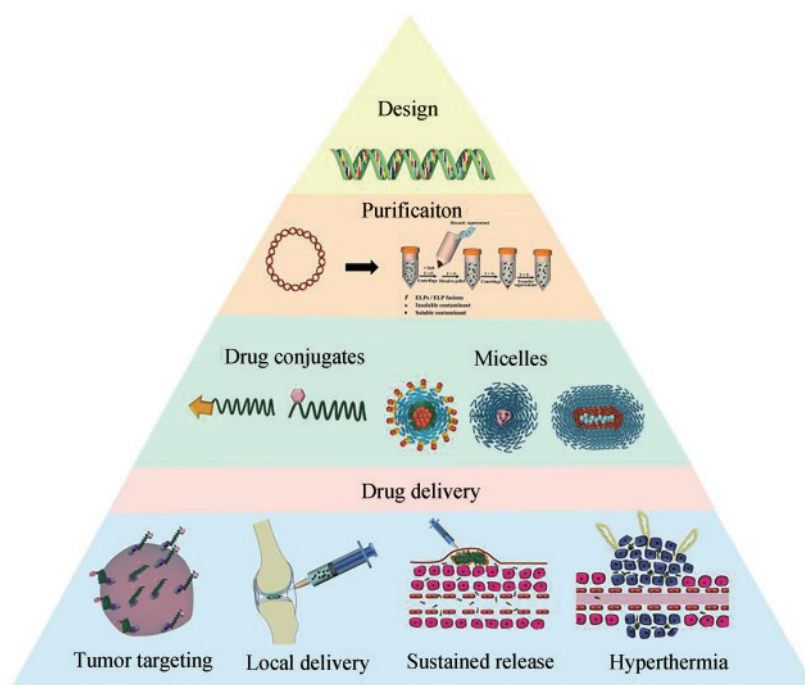
收稿日期: 2021-09-27 修回日期: 2021-11-11

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (81991505)

引用本文: 杨兆颖, 张帆, 郭建文, 高卫平. 类弹性蛋白多肽的生物合成及其药物递送应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 728-747

Citation: YANG Zhaoying, ZHANG Fan, GUO Jianwen, GAO Weiping. Biosynthesis of elastin-like polypeptides and their applications in drug delivery [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 728-747

recombination synthesis as well. This precision control over ELP is unmatched by synthetic polymers. Based on these properties, ELPs can be engineered to assemble into unique architecture and used as soluble macromolecular carriers, therapeutic drug depots, hyperthermia-targeted drug carriers and self-assembled micelles. Lastly, as ELPs are derived from natural protein sequences, they show desirable biological properties including excellent biocompatibility, low immunogenicity, and non-toxic effects. Due to these attributes, ELPs have been widely used in biomedical fields including protein expression and purification, *in vitro* diagnosis, drug delivery and tissue engineering. By focusing primarily on applications of ELPs in drug delivery, this review introduces the design principles, physicochemical properties, biosynthetic methods of ELPs and ELP conjugates, as well as exemplifies representative applications of ELPs in drug delivery, as extending the half-life of drugs, tumor targeted delivery, local delivery, hyperthermia-targeted delivery and sustained released of the drugs *in vivo*. Challenges and problems faced in this emerging field are discussed at the end of this review.



Keywords: elastin like polypeptides; fusion protein; phase transition; biomaterials; drug delivery

好的药物递送系统有助于提高药物疗效，扩展药物的应用范围。医药领域的发展依赖于药物递送技术的进步。通过合适的药物递送策略可以增强药物吸收，提高药物的生物利用率；控制药物释放，延长治疗周期并降低毒副作用；制作靶向药物，实现精准治疗^[1]。药物递送系统的发展依赖于药物递送材料的广泛开发，类弹性蛋白多肽（elastin-like polypeptide, ELP）作为一种新兴的药物递送材料是目前的研究热点之一。

弹性蛋白（elastin）是结缔组织中常见的细胞外基质蛋白，主要为动脉、韧带、肺和皮肤等组织提供弹性^[2]。受弹性蛋白启发，Urry实验室^[3]合成了ELP序列，它衍生于弹性蛋白的疏水区，主要由五肽重复单元（Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, VPGXG）串联而成^[4]，其中，Xaa是除脯氨酸外的任意氨基酸。由于不同的氨基酸具备不同的结构与功能，ELP可随Xaa的改变表现出不同的生物功能。ELP通过基因工程技术制备，它的分子量、

组成、分散性完全精确可控，并可通过DNA重组技术在其序列中添加反应性氨基酸或多肽，能够依据药物特性来进行功能化定制。ELP还具有特殊的温度响应性，ELP会随温度的变化表现出可逆相转变（phase transition）行为，当温度低于其相转变温度（transition temperature, T_1 ）时，ELP呈可溶状态，当温度高于其 T_1 时，ELP呈不溶的聚集状态^[5]，可以通过改变ELP中的Xaa和五肽序列重复数目来控制其 T_1 ^[6]，并且，当ELP与其他小分子药物或多肽偶联时，该特性可以充分保留。基于ELP的特性，ELP可被用来延长药物半衰期、改善药物溶解性、进行肿瘤的靶向治疗、药物的局部递送以及药物在体内的缓释等。同时，由于ELP来源于天然弹性蛋白，其序列无毒、无免疫原性、可降解、具有良好的生物相容性^[7]，使ELP成为递送小分子药物或蛋白药物的理想材料^[8]。

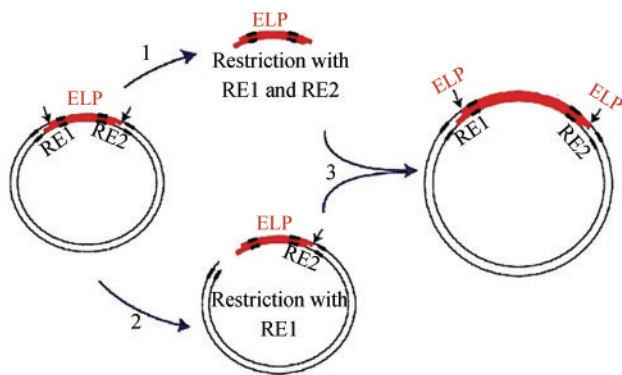
本文聚焦ELP，介绍了ELP的构建方法、ELP与ELP融合蛋白提纯方法，归纳了ELP在药物递送中的设计思路和递送策略，并列举了其中一些较有代表性的一些工作，最后，本文总结了ELP的优势并提出了展望。

1 ELP的构建

早期的ELP合成使用混合酸酐法^[9]，但是该方法往往受限于ELP的重复单元数目，并且在合成工程中会产生大量副产物，目前已逐步被异源表达方

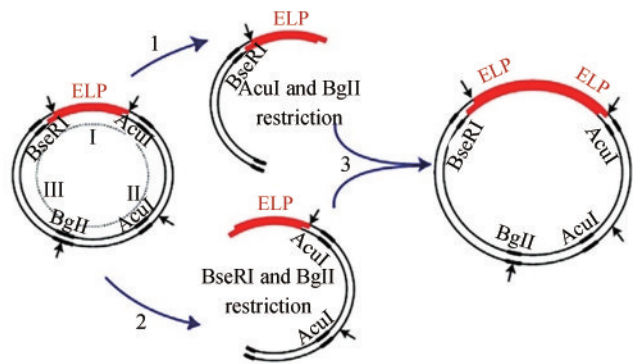
法取代。1992年，Urry实验室^[3]首次通过大肠杆菌表达获得了ELP(V)₂₀，但是该方法需要通过单酶切的方式向载体内插入ELP(V)₁₀基因，而单酶切存在基因序列反向插入以及载体环化等缺点，因此合成含有较多重复序列的ELP是该领域面临的巨大挑战。为解决这一问题，Urry实验室^[10-11]通过串联连接反应（concatenation ligation reaction）构建了ELP(V)₁₂₁，并借助大肠杆菌系统成功表达。该反应耗时较短，ELP单体基因可通过重叠的黏性末端连接，最终形成含有多个重复序列的基因。但该反应过程并不能精确控制ELP的长度，易形成不同长度的DNA寡聚物，后续需要使用琼脂糖凝胶电泳对多个片段进行分离，极大降低了成功率。

2002年，Chilkoti实验室^[12]开发了定向递归连接（recursive directional ligation, RDL）技术，通过多步单酶切将ELP单体基因或寡聚基因插入线性化载体中，从而精确合成具有特定序列长度的ELP [图1(a)]。除此之外，由于该方法的模块化特征，可实现ELP与其他蛋白质的融合，且融合顺序可自由定义。然而单酶切反应会导致ELP片段反向插入、多个插入以及载体的自连接等问题，影响连接效率。为了解决以上问题，Chilkoti实验室^[13]在RDL的基础上，引入了第2个酶切位点，进一步发展了通过质粒重建的定向递归连接（recursive directional ligation by plasmid reconstruction, PRe-RDL） [图1(b)]。该方法有效克服了RDL带来的问题，已经成为构建ELP最常用的手段。



(a) 定向递归连接(RDL)技术构建ELPs的示意图^[12]

(a) Schematic of ELPs construction by Recursive directional ligation (RDL)^[12]



(b) 质粒重建的定向递归连接(PRe-RDL)技术构建ELPs的示意图^[13]

(b) Recursive directional ligation by plasmid reconstruction^[13]

图1 ELP构建示意图

Fig. 1 Schematic of ELP construction

与此同时, Chilkoti 实验室^[14]还开发了另一种快速、高通量且一步即可完成的用于合成 ELP 基因的方法, 即重叠延伸滚环扩增 (overlap extension rolling circle amplification, OERCA)。该方法使用环状 ssDNA 为模板, 构建大量不同长度的线性 ssDNA, 并以此为模板, 通过聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进一步延长基因长度。OERCA 是一种强大的方法, 可用于构建不同序列长度的 ELP 文库。但是该方法仅限于合成序列组成较简单的 ELP, 不能合成序列复杂的 ELP (如能形成自组装体的二嵌段 ELP)。

2016 年 Chilkoti 实验室^[15]提出一种新方法, 该方法利用密码子的简并性, 通过密码子加扰算法优化 ELP 中基因, 使用基因特异性引物用于 PCR 扩增, 减少聚合酶反应过程中重复编码序列交叉杂交或者脱靶反应的发生。该方法极大解决了高度重复编码序列的合成问题, 将成为一种新的构建 ELP 的方法。

研究者可以根据所设计的 ELP 序列及现有实验条件选择合适自己的合成方案。在合成序列简单的 ELP 时, 可选用 OERCA 法^[14], 这种方法的实验周期短, 可以帮助研究者更快拿到目的序列。在设计合成全新、相对复杂的 ELP 序列时, 可用 Chilkoti 实验室^[15]提供的算法优化密码子后进行基因序列合成, 这种方法可以精准定制 ELP 的序列, 但基因合成时间和资金成本相对高。利用 PRe-RDL 法^[13], 研究者可以利用实验室已有的 ELP 序列, 得到不同组合、不同长度的 ELP 序列, 也可以合成并引入新的 ELP 序列, 但对于结构复杂的 ELP, 需要的反应次数较多。

2 ELP 的温度响应性及其影响因素

ELP 具有特殊的温度响应性, 温度升高后 ELP 的有序程度增加, 这一过程与温度升高时物质混乱程度增加的情况相反, 因此被称作逆温度相转变 (inverse temperature transition)^[16]。ELP 在 T_i 温度以下呈可溶状态; 在 T_i 温度以上呈不溶的聚集状

