

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-220-224>

Поступила 22.03.2024

Поступила после рецензирования 29.04.2024

Принята в печать 03.05.2024

© Чернуха И. М., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., 2024

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПЕПТИДНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ БИОПЕПТИДОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ: МИНИ-ОБЗОР

Чернуха И. М.¹, Тихонов С. Л.^{2,3*}, Тихонова Н. В.²¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия² Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия³ Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молекулярная
пептидная
трансплантация,
биопептиды, каркасы,
пептидные вставки,
биологическая
активность

Молекулярная пептидная трансплантация (МПТ) — это выделение/синтез биоактивного фрагмента пептида/белка и последующий перенос его в целевой белок/пептид для создания нового белкового продукта, обладающего заданными уникальными биологическими свойствами. Это один из способов, наряду с методами циркуляризации пептидной основы и молекулярным сшиванием, направленных на усиление структурной организации коротких пептидов. Исследования МПТ в настоящее время в основном сосредоточены на демонстрации ее полезности и применимости, а не на разработке получения биопептидов нового поколения. Цель мини-обзора — показать применимость метода МПТ для разработки стабильных и биодоступных пептидов нового поколения с улучшенными биологическими свойствами. Для создания таких пептидов важно правильно подобрать каркас для последующей прививки к нему биологически активной пептидной последовательности. К пептидам с необходимым каркасом относятся циклотиды, которые можно получить трехфазным синтезом. Циклотиды обладают общим механизмом действия. Их биологическая активность определяется способностью связывать белки с образованием пор и разрушением биологических мембран-мишеней, а также свойствами, необходимыми для создания на их каркасе новых пептидов. Для обеспечения функциональности новых биопептидов, полученных методом МПТ, можно использовать различные пептидные вставки. Примером эффективного практического применения МПТ являются различные пептидные лекарства. Следовательно, МПТ позволяет эффективно конструировать биопептиды нового поколения, отличающиеся высокой термодинамической и метаболической стабильностью эпитопа и новыми или усиленными биологическими функциями. Однако эффективность полученных пептидов с использованием МПТ необходимо доказать в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

Received 23.03.2024

Accepted in revised 29.04.2024

Accepted for publication 03.05.2024

© Chernukha I. M., Tikhonov S. V., Tikhonova N. V., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

MOLECULAR PEPTIDE GRAFTING AS A TOOL FOR CREATING NEW GENERATION OF BIOPEPTIDES: A MINI-REVIEW

Irina M. Chernukha¹, Sergey L. Tikhonov^{2,3*}, Natalia V. Tikhonova²¹ V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia² Ural State Agricultural University, Yekaterinburg, Russia³ Ural State Forestry University, Yekaterinburg, Russia

KEY WORDS:

molecular peptide
grafting, biopeptides,
scaffolds, peptide
inserts, biological
activity

ABSTRACT

Molecular peptide grafting (MPG) is the isolation/synthesis of a bioactive fragment of a peptide/protein and its subsequent transfer to a target protein/peptide to create a new protein product with specified unique biological properties. This is one of the methods together with molecular stapling and peptide backbone circularization to strengthen the structural organization of short peptides. Nowadays research on MPT is mainly focused on demonstrating its usefulness and applicability, rather than on the development of next-generation biopeptides. The purpose of the mini-review is to demonstrate the applicability of MPT to create stable and bioavailable peptides of a new generation with enhanced biological properties. Choosing the right scaffold for subsequent inoculation of a biologically active peptide sequence into it is the most important task in creating targeted biopeptides. Peptides with the necessary framework, such as cyclotides, can be obtained by three-phase synthesis. Cyclotides have a common mechanism of action. Their biological activity is determined both by the ability to bind proteins with the formation of pores and destruction of biological target-membranes, and by the properties necessary to create new peptides in the scaffold. Various peptide inserts can be used to ensure the functionality of new biopeptides obtained by the MPT method. Different peptide drugs are an example of the effective practical use of MTP. Consequently, MPT makes it possible to effectively design a new generation of biopeptides characterized by high epitope thermodynamic and metabolic stability with new or enhanced biological functions. However, the effectiveness of the peptides obtained by the MPT must be proved *in vitro* and *in vivo*.

