

DOI: 10.13376/j.cblls/2022171

文章编号: 1004-0374(2022)12-1578-19

· 技术与应用 ·

工程化天然蛋白纳米区室在生物医学中的应用

康如如, 王汉杰*

(天津大学生命科学学院, 天津 300072)

摘要: 蛋白纳米区室 (protein nanocompartments, PNCs) 这类天然的纳米颗粒集功能性强、生物相容性高、毒副作用小、生产成本低和来源广等多种优势于一体, 被广泛地应用。随着合成生物学的不断发展和化学技术的持续进步, 这类特殊结构可被适当改造, 并在生物医学领域中发挥不可替代的作用。本文主要对蛋白纳米区室的类型及其重组生产系统的选择和优缺点、功能化的主要方法以及在生物医学方面的应用进行了综述。

关键词: 天然蛋白纳米区室; 重组表达; 功能化修饰; 生物医学应用

中图分类号: R318

文献标志码: A

Application of engineered natural protein nanocompartments in biomedicine

KANG Ru-Ru, WANG Han-Jie*

(School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Natural protein nanocompartments (PNCs) combine various advantages such as high functionality, high biocompatibility, feeble toxicity, low production cost and wide availability. With the development of synthetic biology and chemical technology, these special structures can be suitably modified to play irreplaceable roles in biomedical field. This paper reviews the types of natural protein nanocompartments, the selection and advantages and disadvantages of recombinant production systems, the main methods of functionalization, and the application in biomedicine.

Key words: natural protein nanocompartments; recombinant expression; functional modification; biomedical applications

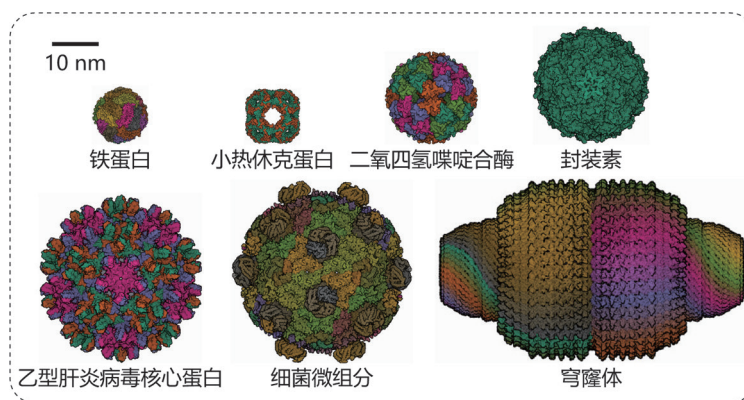
蛋白纳米区室 (protein nanocompartments, PNCs) 是生物体在容纳核酸、储存物质、代谢和信号转导等生命活动中进化形成的纳米结构, 存在于特定的真核生物、原核生物、古细菌和病毒中。常见的 PNCs 包括病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)、铁蛋白 (ferritins)、封装素 (encapsulins)、酶复合物 (enzyme complexes)、小热休克蛋白 (small heat shock proteins, sHsps)、细菌微区室 (bacterial micro-compartments, BMCs) 和穹窿体的核糖核蛋白组分 (vault ribonucleoproteins) 等 (图 1)。它们是由一种或几种蛋白质自组装形成的纳米结构, 所以也属于天然蛋白纳米颗粒 (natural protein nanoparticles, NPNs)。PNCs 具有分散性好、尺寸均一、生物相容性高和细胞毒性低等优势 (表 1)。

基因编辑、非共价连接和化学修饰等方法为按需改造, 从而优化 PNCs 的结构和性质提供了可能。近年来, 它们在物质负载、细胞渗透和免疫激活等方面被广泛地应用。例如, 铁蛋白和 VLPs 被用于开发疫苗^[1-3], 封装素和穹窿核糖核蛋白被用来封装物质^[4-5], 酶复合物和 BMCs 被用作纳米反应容器等^[6-8]。为使人们更全面地了解 PNCs, 本文对其生物学特征、工程化生产和在生物医学中的应用予以总结。

收稿日期: 2022-03-24; 修回日期: 2022-05-04

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2019-YFA0906500); 国家自然科学基金优秀青年基金项目(32122047)

*通信作者: E-mail: wanghj@tju.edu.cn



图片素材来源于PDB数据库。根据来源和PNC名称(数据库编号), 从左上至右下依次是: *Lithobates catesbeianus*, 铁蛋白(4DAS); *Methanocaldococcus jannaschii*, 小热休克蛋白(4ELD); *Aquifex aeolicus*, 2,4-二氧四氢喋啶合酶(1HQK); *Thermotoga maritima*, 封装素(7K5W); hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒核心蛋白(3J2V); *Haliangium ochraceum*, 细菌微组分(5V74); *Rattus norvegicus*, 穹窿体(4V60)。

图1 主要的PNCs

表1 蛋白纳米区室在生物医学应用中的主要优势

特性	蛋白纳米区室
直径	9~200 nm
分散性	单分散性
表面	易于通过多种方法修饰
负载	高效
多功能性	物质递送(药物和造影剂); 纳米反应容器(酶和无机纳米颗粒); 表面展示(抗原和抗体)等
递送	主动靶向(修饰靶向结构域, 例如配体和抗体)或被动靶向(尺寸和形状效应); 长效(封装保护)
稳定性	血清和组织中稳定性高
释放	可控释放
生产	易于规模化生产
纯度	无外源因子和病原体污染
安全性	生物相容性高; 细胞毒性低

1 蛋白纳米区室的类型

1.1 病毒样颗粒(VLPs)

VLPs 是由病毒的特定结构蛋白组装形成的球形、螺旋、杆状或丝状等结构^[9]。VLPs 的组成可概括为: 由一或两种衣壳蛋白形成的简单病毒衣壳, 如多瘤病毒 (polyomavirus); 由多种蛋白组成的复杂衣壳, 如小核糖核酸病毒 (picornavirus); 由衣壳及含脂质囊膜构成的颗粒, 如丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、流感病毒 (influenza viruses) 和艾滋病病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 等^[10]。

在研究与生产中主要有 6 种 VLPs 被广泛地应用, 它们分别来源于动物病毒、噬菌体和植物病毒。其中, 乙型肝炎病毒核心 (hepatitis B virus core, HBVc) 蛋白是由 180~240 个 21 kDa 的亚基组装成的外径 35 nm、内径 26 nm 的空心二十面体结构。

组成 HBVc 的亚基中含精氨酸的结构域在静电作用下可与细胞非特异性地结合, 但该结构域的缺失不会影响颗粒的组装。HBVc 的 78~83 位氨基酸区域是主要免疫显性区域, 可用于展示外源物质。例如, 在该区域融合受体、配体和抗原等的编码序列均可被正确地表达。

噬菌体 MS2 和 Q β VLP 均由 180 个亚基组装形成, 其中 MS2 VLP 外径 27 nm、内径 15 nm, Q β VLP 内外直径分别为 21 nm 和 28 nm。MS2 VLP 在 pH 3~10 的条件下, 保持结构稳定且易于修饰, 还可以通过结构中 32 个 2 nm 的孔转运小分子。而 Q β VLP 结构中的二硫键使其在极端的温度和 pH 条件下比 MS2 VLP 更稳定。另外一种噬菌体 P22 VLP 是由 420 个 27 kDa 的外壳蛋白和 100~300 个支架蛋白组装形成的外径 58~64 nm、内径 48~50

nm 的二十面体结构^[11-12]：在 65℃ 时，其支架蛋白离开衣壳导致结构膨胀；在 75℃ 时，12 个五聚体被释放，衣壳结构随之改变。

最后两种是由侵染植物叶中豇豆褪绿斑驳病毒 (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) 和豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus, CPMV) 的衣壳蛋白组装而成的 VLPs。CCMV 衣壳是由 180 个亚基组装成外径 28 nm、内径 18 nm 的二十面体颗粒，其结构在 pH = 5.0 时稳定，但当处于 pH = 7.5 或高浓度的离子条件下时会发生解聚。CCMV 衣壳蛋白的 N 端位于腔内且带有正电荷，用于吸附 RNA，该特性也被用于电负性分子的封装。此外，对称轴上的孔会因响应 pH 或二价阳离子 (如 Ca²⁺ 和 Mg²⁺) 的浓度而发生开闭转变，也可用于小分子封装。CPMV 的衣壳结构同样具有二十面对称性，直径约 30 nm，由 42 kDa 的大亚基和 24 kDa 的小亚基各 60 个拷贝聚合而成的单元组装形成。这种结构呈现出规则的间隔，有利于在其表面展示多种物质。此外，这种 VLP 可在广泛的 pH (3~9)、温度 (60℃) 和溶剂条件下保持结构稳定。

VLPs 在形态上与病毒相似，但无核酸，因此也被称为“病毒空壳”。其内腔容量从数十到数千 nm³，适合作为物质的承载容器。此外，VLPs 能够重复地展示抗原，这使它们成为制备高免疫原性疫苗的模板。这是一种有效的病原体相关结构模式 (pathogen associated structural pattern, PASP)，一方面，它们可以促进与 B 细胞受体的交联，有助于诱导产生强烈的体液免疫^[13]；另一方面，先天免疫系统中的多聚体成分对于这类结构的亲和力高，有利于改善抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APCs) 对 VLPs 的摄取，从而增强细胞免疫反应^[14]。许多评述性文章已系统地总结了 VLPs 在作为纳米反应容器、物质递送和抗原展示等中的应用^[9-10, 14-19]。

1.2 铁蛋白及其同系物

铁蛋白是动植物体内用于铁储存和转运的功能蛋白。这是一类由水合氧化铁内核和可容纳 4 500 个铁原子且大小为 450 kDa 的蛋白质外壳组成的 PNCs。真核生物来源的铁蛋白由 21 kDa 的重链和 19 kDa 的轻链组成，在不同组织来源的铁蛋白中二者比例不同^[20]。其中重链负责铁氧化，轻链参与铁内核的形成过程。这两者聚合形成异质亚基后组装为内径 8 nm、外径 12~13 nm 的笼状结构。

重组铁蛋白中空的纳米笼有潜力应用为物质递送的载体^[21]。首先，铁蛋白的结构中存在 8 个亲水

通道和 6 个疏水通道，可以满足不同物质的输送需求^[22]。其次，在 pH 为 2~3 或 10~12 时，铁蛋白纳米笼的亚基会发生可逆的解聚；而当 pH 为中性时，亚基以形状记忆的方式重新组装成颗粒^[23]。基于这一性质，铁蛋白可被设计为 pH 敏感的载体。此外，铁蛋白具备天然向性，可以应用为靶向工具；它的重链被转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1) 识别后，易于被细胞内化，而 TfR1 仅在增殖活跃的细胞过度表达，例如肿瘤细胞^[24]。因此，铁蛋白具有作为抗肿瘤药物载体的潜力。

除作为载体外，铁蛋白因热稳定性强 (耐 80~100℃ 高温) 和固有的铁储存功能，已逐渐发展为金属纳米粒子的“生产车间”和半导体制备的“模板”。例如，铁、锰和镍等金属氧化物的生物矿化和半导体纳米粒子的合成已经在铁蛋白中实现^[25]。

饥饿细胞来源的微铁蛋白是一类 DNA 结合蛋白 (DNA-binding proteins from starved cells, Dps)，属于类铁蛋白超家族，即为铁蛋白同系物。Dps 最早在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 中被发现，也存在于多种细菌和古细菌中。这类蛋白内在的氧化酶通过消耗过氧化氢和 Fe²⁺ 来保护 DNA 免受氧化应激损伤。Dps 是由 12 个约 18 kDa 的亚基组装成的外径 9 nm、内径 4.5 nm 的笼状结构^[26-27]。

基于独特的结构和反应特性，Dps 已被应用于不同的场景。比如，利用这类蛋白氧化、铁储存和与金属互作的能力，同铁蛋白一样也被开发成为金属氧化物纳米粒子合成的模板^[28]；通过 Dps 亚基解聚和再组装的过程，作为载体用于封装物质^[29]；也可将其作为构建单元重新设计，用于获得超分子蛋白质聚合物等^[30]。

