

病毒样颗粒作为 mRNA 递送载体的研究进展

林鑫宇^{1,2,3}, 任书玲^{1,2,3}, 李廷栋^{1,2,3}, 葛胜祥^{1,2,3*}

1 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门大学), 福建 厦门 361102

2 厦门大学 公共卫生学院实验医学系, 福建 厦门 361102

3 翔安创新实验室 传染病疫苗研发全国重点实验室, 福建 厦门 361104

林鑫宇, 任书玲, 李廷栋, 葛胜祥. 病毒样颗粒作为 mRNA 递送载体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1268-1279.

LIN Xinyu, REN Shuling, LI Tingdong, GE Shengxiang. Advances of virus-like particles as mRNA delivery vectors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1268-1279.

摘 要: 随着信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)技术的不断发展, mRNA 药物在近些年展现出了广阔的应用前景。mRNA 自身易被降解且难以直接入胞, 因此 mRNA 递送载体一直是 mRNA 药物研发的重点之一。尽管脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)已经广泛应用于 mRNA 的递送, 但 LNP 倾向于在肝脏聚集, 并且重复给药后容易诱发机体炎症反应从而导致组织损伤。相比 LNP, 病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)具有生物相容性高、安全性高的优势, 有望为 mRNA 递送提供新的解决思路。本文从实际应用需求出发, 根据 VLP 实现 mRNA 递送的几个步骤, 即颗粒组装、递送入胞和胞内释放, 对该领域的研究进展进行综述, 为开发新型 VLP 递送载体提供依据和设计思路, 从而推动 VLP 载体在 mRNA 递送领域的发展, 为 mRNA 疗法的研究和应用提供新的可能。

关键词: mRNA; 递送载体; 病毒样颗粒; mRNA 药物

Advances of virus-like particles as mRNA delivery vectors

LIN Xinyu^{1,2,3}, REN Shuling^{1,2,3}, LI Tingdong^{1,2,3}, GE Shengxiang^{1,2,3*}

1 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases (Xiamen University), Xiamen 361102, Fujian, China

2 Department of Laboratory Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

3 State Key Laboratory of Vaccines for Infectious Diseases, Xiang An Biomedicine Laboratory, Xiamen 361104, Fujian, China

Abstract: With the continuous development of messenger RNA (mRNA) technology, mRNA-based drugs have shown broad application prospects in recent years. Since mRNA is

资助项目: 国家自然科学基金(31971369); 中央高校基本科研业务费专项资金(20720220006)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971369) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (20720220006).

*Corresponding author. E-mail: sxge@xmu.edu.cn

Received: 2024-05-23; Accepted: 2024-10-25; Published online: 2024-10-28

easy to be degraded and difficult to enter cells directly, the mRNA delivery vectors have always been one of the focuses in the development of mRNA-based drugs. Although lipid nanoparticles (LNPs) have been widely used for the delivery of mRNA, they tend to accumulate in the liver, and repeated administration can easily induce inflammatory response which leads to tissue damage. Compared with LNPs, virus-like particles (VLPs) have the advantages of high biocompatibility and safety, being expected to offer new solutions for mRNA delivery. Based on the practical application requirements, this review summarized the research progress in VLPs according to the mRNA delivery steps: particle assembly, delivery into cells, and intracellular release. We hope to provide a basis and design ideas for the development of new VLPs as delivery vectors, promote the application of VLPs in mRNA delivery, and provide new possibilities for the research and application of mRNA-based therapeutics.

Keywords: mRNA; delivery vectors; virus-like particles; mRNA drugs

信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)药物在预防和治疗许多难治性或遗传性疾病上具有广阔的前景^[1-4]。mRNA 分子本身结构特点使 mRNA 技术走向应用面临许多挑战。特别是 mRNA 作为一种生物大分子无法直接突破细胞膜屏障入胞^[5], 同时 mRNA 还存在易被降解的问题^[6]。因此, mRNA 药物和疫苗的研究和应用依赖于递送载体技术的发展。mRNA 递送载体需满足以下几点要求。首先, 入胞前在机体组织环境中可稳定存在, 可保护 mRNA 免受 RNA 酶降解; 之后, 载体可介导 mRNA 进入靶细胞; 入胞后, 载体释放 mRNA 到胞质使其发挥功能。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)是目前最成熟的 mRNA 递送载体, 但它存在倾向在肝脏聚集^[7]、难以实现重复给药^[8]和内体逃逸^[9]效率低等问题。为克服以上问题, 近年来也涌现了很多新型递送载体, 递送技术在向着更高递送效率、更高安全性、更高转化潜力的方向持续发展。其中, 病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)为 mRNA 递送提供了新的可能性。VLP 由蛋白质构成, 尺寸均一、可改造性强, 部分 VLP 保留了原始病毒感染细胞的能力, 因此 VLP 可能是更安全高效且易于改造和转化生产的递送载体^[10]。本文主要对 VLP 作为 mRNA 递送载体的设计

和转化应用等方面的研究进展进行综述, 以期 mRNA 技术发展提供助力。

1 VLP-mRNA 的组装

病毒衣壳蛋白(coat protein, CP)与 mRNA 组装成包裹 mRNA 的 VLP(VLP-mRNA)是实现 mRNA 递送的首要步骤(图 1)。不同病毒 CP 与 mRNA 的组装过程存在差异, 为满足 VLP-mRNA 的应用需求, 在设计和优化组装过程时, 需要确定合适的组装方式、提高颗粒的包封能力并保持颗粒在生理条件下的稳定性。

1.1 组装方式

VLP-mRNA 的组装方式根据组装原理主要分为 mRNA 序列特异性和非 mRNA 序列特异性这 2 种。前者需要病毒 CP 通过识别和结合 mRNA 的特异性序列而启动组装, 后者一般基于蛋白与 mRNA 的静电作用启动组装, 不需要 mRNA 具有特异性序列^[11]。而在实际应用过程中, 根据组装环境的不同, VLP-mRNA 的组装方式又可以分为胞内组装和胞外组装。前者是直接各类细胞中形成 VLP-mRNA, 再通过超速离心、尺寸排阻色谱等方法纯化获得^[12]; 后者在组装前要分别纯化蛋白和 mRNA, 然后在无细胞环境中组装成 VLP-mRNA^[13]。

