

**MODULOWANIE WŁAŚCIWOŚCI PEPTYDÓW  
PENETRUJĄCYCH DO KOMÓREK**

**MODULATING PROPERTIES OF THE CELL  
PENETRATING PEPTIDES**

**Wojciech Lipiński\*, Beata Kolesińska**

*Instytut Chemii Organicznej, Politechniki Łódzkiej  
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź  
\*e-mail: wojtek.p.lipinski@gmail.com*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Peptydy penetrujące błony komórkowe
    - 1.1. Definicja peptydów penetrujących błony komórkowe
    - 1.2. Klasyfikacja CPPs
    - 1.3. Modulowanie właściwości CPPs
  2. Mechanizm przenikania CPPs przez błony komórkowe
    - 2.1. Endocytoza
    - 2.2. Transport bezpośredni
  3. Zastosowanie CPPs jako transporterów związków chemicznych do komórek
    - 3.1. Aktywowanie CPPs – wzrost selektywności przenikania do komórek
  4. Zastosowanie CPPs w terapii i diagnostyce
- Podsumowanie  
Podziękowanie  
Piśmiennictwo cytowane
-



**inż. Wojciech Lipiński** studiuje Chemię na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Badania do pracy magisterskiej prowadzi w zespole dr hab. inż. Beaty Kolesińskiej. Zainteresowania naukowe to aktywne biologicznie peptydy i materiały peptydowe.



**dr hab. inż. Beata Kolesińska**, prof. PŁ jest pracownikiem Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy peptydów o zróżnicowanej aktywności biologicznej i ich szerokim wykorzystaniu, poczynając od leków o budowie peptydowej, materiałów peptydowych tworzonych w procesie samoorganizacji peptydów, badań nad agregacją peptydów/białek i poszukiwaniu inhibitorów tego procesu, a skończywszy na oddziaływaniach peptydów z białkami (przeciwciałami). Autor 74 prac naukowych oraz 28 patentów i zgłoszeń patentowych.

### ABSTRACT

Cell penetrating peptides (CPPs) are short peptides able to efficiently cross cellular membrane. The group includes great diversity of sequences and besides capability to enter various types of cells, their characteristic feature is lack of toxicity. CPPs can be divided according to their origin (natural and synthetic) or according to their physicochemical properties responsible for the cellpenetrating ability (cationic, amphipathic and hydrophobic).

Properties of CPPs are closely related to their mechanism of internalisation. Endocytic pathway is probably the dominating mechanism for majority of CPPs, but less common energyindependent internalisation (occurring via inverted micelle, carpet-like, barrel stave pore or toroidal pore model may also play a relevant part in the uptake across membranes.

CPPs have been applied in transporting various compounds. They are very effective in delivering small molecules (fluorophores, drugs, peptides), macromolecules (proteins, nucleic acids) and even nanoparticles (metal nanoparticles, liposomes). Conjunction of CPP and cargo can be achieved either covalently (peptide bond, sulphide bridge etc.) or noncovalently (electrostatic or hydrophobic interaction, hydrogen bonding).

Ability to unspecific enter almost any kind of cell and tissue becomes a great problem in the case of *in vivo* applications. Another disadvantage of CPPs is their low plasma stability. Many strategies have been suggested to overcome these issues. Selectivity can be improved by attaching targeting ligands (e.g. short peptides, antibodies, proteins, folic acid or hyaluronic acid) or by incorporating CPPs into macromolecular drug carriers, which exploit the so called enhanced permeability and retention (EPR) effect. The most recent and most sophisticated way of improving CPPs' stability and selectivity is the synthesis of activatable cell penetrating peptides (ACPPs). The deactivating moiety may consist of anionic sequence, polymer chain or smaller protecting groups. The deactivating parts are connected to the delivery system *via* linker that can be cleaved under conditions characteristic for the site of action. ACPPs may be activated by enzymes, pH and oxidative potential change, temperature or radiation.

CPPs may find application in tumour therapy, diagnostics and the combination of both – theranostics. Despite many successful studies in delivering drugs and tags *in vivo* and *in vitro*, CPPs have passed only few clinical trials (some are being run currently). It is sure that this research area will develop in next years.

**Keywords:** cell penetrating peptides (CPPs), activatable cell penetrating peptides (ACPPs), cargo, transport into the cells, mechanism of penetration

**Słowa kluczowe:** peptydy penetrujące do komórek, aktywowalne peptydy zdolne do przenikania przez błony komórkowe, cargo, transport różnych związków do komórki, mechanizm przenikania przez błony komórkowe

---

---

## WPROWADZENIE

W 1988 r. dwie niezależne grupy badawcze [1, 2] zaobserwowały, że białko tat wirusa HIV-1 zdolne jest do efektywnego przenikania przez błonę komórkową. Ponadto wykazano, że białko to wiąże się z DNA jądrowym i wpływa na jego ekspresję. Innym polipeptydem wykazującym zdolność przenikania przez błonę komórkową jest białko kodowane przez geny homeotyczne muszki owocowej (*Drosophila homeobox*), odpowiedzialne za morfogenezę [3]. Zdolność przenikania błon komórkowych przez polipeptydy była na tyle zaskakująca i intrygująca, że niemal natychmiast podjęto poszukiwania najkrótszych fragmentów wykazujących taką aktywność. Stwierdzono, że w przypadku białka wywodzącego się z homeodomeny Antennapedia jest to 16-aminokwasowy peptyd [4] o sekwencji RQIKIWFQNR-RMKWKK, znany obecnie jako penetratyna. Zidentyfikowano również 11-aminokwasowy peptyd wywodzący się z białka tat [5, 6] o sekwencji GRKKRRQRRRPQ, powszechnie nazywany peptydem TAT.

Odkrycia te dały impuls do dalszych badań nad peptydami zdolnymi do przenikania błon komórkowych oraz nad możliwościami ich szerokiego wykorzystania w praktyce. Obecnie w literaturze naukowej opisane są setki peptydów penetrujących komórki [7, 8], określanych akronimem CPPs, utworzonym z angielskiego terminu *cell penetrating peptides*. Zainteresowanie CPPs wynika z przekonania o ich zdolności do transportu przez błony komórkowe różnego rodzaju związków.

## 1. PEPTYDY PENETRUJĄCE BŁONY KOMÓRKOWE

### 1.1. DEFINICJA PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH BŁONY KOMÓRKOWE

Peptydy penetrujące błony komórkowe są krótkimi peptydami zawierającymi zwykle do 40 reszt reszt aminokwasowych. Z punktu widzenia ich struktury pierwszorzędowej charakteryzują się znaczną różnorodnością. Ich jedyną cechą wspólną jest zdolność do penetrowania błon komórkowych i przenikania do wnętrza komórek. Do ogólnych właściwości CPPs zalicza się również ich niską toksyczność.

Wykazano, że charakteryzują się one zdolnością do przenikania do wnętrza niemalże wszystkich testownych pod tym kątem komórek zwierząt [9], roślin, drożdży i bakterii [10, 11]. Posiadają one ponadto zdolność transportu do wnętrza komórek szerokiej gamy związków o zróżnicowanych strukturach [7]. Wśród nielicznych przykładów wykazujących ograniczenia CPPs są komórki linii MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) [12] niepodatne na penetrację przez dotychczas znane CPPs, w tym przez znakowany fluorescencyjnie peptyd TAT. Opisano pojedyncze przypadki cząsteczek, których CPPs nie mogą transportować przez błonę komórkową (należą do nich np. fragment A toksyny błoniczej) [13].

## 1.2. KLASYFIKACJA CPPs

Proponowane są różne kryteria klasyfikacji CPPs. Jeden z funkcjonujących podziałów oparty jest na pochodzeniu peptydów. Pierwszą grupę CPPs stanowią peptydy pochodzenia naturalnego. Do grupy tej należą: peptyd TAT, penetratyna, peptyd pVEC o sekwencji LLILRRRIRKQAHAAHSK (fragment kadheryny mysiego nabłonka, VE-cadherin) [14] oraz peptyd (HGLASTLTRWAHYNALIRAFGGG) wywodzący się z białka gH625, glikoproteiny H wirusa opryszczki [15]. Kolejnych peptydów o zdolności do penetrowania błony poszukuje się w obrębie białek wiążących się z heparyną, białek oddziaływujących z kwasami nukleinowymi, naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych wydzielanych przez komórki śródbłonka i fagocyty oraz białek wirusowych [16]. Drugą grupę CPPs stanowią peptydy syntetyczne, które projektowane są w oparciu o motywy strukturalne naturalnych CPPs. Nowe CPPs odkrywane są często na drodze przeszukiwania bibliotek peptydowych, korzystając z metody ekspozycji fagowej lub ekspozycji RNA.

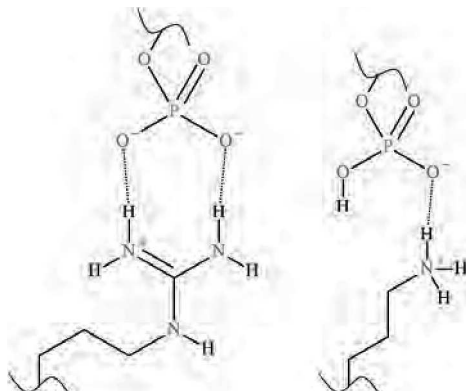
Podział peptydów penetrujących komórki można także dokonać biorąc pod uwagę ich właściwości fizykochemiczne, determinujące zdolność do przenikania przez błonę lipidową. Stąd wyróżnia się CPPs: kationowe, amfifilowe i hydrofobowe.

### Kationowe CPPs

Większość opisanych CPPs posiada wypadkowy ładunek dodatni, jednak do grupy kationowych peptydów penetrujących komórki zalicza się jedynie te, które zawierają dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, warunkujące zdolność do przenikania przez błonę. W oparciu o tę definicję naturalne CPPs, takie jak peptyd TAT i penetratyna, zaliczyć można do grupy kationowych peptydów penetrujących komórki.

Obecność zasadowych reszt aminokwasowych w sekwencji CPPs zwiększa zdolność ich przenikania przez błonę komórkową dzięki silnemu oddziaływananiu z ujemnie naładowanymi lipidami i polisacharydami błon komórkowych. Dowodem na kluczową rolę zasadowych reszt aminokwasowych w strukturach kationowych CPPs był wynik eksperymentu, w którym kolejne reszty peptydu TAT [17] oraz penetratyny [18] zamieniane były na reszty alaniny.

Wykazano, że CPPs zawierające reszty argininy penetrują błony komórkowe znacznie efektywniej niż analogi zawierające reszty pozostałych aminokwasów zasadowych: lizyny, ornityny czy histydyny [19]. Efekt ten przypisuje się silnym wiązaniom wodorowym pomiędzy grupą guanidynową a resztami fosforanowymi [20] oraz anionowymi grupami polisacharydów membranowych [21].



Rysunek 1. Wiązania wodorowe pomiędzy grupą guanidynową reszty argininy lub grupą aminową reszty lizyny a grupą fosforanową: Silne oddziaływanie argininy z błoną lipidową wynika z tworzenia dwóch wiązań wodorowych pomiędzy grupą guanidynową a resztami kwasowymi na powierzchni błony komórkowej. Grupa aminowa lizyny utworzyć może tylko jedno wiązanie wodorowe

Figure 1. Hydrogen bonds between guanidinium group of arginine residue or amine function of lysine and phosphate group: Strong interaction between arginine and lipid membrane stems from the formation of two hydrogen bonds between guanidinium group and acid residues on the membrane surface. Amine group of lysine can form only one H-bond

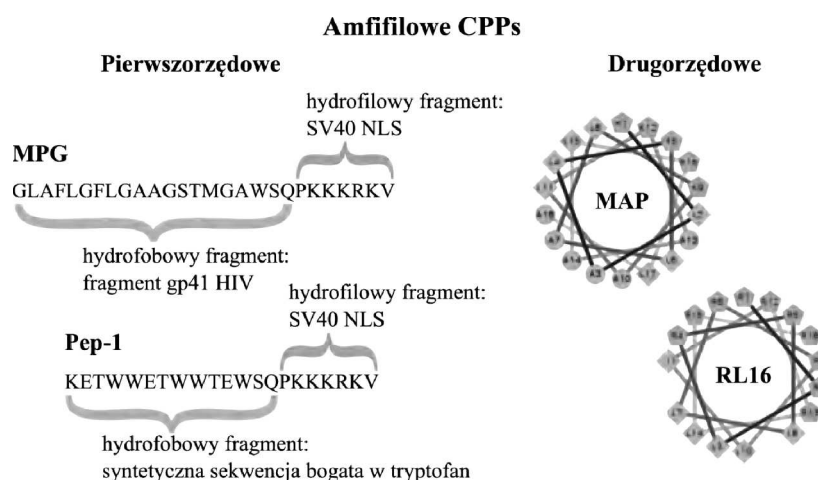
Obecność takich oddziaływań potwierdziły również wyniki izotermicznej kalorymetrii miareczkowej [22, 23]. Po dostrzeżeniu szczególnej roli reszt argininy w transporcie przez błonę otrzymano CPPs składające się wyłącznie z tego aminokwasu. Poliargininy zawierające co najmniej sześć reszt aminokwasowych charakteryzowały się efektywnym przenikaniem przez błonę komórkową. Uznaje się, że optymalna liczba reszt aminokwasowych w łańcuchu CPP wynosi 8–9 [24, 25]. Jednakże nawet peptyd złożony z jedenastu reszt argininy [26] przewyższa zdolnością do przenikania zarówno penetratynę jak i peptyd TAT.

