

Péptidos penetrantes celulares: descripción, mecanismo y aplicaciones*

Alicia Rioboo, Iván Gallego y Javier Montenegro

Resumen: La membrana plasmática protege a la célula de la entrada de moléculas bioactivas hidrofílicas como el ADN, proteínas, anticuerpos, etc. Los péptidos penetrantes en células (CPPs) son péptidos cortos, normalmente con carga positiva, que pueden atravesar las membranas celulares y liberar una gran variedad de cargos en su interior. Los CPPs pueden usarse para la entrega intracelular de nucleótidos, polímeros, nanopartículas, liposomas, péptidos y proteínas. Sin embargo, todavía presentan limitaciones de selectividad, escape endosomal y citotoxicidad. Por ello, resulta fundamental continuar estudiando los CPPs para el tratamiento de enfermedades con los agentes terapéuticos de nueva generación.

Palabras clave: Péptidos penetrantes de células (CPPs), química biológica, química supramolecular.

Abstract: The plasma membrane protects the cell from the entry of bioactive hydrophilic macromolecules such as DNA, proteins, antibiotics, etc. Cell penetrating peptides (CPPs) are small peptides (< 20 amino acids), commonly positively charged, which can cross the cell membrane and deliver different cargos. CPPs can be used for the intracellular delivery of different macromolecules such as nucleotides, polymers, nanoparticles, liposomes and proteins. However, CPPs still present limitations related with cell selectivity, endosomal escape and cytotoxicity. It is thus essential to continue the study of CPPs for the delivery and the treatment of diseases with the next generation of therapeutic agents.

Keywords: Cell penetrating peptides (CPPs), chemical biology, supramolecular chemistry.

* Este trabajo está dedicado a la memoria del profesor Roger Tsien (1952-2016), premio Nobel de Química de 2008 por sus trabajos en el campo de las proteínas fluorescentes (Lippard S. J., *Science*, **2016**, 354, 41). Por ser la fuente de inspiración de químicos y científicos de generaciones y generaciones por venir. *The flame that burns twice as bright burns half as long.* Lao-Tzu.

INTRODUCCIÓN

Muchos de los compuestos biológicamente activos necesitan ser liberados en el interior celular para ejercer su acción terapéutica en el citoplasma, en el núcleo o en otros orgánulos específicos. Sin embargo, la membrana plasmática actúa como una barrera hidrofóbica que impide el paso de las macromoléculas exógenas como moléculas de gran peso molecular, moléculas polares o cargadas.^[1] Por este motivo, los prometedores agentes terapéuticos de nueva generación como los ácidos nucleicos, las proteínas y los anticuerpos, no pueden en muchos casos alcanzar su diana intracelular.^[2,3] En 1988 los hallazgos de Green, Loewenstein, Frankel y Pabo documentaron de manera in-

dependiente que la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), a diferencia de la mayoría de proteínas, internalizaba eficientemente en el interior celular cuando se añadía al medio de cultivo y se localizaba en el núcleo.^[4,5] La proteína TAT es un factor de activación de la transcripción constituido por 86 aminoácidos.^[5] Dicha proteína contiene regiones hélice α con características anfipáticas (TAT₃₈₋₄₉, con el motivo RKGLGI) y un dominio de aminoácidos básicos (TAT₄₉₋₅₇) que se encuentra desestructurado por la repulsión entre las cargas positivas. En 1997 B. Lebleu, durante el estudio del anómalo comportamiento de TAT-VIH, supuso que la región anfipática hélice α era la responsable de la captación celular.

Sin embargo, posteriormente se descubrió que esta secuencia no era responsable de la internalización celular. La función con características penetrantes pertenecía al dominio catiónico adyacente, lo que se denominó péptido TAT (TAT₄₉₋₅₇, RKRRQR).^[6] Cualquier cambio en la secuencia de TAT₄₉₋₅₇ producía una reducción de su capacidad para atravesar la membrana plasmática. Por lo tanto, la capacidad de penetración a través de la membrana se asignó a pequeñas secuencias peptídicas altamente ricas en residuos básicos catiónicos. Estas secuencias se denominaron Dominios de Transducción de Proteínas (PTDs) o Péptidos Penetrantes de Células (CPPs).^[6] Estas propiedades de translocación también fueron encontradas en el homeodominio de Antennapedia, descubierta por primera vez en *Drosophila* por A. Prochiantz en 1994.^[7] Las homeoproteínas son una clase de factores de transcripción que se unen al ADN a través de secuencias



A. Rioboo^[a, b]

I. Gallego^[a, b]

J. Montenegro^[a]

^[a] Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela (España).

^[b] Ambos autores contribuyeron de forma equitativa a este trabajo.

C-e: javier.montenegro@usc.es

Recibido: 02/11/2018. Aceptado: 17/02/2019.

específicas de 60 aminoácidos denominados homeodominios y que están estructurados en tres hélices α .^[3] La tercera hélice del homeodominio Antennapedia era la responsable del proceso de translocación. Esta mínima secuencia penetrante que corresponde con los residuos comprendidos entre 43-58 de Antennapedia se denominó Penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK).^[7,8] En 1997, estas características penetrantes también fueron encontradas en la proteína estructural VP22 (NAATATRGRSAASRPTQRPRAPARSASRPRRPVQ) del virus del herpes (HSV-1).^[9]

Estos descubrimientos iniciales que demostraban el potencial de los CPPs, provocaron la aparición de numerosos trabajos en los cuales se describían diferentes secuencias peptídicas penetrantes unidas a diferentes cargos moleculares para su internalización celular.^[10] Además, estos hallazgos permitieron el uso de este conocimiento para expandir este nuevo y prometedor campo con el estudio de numerosas estructuras con propiedades penetrantes y desarrollar al máximo el alcance de esta

nueva estrategia de transporte y liberación. En la Figura 1 se detalla la evolución temporal de las diferentes secuencias de péptidos penetrantes hasta la fecha. Después de los descubrimientos iniciales desarrollados por diferentes grupos de biología y bioquímica, varios grupos químicos comenzaron a explorar e investigar las diferentes características moleculares que gobernaban el comportamiento de los CPPs. El grupo del profesor P. Wender estudió las características de TAT₄₉₋₅₇ involucradas en el paso a través de la membrana. Para ello intercambiaba cada uno de los aminoácidos de TAT por una alanina y demostró que todas las sustituciones disminuían la internalización a excepción del intercambio de la glutamina.^[2]

Estudios pioneros llevados a cabo por la doctora Naomi Sakai y el profesor Stefan Matile demostraron la gran importancia del intercambio de contraiones de los aminoácidos *positivos* de arginina y las membranas *negativas* de las células. Los grupos guanidinio de las argininas se encuentran protonados a pH fisiológico, por lo que adquieren