1.3 封装素

封装素是原核生物和古细菌在划分特定的反应途径或过程中进化而来的，由 60、180 或 240 个亚基组装形成 24~42 nm 的二十面体隔室。这种隔室区划能够保护和修复应激代谢过程中产生的有毒物质^[31]。迄今，来自于 *Thermotoga maritima*^[32]、*Pyrococcus furiosus*^[33] 和 *Quasibacillus thermotolerans*^[34] 等的封装素结构已被解析。

封装素将内部反应与胞质分离的特征被应用于输送物质和构建纳米反应器或人造细胞器。例如，经改造的封装素在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中已被开发成为代谢细胞器^[35]。这类结构可以通过标签引导实现客体的封装，以完成特定的反应。通过对封装素和客体结构的解析发现，其天然客体在

C 末端存在 10~40 bp 的序列用于识别外壳。这类定位标签相对保守, 翻译后形成的肽也被称为靶向肽 (targeting peptides, TPs)^[36]。TPs 通过构象契合、疏水作用和形成盐桥等与封装素 N 端的螺旋互作, 从而将客体锚定到颗粒内^[37]。

1.4 酶衍生的纳米笼

1.4.1 2,4-二氧四氢嘧啶合酶

2,4-二氧四氢嘧啶合酶 (lumazine synthase, Ls) 存在于一类酶复合物中, 用来催化植物、原核生物和古细菌中核黄素即维生素 B₂ 的合成。不同来源的 Ls 空间结构差异很大。在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs) 中的 Ls 是由 12 个五聚体亚基组装成的约 16 nm 的二十面体聚合结构 (Bs-Ls)^[38]。在天然状态下, Bs-Ls 封装其同源核黄素合酶 (riboflavin synthase, Rs), 共同催化合成核黄素。Ls 与 Rs 的识别过程类似于上述封装素的包装机制, Rs 的 C 末端存在的定位序列与 Ls 识别后形成酶复合物^[39]。然而, Ls 不一定都与 Rs 形成包含物。例如, *E. coli* 中的 Ls (*E. coli*-Ls) 是由 60 个亚基组成的中空结构, 与 *E. coli*-Rs 并无物理关联^[40]。

通过 TPs 同样可以实现外源分子在 Ls 内的封装, 可被用于开发纳米结构的仿生应用。然而, 比 TPs 更高效的基于电荷互补的封装方法已经在 Ls 中验证成功。例如, 野生型嗜嗜热菌 (*A. aeolicus*-wt) 来源的 Ls (Aawt-Ls) 突变后产生的变体 Aaneg-Ls 提供了负电荷, 而在客体蛋白 GFP 中融合聚精氨酸以引入正电荷, 在静电作用下可成功地将 GFP 封装在 Ls 内^[41]。这种静电作用为主客体组装提供了强大的驱动力。Aawt-Ls 除内部封装的优势外, 表面修饰也相对容易, 其结构蛋白的 C 和 N 末端都位于外表面, 以基因融合的方法进行修饰不会中断形成衣壳界面的相互作用, 并且不受限于内腔的尺寸。

1.4.2 二氢硫辛酰基乙酰基转基酶

丙酮酸脱氢酶复合物 (pyruvate dehydrogenase complex, PDHC) 将丙酮酸氧化脱羧过程中三种组分酶 E1、E2 和 E3 的催化活性结合起来, 催化乙酰辅酶 A 生成, 以此联系糖酵解和三羧酸循环。PDC 的核心组件 E2 为二氢硫辛酰转乙酰基酶 (dihydrolipoyl transacetylase, E2), 是由 60 个亚基形成的二十面体结构^[42]。该组分通过功能化修饰, 可被应用于物质输送和疫苗制备等各个方面。

1.5 小热休克蛋白 (sHsp)

小热休克蛋白大家族在生物体内广泛存在 (除

某些细菌外), 主要负责不正确折叠蛋白质的降解。一种来自詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 的 sHsp (Mj-sHsp) 由 24 个亚基形成空心八面体对称的结构^[43]。该结构的外径为 12 nm, 内径为 6.5 nm, 且存在 3 nm 的孔, 允许内外物质交换。Mj-sHsp 在 70°C、pH 5~11 的条件下保持稳定, 该特性可应用于扩展 sHsp 的用途, 例如合成无机材料等^[44]。

1.6 细菌微区室 (BMCs)

BMCs 是细菌中进化而来的一种类似于真核细胞细胞器的结构。经生物信息学工具预测发现, 至少在 23 种细菌门中存在 BMCs^[45]。它们具有封装代谢途径、保护酶和隔离有毒中间产物等功能, 同时也对底物和产物在微区室内和细胞质间的转运起到调控作用^[46]。天然 BMCs 基因簇的组成和排列差异很大, 由 5 000~20 000 个亚基组装形成二十面体或多面体的外壳结构^[47]。

因内部代谢反应的不同, BMCs 可分为羧基体和代谢体。在蓝藻和一些化能自养型生物中的 BMCs 包裹了碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO), 能进行二氧化碳的固定, 被称为 α 羧基体或 β 羧基体。这是一类高度组织化的结构, 直径约 100 nm。而大多数 BMCs 在异养生物的作用下降解环境中的碳水化合物, 属于分解代谢体。这类 BMCs 内的代谢反应主要有丙二醇利用 (propanediol utilization, PDU) 和乙醇胺利用 (ethanolamine utilization, EUT) 两类。这两类代谢体是不规则的多面体, 直径为 90~150 nm。

重组的 BMCs 已在多方面的应用中被认可。在 BMCs 核心酶的子集中, 同样具有促进核心酶聚集以及外壳组装的 TPs^[48]。这在 BMCs 内设计代谢途径提供了方法, 可用于开发工程代谢途径。与天然的羧基体一样, 合成的 BMCs 羧基体已被用于植物生物量的改善^[49]。另外, BMCs 还被作为物质输送的载体和抗原展示的支架等。

1.7 穹窿体核糖核蛋白

穹窿体核糖核蛋白是真核细胞中穹窿体的主要组成蛋白 (major vault protein, MVP)^[50]。不同来源 MVP 的编码序列相似, 转录形成保守的多拱形结构。1986 年, 首次从大鼠肝脏分离纯化出一种卵形结构的复合体, 称为穹窿体 (vault)^[5]。该复合体主要由三种蛋白质和 RNA 组成。其中一种大小为 100 kDa 的蛋白质, 约占颗粒质量的 75%, 即 MVP。另外两种蛋白分别是 290 kDa 的端粒酶相关

蛋白 1 (telomerase associated protein 1, TEP1) 和 193 kDa 的穹窿体聚 (ADP-核糖) 聚合酶 [vault poly (ADP-ribose) polymerase, Vparp]。

MVP 易于对其大小和结构进行优化。例如, 它在 pH 小于 4.0 时会解离成两半, 但胺基的共价交联可以阻止这种解离作用。另外, 在昆虫细胞中重组表达 MVP, 能够组装成更大的穹窿聚集 (vultimers)。迄今相关研究已经表明, MVP 在核质转运、mRNA 定位、耐药性、细胞信号转导和先天免疫等方面具有应用前景。

以上简要阐述了 PNCs 的结构特征和独特的应用潜力, 现将它们主要的结构特征总结如下 (表 2)。

2 蛋白纳米颗粒的表达

大多数 PNCs 可以在异源宿主中大量表达 (图

2), 纯化后使用。本文对重组蛋白的表达系统 (表 3) 和 PNCs 的生产 (表 4) 进行了总结。

2.1 原核细胞表达系统

原核细胞表达系统具有成本低且产量高的优势, 被广泛用于重组蛋白的生产。该系统适用于无需翻译后修饰的蛋白表达, 可将目的基因进行密码子优化后转化到表达细胞 (如 BL21 DE3) 中, 在启动子 (如 PET 和 T7) 等的驱动下表达。

许多 PNCs 的重组表达已在细菌系统中验证成功。约 30% 的 VLPs 由细菌系统再生产。例如, *E. coli* 已用于裂谷热病毒 (rift valley fever virus, RVFV) 衣壳蛋白, 传染性法氏囊病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) VP2、VP3 和 VP4 蛋白, 以及噬菌体 MS2 VLP 的表达^[125]; 乳杆菌已用于人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 16 次要衣壳蛋

表2 主要的蛋白纳米区室的结构

名称	亚单位(个)	对称性	直径(nm)
乙型肝炎病毒核心蛋白	180~240	二十面体	35
噬菌体MS2	180	二十面体	27
噬菌体Q β	180	二十面体	28
噬菌体P22	420和100~300个支架蛋白	二十面体	58~64
豇豆褪绿斑驳病毒	180	二十面体	28
豇豆花叶病毒	60	二十面体	30
铁蛋白	24	八面体	12~13
微铁蛋白	12	四面体	9
封装素	60、180或240	二十面体	24~42
2,4-二氧四氢嘧啶合酶	60	二十面体	16
二氢硫辛酰基乙酰基转基酶	60	二十面体	25
小热休克蛋白	24	八面体	12
细菌微组分	可变的	二十面体或多面体	39~200
穹窿体核糖核蛋白	78	对称拱形	40 × 70



图2 常用的重组蛋白生产系统

表3 主要的异源蛋白表达系统及其特点

表达系统	常用的宿主	优点	缺点
原核	<i>E. coli</i> 、 <i>Lactococcus lactis</i>	生长快; 表达量高; 成本低; 易于遗传操作	缺乏翻译后修饰; 内毒素积累
酵母	<i>S. cerevisiae</i> 、 <i>Pichia pastoris</i>	成本低; 易于遗传操作; 翻译后修饰	生长慢; 翻译后修饰的能力有限
昆虫细胞	Sf9、Sf21、H5	表达量高; 适当的折叠和翻译后修饰	成本高; 培养周期长
哺乳动物细胞	CHO、HEK293	折叠和翻译后修饰接近蛋白的天然状态	成本高; 培养周期长
植物	烟草、马铃薯、苜蓿、水稻	不含病原体和细菌毒素污染物; 翻译后修饰	糖基化能力有限