Użyteczność CPPs nie jest oczywiście w prosty sposób zależna od liczby reszt argininy w łańcuchu peptydowym. Porównanie modyfikowanych arginina polimerowych nanocząstek wykazało, że cząstki modyfikowane ośmioma resztami (R<sub>8</sub>) wnikały co prawda do komórek efektywniej od nanomateriału modyfikowanego tylko czterema resztami argininy, jednak stwierdzono, że w obu przypadkach ich transport zachodzi według odmiennych mechanizmów [27].

Uważa się, że w szczególnych przypadkach aktywność penetrująca kationowych CPPs może wynikać z ich możliwości do przyjmowania struktury helikalnej. Przykładem może być „miniaturowe białko 5.3” o sekwencji GPSQPTYPGDDAPVR-DLIRFYRDLRRYLNVVTRHRY, którego pięć reszt argininy zlokalizowanych jest po jednej stronie helisy („penta-arg”). Wykazał on lepsze właściwości penetrujące od TAT oraz R8, co związane jest z jego zdolnością do szybkiego opuszczania endosomów [28]. Formułowane są również obawy przed nazbyt szerokim wykorzystaniem polikationowych CPPs, wynikające z braku dostatecznej znajomości mechanizmów wiązania ich z DNA [29] i ewentualnych następczych zmian w regulacji i ekspresji genów.

## AMFIFILOWE CPPs

Amfifilowe CPPs podzielone zostały na pierwszorzędowe i drugorzędowe. Amfifilowość pierwszorzędowych CPPs wynika bezpośrednio z sekwencji aminokwasowej peptydu, gdzie obecne są dwa jednoznacznie zdefiniowane fragmenty: jeden składający się z reszt aminokwasów hydrofobowych i drugi zawierający reszty o charakterze hydrofilowym. W drugorzędowych amfifilowych CPPs sekwencja nie zawiera wyraźnych regionów hydrofobowych i hydrofilowych, a ich właściwości amfifilowe są skutkiem przyjmowania odpowiedniej konformacji przez łańcuch peptydowy [16].



Rysunek 2. Amfifilowe CPPs dzielą się na pierwszorzędowe (przykłady z zaznaczonymi fragmentami hydrofilowymi i hydrofobowymi) oraz drugorzędowe (przedstawione projekcje  $\alpha$ -helis przykładowych drugorzędowych amfifilowych CPPs)

Figure 2. Amphipathic CPPs can be divided into primary (examples with indicated hydrophobic and hydrophilic fragments) and secondary (projections of  $\alpha$ -helices of secondary amphipathic CPPs)

Wiele pierwszorzędowych amfifilowych CPPs zsyntetyzowano łącząc, wywodzące się z różnych białek, domeny hydrofobowe z peptydem lokalizującym jądro komórkowe (ang. *nuclear localization sequence*, NLS). NLSs to krótkie hydrofilowe peptydy, rozpoznawane przez białka porów jądrowych. NLSs zawierają wiele reszt aminokwasów zasadowych, jednak same nie są zdolne do przenikania przez błonę komórkową. Przykładem wykorzystania NLS jest koniugat o sekwencji GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV, złożony z fragmentu NLS (wywodzącego się z antygeny T wirusa SV40) oraz hydrofobowej domeny glikoproteiny wirusa HIV-1. Wykorzystany został jako układ transportujący do komórek niekwalencyjnie związane z peptydem geny (*peptide-based gene delivery system*) [30]. Grupę CPPs wykazujących zdolność transportowania do komórek różnego rodzaju związków (cargo) bez konieczności kowalencyjnego łączenia CPPs określono symbolem Pep [31]. Najlepiej poznanym przykładem Pep był Pep-1 [32] o sekwencji KETWWETWW-

TEWSQPKKKRKV. Jest to koniugat bogatego w reszty tryptofanu hydrofobowego peptydu z NLS z antygeny T wirusa SV40.

Drugorzędowe amfifilowe CPPs posiadają zdolność przyjmowania konformacji amfifilowej  $\alpha$ -helisy lub  $\beta$ -kartki. W konformacjach tych reszty hydrofilowe i hydrofobowe ułożone są po przeciwnych stronach uporządkowanej struktury. Wiele peptydów penetrujących błonę komórkową posiada właściwości amfifilowe i wiele z nich tworzy struktury helikalne, ale do grupy amfifilowych CPPs zalicza się tylko te, których zdolność do penetrowania błony nie zależy od wypadkowego ładunku po stronie hydrofilowej.

Do porównania udziału oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych w przenikaniu przez błonę komórkową CPPs wykorzystano dwie niezależne metody. Jedną z nich polegało na uzyskaniu pochodnych amfifilowego CPP (ang. *model amphipatic peptide*, MAP) o wypadkowym ładunku obojętnym oraz o ładunku ujemnym. Stwierdzono, że oba peptydy posiadały zdolność do przenikania do komórek [33]. W drugiej metodzie, porównano oddziaływanie penetratyny (RQIKIWFQNRRMKWKK) i peptydu RL16 (RRLRLLRLLRRLRR) z wielowarstwowymi liposomami zbudowanymi z anionowych i amfoterycznych lipidów [34]. Stwierdzono, że penetratyna przybiera konformację  $\alpha$ -helisy jedynie w trakcie oddziaływania z anionowymi lipidami, co ułatwia jej przenikanie przez błonę, nie oddziałuje zaś z amfoterycznymi lipidami, co potwierdza duże znaczenie oddziaływań elektrostatycznych. Natomiast peptyd RL16 przyjmuje konformację amfifilowej  $\alpha$ -helisy w roztworze buforu i oddziałuje zarówno z anionowymi jak i obojętnymi lipidami. Obecność wielu reszt argininy skutkuje silnymi oddziaływaniami pomiędzy RL16 a anionowymi lipidami, co paradoksalnie może sprzyjać wiązaniu peptydu do powierzchni liposomu i ograniczać jego przenikanie. Podobne badania wykonano również dla większej grupy peptydów i wykazano, że wiele z nich może przyjmować uporządkowane struktury w obecności anionowych lipidów, co umożliwia im przenikanie przez błonę [35].

Amfifilowych CPPs o konformacji  $\beta$ -harmonijki opisanych zostało znacznie mniej w porównaniu do CPPs o strukturze  $\alpha$ -helikalnej. Ograniczenie ich zastosowania wynika z podatności do agregacji i obniżonej rozpuszczalności. Przykładem rozpuszczalnego CPP o strukturze  $\beta$ -harmonijki jest peptyd VT5 o sekwencji aminokwasowej DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD [36, 37]. Gdy peptyd poddano modyfikacji poprzez wprowadzenie reszt D-aminokwasów w pozycje 13 i 14 (D-Val<sup>13</sup>, D-Thr<sup>14</sup>), okazało się, że utracił on zdolność tworzenia struktury  $\beta$ -harmonijki i niemalże całkowicie zdolność przenikania przez błonę komórkową [36]. Innym przykładem CPP o strukturze  $\beta$ -harmonijki jest fragment ludzkiej aneksyny, znany jako peptyd AA3H o strukturze MASIWVGHRG. Wykazano w badaniach *in vitro*, że peptyd ten charakteryzuje się wyższą zdolnością penetracji błon komórkowych od peptydu TAT [38].

W literaturze chemicznej opisana jest również trzecia grupa amfifilowych CPPs, czyli peptydy bogate w prolinę [39]. Ich szczególną właściwością jest zdol-



ność do tworzenia poliprolinowych helis, głównie typu PPII (lewoskrętna helisa pozbawiona wiązań wodorowych) [16]. Jednym z CPPs bogatych w reszty proliny jest peptyd Bac<sub>1-24</sub> o sekwencji RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG, wyodrębniony z białka przeciwdrobnoustrojowego Bac 7 [40]. Znane są również peptydy syntetyczne o sekwencjach (PRR)<sub>n</sub> i (PPR)<sub>n</sub> (n = 3–6), z których najdłuższe wykazały silniejszą zdolność do przenikania przez błonę komórkową od poliargininy [41]. Do grupy tej zaliczany jest również peptyd SAP [42] o sekwencji (VRLPPP)<sub>3</sub>, który stanowi modyfikację motywu strukturalnego  $\gamma$ -zeiny (białka kukurydzy bogatego w prolinę) [43]. Modyfikacja polega na zastąpieniu reszt histydyny resztami argininy. Pochodna SAP, w której reszty argininy zastąpiono resztami kwasu glutaminowego, również przenika przez błony komórkowe [42]. Potwierdza to, że zdolność do penetrowania wynika w głównej mierze z drugorzędowej struktury, a nie z obecności dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych.

#### HYDROFOBOWE CPPs

Grupa hydrofobowych CPPs jest zdecydowanie mniej liczna od grupy peptydów kationowych oraz amfifilowych. Należą do niej peptydy o właściwościach penetrujących, zawierające apolarne reszty aminokwasowe lub hydrofobowy fragment niepeptydowy odpowiedzialny za zdolność do transportu przez błonę. Przewaga reszt hydrofobowych i ładunek wypadkowy bliski zeru sprzyjają transportowi bezpośredniemu [44]. Naturalnym hydrofobowym CPP jest peptyd FGF12<sub>140-149</sub> o sekwencji PIEVCMYREP, będący fragmentem czynnika wzrostu 12 fibroblastów [45]. Kolejnym przykładem może być peptyd C105Y o sekwencji CSIPPEVKFNKPFVYLI, wywodzący się z  $\alpha_1$ -antytrypsyny [46].

Do hydrofobowych CPPs zaliczyć można również peptyd Xentry o strukturze LCLRPG wyizolowany z białka X wirusa zapalenia wątroby typu B, choć sami autorzy opisują peptyd jako nieprzystający do żadnej z wymienionych powyżej grup CPPs [47]. Fakt ten dokumentuje, jak bardzo klasyfikacja CPP jest umowna. Xentry wyróżnia zdolność do przenikania jedynie do komórek produkujących syndekan, obecny w wielu komórkach (w szczególności w komórkach nabłonka) [47].

Zaproponowano również kilka sposobów poprawiania właściwości penetrujących a tym samym również transportujących CPPs przez dołączenie hydrofobowych fragmentów niepeptydowych. Jednym z nich jest prenylowanie peptydów, czyli przyłączenie jednostek izoprenoidowych (15-węglowego farnezyli lub 20-węglowego geranylgeranyli). Prenylowanie peptydów ułatwia ich przenikanie przez błonę na drodze transportu pasywnego, niewymagającego dostarczenia energii [48]. Inny sposób włączenia hydrofobowego fragmentu polega na dobudowaniu reszty kwasu tłuszczowego do N-końca peptydu [49]. Modyfikowane w ten sposób peptydy nazywa się pepducynami (*pepducins*). Obecność długiego łańcucha alifatycznego skutkuje często gromadzeniem się peptydu na powierzchni błony komórkowej i tylko w niektórych przypadkach wspomaga przenikanie przez błonę. Przykładowo,

modyfikowany łańcuchem lipidowym transportan 10 przenika z większą wydajnością, ale lipidowana pochodna R9 lub penetratyny nie wykazuje lepszej zdolności przenikania przez błony komórkowej w porównaniu do peptydu niemodyfikowanego [49].

Poza zastosowaniem opisanych modyfikacji, zdolność wybranych peptydów do przenikania przez błony komórkowe może być zwiększona przez usztywnienie struktury  $\alpha$ -helisy mostkami węglowodorowymi (*stapled peptides*) [50, 51]. Należy podkreślić, że usztywnianie peptydów poprzez tworzenie mostków nie zawsze poprawia ich zdolność przenikania przez błony komórkowe. Do chwili obecnej mechanizm oddziaływania i penetrowania błon komórkowych przez usztywnione analogii CPPs nie jest dokładnie poznany [52].

### 1.3. MODULOWANIE WŁAŚCIWOŚCI CPPs

Poza wspomnianymi już aminokwasami zasadowymi niektóre aminokwasy włączone w sekwencje CPPs poprawiają ich zdolność penetracji. Na właściwości CPPs korzystnie wpływać może obecność histydyny, chociaż nie wykazuje ona tak silnych oddziaływań z błoną lipidową jak arginina czy lizyna. Wartość  $pK_{aH}$  histydyny ( $pK_{aH} \approx 6$ ) jest nieznacznie niższa od fizjologicznego pH (ok. 7,4). Reszty histydyny ulegają protonowaniu wewnątrz endosomów, gdzie pH wynosi około 5–6,5. Gromadzenie się ładunku wewnątrz endosomu destabilizuje membranę lipidową i ułatwia „ucieczkę” jego zawartości do cytoplazmy. Modyfikowany peptyd TAT z dołączonymi resztami histydyny sprawniej przedostaje się do cytoplazmy niż peptyd niemodyfikowany [53]. Podobnie modyfikowana pochodna nonaargininy (HR9 o sekwencji CHHHHHRRRRRRRRHHHHHC) również wykazuje lepsze właściwości transportujące niż R9 [54]. Modyfikacjom resztami histydyny poddano także rodzinę PepFect, drugorzędowych amfifilowych CPPs [55]. W tym wypadku protonowanie reszt histydyny powodowało destabilizację struktury  $\alpha$ -helisy, skutkującą łatwiejszą ucieczką z endosomu.

Szczególną rolę w transporcie przez błonę lipidową odgrywa także tryptofan. Spośród wszystkich reszt hydrofobowych w penetratynie jedynie wymiana tryptofanu skutkuje ograniczeniem zdolności do przenikania przez błonę komórkową [56]. Zaprojektowano i przebadano wiele syntetycznych CPPs celem wyjaśnienia, jaki jest wypadkowy efekt wywołany obecnością reszt argininy i tryptofanu. Przykładami mogą być (i) peptyd RW9 [57] o sekwencji RRWWRRWRR, (ii) cykliczny deka-peptyd z ułożonymi na przemian resztami tryptofanu i argininy [WR]5 o sekwencji c(RWRWRWRWRW) [58] oraz (iii) samoorganizujące się CPPs złożone z tryptofanu, lizyny i glutaminy [59]. Analog RW9 z resztami tryptofanu zamienionymi na reszty fenyloalaniny wiązał się z błoną komórkową, ale nie przenikał do wnętrza komórki [60]. Uważa się, że tryptofan zdolny jest do tworzenia wyjątkowo korzystnych oddziaływań ze składnikami błony komórkowej poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe. Założenie to oparte jest na obserwacji, że natu-

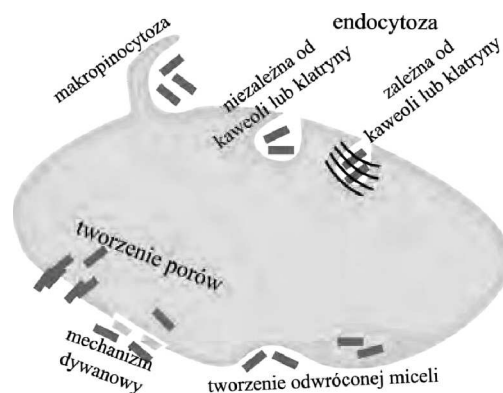
ralne białka transbłonowe zawierają znaczące ilości tego aminokwasu [61]. Ponadto sugeruje się, że obecność tryptofanu w sekwencji CPPs sprzyjać może przenikaniu na drodze endocytozy, dzięki promowaniu oddziaływań z glikozaminoglikanami [62].

Właściwości CPPs poprawić można także poprzez wbudowanie do łańcucha peptydowego reszty cysteiny. Jej rolą jest stabilizowanie peptydu przez tworzenie międzycząsteczkowych mostków disulfidowych. Na potwierdzenie tej tezy wskazuje się odporność na degradację enzymatyczną maurokalcyny zawierającej trzy mostki sulfidowe [63]. Obecność cysteiny umożliwia tworzenie struktur usieciowanych poprzez powolne utlenianie grup tiolowych. Stosując jako monomery polilizynę [64] i poliargininę [65] modyfikowane cysteiną zsyntetyzowano kationowe makrocząsteczki tworzące kompleksy z kwasami nukleinowymi. Utworzone kompleksy posiadały zdolność przenikania do wnętrza komórek i ulegały następczej redukcji z uwalnieniem DNA lub RNA. Cysteina okazała się także niezbędna do zachowania właściwości penetrujących wspomnianego już peptydu Xentry, jednak jej rola w procesie transportu tego peptydu nie została jeszcze wyjaśniona [66].

Modyfikacje, które nie występują w prostych naturalnych polipeptydach zbudowanych z kodowanych aminokwasów, także mogą wpływać korzystnie na właściwości CPPs. Do modyfikacji tych należą acylowanie resztami kwasów tłuszczowych, prenylowanie oraz cyklizacje, które zwiększają hydrofobowość układu. Wbudowanie ornityny do łańcucha peptydowego pozwala na uzyskanie aktywności zbliżonej do argininy [67], zaś obecność fosfotyrozyny i/lub fosfotreoniny zwiększa hydrofilowość peptydu [68]. Wbudowywanie niekodowanych reszt aminokwasowych o konfiguracji D- lub  $\beta$ -aminokwasów poprawia odporność CPPs na degradację enzymatyczną [69, 70].

## 2. MECHANIZM PRZENIKANIA CPPs PRZEZ BŁONY KOMÓRKOWE

Od momentu odkrycia CPPs podejmowane są próby wyjaśnienia mechanizmu przenikania peptydów przez błonę komórkową. Pierwsze badania nad penetratyną, TAT, poliargininą oraz transportanem wskazywały, że peptydy te przenikają przez błony komórkowe na drodze niewymagającej dostarczenia energii i bez udziału białek receptorowych i transporterowych [4, 6, 22, 71]. Jednakże późniejsze badania wykazały, że, poza wyjątkowymi przypadkami, transport przez błony komórkowe zachodzi głównie na drodze endocytozy [72]. Od tego czasu zaproponowano wiele różnych dróg przenikania CPPs do komórek i obecnie przyjmuje się, że nie istnieje uniwersalny mechanizm tłumaczący transport wszystkich rodzajów CPPs (Rys. 3).



Rysunek 3. Mechanizmy transportu CPPs przez błonę: CPPs mogą przenikać do wnętrza komórki na drodze endocytozy (makropinocytozy oraz pinocytozy zależnej lub niezależnej od receptorów) lub w wyniku transportu bezpośredniego (przez tworzenie porów lub odwróconej miceli).

Figure 3. Mechanisms of transmembrane transport of CPPs: CPPs may internalise into cells via endocytic pathway (macropinocytosis or receptor-dependent and receptor-independent pinocytosis) or through direct transport (via pore or inverted micelle formation).

Różne czynniki (budowa CPPs, wypadkowy ładunek CPPs, stężenie peptydu, temperatura oraz rodzaj komórek) decydują o mechanizmie przenikania CPPs przez błonę komórkową. Przenikanie zachodzi może na drodze endocytozy lub na drodze transportu bezpośredniego.

## 2.1. ENDOCYTOZA

Endocytoza polega na tworzeniu pęcherzyków (endosomów) przez fragment błony komórkowej, które następnie przemieszczają do wnętrza komórki. Jednym z rodzajów endocytozy jest fagocytoza, która zachodzi w wyspecjalizowanych komórkach (np. makrofagach) i pozwala przenosić do wnętrza komórek duże struktury (wirusy, inne komórki itd). Kolejnym typem endocytozy jest pinocytoza, którą do transportu różnorodnych związków chemicznych rozpuszczalnych w wodzie wykorzystuje większość komórek [73]. Komórki nieustannie wchłaniają fragment błony komórkowej i odnawiają równoważnik całej jej powierzchni nawet kilka razy w ciągu godziny [74], dlatego wszystkie związki wykazujące powinowactwo do błony komórkowej (np. kationowe peptydy) są łatwo zamykane wewnątrz pęcherzyka i transportowane do wnętrza komórki, proces taki nazywany jest pinocytozą adsorpcyjną. Czynniki wzrostu i inne związki sygnałowe indukują makropinocytozę, która pozwala na transport relatywnie dużych objętości roztworów. Jednakże zdecydowanie najwydajniej przebiega proces endocytozy indukowanej przez receptory [75]. Z receptorami ulokowanymi na powierzchni błon komórkowych związanych jest kilka rodzajów pinocytozy. Różnią się one sposobem formowania endosomów. W procesie tym pośredniczyć może klatryna (endocytoza klatrynozależna) jak rów-

niez bogate w lipidy domeny błonowe (endocytoza tratw lipidowych, do tego typu należy także endocytoza zależna od kaweoli) (Rys. 3). Endocytoza może również przebiegać z wykorzystaniem innych, nieznanych jeszcze mechanizmów. Zawsze jednak, by cargo mogło być transportowane do wnętrza komórki, musi istnieć mechanizm przenikania (ucieczki) z endosomu [76]. Związki, które nie są zdolne do szybkiej ucieczki z pęcherzyka nie są dobrymi transporterami, ponieważ zamknięty w endosomie materiał ulega trawieniu.

Obecnie uważa się, że endocytoza jest jedną z najważniejszych dróg przenikania CPPs do wnętrza komórek. Obserwacja ta dotyczy głównie CPPs obdarzonych ładunkiem [73, 77]. Poznano kilka białek odpowiedzialnych za indukowanie endocytozy pod wpływem CPPs bogatych w argininę. Są to między innymi syndekan-4 [78, 79] (proteoglikan) oraz laminina [80] (glikoproteina). Zidentyfikowano także geny warunkujące endocytotozę, a tym samym również transport poliargininy [81]. Wykazano ponadto, że oddziaływania kationowych CPPs z wchodzącymi w skład błony komórkowej glikozaminoglikanami (ang. *glycosaminoglycans*, GAGs) oraz proteoglikanami [11, 82] są istotnym czynnikiem warunkującym przenikanie do komórek. Oddziaływanie z glikozaminoglikanami jest zapewne pierwszym z etapów transportu TAT [83, 84], penetratyny [85, 86] i poliargininy [22]. Rolę GAGs potwierdziły eksperymenty z komórkami pozbawionymi membranowych proteoglikanów [87] oraz badania termodynamiczne [22, 88, 89]. Wyniki badań termodynamicznych dowodzą także, że oddziaływania różnych kationowych CPPs z glikozaminoglikanami są znacznie silniejsze w porównaniu do oddziaływań z lipidami [90]. Udział proteoglikanów w transporcie pęcherzykowym początkowo budził pewne kontrowersje, jednak obecnie istnieje wiele dowodów wskazujących na indukowanie endocytozy przez proteoglikany [91]. Wykazano również, że CPPs oddziałując z proteoglikanami indukują makropinocytotę [92]. Endocytoza bierze udział w transporcie nie tylko kationowych CPPs, ale również amfifilowych [93, 94] i hydrofobowych CPPs [47]. Wykorzystując inhibitory różnych ścieżek endocytozy wykazano, że kationowe CPPs przenikają do komórek głównie poprzez makropinocytotę, natomiast amfifilowe CPPs poprzez endocytozę klatrynozależną [95, 96], nie wykluczono jednak udziału innych dróg transportu.

## 2.2. TRANSPORT BEZPOŚREDNI

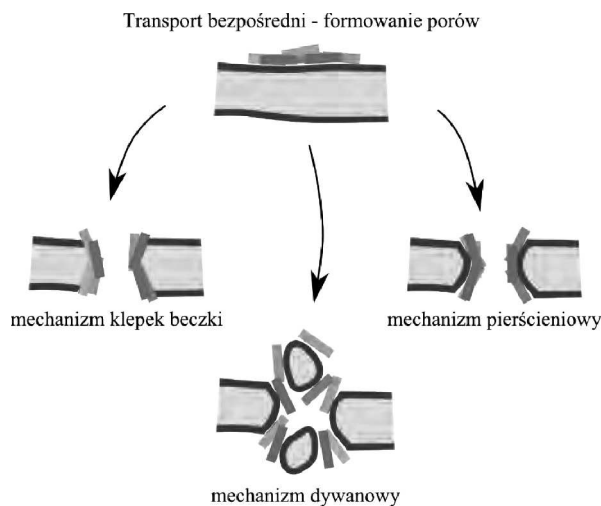
Transport bezpośredni może być oparty na mechanizmie odwróconych miceli lub przebiegać z tworzeniem porów w membranie [73]. Odwrócona micela [97] powstaje, gdy w wyniku gromadzenia się CPPs przy błonie komórkowej fragment membrany ulega deformacji. Odwrócony pęcherzyk zamyka wewnątrz hydrofilowy peptyd, jednocześnie przenikając do hydrofobowej warstwy błony komórkowej (Rys. 4).



Rysunek 4. Mechanizm odwróconej miceli jako przykład transportu bezpośredniego do wnętrza komórki: W trakcie transportu zachodzącego zgodnie z mechanizmem odwróconej miceli wewnątrz membrany tworzy się pęcherzyk z hydrofilowymi głowami fosfolipidów skierowanymi do wewnątrz i hydrofobowymi łańcuchami skierowanymi na zewnątrz. Wewnątrz pęcherzyka znajduje się transportowane cargo

Figure 4. Mechanism of reverse micelle as an example of direct transport into the cell: During internalisation through inverted micelle formation, a vesicle is formed with hydrophilic groups of phospholipids facing its interior and hydrophobic groups directed outwards. The cargo stays inside the vesicle

Odwrócona micela przemieszcza się w kierunku wewnętrznej powierzchni błony i finalnie uwalnia zamknięte cargo. Formowanie porów w błonie komórkowej może zachodzić na drodze trzech mechanizmów (Rys. 5): pierścieniowego [98] (*toroidal pore*), wówczas łańcuchy peptydu układają się w poprzek membrany (wzdłuż porów), co powoduje jej zawinięcie hydrofilową stroną do wnętrza poru; klepek beczki [99] (*barrel stave pore*), łańcuchy peptydu układają się w poprzek membrany (peptyd ma kontakt z hydrofobową warstwą błony komórkowej) oraz dywanowego [100] (*carpet*), gdy znaczne nagromadzenie CPPs przy powierzchni błony powoduje jej całkowitą destabilizację.



Rysunek 5. Tworzenie porów w błonie komórkowej jako przykład transportu bezpośredniego do wnętrza komórki: Przenikanie do wnętrza komórki poprzez tworzenie porów może zachodzić na drodze trzech różnych mechanizmów: klepek beczki, pierścieniowego i dywanowego

Figure 5. Formation of pores in the cell membrane as an example of direct transport into cell: Internalisation via pore formation may occur via one of three pathways: barrel stave, toroidal or carpet-like

Choć dostępnych jest wiele dowodów na niezależne od endocytozy przenikanie CPPs, w literaturze brakuje potwierdzenia dominacji konkretnego mechanizmu transportu bezpośredniego. Możliwość tworzenia odwróconych miceli przez penetratynę wykazały eksperymenty NMR [101], jednak kationowe CPPs bez elementów hydrofobowych prawdopodobnie nie mogą wykorzystywać tej drogi do przenikania. Jednocześnie mechanizmy przebiegające z tworzeniem porów i destabilizacją błony nie korelują z niską toksycznością większości CPPs [73]. Dla kationowych CPPs przyjmuje się, (jeśli przenikają błonę komórkową na drodze innej od endocytozy), że proces ten przebiega według mechanizmu bliskiego odwróconej miceli, nazywanym adaptacyjną translokacją (*adaptive translocation*) [102–104], przy czym nie jest to jedyna możliwa ścieżka transportu.

Przenikanie na drodze transportu bezpośredniego potwierdzono dla wielu peptydów penetrujących komórki w warunkach wykluczających przebieg endocytozy, a także z wykorzystaniem liposomów. Obserwowano bowiem przenikanie do komórek poliarginin zarówno w obecności inhibitorów endocytozy [105, 106] oraz w temperaturze 4°C [107, 108]. Oprócz tego, heksaarginina i TAT przenikały do wnętrza jednowarstwowych liposomów o różnych rozmiarach [109–111]. Nie powodowały przy tym wycieku zawartego w nich barwnika, natomiast peptyd R<sub>6</sub>W przenikał do liposomów, powodując powolną ucieczkę ich zawartości, co sugerować może mechanizm oparty na tworzeniu porów. Eksperyment na modelowych układach wielofazowych wykazał zdolność dyfuzji poliargininowych CPPs przez warstwę hydrofobową [112].

W przypadku amfifilowych i hydrofobowych CPPs bezpośrednie przenikanie może zachodzić w większym stopniu niż w przypadku peptydów kationowych [42, 113], choć nie wszystkie badania to potwierdzają [114]. Zdolność do transportu na drodze niezależnej od endocytozy sugerowana jest dla peptydów: MAP [33] oraz dla Pep-1 [31]. Amfifilowe CPPs mogą przenikać do wnętrza liposomów [108]. Co ciekawe, bezpośredni transport amfifilowych peptydów zdaje się być zależny od obecności glikozaminoglikanów w błonie, w odróżnieniu od kationowych CPPs, w przypadku których obecność GAG nie wpływa na przenikanie do liposomów [115].

Mechanizm przenikania bezpośredniego jest wciąż przedmiotem licznych kontrowersji. Mimo że badania eksperymentalne dostarczają wielu dowodów przemawiających za zdolnością CPPs do transportu bezpośredniego, pojawiają się też prace wykluczające tę drogę przenikania, lub wykazujące jej minimalny udział [83, 116, 117]. Kontrowersyjne jest również bezpośrednie przenoszenie wyników badań z liposomami na procesy zachodzące w żywych komórkach i ogólnie zastosowanie modeli *in vitro* do opisu przenikania przez komórki *in vivo*. Najrozsądniej wydaje się przyjąć, że mechanizm przenikania CPPs jest zależny nie tylko od ich budowy, ale również od stężenia CPPs, przy czym postuluje się, że przy niskich stężeniach promowana jest endocytoza, natomiast przy wysokich transport bezpośredni [118]. Mechanizm zależy również od rozmiaru transportowanych cząsteczek, przy czym

większy rozmiar sprzyja endocytozie [119]. Wśród innych czynników wpływających na mechanizm przenikania wymienić można także rodzaj transportowanych cząsteczek [120], komórek do których zachodzi przenikanie [121] i inne.

### 3. ZASTOSOWANIE CPPs JAKO TRANSPORTERÓW ZWĄZKÓW CHEMICZNYCH DO KOMÓREK

Od momentu odkrycia CPPs zaproponowano dla nich wiele różnorodnych zastosowań, jednak główne ich wykorzystanie dotyczy transportu związków leczniczych i obrazujących. CPPs charakteryzują się wysoką skutecznością *in vitro* w dostarczaniu do komórek fluoroforów, małych cząsteczkowych leków, białek, peptydów, kwasów nukleinowych czy nanocząstek. Ponadto wykazano, że CPPs zdolne są do transportu substancji aktywnych w warunkach *in vivo*. Koniugat  $\beta$ -galaktozydazy z fragmentami białka tat<sub>1-72</sub> oraz tat<sub>37-72</sub> [122, 123] w badaniach na myszach wykazywał aktywność enzymatyczną we wszystkich tkankach organizmu, a najwyższą aktywność obserwowano w sercu, wątrobie, trzustce, płucach i mięśniach szkieletowych. Podobne zdolności do transportu *in vivo* potwierdzono dla wielu innych CPPs [124–127] (Tab. 1).

Tabela 1. Przykłady wykorzystania CPPs do transportu przez błonę komórkową różnych ładunków (cargo) w postaci prostych koniugatów i kompleksów [122–127]

Table 1. The table gathers examples of CPPs applications for transmembrane transport of various cargos as simple conjugates or complexes [122–127]

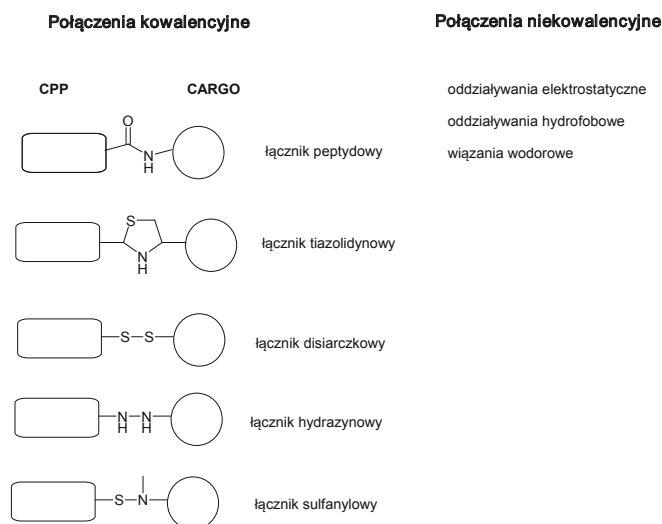
CPPs	Cargo	Typ połączenia CPP-cargo	Test	Rezultat
Transportan-penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat, penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
MPG	siRNA	kompleks - wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Transportan	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Penetratyna-NLS	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Transportan10	Plazmid	kompleks - wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym



CPPs	Cargo	Typ połączenia CPP-cargo	Test	Rezultat
Tat	Plazmid	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat-fag	Plazmid	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	$\beta$ -galaktozydaza	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	GFP	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki
Tat	insulina	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Transport transepitelialny
Tat, Tenetratyna Transportan MAP	Penta-peptyd	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki
R <sub>7</sub> , R <sub>7</sub> W	Tri-, tetra-peptyd	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki
R <sub>8</sub>	Anhydraza węglanowa	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
R <sub>6</sub> , R <sub>8</sub> , R <sub>10</sub>	insulina	ko-administracja	<i>in situ</i>	Transport transepitelialny i efekt biologiczny
R <sub>7</sub>	Cyklosporyna A	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1	Białko 27 <sup>k<sub>ip</sub>1</sup> Inhibitor cyklu komórkowego	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1	$\beta$ -galaktozydaza GFP	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1 YTA2 pVEC	$\beta$ -galaktozydaza streptawidyna	ko-administracja	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym

Istnieją dwa sposoby łączenia CPPs z transportowanym ładunkiem: trwałe koniugat połączony wiązaniami kowalencyjnymi oraz kompleks uzyskiwany na drodze oddziaływań niekowalencyjnych (Rys. 6). Z punktu widzenia trwałości korzystniejsze jest tworzenie kowalencyjnie połączonych koniugatów, jednak może to skutkować ograniczeniem lub utratą zdolności przenikania do komórek, a także wpływać na aktywność ładunku. Krótkie interferujące RNA (siRNA) transportowane jako kompleks (oddziaływania jonowe) z CPP zachowują swoją aktywność [128], podczas gdy próby transportu kowalencyjnie związanych kompleksów CPP-siRNA zakończyły się niepowodzeniem [129]. Również w przypadku transportu białek i peptydów nie ma prostej recepty pozwalającej określić w jakiej postaci ładunek powinien być transportowany za pomocą CPP do wnętrza komórek. W litera-

turze opisane są przykłady transportu przez błony komórkowe niekwalencyjnych kompleksów białek z CPPs [130, 131].



Rysunek 6. Przykłady koniugatów z CPP: CPP można łączyć z transportowaną substancją poprzez wiązanie kowalencyjne. Alternatywą jest tworzenie kompleksu niekowalencyjnego

Figure 6. Examples of conjugates with CPP: CPP may be connected with cargo via covalent linkage. Alternatively, noncovalent complex can be formed

Oprócz wspomnianych zalet, CPPs posiadają jedną zasadniczą wadę, a mianowicie brak selektywności dostarczania cargo do tkanek i komórek w organizmie żywym [7, 132] i wykazują jednakową zdolność wnikania do wszystkich rodzajów komórek eukariotycznych. Z punktu widzenia wykorzystania *in vivo* również niska odporność CPPs na degradację enzymatyczną stwarza problemy. Z tego względu podjęte zostały próby opracowania strategii pozwalających na wykorzystanie funkcji transporterowej CPPs z poprawioną selektywnością oraz stabilnością. Modyfikowane CPPs znalazły zastosowanie jako układy transporujące leki przeciwnowotworowe, stąd też celem badań było opracowanie strategii pozwalających na selektywne wprowadzanie ładunku do komórek nowotworowych [7, 8].

### 3.1. AKTYWOWANIE CPPs – WZROST SELEKTYWNOŚCI PRZENIKANIA DO KOMÓREK

#### Strategia wykorzystania ligandów naprowadzających

Przenikanie CPPs do wnętrza komórek wynika z oddziaływania kationowych CPPs z anionowymi fragmentami lipidów lub glikozaminoglikanów. Są to składniki błon komórkowych wszystkich typów komórek, zarówno zdrowych jak i nowotwo-

rowych. W szczególnych przypadkach możliwe jest jednak wykorzystanie zwiększonej ilości anionowych składników błon fizjologicznych w komórkach nowotworowych. Siarczan chondroityny produkowany jest przez komórki nowotworowe w większej ilości i efekt ten został wykorzystany do poprawy selektywności przenikania do komórek nowotworowych koniugatów CPPs z lekami przeciwnowotworowymi. Niewielką poprawę selektywności obserwowano dla kompleksów penetratyny [133] z terapeutykami. Dopiero wykorzystanie peptydu BR2 (RAGLQFPVGRLLRLLR) oparte na strukturze buforyny IIb jako CPP znacząco poprawiło selektywność oddziaływania z komórkami nowotworowymi [134].

W wielu przypadkach błony komórek nowotworowych charakteryzują się zwiększoną ilością (nadekspresja) wybranych białek receptorowych. Wykorzystując nadekspresję wybranych receptorów błonowych w komórkach nowotworowych możliwe jest więc zwiększenie selektywności działania poprzez tworzenie koniugatów zawierających lek-CPP-ligand. W układzie takim ligand pełni rolę związku naprowadzającego. Jako ligandy najczęściej wykorzystuje się kwas hialuronowy [135, 136], przeciwciała [137], kwas foliowy [138, 139] oraz aktywne biologicznie peptydy: transferynę [140] i bombezynę [141], RGD [142, 143] i NGR [144, 145].

#### **Makrocząsteczki oraz nanocząsteczki jako nośniki koniugatów CPP-cargo**

Jako nośniki wielu leków, w tym również przeciwnowotworowych, stosowane są związki wielkocząsteczkowe oraz nanocząstki. Takie podejście znalazło również zastosowanie w transporcie koniugatów CPPs z lekami. Wykorzystanie makrocząstek zapewnia ochronę przed degradacją zarówno CPP jak i transportowanego leku oraz umożliwia bardziej selektywne dotarcie nośnika do tkanki nowotworowej. Selektywność transportu do tkanki nowotworowej wynika z efektu wyższej przepuszczalności i retencji (ang. *enhanced permeability and retention*, EPR) [146, 147]. Makrocząsteczki w ograniczonym stopniu przenikają z krwiobiegu w zdrowych tkankach. Ze względu na nietypową fizjologię tkanki nowotworowej oraz fakt, że jej naczynia krwionośne są przepuszczalne zarówno dla związków niskocząsteczkowych jak i makrocząstek, ma miejsce zwiększone dostarczanie makromolekuł do tkanki nowotworowej. Efekt ten został wykorzystany do selektywnego kierowania terapeutyków, określanego terminem biernego naprowadzania [7]. Przyjmuje się, że granicą zapewniającą selektywność makrocząstek wobec tkanki nowotworowej jest ciężar cząsteczkowy 40 kDa [146]. Zjawisko EPR wykorzystywane jest również w przypadku nanocząstek, przy czym naczynia krwionośne w obrębie tkanki nowotworowej umożliwiają przenikanie zarówno pojedynczych cząstek nano jak i ich agregatów. Przykładem ilustrującym ten efekt jest zwiększona selektywność działania koniugatów TAT z deksorubicyną osadzonych na nanocząstkach złota [148].

Zazwyczaj platformy dostarczania leków oparte na makrocząsteczkach lub nanocząstkach dodatkowo zawierają elementy zwiększające jeszcze selektywność np. naprowadzające ligandy lub systemy aktywowania w miejscu działania. Bazą

dla nośników zawierających CPPs mogą być polimery [139], dendrymery [142] czy liposomy [140]. W literaturze opisane są przykłady wykorzystania peptydów zdolnych do agregacji, a powstające agregaty mogą stanowić platformy do przenoszenia leków [149].

CPPs osadzone są również na wirusach, które są niejako naturalnymi nośnikami substancji do wnętrza komórek. Peptyd TAT osadzony na adenowirusach nadawał im zdolność przenikania do komórek pozbawionych receptorów wirusów Coxsackie i adenowirusów (ang. *Coxsackievirus and adenovirus receptor*, CAR) [150–152].

### Taktyka aktywowania CPPs w miejscu ich działania

Przedstawione powyżej metody poprawiania selektywności działania CPPs i ich koniugatów z terapeutykami (wbudowywanie fragmentów naprowadzających, metoda EPR) czasami są niewystarczające do uzyskania wysokiej specyficzności przenikania do komórek nowotworowych [153]. W celu uzyskania oczekiwanej selektywności działania koniugatów CPPs z terapeutykami opracowano wiele strategii polegających na hamowaniu zdolności przenikania CPPs przez błony komórkowe aż do momentu osiągnięcia właściwego miejsca działania. Działania takie polegają na dobudowywaniu do CPPs układów osłaniających, co jest możliwe przez stosowanie pochodnych o znacznej zawadzie sterycznej lub układów ekranujących dodatni ładunek CPPs. Przykładowo wspomniany wcześniej peptyd Xentry jest dezaktywowany gdy do jego sekwencji dobudowany jest anionowy peptyd będący mimetykiem heparyny [66].

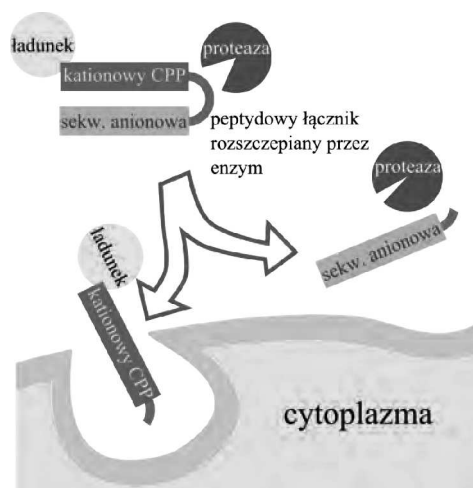
Elementy osłaniające usuwane są po dotarciu koniugatu CPP-terapeutyk do tkanki zmienionej chorobowo. Do usuwania osłon stosuje się bądź różnice w środowisku fizjologicznym komórek nowotworowych (np. odmienne pH) lub różnice w aktywności specyficznych enzymów. Ponadto wykorzystywane są do tego celu bodźce fizyczne takie jak: temperatura, ultradźwięki czy naświetlanie [7, 8]. Nośniki z zablokowaną aktywnością CPP nazywa się często aktywowalnymi peptydami penetrującymi komórki (ang. *activatable cell penetrating peptides*, ACPP). Używa się też nazwy aktywowane peptydy penetrujące komórki, choć pojęcie *aktywowalny* lepiej oddaje ich potencjał do bycia *aktywowanymi* w miejscu działania.

### Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane enzymatycznie

Środowisko nowotworu oraz tkanek z rozwiniętym stanem zapalnym charakteryzuje się wyższym poziomem wielu enzymów m.in. proteaz, esteraz i glikozydaz [154]. W przypadku nowotworów obserwuje się znacznie wyższy poziom metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMP), które umożliwiają szybką przebudowę macierzy pozakomórkowej. Na szczególną uwagę

w grupie metaloproteinaz zasługują MMP-2 oraz MMP-9, których podwyższony poziom obserwuje się w wielu rodzajach nowotworów [7, 154]. Skuteczność strategii wykorzystującej metaloproteinazy *in vivo* jest jednak ograniczona ze względu na obecność tych enzymów także w zdrowych tkankach, co oznacza możliwość aktywowania koniugatu CPP-terapeutyk również poza tkanką nowotworową. Obserwacja ta skłania do poszukiwań innych, specyficznych dla nowotworów enzymów [155].

Pierwszym zaproponowanym rozwiązaniem opartym na enzymatycznej aktywacji było dołączenie do CPP złożonego z dziewięciu reszt argininy (R9) innego peptydu zbudowanego z dziewięciu reszt kwasu glutaminowego. Pomiędzy peptydami wbudowany był łącznik PLG↓LAG, rozcinany w miejscu oznaczonym strzałką przez enzym MMP-2 [156].



Rysunek 7. Przykład aktywowalnego CPP: do kationowego CPP dołączony jest dezaktywujący fragment polianionowy, po rozcięciu łącznika pod działania proteazy, „wolny” CPP przenika przez błonę komórkową [w oparciu o 156]

Figure 7. Example of activatable CPP with deactivating polyanionic chain connected to the cationic CPP: after cleavage of the linker by protease, free CPP can transport the cargo [based on 156]

Testy *ex vivo* pozwalają przypuszczać, że nośnik aktywowany MMP-2 może być wykorzystany do obrazowania nowotworów. Podobne rozwiązania wykorzystano do transportu deksorubicyny połączonej z wyżej wymienionym peptydem [157] jak również do transportu środków kontrastujących do obrazowania MR i znaczników fluorescencyjnych [158].

Ciekawym rozwiązaniem jest modyfikacja łańcuchów bocznych aminokwasów grupami usuwanymi enzymatycznie. Modyfikacja jednej z reszt lizyny peptydu TAT aminokwasem lub dipeptydem okazała się wystarczająca do zahamowania jego przenikania przez błony komórkowe. Odszczepienie dodatkowo wprowadzonego fragmentu zachodzi pod działaniem aminopeptydazy N lub dipeptydylopepty-

dazy IV [159]. Przyłączenie tripeptydu AAN pozwoliło uzyskać CPP aktywowany endopeptydazą C13 [160].

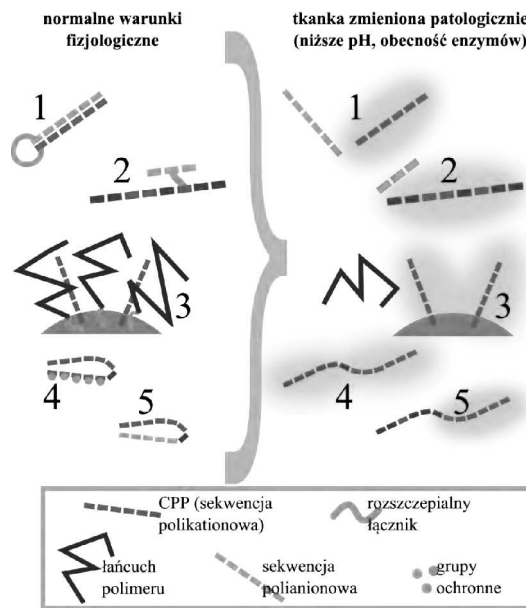
Alternatywne podejście polega na osłonięciu CPPs pochodnymi poli(glikolu etylenowego), które usuwane są pod wpływem działania enzymów. Przykładem takiego rozwiązania jest koniugat złożony z poliargininy, pochodnej PEG oraz nanocząstek tlenku żelaza [161], który został wykorzystany do bioobrazowania. Podobne rozwiązanie zastosowano w syntezie koniugatu złożonego z plazmidowego DNA (ładunku), peptydu PepFect14 (pełniącego rolę CPP), który połączony był z cząsteczkami PEG usuwanymi pod wpływem działania enzymów [162].

### **Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane zmianą pH lub zmianą potencjału utleniająco-redukującego**

Cechą odróżniającą tkankę nowotworową od zdrowej jest również pH. Średnie pH komórek nowotworowych wynosi 7,0, zaś tkanki zdrowej 7,5 [163]. Odczyn płynu międzykomórkowego w guzach nowotworowych zwykle jest kwasowy [164]. Do konstruowania aktywowanych niskim pH peptydów penetrujących wykorzystano łączniki trwałe w normalnych warunkach fizjologicznych, a ulegające rozszczepieniu w środowisku kwasowym.

Przykładem takiego rozwiązania są aktywowalne liposomy modyfikowane poliargininą poprzez rozszczepiany w środowisku kwaśnym łącznik hydrazonowy [165]. Inne rozwiązanie polega na wprowadzaniu kwasowolabilnych grup osłaniających do łańcuchów bocznych zasadowych aminokwasów. Boczne grupy aminowe lizyny w peptydzie  $CR_8G_3PK_6$  acylowano bezwodnikiem 2,3-dimetylomaleinowym. Utworzone wiązanie amidowe ulegało hydrolizie w obniżonym pH tkanki nowotworowej, uwalniając aktywny CPP [166]. Aktywacja peptydu penetrującego może następować także w wyniku odwracalnego procesu protonowania. Peptyd GALA o sekwencji WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA w środowisku kwasowym jest konformerem o  $\alpha$ -helikalnej strukturze, co gwarantuje jego zdolność do penetrowania błon komórkowych. Gdy łańcuchy boczne obecnych w peptydzie reszt kwasu glutaminowego są zdeprotonowane w zasadowym środowisku, struktura helikalna ulega destabilizacji i peptyd traci zdolność do przenikania przez błony komórkowe [167, 168].

Aktywne w niskim pH CPPs można uzyskać poprzez wbudowywanie w łańcuch peptydowy reszt histydyny. Dodanie fragmentu naprzemiennie ułożonych reszt histydyny i kwasu glutaminowego pozwala uwrażliwić na pH peptydy penetrujące o zróżnicowanych sekwencjach aminokwasowych [169]. Podobny efekt można uzyskać poprzez wymianę reszt lizyny na reszty histydyny [170].



Rysunek 8. Przykładowe strategie tworzenia aktywowalnych CPPs: 1) sekwencje polianionowe i polikationowe połączone rozszczepialnym łącznikiem [15]; 2) fragment blokujący przyłączony do łańcucha bocznego kationowego aminokwasu w CPP [158, 159]; 3) CPPs osłonięte polimerami dołączonymi do nośnika poprzez rozszczepialny łącznik [156, 157]; 4) modyfikacja wybranych reszt kationowych CPPs grupami anionowymi [163]; 5) peptyd przybierający aktywną konformację jedynie w pH patologicznym [164–167]

Figure 8. The examples of strategies of formation activatable CPPs: 1) polyanionic and polycationic fragments connected with cleavable linker [153]; 2) blocking fragment connected to the side chain of basic residue of the CPP [158, 159]; 3) shielding polymer chains connected to the carrier with a cleavable linker [156, 157]; 4) modification of cationic parts of CPP with anionic groups [163]; 5) peptide adopting its active conformation only at pathologic pH [164–167]

Zaproponowano także aktywowalne peptydy penetrujące komórki, w których grupy osłaniające CPPs odszczepiane są w wyniku redukcji lub utlenienia. Peptyd M918 o sekwencji MVTVLFKRLRIRACGPPRVKV traci zdolność do przenikania po dobudowaniu do jego struktury łańcuchów PEG [171]. Polimer przyłączono do bocznych grup aminowych lizyny poprzez ugrupowanie azabenzenowe, które rozszczepiane jest w wyniku redukcji. Wykazano, że proces redukcji może być katalizowany przez bakteryjną azoreduktazę w okrężnicy. Znane są również CPPs aktywowane w wyniku utlenienia nadtlenu wodoru. Zdolność ta może być wykorzystana do nakierowywania aktywnych substancji do tkanek znajdujących się w stanie stresu oksydacyjnego. Kluczowym elementem warunkującym takie rozwiązanie jest połączenie aktywnej poliargininy z osłaniającym związkiem polianionowym poprzez resztę kwasu 4-boronomigdałowego [172].

### Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane termicznie

CPPs transportujące terapeutyki aktywować można również zewnętrznymi czynnikami fizycznymi. Jednym z nich jest stosowana w terapii nowotworów miejscowa hipertermia, czyli kontrolowane przegrzewanie komórek guza. W podejściu tym najczęściej stosowane są liposomy uwalniające zawartość w podwyższonej temperaturze [173]. Coraz większe zainteresowanie wzbudza podejście wykorzystujące tzw. peptydy elastynopodobne (ang. *elastin-like polypeptide*, ELP) [174]. Mają one postać postać rozpuszczalnych monomerów w temperaturze fizjologicznej, zaś w warunkach hipertermii tworzą agregaty. Dołączenie do nich koniugatu CPP-cargo umożliwia tworzenie nośników, które przenikają przez błonę jedynie po procesie agregacji [175–177]. Lokalna hipertermia wywoływana może być przepływem prądu elektrycznego lub ultradźwiękami [178]. Ta ostatnia metoda cieszy się jednak większą popularnością i jest chętniej wykorzystywana [145] jako czynnik warunkujący hipertermię. Przykładem takiego podejścia jest wykorzystanie opakowanego w nanosfery kompleksu CPP-deksorubicyna do selektywnego transportu i uwalniania leku przeciwnowotworowego. Jako naprowadzający czynnik fizyczny coraz częściej stosowane jest także zlokalizowane pole magnetyczne [179, 180].

### Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane światłem

Podejmowane są również próby wykorzystania promieniowania elektromagnetycznego do aktywacji nośników leków. Aktywowanie światłem pozwala uzyskać wysoką precyzję zarówno obszarową jak i czasową. Przykładem takiego podejścia są liposomy modyfikowane CPPs, w których grupy aminowe w łańcuchach bocznych lizyny osłaniane są działaniem chloromrówczanu 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylu, który usuwany jest promieniowaniem UV [181].

Jeszcze korzystniejsze jest zastosowanie promieniowania podczerwonego, które głębiej penetruje tkankę. Znane jest podobne do opisanego powyżej rozwiązanie, w którym reszty lizyny zablokowane były usuwanym pod działaniem promieniowania podczerwonego grupami 1-(bromometylo)-4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowymi [144, 182]. Bazując na osłonie 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowej opracowano również system uwalniający polianionową sekwencję CPP po naświetlaniu promieniowaniem IR [183].

## 4. ZASTOSOWANIE CPPs W TERAPII I DIAGNOSTYCE

W diagnostyce nowotworów, a także w diagnostyce połączonej z terapią (teranostyce) wykorzystywane są systemy transportujące nanocząstki metali. Do ukierunkowanej radioterapii wykorzystywane są wzbogacone lutetem-177 nanocząstki złota, które kowalencyjnie połączone są z TAT [141]. Modyfikowane nanorurki



złota, przenikające przez błony po ich modyfikowaniu za pomocą CPPs zostały wykorzystane do selektywnego dostarczania związków fotouczulających [138] do tkanek nowotworowych.

Peptydy penetrujące do komórek wykorzystano także do transportu kropek kwantowych. Kropki kwantowe mogą być funkcjonalizowane za pomocą CPPs na dwóch drogach: poprzez tworzenie kowalencyjnie połączonych koniugatów lub w postaci kompleksów, w których nie ma konieczności tworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy CPP a ładunkiem [184]. Modyfikowane za pomocą CPPs kropki kwantowe wykorzystano do znakowania komórek macierzystych w celu śledzenia ich dystrybucji *in vivo* [185].

Ze zdolnością CPPs do przenikania przez błonę komórkową związana jest także ich zdolność do przenikania przez inne bariery biologiczne, takie jak bariera krew-mózg, bariera jelitowa czy skóra [8]. Wiele badań na modelach *in vitro* sugeruje, że nośniki oparte na CPPs mogą dostarczać terapeutyki do mózgu przekraczając barierę krew-mózg [186, 187]. Badania *in vivo* modyfikowanych za pomocą peptydu TAT liposomów potwierdziły ich selektywność wobec komórek glejaka [188]. Dalsze badania z użyciem peptydów elastynopodobnych modyfikowanych za pomocą CPPs wykazały jednak, że proces przenikania do centralnego układu nerwowego, po podaniu donosowym, nie jest dostatecznie efektywny [189].

Coraz częściej podejmowane są również próby wykorzystania CPPs do transportu leków polipeptydowych. Badania te zmierzają do opracowania rozwiązania, w którym możliwe będzie uzyskanie wydajnego wchłaniania podawanych dojelitowo peptydów. Badania wchłaniania i dystrybucji podawanej doustnie insuliny wykazały znacznie wyższą skuteczność wchłaniania koniugatów insuliny z poliargininą, TAT i penetratyną w porównaniu do wchłaniania hormonu niemodyfikowanego [190, 191]. Atrakcyjnym rozwiązaniem jest zastosowanie CPPs do transportu substancji terapeutycznych przez skórę, która jest nieprzepuszczalna dla związków makrocząsteczkowych w tym również polipeptydów. Wykazano, że poliarginina zapewnia transport transdermalny cyklosporyny A [192], natomiast penetratyna i inne CPPs umożliwiają transport soli sodowej diklofenaku [193].

Mimo licznych propozycji zastosowań CPPs w terapii i diagnostyce, popartych obiecującymi wynikami wstępnych badań *in vitro* i *in vivo*, do tej pory nie ma jeszcze żadnej terapii wykorzystującej peptydy penetrujące do komórek. Kontynuowane są testy kliniczne wykorzystujące głównie TAT [194] (GRKKRRQRR-RPQ) oraz p28 (LSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD) [7] jako układy transportujące. Najbardziej zaawansowane są badania nad zastosowaniem peptydu TAT jako czynnika wspomagającego dostarczanie inhibitorów kinazy  $C\epsilon$  oraz  $C\delta$  (leki przeciwbólowe, przeciwniedokrwienne i przeciwważowe), inhibitorów kinaz aktywowanych stresem (leki przeciwwudarowe i przeciwko wypadaniu włosów) czy transport przez skórę botuliny [195]. Uzyskano też obiecujące wyniki wstępnych badań klinicznych dla hybrydowego peptydu złożonego z fragmentu sekwencji receptora NMDA oraz TAT (Tat-NR2B9c lub NA-1). Hybryda wykazuje zdolność

blokowania neurotoksycznych ścieżek sygnałowych i tym samym hamuje uszkodzenie mózgu związane z udarem [196]. Peptyd p28 badany jest pod kątem wykorzystania w leczeniu nowotworów [197, 198]. Obecnie w trakcie badań klinicznych jest kompleks złożony z peptydu DTS-108, inhibitora topoizomerazy i przeciwciała skierowanego przeciwko ludzkiemu CPP (DPV1047). Peptyd DTS-108 wykazuje aktywność CPP (zawiera pięć resz argininy oraz dwie reszty lizyny warunkujące zdolność przenikania błon komórkowych) [199, 200].

### PODSUMOWANIE

Synteza i poznanie obszaru zastosowania peptydów penetrujących do komórek jest wyjątkowo intensywnie rozwijanym obszarem badawczym. Choć bezpośrednie praktyczne wykorzystanie CPPs jest ograniczone przez ich niedostateczną selektywność i niską stabilność, uzyskany postęp w działaniach zmierzających do wyeliminowania tych nieporządanych właściwości wskazuje na ogromny potencjał owych prostych ale bardzo zróżnicowanych strukturalnie peptydów. Działania te powinny otworzyć szerokie możliwości wykorzystania CPPs w dostarczaniu terapeutyków, a także w diagnostyce i w teranostyce.

### PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca została sfinansowana z projektów badawczych Politechniki Łódzkiej (Grant I-18/501/6245/pl1 oraz I-18/501/6255/pl1).

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.D. Frankel, C.O. Pablo, *Cell*, 1988, **55**, 1189.
- [2] M. Green, P.M. Loewenstein, *Cell*, 1988, **55**, 1179.
- [3] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1991, **88**, 1864.
- [4] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 10444.
- [5] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1994, **91**, 664.
- [6] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 16010.
- [7] D. Raucher, J. Su Ryu, *Trends Mol. Med.*, 2015, **21**, 560.
- [8] D. Zhang, J. Wang, D. Xu, *J. Control. Release*, 2016, **229**, 130.
- [9] E. Vivès, *J. Control. Release*, 2005, **109**, 77.
- [10] D.M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1972.
- [11] A. Chugh, F. Eudes, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 477.
- [12] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1609**, 161.
- [13] P.Ø. Falnes, J. Wesche, S. Olsnes, *Biochemistry*, 2001, **40**, 4349.
- [14] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Bartfai, Ü. Langel, *Exp. Cell Res.*, 2001, **269**, 237.

- [15] S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, H. Browne, C. Pedone, M. Galdiero, *J. Biol. Chem.*, 2005, **31**, 28632.
- [16] F. Miletti, *Drug Discov. Today*, 2012, **17**, 850.
- [17] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2000, **97**, 13003.
- [18] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fåhraeus, D.P. Lane, *J. Pept. Res.*, 2000, **55**, 163.
- [19] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, *J. Pept. Res.*, 2000, **56**, 318.
- [20] J.B. Rothbard, E. Kreider, C.L. VanDeusen, L. Wright, B.L. Wylie, P.A. Wender, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 3612.
- [21] A. Walrant, C. Bechara, I.D. Alves, S. Sagan, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 133.
- [22] E. Gonçalves, E. Kitas, J. Seelig, *Biochemistry*, 2005, **44**, 2692.
- [23] J.L. Zaro, W.-C. Shen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **307**, 241.
- [24] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 5836.
- [25] G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R.M. Martin, M. Stöckl, A. Herrmann, M.C. Cardoso, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 469.
- [26] S.W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C.J. Joyce, S.M.V. Brockbank, P. Newham, M.A. Lindsay, *Brit. J. Pharmacol.*, 2005, **145**, 1093.
- [27] J. Zhou, Y. Chau, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 1462.
- [28] J.S. Appelbaum, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 819.
- [29] A. Ziegler, J. Seelig, *Biochemistry*, 2007, **46**, 8138.
- [30] M.C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 2730.
- [31] E. Gros, S. Deshayes, M.C. Morris, G. Aldrian-Herrada, J. Depollier, F. Heitz, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 384.
- [32] M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**, 1173.
- [33] A. Scheller, J. Oehlke, B. Wiesner, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, M. Melzig, M. Bienert, *J. Pept. Sci.*, 1999, **5**, 185.
- [34] I.D. Alves, N. Goasdoué, I. Correia, S. Aubry, C. Galanth, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1780**, 948.
- [35] E. Eiriksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 1119.
- [36] E. Krause, M. Beyermann, H. Fabian, M. Dathe, S. Rothemund, M. Bienert, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1996, **48**, 559.
- [37] J. Oehlke, E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS Lett.*, 1997, **415**, 196.
- [38] H.Y. Kim, S.Y. Yum, G. Jang, D.-R. Ahn, *Ahn. Sci. Rep.*, 2015, **5**, 11719.
- [39] S. Pujals, E. Giralt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 473.
- [40] K. Sadler, K.D. Eom, J.L. Yang, Y. Dimitrova, J.P. Tam, *Biochemistry*, 2002, **41**, 14150.
- [41] D.S. Daniels, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14578.
- [42] I. Martín, M. Teixidó, E. Giralt, *Chembiochem.*, 2011, **12**, 896.
- [43] M.I. Geli, M. Torrent, D. Ludevid, *Plant Cell*, 1994, **6**, 1911.
- [44] J.R. Marks, J. Placone, K. Hristova, W.C. Wimley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 8995.
- [45] F. Nakayama, T. Yasuda, S. Umeda, M. Asada, T. Imamura, V. Meineke, M. Akashi, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 25823.
- [46] M. Rhee, P. Davis, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 1233.
- [47] K. Montrose, Y. Yang, X. Sun, S. Wiles, G. W. Krissansen, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 1661.
- [48] J.D. Ochocki, U. Igbavboa, W.G. Wood, E.V. Wattenberg, M.D. Distefano, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2010, **76**, 107.

- [49] M. Mäe, S. EL Andaloussi, P. Lundin, N. Oskolkov, H.J. Johansson, P. Guterstam, Ü. Langel, *J. Control. Release*, 2009, **19**, 221.
- [50] S. Patel, M.R. Player, *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2008, **17**, 1865.
- [51] J.R. LaRochelle, G.B. Cobb, A. Steinauer, E. Rhoades, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2536.
- [52] Q. Chu, R.E. Moellering, G.J. Hilinski, Y.-W. Kim, T.N. Grossmann, J.T.-H. Yeh, G.L. Verdine, *Med. Chem. Commun.*, 2015, **6**, 111.
- [53] S. L. Lo, S. Wang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 2408.
- [54] B.R. Liu, Y.W. Huang, J.G. Winiarz, H.J. Chiang, H.J. Lee, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3520.
- [55] J. Regberg, L. Vasconcelos, F. Madani, Ü. Langel, M. Hällbrink, *Int. J. Pharm.*, 2016, **501**, 32.
- [56] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fähræus, D.P. Lane, *J. Pept. Res.*, 2000, **55**, 163.
- [57] D. Delaroché, B. Aussedat, S. Aubry, G. Chassaing, F. Burlina, G. Clodic, G. Bolbach, S. Lavielle, S. Sagan, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1932.
- [58] A.N. Shirazi, N.S. El-Sayed, R.K. Tiwari, K. Tavakoli, K. Parang, *Curr. Drug Deliv.*, 2016, **13**, 409.
- [59] D. Xu, D. Dustin, L. Jiang, D.S. Samways, H. Dong, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 11757.
- [60] M.-L. Jobin, M. Blanchet, S. Henry, S. Chaignepain, C. Manigand, S. Castano, S. Lecomte, F. Burlina, S. Sagan, I.D. Alves, *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, **1848**, 593.
- [61] A.J. de Jesus, T.W. Allen, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**, 864.
- [62] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, *FASEB J.*, 2013, **27**, 738.
- [63] P. Perret, M. Ahmadi, L. Riou, S. Bacot, J. Pecher, C. Poillot, A. Broisat, C. Ghezzi, M. De Waard, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 27730.
- [64] D. Oupický, A.L. Parker, L.W. Seymour, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8.
- [65] J. Yoo, D.-Y. Lee, V. Gujrati, N.S. Rejinold, K.M. Lekshmi, S. Uthaman, C. Jeong, I.-K. Park, S. Jon, Y.-C. Kim, *J. Control. Release*, 2016, **246**, 142.
- [66] K. Montrose, Y. Yang, G.W. Krissansen, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 4900.
- [67] J. Regberg, A. Srimanee, M. Erlandsson, R. Sillard, D.A. Dobchev, M. Karelson, Ü. Langel, *Int. J. Pharm.*, 2014, **464**, 111.
- [68] N. Oskolkov, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2011, **17**, 147.
- [69] N. Purkayastha, K. Eyer, T. Robinson, P.S. Dittrich, A.K. Beck, D. Seebach, B. Kolesinska, R. Cadalbert, *Chem. Biodivers.*, 2013, **10**, 1165.
- [70] T. Kato, H. Yamashita, T. Misawa, K. Nishida, M. Kurihara, M. Tanaka, Y. Demizu, M. Oba, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 2681.
- [71] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, Ü. Langel, *FASEB J.*, 1998, **12**, 67.
- [72] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 585.
- [73] S. Trabulo, A.L. Cardoso, M. Mano, M.C. Pedroso de Lima, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 961.
- [74] R.M. Steinman, I.S. Mellman, W.A. Muller, Z.A. Cohn, *J. Cell Biol.*, 1983, **96**, 1.
- [75] S.D. Conner, S.L. Schmid, *Nature*, 2003, **422**, 37.
- [76] J.L. Zaro, W.-C. Shen, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 2015, **9**, 407.
- [77] F. Madani, S. Lindberg, Ü. Langel, S. Futaki, A. Gräslund, *J. Biophys.*, 2011, **2011**, 414729.
- [78] Y. Kawaguchi, T. Takeuchi, K. Kuwata, J. Chiba, Y. Hatanaka I. Nakase, S. Futaki, *Bioconjug. Chem.*, 2016, **27**, 1119.
- [79] T. Letoha, A. Keller-Pintér, E. Kusz, C. Kolozsi, Z. Bozsó, G. Tóth, C. Vizler, Z. Oláh, L. Szilák, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 2258.
- [80] J. Zhou, W. Liu, R.-C. Pong, G. Hao, X. Sun, J.-T. Hsieh, *Amino Acids*, 2012, **42**, 1253.
- [81] T. Tsumuraya, M. Matsushita, *PLoS One*, 2014, **9**, e86639.
- [82] S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A.T. Jones, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 784.

- [83] J.P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L.V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 15300.
- [84] M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta, M. Giacca, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 3254.
- [85] H.L. Åmand, H.A. Rydberg, L.H. Fornander, P. Lincoln, B. Nordén, E.K. Esbjörner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1818**, 2669.
- [86] F. Illien, N. Rodriguez, M. Amoura, A. Joliot, M. Pallerla, S. Cribier, F. Burlina, S. Sagan, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 36938.
- [87] S.M. Fuchs, R.T. Raines, *Biochemistry*, 2004, **43**, 2438.
- [88] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 2142
- [89] Y. Takechi-Haraya, R. Nadai, H. Kimura, K. Nishitsuji, K. Uchimura, K. Sakai-Kato, K. Kawakami, A. Shigenaga, T. Kawakami, A. Otaka, H. Hojo, N. Sakashita, H. Saito, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 1339.
- [90] L.E. Prevette, N.C. Benish, A.R. Schoenecker, K.J. Braden, *Biophys. Chem.*, 2015, **207**, 40.
- [91] H.C. Christianson, M. Belting, *Matrix Biol.*, 2014, **35**, 51.
- [92] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, 2007, **46**, 492.
- [93] I. Mäger, E. Eiríksdóttir, K. Langel, S. El Andaloussi, Ü. Langel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 338.
- [94] P. Lundin, H. Johansson, P. Guterstam, T. Holm, M. Hansen, Ü. Langel, S. EL Andaloussi, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 2535.
- [95] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry*, 1996, **35**, 11361.
- [96] S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, H.W. Huang, *Biochemistry*, 1996, **35**, 13723.
- [97] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 18188.
- [98] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, H. W. Huang, *Biophys. J.*, 2001, **81**, 1475.
- [99] G. Baumann, P. Mueller, *J. Cell. Biochem.*, 1974, **2**, 538.
- [100] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, Y. Shai, *Biochemistry*, 1992, **31**, 12416.
- [101] J.-P. Berlose, O. Convert, D. Deross, A. Brunissen, G. Chassaing, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **242**, 372.
- [102] E.G. Stanzl, B.M. Trantow, J.R. Vargas, P.A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2944.
- [103] M. Di Pisa, G. Chassaing, J.-M. Swiecicki, *Biochemistry*, 2015, **54**, 194.
- [104] S. Kawamoto, M. Takasu, T. Miyakawa, R. Morikawa, T. Oda, S. Futaki, H. Nagao, *J. Chem. Phys.*, 2011, **134**, 095103.
- [105] I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J.C. Simpson, A.T. Jones, Y. Sugiura, S. Futaki, *Mol. Ther.*, 2004, **10**, 1011.
- [106] M. Fretz, J. Jin, R. Conibere, N.A. Penning, S. Al-Taei, G. Storm, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, *J. Control. Release*, 2006, **116**, 247.
- [107] M. Kosuge, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, S. Futaki, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 656.
- [108] M.M. Fretz, N.A. Penning, S. Al-Taei, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, G. Storm, A.T. Jones, *Biochem. J.*, 2007, **403**, 335.
- [109] A. Mishra, G. Hwee Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, G.C.L. Wong, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2011, **108**, 16883.
- [110] J.M. Swiecicki, M. Di Pisa, F. Burlina, P. Lécorché, C. Mansuy, G. Chassaing, S. Lavielle, *Biopolymers*, 2015, **104**, 533.
- [111] P. Säälík, A. Niinep, J. Pae, M. Hansen, D. Lubenets, Ü. Langel, M. Pooga, *J. Control. Release*, 2011, **153**, 117.
- [112] D. Herce, A.E. Garcia, M.C. Cardoso, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 17459.
- [113] E. Eiríksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 1119.

- [114] C.L. Watkins, P. Brennan, C. Fegan, K. Takayama, I. Nakase, S. Futaki, A.T. Jones, *J. Control. Release*, 2009, **140**, 237.
- [115] J. Pae, L. Liivamägi, D. Lubenets, P. Arukuusk, Ü. Langel, M. Pooga, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 1860.
- [116] E. Harreither, H.A. Rydberg, H.L. Åmand, V. Jadhav, L. Fliedl, C. Benda, M.A. Esteban, D. Pei, N. Borth, R. Grillari-Voglauer, O. Hommerding, F. Edenhofer, B. Nordén, J. Grillari, *Cell Regen.*, 2014, **3**, 2.
- [117] A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, M. Giacca, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 34141.
- [118] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33957.
- [119] F. Simeoni, M.C. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2717.
- [120] B.R. Liu, M.-H. Chan, H.-H. Chen, S.-Y. Lo, Y.-W. Huang, H.-J. Lee, [w:] *Cell Membrane*, Nova Science Publishers, Inc., 2013.
- [121] J.C. Mai, H. Shen, S.C. Watkins, T. Cheng, P.D. Robbins, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 30208.
- [122] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1994, **91**, 664.
- [123] S.R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S.F. Dowdy, *Science*, 1999, **285**, 1569.
- [124] D. Sarko, B. Beijer, R.G. Boy, E.-M. Nothelfer, K. Leotta, M. Eisenhut, A. Altmann, U. Haberkorn, W. Mier, *Mol. Pharmaceutics*, 2010, **7**, 2224.
- [125] A. Bolhassani, B. S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides*, 2017, **87**, 50.
- [126] Ülo Langel, *Cell-Penetrating Peptides*, Humana Press Inc., 2015.
- [127] Langel, Ülo, *Cell-Penetrating Peptides. Methods and Protocols*, CRC Press, 2011.
- [128] K. Ezzat, E.M. Zaghoul, S.E.L. Andaloussi, T. Lehto, R. El-Sayed, T. Magdy, C.I.E. Smith, Ü. Langel, *J. Control. Release*, 2012, **162**, 1.
- [129] S.A. Moschos, S.W. Jones, M.M. Perry, A.E. Williams, J.S. Erjefalt, J.J. Turner, P.J. Barnes, B.S. Sproat, M.J. Gait, M.A. Lindsay, *Bioconjug. Chem.*, 2007, **18**, 1450.
- [130] Z. Wang, Y. Chen, E. Liu, J. Gong, S. M. Cheol, Y. Huang, *Protein Pept. Lett.*, 2014, **21**, 1129.
- [131] N. Kamei, E.J.B. Nielsen, T. Nakakubo, Y. Aoyama, U.L. Rahbek, B.L. Pedersen, M. Takeda-Morishita, *J. Pharm. Sci.*, 2016, **105**, 747.
- [132] S.R. Schwarze, K.A. Hruska, S.F. Dowdy, *Trends Cell Biol.*, 2000, **10**, 290.
- [133] S. Liu, H. Yang, L. Wan, J. Cheng, X. Lu, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2013, **28**, 289.
- [134] K.J. Lim, B.H. Sung, J.R. Shin, Y.W. Lee, D.J. Kim, K.S. Yang, S.C. Kim, *PLoS One*, 2013, **8**, e66084.
- [135] W. Wang, M. Li, Z. Zhang, C. Cui, J. Zhou, L. Yin, H. Lv, *Carbohydr. Polym.*, 2017, **156**, 97.
- [136] Y. Yamada, M. Hashida, H. Harashima, *Biomaterials*, 2015, **52**, 189.
- [137] M.C. Shin, J. Zhang, K.A. Min, K. Lee, C. Moon, J.P. Balthasar, V.C. Yang, *J. Control. Release*, 2014, **194**, 197.
- [138] N. Li, T. Li, C.Liu, S. Ye, J. Liang, H. Han, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2016, **12**, 878.
- [139] J. Chen, S. Li, Q. Shen, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, **47**, 430.
- [140] G. Sharma, A. Modgil, B. Layek, K. Arora, C. Sun, B. Law, J. Singh, *J. Control. Release*, 2013, **167**, 1.
- [141] N. Jiménez-Mancilla, G. Ferro-Flores, C. Santos-Cuevas, B. Ocampo-García, M. Luna-Gutiérrez, E. Azorín-Vega, K. Isaac-Olivé, M. Camacho-López, E. Torres-García, *J. Label Compd. Radiopharm.*, 2013, **56**, 663.
- [142] J. Li, X. Zhang, M. Wang, X. Li, H. Mu, A. Wang, W. Liu, Y. Li, Z. Wu, K. Sun, *Int. J. Pharm.*, 2016, **501**, 112.
- [143] Y. Liu, L. Mei, Q. Yu, Q. Zhang, H. Gao, Z. Zhang, Q. He, *Amino Acids*, 2015, **47**, 2533.
- [144] X. Xie, Y. Yang, Y. Yang, H. Zhang, Y. Li, X. Mei, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 2445.
- [145] W. Lin, X. Xie, J. Deng, H. Liu, Y. Chen, X. Fu, H. Liu, Y. Yang, *J. Drug Target.*, 2016, **24**, 134.

- [146] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 6387.
- [147] H. Maeda, G.Y. Bharate, J. Daruwalla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **71**, 409.
- [148] R.A. Morshed, M.E. Muroski, Q. Dai, M.L. Wegscheid, B. Auffinger, D. Yu, Y.Han, L. Zhang, M. Wu, Y. Cheng M. S. Lesniak, *Mol. Pharm.*, 2016, **13**, 1843.
- [149] J. Zhang, M. Li. Z. Yuan, D. Wu, J. Chen, J. Feng, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**, 299.
- [150] D. Yu, C. Jin, J. Leja, N. Majdalani, B. Nilsson, F. Eriksson, M. Essand, *J. Virol.*, 2011, **85**, 13114.
- [151] Y. Eto, Y. Yoshioka, R. Asavatanabodee, S. Kida, M. Maeda, Y. Mukai, H. Mizuguchi, K. Kawasaki, N. Okada, S. Nakagawa, *Peptides*, 2009, **30**, 1548.
- [152] Y. Liu, Y. J. Kim, M. Ji, J. Fang, N. Siriwon, L.I. Zhang, P. Wang, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2014, **1**, 12.
- [153] D.C. Anderson, E. Nichols, R. Manger, D. Woodle, M. Barry, A.R. Fritzberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**, 876.
- [154] H. He, L. Sun, J. Ye, E. Liu, S. Chen, Q. Liang, M.C. Shin, V.C. Yang, *J. Control. Release*, 2016, **240**, 67.
- [155] S.M. van Duijnhoven, M.S. Robillard, K. Nicolay, H. Gröll, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2015, **10**, 59.
- [156] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2004, **21**, 17867.
- [157] N.Q. Shi, W. Gao, B. Xiang, X.R. Qi, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7**, 1613.
- [158] C.D. Malone, E.S. Olson, R.F. Mattrey, T. Jiang, R.Y. Tsien, Q.T. Nguyen, *PLoS One*, 2015, **10**, e0137104.
- [159] S.A. Bode, M.B. Hansen, R.A. Oerlemans, J.C. van Hest, D.W. Löwik, *Bioconjug. Chem.*, 2015, **26**, 850.
- [160] Z. Liu, M. Xiong, J. Gong, Y. Zhang, N. Bai, Y. Luo, L. Li, Y. Wei, Y. Liu, X. Tan, R. Xiang, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 4280.
- [161] T.J. Harris, G. von Maltzahn, M.E. Lord, J.-H. Park, A. Agrawal, D.-H. Min, M.J. Sailor, S.N. Bhatia, *Small*, 2008, **4**, 1307.
- [162] K.-L. Veiman, K. Künnapuu, T. Lehto, K. Kiisholts, K. Pärn, Ü. Langel, K. Kurrikoff, *J. Control. Release*, 2015, **209**, 238.
- [163] I.F. Tannock, *D. Rotin, Cancer Res.*, 1989, **49**, 4373.
- [164] X. Zhang, Y. Lin, R.J. Gillies, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51**, 1167.
- [165] Y. Ding, D. Sun, G.L. Wang, H.G. Yang, H.F. Xu, J.H. Chen, Y. Xie, Z. Q. Wang, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 6199.
- [166] H. Cheng, J.-Y. Zhu, X.-D. Xu, W.-X. Qiu, Q. Lei, K. Han, Y.-J. Cheng, X.-Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 16061.
- [167] D.K. Schach, W. Rock, J. Franz, M. Bonn, S.H. Parekh, T. Weidner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 12199.
- [168] J.E. Baio, D. Schach, A.V. Fuchs, L. Schmäser, N. Billecke, C. Bubeck, K. Landfester, M. Bonn, M. Bruns, C.K. Weissac, T. Weidner, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 273.
- [169] C. Sun, W.-C. Shen, J. Tu, J. L. Zaro, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 1583.
- [170] W. Zhang, J. Song, B. Zhang, L. Liu, K. Wang, R. Wang, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1410.
- [171] S.H. Lee, E. Moroz, B. Castagner, J.C. Leroux, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 12868.
- [172] R. Weinstain, E.N. Savariar, C.N. Felsen, R.Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 874.
- [173] Y. Yang, Y. Yang, X. Xie, X. Cai, H. Zhang, W. Gong, Z. Wang, X. Mei, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4368.
- [174] S.R. MacEwan, A. Chilkoti, *Biopolymers*, 2010, **94**, 60.
- [175] S.M. Hearst, Q. Shao, M. Lopez, D. Raucher, P.J. Vig, *J. Neurochem.*, 2014, **131**, 101.
- [176] L.R. Walker, J.S. Ryu, E. Perkins, L.R. McNally, D. Raucher, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2014, **8**, 1649.
- [177] S.R. MacEwan, A. Chilkoti, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 2058.

- [178] S.-K. Wu, C.-F. Chiang, Y.-H. Hsu, T.-H. Lin, H.-C. Liou, W.-M. Fu, W.-L. Lin, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 4485.
- [179] W. Lin, X. Xie, Y. Yang, X. Fu, H. Liu, Y. Yang, J. Deng, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 3436.
- [180] Y. Yang, X. Xie, X. Xu, X. Xia, H. Wang, L. Li, W. Dong, P. Ma, Y. Yang, Y. Liu, X. Mei, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2016, **146**, 607.
- [181] H. Li, T. Y. Tsui, W. Ma, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2015, **67**, 1215.
- [182] Y. Yang, Y. F. Yang, X. Y. Xie, Z. Y. Wang, W. Gong, H. Zhang, Y. Li, F. L. Yu, Z. P. Li, X. G. Mei, *Biomaterials*, 2015, **48**, 84.
- [183] Y. Yang, X. Xie, Y. Yang, Z. Li, F. Yu, W. Gong, Y. Li, H. Zhang, Z. Wang, X. Mei, *Mol. Pharmaceutics*, 2016, **13**, 1508.
- [184] S. M. Farkhani, M. Johari-Ahar, P. Zakeri-Milani, J. Shahbazi Mojarrad, H. Valizadeh, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2016, **44**, 1424.
- [185] S. Q. Wu, C. W. Chi, C. X. Yang, X. P. Yan, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4114.
- [186] X. Zhao, T. Shang, X. Zhang, T. Ye, D. Wang, L. Rei, *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, **11**, 451.
- [187] K.-H. Lin, S.-T. Hong, H.-T. Wang, Y.-L. Lo, A. M.-Y. Lin, J. C.-H. Yang, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, E1998.
- [188] X. Chen, M. Yuan, Q. Zhang, Y. T. Yang, H. Gao, Q. He, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2016, **17**, 636.
- [189] J. W. McGowan, Q. Shao, P. J. Vig, G. L. Bidwell III, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2016, **10**, 2803.
- [190] S. Zhu, S. Chen, Y. Gao, F. Guo, F. Li, B. Xie, J. Zhou, H. Zhong, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 1980.
- [191] Y. Daimon, N. Kamei, K. Kawakami, M. Takeda-Morishita, H. Izawa, Y. Takechi-Haraya, H. Saito, H. Sakai, M. Abe, K. Ariga, *Mol. Pharmaceutics*, 2016, **13**, 4034.
- [192] J. B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P. L. McGrane, P. A. Wende, P. A. Khavari, *Nat. Med.*, 2000, **6**, 1253.
- [193] M. Cohen-Avrahami, D. Libster, A. Aserin, N. Garti, *J. Phys. Chem. B.*, 2011, **115**, 10189.
- [194] M. Rizzuti, M. Nizzardo, C. Zanetta, A. Ramirez, S. Corti, *Drug Discov. Today*, 2015, **20**, 76.
- [195] R. R. Sawant, N. R. Patel, V. Torchilin, *Eur. J. Nanomed.*, 2013, **5**, 141.
- [196] M. D. Hill, R. H. Martin, D. Mikulis, J. H. Wong, F. L. Silver, K. G. terBrugge, G. Milot, W. M. Clark, R. L. MacDonald, M. E. Kelly, M. Boulton, I. Fleetwood, C. McDougall, T. Gunnarsson, M. Chow, C. Lum, R. Dodd, J. Poublanc, T. Krings, A. M. Demchuk, M. Goyal, R. Anderson, J. Bishop, D. Garman, M. Tymianski, *Lancet Neurol.*, 2012, **11**, 942.
- [197] M. A. Warso, J. M. Richards, D. Mehta, K. Christov, C. Schaeffer, L. Rae Bressler, T. Yamada, D. Majumdar, S. A. Kennedy, C. W. Beattie, T. K. Das Gupta, *Br. J. Cancer*, 2013, **108**, 1061.
- [198] H. Kim, S. Moodley, M. Liu, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2015, **5**, 275.
- [199] R. Coriat, S. J. Faivre, O. Mir, C. Dreyer, S. Ropert, M. Bouattour, R. Desjardins, F. Goldwasser, E. Raymond, *Int. J. Nanomed.*, 2016, **11**, 6207.
- [200] C. de Coupade, A. Fittipaldi, V. Chagnas, M. Michel, S. Carlier, E. Tasciotti, A. Darmon, D. Ravel, J. Kearsey, M. Giacca, F. Cailler, *Biochem. J.*, 2005, **390**, 407.