

Сергей Леонидович Тихонов^{1✉}, Наталья Валерьевна Тихонова²

^{1,2}Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

¹Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия

¹tihonov75@bk.ru

²tihonov75@bk.ru

ОБЕСПЕЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТЕОЛИЗУ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

Цель исследования – обеспечение стабильности рекомбинантного белка GDF-11 путем разработки циклизированной пептидной последовательности, устойчивой к протеолизу, с последующим синтезом плазмиды, кодирующей эту последовательность для экспрессии в *E. coli*. Объект исследования – рекомбинантный белок CDF-11 суперсемейства белков TGF-β. Для обеспечения устойчивости к протеолизу и биодоступности белка GDF-11 проведена циклизация последовательности NLCLDCDEHS белка путем присоединения двух остатков цистеина с получением последовательности NCLCLDCDEHCS. Пептидная последовательность NCLCLDCDEHCS имеет следующие физико-химические характеристики: два остатка лейцина и четыре цистеина (гидрофобные аминокислоты), один остаток глутаминовой кислоты и два остатка аспаргиновой кислоты (отрицательно заряженные), а также один гистидин (положительно заряженный). Гидрофобность составляет 50 %, общий отрицательный заряд равен 2,75, гидрофобность по Уимли-Уайту – 3,12 ед. Молекулярная масса пептида составляет 1354,532 Да, потенциал связывания с белком (индекс Бомана) – 1,99 ккал/моль. В результате прогнозирования свойств пептидной последовательности установлено, что она имеет оптимальную липофильность и гидрофобность, характеризуется хорошей растворимостью, всасываемостью, проникновением через мембраны клеток, находится в несвязанном состоянии в плазме, имеет низкий плазменный клиренс, длительный период полувыведения, что свидетельствует о ее эффективности и высокой клинической эффективности при пероральном применении и, следовательно, устойчива к протеолизу. Создана плазида, которая кодирует последовательность NCLCLDCDEHCS в белке GDF-11. Для последующего получения устойчивого к протеолизу белка GDF-11 необходимо будет встроить созданную плазмиду в *E. Coli*, метаболитом которой будет вышеуказанный белок, чему и будут посвящены дальнейшие исследования.

Ключевые слова: белок GDF-11, пептиды, плазмиды, период полувыведения, плазменный клиренс, протеолиз, биодоступность

Для цитирования: Тихонов С.Л., Тихонова Н.В. Обеспечение устойчивости к протеолизу рекомбинантного белка // Вестник КрасГАУ. 2025. № 6. С. 291–303. DOI: 10.36718/1819-4036-2025-6-291-303.

Sergey Leonidovich Tikhonov^{1✉}, Natalia Valerievna Tikhonova²

^{1,2}Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia

¹Ural State Forest Engineering University, Yekaterinburg, Russia

¹tihonov75@bk.ru

²tihonov75@bk.ru

ENSURING RESISTANCE TO PROTEOLYSIS OF RECOMBINANT PROTEIN

The aim of the study is to ensure the stability of the recombinant GDF-11 protein by developing a cyclized peptide sequence resistant to proteolysis, with subsequent synthesis of a plasmid encoding this sequence for expression in *E. coli*. The object of the study is the recombinant CDF-11 protein of the TGF-β

protein superfamily. To ensure resistance to proteolysis and bioavailability of the GDF-11 protein, cyclization of the NLCLDCDEHS sequence of the protein was carried out by attaching two cysteine residues to obtain the NCLCLDCDEHCS sequence. The peptide sequence NCLCLDCDEHCS has the following physicochemical characteristics: two leucine residues and four cysteines (hydrophobic amino acids), one glutamic acid residue and two aspartic acid residues (negatively charged), and one histidine (positively charged). Hydrophobicity is 50 %, the total negative charge is 2.75, Wimley-White hydrophobicity is 3.12 units. The molecular weight of the peptide is 1354.532 Da, the protein binding potential (Boman index) is 1.99 kcal/mol. As a result of predicting the properties of the peptide sequence, it was found that it has optimal lipophilicity and hydrophobicity, is characterized by good solubility, absorption, penetration through cell membranes, is in an unbound state in plasma, has low plasma clearance, a long half-life, which indicates its effectiveness and high clinical efficacy when administered orally and, therefore, is resistant to proteolysis. A plasmid was created that encodes the NCLCLDCDEHCS sequence in the GDF-11 protein. For the subsequent production of proteolysis-resistant GDF-11 protein, it will be necessary to insert the created plasmid into *E. Coli*, the metabolite of which will be the above-mentioned protein, which will be the subject of further research.

Keywords: GDF-11 protein, peptides, plasmids, half-life, plasma clearance, proteolysis, bioavailability

For citation: Tikhonov SL, Tikhonova NV. Ensuring resistance to proteolysis of recombinant protein. *Bulletin of KSAU*. 2025;(6):291-303. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2025-6-291-303.

Введение. При создании и последующем использовании рекомбинантных белков остается ряд нерешенных проблем, в частности низкая стабильность в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), образование агрегатов, короткий период полувыведения, плохая растворимость и биодоступность, а также другие. Для решения вышеуказанных проблем рекомбинантные белки необходимо модифицировать, это возможно путем физического или химического взаимодействия между полиэтиленгликолем (ПЭГ) и биоактивными молекулами, в частности ПЭГ-инированием, нанокапсулированием, коэкспрессией, применением липосом и молекулярной пептидной трансплантации [1–3].

В частности, капсулирование сывороточного альбумина крупного рогатого скота (КРС) в нанокапсулы из молочно-гликолевой кислоты размером 200 нм позволило увеличить его период полувыведения с 13,6 минут до 4,5 часов [4].