表4 蛋白纳米区室的重组表达

来源	蛋白纳米区室	表达系统	宿主	引用
Bacteriophage P22	CP、SP	原核	<i>E. coli</i>	[51]
Bacteriophage Q β	CP		<i>E. coli</i>	[52]
CCMV	CP		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[53]
HBV	cP		<i>E. coli</i>	[13, 54]
Human papilloma virus 16	CPL1		<i>L. lactis</i>	[55]
Bacteriophage MS2	CP	酵母	<i>S. cerevisiae</i>	[56]
Bacteriophage Q β	CP		<i>S. cerevisiae</i> 、 <i>P. pastoris</i>	[57]
CCMV	CP		<i>P. pastoris</i>	[58]
Dengue virus	prM、E		<i>P. pastoris</i>	[59]
HCV	cP		<i>P. pastoris</i>	[60]
Menangle virus	NP		<i>S. cerevisiae</i>	[61]
Mumps virus	NP		<i>P. pastoris</i>	[62]
Tioman virus	NP		<i>S. cerevisiae</i>	[63]
CPMV	CP (L、S)	昆虫细胞	Sf21	[64]
Enterovirus 71	P ₁ 、3CD		Sf9	[65]
Goose parvovirus	VP1、VP2、VP3		Sf9	[66]
Noroviruses	VP1		Sf9	[67]
Porcine parvovirus	VP2		Sf9、Sf21	[68]
Hanta virus	NP、E (Gn、Gc)	哺乳动物细胞	CHO	[69]
Marburg virus	E、MP		293T	[70]
West Nile virus	prM、E		CHO-K1	[71]
HBV	cP	植物	黄羽扇豆	[72]
Norwalk virus	CP		马铃薯	[73]
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> 、 <i>P. furiosus</i>	Ferritin	原核	<i>E. coli</i>	[74]
<i>Helicobacter pylori</i>	Ferritin		<i>E. coli</i>	[75-76]
<i>Homo sapiens</i>	Ferritin		<i>E. coli</i>	[23, 77-79]
<i>P. furiosus</i>	Ferritin		<i>E. coli</i>	[80-83]
<i>Listeria</i>	Dps		<i>Lactobacillus</i>	[27, 84]
<i>H. pylori</i>	Ferritin	昆虫细胞	Sf9	[85-88]
<i>H. pylori</i>	Ferritin	哺乳动物细胞	Expi 293F	[1, 89]
<i>H. pylori</i> -bullfrog hybrid	Ferritin		Freestyle 293F、Expi 293F	[90-91]
<i>H. ochraceum</i>	Encapsulin	原核	<i>E. coli</i>	[36]
<i>Q. thermotolerans</i>	Encapsulin		<i>E. coli</i>	[4]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> N771	Encapsulin		<i>E. coli</i>	[92]
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Encapsulin		<i>R. jostii</i> RHA1 Δ encapsulin、 <i>E. coli</i>	[31]
<i>T. maritima</i>	Encapsulin		<i>E. coli</i>	[93-97]
<i>T. maritima</i>	Encapsulin	昆虫细胞	Sf9	[98]
<i>A. aeolicus</i>	Ls	原核	<i>E. coli</i>	[38-39, 41, 99]
<i>Brucella</i> spp.	Ls		<i>E. coli</i>	[100]
<i>Candida albicans</i>	Ls		<i>E. coli</i>	[101]
<i>E. coli</i>	Ls		<i>E. coli</i>	[40]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ls		<i>E. coli</i>	[43]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	E2	原核	<i>E. coli</i>	[102]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	E2		<i>E. coli</i>	[103]
<i>Thermococcus</i> sp. KS-1	sHsp	原核	<i>E. coli</i>	[104]
<i>M. jannaschii</i>	sHsp		<i>E. coli</i>	[105-107]
<i>P. furiosus</i>	sHsp		<i>E. coli</i>	[108]
<i>Citrobacter freundii</i>	BMC	原核	<i>E. coli</i>	[109-111]
<i>C. freundii</i>	BMC		<i>C. glutamicum</i>	[112]

表4 蛋白纳米区室的重组表达(续表)

来源	蛋白纳米区室	表达系统	宿主	引用
<i>H. ochraceum</i>	BMC		<i>E. coli</i>	[113-115]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BMC		<i>E. coli</i>	[116]
<i>Salmonella enterica</i> LT2	BMC		<i>S. typhimurium</i> LT2、 <i>E. coli</i>	[117-118]
<i>Salmonella typhimurium</i>	PDUA		<i>E. coli</i>	[119]
<i>Echinococcus multiloculari</i>	vault	昆虫细胞	Sf9	[120]
<i>H. sapiens</i>	vault		Sf9、Sf21	[121]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	vault		Sf9	[122]
大鼠	vault		Sf9	[123-124]

注：包膜糖蛋白：envelope glycoprotein, E；前膜：premembrane, prM；衣壳蛋白：capsid protein, CP；核衣壳蛋白：nucleocapsid protein, NP；核心蛋白：core protein, cP；基质蛋白：matrix protein, MP；病毒蛋白：viral protein, VP；支架蛋白：scaffolding protein, SP。

白的表达；假单胞菌已用于 CCMV 衣壳蛋白的表达^[53]。铁蛋白无需翻译后修饰，可采用原核生产系统表达^[126]。除 VLPs 和铁蛋白外，Dps、封装素、sHsps 和 BMCs 等 PNCs 也可在原核系统中生产^[93, 108, 127]。

原核表达系统存在无法完成重组蛋白翻译后糖基化等复杂的修饰，以及可能被内毒素或核酸污染等缺陷^[128]，虽然已有应对策略，例如筛选出能够在特定位点进行糖基化的菌株等，但不具有普遍适用性^[129]。

2.2 酵母细胞系统

酵母表达系统可以完成蛋白的折叠和糖基化修饰，适用于大多数重组蛋白的表达。酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*P. pastoris*) 是最常用的两种宿主菌。来源于人乳头瘤病毒 HPV、乙型肝炎病毒 HBV、噬菌体 Q β 的形成 VLPs 的结构蛋白以及黄色黏球菌 (*Myxococcus xanthus*) 的封装素等 PNCs 已在酵母中表达^[23, 75, 130]。酵母宿主可促进蛋白的可溶性表达。例如，重组铁蛋白在 *E. coli* 中表达可能会形成包涵体，而在酵母中则可以获得可溶性蛋白。此外，采用该表达系统遗传操作简单，应用方便。例如，早期研究人员从酵母中获得大量 Ls，借此揭示了其反应的许多特征。

然而，酵母表达菌株缺乏强启动子，导致重组蛋白产量低。此外，酵母培养基中多糖浓度较高，产物纯化相对复杂。

2.3 昆虫细胞表达系统

昆虫细胞表达系统可以表达结构复杂的蛋白，并且能够完成正确折叠和翻译后修饰，获得接近天然状态的蛋白。同时，该表达系统适用于不同形式蛋白的表达，例如胞内或分泌蛋白等。其中，杆状病毒-昆虫系统是较为高效的应用模式，可以实现

高达 38 kb 的包装，允许多种蛋白质同时表达^[88]。基于此优势，300 kDa 的异源复合物即由增加的 DNA 甲基化 (increased DNA methylation, IDM) 组蛋白乙酰转移酶等组成，已被包装在 *T. maritima* 的封装素内，是至今异源封装的最大负载^[98]。

重组表达结构复杂的 PNCs，例如具有包膜结构的 VLPs，一般选用昆虫细胞。一些来自肠道病毒属 (*Enterovirus*)、呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 和冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 等结构复杂的 VLPs，在昆虫细胞中能够正确表达。真核细胞来源的 MVPs 也主要采用该重组生产系统进行生产。但是，这种表达系统成本相对高，且难以形成种子批。

2.4 哺乳动物细胞表达系统

哺乳动物细胞生产系统与昆虫细胞类似，生产的蛋白接近其天然状态。这种表达系统可完成蛋白质的正确折叠、糖基化和翻译后加工。常用的细胞分为淋巴和非淋巴细胞两类。其中较为常用的非淋巴细胞主要有：中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞、小仓鼠肾 (baby hamster syrian kidney, BHK) 细胞和人类胚胎肾 (human embryonic kidney, HEK) 293 细胞等。PNCs 作为一些真核来源的蛋白载体在进行复杂的代谢反应或进行工程化应用时，均可在真核表达系统中生产^[69-71]。

哺乳动物细胞正逐渐发展成为有吸引力的重组蛋白表达系统，但仍面临成本高以及病毒污染等挑战。

2.5 植物表达系统

植物表达系统为重组蛋白的表达和翻译后修饰提供了最佳环境，已成为重组蛋白生产极具吸引力的平台。这种生产系统具有高效的生产能力和优良的扩展性，并且不携带哺乳动物中的病原体，安全性较高。植物中靶基因递送和蛋白质表达的策略包

括转基因、质体转化和瞬时表达等, 其中瞬时表达方法由于其允许在短时间内经济地大量生产目标蛋白, 因此在应用中较为普遍。

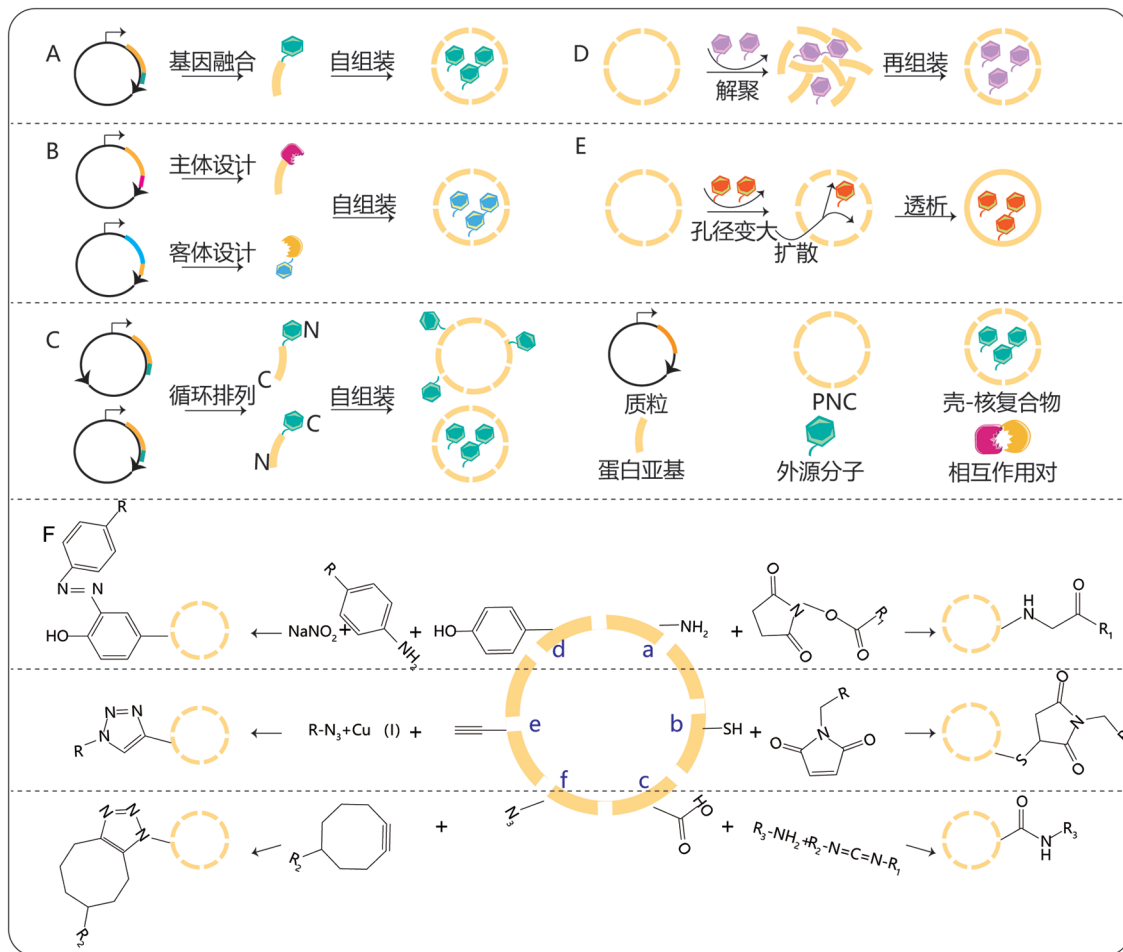
当对安全性要求高时, 像疫苗的生产, 植物即为最理想的表达宿主。目前植物生产的一些 VLPs 疫苗已进入临床验证阶段, 包括诺沃克病毒 NV 衣壳蛋白、乙型肝炎病毒 HBV 核心抗原和狂犬病毒 (rabies virus, RV) 糖蛋白等。尽管在植物中能够正确地表达多种 PNCs, 但由于其操作相对繁琐且周期较长, 因此并没有被广泛地应用。

3 生物医学应用

近年来, 对 PNCs 结构的鉴定、理化性质的分析和重组生产的验证显著拓展了它们在物质输送、纳米反应容器、医学影像和疫苗制备等方面的潜力。

在应用过程中, 涉及在 PNCs 表面或腔内封装外源分子, 目前已有多种功能化策略被开发, 用于 PNCs 实现外源分子的负载^[4, 7]。它们被改造的常用方法包括基因工程、非共价连接和化学修饰等。

利用基因工程技术可使外源物质呈现在 PNCs 的表面或腔内。首先, 可以直接通过构建融合蛋白, 在主体 PNCs 序列的 C 末端^[131]、N 末端或形成柔性环^[132]的位点插入客体外源物质的基因 (图 3A)。其次, 在主体编码基序中插入能够与客体特异性互作, 例如包装定位^[39, 92, 111, 122, 133]、卷曲螺旋^[37]、多聚组氨酸^[134]、异肽键形成的 SpyTag 和 SpyCatcher/ Δ N SpyCatcher^[83, 135-136]、二聚配体 FRB/FKBP^[82] 等的核苷酸序列, 来引导客体的封装 (图 3B)。此外, 循环排列也是 PNCs 一种较为通用的货物封装策略。这种方法通过改变蛋白质二级结构元件的连接, 能