© 2019 Real Sociedad Española de Química

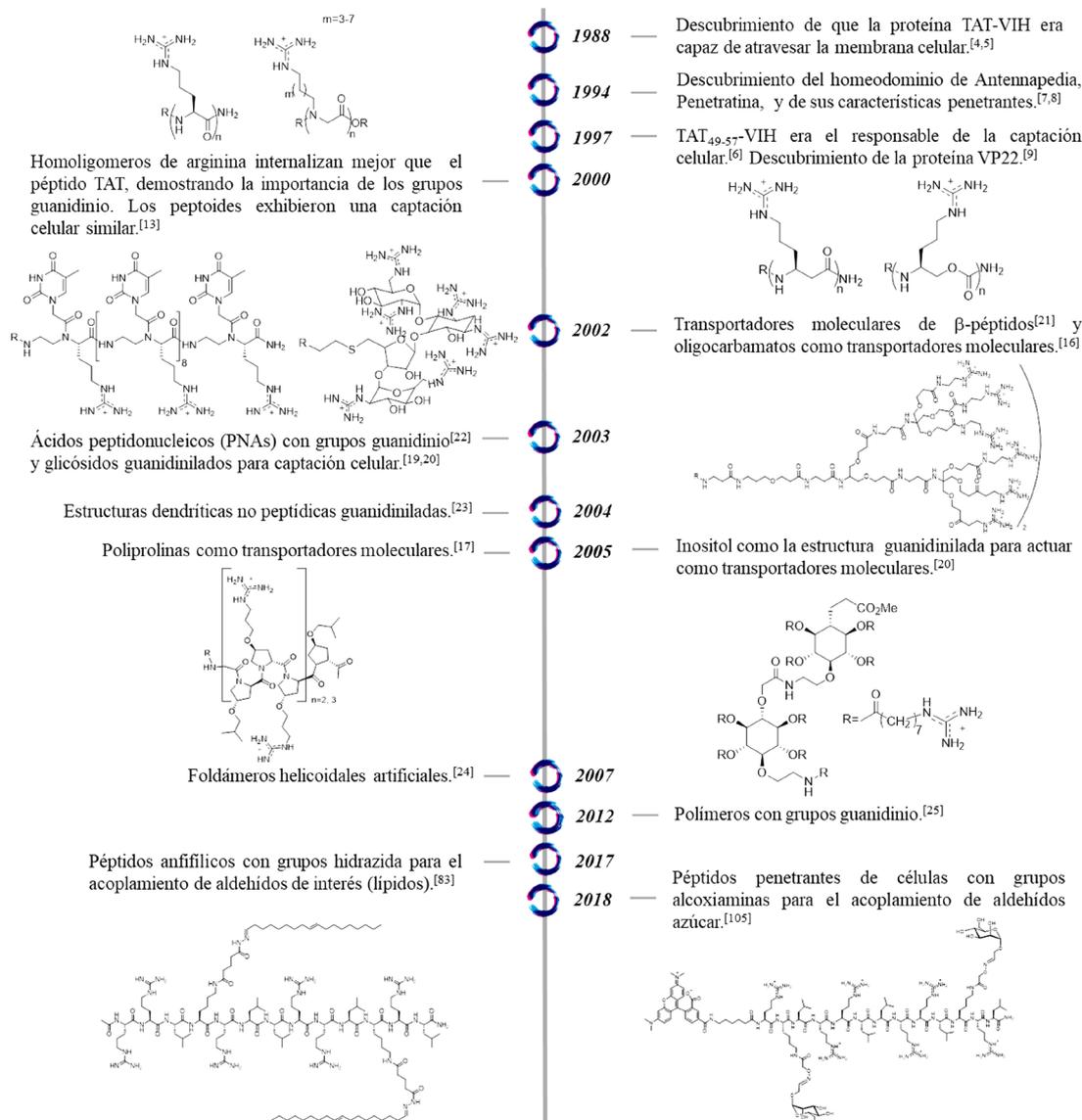


Figura 1. Representación de la línea del tiempo del desarrollo de diferentes transportadores moleculares con estructuras ricas en grupos guanidinio

carga positiva y se repelen entre sí. Como no consiguen desprotonarse parcialmente, dado su elevado valor de pKa (~ 12.5) y para poder minimizar las repulsiones electrostáticas, su única alternativa es la unirse a los aniones presentes en el medio que los rodea. De este modo, pueden unirse a diversos contraiones e intercambiarlos. Cuando este anión es hidrofóbico, como, por ejemplo, un lípido aniónico, el complejo electrostático formado adquiere un carácter anfifílico (hidrofílico e hidrofóbico simultáneamente) lo que favorece enormemente el proceso de translocación de membrana e internalización celular.^[11,12] Esta necesidad de complejarse con contraiones cargados negativamente a pH fisiológico maximiza la interacción electrostática de las oligoargininas con los componentes aniónicos de la membrana celular y es responsable del anclaje y posterior translocación de los CPPS a través de la membrana celular.

Posteriormente, el grupo del profesor Wender estudió cómo los homoligómeros de lisina eran menos efectivos que TAT₄₉₋₅₇, y, sin embargo, los de arginina eran mucho más efectivos.^[13] Propusieron así que esta diferencia se debía a que los grupos guanidinio de las argininas, en contraste con los grupos amonio de las lisinas, podían formar enlaces de hidrógeno bidentados con la superficie aniónica de los grupos fosfato de la membrana lipídica como proceso inicial de la entrada celular.^[14] Basándonos en el modelo de Matile,^[11,12] las oligolisinas, con un pKa de ~ 9.7 , sí que podrían desprotonarse parcialmente a pH fisiológico para minimizar las repulsiones electrostáticas y por lo tanto perderían la carga positiva responsable de la interacción con los contraiones negativos presentes en la membrana plasmática. Además, dichas interacciones también pueden ocurrir con ácidos carboxílicos y los sulfonatos presentes en la membrana (Figura 2). Estas aportaciones permitieron el desarrollo de poliargininas sintéticas (R)_n (n = 6–12), lo que a día de hoy se emplea como CPPs de referencia y los cuales internalizan en el interior celular más eficientemente que otros homopolímeros policationicos.^[15]

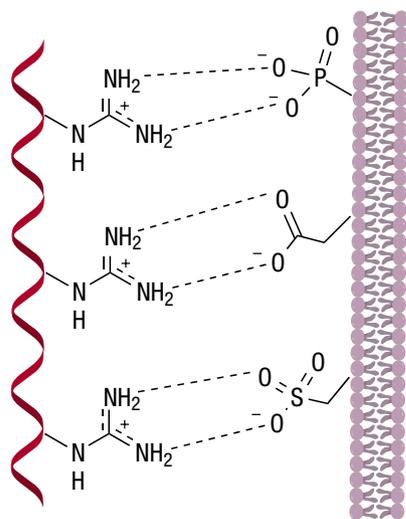


Figura 2. Representación de los enlaces de hidrógeno bidentados entre los grupos guanidinio de las argininas y, de arriba abajo, los grupos aniónicos presentes en las membranas lipídicas (grupos fosfato, carboxilato y sulfonato)

El intercambio en TAT₄₉₋₅₇ de los L-aminoácidos por los D-aminoácidos y la inversión del orden demostró que las propiedades penetrantes se mantenían a pesar de los cambios estereo y regio-químicos.^[13] Estos estudios pusieron de manifiesto que el esqueleto peptídico no era absolutamente necesario para la función penetrante. Por este motivo, se sintetizaron diferentes peptoides (péptidos en los cuales las cadenas laterales se encuentran unidas al átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico) con cadenas laterales de grupos guanidinio exhibiendo una captación similar a las oligoargininas.^[13] También se prepararon estructuras más espaciadas entre el peptoide y los grupos guanidinio, mejorando así la captación celular y sugiriendo que la flexibilidad es beneficiosa en las propiedades de translocación, aunque en este caso es posible que el aumento de la hidrofobicidad debido a los espaciadores también tuviese una repercusión en la capacidad de transporte del péptido penetrante.^[13] Posteriores estudios exploraron el cambio de la amida de los péptidos y peptoides por grupos carbamato, exhibiendo una internalización igual de eficiente.^[16] La translocación celular de estos carbamatos, así como otros transportadores ricos en grupos guanidinio pero con una estructura no natural (β -TAT₄₉₋₅₇, β -poli-Arg o D-TAT₄₉₋₅₇), demostraron que el esqueleto peptídico de los transportadores actuaba como un mero soporte donde se disponían los grupos cationicos. Sin embargo, se demostró que el esqueleto peptídico puede jugar un papel muy importante al determinar la disposición y ordenamiento de los grupos cationicos, lo que supone consecuencias importantes para la internalización celular.^[17,18] Resultó así muy interesante, dentro de los transportadores moleculares, el diseño estructural introducido por Giralt,^[19] de poliprolinas con conformación helicoidal II, a las cuales se les incorporaron grupos hidrofóbicos y cationicos (grupos amino y guanidinio) y que mostraron una mejor y más eficiente captación celular cuando presentaban los grupos guanidinio alineados en su estructura.^[20] Otro caso es el de hélices de oligoalaninas, las cuales facilitan el estudio de las capacidades penetrantes en función de la distribución topológica tridimensional de los aminoácidos.^[21] Además se sintetizaron glicósidos guanidilados de varios derivados de productos naturales como Tobramycin y Neomycin B, los cuales exhibieron una eficacia de translocación a través de la membrana excepcional y que compartía similares mecanismos de captación que los péptidos de poliarginina.^[22,23] Además también diferentes β -péptidos,^[24] ácidos nucleicos (PNAs),^[25] estructuras dendríticas no peptídicas guanidiladas,^[26] foldámeros helicoidales artificiales^[27] o polímeros^[28] mostraron una eficiencia en la internalización similar a TAT₄₉₋₅₇.

CLASIFICACIÓN

A día de hoy, el nombre de CPPs designa una gran superfamilia de péptidos que difieren en su longitud, carga, hidrofobicidad, flexibilidad y solubilidad. La alta diversidad natural de los CPPs tanto en sus propiedades físico-químicas como biológicas ha complicado la elaboración de una definición exacta para los CPPs y también de una clasificación precisa dependiente de sus características estructurales.

En diferentes revisiones en la bibliografía se han realizado detalladas taxonomías de las diferentes clases de péptidos penetrantes.^[10, 29-31] Según su **origen y naturaleza**, los CPPs se pueden clasificar según sean péptidos naturales (derivados de proteínas) o péptidos sintéticos (con aminoácidos artificiales). Dentro de esta clasificación es fundamental distinguir a los CPPs quimeras, fusión de dos péptidos diferentes, los cuales podrían considerarse como un punto intermedio desde los péptidos naturales a los puramente sintéticos o artificiales. En la Tabla 1 se muestra un resumen de estas y otras secuencias peptídicas con capacidad penetrante. La clasificación de los CPPs como naturales, quiméricos o sintéticos es una de las más utilizadas. Sin embargo, todavía resulta complicado relacionar la estructura y secuencia de los CPPs con su capacidad de internalización y localización intracelular.

