

多肽-药物键合物用于肿瘤靶向诊疗

陈颖, 郑蓉蓉, 李仕颖*

(广州医科大学药学院, 广东 广州 511436)

摘要: 癌症仍是威胁人类生命和健康的主要疾病之一。目前, 如何实现肿瘤精准诊疗是癌症治疗的最大挑战。前体药物利用靶向分子的肿瘤特异性将抗癌药物靶向递送至肿瘤部位, 能够有效提高药物生物利用度、治疗效果和安全性, 是当前抗癌药物的研发热点。前药的靶向分子主要有核酸适体、聚合物、抗体、多肽等, 其中多肽具有生物相容性好、降解性能可控、生物体内响应性高和制备方法简单易行等优点, 被广泛用来构建多肽-药物键合物 (peptide-drug conjugates, PDC) 前药, 实现对肿瘤的靶向治疗。近年来, 随着噬菌体肽库技术和多肽标准固相合成技术的发展, 越来越多的靶向多肽被发现和有效合成修饰, 为PDC的发展提供了有力支持。本文简要介绍了PDC中功能型多肽和连接子的种类及功能, 并详细论述了PDC在化学疗法、免疫疗法和光动力疗法在肿瘤靶向诊疗中的应用, 最后总结了PDC药物开发所面临的困难。

关键词: 多肽; 连接子; 抗肿瘤药物; 肿瘤靶向; 药物递送系统

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2341-12

Peptide-drug conjugates for tumor targeted diagnosis and treatment

CHEN Ying, ZHENG Rong-rong, LI Shi-ying*

(School of Pharmacy, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: Cancer is still one of the major diseases threatening human life and health. At present, how to achieve precise diagnosis and treatment of tumors is the biggest challenge in cancer treatment. Prodrugs use the tumor specificity of targeting molecules to deliver anticancer drugs to tumor sites, which can effectively improve drug bioavailability, therapeutic efficacy and safety, and are currently a hot spot in the research and development of anticancer drugs. The targeting molecules of prodrugs mainly include nucleic acid aptamers, polymers, antibodies, polypeptides, etc. Among them, polypeptides have the advantages of good biocompatibility, controllable degradation performance, high *in vivo* responsiveness, and simple and easy preparation methods, and are widely used. It is used to construct peptide-drug conjugates (PDC) prodrugs to achieve targeted therapy of tumors. In recent years, with the development of phage peptide library technology and peptide standard solid-phase synthesis technology, more and more targeted peptides have been discovered and effectively synthesized and modified, providing strong support for the development of PDC. This review briefly introduces the types and functions of functional peptides and linkers in PDC, and discusses the application of PDC in chemotherapy, immunotherapy and photodynamic therapy in tumor targeted diagnosis and treatment, and finally summarizes the difficulties faced by PDC drug development.

Key words: peptide; linker; anti-cancer agent; tumor targeting; drug delivery system

收稿日期: 2022-09-13; 修回日期: 2022-10-05.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1800600); 广东省自然科学基金项目 (2021B1515020043).

*通讯作者 Tel: 86-20-37103274, E-mail: lisy-sci@gzhmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1053

多肽是一类由几个或几十个氨基酸按一定顺序通过酰胺键连接的功能性片段, 具有特殊生理功能, 能被机体吸收并参与细胞代谢。虽然组成多肽的天然氨基酸只有 20 种, 但通过分子设计和氨基酸不同排列组合依然能产生许多种功能型多肽, 能在细胞水平上调控

人体的各种生理功能^[1,2]。相比于传统的生物医用载体,多肽具有肿瘤细胞靶向功能、细胞渗透功能、促凋亡功能、肿瘤微环境响应性高等优点^[3-6]。值得注意的是,由于多肽链段上氨基酸残基具有不同的化学结构,多肽可利用其肽键间氢键作用及氨基酸残基之间的疏水性作用、静电作用、氢键作用及 π - π 堆积作用等有效实现分子自组装,形成有序的超分子拓扑结构,如纳米管、纤维、囊泡、片层等^[7],展现出单分子或分子低聚体所没有的特性。此外,多肽具有生物相容性好、生物体内响应性高的特性,基于多肽自身的结构特点和化学修饰引入特殊功能基团所设计的载体材料具有独特的生理功能,如pH响应性、酶响应性等。因此,各种功能型多肽被研究者广泛用于构建多肽-药物键合物(peptide-drug conjugates, PDC),实现对肿瘤的靶向治疗^[8-10]。

PDC由功能多肽、连接子、细胞毒性药物3个模块组成,其组成与作用机制均与抗体偶联药物(antibody drug conjugates, ADC)相似。此前,已有大量基于抗体的ADC药物分子得到了广泛研究和临床应用发展,但基于多肽的PDC药物分子显示出了更大优势。由于ADC的大分子尺寸,基于抗体的ADC药物分子在肿瘤组织中的穿透性、通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)、免疫原性和体循环稳定性等方面往往不如人意。相比于ADC或其他大分子聚合药物,PDC分子体积小,在肿瘤穿透、EPR效应等方面有更大优势,并且部分靶向多肽可改变入胞机制,克服肿瘤细胞的多药耐药性,实现对耐药肿瘤的有效凋亡^[11]。目前,众多的研究者热衷于使用化学疗法、免疫疗法、光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)甚至两种方法协同作用治疗肿瘤。无论是哪一种疗法,如何将药物精准递送至肿瘤部位,减少药物在非肿瘤部位的过早释放都是重中之重。基于多肽的肿瘤细胞靶向性、刺激响应性、可控自组装等特性,PDC在实现肿瘤精准诊疗上有巨大潜力。本文将综述用于构建PDC的多肽和连接子的种类与功能,具体论述PDC在肿瘤的化疗、免疫疗法、PDT的研究进展(图1),并对PDC用于肿瘤精准治疗的前景进行了展望。

1 PDC中的多肽

研究表明^[12],肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞表面的各种受体表达状态与正常细胞相比有不同程度的差

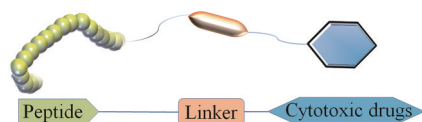


Figure 1 Composition of the three parts of the peptide-drug conjugates (PDC)

异。并且肿瘤微环境在有氧呼吸、血管生成及代谢状态等方面与正常组织相比有显著不同,具体表现为酸中毒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)表达异常、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)表达异常等^[13]。因此,肿瘤细胞表面、肿瘤血管内皮细胞表面和肿瘤微环境高表达受体的配体多肽具有对肿瘤组织的天然靶向性。此外,许多多肽对细胞中的各种亚细胞器也具有靶向性,如核定位信号肽^[14]、线粒体靶向肽^[15]等。当细胞毒性药物与这些靶向肽结合时,可被靶向递送至肿瘤组织,提高药物生物利用度和治疗效果,有效避免药物对正常细胞的损伤,降低药物的全身系统毒性。

在肿瘤细胞凋亡过程中,肿瘤治疗肽起着必不可少的作用,如半胱天冬蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)家族可通过破坏多种抗凋亡的因素发挥作用,被激活后可切断与其特异性识别的靶蛋白多肽,导致程序性细胞死亡;肿瘤抗原衍生的肽能通过细胞表面被称为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)的特殊分子呈递给免疫系统,引起免疫应答导致肿瘤细胞凋亡。其中,表1^[16-43]总结了被应用于PDC研究的各类靶向肽。

1.1 肿瘤细胞靶向肽

靶向肿瘤细胞多肽的受体往往会在肿瘤细胞表面呈现高表达状态,如胰岛素样生长因子受体(IGF-IR)、表皮生长因子受体(EGFR)、促性腺激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRHR)等。以靶向肿瘤细胞表面受体的靶向肽通过化学修饰构建载体材料,包载药物制备得到的PDC将具有对肿瘤细胞最直接的靶向性,能有效提高细胞毒性药物的临床治疗效果和安全性,增强患者对药物的适应性。Pham等^[44]利用转肽酶A和一种蛋白连接酶OaAEP1(*Oldenlandia affinis* asparaginyl endopeptidase 1)在人类红细胞外囊泡(red blood cell extracellular vesicles, RBCEVs)与EGFR靶向肽间建立共价键进行偶联,促进了EGFR阳性肺癌细胞在体内对RBCEVs的特异性摄取。更进一步地,作者将包载紫杉醇(paclitaxel, PTX)的胞外囊泡与EGFR靶向肽偶联,显著增强药物抑制EGFR阳性肿瘤生长的疗效。