A~C: 基因工程。A: 基因融合; B: 特异性识别基序; C: 循环排列。D、E: 非共价键连接。在特定条件下, 使PNC亚基解聚(D)或孔径打开(E)。F: 化学反应。(a)伯氨与NHS酯反应; (b)硫醇与马来酰亚胺反应; (c) EDC活化羧基后与伯氨反应; (d)苯酚中配体氧化成重氮连接至其邻位; (e)炔烃在Cu(I)催化下与叠氮化物反应; (f)叠氮与炔基反应。

图3 PNCs的功能化策略

够调整 PNCs 的结构特征 (图 3C)^[115]。例如, 在烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 外壳、细菌微组分 BMC、酶 Aa-Ls 等 PNCs 中, 基于该策略的应用已实现了外源分子的封装^[119, 137-138]。基因工程改造可以高效地将外源分子与 PNCs 连接。然而, 该技术仅限于对肽或蛋白分子的应用, 不具备普遍适用性。同时, 为避免对 PNCs 的自组装特性和插入分子的功能造成不利的影响, 对插入片段的大小和结构也存在限制。

除遗传编码外, 非共价连接的方法也被用于 PNCs 封装外源分子。在特定的离子浓度 (CCMV)^[139]、pH 水平 (CCMV、MS2、封装素、vault 和铁蛋白)^[4, 5, 17, 140] 和温度 (P22、HBVc) 条件下^[11, 141], 使 PNCs 结构在解聚和组装 (图 3D) 或孔隙打开与关闭 (图 3E) 的过程中, 为物质的封装提供条件^[142]。然后, 通过静电^[143]、亲水或疏水^[30] 等相互作用, 在 PNCs 亚基的再组装过程中封装外源分子。这类方法简单且易操作, 已被广泛应用。但应明确, 非共价连接在本质上具有可逆性, 这也造成了 PNCs 与外源分子复合物不稳定的固有属性。

不断进步的化学技术为在 PNCs 中进行共价修饰提供了条件^[144]。天然状态下, 在 PNCs 亚基的氨基酸中存在一些可直接修饰的基团, 主要有赖氨酸 (伯氨基)、半胱氨酸 (巯基)、谷氨酸 (羧基)、天冬氨酸 (羧基) 和酪氨酸 (酚羟基) 等; 也可以通过定点诱变的生物学技术, 在 PNCs 中引入特定的反应残基^[44, 74, 145-146], 进而通过缀合反应修饰功能分子。常用的生物缀合试剂主要包括: N-羟基琥珀酰亚胺酯 (N-hydroxysuccinimide ester, NHS) 或 NHS 衍生物用于赖氨酸 (图 3Fa); 硫醇-马来酰亚胺用于半胱氨酸 (E2)^[1] 和铁蛋白^[147] (图 3Fb); 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC] 用于谷氨酸和天冬氨酸 (图 3Fc); 苯的重氮衍生物用于酪氨酸 (图 3Fd) 等。此外, 利用化学方法在 PNCs 中引入非天然氨基酸 (unnatural amino acid, uAA) 也可以提供反应基团, 例如通过 Cu(I) 催化的叠氮-炔基环加成 (copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC) 反应或无 Cu 点击化学反应引入叠氮或炔基^[148] (图 3Fe, f), 提高了化学修饰的灵活性。该类方法为满足 PNCs 的应用需求提供了无限可能, 但是也表现出一些不足, 例如不能精确地控制引入基团在 PNCs 中的分布和数量, 从而影响精准化应用等。

下文将对 PNCs 在生物医学领域的主要应用作简要介绍。

3.1 药物输送

常用的治疗药物包括小分子化学药物、多肽或蛋白以及核酸等。这类药物在直接递送时, 因血液缺乏选择性的清除作用, 导致生物利用度不理想。PNCs 作为药物输送载体能够保护其免于降解。同时, 由于它们结构和尺寸的优越性、天然向性 (例如铁蛋白肿瘤细胞归巢性、人乳头瘤病毒 HPV 颗粒的细胞嗜性)、内体溶酶体逃逸特性 (例如逆转录病毒的 VLPs) 和靶向结构域修饰的潜力, 具备改变药物在体分布的能力, 已经被开发为药物靶向递送载体^[29]。这不仅有利于提高药物的局部浓度, 而且还能降低其副作用。

目前, 已有研究探讨将 PNCs 作为小分子药物载体, 如阿霉素 (doxorubicin, Dox)^[23, 136, 146]、姜黄素^[79]、紫杉醇、苯妥英和花青素^[149] 等。归巢肽 tLyP-1 缀合的羊群房子病毒 (flock house virus, FHV) 颗粒^[150]、铁蛋白^[151] 和 RGD 修饰的铁蛋白^[152] 负载 Dox 以及铁蛋白负载姜黄素和紫杉醇^[79, 153-154] 已被用于抗肿瘤治疗中, 它们比游离态的药物表现出更长的循环半衰期和更好的肿瘤生长抑制作用。在小鼠癫痫模型中, 递送 TGN 融合的 HBVc 封装苯妥英的实验结果表明, 这种纳米药物使抗癫痫的效果提高约 100 倍^[155]。此外, 利用铁蛋白封装花青素, 改善了其抗氧化活性^[149]。

来源于猴空泡病毒 40 (simian virus 40, SV40)、人乳头瘤病毒 HPV16、戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 和 E2 等的 PNCs 作为基因递送载体的潜力已被系统地探究。例如, 在小鼠肿瘤模型中, 注射 SV40 外壳蛋白包装的毒素基因 PE38 抑制了肿瘤的增长^[156]。同时, PNCs 载体可增强 RNA 的稳定性, 并改善其对质膜的渗透性。2018 年, Guan 团队为构建核酸递送载体在 sHsp 的基因序列中融合聚精氨酸, 用于复合 siRNA; 研究结果表明, sHsp-siRNA 可被有效地转染到宫颈癌细胞中, 并介导了 GFP 基因的沉默^[106]。该团队进一步在 sHsp 上修饰肿瘤靶向肽 RGD 和反式激活蛋白 (trans-activator, Tat) 以优化载体性质, 发现在 CT26 异种移植的小鼠肿瘤模型中, 递送 RGD-Tat-Hsp 与端粒酶逆转录酶 siRNA 复合物完全抑制了肿瘤的增长^[107]。

PNCs 用于治疗性蛋白质 (例如具有生物催化活性的酶, 直接参与基因调控、细胞凋亡或免疫反

应的蛋白)的递送,对于改善它们的生物学功能,减缓疾病的发展进程十分重要。例如,铁蛋白负载血浆囊泡相关蛋白抗体和超氧化物歧化酶^[147]、鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)颗粒中包装核转录因子和毒素蛋白^[157]、铁蛋白负载细胞色素C^[158]、vault封装趋化因子21(C-C motif chemokine ligand 21, CCL21)^[159]的验证结果表明,这些蛋白的生物学活性均被显著增强。

综上,PNCs作为载体,改善了药物的应用局限,拓展了它们的适用性。随着对PNCs体内分布特性、细胞内化、降解途径、免疫作用以及靶向递送和循环特性的了解不断深入,PNCs有望在临床疾病治疗中得到应用。

3.2 光敏剂和光热剂

光疗包括光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)和光热治疗(photothermal therapy, PTT),已发展成为一种有效的肿瘤疗法。其中,PDT进入临床用于肿瘤的治疗已有40余年;而PTT则一般用于增强局部光热效果,尚未在临床中开展大型测试。然而,光敏剂(photosensitizer agents, PSAs)和光热剂(photothermal agents, PTAs)的应用不足表现在水溶性、靶向性和光稳定性较差,且细胞毒性和免疫原性较高。将PNCs用于光敏剂或光热剂的负载,是改善以上不足的有效方法。

已有许多研究探索了PNCs在光疗中的作用。例如,CCMV衣壳内负载四碘化锌酞菁纳米颗粒^[139]、HPV衣壳结构内封装光敏剂IR700^[160]、HBVc蛋白中封装IR780^[141]、铁蛋白中装载IR820^[161]的实验结果均表明,PNCs的封装使它们的稳定性被提高,肿瘤疗效也得到了改善。此外,PNCs多样的功能化策略和灵活的物质负载方式,使它们有望被开发为集成像观察、靶向递送和联合治疗(例如PDT和PTT、PDT/PTT和药物)为一体的多功能一体化平台。据报道,铁蛋白负载IR820,在近红外区域显示出强吸收的特性;在荧光、光声多模成像和PTT治疗中,pTA的光热转换效率被显著地改善^[161]。例如,也有研究以染料IR1061修饰铁蛋白纳米笼,并使其负载抗癌药物紫杉醇形成复合物;同时,将肿瘤靶向分子叶酸与上述复合物共轭,用于pH/NIRII触发的协同PTT肿瘤治疗^[154]。

光疗在肿瘤的诊疗中发挥着重要的作用。上述实例表明,PNCs的应用可改善PSAs和PTAs的溶解性和光热转化效率,增强光疗效果并降低细胞毒性,这使它们在肿瘤治疗中表现出巨大的应用潜力。

3.3 医学影像

3.3.1 磁共振成像

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)是一种用于生物医药动力学研究和疾病诊断的多功能软组织成像技术。然而,MRI空间分辨率不足,导致不能有效地检测生物组织中低丰度的疾病标志分子,限制了该技术在疾病早期诊断中的应用。另外,由于缺乏选择性,MRI成像结果中假阳性率较高。例如,典型的钆(gadolinium, Gd)螯合物和临床中应用的超顺磁性纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nano-particles, SPIONs)等造影剂特异性差,不能准确地区别癌细胞与正常细胞。PNCs用于造影剂的递送,通过改变它们在体内的动力学特征,有望提高MRI检测的灵敏度。此外,利用PNCs的靶向修饰和多价渗入造影剂的能力,可以通过增加靶器官或组织中造影剂的浓度以提高弛豫率,这对于改善成像效果和减弱造影剂的细胞毒性起到关键作用。因此,PNCs是提高MRI信噪比和增强病变组织与正常组织之间差异的理想平台。

PNCs中的铁蛋白具有合成金属纳米粒子的可塑性,这使其在MRI成像中被广泛地探讨。以铁蛋白包覆约5 nm的氧化钆纳米粒子,其MRI弛豫率比临床应用的顺磁性Gd螯合物高出数十倍^[162];如被表征装载有氧化铁核心的铁蛋白纳米笼,则可表现出极高的横向弛豫率($224 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,其中 $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$)^[163]。铁蛋白作为造影剂的递送载体,还可以实现对磁性强度和弛豫率的调控^[164]。这为将其他MRI探针如锰类造影剂负载于铁蛋白提供了新的思路。

此外,已有研究将PNCs靶向修饰后用于造影剂的递送,来增强局部成像的特异性。例如,铁蛋白修饰RGD-4C和EGF靶向肽,增强了造影剂的细胞特异性^[165]。除铁蛋白外,Ls和各种VLPs也被开发并用于MRI成像。

3.3.2 正电子发射型计算机断层显像

正电子发射型计算机断层显像(positron emission tomography, PET)是一种建立在放射性示踪剂(例如 ^{11}C 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 和 ^{124}I)检测上的成像方式,具有灵敏度高、特异性强和定位精确等优势。临床中PET主要用于肿瘤、神经系统、心血管和心肌代谢等疾病的诊疗项目中。但由于这类示踪剂具有一定的毒性,在使用中需严格控制用量。PNCs递送PET显影剂,可以显著改善成像效果并降低毒性。例如,用放射性核素铜64(^{64}Cu)标记噬菌体MS2

