

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-067

功能肽合成和挖掘策略研究进展

汤传根^{1,2,3,4}, 王璟¹, 张烁¹, 张昊宁¹, 康振^{2,4}

(¹南京汉欣医药科技有限公司, 江苏 南京 210033; ²江南大学, 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122; ³江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; ⁴江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 功能肽是由2~50个氨基酸组成的短链肽, 近年来因其特异性强、作用迅速及副作用低而成为开发新药和功能原料的重要研究热点。首先, 本文梳理了功能肽的分类、作用机制及应用场景, 总结了不同类型功能肽的特点和在生物医药、食品科学及化妆品等领域的应用。接着, 针对功能肽的合成方法, 探讨了化学合成与生物合成的最新进展, 比较了这两种制备工艺的优缺点以及各自的适用场景。在功能肽挖掘策略方面, 本文综述了噬菌体表面展示技术、机器学习算法、分子对接技术及人工智能技术等方面的最新研究, 这些技术在功能肽的筛选和设计中展现出重要潜力, 提升了研究的效率与准确性。展望未来, 功能肽的研究将面临新的挑战与机遇。如何改进合成工艺以提高效率, 如何通过结构修饰提高功能肽稳定性, 以及如何利用计算机辅助优化和人工智能设计多功能肽, 将成为重要的研究方向。同时, 加强功能肽的安全性和有效性的评估能进一步提升功能肽的应用潜力。

关键词: 功能肽; 合成生物学; 生物合成; 高通量; 机器学习

中图分类号: Q815 文献标志码: A

Advances in synthesis and mining strategies for functional peptides

TANG Chuan'gen^{1,2,3,4}, WANG Jing¹, ZHANG Shuo¹, ZHANG Haoning¹, KANG Zhen^{2,4}

(¹Nanjing Hanxin Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Nanjing 210033, Jiangsu, China; ²Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ³Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ⁴Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

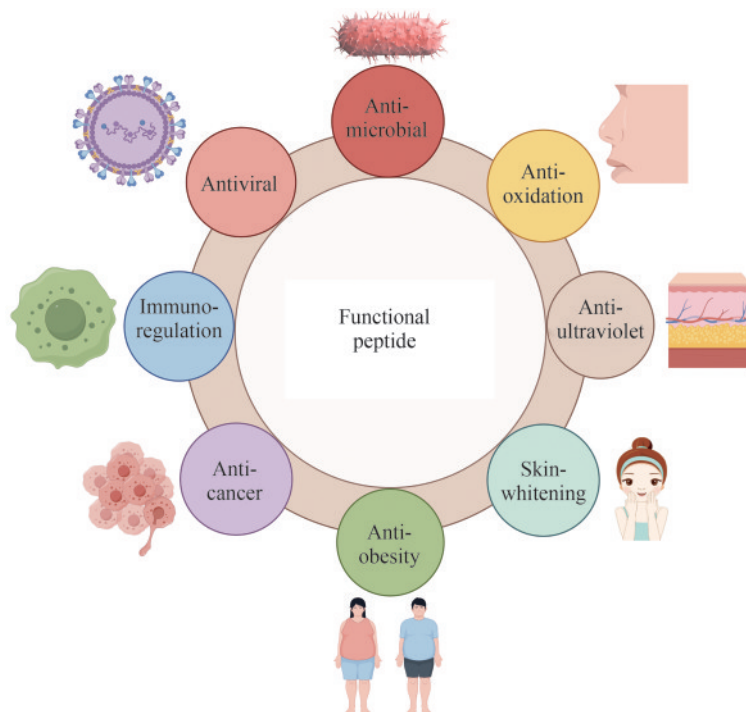
Abstract: Functional peptides are short chain peptides composed of 2 to 50 amino acids, and their biological activities are closely related to their amino acid sequences, chain length, and structural architectures. Functional peptides can play a regulatory role in a variety of physiological processes by specifically recognizing and binding to target molecules *in vivo*. Due to their rapid action, strong specificity, less side effect and toxicity, functional peptides have shown great application potentials in many fields such as biomedicine, food science and cosmetics. For example, in the field of biomedicine, functional peptides can be used as the basic material of antimicrobe, anticancer, immune

收稿日期: 2024-08-28 修回日期: 2024-11-11

引用本文: 汤传根, 王璟, 张烁, 张昊宁, 康振. 功能肽合成和挖掘策略研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(2): 461-478

Citation: TANG Chuan'gen, WANG Jing, ZHANG Shuo, ZHANG Haoning, KANG Zhen. Advances in synthesis and mining strategies for functional peptides [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(2): 461-478

regulation and other therapeutic factors. In the food industry, they are used as natural supplements to enhance nutritional value for health benefit. In the field of cosmetics, functional peptides are widely used for the anti-aging, moisturizing, and repairing of the skin. In this paper, we discuss the ways of obtaining functional peptides, mainly including protein hydrolysis, chemical synthesis, and biosynthesis (*e. g.*, through microbial recombinant expression technology), and compare their advantages and disadvantages and respective application scenarios. In terms of strategies for mining functional peptides, we review the latest research progress including phage surface display, machine learning algorithm, molecular docking and artificial intelligence. These techniques show significant potentials in the screening and design of functional peptides. In recent years, the rapid development of synthetic biology and the wide applications of bioinformatics and artificial intelligence have provided new ideas and strategies for the discovery and optimization of functional peptides, making it possible to screen functional peptides through machine learning and high throughput. Looking forward to the future, the research of functional peptides will face new challenges and opportunities. Improving the synthesis process for high efficiency, improving the stability of functional peptides through structural modifications, and using computer-aided optimization and artificial intelligence to design multifunctional peptides will become important research directions. At the same time, strengthening the safety and efficacy assessment of functional peptides can further enhance the applications of functional peptides.



Keywords: functional peptide; synthetic biology; biosynthesis; high throughput; machine learning

功能肽又称生物活性肽 (bioactive peptide, BAP) 是一类具有特定生物活性的小分子肽。功能肽通常指由 2~50 个氨基酸组成的以不同组合和排列方式构成的线性和环形结构的不同肽类的总称, 是源于蛋白质的多功能化合物。这些肽可以通过蛋白质的水解、化学合成或微生物重组发酵等方

法获得, 能够在体内外发挥多种生物效应^[1-2]。功能肽的生物活性通常与其氨基酸序列、长度和结构密切相关, 特定序列的氨基酸排列使得功能肽能够与体内的靶分子特异性结合, 从而发挥其生物学功能。

功能肽是近年来生物医药、食品科学以及化

妆品领域新型功能原料的研究热点，与传统药物分子不同，肽以其特异性强、作用迅速、副作用低等优势，逐渐成为新药研发的热点之一。此外，随着人们对健康和美容需求的增加，功能肽在化妆品和食品中的应用也日益广泛，其独特的生物活性使其在抗菌、抗病毒、抗氧化、抗紫外线、抗癌和免疫调节等方面具有广泛的应用前景^[3-15]。

对功能肽的研究已有相当长的历史，随着分子生物学和蛋白质工程技术的发展，近年来功能肽研究取得了显著进展。然而，尽管已有大量研究表明功能肽在医学、食品及化妆品等领域具有显著的生物活性，但现有研究还存在以下三个不足之处：一是许多研究主要停留在功能肽的生物活性验证层面，对于其具体作用机制的揭示较为有限，尚需进一步的分子机制研究；二是功能肽往往具有多种生物活性，现有研究多集中于单一功能的开发，对于其多功能性及功能间相互作用的研究尚不充分^[16]；三是功能肽的制备工艺虽然有大量的报道^[17-18]，但目前在制备工艺优化和大规模生产方面的研究相对较少。

基于以上存在的不足，现有的综述文献主要集中于功能肽的某一类或某几类生物活性及应用。例如，2005年，Mendis等^[5]探讨了来源于鱿鱼皮的抗氧化肽体外抗氧化效果；2006年，Hancock和Sahl^[3]综述了抗菌肽的研究进展及其在抗感染治疗中的潜力；2016年，Wang等^[4]建立了抗菌肽数据库，系统总结了抗菌肽的种类及其特性。然而，这些研究多集中于功能肽的单一功能，系统性综述功能肽的分类、作用机制、制备工艺以及挖掘策略的文献较为缺乏。

本文首先介绍功能肽的主要分类以及各类功能肽的作用机制，接下来对功能肽的化学合成研究进展以及以合成生物学为基础的生物制造研究进展进行了分析，最后，对功能肽挖掘策略研究进展进行了综述并对功能肽未来发展方向做了展望，以便为从事功能肽相关研究的人员提供较为系统的参考。

1 功能肽分类、作用机制和应用

功能肽根据其生物活性和作用机制，主要分为抗菌肽、抗病毒肽、抗氧化肽、抗紫外肽、抗

癌肽、免疫调节肽、美白肽、减肥肽等，这些功能肽的作用机制以及可能的应用场景详见表1。除了以上分类之外，还有一些生物学功能的功能性药物肽，如降压肽、抗血栓肽、抗炎肽、心血管治疗用肽，因为篇幅所限，在本表中不做列举。

2 功能肽的化学合成研究进展

化学合成法适用于长度不超过40个氨基酸的多肽制备，可以弥补生物合成法的某些局限性，并以其精确性、多样性、灵活性和高效性等优点，极大地丰富了肽的结构和功能研究。自1954年，Vigneaud首次完成了催产素的全合成并获得诺贝尔化学奖后^[25]，多肽的化学合成法得到蓬勃发展，其中固相合成或液相合成技术在经过不断发展后逐渐成熟，并被广泛应用于人工合成具有特定序列的功能肽。

2.1 固相肽合成

固相肽合成技术（solid phase peptide synthesis, SPPS）是目前最常用的化学合成方法。该方法将肽链逐步连接在固相载体上，通过连续的氨基酸耦合和脱保护反应得到目的肽树脂，再将目标肽从固相载体上释放出来，获得目标肽。固相肽合成具有操作简便、易于纯化等优点，但需要制定高效的合成策略和选择合适的缩合试剂^[26]。