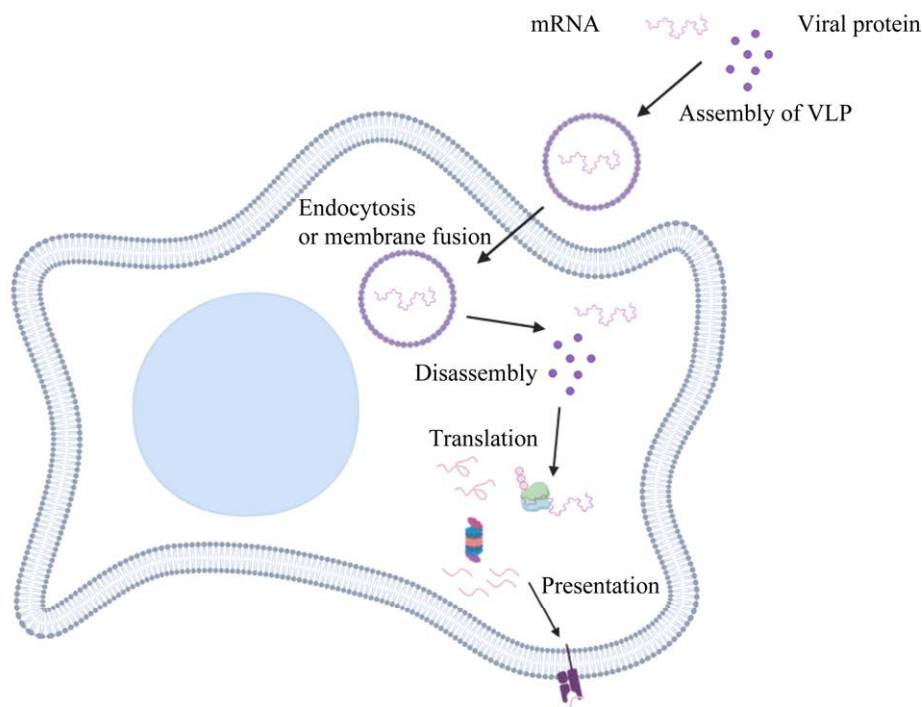


图1 VLP作为mRNA递送载体发挥功能的示意图

Figure 1 The schematic diagram of the function of VLP as mRNA delivery vectors.

mRNA 序列特异性组装相比非序列特异性组装在包封核酸的特异性和组装环境的普适性上有一定的优势。部分病毒 CP 与 mRNA 的结合是基于静电作用,无法保证对靶 mRNA 的高特异性包封^[14]。相比之下,可识别并结合特定茎环结构 mRNA 的 CP 则展现出更高的包封特异性,如 MS2^[15]或 Q β ^[16] CP。在靶 mRNA 序列的非翻译区(untranslated region, UTR)添加一段特异性茎环结构,即可实现 MS2 或 Q β CP 与靶 mRNA 的特异性结合^[15],但 Q β VLP 目前主要应用于 RNAi 技术^[17-18]。除了包封核酸时更具有特异性,mRNA 序列特异性的组装可以在不同环境中完成。MS2 VLP 可以通过原核、酵母和哺乳动物细胞等表达系统实现 VLP-mRNA 的胞内组装^[15,19-20]。此外,MS2 CP 也有在胞外实现 mRNA 包装的潜力,目前已经实现了 MS2 CP 在胞外环境与 siRNA 组装成 VLP,并实现了高

效的递送^[21]。

非 mRNA 序列特异性的组装无法保证 VLP 包封核酸的特异性,因此只能在胞外环境进行组装。VLP-mRNA 胞外组装过程大致为:首先分别获得病毒 CP 和 mRNA,再通过调节组装过程的参数(主要包括 pH 值、金属离子、mRNA 与 CP 比例和 mRNA 长度),实现 CP 对 mRNA 的包封^[22]。目前已经有部分 CP 可以在胞外与 mRNA 组装,在生理条件下保持稳定且具有 RNA 酶耐受性,如烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV) CP^[23]、乙肝病毒核心(hepatitis B virus core, HBc)蛋白^[24]。然而部分病毒的 CP,如豇豆褪绿斑驳病毒(cowpea chlorotic mottle virus, CCMV)^[25]、雀麦花叶病毒(brome mosaic virus, BMV)^[26]等,它们组成的 VLP 在生理条件下不稳定,优化组装过程中的参数或对 CP 进行氨基酸改造是潜在的解决方法^[13]。

本课题组前期开展了多种 VLP-mRNA 胞内组装和胞外组装的工作，结合本课题组前期的工作，本文从设计和应用这 2 个方面对胞内组装和胞外组装这 2 种方式进行总结和比较(表 1)。在递送效率方面，包膜样 VLP 有一定优势^[27-28]，但其必须利用哺乳动物细胞进行胞内组装；无包膜的 VLP 总体来说递送效率不佳，而递送效率的提升往往要涉及多组分，对于多组分组装而言，胞内组装在流程上会更为简便，因此胞内组装是目前实现高递送效率的更好选择。在安全性方面，胞内组装存在包装非特异性核酸和蛋白的安全隐患，相比之下，胞外组装能够以更可控的方式实现对靶 mRNA 的包装^[29]。在成本方面，胞内组装生产成本较高，尤其是依赖于哺乳动物细胞表达系统的颗粒。胞外组装的 CP 大多可以直接通过原核表达方式获得，这种经济的生产方式在产业转化方面

有显著优势。总的来说，不论采用何种方式组装，使 VLP 载体同时具有高递送效率和高安全性仍是目前需要努力的方向，在实际研究和应用过程中，研究者需要根据实际的需求综合考虑选择哪种组装方式。

1.2 包封能力

包封能力是影响 VLP 载体递送性能的关键因素之一，包括 mRNA 的包封率和包封长度。VLP 的包封能力主要取决于不同 VLP 的性质，但相同的 VLP 可能会因为表达宿主不同或进行了适当的改造，具有不同的包封能力。

对于不同的 VLP 而言，可以通过调节组装参数提高包封能力。一方面，野生型病毒的核酸蛋白比例以及基因组 mRNA 长度可作为组装参数的参考；另一方面，通过实验进行探索也可以获得最适的条件。对于 mRNA 与 CP 的比例，TMV VLP 可以根据野生型病毒的基因组

表 1 VLP-mRNA 胞内组装与胞外组装的比较

Table 1 Comparison of intracellular and extracellular assembly of VLP-mRNA

Comparative aspects	Details	Intracellular assembly	Extracellular assembly	References
Assembly conditions	Binding mode of protein and mRNA	Specific binding based on mRNA sequence	Specific binding based on mRNA sequence or non-specific binding based on electrostatic interaction	[11]
	Assembly environment	Appropriate expression systems (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pichia pastoris</i> , mammalian cells, etc.)	Appropriate assembly solution (suitable pH value, metal ions, etc.)	[13,15,19]
	mRNA length	Up to 4 500 nt	Up to 13 000 nt	[20,23]
	Protein and mRNA ratio	Difficult to control; the particles' uniformity is poor	Easy to control; the particles' uniformity is great	[30]
Application	Production cost	The process is relatively simple, but the costs of some expression systems (such as mammalian cells) are more expensive	The process is relatively complex, but the costs of expression systems (generally realized through prokaryotic or yeast expression systems) are cheaper	[19-20]
	Delivery efficiency	High	Low, requires additional modifications	[27-28]
	Safety	The risk of encapsulating non-specific nucleic acids and host proteins is high	The risk of encapsulating non-specific nucleic acids and host proteins is low; high safety	[29]