态, 并且这种相变是可逆的。

影响 ELP T_i 的因素分为两类: 一类是 ELP 本身的特性, 包括 ELP 的浓度、氨基酸组成、侧链的修饰情况 (如离子化、氧化还原、磷酸化、光化学反应等); 另一类是外在条件, 包括溶剂环境中的盐离子、有机溶剂和外界压力等^[17]。Urry 实验室^[18]量化了 Xaa 对 ELP T_i 的影响, 并称之为“ ΔT_i 效应” (ΔT_i effect)。简言之, 就是引入带有亲水性侧链的氨基酸 (如丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和赖氨酸) 会提高 ELP 的 T_i , 而引入带有疏水性侧链的氨基酸会降低 ELP 的 T_i 。当 Xaa 为可电离的氨基酸 (如谷氨酸和组氨酸) 时, 由于这类氨基酸会随溶液 pH 变化发生质子化或去质子化, ELP 的相变行为会受溶液 pH 的影响。Xaa 带电荷时 ELP 的 T_i 会升高, 不携带电荷时 ELP 的 T_i 降低。研究者可以参考上述结论, 进行 ELP 序列设计或调整, 更有效地将其应用于药物递送或其他领域。

3 ELP 的纯化

ELP 特有的温度响应性为 ELP 的纯化提供了方便。1995 年, Urry 实验室^[11]通过大肠杆菌成功表达 ELP 之后, 首次利用 ELP 的温度响应性对其进行了提纯, 发现一轮的相变反应即可得到纯度 >95% 的 ELP。随后, Chilkoti 实验室^[19-20]利用该原理开发了一种用于纯化带有 ELP 标签的可溶性融合蛋白的方法, 并将其命名为逆相转变循环 (inverse transition cycling, ITC)。如图 2 所示, ITC 包括 3 个主要步骤: 第一, 裂解已表达 ELP 的细胞, 在低于 T_i 的温度下离心以除去细胞碎片; 第二, 收集含有可溶性 ELP 的上清液并通过升温 and 加盐使 ELP 发生相变、聚集, 离心并收集含有 ELP 的沉淀组分; 第三, 用预冷的缓冲液溶解包含 ELP 的沉淀组分, 然后在低于 T_i 的温度下离心以去除不溶性杂蛋白, 剩余溶液组分即为纯化的 ELP 组分。相比于色谱柱纯化, ITC 具有纯化方式简单、成本低廉、易于大规模放大等优势, 目前该 ELP 标签已经广泛应用于多种重组蛋白的表达和提纯^[20-21]。

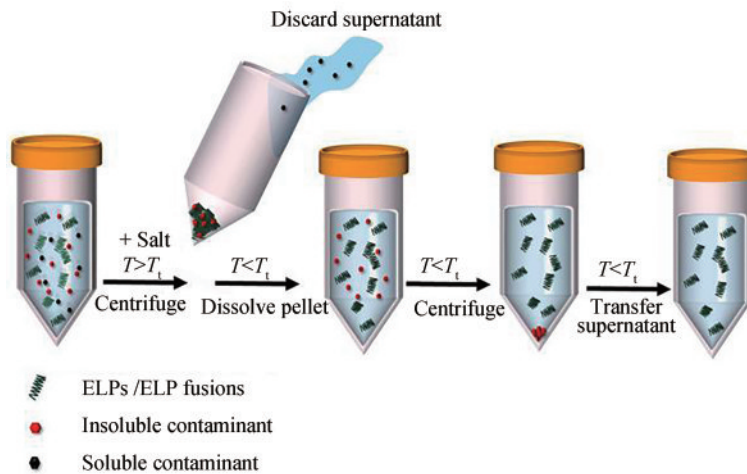


图2 逆相转变循环 (ITC) 纯化ELP与ELP融合蛋白示意图

Fig. 2 Purification of elastin-like polypeptides (ELPs) and ELP fusions by inverse transition cycling

4 ELP在药物递送方面的应用

4.1 ELP分子用于延长药物体内循环半衰期

小分子类药物分子量小，在体内很快就被代谢清除，需要高频给药才能达到治疗效果，这就伴随了剂量相关的药物毒副作用。同时，疏水类小分子药物还由于其较差的溶解度，难以达到需要的给药剂量而大大限制了其应用^[22]。虽相较于小分子药物，蛋白药物特异性强、活性高、副作用小，但是蛋白药物也面临着理化性质不稳定、易被蛋白酶水解、循环半衰期短、免疫原性等问题^[23-24]。目前，常用聚乙二醇 [poly(ethylene glycol), PEG] 修饰方法来增大药物的分子体积，减少肾小球的滤过作用，延长药物的体内循环半衰期^[25]。但PEG化修饰也存在局限性，比如PEG无法在体内降解，而ELP作为一种以氨基酸为基元的生物大分子，能生物降解成身体所需的氨基酸，ELP可以作为一个不错的生物材料用来改善药物特性，延长药物半衰期，降低药物副作用。

4.1.1 ELP分子延长小分子药物体内半衰期

ELP的序列精确可控，通过基因工程设计位点特异性偶联反应性残基，可实现ELP与小分子药物的共价偶联。阿霉素 (DOX) 是一种用于治疗肿瘤的化疗药物，属于小分子药物，DOX频繁的给药会伴有严重的心脏毒性和胃肠道毒性^[26]，限制了其临床应用。有研究使用ELP序列中的赖氨酸

酸^[27]和半胱氨酸^[28-29]残基作为独特反应位点进行ELP与DOX的偶联。并且，研究者通过在ELP与DOX之间引入的可断裂的连接子，如酸敏性的脲键^[27]或组织蛋白酶可切割的GFLG肽^[29]等，使得ELP药物偶联物被细胞摄取后，在酸性、富含酶的核内体和溶酶体中释放出游离的药物 [图3(a)]。在此基础上，通过基因工程连接靶向肽或细胞表面受体的配体到ELP药物偶联物上，可进一步将药物靶向呈递到病理组织而增强药物的特异性 [图3(b)]。Moktan等^[30]将ELP的C端的半胱氨酸残基与DOX的前体药物的脲键共价偶联，然后用细胞穿透肽 SynB1 修饰ELP的N端以增强肿瘤内和细胞内的摄取^[31-33]，这种共价偶联修饰提高了DOX的循环半衰期，使偶联药物的半衰期达到了游离DOX的10倍。SynB1-ELP-DOX偶联物不仅能逃避肾脏清除，还通过增强的通透性和滞留效应 (EPR, enhanced permeability and retention effect) 渗入和富集在肿瘤组织附近，表现出明显优于DOX的抗肿瘤功效。

4.1.2 ELP分子延长蛋白药物体内半衰期

ELP融合蛋白可以通过基因工程技术直接获得，无需其他额外的反应步骤，运用这种方法来改善蛋白药物特性非常简单方便，并且已在多种蛋白类药物上获得了成功。肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF) 是一种促炎症细胞因子，参与多种慢性和急性炎症疾病，比如类风湿性关节炎、败血症、克罗恩病^[34-36]。TNF由活化

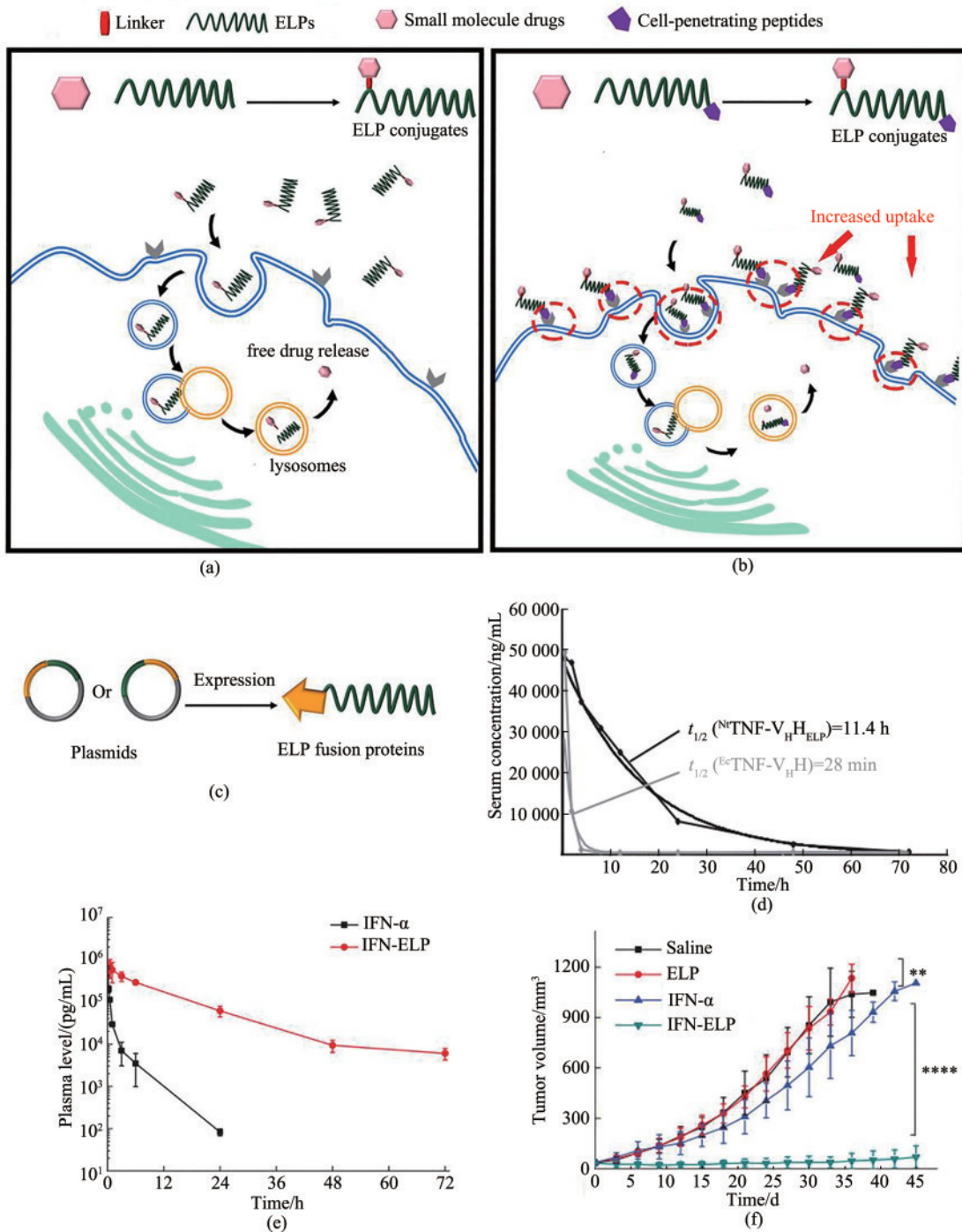


图3 ELP用于延长药物体内循环半衰期

(a) ELP与小分子药物共价偶联，并可由连接子处断裂释放出游离药物；(b) 小分子药物与带有靶向序列的ELP偶联，增强了肿瘤细胞对药物的摄取；(c) 通过基因工程合成ELP融合蛋白的示意图；(d) ^{125}I -TNF- V_H -ELP静脉注射到小鼠后物的药代动力学图^[43]；(e, f) 静脉注射IFN-ELP与IFN的药代动力学(e)和肿瘤抑制情况(f)^[44]