1. Введение

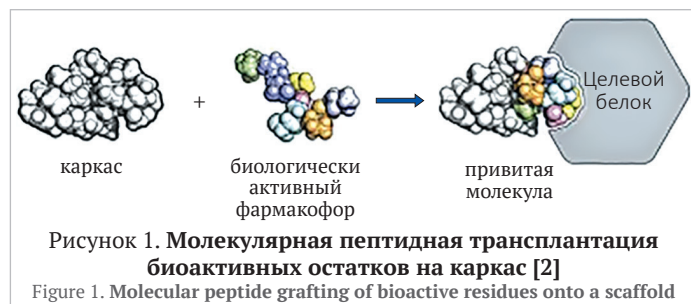
Возможности современной биотехнологии, пептидомики и генной инженерии позволяют выделять, идентифицировать, синтезировать новые пептиды с целевой аминокислотной последовательностью и с биологической активностью. В то же время целевая биологическая активность большинства короткоцепочечных пептидов ниже, чем у белков, из которых они выделены. Для преодо-

ления этого недостатка применяется несколько подходов. В частности, молекулярная пептидная трансплантация (МПТ), которую можно определить как «выделение/синтез биоактивного фрагмента пептида/белка, последующий перенос его в целевой белок/пептид для создания нового белкового продукта, обладающего заданными уникальными биологическими свойствами» [1,2,3]. МПТ имеет некоторое сходство с природным процессом молекулярной эволюции, так

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Чернуха, И. М., Тихонов, С. Л., Тихонова, Н. В. (2024). Молекулярная пептидная трансплантация как инструмент создания биопептидов нового поколения: мини-обзор. *Пищевые системы*, 7(2), 220–224. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-220-224>

FOR CITATION: Chernukha, I. M., Tikhonov, S. L., Tikhonova, N. V. (2024). Molecular peptide grafting as a tool for creating new generation of biopeptides: A mini-review. *Food Systems*, 7(2), 220–224. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-220-224>

как оба процесса включают модификацию белка-предшественника для придания ему новой функции. Но различие между ними заключается в том, что молекулярная трансплантация проводится в гораздо более короткие сроки и с меньшими размерами популяции. МПТ в первую очередь посвящена приданию новой функции пептиду/белку при сохранении его структуры (каркаса) за счет выделения биоактивного фармакофора (пептидная вставка) и прививки его в каркас. Результатом МПТ является биологически активное вещество белковой природы со свойствами как пептидной вставки, так и каркаса (Рисунок 1).



Каркас действует как молекулярный холст, на который прививаются биоактивные пептидные вставки (ПВ), в результате чего получается вариант каркаса с новой функциональной направленностью.

По размеру ПВ может соответствовать белковому домену, пептиду или части пептида. МПТ позволяет также устранить ряд недостатков, присущих пептидам и ограничивающих их применение. В частности, невысокую стабильность пептидов под действием желудочных и кишечных протеаз [4,5], короткий период полувыведения из плазмы, общую невысокую биодоступность [6,7]. МПТ можно оценивать как новый подход для сохранения / к сохранению биологической активности пептидов при приеме внутрь [8,9,10,11,12,13,14]. По нашему мнению, важно рассматривать МПТ в комплексе с подходом, основанным на сшивании синтезированных методом *de novo* пептидов.

Разработка пептидов *de novo* развивается быстрыми темпами [15,16]. За последние четыре десятилетия процессы проектирования белков прошли значительную эволюцию. Начиная с минимального проектирования, основанного на простых химических принципах, они перешли к рациональному проектированию, учитывающему взаимосвязь последовательности и структуры, изучаемую на примерах природных белков. В настоящее время доминирует компьютерное проектирование, где белки создаются из фрагментов или параметрических шаблонов и оцениваются с использованием статистических моделей или физических силовых полей [17]. Сегодня в проектировании белков активно используются передовые вычислительные методы, такие как искусственный интеллект, машинное обучение и нейронные сети. Эти технологии позволяют создавать и оценивать белки в виртуальной среде до их синтеза в лаборатории [18]. Потенциальным недостатком цифровых инноваций является отсутствие понимания того, какие именно белковые структуры создает и оптимизирует компьютер. В связи с этим ставится под сомнение точность определения связи молекулярных свойств пептида с учетом химических и физических принципов сворачивания, сборки, стабильности, биодоступности и биоактивности белка. Кроме того, структурно-ориентированный подход к проектированию белков трансформировался в метод разработки синтетических белков с полезными функциями, эффективность которых не доказана [19,20,21]. Возможно, последовательности *de novo*, встроенные в каркас, позволят сохранить их свойства при применении *in vivo*, что является дальнейшим этапом исследований авторов, проводимых вне рамок этого мини-обзора.

Проблема применения шитых пептидов заключается в их нестабильности в растворе и при высокой температуре [22]. При совместном применении МПТ и сшивания N- или C-концевых пептидов можно обеспечить стабильность шитых пептидов, расширить, изменить функциональную направленность и усилить их активность [23]. МПТ позволяет также обеспечить стабильность каркаса белка при воздействии внешних факторов (протеолитические ферменты, высокая температура) и повысить биодоступность и биоактивность полученного пептида и/или белка [10,11], что особенно важно при поступлении БАП *per os*.

Исследования молекулярной трансплантации до сих пор были сосредоточены в основном на демонстрации ее полезности и применимости, а не на разработке биопептидов нового поколения.

Цель мини-обзора — показать применимость МПТ для решения проблемы нестабильности пептидов с целью создания целевых биодоступных пептидов нового поколения с усиленными биологическими свойствами.

2. Материалы и методы

Описание обзорного исследования включало методы поиска литературы, критерии включения и исключения, источники данных, определение субъектов исследования, сопоставление, обобщение и представление результатов.

2.1. Методы поиска литературы

Из-за разнообразия используемой терминологии был определен поисковый запрос, включающий следующие ключевые слова: «молекулярная пептидная трансплантация», «биопептиды», «каркасы», «пептидные вставки», «биологическая активность», «циклотиды» и др.

2.2. Критерии включения и исключения

Чтобы сосредоточиться на самых последних исследованиях, поиск в базе данных был ограничен последними 10 годами (2014–2024), но при написании обзора была использована информативная статья, опубликованная в 2010 году. Проводился дополнительный ручной поиск публикаций, на которые ссылались авторы наиболее информативных статей за последние 3 года. В исследование включались обзорные и экспериментальные статьи с описанием методологии, полученных результатов и обсуждения. Исключались публикации, в которых не описывались пептидная последовательность, устойчивые каркасы белков и пептидов.

2.3. Источники данных

В качестве источника информации использовали базы данных eLIBRARY.RU, MEDLINE, PubMed, EMBASE, Library, Scopus, Web of Science и Google Scholar.

2.4. Определение субъектов исследования и используемый анализ

В качестве субъектов исследования применяли аннотации, полнотекстовые статьи в журналах открытого и закрытого доступа. В результате поиска литературы было получено 3207 аннотаций и статей. В целом, 126 ссылок были признаны потенциально подходящими. После анализа 78 статей и аннотаций были исключены, а 48 были включены.

3. Пептиды и белки — каркасы для молекулярной трансплантации

Важным фактором эффективности МПТ является подбор каркасов по их естественным свойствам: наличие дисульфидных пептидов — сшивок циклического каркаса, обеспечивающих стабильность [24], биологическую активность [25]; компактный размер [26]; возможность связывания с белками [27]. При поиске каркасов нужно понимать, как выбранный каркас можно модифицировать. Использование каркасов с известной структурой и функцией во многом определяет эффективность молекулярной трансплантации при разработке новых биопептидов. МПТ рассматривают как более гибкий подход, чем дизайн *de novo*, несмотря на его недавний значительный прогресс [28,29,30]. Поиск пептидов и белков, более подходящих в качестве каркаса для трансплантации, представляет актуальное направление биотехнологических исследований [11]. К пептидам с необходимым каркасом относятся циклоти́ды (синтезируемые рибосомами пептиды растительного происхождения, состоящие из 28–37 аминокислот). Первым таким циклотидом стал пептид калата В1, выделенный из *Oldenlandia affinis*. Циклоти́ды обладают четкой структурой, общим механизмом действия, и их биологическая активность определяется способностью связывать белки с образованием пор и с дальнейшим разрушением биологических мембран-мишеней. Также они отличаются свойствами для создания на их каркасе новых пептидов: толерантностью к мутациям, устойчивостью к химическому и биологическому разложению, малым размером, биодоступностью при приеме внутрь и способностью проникать в клетки. Циклоти́ды богаты цистеином, характеризуются наличием дисульфидных мостиков и обычной сквозной макроциклизацией, что обеспечивает их термостабильность, толерантность к действию протеаз. Более того, и межцистеиновые домены (петли) подвержены гипервариативности остатков.

Циклоти́ды состоят из основного циклизованного полипептида с шестью остатками Cys, которые образуют 6 структур с Cys-узлами (6 петель). Встречающиеся в природе циклоти́ды представляют собой полипептиды среднего размера, хотя сообщалось также о более

крупных сконструированных циклотидов [31]. Одна из шести петель, по-видимому, наиболее устойчива к введению пептидов с большим количеством аминокислотных остатков [32].

МПТ допускает введение последовательностей до 25 остатков аминокислот. Эта петля хорошо переносит введение изопептидных связей, не влияя на сворачивание и стабильность получаемого сконструированного нового пептида [33].

Встречающиеся в природе циклотиды подразделяются на три основных подсемейства, так называемые Мебиуса (представленные циклотидом kalata), браслет (представленные циклотидом цикловиолацина O1) и ингибитор трипсина (представленные циклотидом МСоТI-II подсемейства циклотидов) [32]. Установлено, что природные циклотиды обладают множеством различных активностей, таких как, например, противоопухолевая, антибактериальная, гемолитическая, противогрибковая, иммуносупрессивная, ингибирующая протеазу и ВИЧ [32].

Остатки Cys на циклотидном каркасе образуют три взаимосвязанных дисульфида в четко очерченном расположении Cys-узлов. Это делает циклотидный каркас чрезвычайно жестким и компактным, что объясняет их необычную устойчивость к термической/химической денатурации, а также к протеолитической деградации. Последняя, в свою очередь, характерна как для природных, так и для сконструированных синтезированных циклотидов [33,34].

Циклоиды являются идеальным каркасом для молекулярной трансплантации линейных биоактивных пептидов (БАП). При этом сами по себе линейные БАП подвержены воздействию ферментов и, следовательно, теряют свою эффективность в качестве действующего вещества [35]. Поэтому введение их в каркас циклотидов позволяет обеспечить биодоступность и активность полученного нового пептида. Информация о циклических пептидах представлена в базе данных Cybase [36], которая создана в институте молекулярных биологических наук при Университете Квинсленда в Брисбене (Австралия). Многие противораковые линейные пептиды были перенесены методом молекулярной трансплантации в циклический каркас циклотидов с цистеиновыми узлами для повышения их проницаемости через клеточные мембраны, тем самым улучшая их доставку и фармакокинетику [35].

4. Химический синтез циклотидов

Циклотиды можно получить химическим синтезом с использованием стандартных методов, в частности трехфазным синтезом [35]. Полученные линейные предшественники могут быть циклизованы с применением нативного химического внутримолекулярного лигирования в водных буферах при физиологическом значении pH (pH = 7), а затем последовательно свернуты окислительным способом [35]. В лаборатории [37] стадии циклизации и фолдинга осуществляют в реакции «единого котла» с использованием восстановленного глутатиона в качестве тиоловой добавки во время реакции нативного химического лигирования. Используя этот подход, авторы [38] получили много дисульфидсодержащих полипептидов, включая природные и инженерные синтезированные циклотиды [33]. Гетерологичная экспрессия циклотидов может быть достигнута с помощью транс-сплайсинга белков. Этот подход использовался для получения нескольких МСоТI-циклотидов с использованием нативного остатка Cys, расположенного на N-конце петли 6, для облегчения циклизации каркаса [1].

5. Функциональные вставки пептидов для молекулярной трансплантации

Для получения целевых биопептидов с применением МПТ важно правильно подобрать пептидные вставки. Например, для создания антиоксидантного пептида можно использовать последовательности аминокислот WPRGYFL, GPDPRKFLGPF, WYGPDRPKFL и SDWDRF, которые были выделены из микроводорослей *Tetrademus obliquus* и показали выраженную антиоксидантную активность [39]. Ляо и др. [40] обнаружили, что трипептид IRW, полученный из яичного белка, снижает кровяное давление у крыс со спонтанной гипертензией за счет усиления экспрессии ACE2. Эти исследования указывают на потенциальное применение пептидов пищевого происхождения для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [41]. Полученный

натуральный короткий пептид IRW можно использовать в качестве функциональной вставки при МПТ.

Авторами [42] с использованием МПТ разработана серия аналогов глюкагоноподобного пептида, которые: предполагают его замену глицином в положении 2, норлейцином в положении 10, 11- и/или 16-гидрофобную замену. Полученные пептиды более эффективны в сравнении с природным гормоном, они показали высокую селективность к рецепторам [42].

В качестве пептидной вставки для создания нового биопептида с сосудорасширяющим и гипотензивным действием можно использовать короткий пептид новокинин (Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp). Следует отметить, что новокинин — это модифицированный овокинин, но обладающий более высоким селективным сродством к рецепторам ангиотензина II типа 2 в сравнении со своим предшественником. Также новокинин ингибирует базальную секрецию желудочной кислоты после внутримозгового введения и защищает слизистую оболочку желудка от повреждения, вызванного алкоголем, опосредованном пути AT2 рецептор-PG [43].

Линкеры Gly-Ser белках и пептидах выполняют важную роль в [43] и могут быть использованы для МПТ.

6. Примеры создания биопептидов/белков методом молекулярной трансплантации

Исследователями [44,45,46] на основе циклотидного каркаса были получены термостабильные пептиды с новой биологической активностью. В работе авторов [47] дана характеристика, полученного методом МПТ пептида лираглутид, представляющего химически синтезированный аналог человеческого глюкагоноподобного пептида. Авторами [48] представлены исследования пептида энфувиртид/фузеон — ингибитора проникновения ВИЧ-1 в CD4+ клетки, созданного путем трансплантации 6 аминокислотных остатков 638–673 гликопротеина оболочки ВИЧ-1 gp41 в каркас.

В результате исследований [49] с помощью МПТ последовательности из 20–25 аминокислот, ингибирующей адгезию и функционирование Т-клеток, синтезированы пептиды, способные блокировать адгезию Т-клеток, подавляющих развитие аутоиммунных заболеваний.

Авторы [44] создали функциональный пептид IL-10, связав два мономера с помощью гибкого линкера, и оценили его биологическую активность *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что новый IL-10 обладает улучшенной термостабильностью и стойкостью к воздействию реакционной среды (pH) и более высокой противовоспалительной активностью.

7. Выводы

Основной проблемой использования природных пептидов в качестве терапевтического средства остается их крайняя неустойчивость к ферментативному гидролизу в желудочно-кишечном тракте и быстрый период полураспада при попадании в организм. Показано, что способ молекулярной трансплантации (МПТ) позволяет эффективно конструировать биопептиды нового поколения, отличающиеся высокой термодинамической и метаболической стабильностью эпитопа, новыми или усиленными биологическими функциями и низкой аллергенностью. Это связано с тем, что они состоят из остатков аминокислот и, следовательно, распадаются на продукты, обычно присутствующие в организме человека. МПТ доказала свою успешность в разработке пептидных лекарств. Оценивая перспективы МПТ при создании пищевых ингредиентов, следует подчеркнуть приемлемость метода, способного обеспечить сохранность БАП при технологическом процессе производства пищевого продукта. Для расширения возможностей применения БАП нового поколения важно увеличить разнообразие оптимальных каркасных структур и исследовать их эффективность в процессах молекулярной трансплантации. Это также позволит снизить затраты на их производство. Необходимы исследования *in vitro* и *in vivo* для подтверждения эффективности БАП, включая оценку их фармакодинамических свойств (селективность и специфичность к мишеням) и фармакокинетических свойств (дозировка, механизм поступления в кровь и эффективность цитоплазматической доставки к мишеням). Особое внимание следует уделить применению БАП в пищевой промышленности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Camarero, J. A., Campbell, M. J. (2019). The potential of the cyclotide scaffold for drug development. *Biomedicines*, 7(2), Article 31. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020031>
2. Wang, C. K., Craik, D. J. (2021). Linking molecular evolution to molecular grafting. *Journal of Biological Chemistry*, 296, Article 100425. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100425>
3. Jacob, B., Vogelaar, A., Cadenas, E., Camarero, J. A. (2022). Using the cyclotide scaffold for targeting biomolecular interactions in drug development. *Molecules*, 27(19), Article 6430. <https://doi.org/10.3390/molecules27196430>
4. Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G. et al. (2022). Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7, Article 48. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
5. Sharma, K., Sharma, K. K., Sharma, A., Jain, R. (2023). Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug Discovery Today*, 28(2), Article 103464. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103464>
6. Agyei, D., Ahmed, I., Akram, Z., Iqbal, H. M. N., Danquah, M. K. (2017). Protein and peptide biopharmaceuticals: An overview. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 94–101. <https://doi.org/10.2174/0929866523666161222150444>
7. Lau, J. L., Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
8. Qin, L., Cui, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, X., Guan, J. et al. (2022). Challenges and strategies to enhance the systemic absorption of inhaled peptides and proteins. *Pharmaceutical Research*, 40, 1037–1055. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03435-3>
9. Holub, J. M. (2017). Small scaffolds, big potential: Developing miniature proteins as therapeutic agents. *Drug Development Research*, 78(6), 268–282. <https://doi.org/10.1002/ddr.21408>
10. Wang, C. K., Craik, D. J. (2021). Linking molecular evolution to molecular grafting. *Journal of Biological Chemistry*, 296, Article 100425. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100425>
11. Jacob, B., Vogelaar, A., Cadenas, E., Camarero, J. A. (2022). Using the cyclotide scaffold for targeting biomolecular interactions in drug development. *Molecules*, 27(19), Article 6430. <https://doi.org/10.3390/molecules27196430>
12. Hillman, R. A., Nadraws, J. W., Bertucci, M. A. (2018). The hydrocarbon staple and beyond: Recent advances towards stapled peptide therapeutics that target protein-protein interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(7), 611–624. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180518095255>
13. Ali, A. M., Atmaj, J., Van Oosterwijk, N., Groves, M. R., Dömling, A. (2019). Stapled peptides inhibitors: A new window for target drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 263–281. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.012>
14. Chan, A. M., Goodis, C. C., Pommier, E. G., Fletcher, S. (2022). Recent applications of covalent chemistries in protein-protein interaction inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry*, 13(8), 921–928. <https://doi.org/10.1039/d2md00112h>
15. Pan, X., Kortemme, T. (2021). Recent advances in *de novo* protein design: Principles, methods, and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 296, Article 100558. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100558>
16. Huang, P.-S., Boyken, S. E., Baker, D. (2016). The coming of age of *de novo* protein design. *Nature*, 537(7620), 320–327. <https://doi.org/10.1038/nature19946>
17. Woolfson, D. N. (2021). A brief history of *de novo* protein design: Minimal, rational, and computational. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), Article 167160. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167160>
18. Anishchenko, I., Pellock, S.-J., Chidyausiku, T.-M., Ramelot, T.-A., Ovchinnikov, S., Hao, J. et al. (2021). *De novo* protein design by deep network hallucination. *Nature*, 600, 547–552. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04184-w>
19. Wang, J., Lisanza, S., Juergens, D., Tischer, D., Anishchenko, I., Baek, M. et al. (2022). Scaffolding protein functional sites using deep learning. *Science*, 377(6604), 387–394. <https://doi.org/10.1126/science.abn2100>
20. Marchand, A., Van Hall-Beauvais A. K., Correia, B. E. (2022). Computational design of novel protein-protein interactions — An overview on methodological approaches and applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 74, Article 102370. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102370>
21. Zhou, W., Smidhehner, T., Jerala, R. (2020). Synthetic biology principles for the design of protein with novel structures and functions. *FEBS Letters*, 594(14), 2199–2212. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13796>
22. Lovelock, S. L., Crawshaw, R., Basler, S., Levy, C., Baker, D., Hilvert D. et al. (2022). The road to fully programmable protein catalysis. *Nature*, 606, 49–58. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04456-z>
23. Sia, S. K., Carr, P. A., Cochran, A. G., Malashkevich, V. N., Kim, P. S. (2002). Short constrained peptides that inhibit HIV-1 entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 99(23), 14664–14669. <https://doi.org/10.1073/pnas.232566599>
24. Qin, L., Cui, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, X., Guan, J. et al. (2022). Challenges and strategies to enhance the systemic absorption of inhaled peptides and proteins. *Pharmaceutical Research*, 40, 1037–1055. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03435-3>
25. Wang, C. K., Craik, D. J. (2018). Designing macrocyclic disulfide-rich peptides for biotechnological applications. *Nature Chemical Biology*, 14, 417–427. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0039-y>
26. Crook, Z. R., Sevilla, G. P., Friend, D., Brusniak, M.-Y., Bandaranayake, A. D., Clarke, M. et al. (2017). Mammalian display screening of diverse cystine-dense peptides for difficult to drug targets. *Nature Communications*, 8, Article 2244. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02098-8>
27. Simeon, R., Chen, Z. (2018). *In vitro*-engineered non-antibody protein therapeutics. *Protein and Cell*, 9(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0386-6>
28. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., Gilliland, G. L. (2019). Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies*, 8(4), Article 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
29. Korendovych, I. V., DeGrado, W. F. (2020). *De novo* protein design, a retrospective. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 53, Article e3. <https://doi.org/10.1017/S0033583519000131>
30. Bhardwaj, G., Mulligan, V. K., Bahl, C. D., Gilmore, J. M., Harvey, P. J., Cheneval, O. et al. (2016). Accurate *de novo* design of hyperstable constrained peptides. *Nature*, 538, 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature19791>
31. Dawson, W. M., Rhys, G. G., Woolfson, D. N. (2019). Towards functional *de novo* designed proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 52, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.011>
32. Garcia, A. E., Camarero, J. A. (2010). Biological activities of natural and engineered cyclotides, a novel molecular scaffold for peptide-based therapeutics. *Current Molecular Pharmacology*, 3(5), 153–163. <https://doi.org/10.2174/187446721003030153>
33. Aboye, T., Meeks, C. J., Majumder, S., Shekhtman, A., Rodgers, K., Camarero, J. A. (2016). Design of a MCoTI-based cyclotide with angiotensin (1–7)-like activity. *Molecules*, 21(2), Article 152. <https://doi.org/10.3390/molecules21020152>
34. Grover, T., Mishra, R., Bushra, Gulati, P., Mohanty, A. (2021). An insight into biological activities of native cyclotides for potential applications in agriculture and pharmaceuticals. *Peptides*, 135, Article 170430. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170430>
35. Camarero, J. A. (2017). Cyclotides, a versatile ultrastable micro-protein scaffold for biotechnological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(23), 5089–5099. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.051>
36. Cybase. (2024). The database of cyclic proteins. The Institute of Molecular Biosciences IMG, Brisbane, Australia. Retrieved from <https://cybase.org.au> Accessed March 04, 2024. Access mode: for registered users.
37. Li, Y., Bi, T., Camarero, J. A. (2015). Chemical and biological production of cyclotides. Chapter in a book: *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd., United Kingdom. 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.08.006>
38. Aboye, T., Kuang, Y., Neamati, N., Camarero, J. A. (2015). Rapid parallel synthesis of bioactive folded cyclotides by using a tea-bag approach. *ChemBioChem*, 16(5), 827–833. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402691>
39. Li, Y., Gould, A., Aboye, T., Bi, T., Breindel, L., Shekhtman, A. et al. (2017). Full sequence amino acid scanning of theta-defensin RTD-1 yields a potent anthrax lethal factor protease inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1916–1927. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01689>
40. Montone, C. M., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Piovesana S., Chiozzi, R. Z. et al. (2018). Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 3573–3586. <http://doi.org/10.1007/s00216-018-0925-x>
41. Liao, W., Fan, H., Davidge, S. T., Wu, J. (2019). Egg white-derived antihypertensive peptide IRW (Ile-Arg-Trp) reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats via the ACE2/Ang (1–7)/Mas receptor axis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(9), Article e1900063. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900063>
42. Wisniewski, K., Sueiras-Diaz, J., Jiang, G., Galyean, R., Lu, M., Thompson, D. et al. (2016). Synthesis and pharmacological characterization of novel glucagon-like peptide-2 (GLP-2) analogues with low systemic clearance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(7), 3129–3139. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01909>
43. Zhang, Y., Xiu, M., Jiang, J., He, J., Li, D., Liang, S. et al. (2016). Novokinin inhibits gastric acid secretion and protects against alcohol-induced gastric injury in rats. *Alcohol*, 56, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.08.003>
44. Minshawi F., Lanvermann S., McKenzie E., Jeffery R., Couper K., Papoutsopoulou, S. et al. (2020). The generation of an engineered Interleukin-10 protein with improved stability and biological function. *Frontiers in Immunology*, 11, Article 1794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01794>
45. González-Castro, R., Gómez-Lim, M. A., Plisson, F. (2021). Cysteine-rich peptides: Hyperstable scaffolds for protein engineering. *ChemBioChem*, 22(6), 961–973. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000634>
46. Mehta L., Dhankhar R., Gulati P., Kapoor R. K., Mohanty A., Kumar S. (2020). Natural and grafted cyclotides in cancer therapy: An insight. *Journal of Peptide Science*, 26(4–5), Article e3246. <https://doi.org/10.1002/psc.3246>
47. Hamad, F., Elnour, A. A., Elamin, A., Mohamed, S., Yousif, I., Don, J. et al. (2021). Systematic review of glucagon like peptide one receptor agonist liraglutide for subjects with heart failure with reduced left ventricular ejection fraction. *Current Diabetes Reviews*, 17(3), 280–292. <https://doi.org/10.2174/1573399816999200821164129>
48. Yi, H. A., Fochtman, B. C., Rizzo, R. C., Jacobs, A. (2016). Inhibition of HIV entry by targeting the envelope transmembrane subunit gp41. *Current HIV Research*, 14(3), 283–294. <https://doi.org/10.2174/1570162x14999160224103908>
49. Steward-Tharp, S. M., Song, Y.-J., Siegel, R. M., O'Shea, J. J. (2010). New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183(1), 123–148. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05124.x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник, Руководитель Отдела координации инициативных и международных проектов, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (109) E mail: i.chernuha@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4298-0927	Irina M. Chernukha , Doctor of Technical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Principal Researcher, Head of the Department for Coordination of Initiative and International Projects, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina, 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (109) E mail: i.chernuha@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4298-0927
Тихонов Сергей Леонидович — доктор технических наук, профессор, директор научно-образовательного центра «Прикладные нанобиотехнологии», Уральский государственный аграрный университет 620000, Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42 профессор кафедры химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет 620100, Екатеринбург, Сибирский тракт, 37 Тел.: +7-912-276-98-95 E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4863-9834 * автор для контактов	Sergey L. Tikhonov , Doctor of Technical Sciences, Professor, Director of the Scientific and Educational Center «Applied Nanobiotechnology», Ural State Agricultural University 42, Karl Liebknecht str., 620000, Yekaterinburg, Russia Professor, Department of Chemical Technology of Wood, Biotechnology and Nanomaterials Ural State Forestry University 37 Sibirskiy Trakt, 620100, Yekaterinburg, Russia Tel.: +7-912-276-98-95 E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4863-9834 * corresponding author
Тихонова Наталья Валерьевна — доктор технических наук, заведующий кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет 620000, Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42 Тел.: +7-919-392-37-09 E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5841-1791	Natalia V. Tikhonova , Doctor of Technical Sciences, Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Ural State Agricultural University 42, Karl Liebknecht str., 620000, Yekaterinburg, Russia Tel.: +7-919-392-37-09 E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5841-1791
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.