RNA 和 CP 比例进行组装^[23]; Cadena-Nava 等^[30]研究发现 CCMV CP 与 mRNA 的最佳组装质量比为 6:1。对于 mRNA 的长度, Smith 等^[23]表明 TMV CP 和 mRNA 组装时,可包封的 mRNA 最长可达 13 600 nt,且形成的 VLP-mRNA 可以实现 mRNA 的胞内递送。因此, TMV VLP 有望用于传染病疫苗 mRNA 和自复制 mRNA (9 000–12 000 nt)^[31]的包封。相比之下,每个 CCMV 病毒粒子只含有约 3 000 nt RNA,因此 CCMV VLP 的最适 mRNA 包装长度在 3 200 nt 左右^[25],超过 4 500 nt 时颗粒无法耐受 RNase^[30]。此外,人多瘤 JC 病毒(John Cunningham virus, JCV)的病毒蛋白 1 (viral protein 1, VP1)可以用于包装 siRNA 并实现递送^[32],尽管目前 JCV VLP 还未实现 mRNA 的包装,但基于 JCV VP1 的 N 端非特异性结合核酸和可自组装成 VLP 的特性^[32],其有望用于 mRNA 的包封和递送。

对于同一种 VLP,不同表达系统生产的 VLP-mRNA 包封能力可能不同。若 mRNA 仅含有 1 个特异性茎环结构,原核表达的 MS2 VLP 可包封的 mRNA 长度短于真核表达的 MS2 VLP^[19]。此外,在哺乳动物表达系统中,MS2 CP 可以作为序列特异性 mRNA 的结合蛋白,与其他病毒结构蛋白,如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV) Gag 蛋白融合表达后组装成包膜样 VLP,实现 4 000 nt mRNA 的包封^[20],这一设计显著提高了包膜样 VLP 包封 mRNA 的特异性。Horns 等^[33]用亮氨酸拉链替换了 Gag 蛋白中结合非特异性 RNA 的锌指结合基序,形成 GagZip-MS2CP,进一步提高了胞内组装的 VLP 包封 mRNA 的特异性。另一方面,通过对 mRNA 的特定序列进行优化也可以提高包封能力。在大肠杆菌中表达的 MS2 VLP 只能包封 1 200 nt 的单茎环结构的 mRNA,但当 mRNA 含有 2 或 3 个重复茎环结构时,

MS2 VLP 可以包封 1 900 nt 和 3 000 nt 的 RNA^[34-35]。此外,对茎环结构序列进行优化可以将 mRNA 和 MS2 CP 的亲合力提高 10–50 倍,同时提高 mRNA 的包封率和包封长度^[36]。

1.3 稳定性

VLP-mRNA 在生理条件下稳定且具有 RNA 酶耐受性是其作为 mRNA 递送载体的基本要求。虽然部分 VLP-mRNA 本身在生理条件下就具有良好的稳定性(如 MS2 VLP、TMV VLP 等),但还有一部分 VLP-mRNA 需要对蛋白质进行改造或优化组装条件,才能达到生理条件下的稳定性。相较于胞内组装,胞外组装可以对组装流程中的多个条件实现良好的控制^[29],更好地提升颗粒的稳定性。CCMV CP 先在中性 pH 条件下与 mRNA 进行组装,进一步在酸性条件下形成耐受 RNA 酶的稳定 VLP-mRNA,但 CCMV VLP 在中性 pH 值条件和没有二价金属离子存在时,由于 Glu81 和 Asp153 的羧基相互排斥,颗粒无法维持正常形态从而丧失 RNA 酶耐受性^[37]。许多植物病毒 CP 面临类似的问题,这可能与植物病毒的生存和感染相关,它们从自然环境到宿主胞内环境后,pH 值发生改变会使病毒产生一种中间构象,而构象变化是 RNA 释放至宿主胞质的基础^[38]。一方面,通过调节组装中的参数,如在组装溶液中添加 Mg^{2+} 可以维持 CCMV VLP 的稳定性^[39];另一方面,通过对 CP 进行改造也可以提高 VLP 的稳定性,Fox 等^[40]发现,将 CCMV CP 第 42 位赖氨酸突变为精氨酸形成的 VLP (K42R)可以在 pH 7.5 和 1 mol/L NaCl 的条件下维持稳定。但本课题组在研究中发现,尽管 K42R 突变体在生理条件下仍以颗粒形式存在,但并不具备 RNA 酶耐受性(未公开发表),推测这可能与颗粒结构较为松散有关,而进一步的结构分析和针对性的氨基酸改造可能是解决这一问题的方法。此外,副肿

瘤 Ma 抗原(paraneoplastic Ma antigen, PNMA)家族中的 PNMA2 可以在胞外与 mRNA 组装成 VLP-mRNA,但颗粒无 RNA 酶耐受性。Madigan 等^[13]用 CCMV CP 的 N 端 30 个残基替换 PNMA2 的 C 端无序区域,并测试各种组装条件,发现改造后的 PNMA2 在 0.5 mol/L NaCl 和 10 mmol/L CaCl₂ 的条件下可以实现最有效包装和保护 mRNA 免受 RNA 酶降解。

除天然的蛋白质外,由人工设计的蛋白同样显示出与 mRNA 组装成 VLP 的能力,并且这类人工 VLP 具有良好的包封能力和稳定性,是潜在的 mRNA 递送载体。Butterfield 等^[41]基于计算设计的双组分蛋白质组合,可以基于静电作用包封自身的 mRNA 基因组,并且在大肠杆菌中经过几代定向进化后,显著改善了颗粒在血液的稳定性和体内循环时间,有望实现 mRNA 的胞内递送。

2 VLP-mRNA 递送机制研究

VLP-mRNA 不仅要包裹 mRNA 并保护其不被降解,还要帮助它们跨越细胞膜等生理屏障,递送至靶细胞的胞质中。

2.1 VLP-mRNA 入胞机制研究

部分 VLP-mRNA 自身可以通过膜融合或内吞作用等方式入胞,并在胞质释放 mRNA,但有一部分 VLP-mRNA 自身入胞和内吞小泡逃逸效率都很低,需要进行额外改造。