Fig. 3 ELPs applications in extending half-life of drugs

(a) Chemically conjugated ELP to small molecule drugs by inclusion of an intervening cleavable linker which releases the free drug intracellularly after endocytic uptake and accumulation in the acidic, enzyme-rich environment of endosomes and lysosomes; (b) Enhanced cellular uptake of ELP conjugates by functionalization of ELP with cell-penetrating peptides; (c) Schematic of ELP genetically fused to peptide and protein drugs; (d) Pharmacokinetics of ^{125}I -TNF- V_H -ELP^[43]; (e, f) Pharmacometabolic kinetics (e) and *in vivo* antitumor efficacy (f) after intravenous injections with IFN α -ELP and IFN α ^[44]

的单核细胞、T细胞和内皮细胞等非免疫细胞表达^[37-39]。人源化TNF可以与细胞表面TNF受体1(TNFR1, p55)或TNF受体2(TNFR2, p75)结合,从而介导下游细胞内级联反应^[40]。TNF抗体可以中和人源和鼠源TNF,从而抑制TNF与受体的结合^[41-42]。TNF抗体的血清半衰期较短(约为28 min)^[43],为了延长TNF抗体在体内作用时间,Conrad等^[43]将肿瘤坏死因子的抗体重链与ELP融合,合成融合蛋白^NTNF-V_HH_{ELP}。研究人员发现,由于融合蛋白的分子量较大,不会被肾小球滤出,因此,^NTNF-V_HH_{ELP}的体内循环半衰期比未融合ELP的TNF的抗体显著延长[图3(d)],并且可以在小鼠体内有效预防人源化TNF引起的败血症。

干扰素(IFN)是一种可广谱性抗病毒、抗细胞增殖并具有免疫调节功能的细胞因子,在临床上被广泛用来治疗病毒性疾病和癌症,但IFN半衰期短,稳定性差,频繁给药会造成严重的副作用,给病人带来很大的痛苦。Gao实验室^[44]通过基因工程技术将IFN与ELP融合,精准合成了IFN-ELP偶联物,并将此方法命名为ELP fusion[图3(c)]。ELP fusion方法的合成率高,且所合成的IFN-ELP结构精准可控。IFN-ELP不仅可以很好地保留IFN的生物活性(41%),而且显著提高了IFN的体内循环半衰期(8.6 h),IFN-ELP是IFN半衰期(0.3 h)的27.7倍[图3(e)],并表现出明显优于IFN的抗肿瘤功效[图3(f)]。此外,还有许多其他蛋白类药物同样存在稳定性差与半衰期短的问题,基于Gao建立的方法,研究者们可以很方便地运用ELP来改善其药物特性。

4.2 ELP构建药物储库

ELP具有特殊的温度响应性,并且可通过对ELP序列和长度的设计精准调控其相变温度。构建药物-ELP偶联物,并将其相转变温度调控到生理温度以下,使之经注射后在注射部位发生相变,形成聚集体药物储库,缓慢溶解并逐步释放进入循环系统[图4(a)、(b)]。可以设计能形成储库型的药物以缓释的方式实现药物的长效化或是用于药物的局部递送。

4.2.1 ELP储库应用于药物缓释

胰高血糖素样肽1(GLP-1)等肽类药物已显示出治疗2型糖尿病的前景,但是它会被体内的二肽基肽酶(DPPIV)降解而失去生物活性,药物半衰期约2 min,需要频繁给药来维持治疗效果,严重影响患者的依从性^[45-46]。为了解决GLP-1药物的这一缺点,Chilkoti实验室^[47]将相变温度低于体温的ELP与胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)融合,构建出经皮下注射即可在原位形成储库的(GLP-1)-ELP偶联物,并突变GLP-1中可被二肽基肽酶识别的氨基酸序列使其免于降解失活。虽然GLP-1仍可被中性内肽酶识别降解^[48],但大分子量的ELP影响了酶对GLP-1切割位点的识别,使(GLP-1)-ELP有抵抗中性内肽酶水解的效果,(GLP-1)-ELP在体内的稳定性优于GLP-1,并且经单次皮下注射后可持续5 d缓慢释放GLP-1,延长了用药周期,增加降血糖作用治疗效果,减轻患者痛苦。

用于治疗病毒性疾病和癌症的干扰素也存在作用周期短的问题,为此Gao实验室^[49]构建了干扰素ELP融合蛋白IFN-ELP(V),IFN-ELP(V)可在注射部位形成储库并缓释进入循环系统,经单次皮下给药后,IFN-ELP(V)缓释时间可达1个月之久[图4(c)]。并且将IFN-ELP(V)应用于脑肿瘤中最恶性的胶质母细胞瘤的免疫化学治疗时,治疗效果良好^[50]。虽然融合ELP标签后大幅延长了IFN在体内的作用时间,但是同时也降低了IFN的活性。为此,Gao等对构建的IFN-ELP(V)进行了进一步的优化设计,通过基因工程技术在IFN与ELP中插入基质金属蛋白酶底物(matrix metalloproteinase substrate, MMPS),构建了一种体温和基质金属蛋白酶双重响应的IFN-ELP偶联物[图4(c)]^[51]。高浓度IFN-MMPS-ELP(V)注入皮下后,展现出持续1个月的零级释放动力学[图4(d)、(e)],同时瘤内高表达的基质金属蛋白酶可以将IFN从ELP(V)上切割下来,在还原IFN活性的基础上提高了其肿瘤组织渗透性,皮下一次给药可消除37.5%小鼠的肿瘤[图4(f)],且未发现明显的副作用。

除了通过基因工程将药用蛋白与ELP构成融合蛋白外,还可以直接将药用蛋白封装进ELP储

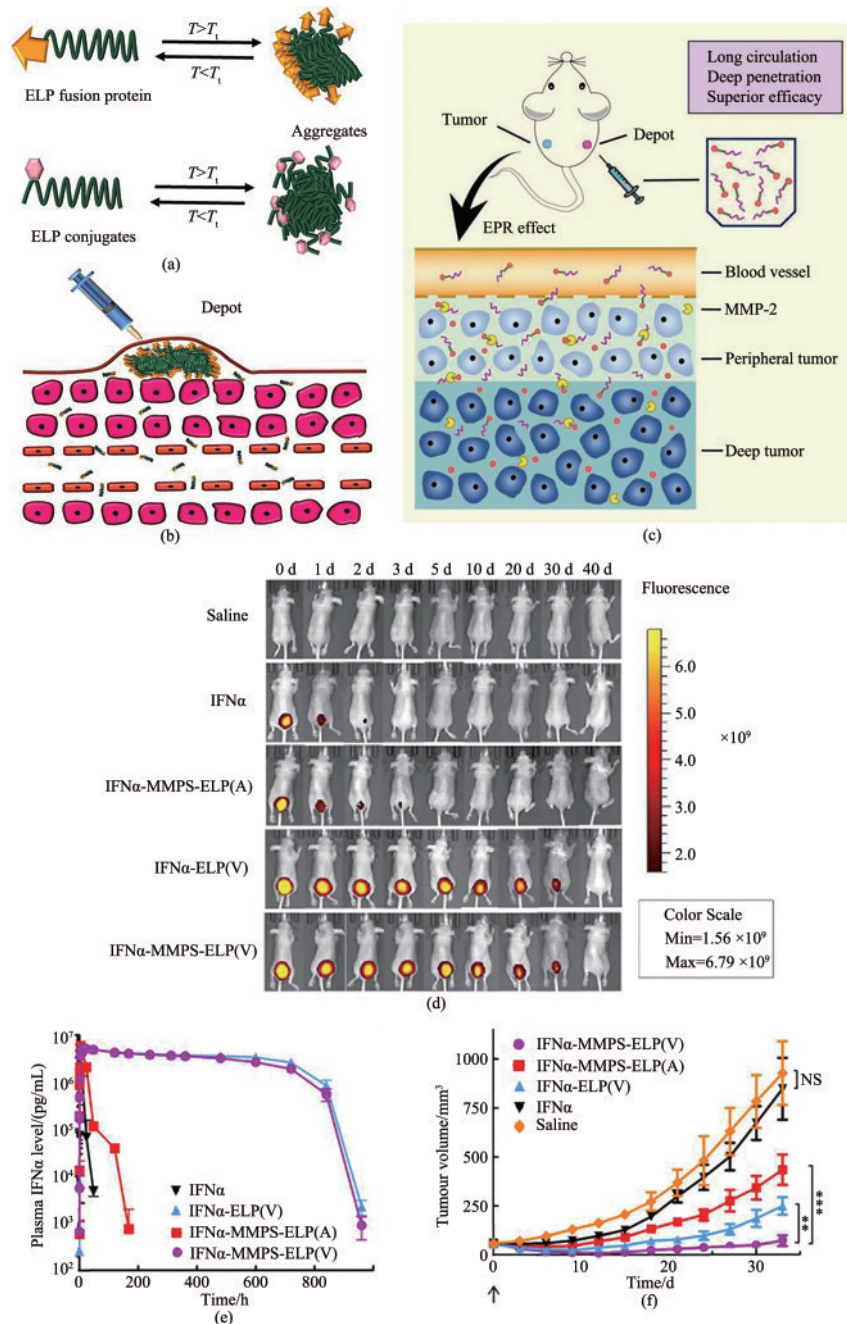


图4 温度响应性ELP的局部缓释

(a, b) 温度响应性药物-ELP融合蛋白、药物-ELP偶联物在高于相变温度后会发生相变，形成聚集体，经皮下注射原位形成储库，并以单分子形式缓释入血液循环系统；(c) 药物ELP偶联物可以通过EPR效应进入肿瘤，然后被MMP-2在肿瘤中分裂成游离的IFN α 和ELP(V)，从而增强肿瘤的穿透性和抗肿瘤疗效^[51]；(d) 以MTD皮下注射Cy5标记的IFN α -MMPS-ELP(V)、IFN α -MMPS-ELP(A)、IFN α -ELP(V)和IFN α 后的小鼠活体荧光成像；(e, f) 以MTD皮下注射IFN α -MMPS-ELP(V)、IFN α -MMPS-ELP(A)、IFN α -ELP(V)和IFN α 的药物代谢动力学(e)和抗肿瘤治疗效果(f)

Fig. 4 Depot-forming ELP for drug delivery

(a, b) Drugs form a subcutaneous insoluble coacervate upon injection and slowly dissolve from their surface to their core, steadily releasing the therapeutic into circulation; (c) The drug ELP conjugates can get into a tumor through the EPR effect and then be cleaved into free IFN α and ELP(V) by MMP-2 in the tumor, resulting in enhanced tumor penetration and antitumor efficacy^[51]; (d) Fluorescence imaging of mice following MTD subcutaneous injection of Cy5-labeled IFN α -MMPS-ELP(V), IFN α -MMPS-ELP(A), IFN α -ELP(V) and IFN α ; (e, f) pharmacokinetics (e) and antitumor efficacy (f) of mice after subcutaneous injections of IFN α -MMPS-ELP(V), IFN α -MMPS-ELP(A), IFN α -ELP(V) and IFN α at their MTDs.