1.2 肿瘤血管内皮细胞靶向肽

肿瘤细胞在遗传上存在不稳定性,常常会对细胞毒性药物产生耐受性,是癌症治疗失败的主要原因之一。在以肿瘤细胞为靶标筛选靶向肽时,体外培养的肿瘤细胞会丢失一些肿瘤细胞特异性分子或产生肿瘤细胞中并不存在的分子,不利于靶向肽的筛选。相反,肿瘤血管内皮细胞在遗传上很稳定,不易引起耐药性,是靶向肽筛选的理想目标。在众多的肿瘤血管靶向肽

Table 1 Various functional polypeptides in PDC. EGFR: Epithelial growth factor receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; ErbB2: Tyrosine kinase receptor 2; IGF-IR: Insulin-like growth factor receptor; CD13: Aminopeptidase N; HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3; MMP: Matrix metalloproteinase; NRP-1: Neuropilin-1; Caspase: Cysteiny aspartate specific proteinase; PD-L1: Programmed cell death 1 ligand 1

Type	Name	Sequence	Target
Tumor cell targeting peptide	GE11	YHWYGYTPQNV	EGFR ^[16]
	AHNP	FCDGFYACYKDV	HER2 ^[17]
	1-D03	MEGPSKCCYSLALSH	ErbB2 ^[18]
	3-G03	SGTKSKCCYSLRRSS	ErbB2 ^[18]
	JB3	D-CSKAPKLPAAYC	IGF-IR ^[19]
Tumor vascular endothelial cell targeting peptide	RGD	RGD	Integrin $\alpha_v\beta_3$ ^[20]
	NGR	NGR	CD13 ^[21]
	GEBP11	CTKNSYLMC	HUVECs ^[22]
	CS-1 peptide	EILDVPST	Integrin $\alpha_v\beta_1$ ^[23]
	CS-5 peptide	GEEIQIGHIPREDVDYHLP	Integrin $\alpha_v\beta_1$ ^[24]
	CSDSWHYC	CSDSWHYWC	VEGFR-3 ^[25]
Tumor microenvironment sensitive peptide	Ac-GPLGIAQ	Ac-GPLGIAGQ	MMP-2 ^[26]
	GQ8	GPLGIAGQ-NH ₂	MMP-2, MMP-9 ^[27]
	PLGVRKLVFF	PLGVRKLVFF	MMP-2 ^[28]
	pHLIP	ACEQNPIYWARY	pH sensitivity ^[29]
	GFLG	GFLG	Cathepsin B ^[30]
Cell-penetrating peptide	TAT	YGRKKRRQRRR ^[30]	/
	iRGD	CRGDK/RGPD/EC	NRP-1, integrin $\alpha_v\beta_3$ ^[31]
	Antp	RQIKIWFQNRRMKWKK ^[32]	/
	pVEC	LLILRRRIRKQAHASK ^[33]	/
Organelle targeting peptide	NLS	CGYGPKKKRQVGG	Nucleus ^[34]
	NTP	RIFIHFRIGC	Nucleus ^[35]
	KLA	KLAKLAKKLA	Mitochondria ^[36]
	SS31	HDDAPL-NH ₂	Mitochondria ^[37]
	12-mer peptide	RDVFTKGYGFGL	Mitochondria ^[38]
	Therapeutic peptide	RGDS	RGDS
DEVD		DEVD	Caspase-3 ^[40]
AARAVFLAL		AARAVFLAL	T lymphocytes ^[41]
YRPRPRRY		YRPRPRRY	T lymphocytes ^[42]
TPP-1		SGQYASYHCWCWRDPGGSK	PD-L1 ^[43]

中, 研究最多的就是含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的多肽 (Arg-Gly-Asp, RGD) 和含天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸序列的多肽 (Asn-Gly-Arg, NGR)。其中, RGD 肽可被整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体识别, 可用来靶向肿瘤血管整合素受体。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞处有高表达, 对肿瘤的侵袭转移、血管生成起着重要作用, 因此整合素 $\alpha_v\beta_3$ 成为许多抗肿瘤药物的绝佳靶点。NGR 肽识别并结合的受体为肿瘤血管内皮细胞中过表达的 CD13 酶, 具有较好的肿瘤血管靶向性。CD13 是一种跨膜蛋白酶, 在大部分肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞中过量表达, 是影响肿瘤血管生成的重要因素。肿瘤的生长增殖、侵袭转移对营养物质的需求极大, 导致肿瘤血管结构与功能与正常血管差异较大。因此, 通过靶向肿瘤血管内皮细胞来递送药物至肿瘤组织, 有效避免对正常组织的损伤, 也是一种具有极大潜力的肿瘤靶向治疗策略。

本课题组前期研究发现^[45], 以 RGD 肽作为靶向分子, 与 caspase-3 响应性多肽 DEVD、光敏剂原卟啉

(protoporphyrin IX, PpIX) 和一个荧光共振能量转移荧光团对构建了一种肿瘤靶向荧光探针 P-PpIX。归功于 RGD 的靶向作用, 荧光探针可富集于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过表达的肿瘤组织。对肿瘤区域进行光照可触发 PpIX 的 PDT 诱导肿瘤细胞凋亡, 进而激活 caspase 酶。被激活的 caspase-3 能进一步切割 DEVD, 使荧光共振能量转移过程终止, 从而恢复荧光信号。该方法有效提高了肿瘤 PDT 的疗效并为肿瘤细胞凋亡过程提供实时反馈。

1.3 肿瘤微环境敏感肽

由肿瘤细胞、免疫细胞、基质细胞和细胞外间质组成的肿瘤微环境, 在有氧呼吸、血管生成及代谢状态等方面与正常组织相比有显著不同。肿瘤组织微环境主要生理特性有微酸性、细胞内外疏基物质浓度差异、部分酶过量表达、低氧等。因此, 肿瘤微环境与正常细胞的明显差异为肿瘤靶向治疗提供了更多的有效靶点选择。在众多肿瘤微环境响应肽中, 酶敏感肽、pH 敏感肽^[46]和还原敏感肽被研究者广泛应用。例如, MMP 家族参与人体重要的生理和病理过程, 在人体正常组织

中仅少量存在,但在肿瘤微环境中过度表达,对肿瘤细胞侵袭转移起至关重要的作用。Qiu等^[47]利用含有MMP-2敏感多肽GPLGLAG的可活化细胞穿膜肽(activatable cell-penetrating peptide, ACP)作为桥梁将PpIX修饰到金纳米棒(gold nanorods, GNRs)表面,得到GNR-ACPP-PpIX纳米递药体系。由于ACPP独特的U型结构和GNRs的强近红外区光吸收,PpIX的光活性被抑制。当该纳米体系到达肿瘤组织后,嵌合肽中的GPLGLAG多肽序列被MMP-2降解,聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)外壳脱落,细胞穿膜肽暴露,PpIX的光活性恢复,有利于光敏剂在MMP-2过表达肿瘤细胞的富集。

1.4 细胞穿膜肽

多肽药物键合物在肿瘤治疗中未达到预期效果时,其原因往往是因为肿瘤细胞对偶联物的内化效率较低。虽然PDC的分子体积在2~20 kDa,与其他大分子递药系统相比有较好的肿瘤穿透效果,但这种仅依靠降低分子体积来提高肿瘤组织渗透率的效果有限,还需加大偶联物剂量才能实现在肿瘤部位达到有效药物浓度富集。为改善上述缺陷,研究者提出,细胞穿膜肽(cell-penetrating peptide, CPP)具有穿透细胞膜往细胞内运送各种生物活性物质的特性,能使PDC具备主动渗透能力,进一步提升偶联物在肿瘤组织处的渗透效率,增强靶向药物的抗肿瘤效果。根据CPP是否具有靶向性,可将其分为无靶向穿膜肽和靶向穿膜肽。众多无靶向穿膜肽中,蛋白转导肽TAT[YGRK-KRRQRRR]最具代表性,不仅能在包括蛋白质、多肽及核酸等多种外源生物大分子的跨膜转导过程中发挥重要作用,而且能携带这些外源生物大分子穿透活体细胞的各种生物膜性结构(细胞膜和血脑屏障等)进入胞内并发挥生理功能。然而以TAT肽为代表的穿膜肽缺少肿瘤靶向性,因此常将其与具有靶向性的肽段连接形成靶向穿透双功能肽如PEGA-pVEC^[48]、gHo-pVEC^[49]等。Zhang等^[50]以pH敏感穿膜肽TH[AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-Cys]修饰负载有免疫佐剂 α -半乳糖神经酰胺的脂质体(TH modified liposome loaded with α -galactosylceramides, aGC-TH-Lip)用于肿瘤免疫治疗。测定TH修饰的脂质体(TH peptidommodified liposome, TH-Lip)在体外被小鼠树突状细胞(dendritic cell, DC)的摄取状况,结果显示,TH-Lip在体外被DC2.4细胞的摄取量是聚乙二醇修饰的脂质体(polyethylene glycols modified liposome, PEG-Lip)的1.48倍。荷瘤小鼠给予aGC-TH-Lip后,其体内自然杀伤性T细胞、成熟DC细胞和细胞毒性T淋巴细胞数量较游离aGC组均有明显差异。结果表