Tabla 1. Selección de los Péptidos penetrantes en Células más representativos clasificados según su origen o naturaleza. Natural (N), quimérico (Q) y sintético (S)

SECUENCIA	NOMBRE	TIPO	REF.
Catiónicos			
RKKRRQRRR	pTAT ₄₉₋₅₇	N	[4,5,6]
RQIKIWFQNRRMKWKK	Penetratina	N	[7]
(R) _n ; n = 6–12	Poliarginina	S	[15]
LLIILRRIRKQAHASK	pVEC	N	[32]
RVIRVWFQNKRCCKDKK	Islet-1	N	[33]
SQIKIWFQNKRAIKK	Engrailed-2	N	[34]
Anfipáticos			
KETWWETWWTEWSQPKK-KRKV	Pep-1	Q	[35]
GALFLGFLGAAGSTMGA	MPG	Q	[36]
GWTLSNAGYLLGKINLKA-LAALAKKIL	Transportan	Q	[37]
GLWRALWRLRLSLWRL-WRA	CADY	S	[38]
KLALKALKALKALKLA	MAP (modelo de CPP anfipático)	S	[39]
NAATATGRSAASRPTQRPRAPAR-SASRPRRPVQ	VP22	N	[9]
(vXLPPP) _n	Péptidos ricos en prolinas	N	[40-43]
Hidrofóbicos			
AAVLLPVLLAAP	K-FGF	N	[44]
Aniónicos			
LKTLTETLKELTKLTEL	MAP12	S	[45]

Según sus **propiedades físico-químicas**, los CPPs pueden clasificarse en función de su carga o hidrofobicidad. Esta división se realiza en catiónicos, anfipáticos (presentan dos caras, una cara hidrofílica o cargada, y una región hidrofóbica) y finalmente hidrofóbicos.^[46] Algunos péptidos aniónicos contribuyen raramente al aumento de la familia de los CPPs.^[47] Sin embargo, continuamente siguen surgiendo péptidos penetrantes de nueva generación con características mejoradas fruto de recientes esfuerzos investigadores.^[29,47,48]

MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN

Los mecanismos de transporte se clasifican en transporte pasivo y transporte activo.^[49,50] El **transporte pasivo o independiente de energía** hace referencia al movimiento de sustancias o moléculas sin la necesidad de un aporte extra de energía, por lo que tan solo puede llevarse a cabo en el sentido favorecido por un gradiente de concentración o carga. Las cuatro clases principales de transporte pasivo son filtración, ósmosis, difusión simple y difusión facilitada (mediada por proteínas de membrana especiales). En este tipo de transporte, el intercambio de contraiones llevado a cabo por los grupos guanidinio de los residuos de arginina juega un papel muy importante. De este modo, permite al péptido adquirir un carácter hidrofílico o hidrofóbico según sus necesidades hasta alcanzar el interior celular.^[11] El **transporte activo o dependiente de energía celular** tiene lugar en contra de un gradiente de concentración o electroquímico motivo por el cual necesita la energía de las células. Una de las más importantes es la bomba de Na⁺/K⁺ la cual utiliza la energía celular en forma de ATP (Adenosín trifosfato). Especial mención requiere la endocitosis, otro de los mecanismos responsables de la internalización celular. La endocitosis incluye la fagocitosis y la pinocitosis, y es un proceso que utilizan las células para la internalización de solutos y fluidos del medio extracelular. Así, la endocitosis es el proceso de la ingestión celular con la cual la membrana plasmática se pliega hacia el interior para aportar diferentes sustancias a la célula. La fagocitosis se lleva a cabo en células especializadas (macrófagos y neutrófilos) utilizada para la internalización de grandes partículas. En cambio la pinocitosis tiene lugar en todo tipo de células para la absorción de material extracelular, líquido con posibles moléculas disueltas. La pinocitosis puede clasificarse en varios tipos de vías: macropinocitosis (tipo de pinocitosis que se caracteriza por la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática), endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por caveolina.^[1,51]

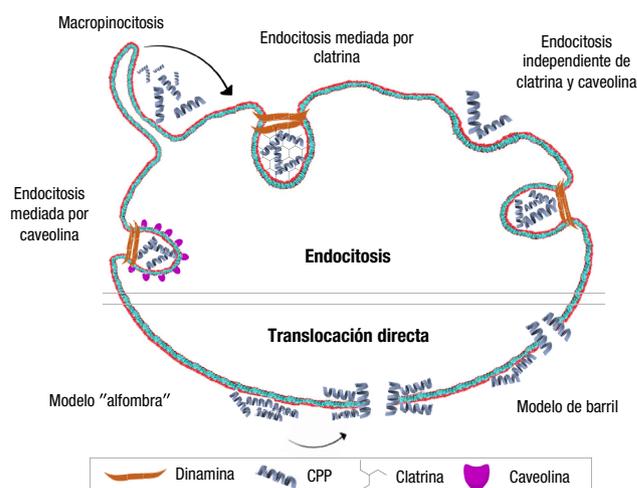


Figura 3. Posibles mecanismos de internalización celular

Existe un gran interés en comprender las reglas generales que regulan la captación de los péptidos penetrantes en células como por ejemplo los efectos de la longitud del péptido o las propiedades químicas. Es conocido que pequeñas diferencias estructurales causan considerables diferencias en los mecanismos de internalización y localización celular de los CPPs.^[46] Por ello, numerosas investigaciones se han llevado a cabo para dilucidar el mecanismo de internalización de los CPPs y, sin embargo, los detalles moleculares responsables de los diferentes métodos de translocación al interior celular todavía son fuente de controversia.^[11] Inicialmente se pensó que la internalización de péptidos ricos en residuos de arginina como TAT₄₉₋₅₇ o las poliargininas parecían atravesar la membrana plasmática mediante mecanismos independientes de energía que no requerían un camino de internalización endocítico.^[6] Posteriores investigaciones esclarecieron un posible artefacto debido al análisis de la internalización de los CPPs tras la fijación de las células.^[52] Este proceso de fijación causaba rupturas y perturbaciones en las membranas afectando a la absorción de los péptidos de la superficie de la membrana plasmática o los cargados en endosomas, dando lugar a una difusión en el citosol e incluso una localización nuclear.^[52-54] A partir de entonces todos los estudios se realizaron en célula viva y sin fijación, encontrando predominantemente estructuras punteadas.^[52] Además, cuando las células fueron tratadas con los CPPs a 4°C (condiciones de inhibición del mecanismo de endocitosis) se observó una disminución de la internalización con ausencia de las estructuras punteadas.^[53] Estos resultados sugieren un camino endocítico como mecanismo de captación de estos péptidos. Además se han sugerido la contribución de una gran variedad de mecanismos de endocitosis, incluyendo el mediado por clatrina,^[53] caveolina^[55] o la macropinocitosis,^[56-59] siendo esta última ruta una de las principales de los CPPs catiónicos.

El grupo de investigación del profesor S. F. Dowdy descubrió la importancia de la macropinocitosis en la captación celular de proteínas mediada por TAT.^[59] También demostraron que la internalización era inhibida por inhibidores como Amilorida (un intercambiador Na⁺/H⁺, el

cual ha sido documentado como inhibidor de la macropinocitosis), publicada también para la inhibición de R8.^[59] Estos resultados sugieren que la macropinocitosis juega el rol más importante en la captación endocítica de péptidos ricos en residuos de arginina y sus derivados.^[60] El profesor Shiroh Futaki en Kyoto también observó, a una concentración determinada, una internalización difusa y localización en el citoplasma y núcleo de péptidos ricos en argininas a 4°C aunque con menos eficacia que a 37°C en células vivas sin fijación. Esto sugiere que a pesar de que el camino mayoritario de internalización suele ser endocitosis es posible que una fracción de péptido pueda acceder al citosol con ausencia del mecanismo endocítico.^[54,60]

En cuanto a la Penetratina, aunque se trata de un péptido básico, presenta una estructura anfifílica con un triptófano fundamental para su internalización.^[7] Por esta razón se pensó que los péptidos policatiónicos presentaban un mecanismo de captación diferente a lo que ocurriría con la Penetratina.^[61] Además, el uso de inhibidores de la macropinocitosis, análogos de Amilorida, mostró inhibición en la translocación de péptidos R8 y TAT 10 μM sin encontrarse esta inhibición en la captación de Penetratina 10 μM. Sin embargo, sí se observó inhibición cuando las células fueron tratadas con 50 μM de Penetratina.^[54] Estos resultados sugirieron no solo diferentes mecanismos de captación entre péptidos policatiónicos y Penetratina, sino también que el mismo CPP podría usar más de un mecanismo de internalización dependiendo de condiciones como por ejemplo la concentración. Esto ocurre especialmente con péptidos anfipáticos los cuales tienden a interactuar con los lípidos y adoptar una estructura secundaria con la membrana, lo que modifica la integridad de la bicapa lipídica.