库中, 来实现药用蛋白在储库中的缓慢释放。白介素受体拮抗剂 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 用于治疗风湿性关节炎, 它通过与白介素受体竞争性结合白介素, 抑制白介素发挥促炎作用。但是由于 IL-1Ra 分子量较小, 容易从关节间隙被清除, 其半衰期仅为 2~6 h^[52], 需要频繁给药才能达到治疗效果, 这样会增加病人的疼痛感, 降低病人的依从性。为此, Kimmerling 等^[53] 将 IL-1Ra 封装进交联的 ELP 中, 在低于相转变温度 T_i 时, ELP 以可溶形式存在, 而当温度升高至 T_i 以上后, ELP 可以自发包裹小分子药物^[54-55]。实验结果证明, 在交联 ELP 的作用下, IL-1Ra 实现了 5 d 的持续释放, 并有效减少了关节软骨变性和滑膜炎。

无论是直接构建 ELP 融合蛋白, 还是将蛋白封装到 ELP 储库中均可以很好地实现药物的缓释, 本策略设计的关键是要同时保留 ELP 的相变特性和蛋白的生物学活性。还可以进行更加灵活的设计来进一步优化药物的作用, 比如, Gao 实验室^[51] 在药物与 ELP 间插入 MMPS 序列, 在肿瘤中 MMPS 被切割并释放出游离的药物, 进一步提高了药物活性。未来可以在已有工作基础上加入更多的设计, 赋予药物更多的功能。

ELP 还可以用于缓释小分子药物, 如姜黄素。姜黄素来源于草药姜黄根茎, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗癌活性^[56-58], 但是姜黄素的水溶性差、体内生物利用度低, 导致它尚未被批准为治疗剂^[56]。Sinclair 等^[59] 通过化学修饰姜黄素, 合成水溶性好的单官能的氨基甲酸酯, 使其可以与 ELP 偶联, 最终合成了热响应性的 ELP-curcumin 偶联物。在小鼠坐骨神经近端肌肉注射该偶联物, 在小鼠体内形成了储库, 注射后 4 d 内持续释放姜黄素。Sinclair 利用 ELP 不仅成功解决了小分子药物姜黄素水溶性差的问题, 同时还实现了药物的缓释。

4.2.2 ELP 储库应用药物的局部递送

还有一些药物不适合全身用药, 因为其作用到非靶向组织器官时, 会引起严重的副作用, 例如重组人 BMP-2 (recombinant human BMP-2, rhBMP-2), 它属于骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs), 具有包括成骨作用在内的多种功能, 可用来治疗骨损伤^[60]。但

rhBMP-2 扩散到其他部位会导致异位骨的形成及严重的炎症反应^[61], 极大限制了 rhBMP-2 的应用。针对这一问题, McCarthy 等^[62] 利用 ELP 设计了一种储库型 rhBMP-2 融合蛋白: rhBMP-2-ELP (V40C2), 实现了 rhBMP-2 的局部递送。rhBMP-2-ELP (V40C2) 同时保留了 BMP-2 的成骨潜能和 ELP 的相变特性, 药物经注射后可在注射部位发生相变形成聚集簇储库, 从而限制其向非靶向组织部位的扩散, 能有效防止异位骨形成 (图 5)。虽然 rhBMP-2-ELP (V40C2) 的生物活性仅在 C2C12 细胞中进行了检测, 还需要进一步建立动物模型来验证其具体的治疗效果和对副作用的降低程度, 但这确实提供了一种利用 ELP 来进行药物局部递送思路, 对于不适合全身给药的药物可以通过 ELP 的修饰进行局部递送, 降低药物副作用。

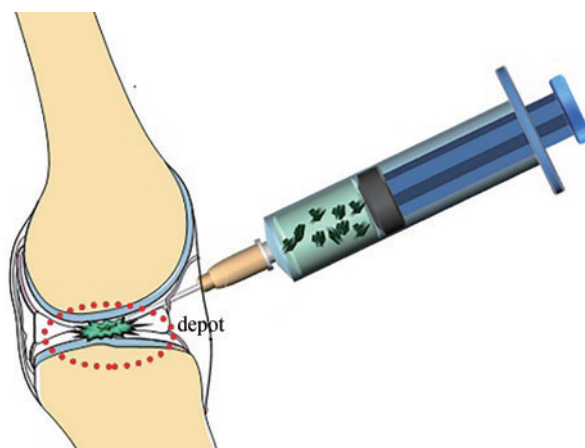


图5 温度响应性 ELP 用于局部递送

(药物注射后在原位形成储库, 限制了向非靶向组织的扩散)

Fig. 5 ELP applied to local delivery

(Reservoirs were formed *in situ* after drug injection, reducing diffusion to non-targeted tissues.)

4.3 ELP 用于肿瘤热靶向治疗

相转变温度略高于体温的 ELP (41 °C 左右) 与药用蛋白融合后, 可以通过对肿瘤组织进行局部加热 (41~45 °C), 利用 ELP 的相转变过程实现药用蛋白-ELP 偶联物在肿瘤处的富集 (图 6)。对肿瘤组织进行局部加热, 这种方法也叫做高热疗法, 可以增加肿瘤处的血管通透性, 从而增强药物向实体瘤的递送^[63]。有研究表明, 当高热

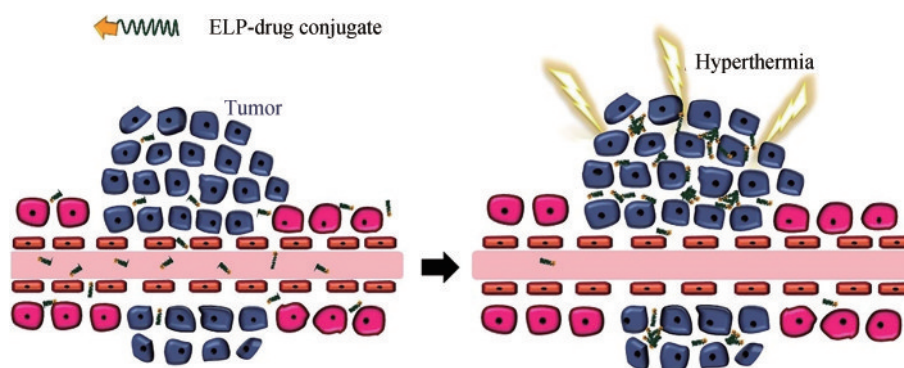


图6 ELP用于肿瘤热靶向治疗示意图

(对肿瘤组织局部加热, 蛋白-ELP偶联物在加热部位相变、富集)

Fig. 6 Schematic of ELPs in thermal targeting

(The tumor tissue was locally heated, and the protein-ELP conjugates were phase transformed and enriched at the heating site.)

疗法与化学疗法或放疗疗法结合使用时, 可以增强对肿瘤细胞的杀伤作用^[64-65]。因此, 将药用蛋白-ELP偶联物的热靶向性质和高热疗法结合, 产生协同作用进一步增强药用蛋白的治疗效果。

Chilkoti实验室^[66]将荧光分子罗丹明标记的ELP ($V_5G_3A_2$) 与42 °C处理的人卵巢癌细胞SKOV-3、人宫颈癌细胞HeLa、人源咽鳞癌细胞FaDu分别孵育测试, 结果发现ELP ($V_5G_3A_2$) 在 T_i 附近时入胞效率明显增强。此外, 他们还将罗丹明标记的ELP ($V_5G_3A_2$) 经静脉注射进入荷瘤小鼠体内, 发现具有热靶向效应的ELP ($V_5G_3A_2$) 在加热肿瘤处的富集提高了2倍^[67]。通过体内和体外试验发现, 热处理后ELP偶联物确实会在靶向部位富集(如图6所示), 并有更好的入胞效率, 理论上应该会有更好的疗效。在以上工作基础上, Moktan等^[30]构建了DOX与ELP的偶联物: ELP-DOX, 在小鼠体内注射ELP-DOX的同时进行热靶向治疗, 发现热疗增强了ELP-DOX的肿瘤抑制效果。这项工作进一步在体内模型中证明了热靶向策略的治疗效果, 该策略特别适合于进行局部肿瘤的治疗, 未来可以将本策略应用于其他的小分子或蛋白类药物中, 强化药物的疗效和特异性。

4.4 ELP用于构建纳米颗粒

4.4.1 二嵌段ELP构建纳米颗粒

分子自组装是指分子在非共价键的相互作用下自发形成一个稳定的、具有一定规则几何外观

的聚集体, 其中, 最简单的是线性二嵌段共聚物。对于两亲性二嵌段共聚物, 通常会自组装形成球形胶束, 该胶束由疏水嵌段构成的内核以及亲水嵌段构成的外表面组成^[68-71]。ELP自组装体是指由具有不同 T_i 的二嵌段ELP (ELP_{diblock}) 融合, 当溶液温度高于含有最低 T_i 的ELP嵌段时, 此嵌段变为疏水性, 脱水坍塌并聚集形成胶束核, 开始进行自组装, 而另一ELP嵌段保持溶剂化并分散在溶剂中, 形成胶束[图7(a)]^[72]。自组装过程是可逆的, 通过改变溶液温度, 可以控制聚合物的聚集。利用这种两亲性ELP自组装体可以将药物装载到胶束核心中, 通过组装体递送药物可以很好地规避有些药物血溶性不好的问题, 更易达到治疗所需剂量, 药物被包裹在组装体内, 减少了药物在体内的清除和代谢, 有利于提高药物利用率, 改善药物的药代。同时, 组装体还有更强的入胞能力, 更有利于药物进入细胞充分地发挥药物药效。为了提高药物的特异性可以进一步在胶束表面偶联配体或有靶向作用的蛋白, 直接将药物递送到发挥作用的组织或器官, 可进一步减少药物引起的副作用。

Chilkoti实验室^[70]构建了一系列局部微高热响应的ELP嵌段自组装体, 其中, 一段为相变温度大于90 °C的ELP, 一段为相变温度约为40 °C的ELP, 该段ELP可在微高热的环境下疏水聚集形成疏水内核, 从而发生自组装形成纳米胶束[图7(b)]。实验结果表明, 这种NGR小肽功能化的纳米胶束可以更多地被肿瘤细胞内吞, 并且有望将单价药物转变为多价纳米颗粒, 从而提高药

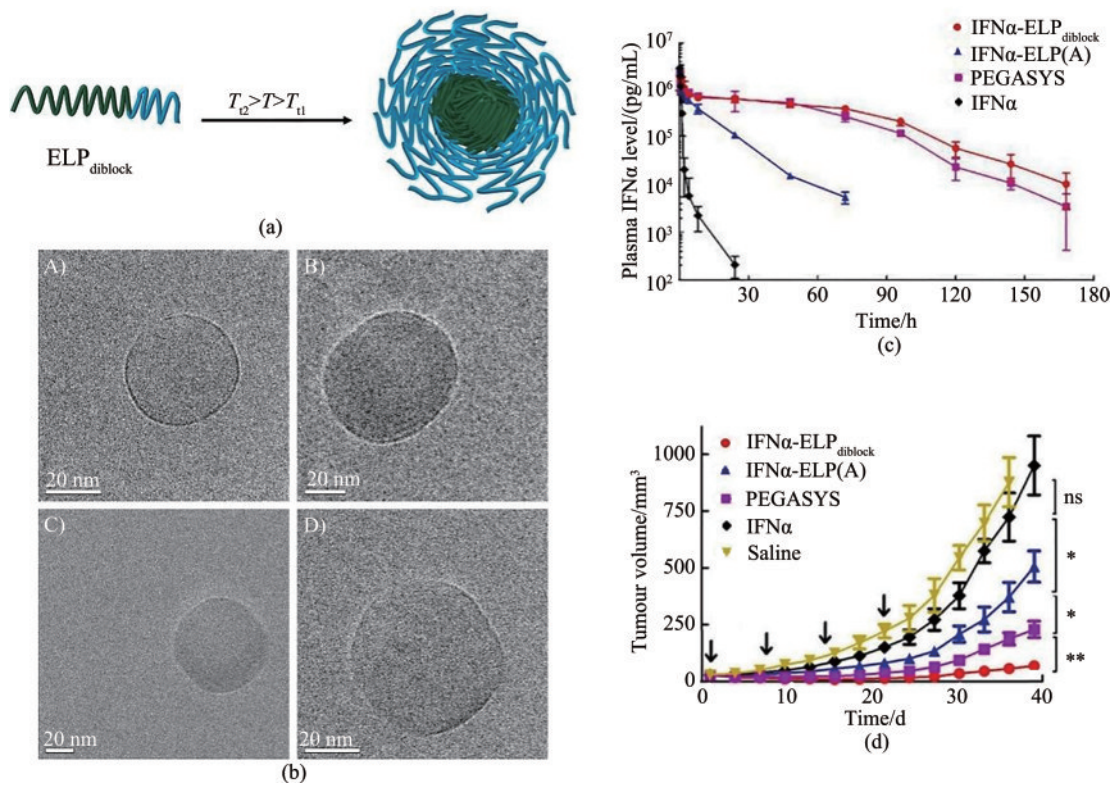


图7 (a) 二嵌段ELP的组装示意图, 低于两段ELP的 T_i 的温度下, 两亲性ELP是可溶的; 在相对疏水的ELP (绿色, $T_i 2$) 和相对亲水的ELP (蓝色, $T_i 1$) 之间的温度 (T) 下, 疏水性ELP选择性脱水, 从而聚集形成致密的疏水核心; (b) 亲水和疏水比不同的二嵌段ELP形成组装体的冷冻电镜图^[70]; (c, d) 静脉注射IFN α -ELPdiblock, IFN α -ELP (A), PEGASYS 和IFN α 的药物代谢动力学图 (c), 肿瘤生长抑制图 (d)^[73]

