

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2644>
<https://elibrary.ru/SSEKBE>

Обзорная статья
<https://fptt.ru>

К вопросу о пероральной доставке биологически активных белковых молекул: проблемы и перспективы



Н. В. Мерзлякова¹, С. А. Тихонов^{1,2,3,*},
Н. В. Тихонова², М. С. Тимофеева², А. Н. Семин⁴,
А. В. Курдюмов⁴, А. С. Лылов³

¹ Уральский государственный лесотехнический университет^{ROR}, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный аграрный университет^{ROR}, Екатеринбург, Россия

³ Башкирский государственный аграрный университет^{ROR}, Уфа, Россия

⁴ Уральский государственный экономический университет^{ROR}, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию: 29.03.2026

Принята после рецензирования: 04.05.2026

Принята к публикации: 02.06.2026

*e-mail: tihonov75@bk.ru

© Н. В. Мерзлякова, С. А. Тихонов, Н. В. Тихонова,
М. С. Тимофеева, А. Н. Семин, А. В. Курдюмов,
А. С. Лылов, 2026



Аннотация.

К основным факторам, снижающим эффективность перорального применения биопептидов и белков относятся ферментативная деградация в ЖКТ, прохождение через слизистый слой, селективный барьер из эпителиальных клеток, кислая среда желудка и низкий период полувыведения. В связи с этим биологически активные белковые молекулы не могут эффективно использоваться в качестве функциональных пищевых ингредиентов в составе продуктов питания профилактического и лечебного назначения. Цель исследования – проанализировать научные направления и стратегии, способствующие решению проблемы нестабильности пептидов и белков в ЖКТ при пероральном применении.

Объектами исследования выступали научные публикации, посвященные пероральному применению, стабильности и биодоступности пептидов и белков в ЖКТ. Проведен систематический поиск в базах данных eLIBRARY.RU, MEDLINE, PubMed, EMBASE, Europe PMC, Scopus, Web of Science и Google Scholar за период 2020–2025 гг. (с включением фундаментальных более ранних работ). Из 1346 первоначально найденных результатов после ручного отбора в обзор включено 116 статей, касающихся повышения стабильности белков и пептидов в ЖКТ.

Установлено, что инкапсуляция пептидов в липидные (твердые липидные наночастицы, наноструктурированные липидные носители, липосомы) и полимерные наноносители повышает стабильность и биодоступность при пероральном применении. Клеточно-проникающие пептиды и их интеграция с различными носителями лекарственных средств позволяют создавать многофункциональные системы доставки. Перспективным направлением является использование модифицированных микроорганизмов (модифицированных живых биотерапевтических продуктов) для адресной доставки пептидов и белков. Разрабатываются методы амплификации матричных белков, а также стратегии создания пептидов для перорального введения с применением ингибиторов протеаз, усилителей проницаемости, химической модификации и циклизации.

В результате собственных исследований получен нативный противовирусный пептид. Его инкапсулирование в мальтодекстрин повысило стабильность в кишечнике на модели *in vitro* в 1,8 раза. Также синтезированы новые циклические биопептиды и рекомбинантный белок, доказано их биологическое действие в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова. Пептиды, белки, пероральная доставка, клеточно-проникающие пептиды, усовершенствованная микробная терапия, усилители проницаемости, полимерные системы, инкапсуляция, липидные носители

Для цитирования: Мерзлякова Н. В., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Тимофеева М. С., Семин А. Н. и др. К вопросу о пероральной доставке биологически активных белковых молекул: проблемы и перспективы. Техника и технология пищевых производств. 2026. Т. 56. № 2. С. 380–400. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2644>

Oral Delivery of Bioactive Protein Molecules: Problems and Perspectives



Natalia V. Merzlyakova¹, Sergey L. Tikhonov^{1,2,3,*},
Natalia V. Tikhonova², Maria S. Timofeeva², Alexander N. Semin⁴,
Alexander V. Kurdyumov⁴, Anton S. Lylov⁴

¹ Ural State Forestry University^{ROR}, Yekaterinburg, Russia

² Ural State Agrarian University^{ROR}, Yekaterinburg, Russia

³ Bashkir State Agrarian University^{ROR}, Ufa, Russia

⁴ Ural State University of Economics^{ROR}, Yekaterinburg, Russia

Received: 29.03.2026
Revised: 04.05.2026
Accepted: 02.06.2026

*e-mail: tikhonov75@bk.ru
© N.V. Merzlyakova, S.L. Tikhonov, N.V. Tikhonova, M.S. Timofeeva,
A.N. Semin, A.V. Kurdyumov, A.S. Lylov, 2026



Abstract.

Bioactive peptides and proteins can be administered orally. However, this method remains largely ineffective because of enzymatic degradation in the gastrointestinal tract, the mucus layer, the selective epithelial barrier, the acidic stomach environment, and a short half-life. As a result, bioactive protein molecules have little prospect as functional food ingredients unless appropriate delivery systems are used. This review describes scientific trends and strategies aimed at solving the problem of the instability of peptides and proteins in the gastrointestinal tract during oral administration.

The review analyzed scientific publications on the oral administration, stability, and bioavailability of peptides and proteins in the gastrointestinal tract registered in eLIBRARY.RU, MEDLINE, PubMed, EMBASE, Scopus, Web of Science, and Google Scholar between 2020 and 2025 (alongside some fundamental earlier works). Of the 1,346 manually selected publications, the review included 116 articles.

Peptides can be encapsulated in solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, liposomes, or polymer nanocarriers. Encapsulation increases stability and bioavailability during oral administration. Cell-penetrating peptides and their integration with various drug carriers create multifunctional delivery systems. Modified living biotherapeutic products are promising carriers for the targeted delivery of peptides and proteins. Novel methods include matrix protein amplification, protease inhibitors, permeability enhancers, chemical modification, and cyclization.

The article also describes new cyclic biopeptides, a recombinant protein, and a native antiviral peptide with reliable bioactive properties. The maltodextrin-encapsulated antiviral peptide demonstrated a 1.8-fold increase in intestinal stability *in vitro*.

Keywords. Peptides, proteins, oral delivery, cell-penetrating peptides, advanced microbial therapy, permeability enhancers, polymer systems, encapsulation, lipid carriers

For citation: Merzlyakova NV, Tikhonov SL, Tikhonova NV, Timofeeva MS, Semin AN, *et al.* Oral Delivery of Bioactive Protein Molecules: Problems and Perspectives. Food Processing: Techniques and Technology. 2026;56(2):380–400. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2644>

Введение

По прогнозам, объем рынка препаратов на основе белков (в т. ч. рекомбинантных) и пептидов к 2032 г. составит 1326,16 млрд долл США. Такие препараты вводятся преимущественно внутривенно, внутривенно, внутримышечно и подкожно. Перечисленные способы введения недостаточно удобны, создают риск инфицирования и являются дорогостоящими, что часто вызывает негативную реакцию пациентов, особенно страдающих хроническими заболеваниями (например диабетом), требующими регулярного лечения [1, 2]. В настоящее время лишь несколько

препаратов на основе белков разрешены и эффективны при пероральном приеме. Кроме того, сами действующие вещества – белки и пептиды – не могут использоваться в качестве функциональных пищевых ингредиентов в составе продуктов профилактического и лечебного назначения. Проблема заключается в том, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) представляет собой естественный физиологический барьер на пути действующего белка или пептида в кровоток. Биодоступность белков при пероральном применении может снижаться до 2 % из-за воздействия на них желудочного сока и протеаз [3]. Проводятся испытания

инкапсулированных препаратов на основе белков, защищенных от кислотной денатурации и ферментативного разрушения, однако их применение в пероральной доставке по-прежнему ограничено рядом факторов. Во-первых, вязкий полупроницаемый слизистый слой служит первичным барьером для диффузии наночастиц к поверхности кишечного эпителия. Во-вторых, плотные контакты между эпителиальными клетками кишечника значительно препятствуют проникновению макромолекул через межклеточные щели. В-третьих, большой размер и гидрофильность макромолекул также препятствуют их трансклеточному прохождению [4].

Известно, что такие биомолекулы, как витамин B_{12} и трансферрин, проникают через слизистый слой и эпителиальные клетки кишечника с помощью различных переносчиков и рецептор-опосредованных транспортных систем [5]. Однако и эти системы сталкиваются с множеством проблем, включая низкую экспрессию рецепторов-мишеней и недостаточную эффективность поглощения [6].

В научных исследованиях и в одобренных методах лечения внутривенное и подкожное введение остаются основными способами доставки терапевтических пептидов и белков. В то же время пероральное введение биопептидов и белков представляет большой интерес, поэтому проводятся научные исследования, направленные на создание пероральных пептидов и их использование в составе пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Цель исследования – проанализировать научные направления и стратегии, способствующие решению проблемы нестабильности пептидов и белков в ЖКТ при пероральном применении.

Объекты и методы

Методология обзорного исследования включала поиск литературы с применением критериев включения и исключения, определение источников данных, отбор субъектов исследования, а также сопоставление, обобщение и представление результатов. Использован поисковый запрос по ключевым словам: пероральное применение, пептиды, белки, стабильность пептидов в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), биодоступность пептидов и др.

Чтобы сосредоточиться на наиболее актуальных исследованиях, поиск в базе данных был ограничен периодом с 2020 по 2025 гг., но также использованы некоторые информативные фундаментальные статьи, опубликованные более десяти лет назад. Также в обзоре проанализированы статьи за последние 3 года, на которые ссылались авторы. В анализ включены экспериментальные и обзорные статьи по теме, находящиеся в открытом доступе, а также аннотации статей с закрытым полнотекстовым доступом.

В качестве источника информации использовали базы данных eLIBRARY.RU, MEDLINE, PubMed,

EMBASE, Europe PMC (препринты), Scopus, Web of Science и Google Scholar.

Поиск в базах данных позволил получить 1346 результатов, вручную отобрано 248 статей. В обзор включено 116 статей, посвященных проблематике повышения стабильности белков и пептидов в ЖКТ.

Результаты и обсуждение

Основные проблемы при пероральном введении пептидов и белков. Пероральная доставка крупных и структурно сложных биомолекул затруднена из-за их низкой стабильности в кишечнике и ограниченной абсорбции [7, 8], а большая молекулярная масса и подверженность ферментативной деградации в условиях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) ограничивают их биодоступность при пероральном приеме и терапевтическую эффективность [9] (рис. 1). Таким образом, создание биопептидов и белков для применения внутрь представляет собой одну из важных комплексных задач, стоящих перед фармацевтической и биотехнологической промышленностью и направленных на повышение эффективности продуктов питания специализированного назначения и превентивной медицины [7, 10].

Проблемы со стабильностью возникают из-за различий в уровне pH и ферментативной деградации в разных отделах ЖКТ, в т. ч. из-за наличия пепсина в желудке (pH 1–4), трипсина и химотрипсина в тонком кишечнике (pH 6,5–7,0), а также жизнедеятельности микроорганизмов в толстом кишечнике (pH 5–7). Нарушения проницаемости связаны с преодолением слизистого слоя и селективного барьера из эпителиальных клеток, где белки плотных контактов (например окклюдин, клаудин) препятствуют парацеллюлярному транспорту и регулируют его.

Кислая среда желудка денатурирует большинство пептидов и белков, вызывая их разрушение до того, как они будут абсорбированы в кровоток [12]. Уровень pH в ЖКТ сильно варьируется в зависимости от рациона, состояния здоровья, возраста и пола. У здоровых людей pH в желудке низкий (1,0–2,5), в двенадцатиперстной кишке он повышается до нейтральных значений (6,0–6,5), а в дистальном отделе подвздошной кишки достигает 7,0–7,5, тогда как pH в толстой кишке колеблется в пределах 5,0–7,0 [13]. pH желудка может влиять на степень ионизации препаратов на основе пептидов, потенциально приводя к изменению их структуры или биологической активности [14].