En los mecanismos de internalización de los CPPs es imprescindible mencionar el papel fundamental de los proteoglicanos, en concreto los que contienen Heparán sulfato (HSPG).^[63,64] Los proteoglicanos son una clase especial de glicoproteínas, formadas por un núcleo proteico unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos, los glucosaminoglicanos, que presentan la peculiaridad de encontrarse cargados negativamente bajo condiciones fisiológicas, debido a la presencia de grupos sulfato. Las interacciones electrostáticas entre los CPPs y estas proteínas aniónicas de membrana facilitan su acumulación sobre la superficie celular, desencadenando posteriormente diferentes mecanismos de entrada dependiendo del CPP. Por ello, la deficiencia de HSPG en algunas líneas celulares (por ejemplo, CHO) provoca una disminución de la internalización de los CPPs. Se observó como los proteoglicanos eran indispensables para la reorganización de actina y la captación por macropinocitosis.^[57] Como uno de los hallazgos más recientes en cuanto a los mecanismos de internalización de los CPPs, cabe destacar el descubrimiento por parte del grupo de investigación del profesor Futaki del receptor Syndecan-4, el cual favorece la internalización de R8 a través de un mecanismo de macropinocitosis.^[65] Aunque es difícil establecer un esquema general del mecanismo de captación de los CPPs y estos todavía siguen siendo discutidos, existe un consenso general en el que el primer contacto entre CPPs y la superficie celular tiene lugar a través de las interacciones electrostáticas con los

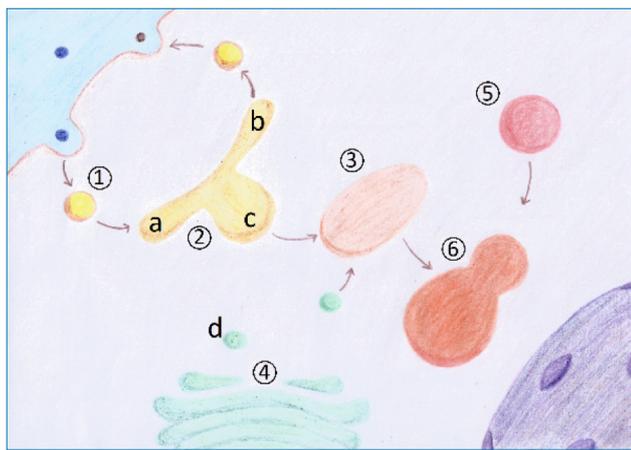


Figura 4. Representación gráfica del proceso de maduración de los endosomas. 1. Vesículas endocíticas. 2. Endosoma temprano, con sus regiones de: (a) recepción de vesículas, (b) reciclaje y (c) vacuolar. 3. Endosoma tardío. 4. Aparato de Golgi, que envía vesículas e hidrolasas ácidas (d) al endosoma tardío. 5. Lisosoma. 6. Endolisosoma.^[62]

proteoglicanos, y que posteriormente el camino de captación celular depende de varios parámetros incluyendo: la naturaleza y estructura secundaria de los CPPs, su habilidad para interactuar con la superficie celular y los componentes lipídicos de la membrana, la naturaleza, el tipo y la concentración activa del cargo y el tipo de célula y composición de la membrana.

ESCAPE ENDOSOMAL

Además de la difícil tarea de atravesar la membrana plasmática, los CPPs cuentan con otra importante barrera para poder entregar con éxito en el interior celular el cargo correspondiente: escapar de los endosomas. Los endosomas son orgánulos celulares que procesan moléculas internalizadas desde el exterior celular. Como ya se ha comentado, la endocitosis es una de las principales rutas de internalización celular que siguen los CPPs y, por ello, es importante conocer sus características biológicas para poder entender cómo abordar el reto del escape endosomal. Los endosomas sufren importantes transformaciones desde su creación en las membranas plasmáticas hasta su fusión con los lisosomas. En cada etapa cuentan con funciones y propiedades claramente diferenciadas que permiten hablar de una ruta de maduración bien definida. Dicho proceso se inicia con el nacimiento de los endosomas tempranos. Estos endosomas están presentes en la periferia celular y son los encargados de recibir los fluidos y moléculas procedentes de vesículas endocíticas. Se caracterizan por tener un pH entre 6.8 y 6.1 y por su baja concentración de Ca^{2+} . Además de una zona encargada de recibir las vesículas, dichos endosomas cuentan con otras regiones como la de reciclaje (que devuelve las vesículas a la membrana) o la vacuolar. Son precisamente los dominios vacuolares los que, al madurar, se transforman en endosomas tardíos. Estos nuevos endosomas son más grandes, ovalados, tienen una superficie con alta carga negativa y un pH de entre 6.0 y 4.8, bastante más ácido que el de los endosomas tempranos. Por otra parte, ya no se encuentran tan cerca de la membrana, ya que los endosomas al madurar ganan movilidad y avanzan hacia el núcleo celular.^[62] Los endosomas tardíos continúan recibiendo vesículas e hidrolasas ácidas desde el aparato de Golgi hasta que, finalmente, acaban fusionándose con los lisosomas y formando los endolisosomas. Los lisosomas son orgánulos con un pH muy bajo (sobre 4.5) y muy ricos en enzimas cuya función es degradar el material que reciben para, posteriormente, ser expulsado de nuevo al exterior celular.^[62] En la Figura 4 se muestra un esquema con los diferentes pasos y procesos que ocurren a lo largo de la maduración del endosoma. Analizado este proceso de transformación de los endosomas es fácil entender que si los fármacos que realizan su función en el citosol o en el núcleo de las células, no consiguen escapar del endosoma antes de que este se fusione con los lisosomas, están condenadas a degradarse y a no poder llevar a cabo su función terapéutica. Por ello, un reto de vital importancia para los CPPs, y las moléculas que transportan, consiste en dotarlos de mecanismos que les permitan salir de los endosomas y llegar al citosol antes de que sea demasiado tarde.

En la naturaleza, los virus realizan esta función del escape endosomal de forma eficiente. Aunque algunos virus son capaces de atravesar la membrana directamente, otros muchos entran en la célula a través de endosomas. Además, los endosomas les ayudan a recibir señales con información del lugar en el que se encuentran y a ser invisibles para la célula que infectan. Por todo ello, han desarrollado numerosos mecanismos que les permiten alcanzar fácilmente el citosol y en el momento oportuno.^[66,67] La estrategia que siguen los virus es, en primer lugar, unirse a proteínas o carbohidratos de la membrana de la célula para poder interactuar específica y multivalentemente con receptores. Estas interacciones desencadenan su internalización por endosomas. A continuación, el descenso de pH dentro de los endosomas provoca cambios en los virus que les permiten introducir en el citosol su cápside o partícula viral. Por último, ya en el citosol o tras avanzar hasta el núcleo, los virus replican su material genético e infectan completamente la célula.^[67] Los virus sufren diversos cambios dependientes del pH en el que se encuentran. Un caso es el de los virus que forman poros en la membrana del endosoma. Estos virus cuentan con ciertos péptidos que, al encontrarse a pH ácido, adoptan una estructura de hélice α que interactúa con fosfolípidos de la membrana y forma poros en ella para el escape del material genético del virus.^[68] Otro caso posible es el de fusión de membrana, un proceso que, por ejemplo, lo lleva a cabo el virus de la lengua azul. Al pH del endosoma temprano pierde su membrana más externa, dejando al descubierto la membrana interior. Esta segunda membrana cambia su estructura al pH del endosoma tardío y gana la capacidad de fusionarse con la membrana del endosoma, permitiendo el paso de la partícula viral activa al citosol (Figura 5).^[69]

Estos mecanismos biológicos han servido de inspiración para la síntesis de CPPs capaces de escapar del endosoma.^[68] Además, se ha observado que TAT VIH-1, proteína encargada de la transactivación de la transcripción del virus de inmunodeficiencia humano y primer caso descrito