2.1.1 VLP 自身特性介导入胞

部分构成 VLP 的病毒结构蛋白在其来源的野生型病毒颗粒中就发挥着协助病毒入胞的作用,甚至还对病毒的组织嗜性有一定影响,这类 VLP 在递送的靶向性和效率上具有一定优势,这一部分将在靶向递送章节详细介绍。此外,内吞小泡逃逸一直是影响 LNP 等各类递送载体递送效率的重要因素,包膜样 VLP 可以通

过膜融合方式直接进入细胞质,无需内吞小泡逃逸,在递送效率方面有显著优势^[27-28]。

目前包膜样 VLP 大多采用水泡性口膜炎病毒糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)作为包膜蛋白,其能与细胞表面广泛存在的磷脂组分而不是一个特异性的细胞表面受体相结合,可以帮助 VLP 进入不同类型的细胞。Lu 等^[42]将病毒 CP 结合 mRNA 茎环结构的特性与部分慢病毒技术结合,构建了一种慢病毒样生物纳米颗粒(lentivirus-like bionanoparticle, LVLP),利用 MS2 CP 结合 mRNA, VSV-G 介导 VLP 入胞,从而递送金黄色葡萄球菌 *Cas9* (*Staphylococcus aureus Cas9*, SaCas9) mRNA,在细胞水平实现 87%的靶基因敲除效率。上海交通大学蔡宇伽团队进一步提高 LVLP 中 MS2 CP 的数量,并优化颗粒包封技术,构建了我国首个完全自主开发的基因治疗载体;该载体可以实现更长的酿脓性链球菌 *Cas9* (*Streptococcus pyogenes Cas9*, SpCas9) mRNA 和 sgRNA 的共递送,在体内(视网膜下腔)注射时,靶基因敲除效率可达 44%^[43]。基于该研究的一款用于疱疹病毒型角膜炎的治疗的 CRISPR 抗病毒基因编辑药物 BD111 已经公布初步临床试验结果^[44],且进一步的临床试验申请已获得国家药品监督管理局药品审评中心许可(受理号: CXSL2300079)。这些结果表明,VLP 作为 mRNA 递送载体在实现安全高效的基因编辑上有良好应用前景。除 VSV-G 外,Segel 等^[45]基于人的逆转录转座子衍生蛋白 PEG10 建立了一种完全内源化的包膜样 VLP 用于 mRNA 递送,该 VLP 采用内源性融合蛋白 MmSYMA 替代 VSV-G,同样可以实现 VLP-mRNA 的高效入胞。Leclerc 等^[46]认为 VLP 作为基因编辑工具的体内递送载体,需要考虑其免疫原性带来的影响,而 PEG10 VLP 这种完全内源性的颗粒,有望避免

这一问题的发生。此外, Banskota 等^[47]构建了一种工程化无 DNA 病毒样颗粒,其可以有效递送 Cas9 核糖核蛋白,实现动物体内的基因编辑。但是,该 VLP 是否能够应用于 mRNA 的递送目前尚未见报道,还有待进一步研究。

2.1.2 外部元件协助 VLP 入胞

对于无法依赖自身结构蛋白实现入胞的 VLP,可以通过引入不同的外部元件来实现入胞。外部元件引入的策略主要包括化学偶联和蛋白融合表达。VLP 表面某些氨基酸残基可为化学偶联提供官能团。其中,赖氨酸的游离氨基一般与 N-羟基琥珀酰亚胺酯反应来实现偶联,CCMV 和 MS2 VLP 目前都可以通过该方式以直接偶联或使用双功能交联剂的方式将多肽偶联至颗粒表面^[21,48-49]。此外,酪氨酸的活性酚羟基可以与炔基进行偶联,目前 TMV 和 Q β VLP 表面可以通过该方式偶联经过炔基修饰的多肽^[50-51]。除了化学偶联,将需要引入的外部元件与病毒结构蛋白融合表达后再组装成 VLP 也是一种常用的改造策略,融合表达的方式包括 N 端融合、C 端融合和中间插入。选择何种方式主要依据 2 点:一方面,融合位置一般位于 VLP 表面的结构域,避免影响外部元件发挥功能。MS2 CP 的第 15 和 16 位、HBc 的第 80 和 81 位氨基酸都位于各自的 VLP 表面,可以在它们之间插入多肽,实现不同外部元件的引入^[52-53]。CCMV CP 的 C 端暴露于 VLP 表面^[54],因此 CCMV VLP 可能可以通过 C 端融合的方式引入外部元件。另一方面,融合表达后的蛋白与 mRNA 的组装需不受影响。TMV CP 的 N 端基序和 N 末端乙酰化修饰都对于 VLP 的组装起至关重要的作用,因此 N 端融合可能不适用于 TMV VLP 的改造,目前 TMV VLP 可以通过在 TMV CP 进行 C 端融合的方式引入各种多肽^[55]。

在选择外部元件时,除了考虑修饰后 VLP 的入胞效率,最好还能够使 VLP 的高生物相容性不受影响。细胞穿膜肽是一类能携带大分子物质进入细胞并帮助它们从内吞小泡逃逸的短肽,在 VLP 中引入细胞穿膜肽可以提高 VLP 的递送效率。大肠杆菌表达的 MS2 VLP 自身无法入胞,但融合表达细胞穿膜肽 TAT 后则可以帮助颗粒实现入胞^[56],而在 TMV VLP 引入 TAT 递送效率可以提高约 3 倍^[57]。此外,在包裹 siRNA 的 CCMV VLP 上偶联 M-溶血毒素肽 L17E (一种细胞穿膜肽),相比未偶联的 VLP,在细胞水平对靶蛋白的敲低效率提高了约 2 倍^[49]。

2.2 VLP-mRNA 靶向递送机制研究

良好的靶向递送可以更好地富集药物,达到降低药物剂量和提高治疗安全性的目的。实现 VLP-mRNA 的靶向递送需要提高颗粒的组织器官靶向性并延长血液循环时间,而 VLP 的自身特性和可改造性使其在实现 mRNA 的良好靶向递送方面具有较大的潜力。

病毒在感染过程中可能具有不同的组织嗜性,这与它们部分结构蛋白密切相关,因此这些结构蛋白构成的 VLP 可能自身就具有特定组织或器官的靶向性,有望帮助解决 mRNA 靶向递送的问题。JCV 与人类多种肿瘤存在相关性,Comas-Garcia 等^[12]认为 JCV VP1 中的天然表位可能足以使 JCV VLP 靶向癌症细胞,有望成为肿瘤靶向的 mRNA 递送载体。目前 JCV VLP 已成功向大鼠体内递送 siRNA^[32],并向多种人类癌细胞递送基因药物^[58-59]。同样地,戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)的 ORF2 蛋白(protein ORF2, pORF2)所形成的 VLP 可以通过特定的高亲和力受体结合到肝脏细胞,有望成为一种肝组织靶向性的 mRNA 递送载体。Panda 等^[60]通过 pORF2-VLP 包封 mRNA,可以特异性向肝脏细胞实现递送,而其他来源的细胞则