衣壳和其变体,经尾静脉注射到肿瘤移植的小鼠中,采用 PET-CT (computerized tomography) 监测的结果表明 MS2 衣壳的循环时间更长^[166];以仙台病毒 (hemagglutinating virus of Japan, HVJ) VLP 包裹氟化物 and 用于靶向的氧化铁纳米颗粒,经 PET 成像解析了其在小鼠中的动态分布^[167]。如上所述, PNCs 应用于 PET 成像,既实现了对被标记物的动态示踪,又无明显的不良副作用产生。

3.3.3 光学成像

光学成像是科学研究中常用的一种表征手段,具有无创性、高时空分辨率和高灵敏度的优势。光学试剂,如有机染料、量子点、上转换纳米颗粒和金属纳米粒子等,因发生荧光共振能量转移和自淬灭等,制约了对被标记物的长期监测。部分光学试剂还存在着安全问题的困扰,包括重金属毒性和体内残留等。将光学试剂包裹在 PNCs 中,可减弱它们的信号淬灭,实现长时间高密度的监测,并且能够提高安全性。例如,通过荧光染料标记 CPMV 颗粒,在对血管内皮细胞进行至少 72 h 的成像过程中没有发现荧光信号的减弱^[168];与游离的吲哚菁绿相比,用雀麦花叶病毒 (brome mosaic virus, BMV) 颗粒封装吲哚菁绿,提供了更强和更持久的光声信号^[169]。荧光分子标记的 PNCs 还被用于复合物的构建、特异性的识别和共定位实验等。例如,有研究以基因融合 ABD 肽类的 Aa-Ls 构建多价抗体结合的 Ab/ABD-Aa-Ls 复合物,分别用荧光染料 Alexa Fluor 647 和荧光素标记抗体和复合物,对它们的结合过程进行可视化和定量分析,验证该复合物是否在抗体的引导下选择性地结合靶细胞^[170]。

通过近红外荧光成像技术,利用 PNCs 的纳米平台,有潜力实现对深层组织的观察。例如,在 SV40 病毒外壳蛋白的腔内封装 Ag₂S 量子点,可在小鼠体内追踪颗粒的动态分布^[171];同样采用上述载体封装负载有两种 NIRII 荧光分子的纳米颗粒,表现出增强的荧光信号、光稳定性和生物相容性^[172]。

如上所述, PNCs 作为载体,有助于改善 MRI、PET 和光学成像试剂的不足和增强成像对比度。同时, PNCs 为成像与治疗的结合提供了平台,是很有前景的肿瘤等疾病诊疗工具。

3.4 纳米反应器(酶制剂、无机纳米颗粒)

近年来, PNCs 作为纳米反应容器用于改善酶催化反应效率的研究逐渐增多。PNCs 的物理尺寸允许多种酶进行催化反应,同时与细胞质中的物质交流保持动态平衡。它们作为高度工程化和模块化

的分子工具,还具备控制反应速率和进程的能力。

PNCs 中的封装素、Ls 和 BMCs 等已经被开发为高效的纳米反应容器。首先,它们可以延缓酶生物活性的下降,还可以通过微隔室的区化提高反应效率。有研究在 *S. cerevisiae* 中表达 *M. xanthus* 封装素,将异源酶选择性地靶向在腔内,用于细胞器的构建;通过共定位实验观察到,在微区内酶与各组分间的互作增强,且与宿主细胞中的底物高效地进行周转,支持酶促反应的顺利进行^[35]。其次, PNCs 纳米反应器可使反应稳定且持续地进行。例如,在 *E. coli* 中重组表达 PDU 利用类的 BMC 和多磷酸盐激酶 1 (polyphosphate kinase 1, PPK1),在 TP 的引导下将 PPK1 封装在 BMC 内;在 *E. coli* 处于生长期和进入稳定期时,检测发现被封装的 PPK1 多磷酸盐水平稳定增加,而单独的 PPK1 过表达只会出现短暂的多磷酸盐增加和磷酸盐摄取^[110]。另外, PNCs 作为纳米容器的优势还在于对酶的包容性。例如,有研究将三种酶通过 TP 引导至 BMC 内,以探究其包裹酶的适用性。结果表明:β-半乳糖苷酶、酯酶 Est5 和辅因子依赖性的甘油脱氢酶均可以定向到 BMC 腔内,并具有催化活性^[173]。另外, PNCs 也被用于工业产品的开发。例如,在 *E. coli* 中重组表达弗氏柠檬酸杆菌 (*C. freundii*) 来源的 BMC,通过 TP 标记丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶,将它们引导至 BMC 腔内,催化生成乙醇^[111]。

重组 PNCs 也被用作尺寸和形状受限的反应器,合成或组装无机纳米粒子,被广泛地应用于材料化学和生物医学领域。相比这些纳米粒子原有的制作工艺, PNCs 在反应中的应用不仅降低了生产成本,而且改善了纳米粒子尺寸的均一性,同时也增强了它们的生物相容性。例如,有研究在还原电位下将去铁铁蛋白置于铂离子溶液中,合成了铁蛋白外壳铂心纳米颗粒,可用作电催化剂^[174];通过调整 CCMV 衣壳的硅化作用,在其内腔形成了二氧化硅颗粒^[175];E2 的内腔中分别渗入用于模拟铁蛋白的催化结构域和引入负电荷的肽,首次被用于铁纳米颗粒的合成^[176]。

基于仿生的理念,将 PNCs 开发为纳米反应容器,不管是用于复杂的催化反应还是尺寸受限纳米粒子的合成,均表现出安全、高效和可控的优势。

3.5 疫苗

单独的抗原由于免疫原性差和血液等的清除作用,往往不能有效地激活免疫反应,产生特异性的保护作用。而利用 PNCs 展示抗原则是通过将其递

送至免疫系统, 增强免疫效应的有效策略。通过淋巴管壁上 200 nm 的孔允许 PNCs 扩散, 经淋巴 (lymph glands, LNs) 系统自由地排出。PNCs 引流至 LNs 的动力学被广泛地研究, 可实现更高效的抗原特异性免疫效应。例如, 直径为 30 nm 的噬菌体 Q β 外壳蛋白被注射到小鼠足中, 2 h 后会聚集在 LNs 内^[177]; CpG-PEG 修饰的 E2 也表现出在 LNs 内滞留和增加的 APCs 摄取^[178]。

PNCs 和它们的衍生物在疫苗开发中的应用已经非常成熟。其中, VLPs 是最具吸引力的抗原递呈平台, 有力地推动了疫苗的发展。目前市售的这类疫苗有人乳头瘤病毒 HPV 疫苗^[179]、戊型肝炎病毒 HEV 疫苗^[180], 进入临床前或临床试验的有艾滋病病毒 HIV 疫苗^[181]、诺如病毒 NV 疫苗^[182]、寨卡病毒 (zika virus, ZV) 疫苗^[183] 和流感病毒疫苗^[184] 等。也有许多文章总结了 VLPs 在疫苗开发中的优势和应用中的进展^[16, 185-187]。此外, 铁蛋白在抗原呈递和疫苗构建中, 同样表现出增强免疫反应和引发特异性保护作用的优势。相关研究表明, 采用铁蛋白构建的流感病毒^[89, 188]、疱疹病毒 (epstein-barr virus, EBV)^[90]、猪繁殖呼吸道症候群病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)^[85]、口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV)^[87]、新冠病毒^[1] 和肿瘤^[83] 等疫苗, 有效预防了病原体的感染, 减缓了疾病的发展。除 VLPs 和铁蛋白外, 其他类型的 PNCs 如封装素等, 也被用作抗原支架^[96, 189]。

下文以疟疾和癌症疫苗为例, 更具体地阐述 PNCs 在疫苗中的应用。

3.5.1 疟疾疫苗

PNCs 可以直接呈递抗原表位或封装来自寄生虫的免疫原性蛋白。Mosquirix (RTS, S/AS01) 是针对疟疾前期红细胞的主要疫苗, 在 IIb 期临床试验中表现出 53% 的有效性和可控的安全性。该疫苗在 *S. cerevisiae* 中表达, 由 HBVc 的 C 端与恶性疟原虫环孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 的 19 个中央串联重复序列融合而成^[190]。进一步优化的疟疾疫苗 R21 已进入 I/IIa 期临床试验。R21 颗粒由单个 CSP-HBVc 融合蛋白形成, 相比于 Mosquirix 疫苗, 其 CSP 比例增加。在 BALB/c 小鼠中, R21 在低剂量下就具有免疫原性。通过将 R21 与 VLP 相结合, 能够同时诱导体液和细胞免疫反应^[191]。在另一项研究中, 将 HBVc 作为载体, 融合 CSP 特异性的 B 细胞表位和通用型的 T 细胞表位形成候选疫苗 V12.PF3.1, 在小鼠体内产生了高于 10⁶ 滴

度的特异性抗体^[192]。

在其他 PNCs 作为抗原载体的研究中发现, 它们同样能够引发有效的免疫反应。例如, E2 作为支架展示疟原虫的免疫表位 MAL₁ 和 MAL₂, 在兔中免疫引发了抗原特异性抗体产生^[102]。

3.5.2 癌症疫苗

模拟病原体原有的形态, 在 PNCs 的表面展示肿瘤特异性或肿瘤相关抗原, 可以更有效地引发免疫反应。肿瘤免疫反应的发生依赖于 APCs, 主要是树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 对抗原的摄取, 其反应的关键步骤包括: DCs 的激活、DCs 向 LNs 的运输及其与适应性免疫细胞如 CD8 T 细胞之间的通讯以及对细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的激活, 从而实现肿瘤细胞溶解。构建 PNCs 抗原递呈系统, 可以促进 APCs 的摄取, 增强其与免疫细胞的互作。有研究通过比较二十面体豇豆花叶病毒 CPMV 和丝状马铃薯病毒 X (potato virus X, PVX) VLP 两种载体, 发现 CPMV 外壳显示出增强的 LNs 转运、滞留以及增加的 APCs 摄取^[193]。

目前 PNCs 已经实现了多种肿瘤抗原的递送, 显著增强了肿瘤免疫反应的发生。例如, 有关 VLPs 在癌症疫苗中的探索有: 用 CPMV 和 TMV 颗粒展示乳腺癌、结肠癌和前列腺癌等多种癌细胞表面过表达的 Tn 抗原; 用 TMV 颗粒融合 CTL 表位 OVA 与黑色素瘤自身抗原构建的疫苗显著提高了小鼠存活率^[194-196]。此外, 重组 sHsp 呈递主要组织相容性复合物 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 限制性肽表位、E2 组分展示 MHC I 限制性肽表位并封装 CpG、铁蛋白展示黑色素瘤抗原 RFP 和 MVP 蛋白作为 CCL21 的载体, 均抑制了肿瘤增长^[159, 197-198]。

综合 PNCs 在疟疾和癌症防治中的表现可知, PNCs 作为抗原载体可以有效地改善疫苗的免疫疗效。当然 PNCs 在疫苗中的应用远不限于上述两类疾病, 它们在防治其他病毒侵袭、细菌感染和重大疾病等疫苗的开发中同样具有重要作用^[199]。

3.6 特殊制剂的开发(抗菌剂)

天然提取的抗菌剂如甲壳素和芥末, 不仅耐受性较差, 且抗菌作用有限。另外, 广泛存在的抗菌素耐药性严重危及预防和治疗病原体感染的能力。因此, 对新型抗菌产品的开发提出了迫切需求。近年冠状病毒的流行更加突出了有效抗菌和抗病毒保护的重要性。PNCs 可用于新型抗菌药物的开发, 通过提高药物的局部浓度, 改善其抗菌活性。

目前,金属抗菌剂的开发是一种新型的抗菌策略,例如银纳米粒子 Ag-NPs。有研究在重组表达 *T. maritima* 来源的封装素隔室内合成了 Ag-NPs,发现其抗菌活性优于商业柠檬酸盐涂层的 Ag-NPs 和 AgNO₃^[97]。应用铁蛋白,基于不同的方法均可以合成 Ag-NPs。其中一项研究采用光催化反应将银离子还原,在铁蛋白表面形成 Ag-NPs;经验证,其在较低浓度下即可抑制金黄色葡萄球菌的活性^[200]。