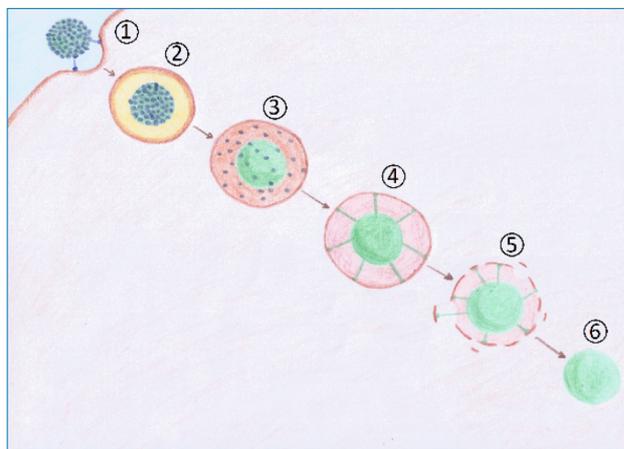


Figura 5. Representación gráfica del proceso de escape endosomal llevado a cabo por un virus a través de fusión de membrana. Se puede observar las diferentes fases: **1.** Interacción del virus con receptores celulares, **2.** Internalización en endosomas, **3.** Pérdida de la membrana externa del virus al pH del endosoma temprano, **4.** Cambio de la estructura de la membrana interna del virus al pH del endosoma tardío, **5.** Ruptura del endosoma por parte de la membrana interna del virus, **6.** Liberación de la partícula viral al citosol.^[69]

de proteína internalizada en células, interacciona con oligonucleótidos de las membranas celulares y es capaz de translocar desde los endosomas al citosol gracias a un proceso de fusión de membrana motivado por el descenso del pH.^[70] Asimismo, ha sido demostrado el importante papel de los residuos de arginina en esta tarea. Liposomas modificados con octaarginina, péptido penetrante catiónico modelo, son capaces de fusionarse con la membrana del endosoma a pH ácido gracias a interacciones electrostáticas. Por el contrario, la modificación con octalysina, análogo de la octaarginina pero carente de los grupos catiónicos guanidinio, pueden desprotonarse para evitar repulsiones entre amonios adyacentes y por lo tanto su capacidad de translocación es menor.^[71] En base a todo este conocimiento, se han desarrollado numerosas estrategias basadas en CPPs para el escape endosomal. Destacan por ejemplo los péptidos derivados de la subunidad HA-2 del virus influenza. Esta proteína viral cuenta con una región hidrofóbica en el extremo N-terminal que queda expuesta al descender el pH y permite la fusión con la membrana del endosoma. Basados en su secuencia, varios péptidos impulsores de la fusión han sido preparados.^[72]

Otro caso es el de los péptidos GALA. Estos péptidos son ricos en residuos de triptófano e histidina y cuentan con la secuencia que da lugar a su nombre, ácido glutámico-alanina-leucina-alanina repetida (GALA). Cuando el pH desciende en torno a 5.0, GALA sufre un cambio conformacional adoptando forma de hélice α anfifílica que le permite interactuar con las membranas lipídicas del endosoma y generar poros por los que pueden escapar moléculas pequeñas.^[73] Otros ejemplos son los péptidos derivados de LAH4. Son péptidos catiónicos anfipáticos ricos en histidinas y aminoácidos hidrofóbicos. A pH neutro se encuentran en una posición transmembranal, pero al descender el pH, los residuos de histidina se protonan y provocan un cambio conformacional que modifica su posición y permiten la interacción electrostática con los aniones de la membrana, provocando la ruptura de los endosomas.^[72,74] Un caso diferente es el de la internalización fotoquímica, donde se usan moléculas que generan una especie muy reactiva de oxígeno al ser irradiadas con luz, la cual rompe la membrana de los endosomas permitiendo el escape del contenido.^[75] Además de estos péptidos con secuencias optimizadas para responder ante el cambio de pH, existen ejemplos de péptidos fusionados a otro tipo de moléculas encargadas de proporcionarles las capacidades de escape del endosoma. Existe así el caso de péptidos unidos a lípidos con capacidad para fusionar membranas, como, por ejemplo, DOPE. Su mecanismo de acción es muy similar al de los péptidos derivados de HA-2, los cuales cuentan con una región hidrofóbica que se fusiona a la membrana endosomal al descender el pH. En el caso de los polímeros policatiónicos como PEI se ha planteado que podrían funcionar a través de un mecanismo de efecto de esponja de protones, mediante la captación de protones, lo que conduce a la entrada de numerosos aniones para contrarrestar la carga, de modo que el aumento de la presión osmótica provoca la ruptura de la membrana. Sin embargo, se ha demostrado que el pH del endosoma no cambia en presencia o ausencia de polilisininas.^[76] Además, la supresión de la

acidificación del endosoma inhibe el escape de nanopartículas modificadas con oligoargininas y sorprendentemente aumenta el escape de las nanopartículas modificadas con oligolisinas.^[71,75] Estos resultados generan actualmente ciertas dudas sobre el escape endosomal promovido por un efecto de esponja de protones.^[76,75] De todos modos y a pesar de los avances, el escape del endosoma sigue siendo un complejo reto por superar sobre todo para macromoléculas biológicas, como por ejemplo los anticuerpos, o nanopartículas inorgánicas con potencial aplicación biológica. Todavía se investiga en la búsqueda de métodos más generales y capaces de funcionar *in vivo*, ya que ninguno de los existentes hasta el momento ha llegado aún a fases clínicas.^[75]

CARGOS

Los CPPs han resultado ser unos vectores con gran potencial para el transporte de cargos biológicamente activos gracias a su capacidad penetrante y a su gran potenciación del transporte de macromoléculas.^[78,79] Así, el transporte de cargos con actividad biológica se ha convertido en su principal aplicación y su potencial es muy elevado. Para que un CPP pueda actuar como transportador de otras moléculas es necesaria la formación de un complejo CPP-cargo. Estos complejos pueden ser de diversa naturaleza y ello los dotará de diferentes características. El caso más común es el del empleo de enlaces covalentes entre el péptido y el cargo. Estos enlaces implican la compartición de electrones y la formación de un enlace estable y de los más fuertes que se pueden presentar.^[78] Dentro de este tipo de enlace existe la posibilidad de unión del cargo a la cadena lateral de uno de los aminoácidos del CPP (Figura 6). Son muy utilizadas las cadenas laterales de las lisinas y las cisteínas, ya que sus grupos amina y tiol, respectivamente, cuentan con un gran carácter nucleofílico. En otros casos también son utilizadas pequeñas moléculas bifuncionales espaciadoras que permiten una mayor distancia entre las 2 subunidades, lo que disminuye los impedimentos estéricos y facilita las interacciones del CPP con la membrana.^[77]

El enlace disulfuro es otro caso y puede formarse entre las cisteínas del péptido y tioles del cargo. Este enlace tiene la capacidad de romperse en el ambiente reductor intracelular, lo que permite liberar el cargo una vez en el citosol celular (Figura 6). En concreto, el glutatión, un tripéptido presente en el interior celular en una concentración entre 1-10 mM y encargado de la reducción de especies oxidantes peligrosas para la célula, es el encargado de esta ruptura. Por ello, los enlaces disulfuros son ampliamente



Figura 6. Representación esquemática de la unión CPP (rojo) / cargo (verde) a través de la cadena lateral de una cisteína (izquierda) y a través de enlace peptídico, es decir, como una única secuencia peptídica (derecha).^[77]

empleados en el suministro de complejos péptido-carga que se vuelven activas una vez liberadas.^[80] Esta misma estrategia es también utilizada por ciertos espaciadores y otros enlaces con carácter covalente dinámico.^[2,81,82] Cuando las moléculas a transportar son péptidos o proteínas, lo más común es sintetizarlas unidas a la secuencia peptídica o expresarlas como proteínas de fusión.^[77] En este caso no requiere reacciones complementarias del cargo, aunque presenta la limitación de la difícil desconexión o liberación de este en el interior celular. Así, este mecanismo ha sido empleado para la internalización de factores de transcripción como NF- κ B, factor capaz de inducir una respuesta en la transcripción de genes tanto celulares como virales.^[44]

A pesar de la simplicidad y robustez de las estrategias con enlaces covalentes, estas cuentan con ciertas limitaciones desde el punto de vista químico. Por ejemplo, la formación de enlaces covalentes con el cargo puede modificar la estructura química del mismo y causar posibles problemas por alteraciones de su actividad biológica. Por ese motivo han surgido alternativas basadas en enlaces no covalentes que, a pesar de su naturaleza más débil, presentan un gran número de interacciones (multivalencia) que permiten la formación de un complejo estable. Además, la unión no covalente entre péptido y carga permite en muchos casos la separación o destrucción del complejo en el interior celular. Existen varios ejemplos en la bibliografía con este tipo de enlaces, como es el de los péptidos MPG y Pep-1. Estos péptidos anfifílicos presentan interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con ácidos nucleicos y proteínas respectivamente, lo que les permite formar nanopartículas estables capaces de internalizar tanto *in vitro* como *in vivo*.^[84] Cabe también destacar el empleo de estrategias supramoleculares y dinámicas por el profesor Roger Tsien en los péptidos activables por enzimas. En este caso, se emplean las fuerzas electrostáticas entre un CPP catiónico y una cadena aniónica de oligoglutamínicos para reducir la carga del CPP. Entre la parte catiónica y la aniónica se introduce una secuencia específica que puede ser degradada por proteasas que normalmente se sobreexpresan en los tumores. Cuando esta

enzima proteasa presente en un tejido tumoral provoca la separación de la región inhibidora, se produce la entrega efectiva y selectiva del CPP y su cargo.^[85-88]