Fig. 7 (a) ELP micelles formed by diblock ELP, at a temperature between the T_i of the more hydrophobic ELP block (green, $T_i 2$) and the more hydrophilic ELP (blue, $T_i 1$), the more hydrophobic block transitions and aggregates while the more hydrophilic block remains soluble, leading to self-assembly into micelles; (b) Cryo-TEM micrograph of ELP micelles^[70]; (c,d) Pharmacokinetics (c) and antitumor efficacy (d) after intravenous injections with IFN α -ELPdiblock, IFN α -ELP(A), PEGASYS and IFN α ^[73]

物与受体的亲和力。Gao 实验室^[73] 在IFN的C末端融合了ELP(A)48-ELP(V)48组成的嵌段物, 该偶联物可在体温条件下自组装成纳米胶束, IFN α -ELP_{diblock}显著提高了IFN α 的体内循环半衰期 (54.7 h), 是IFN α 的124.3倍 [图7(c)], 并且通过试验数据可以看出它比IFN α 、可溶性IFN α -ELP以及PEG化的IFN α 都有更强的抗肿瘤功效 [图7(d)]。

ELP自组装体也可以用于递送小分子药物, 如雷帕霉素 (Rapamycin)。雷帕霉素是一种免疫抑制剂, 可以抑制T细胞的活化和增殖, 但其分子量小, 在肾脏中会被快速清除, 且其水溶性差, 生物利用度低, 频繁用药毒副作用强^[74]。为此, Shi等^[75] 构建了ELP两亲性共聚物Gs(Val-Pro-Gly-Ile-Gly)₄₈(Val-Pro-Gly-Ser-Gly)₄₈, 并在ELP的N端融

合了一个可以与雷帕霉素特异性结合的蛋白FK506 binding protein 12 (FKBP), 该ELP自组装体可以装载雷帕霉素, 形成纳米粒子FSI (图8)。70%的雷帕霉素通过疏水相互作用包裹在ELP的疏水核, 以半衰期为1.9 h快速释放, 剩余30%的雷帕霉素与纳米粒子表面的FKBP以高亲和力结合, 以半衰期为57.8 h慢速释放, FSI纳米粒子的流体力学半径小于30 nm, 因此不会被肾脏清除。雷帕霉素与FKBP结合后, 抑制mTOR通路, 从而抑制癌细胞的增殖^[76]。与游离的雷帕霉素相比, FSI对于治疗mTOR依赖性乳腺癌异种移植小鼠模型时显示出更好的抗肿瘤功效和更低的明显毒性。

4.4.2 ELP与其他聚合物构建纳米颗粒

与两亲性ELP自组装体形成原理相似, 将其他种类的聚合物、蛋白和小分子与ELP融合也可

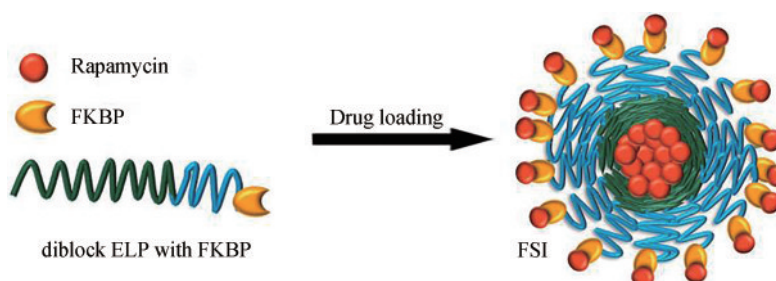


图8 二嵌段ELP装载小分子药物雷帕霉素示意图

Fig. 8 Schematic of diblock ELP micelles loading Rapamycin

以在疏水作用的驱动下组装成纳米颗粒，用于药物的递送。

Chilkoti实验室^[77]构建了嵌合多肽，由亲水的ELP和富含半胱氨酸的一段多肽组成，该多肽含有硫醇基团与疏水药物的马来酰亚胺基团共价偶联， $lgD>1.5$ 的分子驱动偶联物自组装形成纳米颗粒[图9(a)]，本策略可用于疏水类药物的递送。此外，ELP另一端还可以融合靶向序列，赋予药物靶向性和特异性，进一步提高药物利用率，降低对非靶细胞的毒性作用。Gao实验室^[78]通过基因工程技术合成多肽LHRH-ELP2-C8并与DOX偶联，合成了具有靶向性的ELP-药物偶联物：LHRH-ELP2-DOX[图9(b)]。其中，LHRH是黄体生成素释放激素，LHRH的受体在多种肿瘤细胞表面过表达，而在健康组织中很少表达^[79]，可以作为肿瘤靶向序列。由冷冻电镜可以看出，LHRH-ELP2-DOX确实会组装成纳米颗粒[图9(c)]，并在小鼠体内有明显延长的循环半衰期[图9(d)]。LHRH-ELP2-DOX具有靶向能力，相较于ELP2-DOX能更有效地抑制肿瘤生长[图9(e)]。同时，作者还结合了高强度聚焦超声（HIFU）治疗，超声的空化作用有利于酸敏性的腺键断裂释放出更多的DOX，能够进一步增强LHRH-ELP2-DOX的肿瘤靶向性、肿瘤渗透性、肿瘤细胞吞噬能力和药物释放率，HIFU处理可以进一步提高LHRH-ELP2-DOX的肿瘤抑制率[图9(e)]。

亲水类的小分子药物因为其亲水特性，无法像疏水药物那样被直接装载到疏水核心中，为了利用ELP组装体来进行亲水类小分子药物的递送，Chilkoti实验室^[80]构建了一种重组不对称三嵌段多肽（ATBP）并成功装载了小分子药物吉西他滨（GEM）。ATBP由亲水的类弹性蛋白、一

段含有疏水的酪氨酸多肽、一段富含半胱氨酸的多肽三部分组成，可以自组装形成棒状胶束。其中，疏水的酪氨酸多肽在组装时是组装体的核心，GEM的马来酰亚胺衍生物通过与半胱氨酸共价结合，被封装到组装体内部[图10(a)]。作者分别通过冷冻电镜[图10(b)]和原子力显微镜[图10(c)]观察到了ATBP-GEM确实会形成组装体，并且ATBP-GEM相较游离GEM有更好的入胞能力，因而会有更好的抗肿瘤的效果[图10(d)]，并明显提高了疾病动物的存活率[图10(e)]。

许多其他种类的疏水性聚合物也可以ELP偶联，驱动形成组装体。Chilkoti实验室^[81]合成了豆蔻酰基与ELP的组装体，在亲水性ELP的N端融合一段可以被N-肉豆蔻酰基转移酶识别的肽序列，在N-肉豆蔻酰基转移酶（NMT）作用下，最终合成豆蔻酰化的ELP（M-ELP_{90A, 120}），豆蔻酰基是疏水的，可以自组装成为纳米颗粒。阿霉素是疏水性药物，将阿霉素封装在纳米颗粒中，相比于游离的药物，封装在纳米颗粒的药物半衰期增加了6.5倍，降低了非特异性器官毒性。Gao实验室^[82]用聚吡咯（PPy）为疏水内核合成了PPy与ELP的组装体，并将肿瘤细胞上高表达的核仁素的小肽F3融合到ELP的N端，形成能靶向肿瘤细胞的组装体（PPy-ELP-F3），疏水药物阿霉素通过 π - π 堆积被包裹在组装体中。聚吡咯（PPy）还可以吸收近红外光，将光转化为热，消融癌细胞^[83]。与没有肿瘤靶向功能的DOX/PPy-ELP纳米颗粒和游离DOX相比，DOX/PPy-ELP-F3的协同光热和化学作用对肿瘤抑制明显。Gao在赋予组装体靶向性的基础上，又结合了光热和化学作用来抑制肿瘤，为研究者们打开了一个新的思路，通过ELP

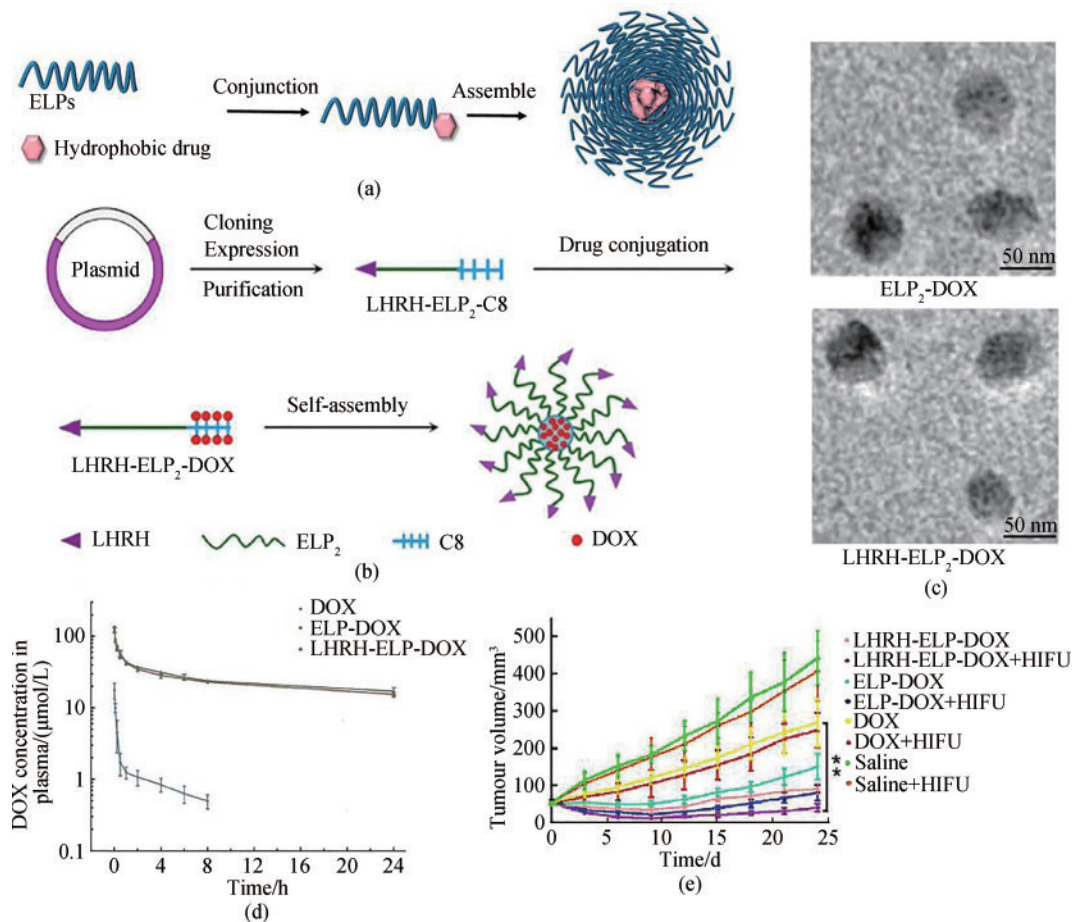


图9 (a) ELP混合组装体装载疏水药物分子示意图,疏水药物在组装时作为组装体的核心被装载在核心内;(b) LHRH-ELP₂-DOX纳米颗粒的合成示意图;(c) LHRH-ELP₂-DOX和ELP₂-DOX的冷冻电镜分析图像;(d) LHRH-ELP₂-DOX在小鼠体内药代动力学表现;(e) LHRH-ELP₂-DOX加HIFU治疗后24 d内肿瘤体积变化^[78]