Пищеварительные ферменты, которые в основном вырабатываются в желудке и тонком кишечнике, необходимы для расщепления пищевых белков на усваиваемые компоненты (короткие пептиды и аминокислоты). Однако эта ферментативная активность ограничивает пероральную доставку пептидных препаратов. В желудке пепсин является ключевым протеолитическим ферментом, оптимально действующим при кислом pH и эффективно расщепляющим белки. Так, период

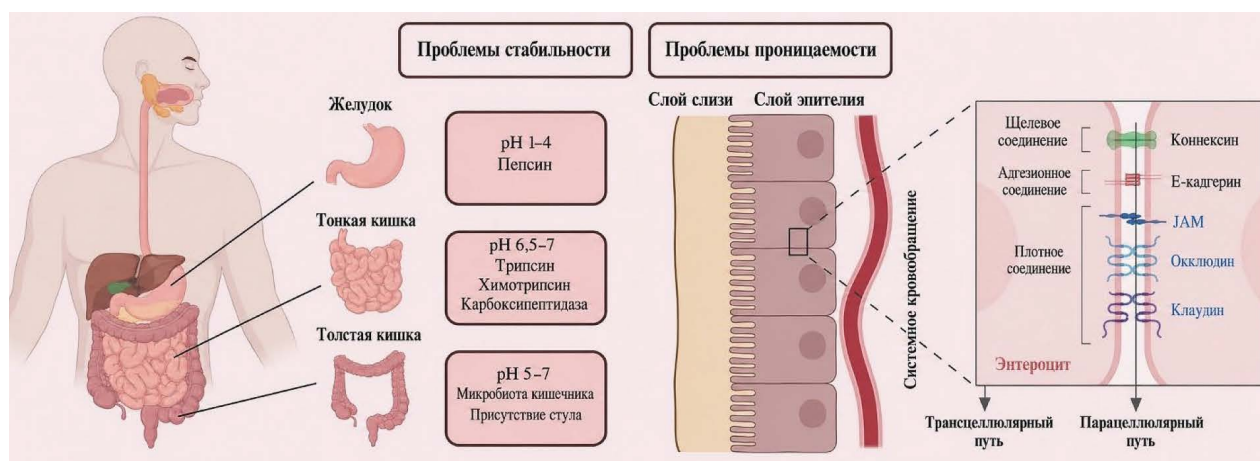


Рисунок 1. Основные проблемы при пероральном введении пептидов и белков [11]

Figure 1. Main challenges in oral administration of peptides and proteins [11]

полувыведения нативного ГПП-1 составляет менее 2 мин при pH 2,6 и примерно 5,5 мин при pH 5,0 под воздействием пепсина. Аналогичным образом семаглутид (в сочетании с SNAC) показал период полувыведения 16 мин при pH 2,6 и 34 мин при pH 5,0 [15]. В тонком кишечнике важную роль в расщеплении белков играют дополнительные ферменты, в т. ч. трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза. Трипсин расщепляет пептидные связи преимущественно после основных аминокислот – лизина и аргинина. Химотрипсин воздействует на ароматические и крупные гидрофобные аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан), а также, хотя и менее эффективно, на лейцин и метионин. Слизистый барьер существенно влияет на пероральную доставку пептидных препаратов, выполняя защитную функцию в ЖКТ. Он состоит в основном из воды и муцинов и образует сложную сеть из двух слоев: плотного внутреннего слоя, прилегающего к эпителию и защищающего от патогенов, и внешнего слоя, рыхло связанного с эпителием и колонизированного комменсальными микроорганизмами [16]. Коэффициент диффузии пептидов и белков в кишечной слизи снижается с увеличением молекулярной массы, причем основным препятствием для транспорта макромолекул становятся стерические затруднения. Помимо этого, на диффузию пептидов влияет распределение зарядов, т. к. сильно анионный синтетический пептид (заряд –12) легче диффундировал в восстановленных желудочных муциновых гелях, чем катионный пептид (заряд +8). Пептиды с почти нулевым зарядом (+2) не подвергались ограничениям, в некоторых случаях их диффузия усиливалась в присутствии муцинов. Кроме того, исследование на крысах *in vivo* показало, что слизь двенадцатиперстной кишки ограничивает диффузию макромолекул массой от 3,5 до 89,0 кДа, что указывает на ее роль в ограничении биодоступности пептидов [17].

Эпителий ЖКТ представляет собой значительный барьер для эффективного всасывания терапевтических препаратов на основе пептидов и белков, однако они могут проникать через эпителиальный слой трансклеточным или парацеллюлярным путем. Трансклеточный путь предполагает либо пассивную диффузию через апикальную и базолатеральную мембраны, либо использование механизмов активного транспорта (например слияние мембран и внутриклеточное всасывание с последующей системной секрецией) [18]. Несмотря на это, из-за большого размера пептиды и белки редко проникают через клеточные мембраны трансклеточным путем [19]. Их поглощение этим путем может ограничиваться внутриклеточной деградацией под действием цитозольных ферментов [20]. Парацеллюлярный путь предполагает транспорт лекарственного вещества через заполненные водой поры или парацеллюлярные пространства между соседними клетками. Площадь поверхности кишечного эпителия составляет примерно 2×10^6 см², из которых лишь 0,01–0,10 % (~ 200–2000 см²) приходится на межклеточное пространство. Теоретически этого достаточно для системной абсорбции пептидов и белков в пикомолярных и наномолярных концентрациях, способных оказывать биологическое воздействие [21]. Тем не менее плотные контакты в межклеточном пространстве ограничивают поглощение макромолекул. Эти межклеточные структуры, регулируемые такими белками, как клаудины, молекулы межклеточной адгезии и замыкательные пластинки действуют как структурные барьеры, препятствующие прохождению макромолекул [22]. Таким образом, биодоступность белковых молекул резко снижается, если их молекулярная масса превышает 700 Да [23]. Для преодоления указанных ограничений пептидов и белков исследователи-биотехнологи стремятся разработать соответствующие системы доставки [24].

Инкапсуляция и липидные носители. Инкапсуляция предполагает помещение пептидов в наноструктурированные матрицы или покрытия, обычно состоящие из липидов, полимеров или неорганических материалов, что обеспечивает улучшенную транспортировку и контролируемое высвобождение. Выбор материала зависит от физико-химических свойств пептида и предполагаемого терапевтического применения [25].

Твердотельные липидные наночастицы все чаще используются в качестве перспективных наноносителей для доставки лекарств при лечении различных заболеваний, включая микробные инфекции, диабет, неврологические расстройства, кожные заболевания и особенно рак [25]. Эти наночастицы состоят из кристаллического липидного ядра, стабилизированного поверхностно-активными веществами, а в некоторых случаях – со-поверхностно-активными веществами [26]. Состав твердой сердцевины наночастиц, которая обычно состоит из жирных кислот, жирных спиртов, восков, а также моно-, ди- и триглицеридов, может влиять на их свойства. Наночастицы являются твердыми при физиологической температуре, биосовместимыми и биоразлагаемыми, а также способны инкапсулировать как гидрофильные, так и липофильные лекарственные вещества, что повышает их стабильность, растворимость и биодоступность [27].

В отличие от этого, применение наночастиц серебра в качестве наноносителей для доставки лекарств сопряжено с рядом трудностей. К физико-химическим нестабильностям относятся перекристаллизация, полиморфные переходы, утечка лекарства при хранении и недостаточная степень загрузки лекарства, что ограничивает срок годности и клинический потенциал этих материалов. Однако недавние исследования продемонстрировали значительный прогресс в преодолении этих ограничений [28].

L. Su *et al.* [29] рассматривали возможность использования супрамолекулярных наночастиц в качестве носителей для сохранения структурной целостности пептидов в неблагоприятных условиях ЖКТ. В ходе исследования инкапсулированы две фракции пептидов, полученные из овсяного глобулина, в результате чего сформированы наночастицы с различными характеристиками: пептиды с молекулярной массой менее 3 кДа; пептиды от 3 до 10 кДа, которые имели средний размер 270,9 нм и индекс полидисперсности 0,44. Оба состава демонстрировали коллоидную стабильность. В имитационных средах ЖКТ наночастицы обеспечивали контролируемое высвобождение пептидов, которое было более медленным для частиц с низкомолекулярными пептидами. Максимальное высвобождение низкомолекулярных пептидов в желудочном соке составило 7,87 %; в кишечном соке – 42,0 % через 6 ч. Наночастицы сохраняли высокую ингибирующую активность в отношении дипептидилпептидазы IV (ДПП4), поддерживая функциональность пептидов и предотвращая их разруше-

ние. Неинкапсулированная фракция пептидов быстро теряла ингибирующую активность в отношении ДПП4, снижаясь с 70,0 до 30,8 и 8,4 % через 0, 2 и 3 ч инкубации соответственно. Эти результаты демонстрируют эффективность супрамолекулярных наночастиц как системы для защиты и доставки биоактивных пептидов при пероральном применении.

Наноструктурированные липидные носители (НЛН) – второе поколение липидных наночастиц, разработанное для преодоления ограничений первого поколения (а именно – супрамолекулярных липидных наночастиц [30]), таких как ограниченная способность к загрузке лекарственного вещества и риск его высвобождения при хранении вследствие кристаллизации твердой липидной матрицы. В составе НЛН используются биосовместимые и биоразлагаемые липиды в твердой и жидкой фазах. К твердым липидам относятся олеиновая кислота, каприловые триглицериды и α -токоферол, тогда как жидкие липиды включают коприт 888 АТО, прецириол АТО 5 и стеариновую кислоту [31]. Инкорпорация жидких липидов вызывает структурные дефекты в твердых липидах, приводя к менее упорядоченному расположению кристаллов, что предотвращает утечку лекарственного средства и обеспечивает высокую нагрузочную способность [32].

В последние годы наночастицы на основе липидов привлекают внимание в качестве альтернативы супрамолекулярным наночастицам, полимерным наночастицам, эмульсиям, микрочастицам, липосомам и другим носителям [33]. Эти наноносители подходят для доставки как гидрофильных, так и липофильных лекарственных препаратов и могут применяться перорально, парентерально, а также в офтальмологии, пульмонологии, при местном и трансдермальном использовании [34]. Среди их преимуществ – более высокая нагрузочная способность по сравнению с супрамолекулярными наночастицами и устойчивость к агрегации частиц при хранении. Однако они обладают цитотоксическим действием, а используемые поверхностно-активные вещества могут вызывать раздражение и сенсибилизацию [35].

Колистин – пептид, взаимодействующий с липополисахаридами на внешней мембране грамотрицательных бактерий, вызывая прежде всего вытеснение ионов кальция и магния. Этот механизм значительно снижает стабильность внешней мембраны и повышает ее проницаемость, что приводит к гибели бактерий вследствие выхода цитоплазматического содержимого [36]. L. Fernández-Barat *et al.* [37] инкапсулировали колистин, чтобы оценить его эффективность против бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Средний размер наночастиц составлял 300–427 нм, эффективность инкапсуляции – 80–95 %, что обеспечивало пролонгированное высвобождение препарата – не менее 50 % в течение первых 24 ч. Антимикробная активность в отношении планктонных бактерий показала, что как свободный, так и наноинкапсулированный колистин

имеют минимальную ингибирующую концентрацию ≤ 4 мкг/мл для большинства изолятов. Однако для уничтожения биопленок свободный колистин требовался в концентрации от 640 до 2560 мкг/мл, тогда как колистин, инкапсулированный в наночастицы, успешно уничтожал биопленки при концентрации всего 160–320 мкг/мл. Кроме того, в тестах на рост бактерий восьмикратная минимальная ингибирующая концентрация свободного колистина (16 мкг/мл для штамма 056SJD и 256 мкг/мл для штамма P19) сразу же подавляла рост бактерий, но наночастицы еще больше повышали эффективность против резистентных штаммов. Полученные результаты показывают, что инкапсуляция колистина в липидные наночастицы усиливает его антимикробную и противобиопленочную активность, что делает этот подход перспективной стратегией борьбы с резистентными инфекциями.