Más allá del tipo de enlace, la naturaleza de los cargos transportados por CPPs es muy variada y hay numerosos ejemplos de cada uno de ellos. Uno de los cargos más interesantes son las proteínas. El transporte de β -galactosidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de ciertos carbohidratos, es uno de los primeros ejemplos dentro de esta categoría. Se usó TAT (RKKRRQRRR) como CPP y se realizaron estudios en ratones que demostraron la heterogénea distribución de este complejo en el organismo.^[89] Desde entonces, decenas de proteínas se han unido a CPPs para su entrega intracelular.^[3,90] El transporte de oligonucleótidos ha despertado gran entusiasmo en la comunidad científica gracias a las posibilidades que la terapia génica ofrece para reparar la expresión de proteínas.^[91,92] Para el transporte de ácidos nucleicos, los vectores virales han resultado ser efectivos, pero problemas relacionados con la respuesta inmunológica han hecho que los CPPs se erigiesen como una alternativa más prometedora.^[93] Así, a lo largo de los años se han descubierto numerosos péptidos capaces de favorecer el transporte de oligonucleótidos. Destacan por ejemplo los péptidos anfifílicos KALA^[94] (variante del GALA anteriormente mencionado), los que cuentan con su extremo N-terminal estearilado,^[95] TAT y Antennapedia^[96] o los casos más actuales de modificaciones de tetralisinas con grupos guanidiniocarbonilpirrol.^[97] Otro ejemplo muy novedoso es el empleo de péptidos anfifílicos modificados mediante enlaces covalentes dinámicos (por ejemplo, hidrazona u oxima) para el transporte de ácidos nucleicos^[91,92] o de la proteína CRISPR/Cas9^[83] al interior celular (Figura 7). Gracias a interacciones de carácter electrostático, los péptidos son capaces de formar un sistema supramolecular con la proteína e introducirla en el interior celular, dando pie a potenciales aplicaciones en edición génica.^[83] Los CPPs pueden ser administrados como proformas para la entrega de agentes terapéuticos, lo que reduce su toxicidad e incrementa su habilidad penetrante, y han sido aplicados con éxito a fármacos tópicos de tratamiento cutáneo.^[98] También se estudia muy activamente para la entrega citosólica de anticuerpos, muy prometedores para la elaboración de vacunas o para permitir tratamientos para cáncer más selectivos.^[99,100]

Otro tipo de cargos son las nanopartículas. En este caso, nanopartículas superparamagnéticas de hierro (SPIONs) fueron funcionalizadas con TAT.^[101] Desde entonces muchas otras han sido transportadas, y destacan por permitir, gracias a su presencia, que las células sean observadas por imagen de resonancia magnética (MRI). De modo similar, también destaca el transporte de agentes de imagen, los cuales aportan gran información al permitir la visualización de transportadores o agentes terapéuticos en el interior celular. Sin embargo, la gran hidrofobicidad de su estructura suele dificultar enormemente su internalización y por ello su complejación con liposomas es muy prometedora. Su empleo tiene aplicación tanto en investigación científica académica como en medicina, sobre todo cuando ofrecen una respuesta luminiscente ratiométrica.^[3] Paralelamente, se ha desarrollado también el transporte de liposomas. Los liposomas son

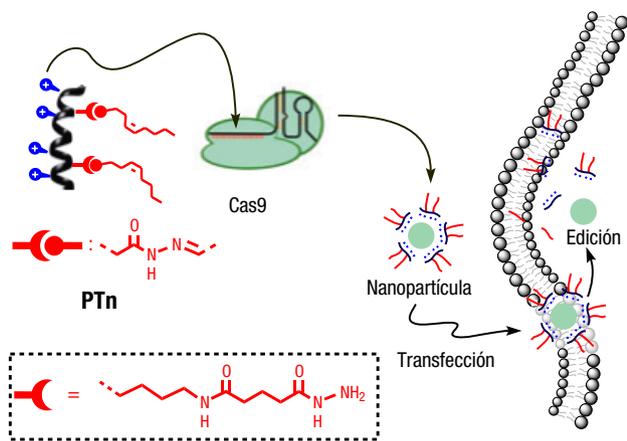


Figura 7. Representación esquemática de un péptido penetrante anfifílico ensamblado mediante una unión covalente dinámica (hidrazona) entre el esqueleto peptídico y dos colas hidrofóbicas. La complejación no covalente entre el CPP y la ribonucleoproteína (Cas9) ocurre a través de interacciones electrostáticas.^[83] La nanopartícula resultante puede translocar la membrana plasmática para realizar edición génica

vesículas de tamaño nanométrico compuestas mayoritariamente por colesterol y fosfolípidos. Son fáciles de sintetizar y de funcionalizar su exterior. Sobre todo, destacan por su capacidad para encapsular agentes terapéuticos. La funcionalización de las superficies de liposomas con CPPs permite modificar su farmacocinética y favorecer su interacción con las membranas plasmáticas, necesaria para lograr con éxito la internalización celular.^[102]

En líneas generales, la cantidad y variedad de cargos que han sido transportados al interior celular gracias a los CPPs es enormemente amplia y aumenta día a día gracias a la activa investigación en este campo. Gracias a ellos, muchas moléculas de interés han podido ser internalizadas por primera vez, lo que conlleva grandes beneficios para la comunidad científica y abre la puerta al futuro desarrollo de avances también beneficiosos para la sociedad. Los CPPs se han consolidado como transportadores y, a pesar de su ya innegable y prometedor potencial, sus habilidades no dejan de sorprendernos.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

El gran éxito de los CPPs en estudios *in vitro* ha permitido en varios casos dar el paso hacia la realización de experimentos y pruebas *in vivo*. En este tipo de estudios los CPPs llevan a cabo dos funciones principales. En primer lugar, dadas sus ya tan conocidas propiedades penetrantes, se encargan de ayudar a cargos con actividad biológica a cruzar la membrana plasmática. Por otra parte, desempeñan una función de dirección. Es decir, los CPPs también tienen en ciertos casos la capacidad de alterar la biodistribución de las moléculas que transportan al dirigir las a otras dianas o permitir su acceso a otras zonas antes inalcanzables. Por todo ello, son ya muchos los casos de CPPs estudiados en cultivos de diferentes líneas celulares, en animales e incluso en humanos, encontrándose ya varios en diferentes fases clínicas.^[35] En el caso de **estudios en animales**, se han usado principalmente CPPs candidatos al tratamiento tanto tópico como sistémico de enfermedades neurológicas, cardíacas y oncológicas, así como fármacos contra el dolor y la inflamación.^[103,104] Cabe destacar por ejemplo aquellos con aplicación para pacientes que han padecido un ictus. El ictus se caracteriza por la oclusión de una arteria, lo que conlleva la carencia de oxígeno suficiente en el cerebro, ocasionando enormes daños en pocos minutos. Es muy importante poder conducir a través de la barrera hematoencefálica fármacos capaces de reducir los daños ocasionados,^[105] lo cual resulta muy complejo dada su exhaustiva regulación del transporte molecular para proteger el sistema nervioso central. Sin embargo, algunos péptidos han logrado atravesarla, como es el caso del tetrapéptido fenilprolina [(PhPro)₄] del profesor Giralt.^[106] Además, ciertos CPPs han demostrado en varios modelos animales sus logros en esta complicada tarea al ser administrados por vía tanto intravenosa como intraperitoneal. En el caso de tratamientos contra el cáncer, los CPPs han sido utilizados intratumoralmente como transportadores de moléculas tóxicas, como la doxorubicina, con el propósito de dirigir las a las células tumorales.^[107] También han transportado inhibido-

res con el propósito de cesar el crecimiento y expansión del tumor a más células sanas.^[47]

Tras los estudios en animales, conocidos como estudios preclínicos, si los resultados observados son buenos se pasa a estudios clínicos: **ensayos en humanos**. A la hora de dar este paso los CPPs suelen encontrarse con una serie de problemas comunes.^[108] Por ejemplo, los CPPs suelen carecer de especificidad, es decir, no son selectivos a un tipo concreto de célula. Eso implica la necesidad de suministrar una mayor dosis, lo que hace que aumenten sus niveles de toxicidad. Además, en muchos casos son inestables y son rápidamente degradados por enzimas del cuerpo humano. A esto se une también el desconocimiento sobre el mecanismo concreto de internalización para cada caso, el cual varía dependiendo de numerosos factores como el cargo o la célula a atravesar.^[108] Sin embargo, existen varios ejemplos de CPPs que han sido capaces de llegar a fases clínicas. En la mayoría de los casos están relacionados con el tratamiento de enfermedades de la piel y son administrados por vía tópica. El caso más reseñable es el del tratamiento de hipersudoración.^[109] Esta dolencia era típicamente tratada con toxina botulínica (Botox), pero ello implicaba la administración de cientos de inyecciones por paciente. Así, la farmacéutica Revance Therapeutics propuso el empleo del gel tópico RT001. Este gel cuenta con dicha toxina unida a un CPP, lo que facilita su absorción tópica y evita el uso de agujas. Además, ha resultado también efectiva para el tratamiento de las arrugas y patas de gallo.^[108] Sin embargo, este nuevo fármaco no ha superado la fase clínica III y actualmente se encuentran las últimas fases clínicas de la nueva formulación RT002. Similar a este caso, la farmacéutica Capstone Therapeutics ha desarrollado el fármaco AZX100 para cicatrizaciones, el cual llegó hasta fase clínica II.^[47] Un caso para el tratamiento de psoriasis es Psorban, de la compañía CellGate. Este fármaco consistía en ciclosporina A, un inmunosupresor típicamente administrado vía oral para el tratamiento de inflamaciones tóxicas, pero fusionado con TAT, lo que permitía su uso tópico. A pesar de los buenos resultados en fase clínica II, sus estudios se encuentran actualmente suspendidos.^[108] Pero además de los tratamientos para enfermedades relacionadas con la piel, existen varios ejemplos relacionadas con otro tipo de dolencias. Por ejemplo, XG-102 de la farmacéutica XigenPharma permite la administración de inhibidores de muerte celular que son utilizados para tratar secuelas auditivas y pacientes que han sufrido un ictus.^[110] Asimismo, existen varios ejemplos de CPPs también en fases clínicas para el tratamiento de cánceres de diversas naturalezas.^[47,110]

CONCLUSIONES

Desde su descubrimiento a finales de la década de los 80, los CPPs han dejado patente su gran potencial como transportadores de cargos biológicamente relevantes al interior celular. Este rol se ha visto cada vez más reforzado con las nuevas investigaciones y avances, convirtiéndose hoy en día en una de las principales vías para la introducción en células de moléculas y macromoléculas de interés biológico. Sus

características y versatilidad los han convertido, entre otras cosas, en una novedosa herramienta para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, pues han supuesto el descubrimiento de estructuras sencillas capaces del transporte de numerosos cargos a través de membranas celulares. Pero a pesar de su enorme potencial, es cierto que los CPPs cuentan todavía con limitaciones a mejorar para poder explotar todas sus aplicaciones. Son todavía muchos los aspectos que desconocemos sobre su naturaleza y numerosos los conceptos que debemos aprender a controlar y manipular. Es por ello que los CPPs son un campo de investigación puntera a día de hoy en química, biología y medicina. Cada vez se sigue avanzando más en su estudio, cada vez son más los casos que llegan a fases clínicas y cada vez su gran potencial se vuelve más real y tangible. Los nuevos avances conceptuales junto con los prometedores resultados de los ensayos clínicos auguran un futuro prometedor para las aplicaciones médicas de los péptidos penetrantes, que esperamos pronto puedan devolver a la sociedad todo el esfuerzo y trabajo que los científicos les dedican a ellos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación del programa MINECO (RYC-2013-13784, CTQ2014-59646-R y SAF2017-89890-R), de la Xunta de Galicia (ED431G/09 y 2016-AD031) y por sus ayudas de apoyo a la etapa predoctoral, de ERDF, de ERC Starting Grant (DYNAP-677786), de Human Frontier Science Program (RGY0066/2017) y de la Fundación Segundo Gil Dávila.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 2242.
- [2] E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2944.
- [3] B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 637.
- [4] M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell*, **1988**, *55*, 1179.
- [5] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell*, **1988**, *55*, 1189.
- [6] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 16010.
- [7] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 10444.
- [8] D. Derossi, G. Chassaing, A. Prochiantz, *Trends Cell Biol.*, **1998**, *8*, 84.
- [9] G. Elliott, P. O'Hare, *Cell*, **1997**, *88*, 223.
- [10] P. M. Fischer, *Med. Res. Rev.*, **2007**, *27*, 755.
- [11] N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14348.
- [12] T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile, S. Futaki, *ACS Chem. Biol.*, **2006**, *1*, 299.
- [13] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, *97*, 13003.
- [14] J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9506.
- [15] D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pept. Res.*, **2000**, *56*, 318.
- [16] P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 13382.
- [17] J. S. Appelbaum, J. R. La Rochelle, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, A. Schepartz, *Chem. Biol.*, **2012**, *19*, 819.
- [18] D. S. Daniels, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14578.
- [19] J. Fernández-Carneado, M. J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 1811.
- [20] Y.A. Fillon, J.P. Anderson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11798.
- [21] M. Pazo, M. Juanes, I. Lostalé-Seijo, J. Montenegro, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 6919.
- [22] N. W. Luedtke, P. Carmichael, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12374.
- [23] K. K. Maiti, O. Jeon, W. S. Lee, D. Kim, K. Kim, T. Takeuchi, S. Futaki, S. Chung, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2907.
- [24] N. Umezawa, M. A. Gelman, M. C. Haigis, R. T. Raines, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 368.
- [25] P. Zhou, M. Wan, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6878.
- [26] H. H. Chung, G. Harms, C. M. Seong, B. H. Choi, C. Min, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers*, **2004**, *76*, 83.
- [27] E. R. Gillies, F. Deiss, C. Staedel, J. -M. Schmitter, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 4081.
- [28] K. Petkau-Milroy, M. H. Sonntag, A. H. A. M. van Onzen, L. Brunsveld, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 8086.
- [29] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters*, **2013**, *587*, 1693.
- [30] W. B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W. C. Wimley, *Trends Biochem. Sci.*, **2015**, *40*, 749.
- [31] G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi, *Trends Pharm. Sci.*, **2017**, *38*, 406.
- [32] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Barfai, U. Langel, *Exp. Cell Res.*, **2001**, *269*, 237.
- [33] K. Kilk, M. Magzoub, M. Pooga, L. E. Eriksson, U. Langel, A. Gräslund, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 911.
- [34] K. Han, M. Jeon, K. Kim, J. Park, S. Y. Choi, *Mol. Cells*, **2000**, *10*, 728.
- [35] M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 1173.
- [36] M. C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2730.
- [37] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, U. Langel, *FASEB J.*, **1998**, *12*, 67.
- [38] L. Crombez, G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz, G. Divita, *Mol. Ther.*, **2009**, *17*, 95.
- [39] J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Kreuse, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1414*, 127.
- [40] S. Pujals, J. Fernández-Carneado, M. J. Kogan, J. Martinez, F. Cavelier, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 8479.
- [41] S. Pujals, E. Giralt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 473.
- [42] R. S. Erdmann, H. Wennemers, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 10340.
- [43] Y. A. Nagel, P. S. Raschle, H. Wennemers, *Angew. Chem.*, **2016**, *56*, 122.
- [44] Y. Z. Lin, S. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson, J. Hawiger, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 14255.
- [45] J. Oehlke, P. BIRTH, E. Klauschenz, B. Wiesner, M. Beyermann, A. Oksche, M. Bienert, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 4025.
- [46] M. Magzoub, A. Gräslund, *Quart. Rev. Biophys.*, **2004**, *37*, 147.
- [47] Ü. Langel, *Cell penetrating peptides: methods and protocols*, Springer-Verlag GmbH, 2011.
- [48] D. Bhunia, P. Mondal, G. Das, A. Saha, P. Sengupta, J. Jana, S. Mohapatra, S. Chatterjee, S. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 1647.

- [49] L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel, *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29, 464.
- [50] E. Koren, V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.*, **2012**, 18, 385.
- [51] F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, 157, 195.
- [52] 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.
- [53] J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L. V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 15300.
- [54] 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. Sugjura, S. Futaki, *Mol. Ther.*, **2004**, 10, 1011.
- [55] A. Ferrari, V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca, F. Beltran, *Mol. Ther.*, **2003**, 8, 284.
- [56] M. Fretz, J. Jin, R. Conibere, N. A. Penning, S. Al-Tai, G. Storm, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, T. A. Jones, *J. Control. Release*, **2006**, 116, 247.
- [57] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, **2007**, 46, 492.
- [58] S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A. T. Jones, *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, 35, 784.
- [59] J. S. Wadia, R. V. Stan, S. F. Dowdy, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 310.
- [60] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *J. Control. Release*, **2005**, 102, 247.
- [61] A. Prochiantz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 448.
- [62] J. Huotari, A. Helenius, *EMBO J.*, **2011**, 30, 3481.
- [63] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 2437.
- [64] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.*, **2004**, 86, 254.
- [65] I. Nakase, K. Osaki, G. Tanaka, A. Utani, S. Futaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, 446, 857.
- [66] A. E. Smith, A. Helenius, *Science*, **2004**, 304, 237.
- [67] J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, 79, 803.
- [68] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release*, **2011**, 151, 220.
- [69] X. Zhang, A. Patel, C. C. Celma, X. Yu, P. Roy, Z. Zhou, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2016**, 23, 74.
- [70] A. Vendeville, F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier, B. Beaumelle, *Mol. Biol. Cell*, **2004**, 15, 2347.
- [71] A. El-Sayed, I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 23450.
- [72] B. Ceresa, *Molecular Regulation of Endocytosis*, IntechOpen, 2012.
- [73] W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 967.
- [74] J. K. W. Lam, W. Liang, Y. Lan, P. Chaudhuri, M. Y. T. Chow, K. Witt, L. Kudsiova, A. J. Mason, *J. Control. Release*, **2012**, 158, 293.
- [75] A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *AAPS J.*, **2009**, 11, 13.
- [76] R. V. Benjaminsen, M. A. Matthebjerg, J. R. Henriksen, S. M. Moghimi, T. L. Andresen, *Mol. Ther.*, **2013**, 21, 149.
- [77] M. Zorko, Ü. Langel, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 529.
- [78] M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, 6, 509.
- [79] A. van den Berg, S. F. Dowdy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2011**, 22, 888.
- [80] L. R. Jones, E. A. Goun, R. Shinde, J. B. Rothbard, C. H. Contag, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6526.
- [81] Jose J. Reina, A. Rioboo, J. Montenegro, *Synthesis*, **2018**, 50, 831.
- [82] A. Fuertes, M. Juanes, J. R. Granja, J. Montenegro, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7861.
- [83] I. Lostalé-Seijo, I. Louzao, M. Juanes, J. Montenegro, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 7923.
- [84] S. Deshayes, M. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 537.
- [85] T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 17867.
- [86] Q. T. Nguyen, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, 13, 653.
- [87] R. Weinstein, E. N. Savariar, C. N. Felsen, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 874.
- [88] T. A. Aguilera, E. S. Olson, M. M. Timmers, T. Jiang, R. Y. Tsien, *Integr. Biol.*, **2009**, 1, 371.
- [89] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science*, **1999**, 285, 1569.
- [90] A. Bolhassani, B. S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides*, **2017**, 87, 50.
- [91] J. M. Priegue, D. N. Crisan, J. Martínez-Costas, J. R. Granja, F. Fernandez-Trillo, J. Montenegro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 7492.
- [92] J. Priegue, I. Lostalé-Seijo, D. Crisan, J. Granja, F. Fernández-Trillo, J. Montenegro, *Biomacromolecules*, **2018**, 19, 2638.
- [93] I. Louzao, R. García-Fandiño, J. Montenegro, *J. Mat. Chem. B*, **2017**, 5, 4426.
- [94] T. B. Wyman, F. Nicol, O. Zelphati, P. V. Scaria, C. Planck, F. C. Szoka, *Biochemistry*, **1997**, 36, 3008.
- [95] S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 1005.
- [96] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B. R. Shaw, R. L. Juliano, *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 744.
- [97] M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 2941.
- [98] J. B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P. L. McGrane, P. A. Wender, P. Khavari, *Nat. Med.*, **2000**, 6, 1253.
- [99] U. Niesner, C. Halin, L. Luzzi, M. Günthert, P. Neri, H. Wunderli-Allenspach, L. Zardi, D. Neri, *Bioconjug. Chem.*, **2002**, 13, 729.
- [100] M. Akishiba, T. Takeuchi, Y. Kawaguchi, K. Sakamoto, H. -H. Yu, I. Nakase, T. Takatani-Nakase, F. Madani, A. Gräslund, S. Futaki, *Nat. Chem.*, **2017**, 9, 751.
- [101] L. Josephson, C. H. Tung, A. Moore, R. Weissleder, *Bioconjug. Chem.*, **1999**, 10, 186.
- [102] V. P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig, T. S. Levchenko, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, 98, 8786.
- [103] G. P. H. Dietz, M. Bähr, *Mol. Cell. Neurosci.*, **2004**, 27, 85.
- [104] S. B. Fonseca, M. P. Pereira, S. O. Kelley, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2009**, 61, 953.
- [105] D. Mochly-Rosen, *Science*, **1995**, 268, 247.
- [106] P. Arranz-Gibert, B. Guixer, M. Malakoutikhah, M. Muttenthaler, F. Guzmán, M. Teixidó, E. Giral, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 7357.
- [107] F. Meyer-Losic, J. Quinonero, V. Dubois, B. Alluis, M. Dechambre, M. Michel, F. Callier, A. -M. Fernandez, A. Trouet, J. Kearsey, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6908.
- [108] C. Foerg, H. P. Merkle, *J. Pharm. Sci.*, **2008**, 97, 144.
- [109] R. G. Glogau, *Dermatol. Surg.*, **2007**, 33, S76.
- [110] S. R. Schmidt, *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges*, Wiley Online Library, 2013.
- [111] M. Juanes, I. Lostalé-Seijo, J. Granja, J. Montenegro, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 10689.

NOTA SOBRE LOS AUTORES

Iván Gallego Gómez obtuvo su graduado en Química en 2016 (Premio Extraordinario) y su Máster en 2017 en la Universidad de Santiago de Compostela. Su Tesis Doctoral, bajo la supervisión del profesor Granja y el doctor Montenegro en el CIQUS, está centrada en el desarrollo de péptidos penetrantes glicosilados y estructuras de carbono multivalentes para la inhibición de la metástasis del cáncer. En 2018 realizó una estancia pre-doctoral con el profesor Nazario Martín en la Universidad Complutense de Madrid. Iván ha conseguido prestigiosos premios y becas competitivas como la beca Segundo Gil Dávila para estudios de doctorado (2016), la beca predoctoral de la Xunta de Galicia (2018) y dos premios al mejor póster en congresos.

Alicia Rioboo Vidal obtuvo su graduado en Química (Premio Extraordinario, 2017) y su Máster en Química Orgánica (2018) por la Universidad de Santiago de Compostela. Actualmente cursa estudios de doctorado donde estudia nuevas sondas fluorescentes para aplicaciones en química biológica bajo la supervisión del profesor Granja y el doctor Montenegro en el CIQUS. Alicia ha conseguido prestigiosos premios como la beca Segundo Gil Dávila para estudios de doctorado (2017), el premio *Chemists for our Future* al mejor estudiante de grado en química (2018), el

Premio Fin de Carrera al mejor expediente académico de la Comunidad Autónoma de Galicia (2018) y el premio *SusChem-JIQ* al mejor expediente académico de química en España (2018).

Javier Montenegro obtuvo su Máster (2003) y Ph.D. (2009) por la Universidad de Santiago de Compostela (profesora Susana López) en el campo de los retinoides artificiales. Realizó estancias pre-doctorales en Cambridge (2005, profesor Steven Ley, síntesis total) y en Scripps (2007, profesor Reza M. Ghadiri, química prebiótica y polímeros dinámicos). Realizó una estancia postdoctoral en la Universidad de Ginebra (2009-2012) con el profesor Stefan Matile en biosensores y transportadores de membrana sintéticos. Ha conseguido contratos competitivos como el Juan de la Cierva (2012-2015, profesor Juan Granja) y el Ramón y Cajal y actualmente trabaja como IP en el CIQUS con líneas de investigación centradas en la química biológica y la biología sintética. Javier ha conseguido los premios internacionales más prestigiosas como por ejemplo el *Starting Grant* de la ERC (2015), la *Young Investigator Grant* del *Human Frontier Science Program* (2017), la *JSP Fellowship Bürgenstock Conference* (2017) y el premio de jóvenes investigadores de la RSEQ (2018).



¿Quieres ser socio de una de las
sociedades científicas más
importantes de España?



**Si tienes menos
de 25 años,
hazte socio de la
RSEQ por 5 EUR**


Real Sociedad Española de Química
www.rseq.org