Fig. 9 (a) Schematic of ELP hybrid nanoparticles loading hydrophobic drug molecules. Hydrophobic drugs are loaded in the core; (b) Synthetic route of LHRH-ELP-DOX nanoconjugates; (c) Cryo-TEM images of LHRH-ELP₂-DOX and ELP₂-DOX; (d) Pharmacokinetics of LHRH-ELP₂-DOX in a DOX-resistant breast tumor mouse model; (e) Tumor volume changes after LHRH-ELP-DOX plus HIFU treatment^[78]

可以同时融合更多元化的治疗策略来提高治疗效率。

ELP除了用作化药与生物药的递送外,还可以递送纳米材料来进行肿瘤的治疗。金纳米颗粒是一类近红外光热转换器,已被广泛应用到癌症光热治疗和成像,金纳米粒子(AuNPs)通常在可见光区域具有局域表面等离子体共振(LSPR)峰,但是可见光的组织穿透能力低不适用于光热治疗^[84-86]。然而,其合成比较困难,可能受到有毒的表面活性剂(十六烷基三甲基溴化铵,CTAB)和聚合物(聚乙烯亚胺,PEI)的污染^[87-88]。Gao实验室^[89]构建了ELP-AuNP,通过金-硫醇的共价结

合将ELP N端的半胱氨酸与金纳米颗粒偶联。在小鼠肿瘤内单次注射ELP-AuNP,由于肿瘤内温度(32 °C)高于ELP-AuNP的相转变温度(23 °C),ELP-AuNP会自组装成为金纳米颗粒组装体(AuNP),形成储库聚集在肿瘤部位,由于相邻AuNP之间的等离子体耦合效应,可以有效吸收NIR光并将其转化为热量,展现出强烈的近红外光吸收,因此用于多种癌症的光热治疗比如黑色素瘤、颈癌、膀胱癌。这项工作再次展示了ELP在组织递送中的巨大潜力,拓宽了研究视野,未来可以借助ELP完善更多材料在肿瘤治疗中的应用。

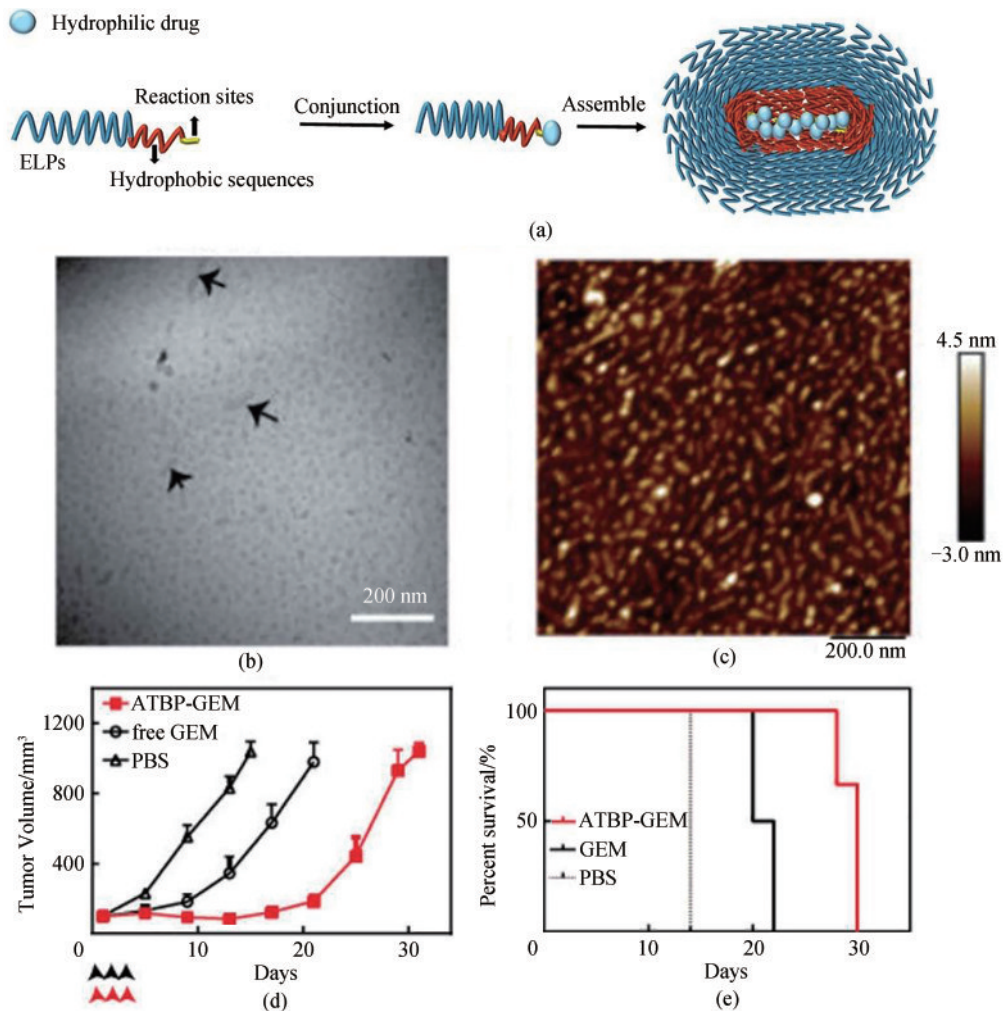


图 10 (a) ELP 混合组装体装载亲水药物分子示意图, 其中的疏水序列在组装时作为组装体的核心, 亲水药物被装载在疏水核心内; (b) 冷冻透射电镜图像拍摄到的 ATBP-GEM 纳米颗粒; (c) 原子力显微镜拍摄到的 ATBP-GEM 组装体; (d) ATBP-GEM 与游离 GEM 相比, 延迟了肿瘤的生长; (e) ATBP-GEM 与游离 GEM 相比, 提高了生存率^[80]

Fig. 10 (a) Schematic of ELP hybrid nanoparticles loading hydrophilic drug molecules where hydrophobic sequences act as the core of the assembly when assembled and hydrophilic drugs are loaded within the hydrophobic core; (b) Cryo-TEM micrograph of ATBP-GEM conjugate; (c) AFM image of ATBP-GEM nanoparticles; (d,e) ATBP-GEM delayed the tumor growth (d) and improved the cumulative survival (e) of mice^[80]

4.5 ELP 水凝胶用于组织工程与药物递送的联合

Chilkoti 实验室^[90]发现, 一种非交联的 ELP 在 35 °C 时会凝聚, 变成类似胶原蛋白和透明质酸的凝胶态, 这种 ELP 水凝胶可用于支持软骨细胞生长和软骨基质合成。然而, 非交联的 ELP 水凝胶刚性较差, 能提供的支撑力有限, 研究者们通过制作交联的 ELP 来提高 ELP 水凝胶的刚性^[91-93], 以便于其在骨组织支撑及其他组织工程领域更好地发挥作用。Sun 等^[94]提出了一种利用蛋白质反应对 SpyTag-SpyCatchr 生物合成 ELP 水凝胶的策

略。该策略可合成具有三维结构的 ELP 水凝胶, SpyTag 与 SpyCatchr 在生理条件下可自发形成共价异肽键, 进而使 ELP 组装成三维分子网络并起到更好的组织支撑功能。此外, 在每个构成 ELP 水凝胶的单元中还可以融入一个蛋白分子, 赋予蛋白 ELP 水凝胶更多的功能。Sun 提出的这种合成策略为 ELP 水凝胶同时实现组织工程与药物递送功能提供了可能和便利。Pal 等^[95]将游离的药物 rhBMP-2 和多西环素 (doxycycline) 装载到胶原-ELP 水凝胶上, 药物的装载不仅赋予了 ELP 水凝胶

多西环素的抗菌功能以及 rhBMP-2 的诱导骨生长作用，还进一步增强了水凝胶的力学性能，为骨生长提供更佳的力学支持作用，从而表现出更好的骨再生效果。通过以上方法，药物可以被固定^[94]或是游离^[95]地装载到 ELP 水凝胶上，未来可以更多地将 ELP 的药物递送功能与其在组织工程中的运用结合起来，更好地辅助组织修复和疾病治疗。

表 1 中总结了一些较有代表性的 ELP 用于药物递送的实例。

5 总结

近年来，ELP 作为一种新型生物材料，在药物递送的应用上已取得了显著进展，这主要源于其独特的优势和巨大的开发潜力。

(1) ELP 可塑性强且易于调控：ELP 的组成、分子量、分散性均可通过序列设计和基因编辑来精确控制。

(2) ELP 的生产制备经济简便：ELP 融合蛋

白表达量高，蛋白纯化方法简单且无需借助复杂昂贵的色谱纯化设备，生产工艺简单且成本能耗低。

(3) ELP 的生物安全性高：ELP 无毒性、可生物降解、具有良好的生物相容性，作为药物递送材料使用非常安全可靠。

(4) ELP 具有刺激响应性：ELP 具有特殊的温度响应性，可根据不同药物的特点及治疗需求，在时间或空间上对药物的释放及靶向性进行控制，定制出更多响应性的 ELP 偶联药物。

(5) ELP 的挖掘潜力大：基于 DNA 重组技术，ELP 序列中可自由添加其他反应性氨基酸或者活性蛋白，赋予 ELP 新的结构和功能。例如，有研究已利用基因编码的蛋白质反应对 SpyTag-SpyCatcher 生物合成了具有环状、支化、索烃等特殊拓扑结构的 ELP^[96-99]，此类 ELP 可以赋予蛋白质更好的抗蛋白质水解、加热和冻融能力，这些特性更有利于蛋白的储存和运输，将此类 ELP 应用于药物制剂中潜力巨大。ELP 还可以与其他种类的聚合物分子进行协同应用，补充其功能，拓宽 ELP 的应用范围。