过氧化氢也可作为抗菌剂使用。在噬菌体 P22 颗粒内部封装还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 和其氧化酶 (NADH oxidase, NOX), 可以通过氧气的还原产生过氧化氢,进而有效地抑制细菌的生长^[201]。

4 总结展望

许多研究已经揭示 PNCs 的结构特征、理化性质和应用潜力,同时合成生物学为生产天然存在或再设计的 PNCs 提供了技术支持。原核表达系统生产成本低且蛋白质表达效率高,适用于多数 VLPs、铁蛋白、Dps、封装素、Ls、E2 和 BMC 的重组表达。真核表达系统则具有完善的蛋白质翻译和修饰能力,能够正确表达并组装形成具有包膜结构的 VLPs 和真核细胞来源的 vaults。它们具有纳米尺寸的结构、大小和特定的功能,被广泛地用于药物输送、医学影像、纳米反应容器、疫苗制备和特殊制剂的开发中。

然而,在应用过程中,PNCs 也表现出一些不足。例如,许多 PNCs 的自组装机制尚未被探索清楚,限制了其应用。尽管经功能化修饰的 PNCs 已经实现部分外源分子在组织或细胞内的高效聚集,但导致它们滞留的原因、摄取的途径和在细胞内降解的内在详细机制,同样有待进一步探究。此外,PNCs 载体对于固有屏障(如肠道屏障和血脑屏障)的克服尚未取得颠覆性成果,这限制了它们在血液疾病和脑疾病研究与治疗中的应用。

近几十年来,多学科技术的交叉运用和对蛋白质折叠的深入理解,为新型蛋白纳米区室的设计和生提供了机遇。将蛋白质组件自下而上地重新组装成新的纳米结构,拓宽了这类生物颗粒的应用范围。这类纳米颗粒的结构、自组装特性、特异性修饰、外源物质的负载和生物相容性等特性均可被精确地设计与生产,相信它们同 PNCs 一样,将在生物医学领域发挥更大的研究和应用价值^[202-203]。

[参 考 文 献]

- [1] Powell AE, Zhang KM, Sanyal M, et al. A single immunization with spike-functionalized ferritin vaccines elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in mice. *ACS Cent Sci*, 2021, 7: 183-99
- [2] He LL, Lin XH, Wang Y, et al. Single-component, self-assembling, protein nanoparticles presenting the receptor binding domain and stabilized spike as SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Sci Adv*, 2021, 7: eabf1591
- [3] Tan TK, Rijal P, Rahikainen R, et al. A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses. *Nat Commun*, 2021, 12: 542
- [4] Jones JA, Cristie-David AS, Andreas MP, et al. Triggered reversible disassembly of an engineered protein nanocage. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 25034-41
- [5] Casanas A, Guerra P, Fita I, et al. Vault particles: a new generation of delivery nanodevices. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23: 972-7
- [6] Terasaka N, Azuma Y, Hilvert D. Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 5432-7
- [7] Liu Q, Shaukat A, Kyllonen D, et al. Polyelectrolyte encapsulation and confinement within protein cage-inspired nanocompartments. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1551
- [8] Kerfeld CA, Aussignargues C, Zarzycki J, et al. Bacterial microcompartments. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 277-90
- [9] 黄利利, 张韩, 王伟伟, 等. 基于生物正交反应的病毒功能化及其生物医学应用. *合成生物学*, 2021, 2: 1-18
- [10] Shirbaghaee Z, Bolhassani A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: vaccination and delivery systems. *Biopolymers*, 2016, 105: 113-32
- [11] McCoy K, Selivanovitch E, Luque D, et al. Cargo retention inside P22 virus-like particles. *Biomacromolecules*, 2018, 19: 3738-46
- [12] Zhang J, Zhang WJ, Yang MS, et al. Passive cancer targeting with a viral nanoparticle depends on the stage of tumorigenesis. *Nanoscale*, 2021, 13: 11334-42
- [13] Akhras S, Toda M, Boller K, et al. Cell-permeable capsids as universal antigen carrier for the induction of an antigen-specific CD8⁺ T-cell response. *Sci Rep*, 2017, 7: 9630
- [14] Gomes AC, Mohsen M, Bachmann MF. Harnessing nanoparticles for immunomodulation and vaccines. *Vaccines*, 2017, 5: 6
- [15] Aniahyei SE, DuFort C, Kao CC, et al. Self-assembly approaches to nanomaterial encapsulation in viral protein cages. *J Mater Chem*, 2008, 18: 3763-74
- [16] Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19: 59
- [17] Li LL, Xu CC, Zhang WJ, et al. Cargo-compatible encapsulation in virus-based nanoparticles. *Nano Lett*, 2019, 19: 2700-6
- [18] Molino NM, Wang SW. Caged protein nanoparticles for

- drug delivery. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 28: 75-82
- [19] Li F, Wang QB. Fabrication of nanoarchitectures templated by virus-based nanoparticles: strategies and applications. *Small*, 2014, 10: 230-45
- [20] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790: 589-99
- [21] Sun CJ, Yang H, Yuan Y, et al. Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for *in vivo* kidney targeting and biomedical imaging. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 8617-24
- [22] Surguladze N, Patton S, Cozzi A, et al. Characterization of nuclear ferritin and mechanism of translocation. *Biochem J*, 2005, 388: 731-40
- [23] Bellini M, Mazzucchelli S, Galbiati E, et al. Protein nanocages for self-triggered nuclear delivery of DNA-targeted chemotherapeutics in cancer cells. *J Control Release*, 2014, 196: 184-96
- [24] Fan KL, Cao CQ, Pan YX, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 459-64
- [25] Xing RM, Wang XY, Yan LL, et al. Fabrication of water soluble and biocompatible CdSe nanoparticles in apoferritin with the aid of EDTA. *Dalton Trans*, 2009, 10: 1710-3
- [26] Ceci P, Chiancone E, Kasyutich O, et al. Synthesis of iron oxide nanoparticles in *Listeria innocua* Dps (DNA-binding protein from starved cells): a study with the wild-type protein and a catalytic centre mutant. *Chemistry*, 2010, 16: 709-17
- [27] Okuda M, Suzumoto Y, Iwahori K, et al. Bio-templated CdSe nanoparticle synthesis in a cage shaped protein, *Listeria*-Dps, and their two dimensional ordered array self-assembly. *Chem Commun*, 2010, 46: 8797-9
- [28] Zhu WW, Fang T, Zhang WJ, et al. A ROS scavenging protein nanocage for *in vitro* and *in vivo* antioxidant treatment. *Nanoscale*, 2021, 13: 4634-43
- [29] Uchida M, Maier B, Waghwan HK, et al. The archaeal Dps nanocage targets kidney proximal tubules via glomerular filtration. *J Clin Invest*, 2019, 129: 3941-51
- [30] Swift J, Wehbi WA, Kelly BD, et al. Design of functional ferritin-like proteins with hydrophobic cavities. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 6611-9
- [31] Rahmanpour R, Bugg TDH. Assembly *in vitro* of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. *FEBS J*, 2013, 280: 2097-104
- [32] Sutter M, Boehringer D, Gutmann S, et al. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 939-47
- [33] Akita F, Chong KT, Tanaka H, et al. The crystal structure of a virus-like particle from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* provides insight into the evolution of viruses. *J Mol Biol*, 2007, 368: 1469-83
- [34] Giessen TW, Orlando BJ, Verdegaal AA, et al. Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity. *Elife*, 2019, 8: e46070
- [35] Lau YH, Giessen TW, Altenburg WJ, et al. Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote. *Nat Commun*, 2018, 9: 1311
- [36] Ross J, McIver Z, Lambert T, et al. Pore dynamics and asymmetric cargo loading in an encapsulin nanocompartment. *Sci Adv*, 2022, 8: eabj4461
- [37] Patterson DP, Su M, Franzmann TM, et al. Characterization of a highly flexible self-assembling protein system designed to form nanocages. *Protein Sci*, 2014, 23: 190-9
- [38] Zhang X, Meining W, Fischer M, et al. X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 angstrom resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J Mol Biol*, 2001, 306: 1099-114
- [39] Azuma Y, Zschoche R, Hilvert D. The C-terminal peptide of *Aquifex aeolicus* riboflavin synthase directs encapsulation of native and foreign guests by a cage-forming lumazine synthase. *J Biol Chem*, 2017, 292: 10321-7
- [40] Mortl S, Fischer M, Richter G, et al. Biosynthesis of riboflavin lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, 271: 33201-7
- [41] Seebeck FP, Woycechowsky KJ, Zhuang W, et al. A simple tagging system for protein encapsulation. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 4516-7
- [42] Patel MS, Nemeria NS, Furey W. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem*, 2014, 289: 16615-23
- [43] Kim KK, Kim R, Kim SH. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 1998, 394: 595-9
- [44] Flenniken ML, Willits DA, Brumfield S, et al. The small heat shock protein cage from *Methanococcus jannaschii* is a versatile nanoscale platform for genetic and chemical modification. *Nano Lett*, 2003, 3: 1573-6
- [45] Axen SD, Erbilgin O, Kerfeld CA. A taxonomy of bacterial microcompartment loci constructed by a novel scoring method. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10: e1003898
- [46] Chessher A, Breitling R, Takano E. Bacterial microcompartments: biomaterials for synthetic biology-based compartmentalization strategies. *ACS Biomater Sci Eng*, 2015, 1: 345-51
- [47] Kerfeld CA, Erbilgin O. Bacterial microcompartments and the modular construction of microbial metabolism. *Trends Microbiol*, 2015, 23: 22-34
- [48] Fan CG, Bobik TA. The N-terminal region of the medium subunit (PduD) packages adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase (PduCDE) into the Pdu microcompartment. *J Bacteriol*, 2011, 193: 5623-8
- [49] Price GD, Pengelly JLL, Forster B, et al. The cyanobacterial CCM as a source of genes for improving photosynthetic CO₂ fixation in crop species. *J Exp Bot*, 2013, 64: 753-68
- [50] Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC, et al. Vaults. III. vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol*, 1991, 112: 225-35
- [51] Bedwell GJ, Zhou Z, Uchida M, et al. Selective biotemplated synthesis of TiO₂ inside a protein cage.