Авторы [38] продемонстрировали преимущества использования наноносителей, в частности липидных наночастиц, для доставки таких пептидов, как гесперидин и кларитромицин, при лечении *Helicobacter pylori*. Оптимизированные липидные наночастицы имели средний размер частиц (19,6 нм) и отрицательный дзета-потенциал (19,4 мВ), что обеспечивало высокую стабильность системы. Такой нанометровый размер повышает биодоступность, облегчая проникновение в бактериальную мембрану и защищая инкапсулированные препараты от воздействия кислой среды желудка. Наночастицы обеспечивали контролируемое и пролонгированное высвобождение лекарственного вещества в течение 24 ч с эффективностью инкапсуляции 78 % для гесперидина и 28 % для кларитромицина, что позволило сократить частоту введения препарата и повысить его антимикробную эффективность. Исследования *in vitro* показали, что рост *H. pylori* подавляется в зависимости от времени и концентрации, достигая 94 % подавления. Совместное действие компонентов приводит к повреждению бактериальной мембраны, повышает проницаемость для антибиотика и способствует уничтожению бактерий. Эти результаты позволяют предположить, что инкапсуляция антимикробных препаратов в наночастицы снижает необходимую дозировку, уменьшает частоту введения и повышает противомикробную активность в отношении основного возбудителя гастрита.

Липосомы. Липосомы – автономные сферические наноносители на основе липидного бислоя, широко используемые в медицине для доставки лекарств [39]. Они состоят из фосфолипидов холестерина, что делает их биоразлагаемыми, биосовместимыми, а также малотоксичными и иммуногенными [40]. Выбор подходящего липидного состава для доставки пептидов имеет решающее значение, поскольку он влияет на физические свойства липосом, в т. ч. на эффективность инкапсуляции, содержание и стабильность пептида [41]. Фосфатидилэтаноламины менее склонны к образованию ламеллярных фаз, поэтому их часто используют

для создания фузогенных липосом, которые могут сливаться с мембранами клеток-мишеней. Кроме того, в липосомальных носителях антимикробных пептидов обычно не используют анионные фосфолипиды (например фосфатидилглицерин), т. к. многие катионные антимикробные пептиды проявляют мембраноразрушающую активность в присутствии анионных фосфолипидов [42].

S. Cantor *et al.* [43] выявили достоинства использования наноносителей для доставки пептидов, особенно с точки зрения антимикробной активности. Инкапсуляция пептидов в липосомы, покрытые полимером (Eudragit E-100), значительно повысила их стабильность и биологическую активность. Размер частиц наноносителей составлял примерно 235 нм в липосомах без покрытия и увеличивался почти вдвое при добавлении пептидов. Дзета-потенциал после нанесения покрытия менялся с отрицательного на положительный, что свидетельствует об эффективной модификации поверхности (с -18 до $+11$ мВ). Антимикробная эффективность инкапсулированных пептидов значительно повысилась. Инкапсуляция увеличила активность пептида против *Listeria monocytogenes* в 2083 раза, а в присутствии *Escherichia coli* – в 12,5 раза. Эти результаты демонстрируют потенциал подобных наноносителей в борьбе с пищевыми патогенами.

N. M. Alzahrani *et al.* [44] инкапсулировали тобрамицин и пептид IDR-1018 в липосомы для оценки их эффективности в отношении референс-штамма *P. aeruginosa* PA01. Эффективность инкапсуляции тобрамицина составила 94 ± 2 %, размер частиц не превышал 200 нм, а дзета-потенциал был выше 55 мВ, что указывает на коллоидную стабильность и сильное электростатическое взаимодействие с бактериальной биопленкой. Анализ минимальной ингибирующей концентрации показал, что пептид IDR-1018 эффективен против PA01.

Полимерные наноносители. Полимерные наноносители, состоящие из синтетических, полусинтетических или природных полимеров, были тщательно изучены благодаря их способности повышать терапевтическую эффективность и снижать токсичность действующих веществ [45]. Эти носители обеспечивают пролонгированное высвобождение лекарственных средств с уникальной фармакокинетикой для доставки антимикробных пептидов, белков и ДНК в определенные органы или клетки [46].

Скорость высвобождения лекарственного средства зависит от характеристик полимера, условий приготовления и свойств. Основные механизмы высвобождения включают диффузию, эрозию матрицы и осмотическое давление [47]. Способ приготовления определяет характер взаимодействия терапевтического соединения с полимерной матрицей: растворение, связывание, инкапсуляция или удержание внутри матрицы. Полимерные наночастицы могут представлять собой нанокапсулы или наносферы. Нанокапсулы содержат

терапевтические соединения, заключенные в полимерную оболочку, тогда как наносферы – соединения, встроенные в полимерную матрицу [48].

B. Giordani *et al.* [49] инкапсулировали антимикробные пептиды G17 и G19 в наночастицы полимолочной гликолевой кислоты для повышения их стабильности и антимикробной активности в отношении *E. Coli* O157:H7. Полученные наночастицы имели средний размер (290 нм).

Полимерные покрытия служат защитным барьером от воздействия соляной кислоты и обеспечивают контролируемое высвобождение активных соединений в кишечнике в зависимости от локализации [50]. К числу таких полимеров относятся сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы и фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, которые интенсивно изучаются за счет своих энтеросолюбивых и пластифицирующих свойств, облегчающих инкапсуляцию антимикробных пептидов и pH-чувствительных биоактивных веществ [51]. Сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы растворяется при pH выше 5,5, что позволяет использовать его для защиты соединений в желудке и обеспечения их высвобождения в тонком кишечнике. В отличие от него, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы растворяется при более высоких значениях pH (обычно выше 6,0), что обеспечивает высвобождение на поздних этапах. Такой подход эффективно предотвращает преждевременную деградацию активных метаболитов и повышает их биодоступность, структурную стабильность, биоактивность и функциональные характеристики при прохождении через ЖКТ [52].

В результате собственного исследования из трипсинового гидролизата коровьего молока получен пептид, состоящий из 20 аминокислотных остатков. В эксперименте *in vitro* подтверждена его противовирусная и антиоксидантная активность. Пептид инкапсулировали в псевдокипящем слое при нанесении защитного слоя мальтодекстрина. Установлено, что через 2 мин обработки при скорости витания частиц пептида $0,35 \times 10^{-3}$ формируется защитный поверхностный слой толщиной 12 мкм; через 3 мин – 14 мкм; через 5 мин – 16 мкм. Таким образом, после 2 мин скорость образования слоя снизилась до 2 мкм/мин. За последующие 9 мин толщина слоя мальтодекстрина вокруг пептида увеличилась до 20 мкм. Средняя скорость приращения толщины слоя составила около 0,2 мкм/мин.

Проведены исследования стабильности свободного и инкапсулированного синтезированного пептида с использованием программируемого лабораторного комплекса ферментативной обработки, предназначенного для оптимизации процесса энзимного разложения лабораторных образцов белкового происхождения. После ферментирования в ротовой полости стабильность инкапсулированного пептида была выше на 61 % по сравнению со свободным пептидом. В результате исследований на модели ЖКТ (*in vitro*) установлено,

что инкапсулированный пептид достигает кишечника, где подвергается гидролизу. Стабильность пептида после 4 ч переваривания в кишечнике составляет 36 %, время высвобождения 9 ч, что в 1,8 раза выше по сравнению со свободным пептидом [53].

Клеточно-проникающие пептиды. Для повышения эффективности доставки биологических молекул через слизистую оболочку кишечника и эпителиальные клетки создают и используют клеточно-проникающие пептиды (КПП), состоящие из 4–30 аминокислот и способные проникать через клеточные мембраны [54]. КПП инкапсулируют в наночастицы для защиты их от действия агрессивных сред (например желудочного сока с низким уровнем pH и кишечных протеаз) [55]. Кроме того, КПП можно комбинировать с различными носителями лекарств, чтобы объединить их преимущества и создать инновационные многофункциональные системы доставки, повышающие стабильность препаратов при циркуляции в крови [56]. В последние годы КПП стали широко применяться для лечения различных заболеваний, включая рак, мышечную дистрофию, антипримонные заболевания, вирусные и бактериальные инфекции, а также сахарный диабет. КПП могут быть получены из ДНК- и РНК-связывающих белков, гепарин-связывающих белков, бактериальных мембранных белков, а также сигнальных пептидов [56]. База данных КПП содержит 1855 записей, в т. ч. последовательности пептидов, информацию о природе пептидов, химических модификациях, методах экспериментальной проверки, структуре пептидов и типах доставляемых веществ. В зависимости от происхождения КПП делятся на три типа: белкового происхождения, химерные и синтетические. КПП белкового происхождения получают из природных белков, которые по своей природе способны проникать через клеточные мембраны. Tat (транскрипционный активатор вируса иммунодефицита человека) – один из самых ранних и хорошо изученных примеров КПП белкового происхождения. Tat взаимодействует с протеогликаном на поверхности клетки посредством положительно заряженных аминокислотных остатков. Он эффективно доставляет лекарства в клетку без участия специфического лиганда-рецептора. Однако Tat не обладает селективностью, что ограничивает его использование в системах, необходимых для адресной пероральной доставки.

Химерные КПП синтезируются путем объединения двух различных пептидов разного происхождения. Например, транспортный белок (TPGWTLSAGYL LGKINLKAKISIL) получают путем слияния сегмента гормона галанина и мастопарана (яда осы). Синтетические КПП разрабатывают и синтезируют искусственно, поэтому их свойства (стабильность в кровотоке, устойчивость к эндолизосомальному расщеплению, повышенное поглощение клетками и чувствительность к pH) можно регулировать. Амфипатический модельный пептид (KLALKLALKALKALKLA) – синтетический

КПП, представляющий собой высокоамфильную α -спиральную структуру, которую неоднократно использовали для доставки различных биоактивных молекул в клетку посредством эндоцитоза. Глутамат и аспарат функционируют как датчики pH благодаря своей способности терять органические протоны в зависимости от pH окружающей среды. Гистидин с рKa имидазольной группы 6,5 является буферным агентом в физиологических условиях и демонстрирует эффект «протонной губки», который облегчает выход молекулы из эндолизосом. Кроме того, можно создавать новые синтетические КПП с заданными свойствами, используя соответствующее соотношение остатков глутаминовой, аспарагиновой и гистидиновой кислот [57, 58].

Целесообразно получение КПП, пептидов и рекомбинантных белков методами микробиологического синтеза на основе генной инженерии, что имеет ряд преимуществ по сравнению с производством нативных и синтезированных пептидов. К этим преимуществам относятся возможность получения продукта с высокой степенью экспрессии, безопасность, а также наличие доступного сырья и низкая стоимость [58].

В результате собственных исследований получены генетические модифицированные рекомбинантные белки, устойчивые к протеолизу в ЖКТ и предотвращающие процессы старения. Эффективность полученных белков подтверждена эксперименте *in vitro* [59]. На рисунке 2 представлены методы синтеза КПП.

КПП синтезируют двумя способами: микробиологическим и химическим синтезом. Однако получение КПП методами генной инженерии также сопряжено с трудностями, включая проблемы масштабирования до промышленного уровня из-за низкой эффективности экспрессии, сложностей очистки и низкого выхода продукта. Метод ферментации основан на использовании микроорганизмами простых питательных веществ для производства пептидов, таких как ϵ -полилизин (ϵ -PL), γ -полиглютамат (γ -PGA) и цианобактериальный пептид [60]. Микробный синтез полезен только для синтеза пептидов с природными аминокислотными остатками [61] и обычно используется для получения более длинных пептидов (> 40 аминокислот). Из-за низкого выхода и длительного времени синтеза КПП редко получают в промышленных масштабах с использованием микроорганизмов [62].

В настоящее время химический синтез является стандартным методом получения пептидов, благодаря высокой скорости, возможности включения нестандартных аминокислотных остатков и минимальному риску заражения эндотоксинами [63]. Для химического синтеза полипептидов обычно используются три способа: твердофазный пептидный синтез (ТФПС), синтез в растворе и полимеризацию с раскрытием цикла (ПРЦ) N-карбоксиангидридов α -аминокислот (НКА) (рис. 2b) [64]. ТФПС считается эталонным методом синтеза пептидов, с момента открытия эффективность его значительно возросла. Линкер, содержа-

щий реакционноспособные функциональные группы (присущие смоле или добавленные в начале синтеза), обеспечивает присоединение первой аминокислоты к смоле и предназначен для облегчения высвобождения готового пептида из смолы после завершения синтеза. При ТФПС пептиды синтезируются на смоле от C-конца к N-концу с использованием аминокислот с защищенными боковыми цепями, которые предотвращают побочные реакции в процессе соединения [65]. ТФПС обычно применяют для синтеза коротких пептидов, содержащих менее 50 аминокислотных остатков [66].