表 1 ELP 用于药物递送的实例

Tab. 1 Applications of ELP in drug delivery

药物递送策略	应用	ELP 药物	ELP 序列信息	文献
延长药物体内循环半衰期	髓样乳腺癌	SynB1-ELP-DOX	(VPGXG) ₁₅₀ X=V ₅ G ₃ A ₂	[30]
	感染性休克	^{Nt} TNF-V _H ELP	(VPGXG) ₁₀₀ X=V ₅ G ₃ A ₂	[43]
	淋巴瘤	IFN-ELP	(VPGXG) ₉₀ X=V ₅ G ₃ A ₂	[44]
药物储库	2 型糖尿病	(GLP-1)-ELP	(GVGVV) ₁₂₀	[47]
	卵巢癌和黑色素瘤	IFN-ELP	(VPGVG) ₉₀	[49]
	胶质母细胞瘤	IFN-ELP 和替莫唑胺联合用药	(VPGVG) ₉₀	[50]
	黑色素瘤和卵巢癌	IFN-MMPS-ELP	(VPGVG) ₉₀	[51]
	创伤后关节炎	xELP[IL-1Ra]	VPGKG(VPGVG) ₁₆₋₁₀₂	[53]
	神经炎症	ELP-curcumin	[VPGXG] _{L=60,80,160} ; X=V/I/E [1:3:1]	[59]
	骨损伤	rhBMP-2-ELP	(VPGVG) ₄₀ [(VPGVG) ₂ (VPGCG)(VPGVG) ₂] ₂	[62]
热靶向治疗	卵巢癌、宫颈癌、人源咽鳞癌	ELP1	(VPGXG) ₁₅₀ X=V ₅ G ₃ A ₂	[66]
两亲性自组装体	卵巢癌	IFN α -ELP _{diblock}	ELP(A) ₄₈ -ELP(V) ₄₈	[73]
	乳腺癌	FKBP-ELP	G(Val-Pro-Gly-Ile-Gly) ₄₈ (Val-Pro-Gly-Ser-Gly) ₄₈ Y	[75]
混合组装体	乳腺癌	LHRH-ELP-DOX	(VPGXG) ₁₆₀ X=V ₁ A ₈ G ₇	[78]
	结肠癌	ELP-(YG) ₆ -(CGG) ₈ -GEM	(VPGAG) ₁₆₀	[80]
	乳腺癌	DOX _{ENC} -M-ELP _{90A,120}	(VPGXG) ₁₂₀ X=A ₉ V ₁	[81]
	黑色素瘤	DOX/PPy-ELP-F3	(XGVVPG) ₁₆₀	[82]
	黑色素瘤、颈瘤、膀胱癌	ELP-AuNP	(VPGVG) ₆₀	[89]
ELP 水凝胶	骨再生	CDEc	(VPGVG) ₁₂₀	[95]

尽管 ELP 在药物递送上展现出明显优势和巨大潜力, 它也在存在着一些局限性和亟待解决的问题。通过基因工程方法只能在蛋白质的 C 末端或 N 末端进行 ELP 的融合, 对蛋白的修饰方式比较有限, 不如化学修饰方法多样化。药物与 ELP 融合后可能会影响药物的生物学活性^[51], 未来在制作 ELP 药物融合物时还需要优化设计, 最大程度保留蛋白质药物的活性。目前为止, 那些已报道的运用 ELP 进行药物递送的工作基本都使用大肠杆菌作为蛋白表达系统, 尽管大肠杆菌表达体系有着高产量低成本的生产优势, 但大肠杆菌并不具备真核表达系统的包括糖基化修饰在内的翻译后修饰功能, 不适用于表达那些需要翻译后修饰才能发挥功能的蛋白质药物^[100]。现生物制药领域常用来制备药物的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和人胚肾 (HEK293) 细胞等真核蛋白表达系统多是通过分泌型表达来制备蛋白质药物的, 而由于 ELP 本身的疏水特性, ELP 融合蛋白很难在细胞中实现分泌表达, 而胞内表达方式又会带来巨大的生产成本, 难以实现产业化。未来研究需要进一步拓展 ELP 融合蛋白在真核表达系统中的表达和提取方法, 解决 ELP 融合蛋白质无翻译后修饰这一不足, 扩大 ELP 适用的药物种类。虽然 ELP 是由天然氨基酸序列构成的, 理论上来说是可安全降解的, 但人工合成的 ELP 融合蛋白在体内具体的降解机理还未有清晰阐述。此外, 虽然部分 ELP 类药物已成功推进到临床阶段, 但尚未有临床获批的 ELP 类药物, ELP 在药物递送的应用上是否还存在其他的问题需要更多的临床数据来提供支持, 需要研究者们将更多的研究推进到临床阶段, 一方面可根据临床数据来不断完善 ELP 的设计与应用, 另一方面临床试验的成功必将打出响亮一炮, 加速 ELP 在药物递送中的应用转化及发展。

参 考 文 献

- [1] ADEPU S, RAMAKRISHNA S. Controlled drug delivery systems: Current status and future directions[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5905.
- [2] MITHIEUX S M, WEISS A S. *Elastin[M]*//San Diego: Academic Press Inc Elsevier Science, 2005: 437-461.
- [3] MCPHERSON D T, MORROW C, MINEHAN D S, et al. Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G-(VPGVG)₁₉-VPGV, from *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Progress*, 1992, 8(4): 347-352.
- [4] MACEWAN S R, CHILKOTI A. Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers[J]. *Biopolymers*, 2010, 94(1): 60-77.
- [5] ZHAO B W, LI N K, YINGLING Y G, et al. LCST behavior is manifested in a single molecule: elastin-like polypeptide (VPGVG)_N[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 17(1): 111-118.
- [6] MEYER D E, CHILKOTI A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 846-851.
- [7] NAIR L S, LAURENCIN C T. Biodegradable polymers as biomaterials[J]. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32(8/9): 762-798.
- [8] CHILKOTI A, CHRISTENSEN T, MACKAY J A. Stimulus responsive elastin biopolymers: applications in medicine and biotechnology[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10(6): 652-657.
- [9] PRASAD K U, IQBAL M A, URRY D W. Utilization of 1-hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions[J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1985, 25(4): 408-413.
- [10] GUDA C, ZHANG X, MCPHERSON D T, et al. Hyper expression of an environmentally friendly synthetic polymer gene[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(7): 745-750.
- [11] MCPHERSON D T, XU J, URRY D W. Product purification by reversible phase transition following *Escherichia coli* expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP[J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, 7(1): 51-57.
- [12] MEYER D E, CHILKOTI A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system[J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 357-367.
- [13] MCDANIEL J R, MACKAY J A, QUIROZ F G, et al. Recursive directional ligation by plasmid reconstruction allows rapid and seamless cloning of oligomeric genes[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(4): 944-952.
- [14] AMIRAM M, QUIROZ F G, CALLAHAN D J, et al. A highly parallel method for synthesizing DNA repeats enables the discovery of "smart" protein polymers[J]. *Nature Materials*, 2011, 10(2): 141-148.
- [15] TANG N C, CHILKOTI A. Combinatorial codon scrambling enables scalable gene synthesis and amplification of repetitive proteins[J]. *Nature Materials*, 2016, 15(4): 419-424.
- [16] URRY D W. Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions[J]. *Progress in*

- Biophysics and Molecular Biology, 1992, 57(1): 23-57.
- [17] URRY D W. Molecular machines: How motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1993, 32(6): 819-841.
- [18] URRY D W. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101(51): 11007-11028.
- [19] MEYER D E, CHILKOTI A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(11): 1112-1115.
- [20] HASSOUNEH W, CHRISTENSEN T, CHILKOTI A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2010, 61(1): 6.11.1-6.11.16.
- [21] LIM D W, TRABBI-CARLSON K, MACKAY J A, et al. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1417-1424.
- [22] BOOTH J J, ABBOTT S, SHIMIZU S. Mechanism of hydrophobic drug solubilization by small molecule hydrotropes[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(51): 14915-14921.
- [23] WANG Q Z. Recent advances in protein drug delivery[J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2020, 768(5): 052055.
- [24] LEADER B, BACA Q J, GOLAN D E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(1): 21-39.
- [25] VERONESE F M, MERO A. The impact of PEGylation on biological therapies[J]. *BioDrugs*, 2008, 22(5): 315-329.
- [26] ABRAHAM S A, WATERHOUSE D N, MAYER L D, et al. The liposomal formulation of doxorubicin[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 391: 71-97.
- [27] DREHER M R, RAUCHER D, BALU N, et al. Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 91(1/2): 31-43.
- [28] FURGESON D Y, DREHER M R, CHILKOTI A. Structural optimization of a "smart" doxorubicin-polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 110(2): 362-369.
- [29] BIDWELL G L, DAVIS A N, FOKT I, et al. A thermally targeted elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate overcomes drug resistance[J]. *Investigational New Drugs*, 2007, 25(4): 313-326.
- [30] MOKTAN S, PERKINS E, KRATZ F, et al. Thermal targeting of an acid-sensitive doxorubicin conjugate of elastin-like polypeptide enhances the therapeutic efficacy compared with the parent compound *in vivo*[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(7): 1547-1556.
- [31] ROUSSELLE C, CLAIR P, LEFAUCONNIER J M, et al. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy[J]. *Molecular Pharmacology*, 2000, 57(4): 679-686.
- [32] BIDWELL G L III, RAUCHER D. Cell penetrating elastin-like polypeptides for therapeutic peptide delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62(15): 1486-1496.
- [33] BIDWELL G L III, WHITTOM A A, THOMAS E, et al. A thermally targeted peptide inhibitor of symmetrical dimethylation inhibits cancer-cell proliferation[J]. *Peptides*, 2010, 31(5): 834-841.
- [34] MAINI R N, ELLIOTT M J, BRENNAN F M, et al. Beneficial effects of tumour necrosis factor- α blockade in rheumatoid arthritis (RA)[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2013, 101(2): 207-212.
- [35] BEUTLER B, MILSARK I W, CERAMI A C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin[J]. *Science*, 1985, 229(4716): 869-871.
- [36] VAN DULLEMEN H M, VAN DEVENTER S J H, HOMMES D W, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (CA2)[J]. *Gastroenterology*, 1995, 109(1): 129-135.
- [37] FALVO J V, TSYTSYKOVA A V, GOLDFELD A E. Transcriptional control of the TNF gene[J]. *Current Directions in Autoimmunity*, 2010, 11: 27-60.
- [38] TSAI E Y, YIE J, THANOS D, et al. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFAT ρ and ATF-2/JUN[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(10): 5232-5244.
- [39] 高世勇, 李丹. 肿瘤坏死因子与癌症相关研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1209-1213.
- GAO S Y, LI D. Research advances in tumor necrosis factor and cancer[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(9): 1209-1213.
- [40] SMITH C A, FARRAH T, GOODWIN R G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death[J]. *Cell*, 1994, 76(6): 959-962.
- [41] COPPIETERS K, DREIER T, SILENCE K, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 54(6): 1856-1866.
- [42] PLAGMANN I, CHALARIS A, KRUGLOV A A, et al. Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142(2): 170-178.