- Biomacromolecules, 2015, 16: 214-8
- [52] Brown SD, Fiedler JD, Finn MG. Assembly of hybrid bacteriophage Q β virus-like particles. *Biochemistry*, 2009, 48: 11155-7
- [53] Phelps JP, Dao P, Jin HF, et al. Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biotechnol*, 2007, 128: 290-6
- [54] Wang YS, Ouyang W, Liu XJ, et al. Virus-like particles of hepatitis B virus core protein containing five mimotopes of infectious bursal disease virus (IBDV) protect chickens against IBDV. *Vaccine*, 2012, 30: 2125-30
- [55] Cho HJ, Shin HJ, Han IK, et al. Induction of mucosal and systemic immune responses following oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 L1. *Vaccine*, 2007, 25: 8049-57
- [56] Legendre D, Fastrez J. Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *J Biotechnol*, 2005, 117: 183-94
- [57] Freivalds J, Dislers A, Ose V, et al. Assembly of bacteriophage Q β virus-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2006, 123: 297-303
- [58] Brumfield S, Willits D, Tang L, et al. Heterologous expression of the modified coat protein of cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1049-53
- [59] Liu WQ, Jiang HN, Zhou JM, et al. Recombinant Dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. *Virus Genes*, 2010, 40: 53-9
- [60] Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Musacchio A, et al. *In vitro* assembly into virus-like particles is an intrinsic quality of *Pichia pastoris* derived HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 68-74
- [61] Juozapaitis M, Serva A, Kucinskaite I, et al. Generation of Menangle virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2007, 130: 441-7
- [62] Slibinskas R, Zvirbliene A, Gedvilaite A, et al. Synthesis of mumps virus nucleocapsid protein in yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2003, 103: 43-9
- [63] Petraityte R, Tamosiunas PL, Juozapaitis M, et al. Generation of Tioman virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res*, 2009, 145: 92-6
- [64] Saunders K, Sainsbury F, Lomonosoff GP. Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology*, 2009, 393: 329-37
- [65] Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine*, 2008, 26: 1855-62
- [66] Ju HY, Wei N, Wang Q, et al. Goose parvovirus structural proteins expressed by recombinant baculoviruses self-assemble into virus-like particles with strong immunogenicity in goose. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409: 131-6
- [67] Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, et al. Norovirus VLPs and Rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine*, 2011, 29: 8126-33
- [68] Antonis AFG, Bruschke CJM, Maranga L, et al. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 2006, 24: 5481-90
- [69] Li C, Liu F, Liang MF, et al. Hantavirus-like particles generated in CHO cells induce specific immune responses in C57BL/6 mice. *Vaccine*, 2010, 28: 4294-300
- [70] Warfield KL, Swenson DL, Negley DL, et al. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine*, 2004, 22: 3495-502
- [71] Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, et al. Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine*, 2010, 28: 6588-96
- [72] Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J*, 1999, 13: 2339-40
- [73] Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*, 2000, 182: 302-5
- [74] Calisti L, Benni I, Trabuco MC, et al. Probing bulky ligand entry in engineered archaeal ferritins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861: 450-6
- [75] Hofmann KJ, Cook JC, Joyce JG, et al. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, 1995, 209: 506-18
- [76] Kamp HD, Swanson KA, Wei RR, et al. Design of a broadly reactive Lyme disease vaccine. *NPJ Vaccines*, 2020, 5: 33
- [77] Turris VD, Trabuco MC, Peruzzi G, et al. Humanized archaeal ferritin as a tool for cell targeted delivery. *Nanoscale*, 2017, 9: 647-55
- [78] Qi M, Zhang XE, Sun XX, et al. Intranasal nanovaccine confers homo- and hetero-subtypic influenza protection. *Small*, 2018, 14: 1703207
- [79] Pandolfi L, Bellini M, Vanna R, et al. H-ferritin enriches the curcumin uptake and improves the therapeutic efficacy in triple negative breast cancer cells. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 3318-30
- [80] Kang HJ, Kang YJ, Lee YM, et al. Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatform. *Biomaterials*, 2012, 33: 5423-30
- [81] Han JA, Kang YJ, Shin C, et al. Ferritin protein cage nanoparticles as versatile antigen delivery nanoplatforms for dendritic cell (DC)-based vaccine development. *Nanomedicine*, 2014, 10: 561-9
- [82] Ducasse R, Wang WA, Navarro MGJ, et al. Programmed self-assembly of a biochemical and magnetic scaffold to trigger and manipulate microtubule structures. *Sci Rep*, 2017, 7: 11344
- [83] Wang WJ, Liu ZD, Zhou XX, et al. Ferritin nanoparticle-based SpyTag/SpyCatcher-enabled click vaccine for tumor

- immunotherapy. *Nanomedicine*, 2019, 16: 69-78
- [84] Fang T, Zhu WW, Li CQ, et al. Role of surface RGD patterns on protein nanocages in tumor targeting revealed using precise discrete models. *Small*, 2019, 15: 1904838
- [85] Ma H, Li XM, Li JL, et al. Immunization with a recombinant fusion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified GP5 and ferritin elicits enhanced protective immunity in pigs. *Virology*, 2021, 552: 112-20
- [86] Qu ZH, Li MZ, Guo YG, et al. Expression, purification, and characterisation of recombinant ferritin in insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnol Lett*, 2020, 42: 57-65
- [87] Chen YB, Hu Y, Chen HC, et al. A ferritin nanoparticle vaccine for foot-and-mouth disease virus elicited partial protection in mice. *Vaccine*, 2020, 38: 5647-52
- [88] Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, et al. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther*, 2001, 8: 846-54
- [89] Kelly HG, Tan HX, Juno JA, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines drive extended germinal center activity and memory B cell maturation. *JCI Insight*, 2020, 5: e136653
- [90] Kanekiyo M, Bu W, Joyce MG, et al. Rational design of an Epstein-Barr virus vaccine targeting the receptor-binding site. *Cell*, 2015, 162: 1090-100
- [91] Kanekiyo M, Joyce MG, Gillespie RA, et al. Mosaic nanoparticle display of diverse influenza virus hemagglutinins elicits broad B cell responses. *Nat Immunol*, 2019, 20: 362-72
- [92] Tamura A, Fukutani Y, Takami T, et al. Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 13-20
- [93] Cassidy-Amstutz C, Oltrogge L, Going CC, et al. Identification of a minimal peptide tag for *in vivo* and *in vitro* loading of encapsulin. *Biochemistry*, 2016, 55: 3461-8
- [94] Kuenzle M, Mangler J, Lach M, et al. Peptide-directed encapsulation of inorganic nanoparticles into protein containers. *Nanoscale*, 2018, 10: 22917-26
- [95] Van de Steen A, Khalife R, Colant N, et al. Bioengineering bacterial encapsulin nanocompartments as targeted drug delivery system. *Synth Syst Biotechnol*, 2021, 6: 231-41
- [96] Lagoutte P, Mignon C, Stadthagen G, et al. Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design. *Vaccine*, 2018, 36: 3622-8
- [97] Giessen TW, Silver PA. Converting a natural protein compartment into a nanofactory for the size-constrained synthesis of antimicrobial silver nanoparticles. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1497-504
- [98] Xiong XS, Sun C, Vago FS, et al. Cryo-EM structure of heterologous protein complex loaded *Thermotoga maritima* encapsulin capsid. *Biomolecules*, 2020, 10: 1342
- [99] Min JM, Kim S, Lee J, et al. Lumazine synthase protein cage nanoparticles as modular delivery platforms for targeted drug delivery. *Rsc Adv*, 2014, 4: 48596-600
- [100] Zylberman V, Craig PO, Klinke S, et al. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase. *J Biol Chem*, 2004, 279: 8093-101
- [101] Morgunova E, Saller S, Haase L, et al. Lumazine synthase from *Candida albicans* as an anti-fungal target enzyme-structural and biochemical basis for drug design. *J Biol Chem*, 2007, 282: 17231-41
- [102] Domingo GJ, Orru S, Perham RN. Multiple display of peptides and proteins on a macromolecular scaffold derived from a multienzyme complex. *J Mol Biol*, 2001, 305: 259-67
- [103] Buecheler JW, Howard CB, de Bakker CJ, et al. Development of a protein nanoparticle platform for targeting EGFR expressing cancer cells. *J Chem Technol Biotechnol*, 2015, 90: 1230-6
- [104] Usui K, Yoshida T, Maruyama T, et al. Small heat shock protein of a hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. strain KS-1, exists as a spherical 24 mer and its expression is highly induced under heat-stress conditions. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92: 161-6
- [105] Xi D, Wei P, Zhang CS, et al. The minimal α -crystallin domain of Mj Hsp 16.5 is functional at non-heat-shock conditions. *Proteins*, 2014, 82: 1156-67
- [106] Guan X, Chang Y, Sun JH, et al. Engineered Hsp protein nanocages for siRNA delivery. *Macromol Biosci*, 2018, 18: 1800013
- [107] Wang H, Liu N, Yang FU, et al. Bioengineered protein nanocage by small heat shock proteins delivering mTERT siRNA for enhanced colorectal cancer suppression. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5: 1330-40
- [108] Chen HY, Chu ZM, Zhang Y, et al. Over-expression and characterization of the recombinant small heat shock protein from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 1089-94
- [109] Parsons JB, Frank S, Bhella D, et al. Synthesis of empty bacterial microcompartments, directed organelle protein incorporation, and evidence of filament-associated organelle movement. *Mol Cell*, 2010, 38: 305-15
- [110] Liang MZ, Frank S, Luensdorf H, et al. Bacterial microcompartment-directed polyphosphate kinase promotes stable polyphosphate accumulation in *E. coli*. *Biotechnol J*, 2017, 12: 1600415
- [111] Lawrence AD, Frank S, Newnham S, et al. Solution structure of a bacterial microcompartment targeting peptide and its application in the construction of an ethanol bioreactor. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 454-65
- [112] Huber I, Palmer DJ, Ludwig KN, et al. Construction of recombinant pdu metabolosome shells for small molecule production in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 2145-56
- [113] Hagen A, Sutter M, Sloan N, et al. Programmed loading and rapid purification of engineered bacterial microcompartment shells. *Nat Commun*, 2018, 9: 2881
- [114] Hagen AR, Plegaria JS, Sloan N, et al. *In vitro* assembly of diverse bacterial microcompartment shell architectures. *Nano Lett*, 2018, 18: 7030-7

- [115] Ferlez B, Sutter M, Kerfeld CA. A designed bacterial microcompartment shell with tunable composition and precision cargo loading. *Metab Eng*, 2019, 54: 286-91
- [116] Kalnins G, Cesle EE, Jansons J, et al. Encapsulation mechanisms and structural studies of GRM2 bacterial microcompartment particles. *Nat Commun*, 2020, 11: 388
- [117] Lee MFS, Jakobson CM, Tullman-Ercek D. Evidence for improved encapsulated pathway behavior in a bacterial microcompartment through shell protein engineering. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 1880-91
- [118] Held M, Kolb A, Perdue S, et al. Engineering formation of multiple recombinant eut protein nanocompartments in *E. coli*. *Sci Rep*, 2016, 6: 24359
- [119] Jorda J, Leibly DJ, Thompson MC, et al. Structure of a novel 13 nm dodecahedral nanocage assembled from a redesigned bacterial microcompartment shell protein. *Chem Commun*, 2016, 52: 5041-4
- [120] Goto A, Kouguchi H, Yamano K, et al. Molecular cloning and characterization of major vault protein of *Echinococcus multilocularis*. *Exp Parasitol*, 2013, 134: 102-8
- [121] Galbiati E, Avvakumova S, Rocca AL, et al. A fast and straightforward procedure for vault nanoparticle purification and the characterization of its endocytic uptake. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1862: 2254-60
- [122] Wang M, Abad D, Kickhoefer VA, et al. Vault nanoparticles packaged with enzymes as an efficient pollutant biodegradation technology. *ACS Nano*, 2015, 9: 10931-40
- [123] Stephen AG, Raval-Fernandes S, Huynh T, et al. Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J Biol Chem*, 2001, 276: 23217-20
- [124] Xia Y, Ramgopal Y, Li H, et al. Immobilization of recombinant vault nanoparticles on solid substrates. *ACS Nano*, 2010, 4: 1417-24
- [125] Yoon SW, Lee TY, Kim SJ, et al. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. *Vaccine*, 2012, 30: 3286-94
- [126] Sun W, Jiao CF, Xiao Y, et al. Salt-dependent aggregation and assembly of *E. coli*-expressed ferritin. *Dose Response*, 2016, 14: 1559325816632102
- [127] Cai F, Bernstein SL, Wilson SC, et al. Production and characterization of synthetic carboxysome shells with incorporated luminal proteins. *Plant Physiol*, 2016, 170: 1868-77
- [128] Zhao QJ, Allen MJ, Wang Y, et al. Disassembly and reassembly improves morphology and thermal stability of human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Nanomedicine*, 2012, 8: 1182-9
- [129] Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, 298: 1790-3
- [130] Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol*, 2017, 39: 174-80
- [131] Caivano A, Doria-Rose NA, Buelow B, et al. HIV-1 Gag p17 presented as virus-like particles on the E2 scaffold from *Geobacillus stearothermophilus* induces sustained humoral and cellular immune responses in the absence of IFN γ production by CD4⁺T cells. *Virology*, 2010, 407: 296-305
- [132] Ji M, Zhu J, Xie XX, et al. A novel rapid modularized hepatitis B core virus-like particle-based platform for personalized cancer vaccine preparation via fixed-point coupling. *Nanomedicine*, 2020, 28: 102223
- [133] Aussignargues C, Paasch BC, Gonzalez-Esquer R, et al. Bacterial microcompartment assembly: the key role of encapsulation peptides. *Commun Integr Biol*, 2015, 8: e1039755
- [134] Shen LH, Zhou J, Wang YX, et al. Efficient encapsulation of Fe₃O₄ nanoparticles into genetically engineered hepatitis B core virus-like particles through a specific interaction for potential bioapplications. *Small*, 2015, 11: 1190-6
- [135] Choi H, Eom S, Kim HU, et al. Load and display: engineering encapsulin as a modular nanoplatform for protein-cargo encapsulation and protein-ligand decoration using split intein and SpyTag/SpyCatcher. *Biomacromolecules*, 2021, 22: 3028-39
- [136] Kim H, Choi H, Bae Y, et al. Development of target-tunable P22 VLP-based delivery nanoplatforms using bacterial superglue. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116: 2843-51
- [137] Dedeo MT, Duderstadt KE, Berger JM, et al. Nanoscale protein assemblies from a circular permutant of the tobacco mosaic virus. *Nano Lett*, 2010, 10: 181-6
- [138] Azuma Y, Herger M, Hilvert D. Diversification of protein cage structure using circularly permuted subunits. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 558-61
- [139] Luque D, Escosura ADL, Snijder J, et al. Self-assembly and characterization of small and monodisperse dye nanospheres in a protein cage. *Chem Sci*, 2014, 5: 575-81
- [140] Huang C, Chu CC, Wang XY, et al. Ultra-high loading of sinoporphyrin sodium in ferritin for single-wave motivated photothermal and photodynamic co-therapy. *Biomater Sci*, 2017, 5: 1512-6
- [141] Lu FY, Li ZJ, Sheng YA, et al. Thermal-triggered packing of lipophilic NIR dye IR780 in hepatitis B core at critical ionic strength and cargo-host ratio for improved stability and enhanced cancer phototherapy. *Biomaterials*, 2021, 276: 121035
- [142] Li F, Wang DB, Zhou J, et al. Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 1142-58
- [143] Hoffmann DB, Boker KO, Schneider S, et al. *In vivo* siRNA delivery using JC virus-like particles decreases the expression of rankl in rats. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5: e298
- [144] Smith MT, Hawes AK, Bundy BC. Reengineering viruses and virus-like particles through chemical functionalization strategies. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24: 620-6
- [145] 张文静, 李明, 周维, 等. 基于病毒组件的纳米材料的自组装合成、功能化及应用. *合成生物学*, 2020, 1: 298-318