无法递送。对于包膜样 VLP 而言, 针对包膜蛋白的改造可以改变 VLP 的靶向性。Yin 等^[61]对辛德比斯病毒糖蛋白进行改造, 替换 VSV-G, 通过识别树突状细胞表面蛋白实现了 VLP 对树突状细胞的特异性靶向。

如同外部元件协助 VLP 入胞一样, VLP 的靶向递送性也可以通过外部元件实现, 引入的策略同入胞递送章节所述。靶向肽是一类可以将药物靶向特定细胞或组织的短肽, 引入靶向肽后的 VLP 可向特定细胞或组织递送货物。部分靶向肽的靶向范围较广, 如 RGD 肽^[62]可以靶向不同肿瘤组织, Choi 等^[53]将一种 RGD 肽融合至 HBc VLP, 相比不含 RGD 肽的 VLP, 该 VLP 在肿瘤细胞上递送 siRNA 的靶基因敲低效率提升 9 倍以上。还有部分靶向肽的靶向功能更为明确, 例如 SP94 主要靶向肝癌细胞, 偶联在 MS2 VLP 上可以特异性地递送至人肝癌细胞, 这种 VLP 对人肝癌细胞的亲和力比正常肝细胞高 10^4 倍^[21]。此外, 胞内组装的 VLP 在组装和出胞过程中募集细胞中具有靶向功能的分子可能是引入外部元件的一种潜在方式。一种人脑天然存在的逆转录病毒 CP 同源物 Arc 蛋白可以组装成靶向脑组织的 VLP-mRNA, Gu 等^[63]发现 Arc 蛋白在白细胞中组装成 VLP 和出胞时, 可以募集白细胞的膜分子, 形成一种含有病毒样颗粒的细胞外囊泡, 将 mRNA 靶向递送至神经炎症部位的神经元。

VLP 随血液循环时, 其颗粒表面会形成由血浆蛋白组成的蛋白冠, 这可能导致颗粒被先天免疫系统的吞噬细胞内化而清除, 从而降低了 VLP 的递送效率和靶向性。克服这一挑战的一种方法是避开循环系统给药, 直接将 VLP-mRNA 给药至特定组织或器官^[43]。另一种方法是在 VLP 表面引入外部元件, 以抵抗与血液成分的相互作用, 从而避免颗粒被清除。其

中, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是药物递送领域中应用最广泛的“隐形”聚合物^[64], 在 VLP 表面引入 PEG 是延长血液循环时间的良好策略。Bao 等^[65]将弱酸性 PEG 聚合物引入 VLP 表面, 经循环系统给药后, 颗粒的血液循环时间由 4 h 延长至 48 h, 并且显著增强在酸性病灶(如肿瘤组织和关节炎组织)的基因递送效率。

3 VLP-mRNA 胞内释放机制研究

mRNA 从 VLP-mRNA 释放到细胞质是实现 mRNA 递送的最终步骤。目前这方面的设计和机制研究较少, 但野生型病毒在胞内脱衣壳释放基因组核酸的方式可以为提高 VLP-mRNA 胞内释放 mRNA 的效率提供参考。根据入胞方式的不同, VLP-mRNA 在进入细胞后释放 mRNA 的情况主要分为 2 种。首先, 包膜样 VLP 通过膜融合的方式进入细胞, 在入胞过程中会先完成脱包膜, 然后 CP 包裹的 mRNA 直接进入细胞质。脱包膜后的 VLP 在胞质内解衣壳的机制还有待进一步研究, 这可能与一些胞质内的酶(如 HIV 的脱衣壳可能与亲环素 A 有关)相关^[66]。LVLP 保留了许多 HIV-1 的结构, 因此在胞内脱衣壳时, 能够像野生病毒粒子一样高效^[67], 从而具有较高的 mRNA 递送效率。此外, 无包膜的 VLP 一般通过内吞作用入胞, 然后进入内吞小泡^[68]。野生型病毒大多具有能够帮助颗粒逃出内吞小泡的结构, 如流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)在内吞小泡环境酸化后, 通过自身结构改变, 可以帮助病毒破坏内吞小泡膜, 同时病毒颗粒也发生变构, 从而逃离内吞小泡并释放核酸^[69]。然而, 无包膜 VLP 的内吞小泡逃逸机制尚不明确, 关于 mRNA 的释放, Fang 等^[17]推测是二硫键断裂和环境 pH 值变化共同作用的结果。内吞小泡逃逸和 mRNA 胞内释放是无包膜 VLP 需要解决的主要问题^[70]。部

分细胞穿膜肽具有较强的内吞小泡逃逸能力^[71],有望帮助 VLP 提高内吞小泡逃逸效率。本课题组尝试引入可以使胞内蛋白质降解的多肽或小分子^[72]以促使 VLP 胞内解聚释放 mRNA,目前已初步证实偶联小分子的 VLP 在入胞后会更高效地降解(未公开发表),表明这可能是提高 VLP 胞内释放 mRNA 效率的有效策略。

VLP-mRNA 在细胞质释放 mRNA 是完成递送的最后步骤,但实现 VLP-mRNA 的最终应用,还需要完成动物水平递送和临床试验,表 2 总结了不同 VLP-mRNA 平台目前的研究阶段。大多数 VLP-mRNA 仍处于临床前的研究阶段,但已经有多个平台在动物体内水平展现了良好的 mRNA 递送性能,未来必然会有更多 VLP-mRNA 实现临床应用。

4 总结与展望

VLP 是一种极具潜力的 mRNA 递送载体,通过良好的设计和优化,其多方面的性能有望

优于 LNP。总的来说,在颗粒组装方面,VLP 载体需要从 mRNA 与蛋白组装可行性、颗粒生理条件下的稳定性和 RNA 酶耐受性、颗粒组装效率几个方面进行考虑和优化,以达成最佳的组装效果。在递送方面,要从有效递送效率(入胞和释放效率)和靶向递送性上进行考虑和优化,以实现最高效的递送和良好的靶向性。目前,多种 VLP-mRNA 递送平台不断发展,其中基于 LVLP 的 mRNA 疗法是 VLP-mRNA 发展的前沿,部分研究已经进入临床试验阶段。此外,PEG10 VLP、MS2 VLP 和 HEV-pORF2 VLP 等也在 mRNA 递送的临床前研究中取得了一定的成果,均在动物水平实现了 mRNA 递送,然而 VLP 递送 mRNA 的研究仍存在很大发展空间。首先,VLP-mRNA 在体内的免疫原性尚不明确,免疫原性过高会使机体产生适应性免疫反应,这将降低重复给药的效果。解决这一问题的最好方法是构建完全内源性的 VLP,从而逃避免疫监视。此外,如何构建兼具高递送