- [43] CONRAD U, PLAGMANN I, MALCHOW S, et al. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(1): 22-31.
- [44] HU J, WANG G L, LIU X Y, et al. Enhancing pharmacokinetics, tumor accumulation, and antitumor efficacy by elastin-like polypeptide fusion of interferon alpha[J]. *Advanced Materials*, 2015, 27(45): 7320-7324.
- [45] MIRANDA L P, WINTERS K A, GEGG C V, et al. Design and synthesis of conformationally constrained glucagon-like peptide-1 derivatives with increased plasma stability and prolonged *in vivo* activity[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(9): 2758-2765.
- [46] 桑延霞. 胰高血糖素样肽 1 类似物长效化的策略[J]. *中国新药与临床杂志*, 2021, 40(7): 481-488.
SANG Y X. Strategies for long-acting effect of glucagon-like peptide 1 analogs[J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2021, 40(7): 481-488.
- [47] AMIRAM M, LUGINBUHL K M, LI X, et al. A depot-forming glucagon-like peptide-1 fusion protein reduces blood glucose for five days with a single injection[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172(1): 144-151.
- [48] MALM-ERJEFÄLT M, BJØRNSDOTTIR I, VANGGAARD J, et al. Metabolism and excretion of the once-daily human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in healthy male subjects and its *in vitro* degradation by dipeptidyl peptidase IV and neutral endopeptidase[J]. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 2010, 38(11): 1944-1953.
- [49] WANG Z R, GUO J W, NING J, et al. One-month zero-order sustained release and tumor eradication after a single subcutaneous injection of interferon alpha fused with a body-temperature-responsive polypeptide[J]. *Biomaterials Science*, 2018, 7(1): 104-112.
- [50] LIANG P, WANG G H, LIU X Y, et al. Spatiotemporal combination of thermosensitive polypeptide fused interferon and temozolomide for post-surgical glioblastoma immunochemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 264: 120447.
- [51] WANG Z R, GUO J W, SUN J W, et al. Thermoresponsive and protease-cleavable interferon-polypeptide conjugates with spatiotemporally programmed two-step release kinetics for tumor therapy[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(16): 1900586.
- [52] CHEVALIER X, GOUPILLE P, BEAULIEU A D, et al. Intra-articular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2009, 61(3): 344-352.
- [53] KIMMERLING K A, FURMAN B D, MANGIAPANI D S, et al. Sustained intra-articular delivery of IL-1RA from a thermally-responsive elastin-like polypeptide as a therapy for post-traumatic arthritis[J]. *European Cells & Materials*, 2015, 29: 124-139.
- [54] ADAMS S B, SHAMJI M F, NETTLES D L, et al. Sustained release of antibiotics from injectable and thermally responsive polypeptide depots[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, 2009, 90(1): 67-74.
- [55] BETRE H, LIU W G, ZALUTSKY M R, et al. A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 115(2): 175-182.
- [56] ANAND P, THOMAS S G, KUNNUMAKKARA A B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 76(11): 1590-1611.
- [57] 刘伟, 顾秀竹, 吴筱霓, 等. 姜黄素药理作用的研究进展[J]. *华西药理学杂志*, 2021, 36(3): 336-340.
LIU W, GU X Z, WU X N, et al. Research on the pharmacological actions of curcumin[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 36(3): 336-340.
- [58] 张洪英. 中药姜黄的研究进展[J]. *菏泽医学学报*, 2001, 13(4): 84-87.
ZHANG H Y. Research progress of traditional Chinese medicine turmeric [J]. *Journal of Heze Medical College*, 2001, 13(4): 84-87.
- [59] SINCLAIR S M, BHATTACHARYA J, MCDANIEL J R, et al. A genetically engineered thermally responsive sustained release curcumin depot to treat neuroinflammation[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 171(1): 38-47.
- [60] CARREIRA A C, ALVES G G, ZAMBUZZI W F, et al. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 561: 64-73.
- [61] MIMATSU K, KISHI S, HASHIZUME Y. Experimental chronic compression on the spinal cord of the rabbit by ectopic bone formation in the ligamentum flavum with bone morphogenetic protein[J]. *Spinal Cord*, 1997, 35(11): 740-746.
- [62] MCCARTHY B, YUAN Y, KORJA P. Elastin-like-polypeptide based fusion proteins for osteogenic factor delivery in bone healing[J]. *Biotechnology Progress*, 2016, 32(4): 1029-1037.
- [63] DEWHIRST M W, PROSNITZ L, THRALL D, et al. Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future[J]. *Seminars in Oncology*, 1997, 24(6): 616-625.
- [64] FEYERABEND T, STEEVES R, WIEDEMANN G J, et al. Rationale and clinical status of local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in locally advanced malignancies[J]. *Anticancer Research*, 1997, 17(4B): 2895-2897.
- [65] ISSELS R. Hyperthermia combined with chemotherapy-biological rationale, clinical application, and treatment results[J]. *Oncology Research and Treatment*, 1999, 22(5): 374-381.
- [66] RAUCHER D, CHILKOTI A. Enhanced uptake of a thermally

- responsive polypeptide by tumor cells in response to its hyperthermia-mediated phase transition[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(19): 7163-7170.
- [67] MEYER D E, KONG G A, DEWHIRST M W, et al. Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(4): 1548-1554.
- [68] WHITESIDES G M, MATHIAS J P, SETO C T. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures[J]. *Science*, 1991, 254(5036): 1312-1319.
- [69] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ J, CHÉCOT F, GNANOU Y, et al. Toward "smart" nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution[J]. *Progress in Polymer Science*, 2005, 30(7): 691-724.
- [70] DREHER M R, SIMNICK A J, FISCHER K, et al. Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(2): 687-694.
- [71] 杨国新, 侯佳男, 胡学军, 等. 自组装ELP多肽的从头设计及其在生物医药领域中的应用进展[J]. *生命的化学*, 2021, 41(2): 296-305.
- YANG G X, HOU J N, HU X J, et al. De novo design of self-assembled ELP peptides and their applications in biomedicine[J]. *Chemistry of Life*, 2021, 41(2): 296-305.
- [72] ABDELGHANI M, SHAO J X, LE D H T, et al. Self-assembly or coassembly of multiresponsive histidine-containing elastin-like polypeptide block copolymers[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2021, 21(6): e2100081.
- [73] WANG Z R, GUO J W, LIU X Y, et al. Temperature-triggered micellization of interferon alpha-diblock copolypeptide conjugate with enhanced stability and pharmacology[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 328: 444-453.
- [74] SIMAMORA P, ALVAREZ J M, YALKOWSKY S H. Solubilization of rapamycin[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 213(1/2): 25-29.
- [75] SHI P, ALURI S, LIN Y A, et al. Elastin-based protein polymer nanoparticles carrying drug at both corona and core suppress tumor growth *in vivo*[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 171(3): 330-338.
- [76] 郑鹏生, 冀静. mTOR信号通路与研究进展[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2010, 31(1): 1-9.
- ZHENG P S, JI J. Advance in research on the relationship between mTOR signaling pathway and tumors[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2010, 31(1): 1-9.
- [77] MCDANIEL J R, BHATTACHARYYA J, VARGO K B, et al. Self-assembly of thermally responsive nanoparticles of a genetically encoded peptide polymer by drug conjugation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(6): 1683-1687.
- [78] WANG Z R, HE Q, ZHAO W G, et al. Tumor-homing, pH- and ultrasound-responsive polypeptide-doxorubicin nanoconjugates overcome doxorubicin resistance in cancer therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 264: 66-75.
- [79] DHARAP S S, WANG Y, CHANDNA P, et al. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12962-12967.
- [80] BHATTACHARYYA J, WEITZHANDLER I, HO S B, et al. Encapsulating a hydrophilic chemotherapeutic into rod-like nanoparticles of a genetically encoded asymmetric triblock polypeptide improves its efficacy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(12): 1605421.
- [81] LUGINBUHL K M, MOZHDEHI D, DZURICKY M, et al. Recombinant synthesis of hybrid lipid-peptide polymer fusions that self-assemble and encapsulate hydrophobic drugs[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(45): 13979-13984.
- [82] SUN M M, GUO J W, HAO H J, et al. Tumour-homing chimeric polypeptide-conjugated polypyrrole nanoparticles for imaging-guided synergistic photothermal and chemical therapy of cancer[J]. *Theranostics*, 2018, 8(10): 2634-2645.
- [83] 黄晚秋, 高苗苗, 窦红静. 聚吡咯及其纳米复合材料在光热治疗领域的应用[J]. *化学进展*, 2020, 32(4): 371-380.
- HUANG W Q, GAO M M, DOU H J. Polypyrrole and its nanocomposites applied in photothermal therapy[J]. *Progress in Chemistry*, 2020, 32(4): 371-380.
- [84] PALLAVICINI P, DONÀ A, CASU A, et al. Triton X-100 for three-plasmon gold nanostars with two photothermally active NIR (near IR) and SWIR (short-wavelength IR) channels[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(56): 6265-6267.
- [85] LIU X S, HUANG N, LI H, et al. Multidentate polyethylene glycol modified gold nanorods for *in vivo* near-infrared photothermal cancer therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(8): 5657-5668.
- [86] KHLEBTSOV N, BOGATYREV V, DYKMAN L, et al. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites[J]. *Theranostics*, 2013, 3(3): 167-180.
- [87] GRABINSKI C, SCHAEUBLIN N, WIJAYA A, et al. Effect of gold nanorod surface chemistry on cellular response[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(4): 2870-2879.
- [88] WANG S T, CHEN K J, WU T H, et al. Photothermal effects of supramolecularly assembled gold nanoparticles for the targeted treatment of cancer cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(22): 3777-3781.
- [89] SUN M M, PENG D, HAO H J, et al. Thermally triggered *in situ* assembly of gold nanoparticles for cancer multimodal imaging and photothermal therapy[J]. *ACS Applied Materials &*

- Interfaces, 2017, 9(12): 10453-10460.
- [90] BETRE H, SETTON L A, MEYER D E, et al. Characterization of a genetically engineered elastin-like polypeptide for cartilaginous tissue repair[J]. Biomacromolecules, 2002, 3(5): 910-916.
- [91] URRY D W, HAYNES B, ZHANG H, et al. Mechanochemical coupling in synthetic polypeptides by modulation of an inverse temperature transition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(10): 3407-3411.
- [92] TRABBIC-CARLSON K, SETTON L A, CHILKOTI A. Swelling and mechanical behaviors of chemically cross-linked hydrogels of elastin-like polypeptides[J]. Biomacromolecules, 2003, 4(3): 572-580.
- [93] HRABCHAK C, ROULEAU J, MOSS I, et al. Assessment of biocompatibility and initial evaluation of genipin cross-linked elastin-like polypeptides in the treatment of an osteochondral knee defect in rabbits[J]. Acta Biomaterialia, 2010, 6(6): 2108-2115.
- [94] SUN F, ZHANG W B, MAHDAVI A, et al. Synthesis of bioactive protein hydrogels by genetically encoded SpyTag-Spy-Catcher chemistry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(31): 11269-11274.
- [95] PAL P, NGUYEN Q C, BENTON A H, et al. Drug-loaded elastin-like polypeptide-collagen hydrogels with high modulus for bone tissue engineering[J]. Macromolecular Bioscience, 2019, 19(9): e1900142.
- [96] ZHANG W B, SUN F, TIRRELL D A, et al. Controlling macromolecular topology with genetically encoded SpyTag-Spy-Catcher chemistry[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(37): 13988-13997.
- [97] WANG X W, ZHANG W B. Cellular synthesis of protein catenanes[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(10): 3442-3446.
- [98] LIU D, WU W H, LIU Y J, et al. Topology engineering of pro-

teins *in vivo* using genetically encoded, mechanically interlocking SpyX modules for enhanced stability[J]. ACS Central Science, 2017, 3(5): 473-481.

- [99] DA X D, ZHANG W B. Active template synthesis of protein heterocatenanes[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(32): 11097-11104.
- [100] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 172.



通讯作者: 高卫平(1975—),男,研究员,博士生导师。研究方向为生物偶联物与生物材料。

E-mail: gaoweiping@hsc.pku.edu.cn



第一作者: 杨兆颖(1993—),女,博士,博士后。研究方向为生物偶联物与生物材料。

E-mail: yangzhaoying18@163.com



第一作者: 张帆(1998—),女,博士研究生。研究方向为蛋白质-高分子偶联物。

E-mail: m18232657001@163.com