20世纪60年代Merrifield等^[26]发明了多肽的固相合成方法，这一方法使得多肽合成领域发生了革命性的改变，此后多肽固相合成技术逐渐应用于各种功能肽的制备。

抗菌肽作为一种具有抗菌特性的碱性多肽，在抵御外来微生物入侵方面发挥着重要作用。天然抗菌肽主要从生物体中分离得到，但这种方法技术要求高，而固相合成方便迅速，且得到的抗菌肽结构精确可控^[27]。2023年Zhang等^[28]采用固相合成法制备了抗菌肽库，并采用修饰细胞膜色谱法从库中筛选肽链，其中FWKFK（Phe-Trp-Lys-Phe-Lys）对大肠杆菌（*Escherichia coli*）和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的最低抑制浓度为200 μg/mL和250 μg/mL，红细胞溶血率

表1 功能肽分类、作用机制、特点和应用场景

Table 1 Classification of functional peptides and their action mechanism, characteristics and application scenarios

分类	作用机制和典型氨基酸序列	特点和应用场景	参考文献
抗菌肽	①破坏细胞膜结构:通过与细菌细胞膜中的磷脂双层结合,增加膜通透性,导致细胞内容物泄漏,从而杀死细菌 ②抑制细菌代谢途径:干扰细菌DNA、RNA和蛋白质合成,抑制细菌生长和繁殖 ③典型氨基酸序列:Phe-Trp-Lys-Phe-Lys	广谱抗菌、抗感染,特别是对抗耐药性菌株感染有很好效果;促进伤口愈合;预防感染;治疗女性阴道念珠菌感染等	[3-4]
抗病毒肽	①阻断病毒进入细胞:通过与病毒外壳蛋白或宿主细胞受体结合,阻止病毒附着和进入宿主细胞 ②抑制病毒复制:干扰病毒RNA或DNA合成,从而抑制病毒复制 ③典型氨基酸序列:Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val--Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro	通过抑制病毒蛋白的功能,阻断病毒生命周期;可预防病毒感染,对于已感染病毒患者,则可阻止病毒在体内的进一步繁殖	[4,19]
抗氧化肽	①清除自由基:通过捐献电子或氢原子,中和体内自由基,减少自由基对细胞损伤 ②提高抗氧化酶活性:通过提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶等抗氧化酶的活性,增强机体抗氧化能力 ③典型氨基酸序列:Leu-Ala-Asn-Ala-Lys	安全性高,可以用在食品领域抗氧化上;也可开发相应抗氧化化妆品、保健食品或者药品	[5-9]
抗紫外肽	①吸收紫外线:通过吸收紫外线光子,减少其对皮肤的穿透和损伤 ②修复紫外线损伤:通过促进DNA修复机制,修复紫外线引起的DNA损伤,减少皮肤癌的发生 ③典型氨基酸序列:Leu-Val-Asn-Glu-Leu-Thr-Glu-Phe-Ala-Gln	增强皮肤对紫外线损伤的防御和修护能力以及防止光老化,在防晒护肤品中应用前景广阔	[10-11]
抗癌肽	①诱导细胞凋亡:通过激活凋亡信号通路,如Caspase级联反应,诱导癌细胞凋亡 ②抑制血管生成:通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)活性,减少肿瘤血管生成,从而抑制肿瘤生长 ③典型氨基酸序列:Xxx-Arg-Gly-Asp-Xxx	肽易于人体吸收,可选择性地抑制肿瘤细胞生长,同时对正常细胞影响较小,亦可降低化疗药物毒副作用	[12-14, 20]
免疫调节肽	①增强免疫细胞功能:促进T细胞、B细胞和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)的增殖和活化,提高免疫系统整体功能 ②调节细胞因子分泌:通过调节细胞因子分泌,平衡促炎和抗炎反应,维持免疫稳态 ③典型氨基酸序列:Gly-Arg-Gly-(Asp) _n	增强机体免疫反应或抑制过度免疫反应,达到免疫平衡效果,在调节免疫方面有良好的应用前景	[15]
美白肽	①抑制酪氨酸酶活性:美白肽通过与酪氨酸酶结合,抑制其活性,从而减少黑色素的合成 ②干扰黑色素转运:某些美白肽可干扰黑色素小体从黑素细胞向角质形成细胞的转运,减少皮肤色素沉着 ③典型氨基酸序列:H-Met-Pro-D-Phe-Arg-D-Trp-Phe-Lys-Pro-Val-NH ₂	具有更好的安全性和美白活性,可在美白护肤品中广泛应用	[21-22]
减肥肽	①促进胰岛素分泌:胰高血糖素样肽-1受体激动剂(glucagon-like peptide-1 receptor agonists, GLP-1RA)可增加胰岛素分泌,降低血糖水平 ②抑制胰高血糖素分泌:GLP-1RA可减少胰高血糖素的分泌,减缓肝脏释放葡萄糖 ③延缓胃排空:GLP-1RA能延缓胃排空速度,使饭后血糖上升更为温和 ④减少食欲:GLP-1RA可降低食欲 ⑤典型氨基酸序列:His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly	GLP-1RA不仅能够良好安全地控制血糖水平,适用于2型糖尿病患者的血糖控制;而且能有效减少热量摄入,帮助控制体重,达到有效减肥效果	[23-24]

低至6%,该肽链的发现对于开发新的抗感染药物有着重大意义。

近年来随着抗氧化肽在食品、生物保健品、生物机体及化妆品中展现出举足轻重的作用,逐渐成为新的研究热点。SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys)具有抗氧化特性和抗癌特性,最初从牡蛎水解产物分离得到。2020年Sabana等^[29]在固相不溶性载体树脂2-Chlorotriethylchloride上重复缩合-洗涤-

去保护-洗涤等操作最终制备出抗氧化肽SCAP1。该方法具有反应条件温和、操作简单方便、易于纯化等优点。

抗癌肽(anticancer peptide, ACP)作为新型抗癌药物,凭借其尺寸小、活性高、免疫原性低、生物相容性好等优势,在癌症治疗领域得到了广泛的关注。2019年Baharlou等^[30]采用固相合成法制备得到一系列三唑基类肽抗癌药物。利用噻唑

蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 法评估产物对乳腺癌、结肠癌细胞系和成纤维细胞的抗癌活性。实验结果表明, 含有1*H*-1, 2,3-三唑环基团的肽支架对结肠癌细胞和乳腺癌细胞具有毒性, 这一发现为未来抗癌药物的设计提供了新的方向。

HBD-3 具有多重抗菌和免疫调节功能, 但结构复杂, 合成效率低, 导致其结构和功能的研究受到限制。2022年 Walewska 等^[31] 对传统 Fmoc 固相合成 HBD-3 的方法进行优化, 通过采用正交二硫键形成策略, 结合优化后的树脂、偶联剂和假脯氨酸二肽结构单元, 可有效减少肽链聚集, 并提高目标肽在最终产物中的含量。此外, 还探索了使用二硒键替代天然二硫键的合成方法, 可进一步改善 HBD-3 的氧化折叠。该工作为后续 HBD-3 的深入生物学和药理学研究奠定了基础, 有望进一步挖掘其治疗潜力。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1), 在体内具备促进胰岛素释放、抑制食欲和延缓胃排空等功效, 可帮助肥胖患者减轻体重。但天然 GLP-1 存在降解快、半衰期过短等问题, 促使衍生出一系列以 GLP-1 为主体的长效化 GLP-1 受体激动剂, 如利拉鲁肽^[32-33]、司美格鲁肽^[34-35]、替尔泊肽 (双重受体激动剂)^[36-37]、瑞他鲁肽 (三靶点受体激动剂)^[38] 等。该类药物的设计思路主要是对 GLP-1 主体结构进行氨基酸序列改造、脂肪酸修饰或糖基修饰等, 目前的获取方式大多需要固相合成法进行全合成或部分片段合成。

2.2 液相肽合成

液相肽合成 (liquid phase peptide synthesis, LPPS) 是较早开发的一种化学合成方法, 通过在液相中进行氨基酸耦合反应合成肽链。液相肽合成方法具有合成规模大、反应条件灵活的优点, 但操作复杂、分离纯化困难^[39]。

1994年, Dawson 等^[40] 发现 C 端为硫酯和 N 端为半胱氨酸残基的多肽片段, 在温和条件下可进行反应, 实现以 Cys 为连接位点的自然化学连接。该方法极大地推动了人工合成蛋白质的发展。

Biphalin 是一种脑啡肽的二聚体类似物, 其结

构特征为 2 个四氨基酸片段 (Tyr-DAla-Gly-Phe) 通过酰肼桥尾对尾相连。由于这种特殊的连接方式使得在聚合物载体上进行固相合成十分困难, 因此该八肽 (Tyr-DAla-Gly-Phe-NH-NH-Phe-Gly-DAla-Tyr) 及其类似物的合成需要在溶液中进行。2020年 Tymecka 等^[41] 以 *N*-Boc 保护的丙氨酸为初始原料, 通过两步液相偶联得到 Boc-Tyr(Bzl)-DAla-Gly-OH 片段。随后再与苯丙氨酸肼进行偶联、脱保护得到目标八肽。

莫瑞伐定是一种由 14 个氨基酸组成的环化多肽, 而传统固相合成大环肽存在成本高、收率低等问题, 难以大规模制备。2024年 Gu 等^[42] 使用疏水性载体辅助液相合成的方法, 以 67% 的收率制备出莫瑞伐定 (POL7080)。且纯化后的莫瑞伐定对多重耐药铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 表现出特异、高效的杀菌作用, 并能在低于最低抑菌浓度的情况下有效抑制 *P. aeruginosa* 的生长。

依替巴肽其结构特征为含有一个二硫键的环状七肽, 被 FDA 批准用于治疗急性冠状动脉综合征、急性心肌梗死。2024年 Li 等^[43] 采用小分子标签 (TAG-Rink) 辅助液相合成技术解决了目前依替巴肽原料药生产成本高、难规模化等技术难题。与传统固相合成相比, 该法可将有机溶剂用量减少 10 倍, 氨基酸用量大大减少, 为肽基药物化学领域引入一种新的绿色合成工具。

综上, 固相合成法和液相合成法作为制备功能性肽的两大主要化学手段, 各有其独特的优势和适用范围, 如表 2 所示。

在实际应用中, 需要根据具体情况灵活选择或结合使用这两种方法, 即混合 SPPS/LPPS, 以达到最佳的合成效果。如 2021年 Frederick 等^[37] 采用固液相结合的四片段法进行替尔泊肽的合成, 首先将替尔泊肽主体拆解成 4 个肽片段, 各片段采用固相合成的方式进行制备 (各片段可并行合成)。合成好的片段经纯化后, 通过液相偶联进行组装, 即可得到替尔泊肽。相较于全采用固相合成法, 该方法的周期可由 10 d 以上缩短至 3 d 左右, 生产效率得到极大提升, 满足了替尔泊肽原料大量生产的需求。

表2 固相合成法和液相合成法的优缺点及适用范围

Table 2 Advantages/disadvantages of the solid/liquid phase synthesis for the production of functional peptides

对比维度	固相合成法(SPPS)	液相合成法(LPPS)
原理与过程	固相载体上逐步缩合氨基酸	溶液中氨基酸/肽片段进行耦合
自动化程度	高,流程化的操作可以通过自动化的多肽合成设备实现自动化生产	较低,操作过程较为复杂,目前难以实现大规模自动化生产
适用范围	中长链多肽(通常40个氨基酸以内)	短肽及特定结构要求的多肽(通常10个氨基酸以内)
产率	较高,随着肽链延长收率下降	适中,随着肽链延长收率迅速下降
纯度	较高,随着肽链延长纯度下降	适中,随着肽链延长纯度迅速下降
耗时	较长,每个氨基酸通常需2~3 h	适中,合成简洁迅速
成本	较高,树脂和大量溶剂	相对较低

3 功能肽的生物制造研究进展

功能肽的生物制造,主要包括天然蛋白质的水解和异源重组表达两种方法。其中水解法是利用化学法或生物酶降解天然蛋白质从而获得多肽的方法;异源重组表达方法是利用基因工程技术将含有目的多肽的序列片段转移到原核或真核细胞中进行重组表达的方法。

3.1 酶法水解工艺

通过使用酸或碱对蛋白质进行化学水解,使部分肽键断裂,得到一些游离氨基酸或者肽段的混合物,例如微生物培养常用的蛋白胨。酸碱水解成本较低,反应快、适用范围广,但由于断裂位点较难控制,可能会导致目标肽片段的降解和副产物的生成,因此在实际应用中一般较少选择。

酶解法是最常用的功能肽制备方法之一,利用特异性蛋白酶(如碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胃蛋白酶等)对蛋白质进行选择性水解,得到目标肽片段。这种方法反应条件温和,具有高效性和专一性,通过对酶的种类、用量和反应条件进行优化,可得到不同长度的功能性肽段。

自然界中存在着许多不同类别的蛋白质,随着生物技术的不断进步,越来越多的蛋白质序列被人们所获悉,因此人们可根据制备目标肽的功能需求或者结构特点来选择相应的原料进行酶解^[44]。近年来常用的植物蛋白原料包括大豆蛋白、玉米蛋白、小麦蛋白、豌豆蛋白、大米蛋白等,动物蛋白原料包括家禽、鱼类和一些贝类等[表3和图1(a)]。

血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制肽又称降压肽,血管紧张素转化酶在体内血管紧张素系统中发挥重要作用,通过抑制ACE活性,阻止血管紧张素的生产或者减少缓激肽的释放,从而达到降低血压的功效。近年来,研究者们已经从植物^[45-47]、动物^[48-49](包括海洋鱼类)等水解产物中发现大量具有降压活性的多肽片段。

海洋约占地球表面积的70%,海洋环境更具有生物多样性,从海洋生物中获取功能肽是食品科学以及生物医学领域未来最重要的途径。鱼类作为原材料主要有三文鱼、鳕鱼、金枪鱼等,包括鱼皮、鱼骨、鱼鳍等部位。不同种类鱼皮提取处理后的氨基酸组成有一定的差异,同一鱼种的不同部位制备得到的抗氧化肽,其抗氧化活性也会有所差异^[56]。2013年,Wang等^[57]报道了分别用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶,从蓝贻贝中酶解提取出一种新的抗氧化肽(BNH-P7),其氨基酸序列被鉴定为YPPAK(Tyr-Pro-Pro-Ala-Lys)。BNH-P7对DPPH自由基、羟基自由基和超氧化物阴离子自由基表现出良好的清除活性。在亚油酸模型系统中,BNH-P7也能有效地对抗脂质过氧化。Kim等^[58]分别用8种蛋白酶水解厚壳贻贝,其中风味蛋白酶酶解产物的NO抑制活性最强,通过超滤、阴离子交换色谱以及HPLC进行分离纯化,筛选到一种新的抗炎肽序列Gly-Val-Ser-Leu-Leu-Gln-Gln-Phe-Phe-Leu。

Chen等^[59]从鳕鱼皮中提取到具有保湿、抗氧化、促进人皮肤成纤维细胞活力的功能肽。其工艺成功从实验室规模进一步扩大至中试100 L,再扩大至工业化规模2000 L,不同规模水解产物中低聚肽和氨基酸组成很相似,说明酶解法从实验

表3 酶解法制备功能肽汇总
Table 3 Summary of functional peptides produced by enzymatic hydrolysis

名称	原料	蛋白酶种类	酶解条件	分离纯化	功能描述	参考文献
降压肽	大豆蛋白	嗜热菌蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶	50 g/L, 55 °C, pH 8, 3 h; 37 °C, pH 8, 3 h; 37 °C, pH 7.6, 3 h	离心、LC-MS	ACE抑制活性	[45]
降压肽	诃子果实	胃蛋白酶	1:25(质量比), 37°C, 12 h	离心、RP-HPLC	ACE抑制活性	[46]
降压肽	米糠	胰蛋白酶	50 mg/mL, 1500 U/mg, 37 °C, pH 8, 2 h	离心	ACE抑制活性、抗氧化	[47]
降压肽	鸡皮	碱性蛋白酶	10 g/L, 60 °C, pH 9.5, 4 h	离心、超滤	ACE抑制活性	[48]
降压肽	短鳍鱼	碱性蛋白酶	10 g/L	离心、过滤	ACE抑制活性	[49]
抗氧化肽	牛毛	碱性蛋白酶	5%, 55 °C, 8 h	离心、凝胶过滤、分子排阻色谱	抗氧化	[50]
二肽酶抑制肽	三文鱼鱼白	蜂蜜曲霉蛋白酶	5种蛋白酶筛选, 50 °C, >5 h, 17.5 g酶/7.2 kg原料	硅藻土过滤、超滤、浓缩	控制血糖	[51]
血糖控制以及抗炎肽	去骨三文鱼	胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶	NA	过滤、超滤	控制血糖、抗炎	[52]
抗氧化肽	黄鳍金枪鱼	碱性蛋白酶	酶量 3000 U/g, 50 °C, 5 h, 100 r/min	离心、超滤 Sephadex G-15	抗氧化	[53]
抗氧化肽	鱿鱼	碱性蛋白酶	酶量 5~30 U/g, 5~180 min	离心	抗氧化	[54]
抗癌肽	虾壳	Cryotin酶	pH 8, 50 °C, 45 min	离心、超滤	抗恶性细胞增殖	[55]

注：NA—不适用。

Note: NA—Not applicable.

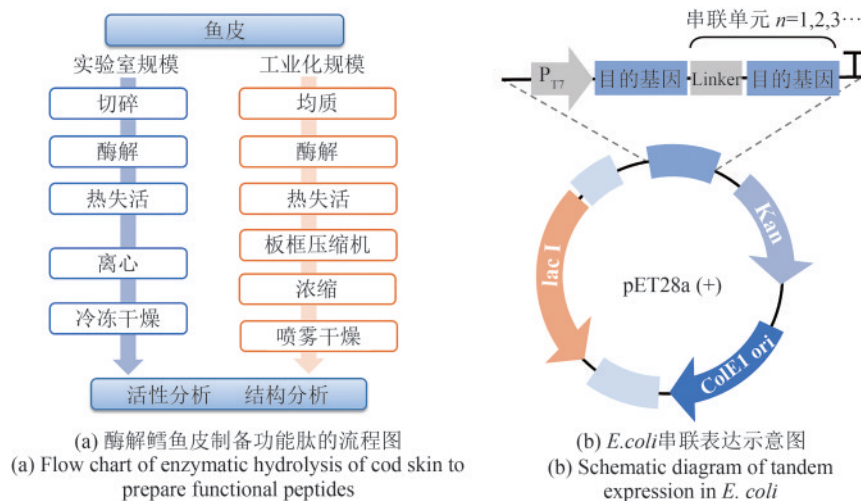


图1 酶水解法制备功能肽 (a) 和串联表达功能肽 (b) 示意图

Fig. 1 Schematic diagram for the enzymatic hydrolysis of cod skin (a) and tandem gene expression in *E. coli* (b) to produce functional peptides

室开发到中试，再到工业化放大，都能保持产品的质量稳定 [图 1(a)]。

3.2 异源重组表达工艺

功能肽的异源重组表达常用的表达体系有细

菌体系和真菌体系。细菌表达体系常用的宿主主要有 *E. coli* 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。真菌表达体系常用的宿主主要为酵母表达体系。重组表达工艺是通过基因工程手段，人工设计并合成编码重组蛋白或者多肽的基因，构建至表达载体上，再转化进入宿主菌，使宿主菌在胞内表达

重组多肽或者把表达的重组多肽分泌到胞外。再通过超滤、色谱等分离纯化技术获得重组蛋白或者重组多肽。这种方法可以实现蛋白或者多肽的大规模生产,具有较高的产量和纯度(表4)。

3.2.1 *E. coli* 表达系统

E. coli 表达系统是目前应用最广泛,最常见的重组蛋白表达系统。主要优点包括遗传背景清晰、繁殖速度快、培养周期短、表达量高以及工业化放大技术成熟等。与真核细胞表达系统相比,*E. coli* 表达系统也有一定的缺点,如:没有翻译后加工的功能,不能进行糖基化、磷酸化等修饰,表达的蛋白很容易形成包涵体,需要经过复性得到具有良好生物活性的蛋白。*E. coli* 表达系统也可以设计使用分泌型载体使 *E. coli* 分泌表达出可溶性的蛋白,但是这种方式往往表达量不高。

Herbel 等^[60] 用载体 pET-32c(+)-SN2, 构建表达抗菌肽 Snakin-2 (SN2) 并融合 Trx 标签蛋白。经过亲和色谱去除融合标签蛋白, 获得重组 SN2 抗菌肽, 经验证对细菌和真菌具有较强的杀菌活性。为了更好地研究来源于合浦珠母贝的抗氧化肽 (DSAOP), Wu 等^[61] 设计 DSAOP 基因序列 N 端连接一个 α -螺旋结构的前体序列, 构建至 pET-30a(+) 表达载体上, 在 *E. coli* 胞内可溶表达, DPPH 自由基清除活性比化学合成的抗氧化肽高 2 倍, 超氧阴离子清除活性比天然抗氧化肽更高。而中试 50 L 发酵规模的实验结果也证明该表达策略有利于降低成本获得活性更高更稳定的抗氧化肽。*E. coli* 除了胞内表达, Momen 等^[62] 在 N 端构建了 AnsBII 信号肽序列, 在 *E. coli* 中成功胞外分泌表达了 YY (3-36) 功能肽。

虽然在细菌中表达真核蛋白具有一定的局限性, 缺乏特定的翻译后修饰以及二硫键的形成。不过考虑到 *E. coli* 表达系统培养周期短, 成本低,

Rauniyar 等^[63] 通过将 VEGF-C 与麦芽糖结合蛋白融合表达, 在 *E. coli* Origami (DE3) 菌株中利用其细胞质中的氧化还原修饰, 成功表达了有生物活性的 VEGF-C。陈国强课题组^[64] 通过 *E. coli* 表达系统成功地融合表达了天然的 PhaP 蛋白与细胞膜上的整合素结合肽 RGD/IKVAV, 并将融合蛋白吸附于生物材料膜上, 有效提高细胞在植入生物材料表面的黏附、铺展、迁徙和增殖。

由于功能肽自身分子量偏小, 容易被宿主蛋白酶降解为无活性的碎片, 以及有些肽段对宿主菌有一定的毒性等限制因素, 串联表达策略可以有效地提高小分子肽的表达量及稳定性。这种方法可以同时生产多种功能肽, 或者生产具有多个功能域的融合肽, 从而提高生产效率和多功能性。串联表达构建方法主要有四种: 非对称黏性末端互补法、接头连接法、同尾酶法和表达盒串联法^[65]。

黄欣媛等^[66] 采用同尾酶法构建了 1~4 个不同串联数的豆类活性肽 PAIb 的基因, 并融合硫氧还蛋白 A (Thioredoxin A, TrxA), 克隆至 pET-32a(+) 表达载体上, 转化至 *E. coli* 进行诱导表达, 利用 His 标签亲和纯化重组的融合蛋白, 再用肠激酶切除融合标签和串联体, 获得重组 PAIb 单拷贝多肽, 4 拷贝表达产物中目的肽的含量比单拷贝高 4 倍。Zhang 等^[67] 设计了天蚕抗菌肽 A 的串联表达, 分别串联 $n=1, 2, 3, 4$, 在 BL21 (DE3) 工程菌中可溶性蛋白的表达量单拷贝和 3 拷贝的高于 2 拷贝和 4 拷贝的。

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类的药物通过促进胰岛素的分泌和抑制胰高血糖的释放, 调节人体的血糖代谢, 同时减少肠道蠕动, 引起饱腹感从而达到减重的目的。陈清等^[68] 通过设计蛋白酶的酶切位点将 GLP-1 多肽的序列串联, 第一个蛋

表4 不同表达系统在功能肽制备中的应用

Table 4 Applications of different expression systems in the preparation of functional peptides

表达系统	优势	不足	应用范围	产业化现状
大肠杆菌	繁殖速度快、培养周期短、遗传背景清晰、工艺放大技术成熟、成本低	易形成包涵体、存在内毒素风险	抗菌肽、抗氧化肽、减肥肽、化妆品肽等	技术成熟, 可实现产业化放大
枯草芽孢杆菌	遗传背景清晰、安全性强、可分泌表达至培养基中、纯化简单	表达量偏低、重组质粒易丢失	淀粉酶、蛋白酶、维生素等	技术成熟, 产业化程度较低
酵母菌	一定的翻译后修饰、耐受能力强	发酵周期长、表达量不高	抗菌肽、免疫调节肽等	技术成熟, 可实现产业化放大

白酶酶切位点为Kex2, 第二个蛋白酶酶切位点为CPB, 目标多肽序列可实现4~16个的串联, 而且在*E. coli*中倍增80倍内质粒丢失率低于10%, 可以实现工业化的高产量表达 [图1(b)]。

3.2.2 *B. subtilis* 表达系统

另外一种经常被用来作为表达宿主的细菌是*B. subtilis*, 它属于革兰氏阳性菌, 细胞壁组成简单, 分泌的产品中不含有内毒素。完善的蛋白分泌系统、高效的信号肽以及分子伴侣系统, 使其表达的多肽可直接分泌至培养基中, 不需要菌体裂解, 表达产物的分离纯化较为简单。另外, 枯草芽孢杆菌安全性强, 无致病性, 是公认的安全菌株。而且染色体序列已知, 遗传背景清晰, 生长速度较快。目前, 枯草芽孢杆菌已被用于生产淀粉酶、蛋白酶、维生素和功能性食品等产物。

Zhang 等^[69]利用 pUC57-PR-FO 载体和*B. subtilis* WB800N 表达了一个新型的 α -螺旋杂合抗菌肽。Chen 等^[70]利用*B. subtilis* 表达系统从大黄鱼基因中筛选出一种含有51个氨基酸的抗菌肽, 命名为Lc1687, 之后在*E. coli*内表达纯化重组的rLc1687, 对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很强的抑制活性。Sun 等^[71]在*B. subtilis* 168 菌株中利用srfA 启动子, 一种有效的依赖于细胞密度的自诱导启动子, 成功自诱导表达风味肽BMP, 并且采用了8拷贝串联的策略, 在5 L的发酵罐中与高密度发酵策略结合, 产量达到3.16 g/L。

近年来, 随着合成生物学的不断发展, 对枯草芽孢杆菌的优化改造也在不断更新, 包括启动子元件、信号肽、分子伴侣、核糖体结合位点、诱导剂选择等。Zhang 等^[72]通过对启动子的优化, 突变和高通量筛选, 开发了基于麦芽糖转录激活因子操作子(malO)的高效表达调控系统MATE (maltose-inducible expression system)。Lu 等^[73]利用CRISPR 系统, 在枯草芽孢杆菌中将RNA 聚合酶 α 和 ω 亚基与dCas9 蛋白融合, 定义最佳的CRISPRa (激活) 和CRISPRi (干扰) 目标窗口, 通过特定的gRNA, 可以同时不同的基因进行激活和抑制操作。通过构建MATE (maltose-inducible expression system) 基因表达调控系统, 调控启动子强度、激活分子伴侣, 调控细胞分裂, 实现了异源蛋白的高效表达。Wu 课题组^[74]通过CRISPRi

策略, 构建文库, 筛选与目的蛋白表达相关的关键基因, 还通过CRISPRa 靶向启动子的上游区域, 调控目的基因的转录。筛选的菌株应用于热淀粉酶、几丁质酶和 β -半乳糖苷酶的表达, 证实了该菌株的普适性。

3.2.3 酵母表达系统

酵母表达系统具有一定的蛋白质翻译后修饰功能, 比较容易获得可溶性表达的重组蛋白, 培养条件简单, 生长速度较快, 纯化工艺相对简单, 工业化成本相对较低。对于那些对宿主菌生长有抑制作用的抗菌肽, 除了采用标签融合表达的策略, 也可以选择采用酵母表达系统。酵母表达系统^[75-76]中常用的胞内载体有pPICZ、pPIC6、pGAPZ、pFLD 等, 分泌表达载体有pPICZ α 、pPIC6 α 、pGAPZ α 、pFLD α , 表达常用宿主菌株有野生型菌株Y-11430 和X-33, 另外还有一些营养缺陷型的GS115、GS190、JC220、YJN165 菌株等, 一些蛋白酶缺陷型的KM71、MC100-3、SMD1168 等。

Cao 等^[77]利用点突变构建了抗菌肽MP1106, 载体选择pPICZ α A 载体, 在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X-33 中表达, 5 L 发酵罐中重组目的肽的表达水平达到1.808 g/L。表达上清用阳离子交换柱进行纯化, 纯化收率46.96%, 纯度94.68%。重组MP1106 对*S. aureus* 表现出很强的抗菌活性, 同时对20株临床分离出的耐甲氧西林*S. aureus* 显示出强效活性(0.03~1.8 μ mol/L), 另外该多肽在20~100 $^{\circ}$ C 范围内表现出广泛的热稳定性。在中性和碱性环境(pH 6、pH 8、pH 10) 中保持较高的抗菌活性, 在酸性环境(pH 2、pH 4) 中其活性略有降低。可以抵抗胃蛋白酶、蜗牛酶和蛋白酶K 的消化, 但是对胰蛋白酶敏感。在512 μ g/mL 的浓度下其溶血活性只有1.16%, 在37 $^{\circ}$ C 人血清中可以24 h 保持稳定。此外, 10 mmol/L 二硫苏糖醇和20% 二甲亚砜对该重组肽的活性影响极小。结果表明MP1106 可以大规模生产, 有潜力成为抗*S. aureus* 的药物候选分子。Zhang 等^[78]优化和改进了菌丝酶素(plectasin) 的序列, 获得一个新的候选序列, 且高表达, 上清液中的总蛋白产量为5.53 g/L, 在体外各种条件下相对稳定, 对几种革兰氏阳性菌有很强的活性(MIC 值范围1~16 μ g/mL), 低毒性, 老鼠腹腔注射1周, 显示无毒性。

在酵母表达系统中,采用串联表达也是比较常见的一种策略。Cao等^[79]用*P. pastoris*表达系统,将富含脯氨酸的抗菌肽(PrAMPs)与人血清白蛋白串联表达,为方便纯化,插入了6个His标签以及TEV蛋白酶切割位点。Li等^[80]报道了在*P. pastoris* GS115中分泌表达人嗜铬粒蛋白A衍生肽CGA-N12,含12个氨基酸ALQGAKERAHQQ(Ala-Leu-Gln-Gly-Ala-Lys-Glu-Arg-Ala-His-Gln-Gln),具有较强的抗菌活性和较低的溶血活性。为了提高表达水平,CGA-N12编码序列的设计模仿酿酒酵母天然 α -因子的设计,使用四对具有黏性末端的长引物合成了四个拷贝的CGA-N12序列,两侧为Lys-Arg和两个Glu-Ala重复,内源性蛋白酶Kex2和Ste13识别切割出单拷贝的多肽。

3.2.4 其他表达系统

随着生物技术的发展,乳酸菌由于其自身的可食用性,也被越来越多的人选为基因工程菌株,用于表达食品、药品等行业所需的生物活性分子,最常用的有植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)等。Renyne等^[81]在*L. lactis* ML13和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) C2中表达一种来源于牛奶 α s1-酪蛋白的抗高血压肽,肽序列为FFVAPFPECVVGK。三叶因子(trefoil factor, TFF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是已知的上皮细胞的强效调节因子,TFF是黏膜损伤修复肽,两者联合使用能促进细胞迁移在较短的时间内修复黏膜伤口。Huynh等^[82]在*L. lactis* PSM565中同时表达和分泌EGF和TFF3(LL-ET)。发酵液上清中两种生物活性因子的联合作用对体外诱导创面愈合的修复具有协同增强作用。这一结果表明乳酸菌共表达两种生物因子的发酵产物有可能在未来用于口服治疗肠道损伤和炎症。

4 功能肽挖掘策略研究进展

在自然界,功能肽往往以非活性的形式存在于前体蛋白中,传统的挖掘方法主要以实验为主,如噬菌体表面展示技术。由于生物实验工作量大、

耗时费力且成本高,因此限制了活性肽的发现^[83]。随着高通量测序技术的不断发展、组学技术以及人工智能的进步,海量的基因组及蛋白质数据被爆发式释放出来,采用生物信息学并结合计算机模拟方法智能预测及挖掘数据库中存在生物活性的多肽已成为挖掘功能肽的最有效手段,有助于活性肽的高效开发和应用^[84]。

4.1 噬菌体表面展示技术

1985年,G. P. Smith第一次提出了噬菌体表面展示技术,其结构和主要原理如图2(a)和(b)所示,是利用分子生物学或分子克隆等技术将外源蛋白或者多肽的基因片段定向插入到噬菌体外壳蛋白的基因中,通过将外源蛋白或多肽与噬菌体的外壳蛋白融合表达,进而展示在噬菌体的表面^[85-86]。通过表型筛选出的噬菌体库可通过感染*E. coli*进行扩增,扩增后的噬菌体展示库通过与对应靶分子进行连续多次的淘选后,会有一种或者多种多肽能与目的靶标^[87],如组织^[88-89]、细胞^[90]、血清^[91]、病毒^[92]等表面的受体发生特异性结合,从而得到高亲和力序列,所筛选出的多肽序列可以发挥相应的生物活性,为后续疾病诊断及治疗提供有效的方法。Liu等^[93]运用噬菌体展示技术,吡虫啉半抗原与BSA相连作为靶标从七肽库和环七肽库中筛选出与其特异性结合的多肽L7-1: AKELSTW(Ala-Lys-Glu-Leu-Ser-Thr-Trp),该多肽与吡虫啉半抗原的结合虽不如吡虫啉抗体灵敏,但该多肽具有方便、快捷、廉价的优势,并且可应用于环境中吡虫啉的检测,有望替代吡虫啉抗体。Chen等^[94]运用噬菌体展示技术筛选出一种具有透皮促渗功能的短肽TD-1,生物实验进一步证实该短肽可使胰岛素经皮肤吸收进入到大鼠体内从而起到降低血糖的作用,而许多文献也表明通过噬菌体表面展示技术筛选出的短肽自身都具有透膜性能^[95-96]。Zhang等^[97]通过噬菌体展示技术进行肽结合实验,筛选出用于帕金森病早期诊断的功能肽,他们在发现阶段利用噬菌体展示技术分别筛选出和帕金森病患者的血浆具有高亲和力的短肽AD#1:HMRQGMA(His-Met-Arg-Gln-Gly-Met-Asn),以及与健康人的血浆特异性结合的短

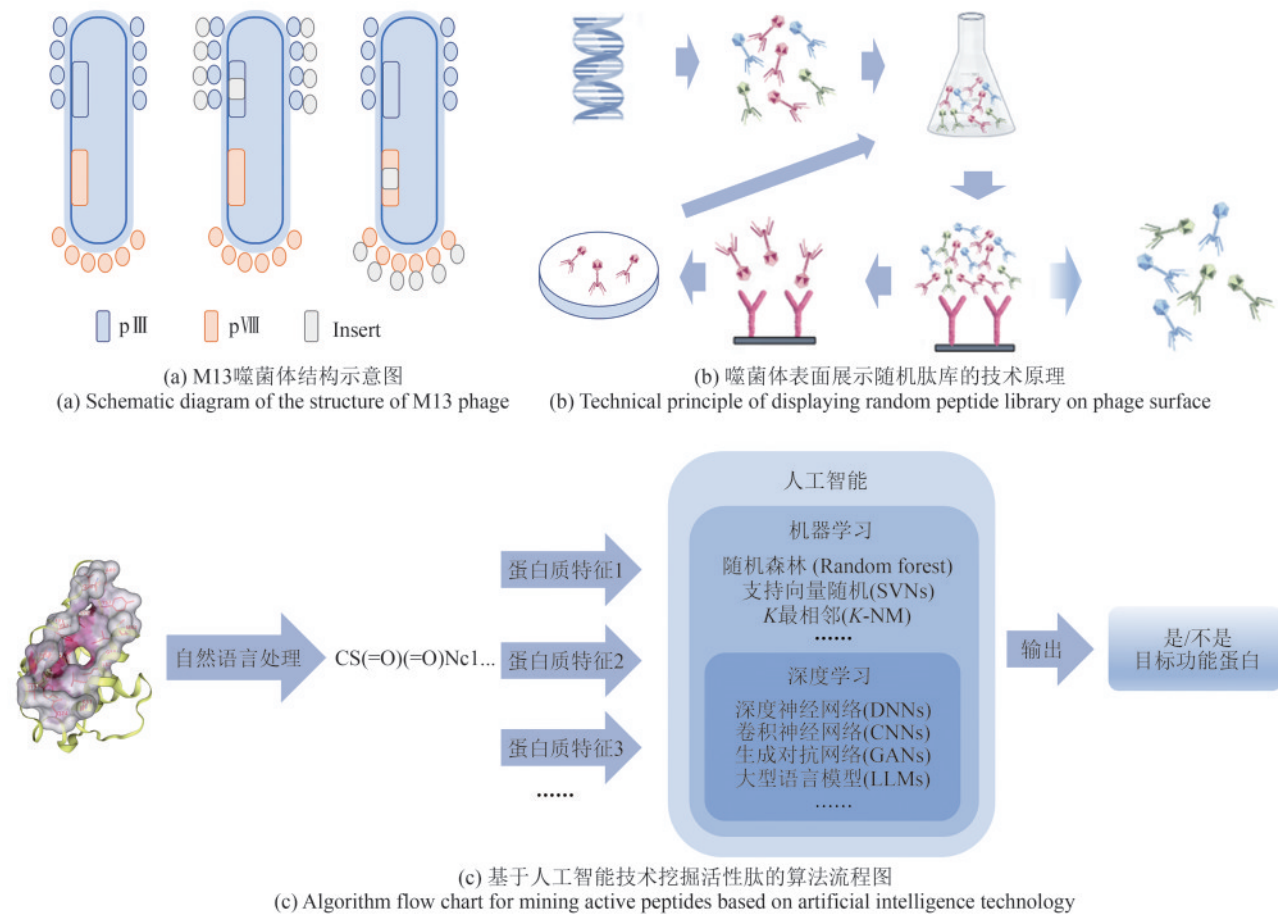


图2 噬菌体表面展示技术和人工智能技术

Fig. 2 Diagram for phage surface display and artificial intelligence to be used in the production of proteins (functional peptides)

肽 Con#1: DGARHGR (Asp-Gly-Ala-Arg-His-Gly-Arg), 这两种多肽在很大程度上提高了诊断性能, 为早期准确诊断帕金森病提供一种新的血液生物标志物检测方法。

4.2 机器学习算法及分子对接技术

随着后基因组时代的到来, 海量的序列数据呈井喷式释放, 各种基于机器学习的预测算法被广泛用于多肽治疗特性以及新的活性肽的发掘^[98]。与传统的湿实验方法相比, 机器学习算法仅靠多肽的数据库即可进行大规模高效的预测, 大大节省了时间和成本。因此, 开发基于序列的预测方法, 尤其是利用机器学习算法, 对挖掘功能肽具有重要意义。近年来, 机器学习算法在发现和设计功能短肽方面的应用日益增加, 例如已经有相关领域的研究者们开始使用多种机器学习算法来

设计新型的抗菌短肽^[99]。Ilyas等^[100]利用11种机器模型, 学习1568份组织蛋白酶K与抗体的构效关系, 优选出15种抗体进行分子对接计算, 最终获得2个强结合抗体。Gull等^[101]使用梯度提升树算法(eXtreme Gradient Boosting, XGBOOST)构建了多标签预测模型AMAP用来预测肽的生物活性, 特别是具有抗菌活性的多肽的预测。AMAP使用多标签分类来预测给定肽序列的14种不同类型的生物学功能, 并且与目前技术水平相比, 其预测精准度更高。研究还对提出的方法进行了严格的性能评估。除了与现有AMP预测因子进行交叉验证和性能对比外, AMAP还在测试数据集中的表现相当出色。除直接计算新药的活性外, Cho等^[102]将FDA获批专利的相关特征与药物化学结构、物理化学性质和临床试验相关特征结合起来, 设计了深度学习方案ChemAP, 用于预测药物的FDA批准可能性, 减小新药研发早期的决策压力。

4.3 人工智能技术

基于现有的基因组及多肽数据库,利用自然语言处理(nature language processing, NLP)和人工智能方法,筛选出未发现的功能多肽也是近年来发展起来的多肽挖掘新方法。在多肽的NLP模型中,由20种天然氨基酸组成的不同的多肽序列就像是由26个英文字母组成的“单词”一样,而多肽针对某个疾病和特定受体的功能就像是“词义”。Giguère等^[103]在Joo等^[104]实验得到的抑菌多肽数据库的基础上生成NLP模型,以天然活性肽序列中疏水氨基酸的位置为特征,通过对其进行语义分析,得到了多条在自然界未被挖掘的且具有较高活性的抑菌多肽。Fang等^[105]同样在Agrawal等^[106]的数据库中,根据天然抗菌肽中C、G、H、K、R、Y等氨基酸含量高的特点选取训练集,生成NLP模型后使用深度学习算法,最终筛选出一种具有抗真菌功能的活性多肽。另外一种与人工智能筛选活性肽技术相关的是神经网络技术。神经网络技术,即深度学习技术,是使用简化分子线性输入规范(simplified molecular input line entry system, SMILES)^[107]或分子指纹特征^[108]等描述方法,对蛋白质的氨基酸组成、极性、三维结构和拓扑性质转化为计算机可以处理的字符串,将已知的相似功能蛋白的特征赋予不同权重录入数据库,根据训练出的模型对未知功能蛋白进行筛选。神经网络技术已发展出多种语言模型,例如,Kao等^[109]利用生成式对抗网络模型,根据天然DDR1的化学官能团位置和晶型结构设计并验证了DDR1激酶抑制剂,Müller等^[110]基于天然抗菌肽中性 α -螺旋的疏水性质,使用长短期记忆网络(long short-term memory, LSTM)设计了具有82%验证活性的抗菌肽生成模型。王军团队^[111]应用了NLP的最新方法,对基因组序列进行研究,并对其中编码的多肽进行功能预测。在现有的抗菌肽数据库的基础上,构建了多个神经网络模型整合的分析流程,判定结果可达90%以上的准确率。在海量的基因组和宏基因组数据中,借助AI工具可以进行定向功能分子的直接挖掘和判定,高通量筛选后,再进行后续的机理和有效性验证。然而,神经网络技术依赖经验证的数据库进行学习,受到活性及非活性样本数量的

限制,通过引入随机森林(random forest, RF)和模糊 K 最相邻(fuzzy K -nearest neighbors, FKNN)等算法对数据进行泛化预测,可以降低模型对样本量的需求,并提高模型预测的精度^[112-113],该方法称为机器学习[图2(c)],例如Wei等^[114]对预测氨基酸序列的算法进行优化,保留了82个阳性和阴性数据集,经过十倍交叉验证达到91.4%的准确率。随着模型和参数的不断优化升级,人工智能在功能肽的挖掘上表现出了巨大潜力,可以极大提高药物研究的速率,但该领域的研究仍处于初步发展阶段。

5 未来合成生物时代功能肽展望

功能肽作为一种新型的生物活性分子,因其特异性强、作用迅速且副作用较低,近年来在医药、食品、化妆品等领域得到了广泛关注。随着合成生物学^[115]、分子生物学和蛋白质工程等技术的不断发展,功能肽的研究将在未来更加深入细致,具有巨大的应用前景。

5.1 改进合成工艺

功能肽的合成方法主要包括化学合成、蛋白质酶法水解和重组表达。这些方法各有优势和局限,但如何降低成本、提高产量及纯度仍是未来发展的关键。固相肽合成(SPPS)作为一种成熟的合成技术,目前被广泛应用于功能肽的制备。然而,其在肽链延长过程中常伴随副产物生成及合成效率较低的问题。未来的研究可通过改进保护基团的设计及催化剂的选择,进一步提升合成效率。例如,近年来通过采用新型的自动化合成设备,显著减少了合成时间并提升了肽链纯度。蛋白质酶法水解通常依赖酶的高选择性及温和的反应条件,逐渐成为功能肽合成的重要手段。通过定向进化等方法开发新的高效酶类,是提高肽类合成效率的重要途径。此外,研究新型酶促反应体系和条件优化,将有助于扩大酶法水解工艺的应用范围。重组表达系统是一种经济且高效的肽类生产方式。未来的研究将侧重于通过基因编辑和代谢工程等技术,优化宿主细胞并提高表达

系统的稳定性,从而大幅提升功能肽的产量和稳定性。近年来,基因工程菌和合成生物系统已被应用于大规模生产多种功能性肽类生产。

5.2 结构修饰与稳定性提升

功能肽的生物活性与其氨基酸序列和空间结构密切相关。通过化学修饰和基因工程改造等手段,能够增强肽的稳定性、延长其体内半衰期并提升生物利用度。化学修饰技术,如聚乙二醇化(PEGylation)和脂质化修饰,能够显著提高肽类分子的稳定性,减少其被蛋白酶降解的可能性。未来的研究可进一步优化修饰方法,以提升肽类药物的体内稳定性、药效及靶向性。例如,脂质化修饰近年来已被证明可有效延长肽类分子的循环时间并增强其靶向能力^[116]。基因工程技术允许对肽的序列进行优化,以增强其生物活性及特异性。利用计算生物学及人工智能技术,可模拟肽的结构并优化其序列设计,从而开发出更具功能性和稳定性的肽类分子。这些技术的发展为精准设计和合成新型功能肽提供了有效的工具^[117]。

5.3 多功能肽的设计

未来功能肽的研究将在一定程度上关注多功能化的设计。通过计算机辅助优化氨基酸序列及空间结构,开发出兼具多种生物活性的功能肽,以满足不同领域的应用需求。功能肽的活性与其氨基酸序列密切相关。通过序列优化设计,可以开发出兼具抗菌、抗氧化、抗病毒等多种生物活性的肽类分子,以满足医药、食品等领域的多重需求。例如,通过序列的理性设计及高通量筛选技术,研究者已成功合成出具备多功能活性的肽类分子。高通量筛选技术和多肽库构建是多功能肽开发的重要工具。未来的研究可以结合大规模合成与高效筛选技术,通过构建具有多样性和复杂性的肽库,快速筛选出具有特定生物活性的多功能肽类分子。这些技术的发展将极大加速功能肽的发现与开发过程^[118]。

5.4 功能肽应用前景

功能肽的低毒性及高效性使其在医药领域和

化妆品领域中展现出广阔的应用潜力。未来的研究应着重于功能肽在应用中的安全性和有效性评估。尽管功能肽具有较低的毒性和良好的生物相容性,但其潜在的免疫原性和长期使用的副作用仍需进一步研究。未来的药物开发应加强功能肽在毒理学和药代动力学方面的评估,化妆品新原料的开发应侧重功效和长期使用安全性的评估,为功能肽的广泛应用提供更充分的科学依据。为了提高功能肽的药效及生物利用度,近年来已有大量研究致力于开发有效的载体技术,如纳米颗粒和脂质体等,以实现功能肽的靶向递送。这些技术可以提高肽类药物在体内的稳定性,并增强其在特定组织或细胞中的积累,从而进一步提升其临床疗效^[119]。

参 考 文 献

- [1] HARTMANN R, MEISEL H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 163-169.
- [2] KITTS D D, WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(16): 1309-1323.
- [3] HANCOCK R E W, SAHL H G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(12): 1551-1557.
- [4] WANG G S, LI X, WANG Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D1087-D1093.
- [5] MENDIS E, RAJAPAKSE N, BYUN H G, et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects[J]. *Life Sciences*, 2005, 77(17): 2166-2178.
- [6] SUETSUNA K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(1): 5-10.
- [7] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. *Peptides*, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [8] PIHLANTO A. Antioxidative peptides derived from milk proteins[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1306-1314.
- [9] FREITAS A C, ANDRADE J C, SILVA F M, et al. Antioxidative peptides: trends and perspectives for future research[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2013, 20(36): 4575-4594.

- [10] ZHANG X L, ZHUANG H, WU S J, et al. Marine bioactive peptides: anti-photoaging mechanisms and potential skin protective effects[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(2): 990-1009.
- [11] DOUNGAPAI C, SIRIWOHARN T, MALILA Y, et al. UV-B protective and antioxidant activities of protein hydrolysate from sea cucumber (*Holothuria scabra*) using enzymatic hydrolysis[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 892255.
- [12] ZHANG Y H, WANG C, ZHANG W H, et al. Bioactive peptides for anticancer therapies[J]. *Biomaterials Translational*, 2023, 4(1): 5-17.
- [13] WANG L H, DONG C, LI X, et al. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review)[J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(2): 637-651.
- [14] SOON T N, CHIA A Y Y, YAP W H, et al. Anticancer mechanisms of bioactive peptides[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2020, 27(9): 823-830.
- [15] PAVLICEVIC M, MARMIROLI N, MAESTRI E. Immunomodulatory peptides: a promising source for novel functional food production and drug discovery[J]. *Peptides*, 2022, 148: 170696.
- [16] CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11(7): 254-262.
- [17] KORHONEN H, PIHLANTO A. Bioactive peptides: production and functionality[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9): 945-960.
- [18] UDENIGWE C C, ALUKO R E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): R11-R24.
- [19] ALTMANN S E, JONES J C, SCHULTZ-CHERRY S, et al. Inhibition of Vaccinia virus entry by a broad spectrum antiviral peptide[J]. *Virology*, 2009, 388(2): 248-259.
- [20] WANG Y G, WANG X, ZHANG Y F, et al. RGD-modified polymeric micelles as potential carriers for targeted delivery to integrin-overexpressing tumor vasculature and tumor cells[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2009, 17(6): 459-467.
- [21] NGOC L T N, MOON J Y, LEE Y C. Insights into bioactive peptides in cosmetics[J]. *Cosmetics*, 2023, 10(4): 111.
- [22] ZHAO W, YANG A Q, WANG J, et al. Potential application of natural bioactive compounds as skin-whitening agents: a review[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022, 21(12): 6669-6687.
- [23] SURYANINGTYAS I T, JE J Y. Bioactive peptides from food proteins as potential anti-obesity agents: mechanisms of action and future perspectives[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 138: 141-152.
- [24] KUMAR M S. Peptides and peptidomimetics as potential antiobesity agents: overview of current status[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6: 11.
- [25] MUTTENTHALER M, KING G F, ADAMS D J, et al. Trends in peptide drug discovery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(4): 309-325.
- [26] MERRIFIELD R B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1963, 85(14): 2149-2154.
- [27] ABDILDINOVA D A, KURTH P M J, GONG P Y. Solid-phase synthesis of peptidomimetics with peptide backbone modifications[J]. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2021, 10(9): 2300-2317.
- [28] ZHANG R F, YAN H, WANG X J, et al. Screening of a short chain antimicrobial peptide - FWKFK and its application in wound healing[J]. *Biomaterials Science*, 2023, 11(5): 1867-1875.
- [29] SABANA I, NAUFAL M, WIANI I, et al. Synthesis of antioxidant peptide SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) [J]. *Egyptian Journal of Chemistry*, 2020, 63(3): 921-926.
- [30] BAHARLOUI M, MIRSHOKRAEE S A, MONFARED A, et al. Design and synthesis of novel triazole-based peptide analogues as anticancer agents[J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2019, 18(3): 1299-1308.
- [31] WALEWSKA A, KOSIKOWSKA-ADAMUS P, TOMCZYKOWSKA M, et al. Improving fmoc solid phase synthesis of human beta defensin 3[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12562.
- [32] COLLINS J M, SINGH S K, WHITE T A, et al. Total wash elimination for solid phase peptide synthesis[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 8168.
- [33] BARREDO-VACCHELLI G R, RODRÍGUEZ J A, ELOY J A, et al. A novel method for liraglutide synthesis and purification [J]. *Peptide Science*, 2024, 116(5): e24351.
- [34] CHRISTOU G A, KATSIKI N, BLUNDELL J, et al. Semaglutide as a promising antiobesity drug[J]. *Obesity Reviews*, 2019, 20(6): 805-815.
- [35] PENG D Z, LI Y, SI L L, et al. A two-step method preparation of semaglutide through solid-phase synthesis and inclusion body expression[J]. *Protein Expression and Purification*, 2024, 219: 106477.
- [36] ANDRAOS J, MUHAR H, SMITH S R. Beyond glycemia: comparing tirzepatide to GLP-1 analogues[J]. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2023, 24(6): 1089-1101.
- [37] FREDERICK M O, BOYSE R A, BRADEN T M, et al. Kilogram-scale GMP manufacture of tirzepatide using a hybrid SPPS/LPPS approach with continuous manufacturing[J]. *Organic Process Research & Development*, 2021, 25(7): 1628-1636.
- [38] ROSENSTOCK J, FRIAS J, JASTREBOFF A M, et al. Retatrutide, a GIP, GLP-1 and glucagon receptor agonist, for

- people with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo and active-controlled, parallel-group, phase 2 trial conducted in the USA[J]. *The Lancet*, 2023, 402(10401): 529-544.
- [39] KENT S B H. Chemical synthesis of peptides and proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1988, 57: 957-989.
- [40] DAWSON P E, MUIR T W, CLARK-LEWIS I, et al. Synthesis of proteins by native chemical ligation[J]. *Science*, 1994, 266 (5186): 776-779.
- [41] TYMECKA D, MISICKA A. Solution phase peptide synthesis: the case of biphalin[M/OL]//HUSSEIN W M, SKWARCZYNSKI M, TOTH I. Peptide synthesis: peptide synthesis. New York, NY: Springer US, 2020: 1-11[2024-10-15]. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0227-0_1.
- [42] GU X T, CHEN W J, GUO T, et al. A novel synthetic method for backbone-cyclized polypeptide POL7080 with the help of hydrophobic-support materials[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2024, 22(1): 85-89.
- [43] LI H D, WANG L J, ZHANG L Y, et al. Scalable preparation of green C-terminal amidation peptide-synthesis TAGs and the optimized TAG-assisted liquid-phase synthesis of eptifibatid [J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2024, 41: 101684.
- [44] 蔡木易. 食源性低聚肽[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2021. CAI M Y. Food-derived oligopeptides[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2021.
- [45] GU Y C, WU J P. LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141 (3): 2682-2690.
- [46] SORNWATANA T, BANGPHOOMI K, ROYTRAKUL S, et al. Chebulin: *Terminalia chebula* Retz. fruit-derived peptide with angiotensin- I -converting enzyme inhibitory activity[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(6): 746-753.
- [47] WANG X M, CHEN H X, FU X G, et al. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study[J]. *LWT*, 2017, 75: 93-99.
- [48] BABJI A S, DAUD N A, HUSAIN S G. Effect of molecular weight reduction of polypeptides on angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in chicken skin hydrolysate (collagen)[J]. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 2014, 3(2): 81-86.
- [49] RASLI H I, SARBON N M. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions and characterization of Shortfin scad (*Decapterus Macrosoma*) skin gelatin hydrolysate using response surface methodology[J]. *International Food Research Journal*, 2018, 25(4): 1541-1549.
- [50] ZENG W C, ZHANG W H, HE Q, et al. Purification and characterization of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(6): 948-954.
- [51] TAKAHASHI Y, KAMATA A, KONISHI T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from salmon milt and their effects on postprandial blood glucose level[J]. *Fisheries Science*, 2021, 87(4): 619-626.
- [52] HENAUX L, PEREIRA K D, THIBODEAU J, et al. Glucoregulatory and anti-inflammatory activities of peptide fractions separated by electro dialysis with ultrafiltration membranes from salmon protein hydrolysate and identification of four novel glucoregulatory peptides[J]. *Membranes*, 2021, 11(7): 528.
- [53] CAI B N, WAN P, CHEN H, et al. Purification and identification of novel myeloperoxidase inhibitory antioxidant peptides from tuna (*Thunnus albacares*) protein hydrolysates [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2681.
- [54] SINGH A, UTOMO PUTRI G A, MITTAL A, et al. Protein hydrolysate from splendid squid (*Loligo formosana*) fins: antioxidant, functional properties, and flavoring profile[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2022, 22 (6): TRJFAS21005.
- [55] KANNAN A, HETTIARACHCHY N S, MARSHALL M, et al. Shrimp shell peptide hydrolysates inhibit human cancer cell proliferation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(10): 1920-1924.
- [56] DE LA FUENTE B, PALLARÉS N, BERRADA H, et al. Salmon (*Salmo salar*) side streams as a bioresource to obtain potential antioxidant peptides after applying pressurized liquid extraction (PLE)[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(6): 323.
- [57] WANG B, LI L, CHI C F, et al. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1713-1719.
- [58] KIM E K, KIM Y S, HWANG J W, et al. Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1416-1420.
- [59] CHEN X L, PENG M, LI J, et al. Preparation and functional evaluation of collagen oligopeptide-rich hydrolysate from fish skin with the serine collagenolytic protease from *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 15716.
- [60] HERBEL V, SCHÄFER H, WINK M. Recombinant production of snak-in-2 (an antimicrobial peptide from tomato) in *E. coli* and analysis of its bioactivity[J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 14889-14901.
- [61] WU Y Y, MA Y K, LI L H, et al. Preparation and antioxidant activities *in vitro* of a designed antioxidant peptide from

- Pinctada fucata* by recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(1): 1-11.
- [62] MOMEN A H, HARZANDI N, HADDADI A, et al. Implementation of a novel self-induced promoter for the expression of pharmaceutical peptides in *Escherichia coli*: YY₍₃₋₃₆₎ peptide[J]. Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 2020, 41(1): 20180056.
- [63] RAUNIYAR K, AKHONDZADEH S, GAÇIARZ A, et al. Bioactive VEGF-C from *E. coli*[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 18157.
- [64] XIE H L, LI J, LI L, et al. Enhanced proliferation and differentiation of neural stem cells grown on PHA films coated with recombinant fusion proteins[J]. Acta Biomaterialia, 2013, 9(8): 7845-7854.
- [65] 曹艳萍, 单安山, 马清泉, 等. 多拷贝策略在小肽表达中的应用[J]. 生物工程学报, 2011, 27(5): 684-689.
CAO Y P, SHAN A S, MA Q Q, et al. Application of multi-copies in expression of smaller peptides: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(5): 684-689.
- [66] 黄欣媛, 邹礼平, 范红波. 豆类活性肽 PA1b 在大肠杆菌中的多拷贝串联表达[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(15): 57-62.
HUANG X Y, ZOU L P, FAN H B. Prokaryotic expression of multicopies of legume peptide PA1b in *Escherichia coli*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(15): 57-62.
- [67] ZHANG J X, MOVAHEDI A, WEI Z H, et al. High-level SUMO-mediated fusion expression of ABP-dHC-cecropin A from multiple joined genes in *Escherichia coli*[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 509: 15-23.
- [68] 陈清, 曾鑫, 彭永亮, 等. 重组串联融合蛋白制备目标多肽的方法: ZL201910563692.3[P]. 2022-05-13.
CHEN Q, ZENG X, PENG Y L, et al. Method for preparing target polypeptide by recombinant tandem fusion protein ZL201910563692.3[P]. 2022-05-13.
- [69] ZHANG L C, WEI D D, ZHAN N, et al. Heterologous expression of the novel α -helical hybrid peptide PR-FO in *Bacillus subtilis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(9): 1619-1627.
- [70] CHEN M L, LIN N F, LIU X D, et al. A novel antimicrobial peptide screened by a *Bacillus subtilis* expression system, derived from *Larimichthys crocea* Ferritin H, exerting bactericidal and parasitocidal activities[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1168517.
- [71] SUN W F, WU Y M, DING W W, et al. An auto-inducible expression and high cell density fermentation of Beefy Meaty Peptide with *Bacillus subtilis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(4): 701-710.
- [72] FU G, YUE J, LI D D, et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(11): e2119980119.
- [73] LU Z H, YANG S H, YUAN X, et al. CRISPR-assisted multi-dimensional regulation for fine-tuning gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(7): e40.
- [74] ZHU X Y, LUO H, YU X R, et al. Genome-wide CRISPRi screening of key genes for recombinant protein expression in *Bacillus subtilis*[J]. Advanced Science, 2024, 11(33): 2404313.
- [75] ILGEN C, LIN-CEREGHINO J, CREGG J M. *Pichia pastoris* [M/OL]//GELLISSEN G. Production of recombinant proteins. 1st ed. New York: Wiley, 2004: 143-162[2024-08-08]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527603670.ch7>.
- [76] KARBALAEI M, REZAEE S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [77] CAO X T, ZHANG Y, MAO R Y, et al. Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2649-2662.
- [78] ZHANG K, YANG N, TENG D, et al. Expression and characterization of the new antimicrobial peptide AP138L-arg26 anti *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 111.
- [79] CAO J C, DE LA FUENTE-NUNEZ C, OU R W, et al. Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(3): 896-902.
- [80] LI X H, FAN Y, LIN Q, et al. Expression of chromogranin A-derived antifungal peptide CGA-N12 in *Pichia pastoris*[J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 318-327.
- [81] RENYE J A JR, SOMKUTI G A. Nisin-induced expression of a recombinant antihypertensive peptide in dairy lactic acid bacteria[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(7): 1447-1454.
- [82] HUYNH E, LI J L. Generation of *Lactococcus lactis* capable of coexpressing epidermal growth factor and trefoil factor to enhance *in vitro* wound healing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(11): 4667-4677.
- [83] NONGONIERMA A B, O'KEEFFE M B, FITZGERALD R J. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides[M/OL]//MCSWEENEY P L H, O'MAHONY J A. Advanced dairy chemistry: volume 1B: proteins: applied aspects. New York, NY: Springer New York, 2016: 417-482[2024-08-10]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_15.
- [84] LIAO W, JAHANDIDEH F, FAN H B, et al. Egg protein-derived bioactive peptides: preparation, efficacy, and absorption[M/OL]//Advances in food and nutrition research. New York: Elsevier, 2018, 85: 1-58[2024-08-10]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452618300068>.

- [85] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [86] FLING M, HOROWITZ N H, HEINEMANN S F. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238(6): 2045-2053.
- [87] SUN Y J, SHUKLA G S, WEAVER D, et al. Phage-display selection on tumor histological specimens with laser capture microdissection[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2009, 347(1-2): 46-53.
- [88] YANG M, LIU C W, NIU M C, et al. Phage-display library biopanning and bioinformatic analysis yielded a high-affinity peptide to inflamed vascular endothelium both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 174: 72-80.
- [89] GUAN M Q, WANG J, YANG L B, et al. Targeting osteosarcoma vasculature with peptide obtained by phage display[J]. *Contemporary Oncology/ Współczesna Onkologia*, 2014, 18(3): 165-170.
- [90] ZHOU C, KANG J L, WANG X X, et al. Phage display screening identifies a novel peptide to suppress ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* in mouse models[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 889.
- [91] WENG X J, LIAO Q D, LI K H, et al. Screening serum biomarker of knee osteoarthritis using a phage display technique[J]. *Clinical Biochemistry*, 2012, 45(4-5): 303-308.
- [92] YIN L, LUO Y Z, LIANG B, et al. Specific ligands for classical swine fever virus screened from landscape phage display library[J]. *Antiviral Research*, 2014, 109: 68-71.
- [93] LIU Z P, LIU J F, WANG K, et al. Selection of phage-displayed peptides for the detection of imidacloprid in water and soil[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 485: 28-33.
- [94] CHEN Y P, SHEN Y Y, GUO X, et al. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified *via* phage display[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(4): 455-460.
- [95] DUERR D M, WHITE S J, SCHLUESENER H J. Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 116(2): 177-180.
- [96] PASQUALINI R, RUOSLAHTI E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries[J]. *Nature*, 1996, 380(6572): 364-366.
- [97] ZHANG X C, ZHANG X Y, GAO H L, et al. Phage display derived peptides for Alzheimer's disease therapy and diagnosis [J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2041-2062.
- [98] MANAVALAN B, BASITH S, SHIN T H, et al. MLACP: machine-learning-based prediction of anticancer peptides[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77121-77136.
- [99] GUPTA S, SHARMA A K, SHASTRI V, et al. Prediction of anti-inflammatory proteins/peptides: an *in silico* approach[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2017, 15(1): 7.
- [100] ILYAS S, LEE J, HWANG Y, et al. Deciphering Cathepsin K inhibitors: a combined QSAR, docking and MD simulation based machine learning approaches for drug design[J]. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 2024, 35(9): 771-793.
- [101] GULL S, SHAMIM N, MINHAS F. AMAP: hierarchical multi-label prediction of biologically active and antimicrobial peptides[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2019, 107: 172-181.
- [102] CHO C Y, LEE S S, BANG D M, et al. ChemAP: predicting drug approval with chemical structures before clinical trial phase by leveraging multi-modal embedding space and knowledge distillation[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 23010.
- [103] GIGUÈRE S, LAVIOLETTE F, MARCHAND M, et al. Machine learning assisted design of highly active peptides for drug discovery[J]. *PLoS Computational Biology*, 2015, 11(4): e1004074.
- [104] JOO S H, PEI D H. Synthesis and screening of support-bound combinatorial peptide libraries with free C-termini: determination of the sequence specificity of PDZ domains[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(9): 3061-3072.
- [105] FANG C, MORIWAKI Y, LI C H, et al. Prediction of antifungal peptides by deep learning with character embedding [J]. *IPSI Transactions on Bioinformatics*, 2019, 12: 21-29.
- [106] AGRAWAL P, BHALLA S, CHAUDHARY K, et al. *In silico* approach for prediction of antifungal peptides[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 323.
- [107] BJERRUM E J, SATTAROV B. Improving chemical autoencoder latent space and molecular *de novo* generation diversity with heteroencoders[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 131.
- [108] CAO D S, LIU S, XU Q S, et al. Large-scale prediction of drug-target interactions using protein sequences and drug topological structures[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 752: 1-10.
- [109] KAO P Y, YANG Y C, CHIANG W Y, et al. Exploring the advantages of quantum generative adversarial networks in generative chemistry[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2023, 63(11): 3307-3318.
- [110] MÜLLER A T, HISS J A, SCHNEIDER G. Recurrent neural network model for constructive peptide design[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2018, 58(2): 472-479.
- [111] MA Y, GUO Z Y, XIA B B, et al. Identification of antimicrobial peptides from the human gut microbiome using deep learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 921-931.
- [112] KHABBAZ H, KARIMI-JAFARI M H, SABOURY A A, et al. Prediction of antimicrobial peptides toxicity based on their physico-chemical properties using machine learning techniques

- [J]. *BMC Bioinformatics*, 2021, 22(1): 549.
- [113] XIAO X, WANG P, LIN W Z, et al. iAMP-2L: a two-level multi-label classifier for identifying antimicrobial peptides and their functional types[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 436(2): 168-177.
- [114] WEI L Y, ZHOU C, CHEN H R, et al. ACPred-FL: a sequence-based predictor using effective feature representation to improve the prediction of anti-cancer peptides[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(23): 4007-4016.
- [115] 丁明珠, 李炳志, 王颖, 等. 合成生物学重要研究方向进展[J]. *合成生物学*, 2020, 1(1): 7-28.
DING M Z, LI B Z, WANG Y, et al. Significant research progress in synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(1): 7-28.
- [116] KOWALCZYK R, HARRIS P W R, WILLIAMS G M, et al. Peptide lipidation-a synthetic strategy to afford peptide based therapeutics[M/OL]. *Advances in experimental medicine and biology: peptides and peptide-based biomaterials and their biomedical applications*. Cham: Springer, 2017, 1030: 185-227. (2017-10-29)[2024-08-01]. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66095-0_9.
- [117] GU S P. Applying machine learning algorithms for the analysis of biological sequences and medical records[D/OL]. *Electronic Theses and Dissertations*. Brookings: South Dakota State University, 2019, 3666[2024-08-01]. <https://openprairie.sdstate.edu/etd/3666>.
- [118] TRIPATHI N M, BANDYOPADHYAY A. High throughput virtual screening (HTVS) of peptide library: technological advancement in ligand discovery[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 243: 114766.
- [119] DANG Y, GUAN J J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy[J]. *Smart Materials in Medicine*, 2020, 1: 10-19.



第一作者及通讯作者：汤传根（1985—），男，博士研究生，工程师。研究方向为重组多肽/蛋白药物、合成多肽药物、功能肽研究、合成生物学产业化应用。

E-mail: rootyt@hanxinpharm.com