- [146] Ren DM, Kratz F, Wang SW. Protein nanocapsules containing doxorubicin as a pH-responsive delivery system. *Small*, 2011, 7: 1051-60
- [147] Shuvaev VV, Khoshnejad M, Pulsipher KW, et al. Spatially controlled assembly of affinity ligand and enzyme cargo enables targeting ferritin nanocarriers to caveolae. *Biomaterials*, 2018, 185: 348-59
- [148] Washington-Hughes CL, Cheng YX, Duan XR, et al. *In vivo* virus-based macrofluorogenic probes target azide-labeled surface glycans in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Pharm*, 2013, 10: 43-50
- [149] Zhang Y, Dong YX, Li X, et al. Proanthocyanidin encapsulated in ferritin enhances its cellular absorption and antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 11498-507
- [150] Ghosh S, Banerjee M. A smart viral vector for targeted delivery of hydrophobic drugs. *Sci Rep*, 2021, 11: 7030
- [151] Liang M, Fan K, Zhou M, et al. H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 14900-5
- [152] Zhen ZP, Tang W, Chen HM, et al. RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors. *ACS Nano*, 2013, 7: 4830-7
- [153] Dong YX, Ma YM, Li X, et al. ERK-peptide-inhibitor-modified ferritin enhanced the therapeutic effects of paclitaxel in cancer cells and spheroids. *Mol Pharm*, 2021, 18: 3365-77
- [154] He L, Qing FZ, Li MD, et al. Paclitaxel/IR1061-co-loaded protein nanoparticle for tumor-targeted and pH/NIR-II-triggered synergistic photothermal-chemotherapy. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2337-49
- [155] Zhao J, Ye Z, Yang J, et al. Nanocage encapsulation improves antiepileptic efficiency of phenytoin. *Biomaterials*, 2020, 240: 119849
- [156] Kimchi-Sarfaty C, Vieira WD, Dodds D, et al. SV40 pseudovirion gene delivery of a toxin to treat human adenocarcinomas in mice. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13: 648-57
- [157] Wu DT, Roth MJ. MLV based viral-like-particles for delivery of toxic proteins and nuclear transcription factors. *Biomaterials*, 2014, 35: 8416-26
- [158] Macone A, Masciarelli S, Palombarini F, et al. Ferritin nanovehicle for targeted delivery of cytochrome C to cancer cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 11749
- [159] Kar UK, Srivastava MK, Andersson A, et al. Novel CCL21-vault nanocapsule intratumoral delivery inhibits lung cancer growth. *PLoS One*, 2011, 6: e18758
- [160] Kines RC, Varsavsky I, Choudhary S, et al. An infrared dye-conjugated virus-like particle for the treatment of primary uveal melanoma. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17: 565-74
- [161] Huang P, Rong PF, Jin A, et al. Dye-loaded ferritin nanocages for multimodal imaging and photothermal therapy. *Adv Mater*, 2014, 26: 6401-8
- [162] Sanchez P, Valero E, Galvez N, et al. MRI relaxation properties of water-soluble apoferritin-encapsulated gadolinium oxide-hydroxide nanoparticles. *Dalton Trans*, 2009, 5: 800-4
- [163] Cao CQ, Wang XX, Cai Y, et al. Targeted *in vivo* imaging of microscopic tumors with ferritin-based nanoprobe across biological barriers. *Adv Mater*, 2014, 26: 2566-71
- [164] Cai Y, Cao CQ, He XQ, et al. Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 2619-34
- [165] Uchida M, Flenniken ML, Allen M, et al. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 16626-33
- [166] Farkas ME, Aanei IL, Behrens CR, et al. PET imaging and biodistribution of chemically modified bacteriophage MS2. *Mol Pharm*, 2013, 10: 69-76
- [167] Flexman JA, Cross DJ, Lewellen BL, et al. Magnetically targeted viral envelopes: a PET investigation of initial biodistribution. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2008, 7: 223-32
- [168] Lewis JD, Destito G, Zijlstra A, et al. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med*, 2006, 12: 354-60
- [169] Gupta S, Chatni MR, Rao ALN, et al. Virus-mimicking nano-constructs as a contrast agent for near infrared photoacoustic imaging. *Nanoscale*, 2013, 5: 1772-6
- [170] Kim H, Kang YJ, Min J, et al. Development of an antibody-binding modular nanoplatfor for antibody-guided targeted cell imaging and delivery. *Rsc Adv*, 2016, 6: 19208-13
- [171] Li CY, Li F, Zhang YJ, et al. Real-time monitoring surface chemistry-dependent *in vivo* behaviors of protein nanocages via encapsulating an NIR-II Ag₂S quantum dot. *ACS Nano*, 2015, 9: 12255-63
- [172] Min XH, Zhang J, Li RH, et al. Encapsulation of NIR-II AIEgens in virus-like particles for bioimaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 17372-9
- [173] Wagner HJ, Capitain CC, Richter K, et al. Engineering bacterial microcompartments with heterologous enzyme cargos. *Eng Life Sci*, 2017, 17: 36-46
- [174] Kim JW, Choi SH, Lillehei PT, et al. Electrochemical reconstitution of biomolecules for applications as electrocatalysts for the bionanofuel cell. *Spie*, 2004, 5389: 452-60
- [175] Liu A, Yang L, Verwegen M, et al. Construction of core-shell hybrid nanoparticles templated by virus-like particles. *Rsc Adv*, 2017, 7: 56328-34
- [176] Peng T, Paramelle D, Sana B, et al. Designing non-native iron-binding site on a protein cage for biological synthesis of nanoparticles. *Small*, 2014, 10: 3131-8
- [177] Manolova V, Flace A, Bauer M, et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 1404-13
- [178] Molino NM, Neek M, Tucker JA, et al. Display of DNA on nanoparticles for targeting antigen presenting cells. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 496-501
- [179] Andre FE. Overview of a 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 8 Suppl: S74-

- 8; discussion S79-80
- [180] 邓俊花, 林祥梅, 张永宁, 等. 裂谷热假病毒颗粒研制及鉴定. *生物技术通报*, 2013, (02): 135-9
- [181] Pankrac J, Klein K, McKay PF, et al. A heterogeneous human immunodeficiency virus-like particle (VLP) formulation produced by a novel vector system. *NPJ Vaccines*, 2018, 3: 2
- [182] Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med*, 2011, 365: 2178-87
- [183] Boigard H, Alimova A, Martin GR, et al. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11: e0005608
- [184] Landry N, Ward BJ, Trepanier S, et al. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One*, 2010, 5: e15559
- [185] Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 2012, 31: 58-83
- [186] Chung YH, Cai H, Steinmetz NF. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 156: 214-35
- [187] Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, et al. Major findings and recent advances in virus like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*, 2017, 34: 123-32
- [188] Kanekiyo M, Wei CJ, McTamney P, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 2013, 499: 102-6
- [189] Lee EJ, Lee NK, Kim IS. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106: 157-71
- [190] Olotu A, Moris P, Mwacharo J, et al. Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS, S/AS01(E) and protection against *P falciparum* clinical malaria. *PLoS One*, 2011, 6: e25786
- [191] Collins KA, Snaith R, Cottingham MG, et al. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci Rep*, 2017, 7: 46621
- [192] Sallberg M, Hughes J, Jones J, et al. A malaria vaccine candidate based on a hepatitis B virus core platform. *Intervirology*, 2002, 45: 350-61
- [193] Shukla S, Myers JT, Woods SE, et al. Plant viral nanoparticles-based HER2 vaccine: immune response influenced by differential transport, localization and cellular interactions of particulate carriers. *Biomaterials*, 2017, 121: 15-27
- [194] Miermont A, Barnhill H, Strable E, et al. Cowpea mosaic virus capsid: a promising carrier for the development of carbohydrate based antitumor vaccines. *Chemistry*, 2008, 14: 4939-47
- [195] Yin ZJ, Huang GN, Chowdhury S, et al. Tobacco mosaic virus as a new carrier for tumor associated carbohydrate antigens. *Bioconjug Chem*, 2012, 23: 1694-703
- [196] Speiser DE, Schwarz K, Baumgaertner P, et al. Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *J Immunother*, 2010, 33: 848-58
- [197] Molino NM, Anderson AKL, Nelson EL, et al. Biomimetic protein nanoparticles facilitate enhanced dendritic cell activation and cross-presentation. *ACS Nano*, 2013, 7: 9743-52
- [198] Lee BR, Ko HK, Ryu JH, et al. Engineered human ferritin nanoparticles for direct delivery of tumor antigens to lymph node and cancer immunotherapy. *Sci Rep*, 2016, 6: 35182
- [199] Demchuk AM, Patel TR. The biomedical and bioengineering potential of protein nanocompartments. *Biotechnol Adv*, 2020, 41: 107547
- [200] Petrucci OD, Hilton RJ, Farrer JK, et al. A ferritin photochemical synthesis of monodispersed silver nanoparticles that possess antimicrobial properties. *J Nanomater*, 2019, 2019: 9535708
- [201] Patterson DP, McCoy K, Fijen C, et al. Constructing catalytic antimicrobial nanoparticles by encapsulation of hydrogen peroxide producing enzyme inside the P22 VLP. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 5948-51
- [202] Hsia Y, Bale JB, Gonen S, et al. Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron. *Nature*, 2016, 535: 136-9
- [203] Gao RM, Tan H, Li SJ, et al. A prototype protein nanocage minimized from carboxysomes with gated oxygen permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2104964119