Исследования подтверждают, что такие подходы, как инкапсуляция белков в микрочастицы, химическая модификация с помощью гидрофильных полимеров, а также методы рекомбинантной белковой инженерии, способствуют повышению терапевтической эффективности белковых соединений. Одним из методов стабилизации белков является внедрение ферментов в нанометровые везикулы [5]. Этот способ позволяет защитить ферменты от разрушения, связанного с эффектом разбавления, а также от воздействия внешних факторов, включая протеазы [6]. Помимо стабилизирующего эффекта,

данный метод инкапсуляции ферментов находит применение в биотехнологии, обеспечивая возможности для управления их специфичностью и направленной доставки молекул при лечении злокачественных новообразований.

Согласно исследованиям авторов [3], процесс конъюгации ПЭГ с белками не приводит к изменению их структуры, что подтверждает актуальность и значимость ПЭГ-гилирования для различных сфер науки, включая фармацевтическую и пищевую промышленность. Существует ряд исследований, демонстрирующих успешное применение ПЭГ-модификации. Например, благодаря этому методу удалось увеличить период полувыведения бычьего сывороточного альбумина (БСА) с 13,6 мин до 4,5 ч по сравнению с не-ПЭГ-модифицированными наночастицами. Этот эффект был достигнут за счет использования ПЭГ-модификации наночастиц полимолочной-гликолевой кислоты (PLGA), содержащих инкапсулированный БСА (размер наночастиц – 200 нм, эффективность инкапсуляции – 48,6 %).

В исследованиях [7] продемонстрирована эффективность ПЭГ в отношении конформационной стабильности белков. Вычислительное моделирование показало эффективность процесса ПЭГ-гилирования в обеспечении конформационной стабильности белков. В широком смысле стабильность белка включает устойчивость к протеазам, термическую, термодинамическую, химическую и структурную стабильность [8]. Таким образом, модификация белков, нап-

пример их ПЭГ-гилирование, является предпочтительным методом повышения стабильности, поскольку позволяет сохранять вторичную структуру белка независимо от конформации ПЭГ-цепи [9-10].

Конъюгация BSA с ПЭГ продемонстрировала повышение протеолитической, термической стабильности, а также устойчивости к изменениям pH. Проведенное исследование внесло вклад в дальнейшее понимание влияния различных форм ПЭГ-гилирования (линейная, разветвленная, циклическая структура белков) на стабильность и конформацию белков. Кроме того, результаты экспериментов показали увеличение периода полураспада и общей стабильности [11].

Для оценки эффективности ПЭГ-конъюгации в повышении конформационной стабильности инсулина применялось молекулярно-динамическое моделирование с использованием ПЭГ-молекул различного размера. ПЭГ-молекулы, состоящие из 10–200 звеньев этиленоксида, были соединены с инсулином через амидную связь с ϵ -аминогруппой LysB29. После конъюгации наблюдалось значительное уменьшение площади поверхности, доступной для растворителя (SASA), при этом вторичная структура инсулина оставалась неизменной. Дополнительно было установлено, что взаимодействия между ПЭГ и белком, включая водородные связи и гидрофобные эффекты, способствовали удалению воды с поверхности инсулина. Эти изменения зависели от длины ПЭГ-цепи, однако при молекулярной массе ПЭГ свыше 4000 Да дальнейших изменений не происходило [12].

Ранее проведенное исследование показало, что ПЭГ с четырьмя звеньями и более длинными цепями ускоряет сворачивание и замедляет разворачивание белка WW, тогда как более короткие цепи снижают его стабильность [10]. Домен WW человеческого белка Pin1 часто используется как модель из-за его хорошо изученных энергетических состояний, позволяющих модификацию аминокислот. В исследовании ПЭГ из четырех звеньев этиленоксида присоединили к 19-му положению боковой цепи аспарагина в WW-доме. D-аспарагин стабилизировал ПЭГ, однако не влиял на конформационную стабильность белка. Это может свидетельствовать о специфических взаимодействиях ПЭГ с белком при L-аспарагине, но не при D-аспарагине [13]. Метод ПЭГ-ирования аспара-

гина в области обратного поворота значительно повысил стабильность белка, ускоряя сворачивание и замедляя разворачивание. При этом ПЭГ защищает белок от протеолиза вне зависимости от длины цепи. Хотя механизм влияния ПЭГ-ОН-взаимодействий на термодинамическую стабильность пока неясен, предполагается, что близлежащие ОН-группы влияют на молекулы воды вокруг белка, увеличивая их дезорганизацию и стабилизируя энтропию. P.B. Lawrence et al. [9] также доказали, что на конформационную и протеолитическую стабильность WW влияют как 45-звенный, так и 4-звенный ПЭГ. Самое главное, что метод, основанный на структуре, может точно предсказать ПЭГ-гилирование домена Src SH3, расположенного в бета-листе белка, и повысить конформационную стабильность [9].

Молекулярная масса ПЭГ эффективно снижает аутолиз и значительно повышает стабильность химотрипсина. Для улучшения его pH- и термической устойчивости фермент конъюгировали с ПЭГ-поли(сульфобетаин-метилакриламидом)-блок-поли(N-изопропилакриламидом) (pSBAm-блок-pNIPAM) массой 232, 354, и 553 кДа. После инкубации при 37 °C в течение 8 часов конъюгаты сохраняли стабильность, тогда как нативный химотрипсин терял половину активности. В условиях 167 mM HCl нативный фермент утратил 50 % активности за 30 мин и полностью дестабилизировался через 2 ч, тогда как конъюгаты сохранили 60 % активности [13, 14]. Позиционное сопряжение WW в положении 23 с азидо-функционализированным четырехкомпонентным ПЭГ к остатку пропаргил-оксифенилаланина, который обычно занимает тирозин, привело к повышению конформационной стабильности ПЭГ-гилированного белка. ПЭГ может потенциально повысить прочность соседнего солевого мостика, однако его эффективность не признана повсеместно. Структурные особенности, которые лежат в основе этого эффекта, не ограничиваются простой функцией вторичной структуры, ориентацией и расстоянием между ПЭГ-гилированным участком и солевым мостиком, а также идентичностью остатков солевого мостика [15].