Метод фазового разделения в растворе предполагает использование короткой пептидной последовательности в качестве отправной точки для получения большего количества КПП. Поэтому этот метод всегда используется для синтеза КПП, содержащих повторяющиеся короткие последовательности (длиной от 3 до 10 аминокислотных остатков) [67].

Механизмы клеточного поглощения КПП. Отличительной особенностью КПП является их способность взаимодействовать с клеточными мембранами, тем самым обеспечивая последующую внутриклеточную трансдукцию. Эффективность клеточной трансдукции и активного таргетинга (выходящего за рамки пептид-специфических взаимодействий) зависит от размера и полярности молекул. Небольшие неполярные молекулы проникают через клеточные мембраны путем простой диффузии – процесса, для которого характерна быстрая, зависящая от концентрации и не требующая затрат энергии кинетика. Согласно исследованиям, ослабление упаковки липидных бислоев – ключевой фактор, определяющий транслокацию через мембрану с помощью КПП. Стратегическое увеличение количества гидрофобных остатков в основной цепи пептида облегчает проникновение через липофильное ядро мембраны. Исходя из предложенного механизма, КПП могут способствовать трансдукции, вызывая искривление мембраны. Кроме того, ферментативная деградация во внеклеточной среде (например под действием протеаз в ЖКТ) снижает стабильность КПП до их проникновения в клетку. Помимо свойств самих КПП, на эффективность транслокации критически влияет состав мембраны. Примечательно, что определенные липиды, такие как бис(моноацилглицерол)фосфат (ВМР), в большом количестве содержащиеся в поздних эндосомах, выступают ключевыми медиаторами выхода из эндосом – лимитирующего этапа внутриклеточной доставки [68]. Точный молекулярный механизм проникновения КПП в клетки до сих пор окончательно не установлен, хотя многие исследователи выдвигали предположения о том, как КПП проникают через плазматическую мембрану [68]. Механистические модели выявили несколько факторов, влияющих на проникновение КПП в клетки: тип клетки; масса и структура груза; способ связывания; концентрация КПП; продолжительность и температура инкубации.

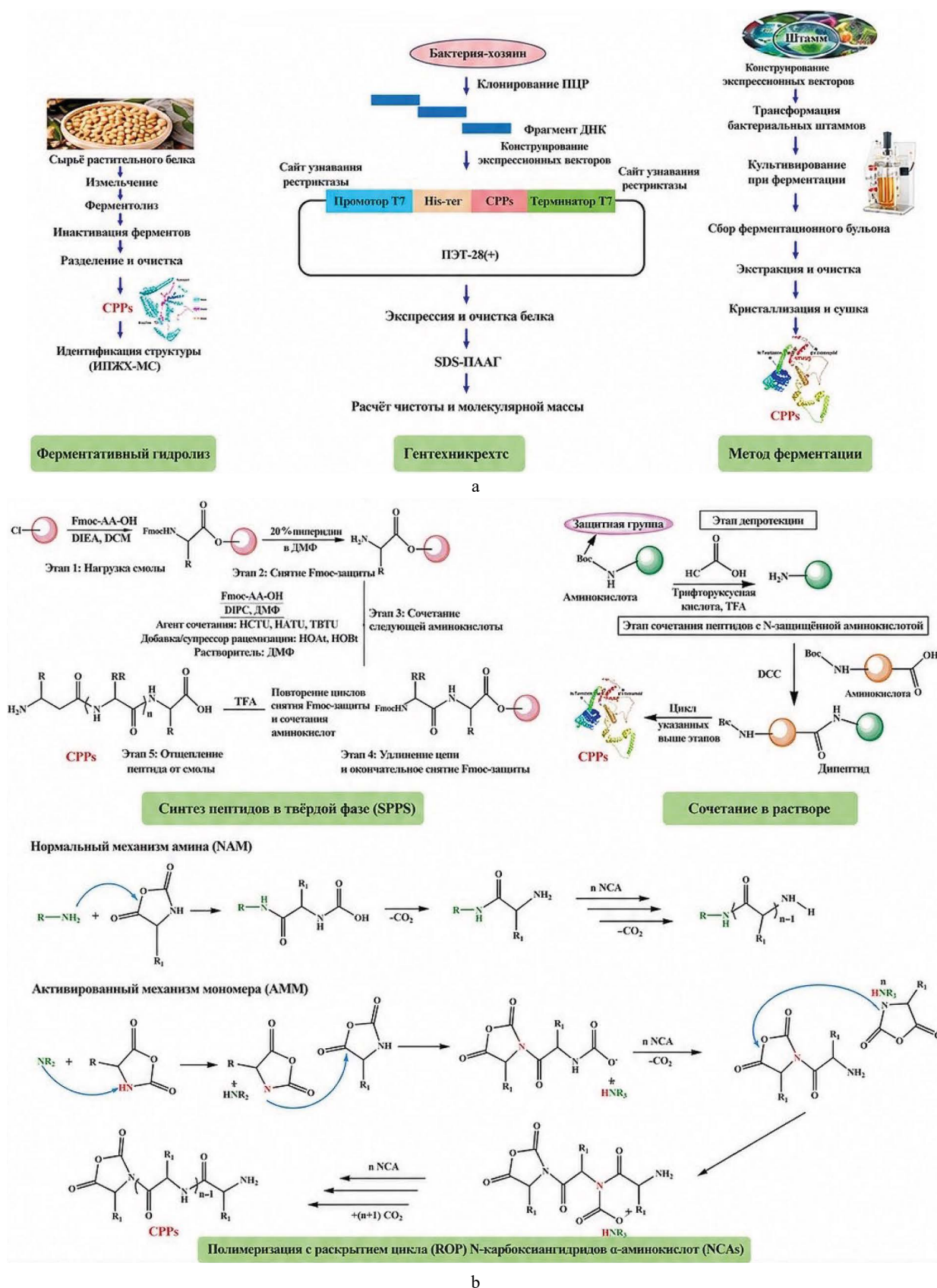


Рисунок 2. Методы синтеза клеточно-проникающих пептидов: а – микробиологический синтез; б – химический синтез

Figure 2. Methods of synthesis of cell-penetrating peptides: a – microbiological synthesis; b – chemical synthesis

Основные механизмы интернализации КПП – эндоцитоз и прямое проникновение (рис. 3) [69].

К механизмам эндоцитоза в основном относят макропиноцитоз, клатрин- и кавеолин-опосредованный эндоцитоз, клатрин- и каведин-независимый эндоцитоз. Механизмы прямого проникновения связывают с образованием инвертированных мицелл; моделью «ковра»; истончением мембраны; образованием временных пор и индукция мультиламеллярности, а также с моделью «стебель-пора».

Большинство КПП проникают в клетки через эндоцитозные пути, состоящие из двух ключевых этапов:

эндоцитоза и последующего выхода из эндосом [68]. Эндоцитоз – процесс, при котором внутриклеточные и внеклеточные вещества поглощаются путем инвагинации плазматической мембраны с образованием везикул, в которых содержится поглощенный материал [69]. Эндоцитоз представляет собой энергозависимый процесс, происходящий во всех клетках. КПП проникают в клетки преимущественно путем эндоцитоза, а не прямого проникновения, из-за быстрого обновления плазматической мембраны [70]. Эндоцитоз включает различные пути: макропиноцитоз; эндоцитоз, опосредованный клатрином / каведином,

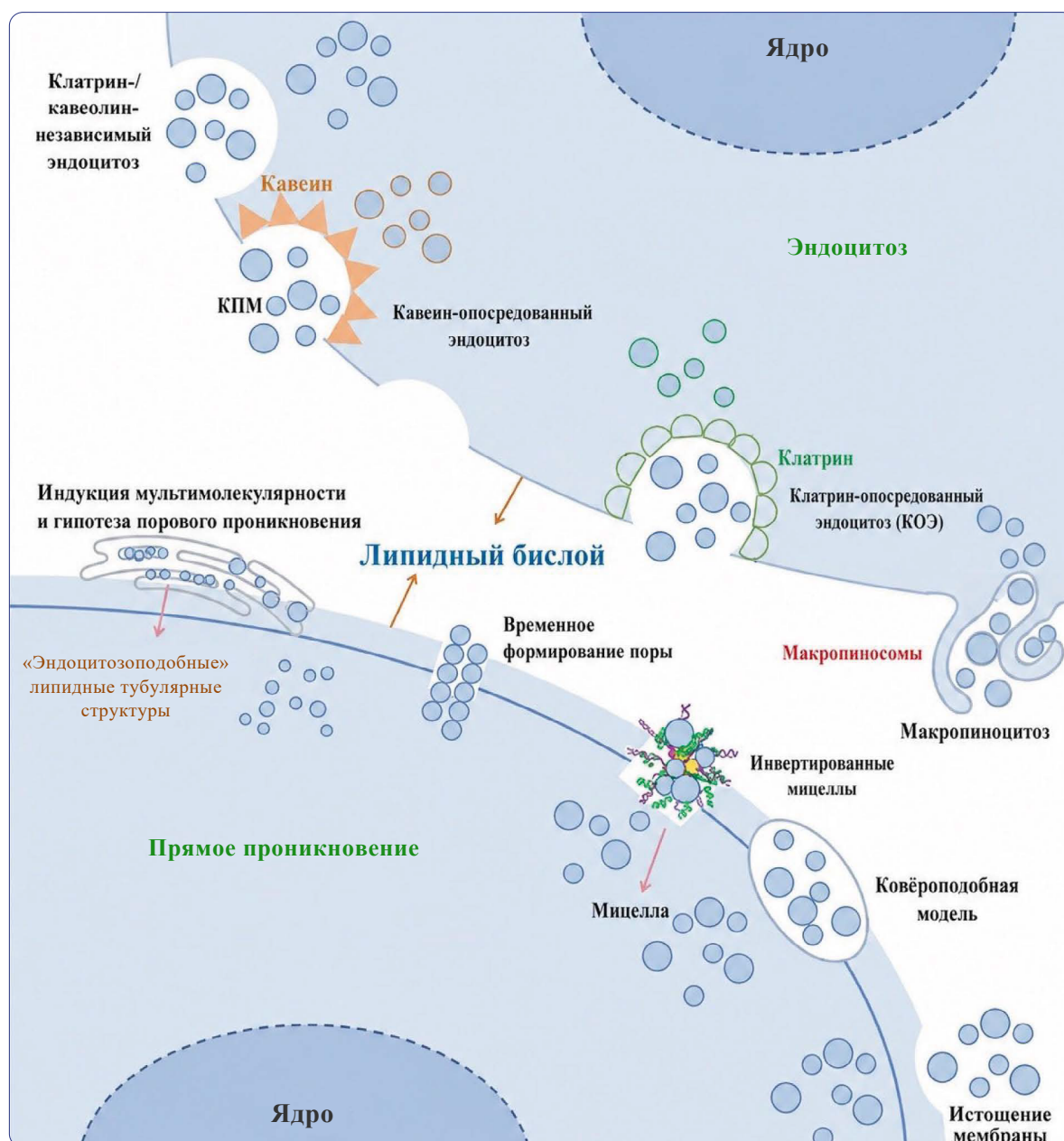


Рисунок 3. Механизмы интернализации и поглощения клеточными мембранами клеточно-проникающих пептидов [41]

Figure 3. Internalization / uptake of cell penetrating peptides by cell membranes [41]

и эндоцитоз, независимый от клатрина / каведина (рис. 3) [71]. Все эти эндоцитарные пути ингибируются в условиях истощения энергии, таких как низкая температура (4 °C) или обработка азидом натрия (NaN_3) [72].

Макропиноцитоз – уникальный клеточный процесс, который не запускается по типичному механизму мембранной инвагинации, вместо этого он возникает в результате повышенного растрепывания мембран и клеточной активации. Такая форма динамики мембраны приводит к образованию выступов, которые не захватывают частицу, покрытую лигандом, а складываются обратно, встраиваясь в плазматическую мембрану и образуя структуры, называемые макропиносомами [72]. Многочисленные экспериментальные данные указывают на важнейшую роль макропиноцитоза в проникновении в клетки различных пептидов [73]. Механизм проникновения пептида M918 через клеточную мембрану, по-видимому, включает как макропиноцитоз, так и клатрин-опосредованный эндоцитоз. Аналогичным образом пептид TP10 проникает через клеточную мембрану преимущественно посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза [74]. Это свидетельствует о том, что механизмы клеточного поглощения сложны и многогранны.

Помимо макропиноцитоза, важную роль в поглощении пептидов нейронами играют различные эндоцитозные процессы, включая клатрин-опосредованный механизм. Пептид Tat и родственные ему переносчики зависят от кавеолин-опосредованного эндоцитоза [75]. Кроме того, ингибирование кавеолин-опосредованного пути частично подавляло поглощение Tat клетками, что указывает на участие в этом процессе и других механизмов. В комплексном исследовании показано, что Tat и pArg используют три эндоцитозных пути для клеточной транслокации: клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и микропиноцитоз. Однако степень участия этих путей в поглощении различается в зависимости от конкретного КПП, что подчеркивает сложность и специфичность механизмов их проникновения в клетки [76]. J. P. Richard *et al.* [77] предположили, что в поглощении КПП клетками может участвовать клатрин-зависимый путь, и продемонстрировали, что поглощение тартрата в клетках HeLa снижается на 50 % после ингибирования хлорпромазином. Общеизвестно, что КПП связываются с плазматической мембраной, прежде чем проникнуть внутрь клетки через любой из вышеупомянутых эндоцитозных путей [78]. Электростатическое взаимодействие между КПП и гликозаминогликанами представляет собой не просто пассивный процесс проникновения в клетку, а запускает эндоцитоз, вызывая агрегацию мембранных белков. Считается, что гепарансульфатные протеоглики играют ключевую роль в проникновении КПП в клетку, но их точное значение в этом процессе до сих пор не установлено [79].

Прямая транслокация богатых аргинином КПП облегчается за счет их сильного взаимодействия с по-

лярными головками липидов в плазматической мембране [80]. КПП, богатые аргинином, транслоцируются через плазматическую мембрану путем прямого проникновения [81]. При этом положительно заряженные КПП взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами клеточной мембраны, такими как фосфолипидный бислой и гепарансульфат. Прямое проникновение – простой одноэтапный процесс, не требующий затрат энергии [82]. Некоторые КПП интернализуются при низких температурах, что может объяснять, почему они избегают энергозависимого эндоцитоза. Хотя энергозависимый эндоцитоз считается основным путем интернализации различных КПП в клетки, появляется все больше доказательств того, что некоторые КПП интернализуются независимо от эндоцитоза. В частности, положительно заряженные остатки аргинина связываются с отрицательно заряженными липидами (например фосфатидилсерин и фосфатидилглицерином). Кроме того, гуанидиновая группа образует водородные связи с фосфатными, карбоксильными и сульфатными группами, что приводит к структурным изменениям в мембране [83]. Прямое проникновение КПП может происходить даже в присутствии криогенных и эндоцитарных ингибиторов.

КПП могут проникать в клетки с помощью пяти различных механизмов прямого проникновения: образование перевернутых мицелл; модель «ковра»; модель истончения мембран; образование временных пор и индукция мультисамеллярности в сочетании с моделью «стебель-пора» (рис. 3) [84]. Первый механизм связан с образованием перевернутых мицелл, в которых КПП собираются в агрегаты и встраиваются в липидный бислой мембраны. Модель «ковра» описывает прикрепление КПП к поверхности мембраны и нарушение липидной структуры, что позволяет им проникать через мембрану. Согласно модели истончения мембраны, КПП уменьшают ее толщину, создавая благоприятные условия для проникновения. Модель образования временных пор предполагает, что КПП взаимодействуют с липидными молекулами и образуют временные отверстия в клеточной мембране. Индукция мультисамеллярных структур и модель «стебель-пора» демонстрируют, как КПП могут способствовать формированию множества липидных слоев и временных структур, облегчающих их проникновение в клетку. Эти разнообразные пути интернализации свидетельствуют об универсальности применения КПП в клеточной доставке лекарств, функционирующих без затрат энергии [85].

Использование модифицированных микроорганизмов в качестве носителей для пероральной доставки пептидов. В последнее время в качестве инновационного подхода стали использовать пероральные микроустройства, способные защитить биопептиды от разрушения и обеспечить их контролируемое высвобождение и всасывание в ЖКТ [86]. Несмотря на перспективные разработки, каждая стратегия имеет

свои недостатки, включая возможное изменение биологической активности биопептидов, а также опасения в отношении их долгосрочной безопасности и потенциальной токсичности [87].

Данный подход, известный как усовершенствованная микробиомная терапия (Advanced Microbiome Therapeutics) или модифицированные живые биотерапевтические продукты (Engineered Live Biotherapeutic Products), рассматривается как потенциально революционный метод решения проблем, связанных с пероральным введением лекарств [88].

Усовершенствованная микробиомная терапия (УМТ) представляет собой микроорганизмы (например бактерии и дрожжи), модифицированные для адресной доставки терапевтических веществ с целью профилактики, лечения или устранения заболевания. УМТ является биологическим решением, использующим микробные системы, которые естественным образом адаптированы к среде кишечника. В отличие от традиционных лекарственных форм, часто сталки-

вающихся со значительными препятствиями в ЖКТ, УМТ используют модифицированные микробы для защиты, продукции и высвобождения терапевтических пептидов непосредственно на месте действия, что позволяет преодолеть многие ограничения перорального введения пептидов, особенно в желудке и верхних отделах кишечника. Некоторые микроорганизмы, в т. ч. несколько пробиотических штаммов, используются в терапевтических целях благодаря своим полезным свойствам, доказанной безопасности и стабильности [79].

Кроме того, возможна модификация данных систем для придания им чувствительности к специфическим стимулам (изменение pH или концентрации метаболитов), что обеспечивает не только точный контроль высвобождения лекарственного средства [80], но и пролонгированное высвобождение биофармацевтических препаратов, особенно пептидов и белков (рис. 4).

Такой результат достигается с помощью систем конститутивной экспрессии, в которых используются

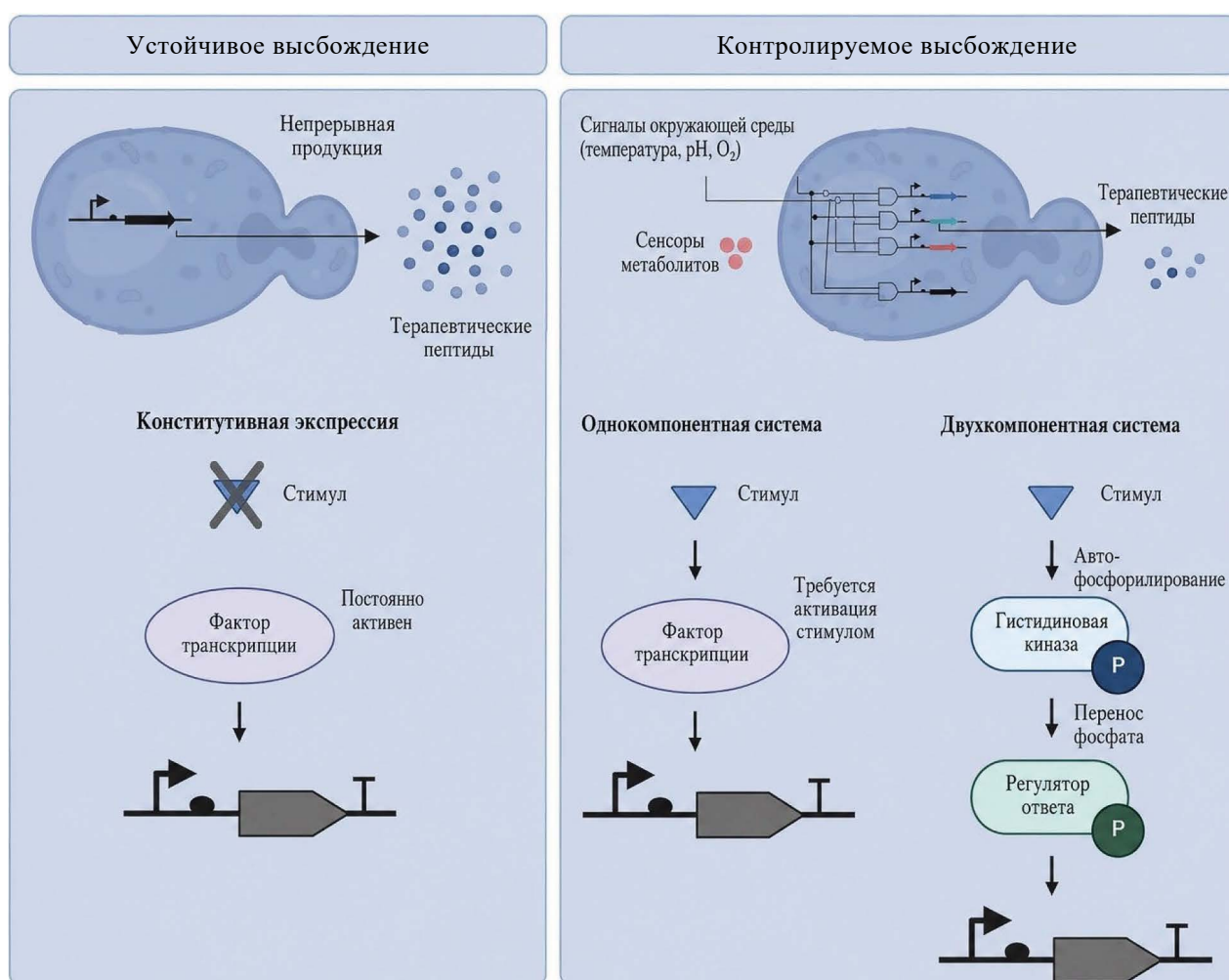


Рисунок 4. Схема непрерывного и контролируемого высвобождения терапевтических пептидов в адипоцитах [80]

Figure 4. Continuous and controlled release of therapeutic peptides in adipocytes [80]

промоторы, обеспечивающие непрерывную транскрипцию целевого гена независимо от условий окружающей среды. Уровень терапевтической продукции белка в таких системах конститутивной экспрессии во многом определяется элементами контроля транскрипции и трансляции. На уровне транскрипции сила промотора зависит от эффективности задействования клеточных механизмов транскрипции. Сильные промоторы эффективнее распознаются РНК-полимеразой, что приводит к более частой инициации синтеза мРНК, тогда как слабые промоторы обеспечивают менее частую транскрипцию. Сила промотора определяется его последовательностью ДНК, которая влияет на прочность и частоту связывания РНК-полимеразы с ДНК и инициацию транскрипции. Это напрямую определяет количество мРНК, доступной для трансляции в белок. Следовательно, выбор подходящего промотора является ключевым фактором для достижения желаемого уровня экспрессии белка [91]. Такие системы протестированы *in vivo* на грызунах с использованием бактерий и дрожжей [92]. Изучено множество конститутивных промоторов для экспрессии белков в распространенных штаммах УМТ, таких как *Lactococcus lactis*, *E. coli* [95] и *Saccharomyces boulardii* [94]. На трансляционном уровне последовательности рибосомного сайта связывания (РСС) контролируют эффективность привлечения рибосом к мРНК, влияя на скорость синтеза белка [95]. Рибосомный сайт связывания – короткая последовательность, расположенная непосредственно перед стартовым кодоном. Он часто включает в себя последовательность Шайна – Далгарно, которая помогает рибосоме занять правильное положение на матричной РНК. Эта последовательность образует пару с комплементарной областью на 16S рРНК рибосомы, что позволяет рибосоме правильно ориентироваться и начинать трансляцию. Вариации в последовательности рибосомного сайта связывания и его расположении относительно стартового кодона влияют на силу и стабильность связывания рибосомы, тем самым регулируя эффективность инициации трансляции. Таким образом, выбор подходящей последовательности РСС является ключевым фактором для достижения желаемого уровня экспрессии белка [96]. Для остановки транскрипции в нужном месте используют сконструированные терминаторы транскрипции, которые предотвращают непреднамеренное считывание нижележащих генов и обеспечивают точный контроль экспрессии генов. В совокупности эти молекулярные инструменты повышают способность модифицированных микроорганизмов выступать в качестве надежных и стабильных источников терапевтических пептидов [97].

Разрабатываются белковые препараты для перорального приема с пролонгированным высвобождением действующего начала, которые обладают рядом преимуществ: снижение частоты приема, уменьшение

побочных эффектов и улучшение соотношения эффективности и дозы [98]. Также создаются материалы с модифицированной поверхностью [99]: такие препараты содержат лекарственные вещества в биоразлагаемой матрице, которая постепенно разрушается. Однако разработка препаратов с пролонгированным высвобождением белков сопряжена с трудностями из-за их сложной структуры. Кроме того, белки подвержены денатурации [100] и агрегации, что может повышать их иммуногенность. В отличие от традиционных систем пролонгированного высвобождения, основанных на контролируемой деградации синтетических матриц, матриксные металлопротеиназы обеспечивают пролонгированное высвобождение за счет непрерывного синтеза и секреции пептидов или белков *in situ* в течение длительного времени [100].

Несмотря на перспективы, клиническое применение пероральных антимикробных препаратов на основе низкомолекулярных соединений ограничено нормативными, производственными и биологическими факторами. Нормативная неопределенность связана с тем, что антимикробные препараты представляют собой новый терапевтический класс, не имеющий аналогов. Производство также сопряжено с серьезными трудностями, поскольку антимикробные препараты должны производиться в больших объемах с неизменным качеством, быть стабильными в течение длительного времени и сохранять жизнеспособность при пероральном приеме [101, 102]. Кроме того, биологическая сложность взаимодействий между хозяином и микробиомом, а также патология заболевания затрудняют проектирование и оценку УМТ [103]. Эти препараты сталкиваются с высокоизменчивой средой ЖКТ и различиями в микробиоте между пациентами. Часто отсутствует четкое понимание механизмов развития заболевания и надежных биомаркеров, что затрудняет прогнозирование и количественную оценку терапевтических эффектов, а также определение зависимости «доза – реакция» [104]. Так, многие препараты-кандидаты для антимикробной терапии, продемонстрировавшие эффективность *in vitro* или на животных моделях, не показали аналогичной эффективности у человека, а клинические испытания часто прекращались из-за отсутствия терапевтического эффекта. Это несоответствие в трансляционной медицине подчеркивает сложность разработки клинических испытаний для методов лечения, основанных на УМТ, которые должны учитывать такие сложные конечные точки, как приживание микроорганизмов, иммунологические изменения в организме хозяина и т. д., а также высокую вариативность, сохраняя при этом строгий контроль и слепой метод [105].

Несмотря на это, разрабатывается несколько стратегий для преодоления существующих барьеров и ускорения внедрения в клиническую практику методов амплификации матриксных белков. Исследователи создают генетические конструкции, которые позволяют точно

реализовывать терапевтические эффекты в зависимости от заболевания с помощью проверенных биосенсоров и логических элементов [106, 107]. Биобезопасность остается одним из приоритетов при разработке методов амплификации матричных белков. Для ограничения выживания вне предполагаемой среды обитания используются такие стратегии, как «выключатели» и ауксотрофная зависимость [108]. Изучаются более совершенные многоуровневые системы сдерживания, в т. ч. генные цепи, которые запускают самоуничтожение по завершении терапии или при выходе из среды обитания [109]. Также предпринимаются попытки вывести облигатные анаэробы и комменсальные штаммы, которые лучше подходят для колонизации кишечника человека [110, 111]. Физическая изоляция с помощью передовых технологий доставки, таких как pH-чувствительные капсулы и системы с магнитным управлением, обеспечивает дополнительный уровень адресности и безопасности, повышая эффективность колонизации и снижая нецелевые эффекты [112]. В дополнение к экспериментальным подходам используются вычислительные инструменты, позволяющие моделировать физиологию кишечника, динамику микробиоты и терапевтическую кинетику. В сочетании с мультиомиксными данными и машинным обучением эти модели потенциально могут обеспечить *in silico* оптимизацию дозировки, колонизации и эффективности, что, возможно, сделает доклинические испытания более прогностичными для результатов у человека [113].

Создание пептидов на основе наночастиц. Разрабатываются белки и пептиды на основе наночастиц, в частности для пероральной доставки инсулина. В последнее время появилось множество наноносителей, в т. ч. на основе липидов (липосомы, мицеллы); углеродные нанотрубки; неорганические наноносители (квантовые точки); наночастицы золота и полимерные наночастицы (полисахариды, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, металлоорганические каркасные структуры и пористые органические полимеры) [114]. Несмотря на то что наночастицы защищают инкапсулированные белковые препараты от кислотной денатурации и ферментативного разрушения, их применение в системах пероральной доставки инсулина по-прежнему ограничено несколькими факторами. Во-первых, вязкий полупроницаемый слизистый слой служит первичным барьером для диффузии наночастиц к поверхности кишечного эпителия [115]. Во-вторых, плотные контакты, соединяющие эпителиальные клетки кишечника, значительно препятствуют проникновению макромолекул через межклеточные щели. В-третьих, большой размер и гидрофильность макромолекул также затрудняют их трансклеточное прохождение [115].

Стратегии разработки пептидов для перорального введения. В настоящее время разработаны стратегии создания пептидов для перорального введения (рис. 5, 6 и 7) [89]. Для этой цели используются ингибиторы протеаз и усилители проницаемости.

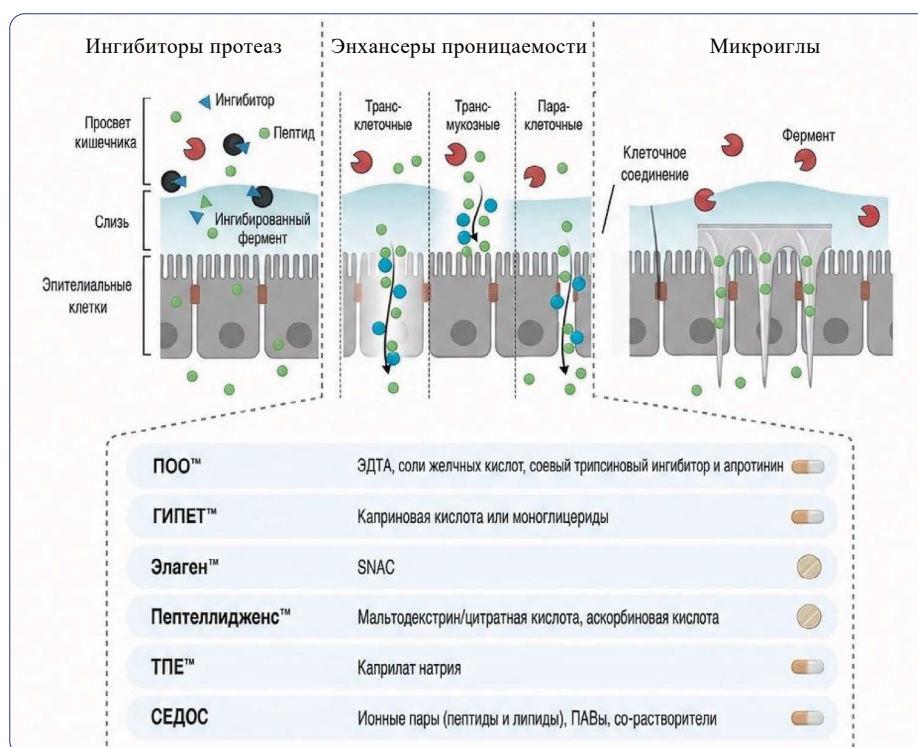


Рисунок 5. Стратегии пероральной доставки пептидов [116]

Figure 5. Strategies for oral peptide delivery [116]



Рисунок 6. Энхансеры проницаемости для пероральной доставки пептидов [116]

Figure 6. Permeation enhancers for oral peptide delivery [116]

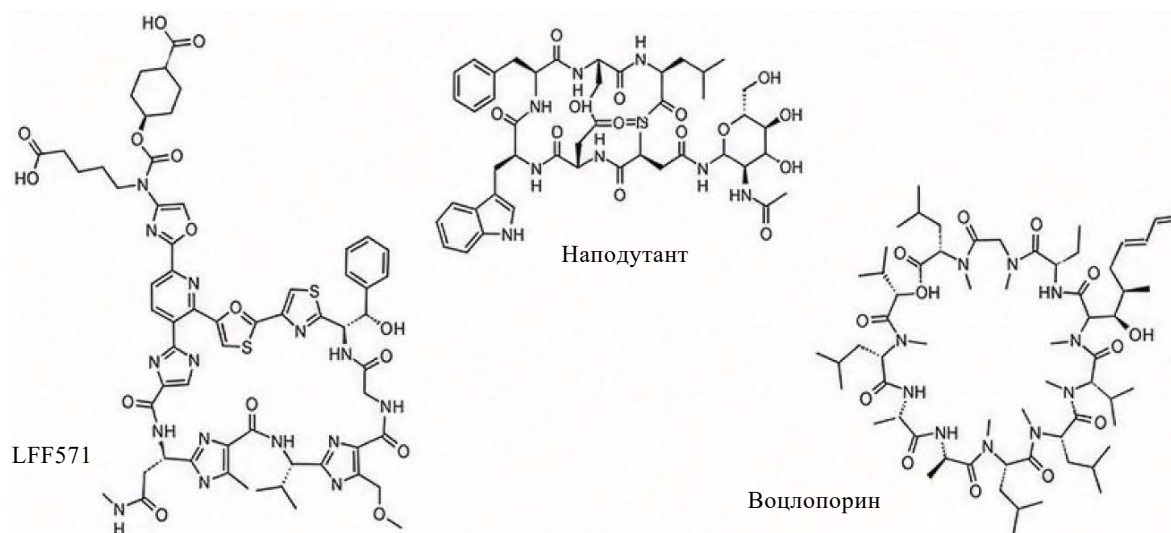


Рисунок 7. Химическая модификация и циклизация пептидов для перорального введения [116]

Figure 7. Chemical modification and cyclization of peptides for oral administration [116]

Общая информация	
Имя	[Nphe5]SFTI-1
Последовательность	GRCTXSIPPICFFD
Класс	BBI-подобный ингибитор трипсина
Средняя масса	1547.70
Моноизотопная масса	0
m/z M +H	0
Тип белка	Мутант
Родитель	SFTI-1
Организм	Синтетический
Примечания	N-SFTI-1-C с Lys5, замещенным остатком N-бензилглицина.

Рисунок 8. Белковая карта пептида [Nphe5]SFTI-1(100)

Figure 8. Protein map of the [Nphe5]SFTI-1 peptide(100)

Последние (салкапрозат натрия (SNAC), соли желчных кислот и каприлат натрия) обеспечивают прохождение молекулы через слизистый слой, клеточные мембраны и плотные контакты. Химическая модификация и циклизация являются эффективными инструментами для изменения физико-химических свойств пептидов, а также применяются для перорального введения пептидов.

В результате исследований с использованием стратегии разработаны и синтезированы пептиды и рекомбинантный белок для перорального применения. При раз-

работке использована циклизация пептидов и применение циклических каркасов из базы данных циклических пептидов. В качестве каркаса использован циклический синтезированный пептид из базы Cybase с номером [Nphe5]SFTI-1(100) (рис. 8).

Теоретическим обоснованием использования известного циклического пептида в качестве каркаса является то, что по данным Cybase, он устойчив к действию протеаз и получен в результате синтеза, что позволяет его использовать без выделения из сырья или гидролиза белка.

В результате молекулярно-пептидной трансплантации биологически активных последовательностей в устойчивый к протеолизу циклический пептид [Nphe5] SFTI-1(100) получены новые циклические пептиды и доказано их биологическое действие в экспериментах *in vitro*: нейропротекторный пептид с условным названием GD-20 и CC-18; антитромбиновый пептид (QW-13); пептид, регулирующий метаболизм липидов (CG-16); иммуномодулирующий пептид (CD-17), а также рекомбинантный белок, устойчивый к протеолизу и предупреждающий процессы старения.

Выводы

За последнее время разработано множество решений для пероральной доставки терапевтических препаратов белковой природы, однако в пищевой отрасли достижения фармацевтической биотехнологии используются не в полном объеме. В перспективе разработка систем доставки биопептидов для перорального применения в составе пищевых продуктов может стать стратегическим направлением развития биотехнологии, способным дополнить существующие подходы к профилактике и лечения различных заболеваний, а также

снизить риск осложнений. Для ускорения внедрения продуктов будущего в клиническую практику необходимо усилить междисциплинарное сотрудничество между вузами, научными учреждениями и биотехнологическими компаниями, а также вести непрерывный диалог с законодательной властью для усовершенствования нормативной базы, регулирующей применение новых продуктов питания.

Критерии авторства

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All authors made equivalent contributions to the research.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Список литературы / Reference

1. Wu J, Roesger S, Jones N, Hu C-MJ, Li SD. Cell-penetrating peptides for transmucosal delivery of proteins. *Journal of Controlled Release*. 2024;366:864–878. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.038>
2. Pang H, Huang X, Xu ZP, Chen C, Han FY. Progress in oral insulin delivery by PLGA nanoparticles for the management of diabetes. *Drug Discovery Today*. 2023;28(1):103393. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103393>
3. Wang YY, Li H, Rasool A, Wang HB, Manzoor R, *et al.* Polymeric nanoparticles (PNPs) for oral delivery of insulin. *Journal of Nanobiotechnol.* 2024;22(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02253-y>
4. Salama NN, Eddington ND, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(1):15–28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.003>
5. Zou J-J, Wei G, Xiong C, Yu Y, Li S, *et al.* Efficient oral insulin delivery enabled by transferrin-coated acid-resistant metal-organic framework nanoparticles. *Science Advances*. 2022;8(8):eabm4677. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4677>
6. Zhu X, Shan W, Zhang P, Yun J, Shan G, *et al.* Penetratin derivative-based nanocomplexes for enhanced intestinal insulin delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2014;11(2):317–328. <https://doi.org/10.1021/mp400493b>
7. Smart AL, Gaisford S, Basit AW. Oral peptide and protein delivery: Intestinal obstacles and commercial prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014;11(8):1323–1335. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.917077>
8. Goldberg M, Gomez-Orellana I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(4):289–295. <https://doi.org/10.1038/nrd1067>
9. Drucker DJ. Advances in oral peptide therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020;19(4):277–289. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0053-0>
10. Han Y, Gao Z, Chen L, Kang L, Huang W, *et al.* Multifunctional oral delivery systems for enhanced bioavailability of therapeutic peptides/proteins. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2019;9(5):902–922. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.01.004>
11. Miao Y-B, Xu T, Gong Y, Chen A, Zou L, *et al.* Cracking the intestinal lymphatic system window utilizing oral delivery vehicles for precise therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023;21:263. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01991-3>
12. Dubey SK, Parab S, Dabholkar N, Singhvi G, Argrawal M, *et al.* Oral peptide delivery: Challenges and the way ahead. *Drug Discovery Today*. 2021;26(4):931–950. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.001>
13. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin*. 1999;46(3):183–196. <https://elibrary.ru/YCCJSX>
14. Chen G, Kang W, Li W, Chen S, Gao Y. Oral delivery of protein and peptide drugs: From non-specific formulation approaches to intestinal cell targeting strategies. *Theranostics*. 2022;12(3):1419–1439. <https://doi.org/10.7150/thno.61747>

15. Buckley ST, Bækdal TA, Vegge A, Maarbjerg SJ, Knudsen LB, *et al.* Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist. *Science Translational Medicine*. 2018;10(467):eaar7047. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar7047>
16. Johansson MEV, Thomsson KA, Hansson GC. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(7):3549–3557. <https://doi.org/10.1021/pr9002504>
17. Leon DL, Crouzier T, Sarkar A, Dunphy L, Han J, *et al.* Spatial configuration and composition of charge modulates transport into a mucin hydrogel barrier. *Biophysical Journal*. 2013;105(6):1357–1365. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.050>
18. Brunner J, Ragupathy S, Borchard G. Target specific tight junction modulators. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;171:266–288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.008>
19. Yang NJ, Hinner MJ. Getting across the cell membrane: An overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1266:29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
20. Kristensen M, Nielsen HM. Cell-penetrating peptides as carriers for oral delivery of biopharmaceuticals. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicol*. 2016;118(2):99–106. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12515>
21. Salamat-Miller N, Johnston TP. Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;294(1–2):1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.022>
22. Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight junction in the intestinal epithelium: Its association with diseases and regulation by phytochemicals. *Journal of Immunology Research*. 2018;2018:2645465. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
23. Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. Therapeutic application of peptides and proteins: Parenteral forever? *Trends in Biotechnology*. 2009;27(11):628–635. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.009>
24. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(6):557–570. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>
25. Canales C, Shleider C, Roque-Borda A, Cazorla JIM, Cazorla RMM, *et al.* Forging a new frontier: Antimicrobial peptides and nanotechnology converging to conquer gastrointestinal pathogens. *Small*. 2025;21(26):e2501431. <https://doi.org/10.1002/smll.202501431>
26. Zarrintaj P, Ghorbani S, Barani M, Chauhan NPS, Yazdi MK, *et al.* Polylysine for skin regeneration: A review of recent advances and future perspectives. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2021;7(1):e10261. <https://doi.org/10.1002/btm2.10261>
27. Yaghmur A, Mu H. Recent advances in drug delivery applications of cubosomes, hexosomes, and solid lipid nanoparticles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(4):871–885. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.013>
28. Jansook P, Fülöp Z, Ritthidej GC. Amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): Physicochemical and solid-solution state characterizations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2019;45(4):560–569. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569023>
29. Su L, Zhou F, Yu M, Ge R, He J, *et al.* Solid lipid nanoparticles enhance the resistance of oat-derived peptides that inhibit dipeptidyl peptidase IV in simulated gastrointestinal fluids. *Journal of Functional Foods*. 2020;65:103773. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103773>
30. Salvi VR, Pawar P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>
31. Elmowafy M, Al-Sanea MM. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and application. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2021;29(9):999–1013. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.015>
32. Jain P, Rahi P, Pandey V, Asati S, Soni V. Nanostructured lipid carriers: A modish contrivance to overcome the ultraviolet effects. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2017;4(2):89–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.02.001>
33. Nelson AL, Mancino C, Gao X, Choe JA, Chubb L, *et al.* β -catenin mRNA encapsulated in SM-102 lipid nanoparticles enhances bone formation in a murine tibia fracture repair model. *Bioactive Materials*. 2024;39:273–286. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.05.020>
34. Akbari A, Saeedi M, Ahmadi F, Hashemi SMH, Babaei A, *et al.* Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2022;27(5):525–539. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2084554>
35. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh AP. Nanostructured lipid carriers: A platform to lipophilic drug for oral bioavailability enhancement. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020;10(2):150–165. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>
36. Ehlers APF, Bartholomä J, Menghin D. Rechtliche Regelung der „Triage“ – Gesundheitssysteme an ihren Grenzen. *Medizinrecht*. 2021;39(5):416–423. [Ehlers APF, Bartholomä J, Menghin D. Legal regulation of „Triage“ health care systems at their borders. *Medical Law*. 2021;39(5):416–423. (In German)] <https://doi.org/10.1007/s00350-021-5874-2>
37. Fernández-Barat L, Ciofu O, Kragh KN, Pressler T, Johansen U, *et al.* Phenotypic shift in *Pseudomonas aeruginosa* populations from cystic fibrosis lungs after 2-week antipseudomonal treatment. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2017;16:222–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.08.005>

38. Rehman KU, Zaman U, Alem A, Khan D, Khattak NS, *et al.* Alkaline protease functionalized hydrothermal synthesis of novel gold nanoparticles (ALPs-AuNPs): A new entry in photocatalytic and biological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;265:131067. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131067>
39. Silva APB, Roque-Borda CA, Carnero Canales CS, Duran Gleriani Primo LM, Silva IC, *et al.* Activity of bacteriophage D29 loaded on nanoliposomes against macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Diseases*. 2023;11(4):150. <https://doi.org/10.3390/diseases11040150>
40. Almeida A, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(6):478–490. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.007>
41. Thapa RK, Diep DB, Tønnesen HH. Nanomedicine-based antimicrobial peptide delivery for bacterial infections: Recent advances and future prospects. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2021;51(4):377–398. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00525-z>
42. Makowski M, Silva ÍC, Pais do Amaral C, Gonçalves S, Santos NC. Advances in lipid and metal nanoparticles for antimicrobial peptide delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(11):588. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110588>
43. Cantor S, Vargas L, Rojas A, Yarce C, Salamanca C, *et al.* Evaluation of antimicrobial peptide incorporated liposomes coated with Eudragit E-100 against foodborne pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):680. <https://doi.org/10.3390/ijms20030680>
44. Alzahrani NM, Booq RY, Aldossary AM, Bakr AA, Almughem FA, *et al.* Liposome-encapsulated tobramycin and IDR-1018 peptide mediated biofilm disruption and enhanced antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceutics*. 2022;14(5):960. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050960>
45. Zhao H, Sun J, Cheng Y, Nie S, Li W. Advances in peptide/polymer antimicrobial assemblies. *Journal of Materials Chemistry B*. 2025;13(5):1518–1530. <https://doi.org/10.1039/D4TB02144D>
46. Spirescu VA, Chircov C, Grumezescu AM, Andronescu E. Polymeric nanoparticles for antimicrobial therapies: An up-to-date overview. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5):724. <https://doi.org/10.3390/polym13050724>
47. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;415(1–2):34–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
48. Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, *et al.* Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for drug delivery. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2019;20:100397. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>
49. Giordani B, Basnet P, Mishchenko E, Luppi B, Škalko-Basnet N. Utilizing liposomal quercetin and gallic acid in localized treatment of vaginal *Candida* infections. *Pharmaceutics*. 2020;12:9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010009>
50. Muthukrishnan L. Nanonutraceuticals – challenges and novel nano-based carriers for effective delivery and enhanced bioavailability. *Food and Bioprocess Technology*. 2022;15:2155–2184. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02807-2>
51. Zhuo S, Zhang F, Yu J, Zhang X, Yang G, *et al.* pH-sensitive biomaterials for drug delivery. *Molecules*. 2020;25(23):5649. <https://doi.org/10.3390/molecules25235649>
52. Roque-Borda CA, Saraiva MSM, Macedo Junior WD, Márquez Montesinos JCE, Meneguín AB, *et al.* Chitosan and HPMCAS double-coating as protective systems for alginate microparticles loaded with Ctx(Ile²¹)-Ha antimicrobial peptide to prevent intestinal infections. *Biomaterials*. 2023;293:121978. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121978>
53. Тихонов С. Л., Чернуха И. М. Функциональная направленность природных и синтезированных биопептидов. Екатеринбург: Уральский государственный лесотехнический университет и Уральский государственный аграрный университет, 2024. 212 с. [Tikhonov SL, Chernukha IM. Functional orientation of natural and synthesized biopeptides. Yekaterinburg: Ural State Forestry Engineering University and Ural State Agrarian University; 2024. 212 p. (In Russ.)]
54. Raucher D, Ryu JS. Cell-penetrating peptides: Strategies for anticancer treatment. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(9):560–570. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.06.005>
55. Douat C, Aisenbrey C, Antunes S, Decossas M, Lambert O, *et al.* A cell-penetrating foldamer with a bioreducible linkage for intracellular delivery of DNA. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(38):11133–11137. <https://doi.org/10.1002/anie.201504884>
56. Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, *et al.* Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: From preclinical research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:697. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00697>
57. Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel U. Cell-penetrating peptides: Design, synthesis, and applications. *ACS Nano*. 2014;8(3):1972–1994. <https://doi.org/10.1021/nn4057269>
58. Wang T, Li H, Liang C, Sun S, Liu A, *et al.* Purification and characterization of a novel antioxidant Phelligradin LA produced by *Inonotus baumii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2020;95(9):2483–2494. <https://doi.org/10.1002/jctb.6430>
59. Валиева Ш. С., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Тимофеева М. С., Ногина А. А. Синтез и экспрессия устойчивого к протеолизу, предупреждающего процессы старения нового рекомбинантного пищевого белка. АПК России. 2024. Т. 31. № 4. С. 607–613. [Valieva SS, Tikhonov SL, Tikhonova NV, Timofeeva MS, Nogina AA. Synthesis and expression of

a new recombinant food protein resistant to proteolysis and preventing aging processes. *Agro-Industrial Complex of Russia*. 2024;31(4):607–613. (In Russ.)] <https://doi.org/10.55934/2587-8824-2024-31-4-607-613>

60. Zenin V, Tsedilin A, Yurkova M, Siniavin A, Fedorov A. Thermostable chaperone-based polypeptide biopolymer. *PLOS One*. 2023;18(6):e0286752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286752>

61. Deng C, Wu J, Cheng R, Meng F, Klok H-A, et al. Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2014;39(2):330–364. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.10.008>

62. Collins JM, Singh SK, White TA, Cesta DJ, Simpson CL, et al. Total wash elimination for solid phase peptide synthesis. *Nature Communications*. 2023;14(1):8168. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44074-5>

63. Liu Y, Li D, Ding J, Chen X. Controlled synthesis of polypeptides. *Chinese Chemical Letters*. 2020;31(12):3001–3014. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.04.029>

64. Varnava KG, Sarojini V. Making solid-phase peptide synthesis greener: A review of the literature. *Chemistry an Asian Journal*. 2019;14(8):1088–1097. <https://doi.org/10.1002/asia.201801807>

65. Lee YS. Gram-scale preparation of C-terminal-modified enkephalin analogues by typical liquid-phase peptide synthesis. *Current Protocols in Protein Science*. 2019;98(1):e97. <https://doi.org/10.1002/cpps.97>

66. Xu J, Wang F, Ye L, Wang R, Zhao L, et al. Penetrating peptides: Applications in drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;84:104475. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104475>

67. Kang Z, Ding G, Meng Z, Meng Q. The rational design of cell-penetrating peptides for application in delivery systems. *Peptides*. 2019;121:170149. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170149>

68. Ruseska I, Zimmer A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020;11:101–123. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.10>

69. Cheng X, Chen K, Dong B, Yang M, Filbrun SL, et al. Dynamin-dependent vesicle twist at the final stage of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Cell Biology*. 2021;23(8):859–869. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00713-x>

70. Liu Y, Shen Z, Xu Y, Zhu Y-W, Chen W, et al. Layer-by-layer self-assembly of PLL/CPP-ACP multilayer on SLA titanium surface: Enhancing osseointegration and antibacterial activity *in vitro* and *in vivo*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2024;240:113966. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113966>

71. Salloum G, Bresnick AR, Backer JM. Macropinocytosis: Mechanisms and regulation. *Biochemical Journal*. 2023;480(5):335–362. <https://doi.org/10.1042/bcj20210584>

72. Kim GC, Cheon DH, Lee Y. Challenge to overcome current limitations of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2021;1869(4):140604. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140604>

73. Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. 2005;102(1):247–253. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.018>

74. Eiríksdóttir E, Mäger I, El Andaloussi S, Langel U, Lehto T. Cellular internalization kinetics of (luciferin-) cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 2010;21(9):1662–1672. <https://doi.org/10.1021/bc100174y>

75. Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppé M, Arcangeli C, Pellegrini V, et al. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(36):34141–34149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303045200>

76. Mäger I, Langel K, Lehto T, Eiríksdóttir E, Langel Ü. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2012;1818(3):502–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.020>

77. Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, et al. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(15):15300–15306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401604200>

78. Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, et al. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*. 2007;46(2):492–501. doi:10.1021/bi0612824.

79. Subrizi A, Tuominen E, Bunker A, Róg T, Antopolsky M, et al. Tat(48-60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake. *Journal of Controlled Release*. 2012;158(2):277–285. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.007>

80. Wallbrecher R, Ackels T, Olea RA, Klein MJ, Caillon L, et al. Membrane permeation of arginine-rich cell-penetrating peptides independent of transmembrane potential as a function of lipid composition and membrane fluidity. *Journal of Controlled Release*. 2017;256:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.013>

81. Szabó I, Mező G, Yousef MA, Soltész D, Bató C, et al. Redesigning of cell-penetrating peptides to improve their efficacy as a drug delivery system. *Pharmaceutics*. 2022;14(5):907. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050907>

82. Jiao C-Y, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *Journal Biological Chemistry*. 2009;284(49):33957–33965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056309>

83. Li L, Vorobyov I, Allen TW. The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013;117(40):11906–11920. <https://doi.org/10.1021/jp405418y>
84. Pirhaghi M, Mamashli F, Moosavi-Movahedi F, Arghavani P, Amiri A, *et al.* Cell-penetrating peptides: Promising therapeutics and drug-delivery systems for neurodegenerative diseases. *Molecular Pharmaceutics*. 2024;21(5):2097–2117. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c01167>
85. Zakany F, Mándity IM, Varga Z, Panyi G, Nagy P, *et al.* Effect of the lipid landscape on the efficacy of cell-penetrating peptides. *Cells*. 2023;12(13):1700. <https://doi.org/10.3390/cells12131700>
86. Byrne J, Huang H-W, McRae JC, Babae S, Soltani A, *et al.* Devices for drug delivery in the gastrointestinal tract: A review of systems physically interacting with the mucosa for enhanced delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;177:113940. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113926>
87. Homayun B, Lin X, Choi H-J. Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):129. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030129>
88. Vazquez-Urbe R, Hedin KA, Licht TR, Nieuwdorp M, Sommer MOA. Advanced microbiome therapeutics as a novel modality for oral delivery of peptides to manage metabolic diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2024;35(9):779–791. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.04.021>
89. Hedin KA, Rees VM, Zhang H, Kruse V, Vazquez-Urbe R, *et al.* Effects of broad-spectrum antibiotics on the colonisation of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the murine gastrointestinal tract. *Scientific Reports*. 2022;12(1):8862. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12806-0>
90. Vaaben TH, Vazquez-Urbe R, Sommer MOA. Characterization of eight bacterial biosensors for microbial diagnostic and therapeutic applications. *ACS Synthetic Biology*. 2022;11(12):4184–4193. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00491>
91. Redden H, Morse N, Alper HS. The synthetic biology toolbox for tuning gene expression in yeast. *FEMS Yeast Research*. 2015;15(1):1–10. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12188>
92. Sands C, Hedin KA, Vazquez-Urbe R, Sommer MOA. *Saccharomyces boulardii* promoters for control of gene expression *in vivo*. *Microbial Cell Factories*. 2024;23(1):16. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02288-8>
93. Armetta J, Schantz-Klausen M, Shepelin D, Vazquez-Urbe R, Bahl MI. *Escherichia coli* promoters with consistent expression throughout the murine gut. *ACS Synthetic Biology*. 2021;10(12):3359–3367. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00325>
94. Durmusoglu D, Naldi M, Parolin C, Erdoğan Ü, Bartolini M, *et al.* Improving therapeutic protein secretion in the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* using a multifactorial engineering approach. *Microbial Cell Factories*. 2023;22(1):45. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02053-x>
95. Santos-Navarro FN, Vignoni A, Boada Y, Pico J. RBS and promoter strengths determine the cell-growth-dependent protein mass fractions and their optimal synthesis rates. *ACS Synthetic Biology*. 2021;10(12):3297–3308. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00131>
96. Oesterle S, Gerngross D, Schmitt S, Roberts TM, Panke S. Efficient engineering of chromosomal ribosome binding site libraries in mismatch repair proficient *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 2017;7(1):123. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12395-3>
97. Felippes de FF, Mchale M, Doran RL, Roden S, Eamens AL, *et al.* The key role of terminators on the expression and posttranscriptional gene silencing of transgenes. *The Plant Journal*. 2020;104(1):96–112. <https://doi.org/10.1111/tpj.14907>
98. Bose A, Wong TW, Singh N. Formulation development and optimization of sustained release matrix tablet of Itopride HCl by response surface methodology and its evaluation of release kinetics. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(2):201–213. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.03.006>
99. Reddy N, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2015;33(6):362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>
100. Jiang G, Woo BH, Kang F, Singh J, Deluca PP. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*. 2002;79(1–3):137–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00533-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00533-8)
101. Charbonneau MR, Isabella VM, Li N, Kurtz CB. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. *Nature Communications*. 2020;11(1):1738. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15508-1>
102. Brennan AM. Development of synthetic biotics as treatment for human diseases. *Synthetic Biology*. 2022;7(1):ysac014. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysac001>
103. Ozdemir T, Fedorec AJH, Barnes CP, Danino T. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: Toward increasing system complexity. *Cell Systems*. 2018;7(1):5–16. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.06.008>
104. Heavey MK, Durmusoglu D, Crook N, Anselmo AC. Discovery and delivery strategies for engineered live biotherapeutic products. *Trends Biotechnol*. 2022;40(3):354–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.08.002>
105. Rutter JW, Dekker L, Owen KA, Barnes CP. Microbiome engineering: Engineered live biotherapeutic products for treating human disease. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:892087. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1000873>

106. Chien T, Harimoto T, Kepecs B, Gray K, Coker C, et al. Enhancing the tropism of bacteria via genetically programmed biosensors. *Nature Biomedical Engineering*. 2022;6(9):1052–1063. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00772-3>
107. Armstrong A, Isalan M. Engineering bacterial theranostics: From logic gates to *in vivo* applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:892087. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1437301>
108. Hedin KA, Kruse V, Vazquez-Urbe R, Sommer MOA. Biocontainment strategies for *in vivo* applications of *Saccharomyces boulardii*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1136095. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1136095>
109. Ma Y, Manna A, Moon TS. Advances in engineering genetic circuits for microbial biocontainment. *Current Opinion in Systems Biology*. 2021;36:100483. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2023.100483>
110. Arnold JA, Glazier J, Mimeo M. Genetic engineering of resident bacteria in the gut microbiome. *Journal of Bacteriol.* 2023;205(7):e0012723. <https://doi.org/10.1128/jb.00127-23>
111. Hayashi N, Lai Y, Fuerte-Stone J, Mimeo M, Lu TK. Cas9-assisted biological containment of a genetically engineered human commensal bacterium and genetic elements. *Nature Communications*. 2024;15(1):2096. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45893-w>
112. Xing H, Liu X, Wang JU, Zhou T, Jin X, et al. Magnetically targeted delivery of probiotics for controlled residence and accumulation in the intestine. *Nanoscale*. 2025;17(15):8588–8598. <https://doi.org/10.1039/d4nr04753b>
113. Charbonneau MR, Denney WS, Horvath NG, Cantarella P, Castillo MJ, et al. Development of a mechanistic model to predict synthetic biotic activity in healthy volunteers and patients with phenylketonuria. *Communications Biology*. 2021;4(1):89. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02183-1>
114. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(2):75–85. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008>
115. Chen M-C, Sonaje K, Chen K-J, Sung H-W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*. 2011;32(36):9826–9838. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.087>
116. Zizzari AT, Pliatsika D, Gall FM, Fischer T, Riedl R. New perspectives in oral peptidomimetic delivery. *Drug Discovery Today*. 2021;26(4):1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.020>

Дополнительная информация об авторах / Additional information about the authors

Мерзлякова Наталия Вадимовна / Natalia V. Merzlyakova ORCID 0000-0003-2728-4501; eLIBRARY SPIN 1518-4871
Тихонов Сергей Леонидович / Sergey L. Tikhonov ORCID 0000-0003-4863-9834; eLIBRARY SPIN 4649-8616
Тихонова Наталья Валерьевна / Natalia V. Tikhonova ORCID 0000-0001-5841-1791; eLIBRARY SPIN 1303-8180
Тимофеева Мария Сергеевна / Maria S. Timofeeva ORCID 0000-0001-7760-1427
Семин Александр Николаевич / Alexander N. Semin ORCID 0000-0001-8270-2257; eLIBRARY SPIN 6417-0513
Курдюмов Александр Васильевич / Alexander V. Kurdyumov ORCID 0000-0002-2523-7595; eLIBRARY SPIN 9736-5702
Лылов Антон Сергеевич / Anton S. Lylov ORCID 0000-0002-8068-753X; eLIBRARY SPIN 1491-0150