明,基于TH肽的递送系统有效地将药物富集到肿瘤细胞,增强负载药物疗效。

在靶向穿膜肽中,以CendR肽为基础所构建的多肽受到广泛关注。CendR是氨基酸C-端序列为R/KXXR/K的短肽,能与肿瘤组织内高表达的NRP-1(neuropilin-1)特异性结合。CendR多肽和NRP-1的相互作用是药物克服生理屏障,促使其在组织内穿透的最关键因素。例如iRGD(CRGDK/RGPD/EC)肽既含有肿瘤血管内皮细胞靶向肽RGD序列又具备CendR肽链序列,与肿瘤细胞的亲和性高,能有效靶向渗透到肿瘤组织和肿瘤细胞内。

1.5 细胞器靶向肽

细胞器独特的生理功能在肿瘤细胞的生长增殖、侵袭转移中发挥着关键作用,因此细胞器如细胞核、线粒体等可作为肿瘤治疗的靶点。细胞核是真核细胞内重要的细胞结构,是细胞遗传与代谢的调控中心。药物靶向至细胞核能克服耐药细胞的细胞外排作用,有效破坏肿瘤细胞细胞核的结构与功能,使肿瘤细胞生理功能紊乱并致其凋亡。然而细胞核外的核膜阻碍了细胞核与细胞质的物质运输,大分子活性物质需借助核靶向分子才能完成入核过程。细胞核靶向肽能很好地将细胞毒性药物运输至细胞核,被广泛用于协助药物入核。

线粒体是细胞进行有氧呼吸、提供细胞代谢所需能量的主要场所。传统的线粒体靶向肿瘤治疗通常将亲脂性阳离子(如三苯基)作为线粒体靶向基团以将细胞毒性物质递送至线粒体,然而由于传统线粒体靶向递药系统对肿瘤细胞选择性低、肿瘤细胞富集少、全身系统毒性较高等缺点削弱了肿瘤治疗效果。为克服上述缺陷,线粒体靶向肽通常含有带正电荷和疏水性的氨基酸,如线粒体穿膜肽、Szeto-Schiller肽、线粒体靶向序列等^[51],被提出作为线粒体靶向分子的亲脂性阳离子的替代品。受损的线粒体产生活性氧、细胞色素C等信号激活caspase家族蛋白来启动细胞凋亡。因此,线粒体成为了最适合肿瘤PDT触发细胞凋亡的细胞器。Sun等^[52]以RGD肽和KLA肽开发了一种多阶段肿瘤靶向脂质体(RGD/KLA-modified liposome, RGD-KLA-Lip)负载PTX, RGD-KLA-Lip具有对肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞线粒体的靶向运输作用,促进了线粒体介导的细胞凋亡并有效降低了细胞毒性药物的全身系统毒性。

1.6 治疗肽

Caspase家族是一种调节细胞程序性凋亡、炎症等生理功能的蛋白酶家族,细胞凋亡的过程实际上是caspase被活化并发生凋亡蛋白酶的级联反应。在细胞凋亡过程中,caspase蛋白酶被激活可切断对其特异

性识别的多肽。这种 caspase 蛋白酶刺激响应型多肽常用作构建荧光探针来实现对肿瘤细胞凋亡过程中的实时检测, 或用于设计 caspase 蛋白酶响应型纳米递药系统实现细胞毒性药物对肿瘤的靶向治疗。

肿瘤抗原可使免疫系统将正常细胞与肿瘤细胞区分开, 一方面肿瘤抗原衍生肽能通过 HLA 呈递给免疫系统, 另一方面抗原递呈细胞 (antigen presenting cells, APC) 能摄取、加工处理肿瘤抗原, 并将抗原递呈给 T 淋巴细胞的一类免疫细胞, 引起机体的免疫应答。因此, 肿瘤抗原多肽尤其是只在肿瘤细胞表达的肿瘤特异性表达抗原肽均可作为免疫治疗肽, 在以 APC 和 T 淋巴细胞为靶点对肿瘤细胞进行免疫治疗方面有着巨大潜力。Boël 等^[53]报道了编码肿瘤抗原的新基因 *BAGE* 基因, 其编码的 ARAVFLAL 肽可被 T 淋巴细胞识别。*BAGE* 基因在正常组织中是沉默的, 而在肿瘤部位特异性表达, 编码的抗原可作为对细胞毒性 T 淋巴细胞的靶向肽, 触发免疫系统对肿瘤的免疫应答。

2 PDC 中的连接子

PDC 的多肽分子和细胞毒性药物通过连接子共价偶联。作为一种前药, PDC 须满足在体循环过程中无过早释药, 仅在肿瘤部位释放药物的条件。其中, 连接子的选择至关重要, 需考虑很多因素: 多肽类型与功能、细胞毒性药物、肿瘤微环境特性等。合适的连接子不仅能保证 PDC 在体循环过程中的稳定性, 还能提高细胞毒性药物杀伤肿瘤细胞效率。根据连接子在体循环中的稳定性和肿瘤组织处的断裂机制, 可将其分为不可裂解型连接子和可裂解型连接子。可裂解型连接子中, 根据其在肿瘤组织中触发裂解机制又可分为酶敏感性连接子、还原敏感型连接子和 pH 敏感型连接子。表 2^[54-61]中列举了一些常用的连接子。

Table 2 Various commonly used linkers in PDC

Type	Name
Non-cleavable	Oxime bond ^[54]
	Triazole bond ^[54]
	γ -Aminobutyric acid ^[54]
	Thioether bond ^[55]
	Amide bond ^[55]
Cleavable	
Enzyme sensitive	KCLPRTGCK ^[56]
	GAGRRAAG ^[57]
Reduction sensitive	Disulfide bond ^[58]
pH sensitive	Hydrazine bond ^[59]
	Imine ^[60]
	Hydrazone bond ^[61]

2.1 不可裂解型连接子

不可裂解型化学物质如肟、硫醚、三唑和 γ -氨基丁酸等^[54], 可用于结合细胞毒性药物连接到靶向多肽。

与可裂解型连接子相比, 以不可裂解型连接子为中间体的 PDC 优势在于良好的体循环稳定性、更少的过早释药和更低的系统毒性。但是当连接的靶向肽与细胞毒性分子相同时, 不可裂解型连接子构建的 PDC 相比于可裂解型连接子往往表现出更低的抗肿瘤效果^[62]。

Yu 等^[55]将一种细胞穿膜肽 KRP 与多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 通过硫醚键和酰胺键连接得到 KRP-DOX 偶联物。KRP-DOX 静脉注射移植骨肉瘤小鼠后, 在血液循环中几乎没有释放游离 DOX, 并表现出了良好的肿瘤组织选择性富集和肿瘤细胞内化效率, 这归功于偶联物中稳定的共价键避免了药物在血液中的过早释放, 使大部分 DOX 通过 KRP 进入肿瘤细胞。

2.2 可裂解型连接子

2.2.1 酶敏感型连接子 酶敏感型连接子常用形式有酯键、特定氨基酸序列的短肽等, 能被肿瘤细胞的专属性或过表达蛋白酶特异性识别, 广泛用于肿瘤微环境异常表达酶触发释药。由于血浆中 pH 过高, 肿瘤组织中某些特定蛋白酶在血浆中的活性低, 因此酶响应型连接子在体循环中能保持良好稳定性。其中, 蛋白酶特异性响应短肽在 PDC 研究中受到广泛关注。肿瘤组织中高表达的蛋白酶有 MMP、半胱氨酸组织蛋白酶、激肽释放酶等。

2.2.2 还原敏感型连接子 还原敏感型连接子是基于细胞质中 GSH 等还原性物质的浓度比血浆中浓度高近 1 000 倍。并且, 由于肿瘤微环境的氧化应激和缺氧, 肿瘤细胞内的 GSH 浓度比正常细胞更高, 促进二硫键在细胞内的断裂。因此, 二硫键被广泛用于靶向给药。以二硫键为中间体构建的 PDC 在血液中具有良好稳定性, 而在肿瘤细胞中能被还原分解释放出细胞毒性分子。Qian 等^[58]利用一种靶向 MMP-2 的多肽 MMP1 (CCKIGLFRWR) 通过还原敏感性二硫键与 DOX 连接。MMP1 肽和 DOX 间的二硫键通过高浓度 GSH 还原而断裂。DOX 可有效地进入肿瘤细胞。同时, MMP1 肽选择性地抑制 MMP-2 活性, 有效抑制肿瘤转移。

2.2.3 pH 敏感型连接子 与正常细胞通过氧化磷酸化获取能量的方式不同, 肿瘤细胞因为脉管系统分布不均匀 (也称瓦氏效应), 供氧量不足, 所以只能利用无氧糖酵解产生的能量。因此, 肿瘤细胞会产生大量的乳酸、氢离子及二氧化碳, 从而导致肿瘤微环境酸化 (pH 值为 6.2~6.8)。溶酶体中的 pH 值为 4.5~6.0, 与人体生理 pH 7.4 差异更大。pH 敏感型连接子中, 最常用的连接子是胍键^[59], 其中性环境中稳定, 但在弱酸性环境中易水解。此外, 亚胺^[60]、缩醛等都是 pH 敏感型连接子常用形式。Ding 等^[61]利用 PEG 的水合壳功

能和腺键的酸敏感性,构建了一种CPP修饰的pH敏感性PEG化脂质体,以提高多肽对肿瘤靶向的选择性。高效液相色谱和流式细胞术表明,酸可降解腺键,在正常中性条件下是稳定的,PEG可从脂质体表面完全切割,在肿瘤酸性环境下暴露出CPP,增强肿瘤细胞对PEG链的摄取。

3 PDC用于肿瘤诊疗

PDC的功能多肽为偶联物提供了肿瘤靶向、细胞穿透、蛋白酶响应等功能;连接子起着中间体和刺激响应释药作用;而细胞毒性药物则是PDC的核心,对肿瘤细胞具有杀伤作用。细胞毒性药物是指能诱导细胞凋亡的治疗活性分子,包括化疗药物、光敏剂、放射性核素、肿瘤抗原、免疫检查点阻断剂甚至是显像剂、造影剂等。然而,细胞毒性药物单独使用对肿瘤细胞无选择性,无差别杀伤正常细胞,导致全身系统毒性。此外,给药后肿瘤细胞细胞膜上过度表达外排抗肿瘤药物蛋白引起多药耐药性,削弱了细胞毒性药物在临床治疗中的疗效。虽然传统的前药载体能让药物具有较好的缓释作用,但仍存在制备复杂、生物降解性差、对肿瘤细胞选择性差等缺陷。以功能多肽为载体的PDC前药系统可有效提高细胞毒性药物靶向性,解决其全身系统毒性、多药耐药等问题,并且多肽载体在体内生物降解可控,不会产生积累毒性,为肿瘤诊疗开辟新途径。

3.1 PDC在肿瘤化学疗法中的应用

化疗是肿瘤传统三大疗法之一,由于化疗药物自身靶向能力差、生物利用度低等原因,为化疗带来了严重的不良反应,削弱了其在临床治疗中的疗效。PDC前药系统是解决化疗药物此类普遍性问题的重要手段。

Shim等^[63]利用促凋亡肽(Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln, SMAC)和组织蛋白酶B裂解肽(Phe-Arg-Arg, FRRG)与DOX偶联,自组装得到纳米粒(SMAC-FRRG-DOX nanoparticles)。如图2所示,DD-NPs(drug-drug nanoparticles)仅在组织蛋白酶B高表达的癌细胞中被切割释放出促凋亡药物与DOX,诱导了促凋亡作用与化疗的协同治疗。在乳腺癌小鼠实验中,DD-NPs通过EPR作用在肿瘤组织处高度积累,并通过SMAC肽和FRRG肽的双重递送增强了DOX介导的化疗。因此,它们可阻止耐药性的发展,并有效、安全地抑制肿瘤的生长和转移,且使常规化疗的毒副作用最小。

Duan等^[64]合成并评估了两种紫衫醇-细胞穿透肽偶联物(paclitaxel-cell penetrating peptide conjugates, PTX-CPPs)。与游离PTX相比,两种PTX-CPPs在癌细胞中均显示出显著增强的细胞摄取、细胞毒性升高、细胞凋亡增加及线粒体膜电位降低。PTX-CPPs在抑制荷瘤小鼠肿瘤生长方面比游离PTX更有效,这表明其

在体内抗肿瘤疗效更好,有效改善了PTX水溶性低、细胞多药耐药性等问题。

Saghaeidehkordi等^[65]设计了一种靶向于乳腺癌细胞受体角蛋白1的靶向肽,与DOX通过酸敏感性腺键连接构建了受体角蛋白1靶向肽-DOX偶联物。在三阴性乳腺癌小鼠模型中对偶联物进行了体内评估,第35天时用PDC处理的小鼠肿瘤生长显著减少,约为游离DOX治疗小鼠肿瘤生长体积的65%。更值得注意的是,由于靶向肽的靶向作用,PDC药物处理组小鼠肿瘤内DOX水平是游离DOX组的1.4倍。相反,在其他器官处,PDC药物处理组显示出更低的DOX水平,仅为游离DOX组的45%~77%,说明靶向肽能显著增强药物在肿瘤组织处的富集,减少化疗药物的不良反应。

化疗药物结合各种功能型多肽构建PDC,克服了化疗药物肿瘤靶向性低、毒副作用严重的缺陷,并且增强了药物的肿瘤穿透能力,能在病灶处实现有效富集,进一步增强疗效。然而,体循环中PDC的多肽与连接子可被蛋白酶或化学刺激裂解,造成药物过早释放,出现不希望的毒副作用。因此,为提高PDC在血循环中的稳定性,还需对PDC的载体构建开发新材料和新技术。

3.2 PDC在肿瘤免疫疗法中的应用

抗肿瘤免疫反应可分为3个步骤^[66]:①肿瘤抗原加工与递呈;②APCs启动肿瘤抗原特异性T细胞;③肿瘤部位的效应T细胞杀灭癌细胞。然而,肿瘤细胞能采用不同策略来抑制免疫系统,逃避机体正常的抗肿瘤免疫反应,出现免疫逃逸。

肿瘤逃逸免疫系统的主要机制是通过抑制抗原递呈。APC尤其是DC细胞本应促进抗肿瘤免疫。然而,肿瘤源性因子(白介素-6、白介素-10、血管内皮生长因子等)创造的环境会阻碍DC的成熟,维持在不成熟状态,最终损害其作为抗原递呈细胞的功能,从而使这些细胞不能诱导抗肿瘤T细胞反应。Yuzuriha等^[67]设计了一种抗原肽SIINFEKL与全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)、维生素D3的偶联物,以有效地诱导对抗肿瘤特异性免疫耐受(图3)。ATRA与维生素D3作为DC细胞的诱导剂,能有效抑制巨噬细胞和DC细胞的炎症反应,促进DC细胞对抗原的递呈,进而诱导T淋巴细胞对肿瘤的免疫治疗。这种以APC为靶标的多肽药物键合物前药体系将有助于增强APC对肿瘤抗原的识别与处理,促进对抗肿瘤特异性免疫耐受。

肿瘤免疫治疗中,免疫检查点表达于免疫及相关细胞,与肿瘤细胞上的受体结合后通过抑制免疫细胞的活性和增殖能力来抑制免疫应答,从而诱导免疫逃逸。免疫检查点及其配体是肿瘤成像及靶向治疗的优

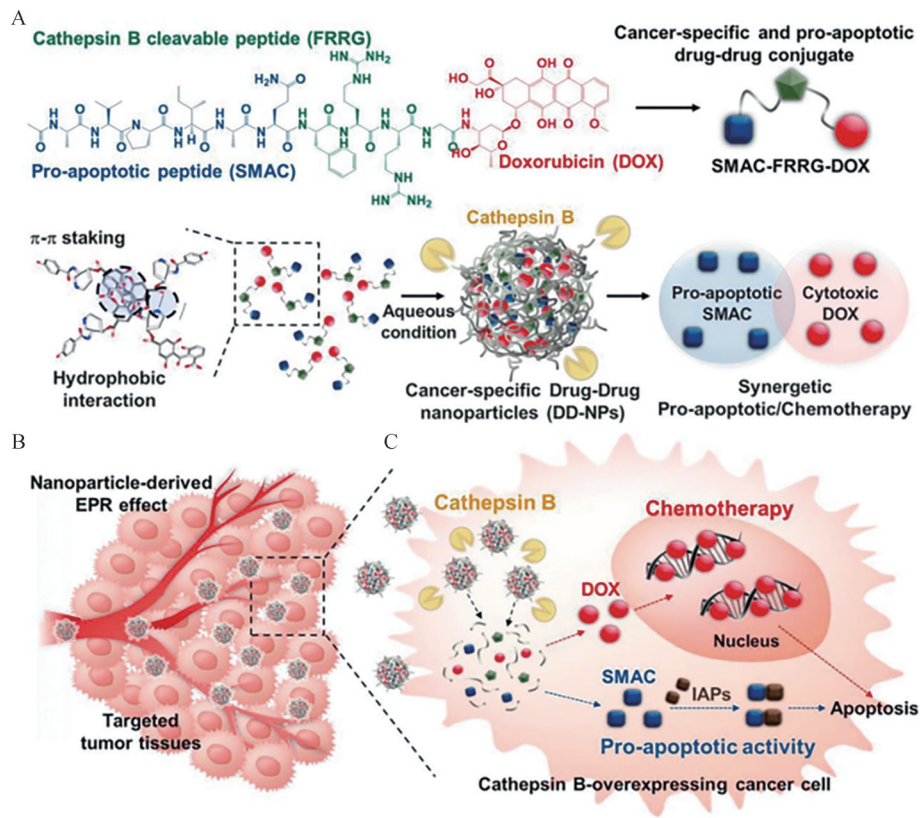


Figure 2 Tumor-specific and pro-apoptotic peptide-drug nanoparticles of drug-drug nanoparticles (DD-NPs) for synergistic pro-apoptotic/chemotherapy. A: Peptides and hydrophobic doxorubicin (DOX) can form stable nanoparticles through hydrophobic interactions and amphiphilic intermolecular π - π stacking, resulting in DD-NPs; B: The DD-NPs highly accumulates in the targeted tumor tissues *via* enhanced permeability and retention effect; C: DD-NPs are specifically cleaved into pro-apoptotic Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln (SMAC) and cytotoxic DOX in cathepsin B-overexpressing cancer cells, and then synergistically induce apoptosis in drug-resistant cells through chemotherapy and inhibitor of apoptosis protein (IAP) inhibition. Adapted from Ref. 63 with permission. Copyright © 2020 Elsevier

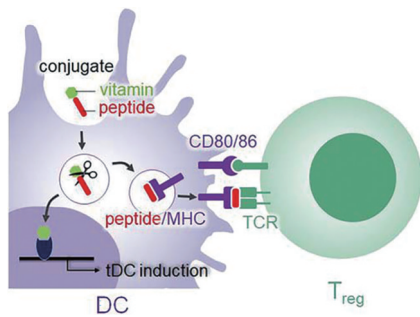


Figure 3 Induction of tolerant dendritic cells and regulatory T cells by peptide-vitamin conjugates. MHC: Major histocompatibility complex; TCR: T cell receptor; tDC: Tolerogenic dendritic cells; T_{reg}: Regulatory cell; CD: Antigen differentiation cluster. Adapted from Ref. 67 with permission. Copyright © 2020 Wiley

良靶标, 筛选及制备出的一些分子可与免疫检查点或其配体特异性结合, 通过阻断其相互作用而使免疫细胞发挥正常功能, 这类化合物被称为免疫检查点阻断剂。其中, 靶向细胞毒性 T 淋巴细胞相关分子-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)、程序性细

胞死亡受体-1 (programmed cell death receptor 1, PD-1) 和 PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1) 的药物是最广泛研究和认可的。多肽也能成为免疫检查点阻断药物。Li 等^[68]使用 T 细胞活化测定和混合淋巴细胞反应, 证实多肽 TPP-1 (SGQYASYHCWCWRDPGGSK) 会干扰 PD-1/PD-L1 的相互作用。为了检测 TPP-1 对体内肿瘤生长的抑制作用, 建立了使用 H460 细胞的异种移植小鼠模型。TPP-1 或 PD-L1 抗体治疗小鼠的肿瘤块生长率分别比对照肽治疗小鼠低 56% 或 71%, 表明 TPP-1 抑制或至少延缓肿瘤生长, 这归功于 TPP-1 减弱了 PD-L1 对 T 细胞的抑制作用, T 细胞重新激活。更进一步的是, Meng 等^[69]将超顺磁性氧化铁纳米粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO NPs) 被 H460 肺癌细胞膜包封得到 SPIO NP@M, 并将 PD-L1 抑制肽 TPP1 和 MMP-2 敏感肽 PLGLLG 偶联到肺癌细胞膜上得到 SPIO NP@M-P 纳米粒。H460 肺癌细胞膜作为仿生载体延长了 PDC 药物的半衰期, 并以 MMP-2 敏感肽作为靶向分子使其在肿瘤组织中实现

有效积累。更值得注意的是, PDC 药物递送系统中将 PD-L1 抑制肽 TPP1 作为细胞毒性药物, 增强了肿瘤免疫治疗疗效。

除上述的抗原呈递抑制和肿瘤检查点外, 肿瘤免疫逃逸与免疫抑制肿瘤微环境息息相关, 例如吡啶胺 2,3-双加氧酶抑制、异常氧化还原状态、肿瘤相关巨噬细胞等, 使得免疫疗法在肿瘤治疗中的疗效降低。然而, 以多肽为基础的 PDC 药物可充分利用肿瘤微环境影响来设计药物靶向递送系统。由于肿瘤微环境与正常组织间的巨大差异, 使肿瘤微环境敏感肽、pH 敏感肽等对肿瘤微环境具有靶向能力, 同时, pH 敏感型连接子、还原敏感型连接子亦可利用肿瘤微环境实现药物的可控释放。随着对肿瘤微环境的不断研究, PDC 可在肿瘤免疫疗法领域取得更大进步。

3.3 PDC 在肿瘤 PDT 中的应用

PDT 是基于光敏剂在局部或全身的作用, 由于其选择性好、患者耐受性高, 在癌症治疗中有很好的应用前景。PDT 的分子机制是基于 3 种无毒成分, 仅通过相互作用在病理组织内产生预期效果。这 3 种必需分

子分别为光敏剂、具有适当波长的光、在细胞中溶解的氧气。光敏剂进入细胞后吸收适当波长的光, 启动激活过程, 产生具有细胞毒性的单态氧等活性氧物质。高活性氧会引起肿瘤组织内的蛋白质、脂肪和其他分子的光损伤, 能导致肿瘤细胞在凋亡或坏死过程中直接死亡。值得注意的是, 光敏剂在细胞内的位置不同决定了细胞死亡的机制不同, 例如线粒体的损伤可导致细胞凋亡、细胞膜的破坏和完整性的丧失可引起坏死、溶酶体或内质网的损伤可引起自噬。

本课题组的前期研究中^[70], 合成了一种 MMP-2 敏感激活的细胞穿透肽 ACPP [R9GPLGLAGE8] 与 PpIX 的偶联物 (ACPP-PpIX), 用于肿瘤靶向 PDT (图 4)。ACPP 由聚阳离子穿膜肽 R9 (RRRRRRRRR)、MMP-2 敏感寡肽和聚阴离子肽 E8 (EEEEEEEE) 组成。在正常组织中, R9 肽的细胞穿透功能会通过分子内静电吸引被 E8 肽阻断。一旦偶联物进入 MMP-2 过表达的肿瘤细胞, R9 肽和 E8 肽之间的寡肽连接子被蛋白水解将分离抑制性聚阴离子, 释放 CPP-PpIX 用于 PDT, 这有效地解决了显正电荷的细胞穿透肽在血液循环中不

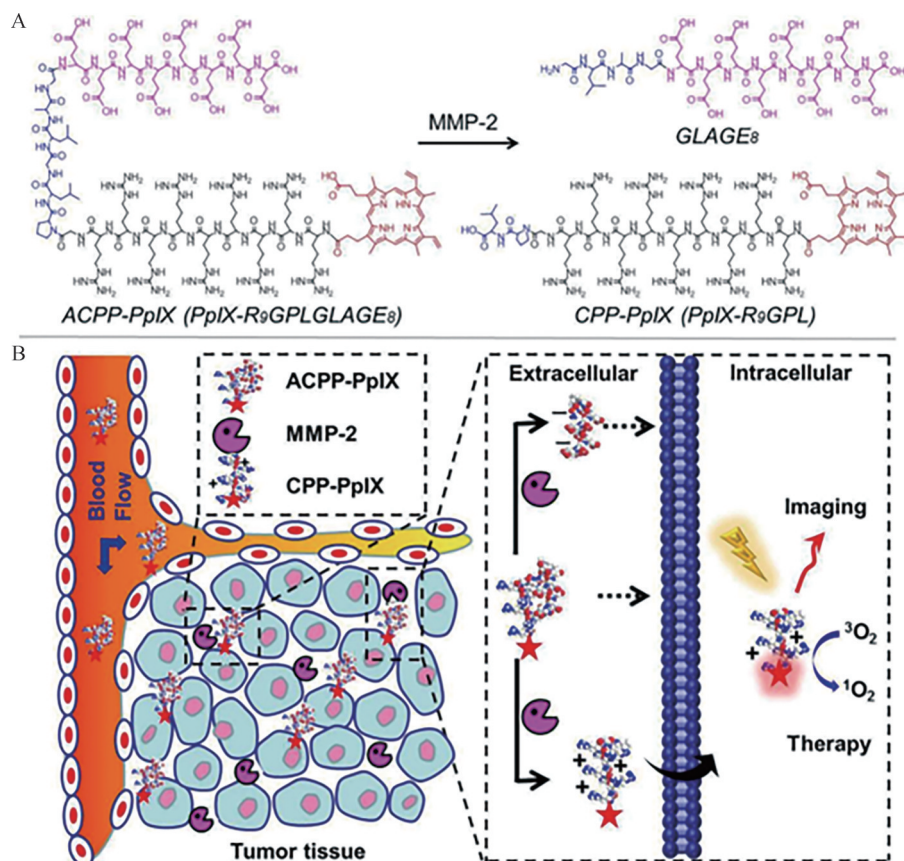


Figure 4 ACPP-PpIX for diagnostic imaging and photodynamic therapy. A: MMP-2 triggered structure transformation of ACPP-PpIX; B: Schematic illustration of the mechanism of action of ACPP-PpIX. ACPP-PpIX: Activatable cell-penetrating peptide protoporphyrin IX conjugate; CPP-PpIX: Cell penetrating peptide protoporphyrin IX conjugate; GLAGE8: Polyanionic peptide E8; $^3\text{O}_2$: Triplet oxygen; $^1\text{O}_2$: Singlet oxygen. Adapted from Ref. 70 with permission. Copyright © 2015 American Chemical Society

稳定和对肿瘤组织具有非特异性导致毒副作用严重的缺陷。结果发现,在尾静脉注射后,ACPP-PpIX偶联物可通过荧光增强有效地聚集在肿瘤部位,有利于肿瘤诊断和图像引导下的PDT。

由于富含氧的细胞环境可产生活性氧,线粒体可能是最适合PDT触发细胞凋亡的细胞器。Cheng等^[71]开发了一种单药自递送嵌合肽基纳米粒,用于线粒体和质膜双靶向光动力肿瘤治疗(图5)。嵌合肽由光敏剂PpIX、一种具有双重靶向功能的生物活性肽RFXR-FXRFXR和亲水PEG链组成。实验表明,肿瘤质膜定位嵌合肽可增强光照射下的膜通透性,提高纳米粒的细胞传递。更重要的是,线粒体和质膜双靶向系统实现了光敏剂的线粒体有效定位,从而实现线粒体部位的PDT,最大限度增强了光敏剂诱导PDT的疗效。

上述文献^[70,71]证明了两肽结合能有效提高PDC在体内的稳定性,并且将光敏剂靶向线粒体的PDT效果更佳。Xu等^[72]以活性中性粒细胞封装了RGD肽和线粒体破坏肽KLA(KLAKLAKKLAKLAL)修饰的光敏剂Ce6,既赋予了PDC体内长循环能力、对肿瘤组织的靶向性,又能主动进入肿瘤细胞积聚在线粒体处触发PDT。同时多肽KLA诱导线粒体膜破坏,达到协同治疗目的。

PDC前药策略不仅能将光敏剂成功靶向至肿瘤

组织,增强其肿瘤细胞穿透能力,而且能利用细胞器靶向肽如线粒体靶向肽、质膜靶向肽、内质网靶向肽等将光敏剂定向递送至亚细胞器,以不同的机制引起肿瘤细胞凋亡,发挥PDT的最大疗效。

4 目前PDC开发面临的挑战

与ADC或其他大分子聚合药物相比,PDC药物分子体积小,具有更强的肿瘤组织穿透能力和EPR效应,这是PDC药物的一大优势。然而,PDC分子质量小亦使其易透过肾小球滤过膜而被快速清除,是PDC分子生物半衰期短的一个重要原因。此外,由于血浆中存在各种蛋白酶或多肽酶,PDC在体循环中易被降解,是造成PDC在体内不稳定、生物半衰期短的另一重大因素。为了让PDC具有长时间的持续给药能力,使细胞毒性药物在病灶部位实现有效富集,研究者通常对PDC进行化学修饰或采用仿生载体策略。Wang等^[73]将PDC接枝于PEG和第4代聚酰胺基胺树枝状大分子所构建的载体上,大大增强了PDC在小鼠体内的长循环能力。Fan等^[74]采用仿生载体策略,利用大鼠胶质瘤细胞的细胞膜(rat glioma cell membrane, CCM)包裹紫杉醇纳米悬浮液[paclitaxel nano suspension, (PTX) NS],并进一步将血脑肿瘤屏障穿透肽WSM(SYPGWSW)通过插入法修饰到肿瘤细胞膜表面,使

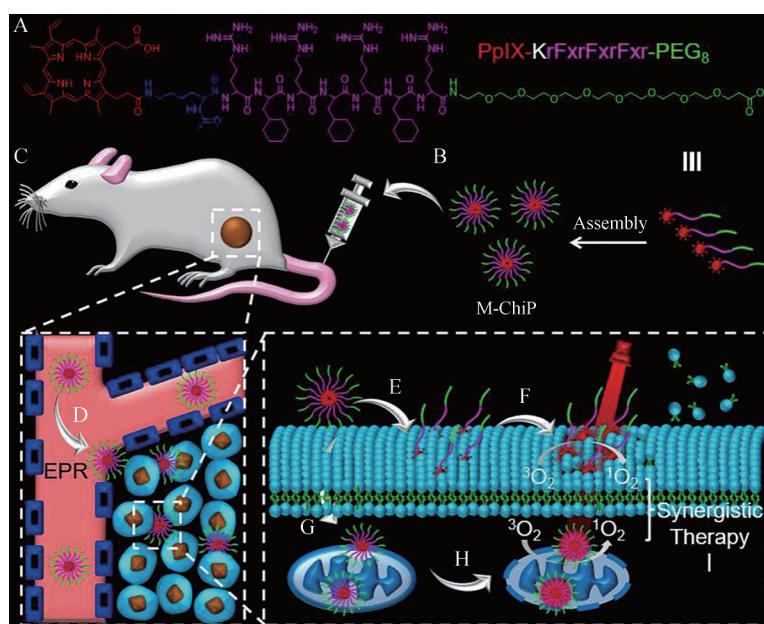


Figure 5 Schematic illustration of the structure and proposed mechanism of M-ChiP for tumor-targeted synergistic photodynamic therapy. A: Chemical structure of PpIX-KrFxrFxrFxr-PEG8; B: Self-assembly of PpIX-KrFxrFxrFxr-PEG8 into M-ChiP; C: Intravenous injection of M-ChiP into tumor bearing mouse; D: Accumulation of M-ChiP on tumor site *via* EPR effect; E: Insertion of M-ChiP into the plasma membrane of tumor cells; F: The production of $^1\text{O}_2$ under irradiation and the rupture of plasma membrane; G: The endocytosis and the mitochondria target delivery of M-ChiP; H: The production of $^1\text{O}_2$ under irradiation and the destruction of mitochondria; I: The synergistic therapeutic effects to induce tumor cell death. M-ChiP: Single-agent self-delivery chimeric peptide based nanoparticle; EPR: Enhanced permeability and retention effect. Adapted from Ref. 71 with permission. Copyright © 2019 Elsevier

PDC既具有了肿瘤穿透能力,又提高了其PDC在体循环中稳定性。但值得注意的是,化学修饰、仿生载体策略等方法在一定程度上限制了PDC分子体积小所带来的肿瘤穿透能力强和载药率高等优势。因此,在开发设计PDC药物分子结构时,需综合考虑多方因素。

世界上首个被FDA批准的抗癌PDC药物Pepaxto在验证性临床试验中出现了逐步增高的死亡率,其临床试验均被终止并撤出市场。作为一种新型PDC药物,Pepaxto靶向于肿瘤细胞中的CD13酶,被用于治疗CD13高表达的多发性骨髓瘤。在氨肽酶敏感性裂解后,Pepaxto的亲水性烷基化代谢物马法兰积聚在骨髓瘤细胞中,与细胞中的生物活性成分发生烷化作用,造成细胞凋亡。Schjesvold等^[75]对Pepaxto做了详细研究,称Pepaxto是由于该药物的高亲脂性通过被动转运进入细胞内,并迅速在肿瘤细胞中使药物富集到有效浓度,这是Pepaxto的一大优势。但也正因其高亲脂性,Pepaxto也能进入到正常细胞中,出现不良反应,这与其在临床试验研究中总生存期下降可能有关。

5 总结与展望

本综述对多肽、连接子进行了详细分析,并论述了PDC在肿瘤治疗中的各种应用,为构建PDC前药递送系统提供了有力支持。具有良好生物活性的多肽本身或经过化学修饰后,能实现长循环可控释放、肿瘤细胞靶向、细胞穿透等功能。在PDC的构建中,常用的多肽主要包括肿瘤细胞靶向肽、肿瘤血管内皮细胞靶向肽、肿瘤微环境敏感肽、细胞穿膜肽、细胞器靶向肽和治疗肽。针对不同类型肿瘤,靶向肽的选择对药物的治疗效果影响深远。此外,发挥中间体作用的连接子对PDC的药效也至关重要,具有PDC稳定性及响应性控制释药的作用,有利于药物在肿瘤组织中的富集。从目前研究看,PDC前药递送系统在肿瘤的化学疗法、免疫疗法和PDT中展现出了巨大应用潜力。相信随着多肽合成和筛选技术的不断发展,肿瘤靶标的不断发现,将更有利于PDC在肿瘤诊疗中的应用。

作者贡献: 陈颖负责文献检索和全文撰写;郑蓉蓉负责文章修订和复核;李仕颖负责选题和思路指导。

利益冲突: 所有作者和文章所涉及内容均不存在潜在的利益冲突。

References

- [1] Ruoslahti E. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles [J]. *Adv Mater*, 2012, 24: 3747-3756.
- [2] Li K, Liu CJ, Zhang XZ. Multifunctional peptides for tumor therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 160: 36-51.
- [3] Zhao N, Qin Y, Liu H, et al. Tumor-targeting peptides: ligands for molecular imaging and therapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18: 74-86.
- [4] Hu HY, Chen DW, Liu YF, et al. Preparation of sterically stabilized immunoliposomes with bee venom polypeptide and its selectivity to tumor cells *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学期报)*, 2007, 42: 1201-1205.
- [5] Habault J, Poyet JL. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies [J]. *Molecules*, 2019, 24: 927.
- [6] Hazafa A, Batool A, Ahmad S, et al. Humanin: a mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases [J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118679.
- [7] Mandal D, Nasrolahi Shirazi A, Parang K. Self-assembly of peptides to nanostructures [J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12: 3544-3561.
- [8] Wang Y, Chen QJ, Sun T, et al. *In vitro* and *in vivo* targeting evaluation of oxaliplatin-loaded reduction-sensitive ferric oxide nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin (药学期报)*, 2022, 57: 188-199.
- [9] Zhu YS, Tang K, Lv J. Peptide-drug conjugate-based novel molecular drug delivery system in cancer [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42: 857-869.
- [10] Wang MD, Hou DY, Lv GT, et al. Targeted *in situ* self-assembly augments peptide drug conjugate cell-entry efficiency [J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121139.
- [11] Ma L, Wang C, He Z, et al. Peptide-drug conjugate: a novel drug design approach [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24: 3373-3396.
- [12] Plotkin BJ, Sigar IM, Swartzendruber JA, et al. Differential expression of cytokines and receptor expression during anoxic growth [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11: 406.
- [13] Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, et al. Tumor microenvironment as a "Game Changer" in cancer radiotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3212.
- [14] Lu J, Wu T, Zhang B, et al. Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19: 60.
- [15] Wu J, Li J, Wang H, et al. Mitochondrial-targeted penetrating peptide delivery for cancer therapy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15: 951-964.
- [16] Striese F, Sihver W, Gao F, et al. Exploring pitfalls of ⁶⁴Cu-labeled EGFR-targeting peptide GE11 as a potential PET tracer [J]. *Amino Acids*, 2018, 50: 1415-1431.
- [17] Zahmatkeshan M, Gheybi F, Rezayat SM, et al. Improved drug delivery and therapeutic efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin by targeting anti-HER2 peptide in murine breast tumor model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 86: 125-135.
- [18] Larimer BM, Thomas WD, Smith GP, et al. Affinity maturation of an ERBB2-targeted SPECT imaging peptide by *in vivo* phage display [J]. *Mol Imaging Biol*, 2014, 16: 449-458.
- [19] Haylor J, Hickling H, El Eter E, et al. JB3, an IGF-I receptor

- antagonist, inhibits early renal growth in diabetic and uninephrectomized rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 2027-2035.
- [20] Fan JX, Liu MD, Li CX, et al. A metal-semiconductor nanocomposite as an efficient oxygen-independent photosensitizer for photodynamic tumor therapy [J]. *Nanoscale Horiz*, 2017, 2: 349-355.
- [21] Corti A, Gasparri AM, Sacchi A, et al. NGR-TNF engineering with an N-terminal serine reduces degradation and post-translational modifications and improves its tumor-targeting activity [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17: 3813-3824.
- [22] Liang S, Lin T, Ding J, et al. Screening and identification of vascular-endothelial-cell-specific binding peptide in gastric cancer [J]. *J Mol Med*, 2006, 84: 764-773.
- [23] Domínguez-Jiménez C, Sánchez-Aparicio P, Albar JP, et al. The alpha 4 beta 1 fibronectin ligands CS-1, Hep II, and RGD induce different intracellular events in B lymphoid cells. Comparison with the effects of the endothelial ligand VCAM-1 [J]. *Cell Adhes Commun*, 1996, 4: 251-267.
- [24] Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, et al. The CS5 peptide is a second site in the IIIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 3579-3585.
- [25] Qin X, Wan Y, Li M, et al. Identification of a novel peptide ligand of human vascular endothelial growth factor receptor 3 for targeted tumour diagnosis and therapy [J]. *J Biochem*, 2007, 142: 79-85.
- [26] Xia F, Niu J, Hong Y, et al. Matrix metalloproteinase 2 targeted delivery of gold nanostars decorated with IR-780 iodide for dual-modal imaging and enhanced photothermal/photodynamic therapy [J]. *Acta Biomater*, 2019, 89: 289-299.
- [27] Wang X, Chen Q, Zhang X, et al. Matrix metalloproteinase 2/9-triggered-release micelles for inhaled drug delivery to treat lung cancer: preparation and *in vitro/in vivo* studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 4641-4659.
- [28] Jia W, Liu R, Wang Y, et al. Dual-responsive nanoparticles with transformable shape and reversible charge for amplified chemophotodynamic therapy of breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3354-3366.
- [29] Rao BD, Chakraborty H, Chaudhuri A, et al. Differential sensitivity of pH-LIP to ester and ether lipids [J]. *Chem Phys Lipids*, 2020, 226: 104849.
- [30] Kumar M, Tegge W, Wangoo N, et al. Insights into cell penetrating peptide conjugated gold nanoparticles for internalization into bacterial cells [J]. *Biophys Chem*, 2018, 237: 38-46.
- [31] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16: 510-520.
- [32] Pietersz GA, Li W, Apostolopoulos V. A 16-mer peptide (RQIKI-WFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the class I pathway [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 1397-1405.
- [33] Kang S, Jeon S, Kim S, et al. Development of a pVEC peptide-based ribonucleoprotein (RNP) delivery system for genome editing using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 22158.
- [34] Hoang B, Reilly RM, Allen C. Block copolymer micelles target auger electron radiotherapy to the nucleus of HER2-positive breast cancer cells [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 455-465.
- [35] Teratake Y, Kimura Y, Ishizaka Y. Role of karyopherin nuclear transport receptors in nuclear transport by nuclear trafficking peptide [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 409: 112893.
- [36] Hao W, Hu C, Huang Y, et al. Coadministration of kla peptide with HPRP-A1 to enhance anticancer activity [J]. *PLoS One*, 2019, 14: e0223738.
- [37] Supinski GS, Wang L, Schroder EA, et al. SS31, a mitochondrially targeted antioxidant, prevents sepsis-induced reductions in diaphragm strength and endurance [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128: 463-472.
- [38] Zhang F, Angelova A, Garamus VM, et al. Mitochondrial voltage-dependent anion channel 1-hexokinase-II complex-targeted strategy for melanoma inhibition using designed multiblock peptide amphiphiles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 35281-35293.
- [39] Aguzzi MS, Giampietri C, De Marchis F, et al. RGDS peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells [J]. *Blood*, 2004, 103: 4180-4187.
- [40] Song W, Kuang J, Li CX, et al. Enhanced immunotherapy based on photodynamic therapy for both primary and lung metastasis tumor eradication [J]. *ACS Nano*, 2018, 12: 1978-1989.
- [41] Farina C, van der Bruggen P, Boël P, et al. Conserved TCR usage by HLA-Cw* 1601-restricted T cell clones recognizing melanoma antigens [J]. *Int Immunol*, 1996, 8: 1463-1466.
- [42] Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, et al. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma [J]. *J Exp Med*, 1995, 182: 689-698.
- [43] Hu K, Kuan H, Hanyu M, et al. Developing native peptide-based radiotracers for PD-L1 PET imaging and improving imaging contrast by pegylation [J]. *Chem Commun*, 2019, 55: 4162-4165.
- [44] Pham TC, Jayasinghe MK, Pham TT, et al. Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10: e12057.
- [45] Li SY, Cheng H, Xie BR, et al. A ratiometric theranostic probe for tumor targeting therapy and self-therapeutic monitoring [J]. *Biomaterials*, 2016, 104: 297-309.
- [46] Zhao HL, Liang J, Wu WL, et al. The mechanism of action of acid-sensitive peptides in drug delivery and their applications [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 440-447.
- [47] Qiu WX, Liu LH, Li SY, et al. ACPI conjugated gold nanorods

- as nanoplatform for dual image guided activatable photodynamic and photothermal combined therapy *in vivo* [J]. *Small*, 2017, 13: 18.
- [48] Myrberg H, Zhang L, Mäe M, et al. Design of a tumor-homing cell-penetrating peptide [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 70-75.
- [49] Eriste E, Kurrikoff K, Suhorutšenko J, et al. Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2 [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 305-313.
- [50] Zhang MM, Yang YT, Yu QW, et al. Preliminary study on the immune mechanism of pH-sensitive transmembrane peptide-modified α -galactosylceramide-loaded liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 634-640.
- [51] Wang H, Fang B, Peng B, et al. Recent advances in chemical biology of mitochondria targeting [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 683220.
- [52] Sun J, Jiang L, Lin Y, et al. Enhanced anticancer efficacy of paclitaxel through multistage tumor-targeting liposomes modified with RGD and KLA peptides [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 1517-1537.
- [53] Boël P, Wildmann C, Sensi ML, et al. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes [J]. *Immunity*, 1995, 2: 167-175.
- [54] Alas M, Saghaeidehkordi A, Kaur K. Peptide-drug conjugates with different linkers for cancer therapy [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 216-232.
- [55] Yu M, Li X, Huang X, et al. New cell-penetrating peptide (KRP) with multiple physicochemical properties endows doxorubicin with tumor targeting and improves its therapeutic index [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 2448-2458.
- [56] Arkenberg MR, Moore DM, Lin CC. Dynamic control of hydrogel crosslinking *via* sortase-mediated reversible transpeptidation [J]. *Acta Biomater*, 2019, 83: 83-95.
- [57] Herceg V, Bouilloux J, Janikowska K, et al. Cathepsin B-cleavable cyclopeptidic chemotherapeutic prodrugs [J]. *Molecules*, 2020, 25: 4285.
- [58] Qian C, Wang J, Qian Y, et al. Tumor-cell-surface adherable peptide-drug conjugate prodrug nanoparticles inhibit tumor metastasis and augment treatment efficacy [J]. *Nano Lett*, 2020, 20: 4153-4161.
- [59] Brunato S, Mastrotto F, Bellato F, et al. PEG-polyaminoacid based micelles for controlled release of doxorubicin: rational design, safety and efficacy study [J]. *J Control Release*, 2021, 335: 21-37.
- [60] Rashidzadeh H, Rezaei SJT, Zamani S, et al. pH-sensitive curcumin conjugated micelles for tumor triggered drug delivery [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2021, 32: 320-336.
- [61] Ding Y, Sun D, Wang GL, et al. An efficient PEGylated liposomal nanocarrier containing cell-penetrating peptide and pH-sensitive hydrazone bond for enhancing tumor-targeted drug delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 6199-6214.
- [62] Dal Corso A, Pignataro L, Belvisi L, et al. $\alpha\beta 3$ integrin-targeted peptide/peptidomimetic-drug conjugates: in-depth analysis of the linker technology [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 314-329.
- [63] Shim MK, Moon Y, Yang S, et al. Cancer-specific drug-drug nanoparticles of pro-apoptotic and cathepsin B-cleavable peptide-conjugated doxorubicin for drug-resistant cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 261: 120347.
- [64] Duan Z, Chen C, Qin J, et al. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24: 752-764.
- [65] Saghaeidehkordi A, Chen S, Yang S, et al. Evaluation of a keratin 1 targeting peptide-doxorubicin conjugate in a mouse model of triple-negative breast cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 661.
- [66] Bandola-Simon J, Roche PA. Dysfunction of antigen processing and presentation by dendritic cells in cancer [J]. *Mol Immunol*, 2019, 113: 31-37.
- [67] Yuzuriha K, Yoshida A, Li S, et al. Synthesis of peptide conjugates with vitamins for induction of antigen-specific immunotolerance [J]. *J Pept Sci*, 2020, 26: e3275.
- [68] Li C, Zhang N, Zhou J, et al. Peptide blocking of PD-1/PD-L1 interaction for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6: 178-188.
- [69] Meng X, Wang J, Zhou J, et al. Tumor cell membrane-based peptide delivery system targeting the tumor microenvironment for cancer immunotherapy and diagnosis [J]. *Acta Biomater*, 2021, 127: 266-275.
- [70] Li SY, Cheng H, Qiu WX, et al. Protease-activable cell-penetrating peptide-protoporphyrin conjugate for targeted photodynamic therapy *in vivo* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 28319-28329.
- [71] Cheng H, Zheng RR, Fan GL, et al. Mitochondria and plasma membrane dual-targeted chimeric peptide for single-agent synergistic photodynamic therapy [J]. *Biomaterials*, 2019, 188: 1-11.
- [72] Xu Y, Zhang X, Hu G, et al. Multistage targeted "photoactive neutrophil" for enhancing synergistic photo-chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121224.
- [73] Wang Y, Hu W, Ding B, et al. cRGD mediated redox and pH dual responsive poly(amidoamine) dendrimer-poly(ethylene glycol) conjugates for efficiently intracellular antitumor drug delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 194: 111195.
- [74] Fan Y, Cui Y, Hao W, et al. Carrier-free highly drug-loaded biomimetic nanosuspensions encapsulated by cancer cell membrane based on homology and active targeting for the treatment of glioma [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6: 4402-4414.
- [75] Schjesvold F, Robak P, Pour L, et al. OCEAN: a randomized phase III study of melflufen + dexamethasone to treat relapsed refractory multiple myeloma [J]. *Future Oncol*, 2020, 16: 631-641.