Одним из направлений обеспечения устойчивости к протеолизу рекомбинантных белков является их циклизация за счет дисульфидных связей между остатками цистеина. Остатки цис-

теина обычно расположены внутри белковой структуры с низкой частотой, что делает их привлекательными целями для модификации и ограничивает доступность для химических реагентов. Поскольку цистеин является редким в природе, его часто вводят с помощью генной инженерии. Для модификации белков с N-концевым цистеином применяется химическая лиганда (NCL) [1].

В ходе этого процесса сначала обратимо образуется промежуточное тиоэфирное соединение, за которым следует самопроизвольное превращение S-в-N-ацил, завершающееся образованием амидной связи [16]. Этот метод был использован для ПЭГ-ирования Су34, не содержащего молекул HSA, с помощью ПЭГ-малеимида для сульфгидрильных (-SH) групп белка (высокая специфичность) [10]. Cooper C.E. et al. показали, что белки, обработанные моносальфоновым ПЭГ, сохраняют значительно более высокую степень конъюгации [17]. Dozier J.K. and Distefano M.D. использовали этот метод, ПЭГилируя L-лактат-оксидазу, которая сохраняла активность после ПЭГилирования. Они модифицировали остаток серина, так как считалось, что он более восприимчив к малеимидному ПЭГ, и результаты показали снижение активности на 30 %. В то же время ПЭГилированный и немодифицированный мутант продемонстрировал снижение устойчивости к ферментативной активности примерно в 2,5 раза по сравнению с диким типом [18].

Кокспрессия – еще одна стратегия, используемая для повышения стабильности, растворимости и биологической активности белков.

Использование шаперонных систем, таких как GroEL-GroES и DnaK-DnaJ-GrpE, или коэкспрессия белков с триггерными факторами, улучшает растворимость белков. Шапероны способствуют увеличению растворимости белков-мишеней, а системы коэкспрессии часто оказывают положительное влияние на растворимость. Например, в *E. coli* растворимость гена 23 бактериофага T4 (основного капсидного белка) повышается при коэкспрессии с продуктом гена 31 (фагового ко-шаперонина gp31) [19]. Также растворимость, выход и фолдинг белков могут быть улучшены с помощью слияния с партнерами или метками [3].

Аффинные метки традиционно используются для очистки рекомбинантных белков, увеличивая их выход, предотвращая протеолиз и улучшая растворимость. Партнеры по слиянию, такие как мальтоза-связывающий белок (MBP) и модификатор, родственник убиквитину (SUMO), могут перемещать белки из цитозоля в мембрану или ядро, защищая их от разрушения [20–21].

В последние годы среди рекомбинантных белков особое внимание уделяют двум высокоомологичным белкам TGF- β – фактор дифференцировки роста 11 (GDF11) и GDF8 (также известный как миостатин/MSTN), которые вызвали значительный интерес благодаря доказательствам их роли в процессах старения и регенерации [22–24].

Из-за 89-процентного сходства аминокислотных последовательностей в их C-концевых сигнальных доменах GDF11 и GDF8 рассматривались как выполняющие дублирующие функции *in vivo* (рис. 1, А) [25].

Однако все больше данных свидетельствует о том, что GDF11 и GDF8 обладают разной активностью и выполняют разные пространственно-временные функции *in vivo*. Являясь представителями подкласса актинов TGF- β , GDF8 и GDF11 передают сигнал через рецепторы I типа ALK4, ALK5 и ALK7 [26]. На молекулярном уровне они синтезируются как предшественники, которые остаются в неактивном, латентном комплексе до тех пор, пока протеаза, подобная Tolloid (TLD), не расщепляет продомен лиганда, освобождая зрелый домен от ингибирования [27]. Зрелый GDF11 и зрелый GDF8 состоят из двух мономеров, соединенных дисульфидными связями в гомодимер пропеллерообразной формы (рис. 1, В), который образует симметричные вогнутые и выпуклые поверхности, используемые для связывания с рецепторами [28]. Для передачи сигнала лиганды образуют комбинацию из двух рецепторов-киназ II типа и двух рецепторов-киназ I типа, которые имеют один внеклеточный лиганд-связывающий домен. Образование этого комплекса позволяет рецептору II типа фосфорилировать рецептор I типа, что инициирует сигнальный каскад SMAD [29].

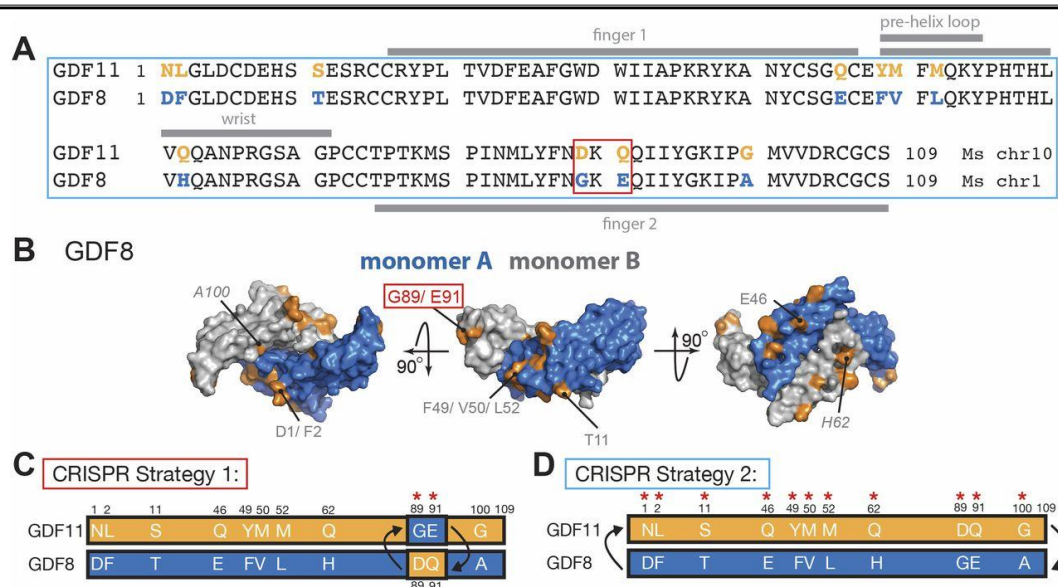


Рис. 1. Различия в последовательностях GDF11 и GDF8 и стратегия CRISPR/Cas9 для замены аминокислотных остатков в зрелых доменах GDF11 и GDF8. А – уникальные аминокислотные остатки Gdf11 выделены оранжевым цветом, а GDF8 – уникальные остатки – выделены синим цветом. В – выделено место на поверхности GDF8 (мономер А – синим, мономер В – серым), где расположены уникальные аминокислотные остатки GDF8, выделенные оранжевым цветом, а G89 и E91 – красным. С – схема стратегий CRISPR/Cas9 для изменения остатков в GDF11 и GDF8. В стратегии 1 аминокислотные остатки D89 и Q91 в GDF11 заменяются аналогичными аминокислотными остатками G89 и E91 из GDF8, а аминокислотные остатки G89 и E91 в GDF8 заменяются аналогичными остатками D89 и Q91 из GDF11. D – стратегии 2 полный зрелый домен GDF8 заменяется полным зрелым доменом GDF11. Аминокислотные остатки GDF11 показаны оранжевым цветом, а GDF8 – синим [25]

The differences in the sequences of GDF11 and GDF8 and the CRISPR/Cas9 strategy for replacing amino acid residues in the mature domains of GDF11 and GDF8. A – the unique amino acid residues of Gdf11 are highlighted in orange, and GDF8 – the unique residues are highlighted in blue. B – a place on the surface of GDF8 is highlighted (monomer A in blue, monomer B in gray), where the unique amino acid residues of GDF8 are located, highlighted in orange, and G89 and E91 in red. C is a diagram of CRISPR/Cas9 strategies for modifying residues in GDF11 and GDF8. In strategy 1, amino acid residues D89 and Q91 in GDF11 are replaced by similar amino acid residues G89 and E91 from GDF8, and amino acid residues G89 and E91 in GDF8 are replaced by similar residues D89 and Q91 from GDF11. D – strategy 2, the complete mature domain of GDF8 is replaced by the complete mature domain of GDF11.

The amino acid residues of GDF11 are shown in orange, and GDF8 in blue [25]

Цель исследования – обеспечение стабильности рекомбинантного белка GDF-11 путем разработки циклизированной пептидной последовательности, устойчивой к протеолизу, с последующим синтезом плазмиды, кодирующей эту последовательность для экспрессии в *E. coli*.

Объекты и методы. В качестве объекта исследований был использован рекомбинантный белок CDF-11 суперсемейства белков TGF- β , которое хорошо известно тем, что регулирует эмбриональное развитие, заживление ран и поддержание тканей во взрослом возрасте. В состав белка CDF-11 входит пептидная пос-

ледовательность NLCLDCDEHS, которая и была циклизирована. Также в качестве объекта исследований была использована плазида, кодирующая вышеуказанную последовательность. Прогнозирование свойств новой пептидной последовательности проводили с помощью сервера ADMETlab 3.0, нового компьютерного инструмента в биотехнологии для разработки биологически активных соединений.

Плазмиды были синтезированы в ООО «Евроген» (Москва) методом циклической сборки из олигонуклеотидов (PCA, polymerase cycling assembly). ДНК-олигонуклеотиды синтезировались на Applied Biosystems ABI 3900 (США), пос-

ле чего были обессолены и лиофилизированы. Затем с помощью ДНК-полимеразы были построены цепи, заполняющие промежутки между олигонуклеотидами. На последнем этапе ген амплифицировался с помощью стандартной ПЦР. Последовательности, кодирующие белок GDF-11, после амплификации обрабатывались эндонуклеазами рестрикции BamHI и XhoI и клонировались в вектор pET-25b (+) по сайтам этих ферментов. Секвенирование плазмид и ПЦР-фрагментов проводилось на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems (США).

Молекулярно-массовое распределение пептидной последовательности оценивали масс-спектрометрическим методом [30]. Идентификацию пептидной последовательности осуществляли методом MALDI-TOF MS Ultraflex (Bruker, Германия) [31].

Результаты и их обсуждение. Для обеспечения стабильности и биодоступности белка GDF-11 проведена циклизация пептидной последовательности NCLCLDCDEHS путем присоединения двух остатков цистеина с получением следующей последовательности NCLCLDCDEHCS. Этот способ циклизации называется «2C-СС сшиванием», что позволяет зафиксировать вторичную и третичную структуру белка, обеспечить его стабильность к протеолизу и повысить биодоступность [32]. Примером сшитых пептидов, используемых в медицинской практике, является циклотид [33], применяемый в качестве гормона роста [34]. Предложенное нами сшивание пептидных последовательностей белка укладывается в общую концепцию создания новых последовательностей аминокислотных остатков за счет сшивания остатков цистеина с функциональным линкером, рассмотренного в работе [35]. Введенные остатки цистеина в пептидную последовательность образуют связанные цистеины. Это и делает пептидную последовательность устойчивой к протеолизу и термической обработке, что может встречаться как у нативных белков, так и у рекомбинатных синтезированных [36].

Пептидная последовательность NCLCLDCDEHCS имеет следующие физико-химические характеристики: два остатка лейцина и четыре цистеина (гидрофобные аминокислоты), один остаток глутаминовой кислоты и два остатка аспаргиновой кислоты (отрицательно заряженные), а также один гистидин (положительно заряженный). Гидрофобность составляет 50 %, общий отрицательный заряд равен $-2,75$, гидрофоб-

ность по Уимли – Уайту – $3,12$ ед. Молекулярная масса пептида составляет $1354,532$ Да, а потенциал связывания с белком (индекс Бомана) – $1,99$ ккал/моль.

Спрогнозированы следующие показатели: липофильность ($\log P$), баланс между липофильностью и гидрофильностью ($\log D_{7,4}$), константа кислотно-щелочной диссоциации (pK_a), эффективность клинического применения (F_{sp^3}), показатель распределения и метаболизма в организме (VD_{ss}), плазменный клиренс (CL_{plasma}), период полувыведения ($T_{1/2}$). Липофильность отражает способность соединения растворяться как в октаноле, так и в воде. В белках липофильность влияет на физико-химические свойства, такие как абсорбция, распределение, метаболизм, элиминация и токсикология [37]. Высокая липофильность связана с повышенным риском токсических явлений, что доказано в исследованиях на лабораторных животных, проведенных авторами [38], в то время как низкая липофильность может ограничивать всасывание и метаболизм [37]. Оптимальная липофильность обеспечивает пептиду высокую клиническую эффективность [38]. Следовательно, точное предсказание липофильности потенциальных пептидов имеет решающее значение при разработке. Показатель $\log P$ отражает липофильность, оптимальное значение по этому показателю составляет от $-5,5$ до 4 ед., у большинства биологически активных пептидных последовательностей белков он находится в вышеуказанных пределах, в частности у исследуемой последовательности NCLCLDCDEHCS составляет $-1,307$ ед., что свидетельствует о высокой степени оказания терапевтического или профилактического эффекта.

Белок должен попасть не только в кровоток, но и достичь клеток-мишеней. Следовательно, новая пептидная последовательность NCLCLDCDEHCS должна поддерживать баланс между липофильностью и гидрофильностью, чтобы растворяться в биожидкостях организма и эффективно проникать через биомембрану клеток.

Авторы [38] установили, что коэффициент распределения n -октанола / воды при физиологических значениях pH ($\log D_{7,4}$) позволяет отличить агрегаторы от неагрегаторов. Кроме того, соединения с умеренными значениями $\log D_{7,4}$ демонстрируют оптимальные фармакокинетические профили и профили безопаснос-

ти, что приводит к повышению терапевтической эффективности [38]. В целом $\log D_{7,4}$ играет решающую роль в оценке липофильности по сравнению с обычно используемым значением $\log P$. По данным [39], $\log D_{7,4}$ является комплексным показателем липофильности и гидрофобности, который определяет абсорбцию, распределение, метаболизм, выведение и токсичность и, соответственно, прогнозирует функциональную пригодность пептидов. Поэтому важно оценить коэффициент распределения н-октанола/воды при физиологических значениях pH ($\log D_{7,4}$). Оптимальное значение $\log D_{7,4}$ для лекарственных веществ от $-0,5$ до 3 [40]. Показатели $\log P$ и $\log D_{7,4}$ использованы в качестве критериев липофильности и гидрофобности. Показатель $\log D_{7,4}$ у последовательности NCLCLDCDEHCS составляет $0,089$ ед.

Значение константы кислотно-щелочной диссоциации (pK_a) отражает степень кислотности и/или основности пептидов. Понимание значений pK_a пептида важно для прогнозирования его растворимости, всасывания, распределения и метаболизма в различных физиологических средах. Вещество характеризуется высокой всасываемостью, если pK_a (кислота) ниже базового. Известно, что pK_a (кислота) у пептидов с биологической активностью ниже базовых. У исследуемого пептида pK_a составляет $4,129$, что ниже базового на $37,4\%$.

Fsp3, количество sp3-гибридизированных атомов углерода/общее количество атомов углерода используется для определения насыщенности молекул углеродом и характеристики сложности пространственной структуры молекул. Доказано, что повышенная насыщенность, измеряемая с помощью Fsp3, и количество хиральных центров в молекуле повышают вероятность клинического успеха, что может быть связано с повышенной растворимостью или с тем фактом, что улучшенные трехмерные характеристики позволяют небольшим молекулам занимать больше места в мишени. Fsp³ более $0,42$ ед. указывает на успешность клинического применения пептида, что может быть связано с хорошей растворимостью [41].

Одним из основных механизмов поглощения и распределения лекарств является связывание с белками плазмы, поэтому связывание лекарства с белками плазмы оказывает сильное влияние на его фармакодинамику. Связывание с белками плазмы (PPB) может напрямую

влиять на биодоступность при пероральном приеме, поскольку в этом процессе на кону оказывается свободная концентрация лекарства, когда оно связывается с белками сыворотки. Считается, что соединение имеет надлежащий показатель PPB, если его прогнозируемое значение $< 90\%$. У исследуемой пептидной последовательности PPB составляет $4,651\%$, что свидетельствует о высокой эффективности клинического применения.

Объем распределения в равновесном состоянии (VD_{ss} , л/кг) – это фундаментальное фармакокинетическое (ФК) свойство лекарственных препаратов, которое показывает, насколько эффективно молекула препарата распределяется по организму. Наряду с клиренсом (CL) он определяет период полувыведения и, следовательно, интервал между приемами препарата. Соединение считается эффективным, если прогнозируемый VD_{ss} находится в диапазоне $0,04$ – 20 л/кг. У исследуемой последовательности VD_{ss} на уровне $0,6$ л/кг.

Большинство лекарственных препаратов в плазме находятся в равновесии между несвязанным состоянием и состоянием, связанным с белками сыворотки. Эффективность конкретного препарата (F_u) может зависеть от степени его связывания с белками в крови, поскольку чем сильнее он связан, тем хуже проникает через клеточные мембраны или диффундирует. При $F_u > 20\%$ эффективность проникновения через мембраны клеток высокая, от 5 – 20% – средняя, при $F_u < 5\%$ – низкая. У исследуемого пептида составляет $99,309\%$.

Клиренс плазмы (CL_{plasma}) является наиболее важным фармакокинетическим параметром, поскольку он является единственным параметром, который контролирует общую экспозицию препарата (при заданной биодоступности), и именно этот параметр позволяет рассчитать дозировку, необходимую для поддержания средней равновесной концентрации препарата в плазме. CL_{plasma} выражает общую способность организма выводить препарат, масштабируя скорость выведения препарата (количество за единицу времени) на соответствующий уровень концентрации в плазме. Эмпирические диапазоны для CL_{plasma} определяются следующим образом: >15 мл/мин/кг означает высокий клиренс, 5 – 15 мл/мин/кг – умеренный клиренс, а <5 мл/мин/кг – низкий клиренс. У исследуемого

дуемой последовательности CLplasma составляет 1,5 мл/мин/кг.

Период полувыведения ($T_{1/2}$) препарата – это гибридная концепция, которая включает в себя клиренс и объем распределения, и, возможно, более целесообразно иметь достоверные оценки этих двух свойств.

Препараты с очень коротким периодом полувыведения: $T_{1/2} < 1$ ч; препараты с коротким периодом полувыведения: $T_{1/2}$ от 1 до 4 ч; препараты с промежуточным коротким периодом полувыведения: $T_{1/2}$ от 4 до 8 ч; препараты с длительным периодом полувыведения: $T_{1/2} > 8$ ч. У пептида NCLCLDCDEHCS

составляет 1,464 ч, что свидетельствует о его эффективности.

Из результатов прогнозирования физико-химических характеристик, поглощения, распределения, метаболизма и выведения пептидной новой последовательности NCLCLDCDEHCS белка GDF-11 можно утверждать, что она является биодоступной и следует использовать ее в конструкции белка для придания ему устойчивости к протеолизу.

На следующем этапе исследований была создана плазмида, которая кодирует последовательность NCLCLDCDEHCS в белке GDF-11. Хроматограмма праймера плазмиды представлена на рисунке 2.

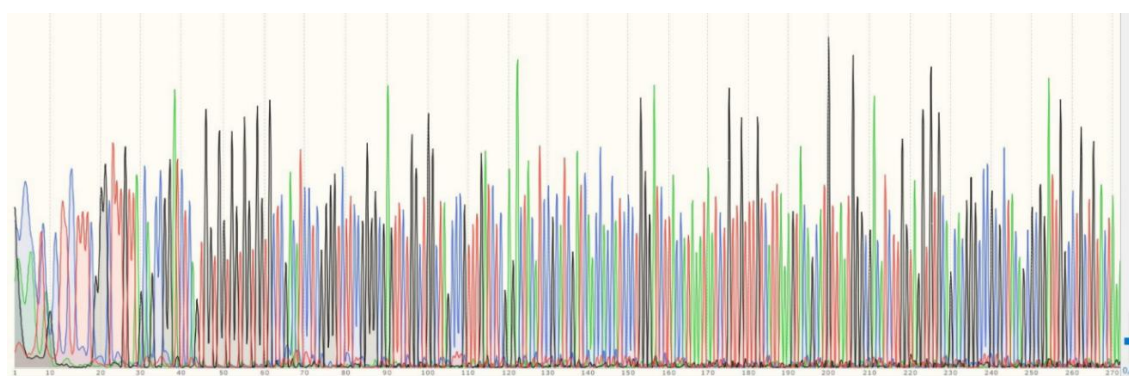


Рис. 2. Хроматограмма праймера плазмиды, кодирующая экспрессию пептида NCLCLDCDEHCS в *E. Coli*
Chromatogram of the plasmid primer encoding the expression of the peptide NCLCLDCDEHCS in *E. Coli*

На рисунке 2 представлена следующая последовательность аминокислот, кодирующая плазмиду пептидной последовательности NCLCLDCDEHCS:

GGGCGGTCATTCCGTCTAGAATAATTTTGTTTA
ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCT
GCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCC
TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGATATC
GGAATTAATTCGGATCCAACTTGGGTCTTGAC
TGCGATGAACATTCTCAGAAAGCCGCTGTTGT
CGTTATCCGCTGACGGTTCGATTTTGAAGCGTT
CGGCTGGGATTGGATCATTGCTCCGCGCCGTT
ACAAAGCAAATATTGCTCTGGCCAGTGGAG
TACATGTTTATGCAGAAATATCCGCACACCCAT
TTAGTACAGCAGGCCAATCCGCGCTGTAGCGC
GGGCCCCTGCTGCACACCTACCAAGATGTGCG
CCATTAACATGCTGTACTTTAATGACAAACAAC
AGATTATTTATGGTAAGATCCAGGGATGGTGG
TTGATCGATGCGGATGTAGTCTCGAGATCAAAC
GGGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGAAGA

CCCCGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACC
ACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG
GAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCA
AACCTTAGCATAA.

Для последующего получения устойчивого к протеолизу белка GDF-11 необходимо будет встроить созданную плазмиду в *E. Coli*, метаболитом которой будет вышеуказанный белок, чему и будут посвящены дальнейшие исследования.

Заключение. В результате исследований проведена циклизация пептидной последовательности белка GDF-11. Полученные данные прогнозирования физико-химических характеристик, гидрофильности, липофильности, константы кислотно-щелочной диссоциации, связывания с белками плазмы крови, объема распределения состояния равновесия, плазменного клиренса, периода полувыведения и другие показатели метаболизма, установили: разрабо-

танная пептидная последовательность NCLCLDCDEHCS устойчива к протеолизу и обладает биодоступностью.

Получена плаزمид, кодирующая последовательность NCLCLDCDEHCS. Встраивание

этой плазмиды в *E. Coli* позволит получить белок GDF-11 с повышенной устойчивостью к протеолизу и улучшенной биодоступностью при пероральном применении.

Список источников

1. Pasut G. Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol // *BioDrugs*. 2014. Vol. 28, № 1. P. 15–23. DOI: 10.1007/s40259-013-0064-z.
2. Pasut G., Veronese F.M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research // *Journal of Controlled Release*. 2012. Vol. 161, № 2. P. 461–472. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.037.
3. Santos J.H.P.M., Torres-Obrequé K.M., Meneguetti G.P., et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 54. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001009.
4. Turecek P.L., Bossard M.J., Schoetens F., et al. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016. Vol. 105, № 2. P. 460–475. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.015.
5. Villegas M.R., Baeza A., Vallet-Regí M. Nanotechnological strategies for protein delivery // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 5. P. 1–21. DOI: 10.3390/molecules23051008.
6. Colletier J.P., Chaize B., Winterhalter M., et al. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer // *BMC Biotechnology*. 2002. Vol. 2. P. 1–8. DOI: 10.1186/1472-6750-2-9.
7. Lawrence P.B., Price J.L. How PEGylation influences protein conformational stability // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2016. Vol. 34. P. 88–94. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.006.
8. Liang C., Amelung W., Lehmann J., et al. Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter // *Global Change Biology*. 2019. Vol. 25, № 11. P. 3578–3590. DOI: 10.1111/gcb.14781.
9. Lawrence P.B., Gavrilov Y., Matthews S.S. et al. Criteria for selecting PEGylation sites on proteins for higher thermodynamic and proteolytic stability // *Journal of the American Chemical Society*. 2014. Vol. 136, № 50. P. 17547–17560. DOI: 10.1021/ja5095183.
10. Munasinghe A., Mathavan A., Mathavan A., et al. Atomistic insight towards the impact of polymer architecture and grafting density on structure-dynamics of PEGylated bovine serum albumin and their applications // *The Journal of Chemical Physics*. 2021. Vol. 154, № 7. DOI: 10.1063/5.0038306.
11. Belén L.H., Rangel-Yagui C.O., Beltrán Lissabet J.F. et al. From synthesis to characterization of site-selective pegylated proteins // *Frontiers in Pharmacology*. 2019. Vol. 10, № 1450. P. 1–16. DOI: 10.3389/fphar.2019.01450.
12. Hinds K.D., Kim S.W. Effects of PEG conjugation on insulin properties // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002. Vol. 54, № 4. P. 505–530. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00025-X.
13. Chao H., Wang H., Wang X., et al. Genetic dissection of seed oil and protein content and identification of networks associated with oil content in *Brassica napus* // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 46295. P. 1–16. DOI: 10.1038/srep46295.
14. Wright A.V., Wang J.Y., Burstein D., et al. A functional mini-integrase in a two-protein type V-C CRISPR system // *Molecular Cell*. 2019. Vol. 73, № 4. P. 727–737.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.12.015.
15. Zheng Z., Ji H., Zong W., et al. Construction and characterization of immunoliposomes targeting fibroblast growth factor receptor 3 // *AMB Express*. 2019. Vol. 9, № 1. DOI: 10.1186/s13568-019-0875-5.
16. Rosen C.B., Francis M.B. Targeting the N terminus for site-selective protein modification // *Nature Chemical Biology*. 2017. Vol. 13, № 7. P. 697–705. DOI: 10.1038/nchembio.2416.

17. Cooper C.E., Bird M., Sheng X., et al. Stability of maleimide-PEG and mono-sulfone-PEG conjugation to a novel engineered cysteine in the human hemoglobin alpha subunit // *Frontiers in Chemistry*. 2021. Vol. 9, № 707797. P. 1–11. DOI: 10.3389/fchem.2021.707797.
18. Dozier J.K., Distefano M.D. Site-specific pegylation of therapeutic proteins // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, № 10. P. 25831–25864. DOI: 10.3390/ijms161025831.
19. Ma Y., Lee C., Park J. Strategies for optimizing the production of proteins and peptides with multiple disulfide bonds // *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, № 9. P. 541. DOI: 10.3390/antibiotics9090541.
20. Costa S., Almeida A., Castro A., et al. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system // *Frontiers in Microbiology*. 2014. Vol. 5. P. 1–20. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063.
21. Kosobokova E.N., Skrypnik K.A., Kosorukov V.S. Overview of fusion tags for recombinant proteins // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. Vol. 81, № 3. P. 187–200. DOI: 10.1134/S0006297916030019.
22. Biesemann N., Mendler L., Wietelmann A., et al. Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure // *Circulation Research*. 2014. Vol. 115. P. 296–310. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304185.
23. Poggioli T., Vujic A., Yang P., et al. Circulating growth differentiation factor 11/8 levels decline with age // *Circulation Research*. 2016. Vol. 118. P. 29–37. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307521.
24. Du G.Q., Shao Z.B., Wu J., et al. Targeted myocardial delivery of GDF11 gene rejuvenates the aged mouse heart and enhances myocardial regeneration after ischemia-reperfusion injury // *Basic Research in Cardiology*. 2017. Vol. 112. P. 7. DOI: 10.1007/s00395-016-0593-y.
25. Walker R.G., Czepnik M., Goebel E.J., et al. Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11 // *BMC Biology*. 2017. Vol. 15. P. 19. DOI: 10.1186/s12915-017-0350-1.
26. Lee Y.S., Lee S.J. Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. Vol. 110. P. E3713–E3722. DOI: 10.1073/pnas.1309907110.
27. Anderson S.B., Goldberg A.L., Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283. P. 7027–7035. DOI: 10.1074/jbc.M706678200.
28. Yadin D., Knaus P., Mueller T.D. Structural insights into BMP receptors: specificity, activation and inhibition // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2016. Vol. 27. P. 13–34. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.005.
29. Weiss A., Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2013. Vol. 2. P. 723–729. DOI: 10.1002/wdev.86.
30. Webster J., Oxley D. Protein identification by Peptide Mass Fingerprinting // *Methods in Molecular Biology*. 2012. Vol. P. 723–730.
31. Hubler S.L., Craciun G. Periodic patterns in distributions of peptide masses // *Biosystems*. 2012. Vol. 109, № 2. P. 179–185. DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.04.008
32. Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J., et al. Trends in peptide drug discovery // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021. Vol. 20, № 4. P. 309–325. DOI: 10.1038/s41573-020-00135-8.
33. Liu X.Y., Ji X., Heinis C., et al. Peptide-hypervalent iodine reagent chimeras: enabling peptide functionalization and macrocyclization // *Angewandte Chemie International Edition*. 2023. Vol. 62, № 33. P. e202306036. DOI: 10.1002/anie.202306036.
34. Keppler J.K., Heyse A., Scheidler E., et al. Towards recombinantly produced milk proteins: physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein betalactoglobulin variants // *Food Hydrocolloids*. 2021. Vol. 110. P. 106132. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106132.
35. Mund T., Lewis M.J., Maslen S., et al. Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. Vol. 111, № 47. P. 16736–16741. DOI: 10.1073/pnas.1412152111.
36. Grover T., Mishra R., Bushra, et al. An insight into biological activities of native cyclotides for potential applications in agriculture and pharmaceuticals // *Peptides*. 2021. Vol. 135. P. 170430. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170430.

37. Broccatelli F., Aliagas I., Zheng H. Why decreasing lipophilicity alone is often not a reliable strategy for extending IV half-life // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2018. Vol. 4. P. 522–527. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00047.
38. Arnott J.A., Planey S.L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design // *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012. Vol. 10. P. 75. DOI: 10.1517/17460441.2012.714363.
39. Yang Z.Y., Yang Z.J., Dong J., et al. Structural analysis and identification of colloidal aggregators in drug discovery // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2019. Vol. 59. P. 3714–3726. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00541.
40. Duan Y.J., Fu L., Zhang X.C., et al. Improved GNNs for Log D7.4 prediction by transferring knowledge from low-fidelity data // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2023. Vol. 24. P. 2345–2359. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01564.
41. Lovering F., Bikker J., Humblet C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009. Vol. 52, № 21. P. 6752–6756. DOI: 10.1021/jm901241e.

References

1. Pasut G. Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol. *BioDrugs*. 2014;28(1):15-23. DOI: 10.1007/s40259-013-0064-z.
2. Pasut G, Veronese FM. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):461-472. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.037.
3. Santos JHPM, Torres-Obreque KM, Meneguetti GP, et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001009.
4. Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, et al. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(2):460-475. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.015.
5. Villegas MR, Baeza A, Vallet-Regí M. Nanotechnological strategies for protein delivery. *Molecules*. 2018;23(5):1-21. DOI: 10.3390/molecules23051008.
6. Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, et al. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology*. 2002;2:1-8. DOI: 10.1186/1472-6750-2-9.
7. Lawrence PB, Price JL. How PEGylation influences protein conformational stability. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2016;34:88-94. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.006.
8. Liang C, Amelung W, Lehmann J, et al. Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. *Global Change Biology*. 2019;25(11):3578-3590. DOI: 10.1111/gcb.14781.
9. Lawrence PB, Gavrilov Y, Matthews SS, et al. Criteria for selecting PEGylation sites on proteins for higher thermodynamic and proteolytic stability. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(50):17547-17560. DOI: 10.1021/ja5095183.
10. Munasinghe A, Mathavan A, Mathavan A, et al. Atomistic insight towards the impact of polymer architecture and grafting density on structure-dynamics of PEGylated bovine serum albumin and their applications. *The Journal of Chemical Physics*. 2021;154(7). DOI: 10.1063/5.0038306.
11. Belén LH, Rangel-Yagui CO, Beltrán Lissabet JF, et al. From synthesis to characterization of site-selective pegylated proteins. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10(1450):1-16. DOI: 10.3389/fphar.201901450.
12. Hinds KD, Kim SW. Effects of PEG conjugation on insulin properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(4):505-530. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00025-X.
13. Chao H, Wang H, Wang X, et al. Genetic dissection of seed oil and protein content and identification of networks associated with oil content in *Brassica napus*. *Scientific Reports*. 2017;7(46295):1-16. DOI: 10.1038/srep46295.
14. Wright AV, Wang JY, Burstein D, et al. A functional mini-integrase in a two-protein type V-C CRISPR system. *Molecular Cell*. 2019;73(4):727-737.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.12.015.

15. Zheng Z, Ji H, Zong W, et al. Construction and characterization of immunoliposomes targeting fibroblast growth factor receptor 3. *AMB Express*. 2019;9(1). DOI: 10.1186/s13568-019-0875-5.
16. Rosen CB, Francis MB. Targeting the N terminus for site-selective protein modification. *Nature Chemical Biology*. 2017;13(7):697-705. DOI: 10.1038/nchembio.2416.
17. Cooper CE, Bird M, Sheng X, et al. Stability of maleimide-PEG and mono-sulfone-PEG conjugation to a novel engineered cysteine in the human hemoglobin alpha subunit. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9(707797):1-11. DOI: 10.3389/fchem.2021.707797.
18. Dozier JK, Distefano MD. Site-specific pegylation of therapeutic proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(10):25831-25864. DOI: 10.3390/ijms161025831.
19. Ma Y, Lee C, Park J. Strategies for optimizing the production of proteins and peptides with multiple disulfide bonds. *Antibiotics*. 2020;9(9):541. DOI: 10.3390/antibiotics9090541.
20. Costa S, Almeida A, Castro A, et al. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:1-20. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063.
21. Kosobokova EN, Skrypnik KA, