

Dostavni peptidi in njihova uporaba

Cell-penetrating peptides and their application

Maja Anko, Matjaž Zorko

Povzetek: Odkritja terapevtsko učinkovitih molekul, ki težko prodirajo v tkiva in celice in zato ne pridejo v klinično uporabo, so povzročila iskanje novih učinkovitejših dostavnih sistemov. Med najnovejše nosilce učinkovin v celice spadajo tudi dostavni peptidi, ki lahko neinvazivno prehajajo membrane in prenašajo v celice najrazličnejše molekule. Danes se dostavni peptidi uspešno uporabljajo za vnos nizkomolekularnih učinkovin, peptidov, proteinov in nukleinskih kislin tako *in vitro* kot tudi *in vivo* na ravni raziskav, nekateri pa se že tudi klinično preizkušajo. V tem preglednem članku predstavljamo strukturo, funkcijo in celične mehanizme vstopa ter možnosti, ki jih dostavni peptidi odpirajo za dostavo farmacevtsko pomembnih učinkovin.

Ključne besede: dostavni peptidi, dostavni sistemi, proteinske transdukcijske domene, prenos v celico

Abstract: The discovery of potent therapeutic molecules that do not reach clinical application due to poor penetration into the tissues and cells have fuelled the investigations of new efficient delivery systems. Recently developed cell-penetrating peptides (CPP) non invasively penetrate cell membrane and are able to translocate different cargoes into the cells. Nowadays CPPs are successfully applied for *in vitro* and *in vivo* delivery of small-molecule drugs, peptides, proteins and nucleic acids in research work, but some of them are currently under clinical evaluations. In this review we highlight structure, function and cellular uptake mechanisms of CPPs and their potential applications for the delivery of therapeutic molecules.

Key words: cell-penetrating peptides, delivery systems, protein transduction domains, cell internalisation

1 Uvod

Eno od pomembnih ovir pri razvoju novih zdravil, ki so usmerjena na znotrajcelične tarče, predstavlja nizka biološka uporabnost hidrofilnih, velikih ali nabitih molekul. Molekule, ki se vežejo na znotrajcelične tarče, so učinkovite le, če lahko prehajajo lipidni dvosloj. Da bi omogočili učinkovitejšo uporabo učinkovin, ki imajo znotrajcelična tarčna mesta, so v zadnjem času razvili različne dostavne sisteme. Mednje spadajo virusni in nevirusni sistemi. Virusni vektorji so pogosto učinkoviti prenašalci, vendar lahko sprožijo imunski odziv, pri *in vivo* uporabi pa predstavlja tveganje tudi možna virusna rekombinacija (1, 2). Med nevirusne dostavne sisteme sodi uporaba liposomov, polipeptidov, nanodelcev, micelijev in dendramerov. V zadnjih letih so se tem dostavnim sistemom pridružili peptidi, ki prehajajo celično membrano in lahko v celico prenesejo različne snovi. Za to skupino peptidov, ki so pomembno povečali nabor prenašalcev farmakološko učinkovitih snovi v notranjost celice, se je v tuji literaturi uveljavilo ime »cell-penetrating peptides« in okrajšava CPP, včasih pa jih imenujejo tudi »protein transduction domains,« okrajšano PTDs (3). Slovenska terminologija za te peptide je še v pripravi. V tem članku jih bomo v skladu z začasnimi priporočili Terminološke komisije Slovenskega biokemijskega društva imenovali dostavni peptidi in bomo ohranili mednarodno kratico CPP, prenašano molekulo pa bomo imenovali tovor (terminoloških priporočil za to molekulo še ni).

2 Dostavni peptidi: razvoj in vrste

Dostavni peptidi so dolgi od 10 do 30 aminokislin in imajo zelo različne strukturne značilnosti, večini pa je skupen pozitiven naboj pri fiziološkem pH in amfifilna narava (4). Mehanizem prehoda CPP skozi membrano še ni povsem pojasnjen, kljub temu pa vedno več raziskav kaže na njihovo uporabnost v raziskavah in potencialno tudi v medicinski klinični praksi.

2.1 Pomembni mejniki v razvoju dostavnih peptidov

Proteine, sposobne prehoda iz celice v celico, so prvič opazili pred dvema desetletjema, v večini primerov so bili ti proteini transkripcijski dejavniki. Prvi opisan je bil Tat transaktivator iz virusa HIV, ki prehaja membrano in lahko vstopi tudi v jedro (5). Kasneje so odkrili minimalno peptidno zaporedje Tat, ki še lahko vstopi v celico. Dolgo je 13 aminokislin imenovali pa so ga Tat-peptid, ki je danes eden najboljše ovrednotenih CPP (6). Prvi primer CPP, ki ne izvira iz virusa je 16 aminokislin dolgo zaporedje, ki izhaja iz tretjega heliksa homeoproteina, ki je produkt gena Antennapedia iz vinske mušice (*Drosophila sp.*) – ta CPP so imenovali penetratin (7). Pomemben mejnik v razvoju dostavnih peptidov kot farmakoloških prenašalcev pa

predstavlja prvi *in vivo* vnos. Langel in sod. so leta 1998 (8) za znotrajcelično dostavo PNA (peptide nucleic acid) uporabili penetratin in transportan (himerni amfifilen peptid, glej preglednico 1). PNA je oligonukleotidni analog pri katerem je ogrodje iz deoksiriboze in fosfata zamenjano z nenabitim poliamidnim ogrodjem, kar poveča stabilnost molekule, saj je nukleaze ne morejo razgraditi. Z vnosom PNA, ki je bila komplementarna mRNA za galaninski receptor tipa 1, so zavrli izražanje galaninskih receptorjev pri podgani. Leto kasneje (1999) so Schwarze in sod. pokazali, da se po intraperitonealnem vnosu biološko aktivni encim β -galaktozidaza vezana s Tat porazdeli po celem organizmu in vstopi v celice vseh tkiv, vključno z možgani (9). Od takrat so odkrili ali zasnovali še številne nove dostavne peptide (10-13). V zadnjem času gredo raziskave predvsem v smer povečanja tkivne oziroma celične specifičnosti pri dostavi učinkovin in kombiniranja CPP z molekulami lipidov (14).

2.2 Splošne značilnosti

Dostavni peptid predstavlja vsak peptid, ki lahko prehaja celično membrano, večino od njih sestavlja manj kot 30 aminokislin. Glede na izvor jih lahko razdelimo na tri skupine: (a) CPP, ki izvirajo iz naravnih proteinov, (b) himerni CPP, ki so sestavljeni iz dveh ali več proteinskih

domen, ki izhajajo iz različnih proteinov, lahko pa tudi delov peptidov - tak primer je transportan, ki je sestavljen iz peptida mastoparana na C terminalnem koncu, ter sestavnega dela peptida galanina na N terminalnem koncu molekule (15); in (c) modelni CPP, ki so *ab initio* načrtovani peptidi in niso homologni naravnim zaporedjem (4, 16). Pri klasifikaciji CPP lahko upoštevamo tudi strukturni vidik ter jih razdelimo na polikationske, ki v zaporedju vsebujejo več argininov in/ali lizinov (tako so npr. oligoarginini in pVEC) ter amfifilne kot je transportan. Nekateri najpogosteje uporabljeni CPP so predstavljeni v preglednici 1.

3 Mehanizem vstopa v celico

Mehanizem vstopa CPP v celice so različni in v nekaterih primerih slabo raziskani. Kljub temu pa se večina raziskovalcev strinja, da je za prvi stik med CPP in površino celice odgovorna elektrostatska interakcija s proteoglikani, medtem ko je mehanizem nadaljnega procesa vstopa v celico odvisen od naslednjih parametrov: (a) narave in sekundarne strukture CPP, (b) sposobnosti interakcije s celično površino in lipidnimi komponentami, (c) narave, vrste in koncentracije molekule, ki jo prenaša ter (d) vrste celice v katero vstopa in strukture njene membrane (2, 4).

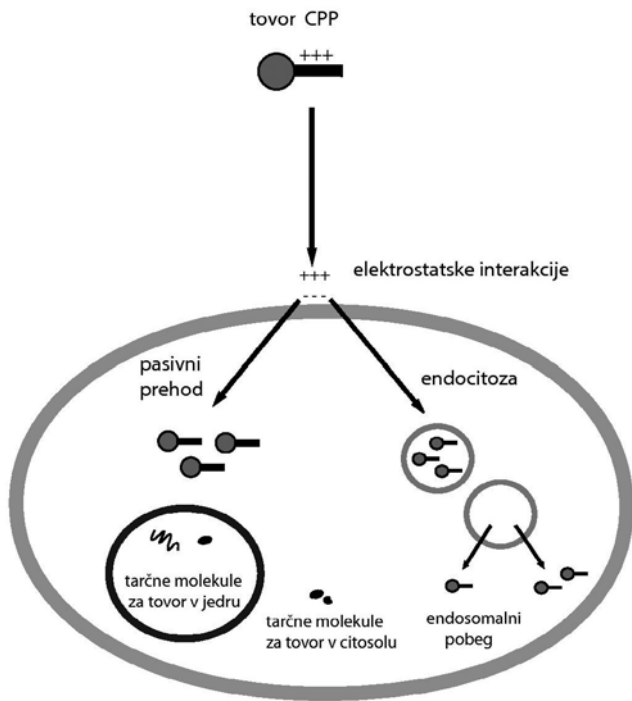
Preglednica 1: Primeri dostavnih peptidov.

Tabel 1: Examples of cell-penetrating peptides.

Ime Zaporedje	Skupina Izvor	Referenca
Tat ⁴⁸⁻⁶⁰ GRKKRRRQRPPQ	proteinski izvor HIV-Tat protein	(5)
penetratin (Antp) ⁴³⁻⁵⁸ RQIKIWFQNRRMKWKK	proteinski izvor homeodomena	(7)
pVEC LLIILRRRIRKQAHASK	proteinski izvor žilni endotelni kadherin	(17)
transportan GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	himerni CPP galanin / mastoparan	(15)
transportan10 AGYLLGKINLKALAALAKKIL	himerni CPP galanin / mastoparan	(13)
MPG GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	himerni CPP HIV-1 gp41 / SV40*	(18)
Pep-1 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	himerni CPP s Trp bogat motiv / SV40**	(19)
oligoarginin Arg8 ali Arg9	modelni CPP	(20)
MAP KLALKLALKALKAAKLKLA	modelni CPP	(21)

* MPG je sestavljen iz hidrofobne domene, ki izhaja iz fuzijske sekvence HIV gp41 in hidrofilne domene, ki pa izhaja iz motiva za lokalizacijo v jedro SV40 T-antigena.

** Hidrofobno domeno Pep-1 predstavlja s Trp bogat dimerizacijski motiv HIV-1 reverzne transkriptaze, medtem ko je hidrofilna domena enaka kot pri MPG.



Slika 1: Mehanizmi prehoda v celico.
Figure 1: Mechanisms of uptake.

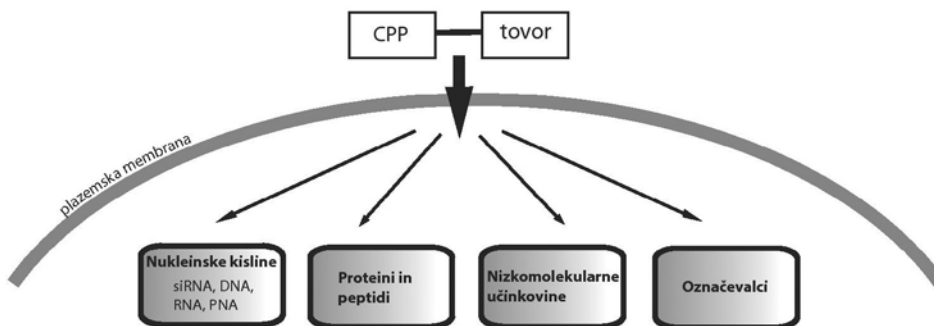
Dostavni peptidi lahko vstopajo v celico na dva načina: z vezikularnim transportom s porabo energije oziroma endocitozo ali pasivno s translokacijo preko lipidnega dvosloja (22), Slika 1. Vezava CPP na glikozaminoglikanske strukture na površini celice omogoča akumulacijo CPP, preko vpliva na membranske komponente (organizacija aktina, male GTPaze) pa olajša endocitozo, kot tudi pasiven prehod. Makropinocitoza je glavni način za internalizacijo kationskih peptidov, dostavni peptidi pa vstopajo v celice tudi z endocitozo odvisno od klatrina, lipidnih raftov ali kaveolina. Na način endocitotskega vstopa vplivajo poleg narave dostavnega peptida tudi lastnosti molekule tovora in tip celice. Več raziskav kaže na to, da je pri večini CPP istočasno prisotnih več različnih mehanizmov (2). To je še posebej značilno za amfifilne peptide, ki lahko v stiku z lipidnim okoljem spremenijo sekundarno strukturo in s tem destabilizirajo strukturo

membrane. Na osnovi tega raziskovalci sklepajo, da je sekundarna struktura in njena dinamika pomemben dejavnik pri prehajanju dostavnih peptidov preko membrane (23). Povišanje lokalne koncentracije CPP na površini celice olajša neendocitotski vstop, ki je verjetno povezan z lokalno in začasno destabilizacijo membrane. Med peptide, ki vstopajo pasivno sodita MPG in Pep-1, ki s svojimi hidrofobnimi deli vstopata v interakcijo z membranskimi lipidi ob tem pa tvorita začasne helikalne ali beta strukture. Za oba peptida v povezavi s tovorom so pokazali, da lahko spontano tvorita komplekse nanometrskih velikosti, ti pa omogočajo povišanje lokalne koncentracije peptida na celični površini. Kako tako veliki kompleksi prehajajo membrano brez negativnih stanskih učinkov, (na primer toksičnosti) še ni znano (24, 25).

Manj je znanega o znotrajceličnem transportu CPP, ki je ključen za to da molekula, ki jo CPP prenaša, doseže tarčno mesto. Po endocitoznem vstopu so CPP zaprti v endosomih. Sposobnost endosomalnega pobega je pomembna omejitev za dostavo učinkovin, v jedro ali citoplazmo. V primeru, ko se CPP predolgo zadrži v endosomih, konča v lizosomih, kjer ga proteaze razgradijo. *In vitro* lahko uporabimo snovi, ki povzročijo razpad endo/lizosomov kot je klorokvin in endosomolitični polimeri, vendar ti pristopi večinoma niso primerni za študije in uporabo *in vivo* (14). Endosomalni pobeg lahko omogočimo tudi z modifikacijo CPP, kar je potencialno uporabno *in vivo* saj s tem ne povzročimo lize celičnih organelov. Kadar želimo s CPP v celico dostaviti molekulo, npr. fragment nukleinske kisline, ki naj se vključi v celično DNA (transfekcija) ali vpliva na izražanje genov, je pomembno, da konstrukt CPP – tovor doseže celično jedro. Pri tem so zelo učinkoviti peptidi z motivom za lokalizacijo v jedro (»nuclear localization signal,« NLS) (2). Zneane so še druge strategije za povečanje transfekcijske učinkovitosti, ki npr. pri peptidu Tat vključujejo tudi fuzijo tega CPP z domeno hemaglutinina - HA2, proteina iz virusa influenzae, C terminalno cisteamidacijo in stearilacijo (14).

4 Uporaba dostavnih peptidov

Prednosti CPP kot transportnih molekul so v njihovi majhni citotoksičnosti in dejstvu, da lahko prenašajo molekule zelo različnih velikosti in lastnosti od nizkomolekularnih učinkovin do terapevtskih proteinov ter fragmentov nukleinskih kislin, Slika 2. Z uporabo CPP lahko izboljšamo prehod učinkovin preko membrane, da v celici dosežemo višje koncentracije in močnejšo jakost delovanja. Vse več raziskav pa je usmerjenih v povečanje celično oziroma organelno



Slika 2: Uporaba dostavnih peptidov za prenos različnih vrst tovarnih molekul (prirejeno po (22)).

Figure 2: Applications of cell penetrating peptides for transport of different types of cargo molecules (modified from (22)).

specifične dostave. Poleg prenosa učinkovin so CPP uporabni tudi za specifično označevanje celic in znotrajceličnih tarč (4, 22).

Molekula tovora je na dostavni peptid lahko vezana kovalentno ali nekovalentno. Kovalentno vez lahko vzpostavimo kemično z uporabo stranske verige primerne aminokislina, na primer amino skupine lizina ali tiolne skupine cisteina (15). V primeru, da je tovor protein ali peptid lahko kompleks sintetiziramo ali eksprimiramo v tandemu kot fuzijski protein (26). Pri kovalentni povezavi se lahko uporabi tudi bifunkcionalne povezovalne molekule, ki se na eni strani vežejo na CPP, na drugi pa na molekulo tovora (4). Pri nekovalentni povezavi pogosto sodelujejo ionske interakcije. Odvisno od lastnosti obeh partnerjev lahko nastanejo skupki kompleksov, kar vodi v nastanek nanodelcev, to pa je pri kovalentni vezavi manj verjetno (25).

4.1 Vnos nizko molekularnih učinkovin

Dostavni peptidi se uporabljajo za dostavo učinkovin, katerih uporabo omejujejo nekatere lastnosti, kot je velika lipofilnost ali slab prehod in porazdelitev v tkiva (22). Primer predstavlja dermalni vnos protivnetne molekule ciklosporina A v povezavi s CPP, ki omogoča prodor učinkovine v globlje ležeča tkiva in prenos zadostne količine učinkovine za terapevtski učinek (27). CPP pa so se izkazali tudi kot dobri prenašalci učinkovin v rakave celice, ki so odporne na kemoterapevtike. Primer predstavlja doksorubicin v konjugaciji s Tat-peptidom in transferinom, ki deluje citotoksično na doksorubicin odporno celično linijo (28). Podobno CPP omogočijo prenos metotreksata v celično linijo raka na dojkah odporno na to učinkovino (29). Te učinkovine sicer lahko vstopijo v celico, funkcija konjugacije s CPP pa je, da onemogoči njihovo izčrpavanje iz celice.

4.2 Vnos nukleinskih kislin

Prednost nukleinskih kislin pred tradicionalno uporabljenimi nizkomolekularnimi zdravili je v zelo veliki specifičnosti za tarčne molekule in majhni pojavnosti neželenih stranskih učinkov. V primerjavi s proteini so praktično neimunogene. V konjugaciji s CPP so v celice uspešno vnesli plazmide, protismiselne oligonukleotide in male interferenčne RNA (siRNA, short interfering RNA) (16). siRNA je navadno 21-23 baznih parov dolga dvovertična RNA, ki se vključuje v utišanje genov preko uravnavanja razgradnje mRNA (30).

S pomočjo CPP so plazmidno DNA vnesli tako v celice v kulturi kot tudi *in vivo* (16). Zaradi velikosti plazmidov in posledično velikega negativnega naboja je navadno mogoča le kovalentna vezava. V primeru nekovalentne vezave plazmidov in tovora, namreč nastanejo zelo veliki kompleksi, ki pogosto ne prehajajo membrane. Več raziskav kaže na to, da je za *in vivo* študije prenosa plazmidov bolj primerna uporaba polimerov in kompleksnih sistemov v primerjavi s preprostimi CPP pristopi, kjer je prenašalec monomeren peptid. Pri polimernih oziroma kompleksnih sistemih gre za povezavo posameznih peptidov v večjo molekulo, ki omogoča bolj učinkovit prenos (16). Transfeksijsko učinkovitost Tat-peptida so na primer povečali s tvorbo di- in tetramerov ali z disulfidno povezavo v linearne polimere (12).

Protismiselna-RNA tehnologija je osnovana na zaporedno specifični interakciji vnešenih oligonukleotidov s komplementarnim zaporedjem mRNA v citosolu ali jedru. Hibridizacija mRNA z oligonukleotidom prekine proteinsko sintezo z onemogočanjem prevajanja genske

informacije, z vzpodbujanjem razgradnje mRNA z endogeno RNAzo H ali s preprečevanjem zorenja pre-mRNA v funkcionalno mRNA (31). Problem hitre razgradnje oligonukleotidov v celici so uspešno rešili z uporabo različnih sintetičnih analogov, npr. PNA. S konjugacijo protismiselnih oligonukleotidov s CPP so dosegli biološki odgovor tako *in vitro* kot *in vivo*. Primer je dostava s transportanom povezane protismiselne PNA, usmerjene proti elementu, ki je odgovoren za transaktivacijo (TAR element) genoma virusa HIV v celična jedra, s čemer se je zmanjšala transaktivacija HIV-1 v celični liniji. Ta uspešna aplikacija je odprla možnosti za razvoj zdravil proti virusu HIV (32).

Uspešnost utišanja genskega izražanja s siRNA, ki je bila konjugirana s Tat-peptidom, je primerljiva tisti, pri kateri so kot transfekcijski medij uporabili lipofektamin. Z uporabo modificiranega penetratina in transportana in kovalentno vezano siRNA so v različnih linijah sesalčjih celic dosegli utišanje izražanja reporterskih proteinov (zelenega fluorescentnega proteina (GFP) in luciferaze) za obdobje do sedmih dni (33). Vnos siRNA s pomočjo CPP je bil uspešen tudi *in vivo* pri zdravljenju tumorjev. S subkutanim vnosom siRNA nekovalentno povezane s holesterol-oligo-D-argininom so uspešno zavrli izražanje angiogenega rastnega faktorja (VEGF), s čemer se je tumor sedemkrat zmanjšal (34).

4.3 Vnos proteinov in peptidov

Uporaba eksogenih proteinov in peptidov je dragoceno orodje pri zdravljenju številnih bolezni, oviro pri uporabi proteinov pa predstavlja vnos velikih makromolekul v celico. Raziskave kažejo, da je CPP možno uporabiti za vnos proteinov velikosti med 30 kDa (npr. GFP) do 120-150 kDa (npr. IgG) (22). Tako so npr. s pomočjo Tat-peptida in penetratina uspeli vnesti v celice imunoglobuline, ki so po prenosu ohranili sposobnost vezave na antigen (35). Učinkovit vnos omogoča tudi nekovalentna povezava med CPP in proteinom, kar so pokazali s primerom Pep-1 v kompleksu s peptidi, proteini in protitelesi. Takšen pristop poenostavlja pripravo kompleksov, saj ne zahteva dodatnih kemijskih modifikacij (2).

4.3.1 Raziskave vnosa *in vivo*

V preteklem desetletju so s pomočjo dostavnih peptidov v sesalčje celične linije uspešno vnesli proteine in peptide za zdravljenje različnih bolezni kot so rak in astma ter bolezni, katerih posledica je apoptoza. V večini primerov gre za CPP (Tat-peptid, penetratin, poliarginin, VP22), ki so kovalentno vezani s peptidi ali proteini ali za fuzijske proteine (tovor in CPP sta izražena v tandemu) (2).

Tumorski supresor p53 je DNA vezavni protein, ki lahko sproži apoptozo ali izražanje genov, ki so vključeni v biologijo raka in zato predstavlja tarčno molekulo pri zdravljenju raka. Z vnosom CPP kovalentno vezanih s peptidi, ki izvirajo iz p53, se obnovi funkcija tega transkripcijskega dejavnika v rakavih celicah. Primer je vnos C-terminalnega dela p53, ki upočasnjuje rast tumorja po intraperitonealnem vnosu v miši z β -celičnim limfomom (36), podoben učinek pa ima PNC-28, ki izhaja iz vezavne domene MDM-2 p53 (10). Proliferacijo celic, kot posledico raka, so uspešno zavrli z uporabo peptida iz N-terminalnega dela Smac proteina, ki inaktivira inhibitorje apoptoznih proteinov in poveča občutljivost za pro-apoptozne signale (37). Še ena uspešna metoda pa vključuje vnos proteinskih in peptidnih domen

naravnih proteinskih inhibitorjev (p16^{ink}, p21, p15, p27^{kip}) od ciklina odvisnih kinaz, ki so vključene v uravnavanje celičnega cikla (38).

Deregulacija apoptoze je povezana s številnimi boleznimi, za regulacijo pa se pri raziskavah uspešno uporablja s CPP posredovan vnos peptidov in proteinov na ravni sesalčjih celičnih linij. Apoptozo so uspešno zavrli z vnosom inhibitorja kaspaze 8 FLIP (39) in peptida iz Bcl2 (ki je vključen v regulacijo permeabilnosti zunanje membrane mitohondrija) (40). V obeh primerih so za prenos uporabili Tat-peptid, medtem, ko so s Pep-1 vnesli proteine za pospešitev apoptoze alveolarnih sten v pljučih miši oz. za popraviljanje napak pri delovanju protein kinaze A (41, 42).

Uporaba CPP za prenos učinkovin preko krvno-možganske bariere predstavlja novo možnost za izboljšanje izida ishemijskih stanj. Proteine in peptide, ki preprečujejo možgansko ishemijo pri poškodbah, npr. Tat-cJNK peptid ter Bclxl protein, ki zmanjša odmiranje živčnih celic v področju ishemičnih poškodb, so vnesli vezane na Tat-peptid (43). Poleg Tat-peptida, sta prenosa snovi preko krvno-možganske bariere sposobna tudi D-penetratin in Pep-1.

V celični liniji človeških eozinofilcev so s pomočjo dostavnih peptidov uspešno preprečili pretiran imunski odziv, kar je pomembno pri zdravljenju astme. Dominantno negativna oblika Ras ali fosfoinozitol 3 kinaza v povezavi s Tat-peptidom zavirata vnetni odgovor dihalnih poti (44). Proteini in peptidi vezani na Tat-peptid omogočajo vnos antigenskih molekul za zdravljenje alergij ali pripravo cepiv (45).

5 Tkivna specifičnost

Za uporabo učinkovine v terapevtske namene je ključna specifičnost za določena tarčna tkiva, v katera želimo dostaviti molekulo tovora. Specifičnost za tumorsko tkivo peptida pVEC so povečali s povezavo s peptidom PEGA, ki se akumulira v celicah raka dojke. PEGA sam po sebi ne prehaja celične membrane, v konjugaciji z dostavnim peptidom in zdravilom za zdravljenje raka klorambucilom pa omogoča 4-kratno povečanje učinkovitosti klorambucila v celičnih linijah rakavih celic (11).

Drugi pristop k povečanju specifičnosti dostavnega peptida za tarčno mesto je, da v kompleks CPP-tovor vključijo zaporedje, ki inaktivira sposobnost CPP za vstop v celico, a se na tarčnem mestu encimsko cepi. Tako kompleks CPP-tovor vstopa le v tkivo v katerem so specifični encimi, ki aktivirajo dostavni peptid. Tako so polikationske CPP inaktivirali s polianionskimi peptidnimi zaporedji, za reaktivacijo CPP pa so poskrbele metaloproteaze na tarčnem mestu (46).

6 Predklinične in klinične raziskave

Trenutno potekajo številne predklinične in tudi nekaj kliničnih raziskav, ki temeljijo na dermalnem ali sistemskem vnosu različnih zdravilnih učinkovin s CPP. Leta 2003 je bila opravljena klinična študija faze II, pri kateri gre za dermalni vnos kompleksa ciklosporin-poliarginin, ki učinkovito prodira v kožo, vstopa v kožne limfocite T in inhibira kožna vnetja (27). Poteka tudi študija faze II zdravljenja akutnega srčnega infarkta in cerebralne ishemije z inhibitorjem protein kinaze C v kompleksu s Tat-peptidom (47). Obetavne so študije vnosa

oligonukleotidov za popraviljanje sestavljanja pre-mRNA z oligoarginini v povezavi s 6-aminoheksanojsko kislino in zdravljenje različnih boleznih z vnosom nekovalentnega kompleksa Tat-siRNA (2).

7 Sklep

Dostavni peptidi predstavljajo novo inovativno orodje za povečanje biološke uporabnosti potencialno farmakološko učinkovitih molekul, ki vključujejo nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine in nukleinske kisline. Prednost uporabe dostavnih peptidov je v hitrem in zelo učinkovitem vnosu v celice, stabilnosti CPP v telesnih tekočinah ter netoksičnosti. Uspešnost predkliničnih študij je razkrila velike možnosti, ki jih imajo CPP za uporabo v terapevtske namene, pa naj si bodo z učinkovino povezani kovalentno ali nekovalentno. V bližnji prihodnosti lahko pričakujemo prva komercialno dostopna zdravila, ki temeljijo na uporabi CPP, za prihodnost pa ostane izziv povečanja specifičnosti vnosa v tarčno tkivo.

8 Literatura

1. Cegnar M, Kristl J. Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. *Med razgl* 2005; 44(4): 447-462.
2. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 2009; 157(2): 195-206.
3. El-Andaloussi S, Holm T, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr Pharm Des* 2005; 11(28): 3597-3611.
4. Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(4): 529-545.
5. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 55(6): 1189-1193.
6. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997; 272(25): 16010-16017.
7. Derossi D, Joliet AH, Chassaing G et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10444-10450.
8. Pooga M, Soomets U, Hallbrink M et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 1998; 16(9): 857-861.
9. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; 285(5433): 1569-1572.
10. Bowne WB, Michl J, Bluth MH et al. Novel peptides from the RAS-p21 and p53 proteins for the treatment of cancer. *Cancer Ther* 2007; 5B(331-344).
11. Myrberg H, Zhang L, Mae M et al. Design of a tumor-homing cell-penetrating peptide. *Bioconjug Chem* 2008; 19(1): 70-75.
12. Rudolph C, Plank C, Lausier J et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 Tat protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 11411-11418.
13. Soomets U, Lindgren M, Gallet X et al. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467(1): 165-176.
14. Mae M, El Andaloussi S, Lundin P et al. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 2009; 134(3): 221-227.
15. Pooga M, Hallbrink M, Zorko M et al. Cell penetration by transportan. *FASEB J* 1998; 12(1): 67-77.
16. Veldhoen S, Laufer SD, Restle T. Recent developments in Peptide-based nucleic Acid delivery. *Int J Mol Sci* 2008; 9(7): 1276-1320.
17. Elmquist A, Lindgren M, Bartfai T et al. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 2001; 269(2): 237-244.
18. Morris MC, Vidal P, Chaloin L et al. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(14): 2730-2736.

19. Deshayes S, Heitz A, Morris MC et al. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* 2004; 43(6): 1449-1457.
20. Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K et al. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(24): 13003-13008.
21. Oehlke J, Scheller A, Wiesner B et al. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1414(1-2): 127-139.
22. Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 2008; 6(13): 2242-2255.
23. Lundberg P, El-Andaloussi S, Sutlu T et al. Delivery of short interfering RNA using endosomalolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* 2007; 21(11): 2664-2671.
24. Morris MC, Deshayes S, Heitz F et al. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell* 2008; 100(4): 201-217.
25. Munoz-Morris MA, Heitz F, Divita G et al. The peptide carrier Pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(4): 877-882.
26. Lin YZ, Yao SY, Veach RA et al. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995; 270(24): 14255-14258.
27. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* 2000; 6(11): 1253-1257.
28. Liang JF, Yang VC. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(22): 5071-5075.
29. Lindgren M, Rosenthal-Aizman K, Saar K et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(4): 416-425.
30. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009; 457(7228): 426-433.
31. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(5-6): 533-540.
32. Chaubey B, Tripathi S, Ganguly S et al. A PNA-transporter conjugate targeted to the TAR region of the HIV-1 genome exhibits both antiviral and virucidal properties. *Virology* 2005; 331(2): 418-428.
33. Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett* 2004; 558(1-3): 63-68.
34. Efimov V, Choob M, Buryakova A et al. PNA-related oligonucleotide mimics and their evaluation for nucleic acid hybridization studies and analysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001; 20(4-7): 419-428.
35. Hu M, Wang J, Chen P et al. HIV-1 Tat peptide immunoconjugates differentially sensitize breast cancer cells to selected antiproliferative agents that induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF-1/CIP-1. *Bioconjug Chem* 2006; 17(5): 1280-1287.
36. Tang X, Molina M, Amar S. p53 short peptide (p53pep164) regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor/cytokine expression. *Cancer Res* 2007; 67(3): 1308-1316.
37. Fulda S, Wick W, Weller M et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002; 8(8): 808-815.
38. Hosotani R, Miyamoto Y, Fujimoto K et al. Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4): 1271-1276.
39. Krautwald S, Ziegler E, Tiede K et al. Transduction of the TAT-FLIP fusion protein results in transient resistance to Fas-induced apoptosis in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 44005-44011.
40. Sugioka R, Shimizu S, Funatsu T et al. BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene* 2003; 22(52): 8432-8440.
41. Maron MB, Folkesson HG, Stader SM et al. PKA delivery to the distal lung air spaces increases alveolar liquid clearance after isoproterenol-induced alveolar epithelial PKA desensitization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(2): L349-354.
42. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(5): 555-562.
43. Cao G, Pei W, Ge H et al. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 2002; 22(13): 5423-5431.
44. Myou S, Leff AR, Myo S et al. Activation of group IV cytosolic phospholipase A2 in human eosinophils by phosphoinositide 3-kinase through a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Immunol* 2003; 171(8): 4399-4405.
45. Rhyner C, Kundig T, Akdis CA et al. Targeting the MHC II presentation pathway in allergy vaccine development. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 833-834.
46. Jiang T, Olson ES, Nguyen QT et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(51): 17867-17872.
47. Chen L, Harrison SD. Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 821-825.