表 2 不同 VLP-mRNA 递送平台发展情况

Table 2 The development of different VLP-mRNA delivery platforms

Delivery platforms	Stages	Representative example	References
LVLP	Clinical trial	Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA for the treatment of herpesvirus keratitis	[44]
MS2 VLP	Animal level delivery	Delivery of prostate acid phosphatase mRNA for the treatment of prostate cancer in mice	[19]
HEV-pORF2 VLP	Animal level delivery	Delivery of hepatitis B virus surface antigen mRNA to mice	[60]
PEG10 VLP	Animal level delivery	PEG10 VLP produced in mice can carry mRNA through the blood to cells in other tissues and release mRNA	[45]
Arc VLP	Animal level delivery	Leukocyte-derived Arc VLP targeted delivery of mRNA to the inflammatory site of mouse neurons	[63]
CCMV VLP	Cellular level delivery	Delivery of green fluorescent protein mRNA to mammalian cells	[37]
TMV VLP	Cellular level delivery	Delivery of Semliki Forest virus genomic mRNA to mammalian cells	[23]
PNMA2 VLP	Cellular level delivery	Delivery of cyclization recombinase mRNA to mammalian cells	[13]
HBc VLP	Encapsulate mRNA and deliver siRNA	Delivery of siRNA to tumor cells, knockdown of red fluorescent protein expression	[24]
Q β VLP	Deliver siRNA	Delivery of siRNA for treatment of malignant brain tumors in mice	[18]
JCV VLP	Deliver siRNA	Delivery of siRNA improves osteoporosis in rats	[32]

效率和低生产成本的 VLP 载体也面临一些技术瓶颈。内吞小泡逃逸效率低是 VLP 载体在递送效率上面临的最大问题,包膜样 VLP 可以直接进入胞质,能有效避开这一问题,但生产和转化成本较高,而无包膜 VLP 递送效率较低。无包膜 VLP 递送效率低的原因包括颗粒生理条件下不稳定、难以引入胞内元件或胞内难以释放 mRNA 等,但随着结构生物学和人工智能等学科的发展以及重组蛋白表达、化学修饰和蛋白靶向降解等技术的发展,无包膜 VLP 也有望在递送效率上取得突破,从而实现 VLP 在 mRNA 递送领域的进一步发展,在未来 mRNA 药物的应用中发挥更大的作用。

作者贡献声明

林鑫宇:初稿写作、稿件润色修改;任书玲:稿件润色修改;李廷栋、葛胜祥:监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

所有作者均声明没有任何可能会影响本文所述内容的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] QIN SG, TANG XS, CHEN YT, CHEN KP, FAN N, XIAO W, ZHENG Q, LI GH, TENG YQ, WU M, SONG XR. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 166.
- [2] MIAO L, ZHANG Y, HUANG L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 41.
- [3] POPOVITZ J, SHARMA R, HOSHYAR R, KIM BS, MURTHY N, LEE K. Gene editing therapeutics based on mRNA delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2023, 200: 115026.
- [4] FANG EY, LIU XH, LI M, ZHANG ZL, SONG LF, ZHU BY, WU XH, LIU JJ, ZHAO DH, LI YH. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 94.
- [5] KOWALSKI PS, RUDRA A, MIAO L, ANDERSON DG. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 710-728.
- [6] HOU XC, ZAKS T, LANGER R, DONG YZ. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 6(12): 1078-1094.
- [7] MAURIZI A, PATRIZI P, TETI A, SUTERA FM, BARAN-RACHWALSKA P, BURNS C, NANDI U, WELSH M, TORABI-POUR N, DEHSORKHI A, SAFFIE-SIEBERT S. Novel hybrid silicon-lipid nanoparticles deliver a siRNA to cure autosomal dominant osteopetrosis in mice. Implications for gene therapy in humans[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2023, 33: 925-937.
- [8] NDEUPEN S, QIN Z, JACOBSEN S, ESTANBOULI H, BOUTEAU A, IGYÁRTÓ BZ. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory[J]. *bioRxiv*, 2021: 2021.03.04.430128.
- [9] WITTRUP A, AI A, LIU X, HAMAR P, TRIFONOVA R, CHARISSE K, MANOHARAN M, KIRCHHAUSEN T, LIEBERMAN J. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(8): 870-876.
- [10] IKWUAGWU B, TULLMAN-ERCEK D. Virus-like particles for drug delivery: a review of methods and applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 78: 102785.
- [11] SHUKLA S, HU H, CAI H, CHAN SK, BOONE CE, BEISS V, CHARIOU PL, STEINMETZ NF. Plant viruses and bacteriophage-based reagents for diagnosis and therapy[J]. *Annual Review of Virology*, 2020, 7(1): 559-587.
- [12] COMAS-GARCIA M, COLUNGA-SAUCEDO M, ROSALES-MENDOZA S. The role of virus-like particles in medical biotechnology[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2020, 17(12): 4407-4420.
- [13] MADIGAN V, ZHANG YG, RAGHAVAN R, WILKINSON ME, FAURE G, PUCCIO E, SEGEL M, LASH B, MACRAE RK, ZHANG F. Human paraneoplastic antigen Ma2 (PNMA2) forms icosahedral capsids that can be engineered for mRNA delivery[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(11): e2307812120.
- [14] NATILLA A, MURPHY C, HAMMOND RW. Mutations in the alpha-helical region of the amino terminus of the Maize rayado fino virus capsid protein and CP: RNA ratios affect virus-like particle encapsidation of RNAs[J]. *Virus Research*, 2015, 196: 70-78.
- [15] QI LL, ZHANG Z, WANG MT, KE ZJ, MAO HG, DENG G, WANG JB. One-plasmid double-expression system for preparation of MS2 virus-like particles packaging SARS-CoV-2 RNA[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1238543.
- [16] FANG PY, BOWMAN JC, GÓMEZ RAMOS LM, HSIAO C, WILLIAMS LD. RNA: packaged and protected by VLPs[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(38): 21399-21406.
- [17] FANG PY, GÓMEZ RAMOS LM, HOLGUIN SY, HSIAO C, BOWMAN JC, YANG HW, WILLIAMS LD. Functional RNAs: combined assembly and packaging in VLPs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(6): 3519-3527.
- [18] PANG HH, HUANG CY, CHOU YW, LIN CJ, ZHOU ZL, SHIUE YL, WEI KC, YANG HW. Bioengineering fluorescent virus-like particle/RNAi nanocomplexes act synergistically with temozolomide to eradicate brain tumors[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(17): 8102-8109.
- [19] LI JM, SUN YL, JIA TT, ZHANG R, ZHANG K, WANG

- LN. Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(7): 1683-1694.
- [20] BARON Y, SENS J, LANGE L, NASSAUER L, KLATT D, HOFFMANN D, KLEPPA MJ, BARBOSA PV, KEISKER M, STEINBERG V, SUERTH JD, VONDRAN FWR, MEYER J, MORGAN M, SCHAMBACH A, GALLA M. Improved alpharetrovirus-based Gag.MS2 particles for efficient and transient delivery of CRISPR-Cas9 into target cells[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2022, 27: 810-823.
- [21] ASHLEY CE, CARNES EC, PHILLIPS GK, DURFEE PN, BULEY MD, LINO CA, PADILLA DP, PHILLIPS B, CARTER MB, WILLMAN CL, BRINKER CJ, CALDEIRA JD, CHACKERIAN B, WHARTON W, PEABODY DS. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(7): 5729-5745.
- [22] RAO ALN. Genome packaging by spherical plant RNA viruses[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 61-87.
- [23] SMITH ML, CORBO T, BERNALES J, LINDBO JA, POGUE GP, PALMER KE, McCORMICK AA. Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from Tobacco mosaic virus and Semliki Forest virus and their evaluation as immunogens[J]. *Virology*, 2007, 358(2): 321-333.
- [24] STRODS A, OSE V, BOGANS J, CIELENS I, KALNINS G, RADOVICA I, KAZAKS A, PUMPENS P, RENHOFA R. Preparation by alkaline treatment and detailed characterisation of empty hepatitis B virus core particles for vaccine and gene therapy applications[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11639.
- [25] COMAS-GARCIA M, CADENA-NAVA RD, RAO ALN, KNOBLER CM, GELBART WM. *In vitro* quantification of the relative packaging efficiencies of single-stranded RNA molecules by viral capsid protein[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12271-12282.
- [26] NUÑEZ-RIVERA A, FOURNIER PGJ, ARELLANO DL, RODRIGUEZ-HERNANDEZ AG, VAZQUEZ-DUHALT R, CADENA-NAVA RD. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes[J]. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2020, 11: 372-382.
- [27] UNTI MJ, JAFFREY SR. Highly efficient cellular expression of circular mRNA enables prolonged protein expression[J]. *Cell Chemical Biology*, 2024, 31(1): 163-176.e5.
- [28] PANTHI S, SCHMITT PT, LORENZ FJ, STANFIELD BA, SCHMITT AP. Paramyxovirus-like particles as protein delivery vehicles[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(20): e0103021.
- [29] ZHANG L, LUA LHL, MIDDELBERG APJ, SUN Y, CONNORS NK. Biomolecular engineering of virus-like particles aided by computational chemistry methods[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(23): 8608-8618.
- [30] CADENA-NAVA RD, COMAS-GARCIA M, GARMANN RF, RAO ALN, KNOBLER CM, GELBART WM. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(6): 3318-3326.
- [31] BLAKNEY AK, IP S, GEALL AJ. An update on self-amplifying mRNA vaccine development[J]. *Vaccines*, 2021, 9(2): 97.
- [32] HOFFMANN DB, BÖKER KO, SCHNEIDER S, ECKERMANN-FELKL E, SCHUDER A, KOMRAKOVA M, SEHMISCH S, GRUBER J. *In vivo* siRNA delivery using JC virus-like particles decreases the expression of RANKL in rats[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2016, 5(3): e298.
- [33] HORNS F, MARTINEZ JA, FAN CC, HAQUE M, LINTON JM, TOBIN V, SANTAT L, MAGGIOLO AO, BJORKMAN PJ, LOIS C, ELOWITZ MB. Engineering RNA export for measurement and manipulation of living cells[J]. *Cell*, 2023, 186(17): 3642-3658.e32.
- [34] WEI BJ, WEI YX, ZHANG K, YANG CM, WANG J, XU RH, ZHAN SE, LIN GG, WANG W, LIU M, WANG LN, ZHANG R, LI JM. Construction of armored RNA containing long-size chimeric RNA by increasing the number and affinity of the pac site in exogenous RNA and sequence coding coat protein of the MS2 bacteriophage[J]. *Intervirology*, 2008, 51(2): 144-150.
- [35] ZHAN SE, LI JM, XU RH, WANG LN, ZHANG K, ZHANG R. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(8): 2571-2576.
- [36] TALBOT SJ, GOODMAN S, BATES SR, FISHWICK CW, STOCKLEY PG. Use of synthetic oligoribonucleotides to probe RNA-protein interactions in the MS2 translational operator complex[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(12): 3521-3528.
- [37] AZIZGOLSHANI O, GARMANN RF, CADENA-NAVA R, KNOBLER CM, GELBART WM. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells[J]. *Virology*, 2013, 441(1): 12-17.
- [38] LEFEUVRE P, MARTIN DP, ELENA SF, SHEPHERD DN, ROUMAGNAC P, VARSANI A. Evolution and ecology of plant viruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(10): 632-644.
- [39] CHAN SK, STEINMETZ NF. MicroRNA-181a silencing by antisense oligonucleotides delivered by virus-like particles[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(4): 816-825.
- [40] FOX JM, ZHAO XX, SPEIR JA, YOUNG MJ. Analysis of a salt stable mutant of cowpea chlorotic mottle virus[J]. *Virology*, 1996, 222(1): 115-122.
- [41] BUTTERFIELD GL, LAJOIE MJ, GUSTAFSON HH, SELLERS DL, NATTERMANN U, ELLIS D, BALE JB, KE S, LENZ GH, YEHDEGO A, RAVICHANDRAN R, PUN SH, KING NP, BAKER D. Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome[J]. *Nature*, 2017, 552(7685): 415-420.
- [42] LU BS, JAVIDI-PARSIJANI P, MAKANI V, MEHRAEIN-GHOMI F, SARHAN WM, SUN DJ, YOO KW, ATALA ZP, LYU P, ATALA A. Delivering SaCas9 mRNA by lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(8): e44.
- [43] LING SK, YANG SQ, HU XD, YIN D, DAI Y, QIAN XQ, WANG DW, PAN XY, HONG JX, SUN XD, YANG H, PALUDAN SR, CAI YJ. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(2): 144-156.
- [44] WEI AJ, YIN D, ZHAI ZM, LING SK, LE HY, TIAN LJ, XU JJ, PALUDAN SR, CAI YJ, HONG JX. *In vivo* CRISPR gene editing in patients with herpetic stromal keratitis[J]. *Molecular Therapy*, 2023, 31(11): 3163-3175.

- [45] SEGEL M, LASH B, SONG JW, LADHA A, LIU CC, JIN X, MEKHEDOV SL, MACRAE RK, KOONIN EV, ZHANG F. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery[J]. *Science*, 2021, 373(6557): 882-889.
- [46] LECLERC D, SIROKY MD, MILLER SM. Next-generation biological vector platforms for *in vivo* delivery of genome editing agents[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024, 85: 103040.
- [47] BANSKOTA S, RAGURAM A, SUH S, DU SW, DAVIS JR, CHOI EH, WANG X, NIELSEN SC, NEWBY GA, RANDOLPH PB, OSBORN MJ, MUSUNURU K, PALCZEWSKI K, LIU DR. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins[J]. *Cell*, 2022, 185(2): 250-265.e16.
- [48] CAO SQ, LI YY, SHEN LX, SHAO B, YU LX, LI JS, YUAN Q. Functionalized virus nanoparticles alleviates osteoporosis *via* targeting the function of RANK-specific motifs[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(27): 32272-32280.
- [49] LAM P, STEINMETZ NF. Delivery of siRNA therapeutics using cowpea chlorotic mottle virus-like particles[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(8): 3138-3142.
- [50] BRUCKMAN MA, STEINMETZ NF. Chemical modification of the inner and outer surfaces of Tobacco Mosaic Virus (TMV)[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1108: 173-185.
- [51] BANERJEE D, LIU AP, VOSS NR, SCHMID SL, FINN MG. Multivalent display and receptor-mediated endocytosis of transferrin on virus-like particles[J]. *Chembiochem*, 2010, 11(9): 1273-1279.
- [52] SUN YL, YIN GX. RETRACTED ARTICLE: Cell-specific delivery of messenger RNA and microRNA by recombinant MS2 virus-like particles carrying cell-penetrating peptide[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(11): 4755.
- [53] CHOI KM, CHOI SH, JEON H, KIM IS, AHN HJ. Chimeric capsid protein as a nanocarrier for siRNA delivery: stability and cellular uptake of encapsulated siRNA[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(11): 8690-8699.
- [54] SCHOONEN L, PILLE J, BORRMANN A, NOLTE RJM, van HEST JCM. Sortase A-mediated N-terminal modification of cowpea chlorotic mottle virus for highly efficient cargo loading[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, 26(12): 2429-2434.
- [55] SHAN ZS, BI HT, SUONAN AX, GU Y, ZHOU H, XI K, XIONG R, CHEN H, CHEN L. Tobacco mosaic viral nanoparticle inhibited osteoclastogenesis through inhibiting mTOR/AKT signaling[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 7143-7153.
- [56] PAN Y, ZHANG Y, JIA TT, ZHANG K, LI JM, WANG LN. Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(7): 1198-1208.
- [57] TIAN Y, ZHOU MX, SHI HG, GAO SJ, XIE GC, ZHU M, WU M, CHEN J, NIU ZW. Integration of cell-penetrating peptides with rod-like bionanoparticles: virus-inspired gene-silencing technology[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(9): 5453-5460.
- [58] CHAO CN, YANG YH, WU MS, CHOU MC, FANG CY, LIN MC, TAI CK, SHEN CH, CHEN PL, CHANG D, WANG ML. Gene therapy for human glioblastoma using neurotropic JC virus-like particles as a gene delivery vector[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2213.
- [59] LIN MC, WANG ML, CHOU MC, CHAO CN, FANG CY, CHEN PL, CHANG D, SHEN CH. Gene therapy for castration-resistant prostate cancer cells using JC polyomavirus-like particles packaged with a PSA promoter driven-suicide gene[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2019, 26(7/8): 208-215.
- [60] PANDA SK, KAPUR N, PALIWAL D, DURGAPAL H. Recombinant Hepatitis E virus like particles can function as RNA nanocarriers[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13: 44.
- [61] YIN D, ZHONG YY, LING SK, LU SC, WANG XY, JIANG ZF, WANG J, DAI Y, TIAN XL, HUANG QJ, WANG XB, CHEN JS, LI ZY, LI Y, XU ZJ, JIANG HW, WU YQ, SHI Y, WANG QJ, XU JJ, et al. Dendritic-cell-targeting virus-like particles as potent mRNA vaccine carriers[J/OL]. *Nature Biomedical Engineering*, 2024. DOI: 10.1038/s41551-024-01208-4.
- [62] FU S, XU XD, MA Y, ZHANG SB, ZHANG SF. RGD peptide-based non-viral gene delivery vectors targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ for cancer therapy[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2019, 27(1): 1-11.
- [63] GU WC, LUOZHONG SJ, CAI SM, LONDHE K, ELKASRI N, HAWKINS R, YUAN ZF, SU-GREENE K, YIN YJ, CRUZ M, CHANG YW, McMULLEN P, WU CY, SEO C, GURU A, GAO WT, SARMIENTO T, SCHAFFER C, NISHIMURA N, CERIONE R, et al. Extracellular vesicles incorporating retrovirus-like capsids for the enhanced packaging and systemic delivery of mRNA into neurons[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2024, 8(4): 415-426.
- [64] SUK JS, XU QG, KIM N, HANES J, ENSIGN LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 99: 28-51.
- [65] BAO CJ, DUAN JL, XIE Y, FENG XP, CUI W, CHEN SY, LI PS, LIU YX, WANG JL, WANG GL, LU WL. Bioorthogonal engineered virus-like nanoparticles for efficient gene therapy[J]. *Nano-Micro Letters*, 2023, 15(1): 197.
- [66] CAMPBELL EM, HOPE TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 471-483.
- [67] CAI YJ, MIKKELSEN JG. Lentiviral delivery of proteins for genome engineering[J]. *Current Gene Therapy*, 2016, 16(3): 194-206.
- [68] de RUITER MV, van der HEE RM, DRIESSEN AJM, KEURHORST ED, HAMID M, CORNELISSEN JJLM. Polymorphic assembly of virus-capsid proteins around DNA and the cellular uptake of the resulting particles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 307: 342-354.
- [69] VAHEY MD, FLETCHER DA. Low-fidelity assembly of influenza A virus promotes escape from host cells[J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 281-294.e19.
- [70] WANG XY, GAO RM, WANG X, ZHOU J, ZHANG XN, LI F. mRNA delivery systems based on protein nanocages: how far can we go?[J]. *Biodesign Research*, 2024, 6: 0032.
- [71] COOLEN AL, LACROIX C, MERCIER-GOUY P, DELAUNE E, MONGE C, EXPOSITO JY, VERRIER B. Poly(lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation[J]. *Biomaterials*, 2019, 195: 23-37.
- [72] LI K, CREWS CM. PROTACs: past, present and future[J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51(12): 5214-5236.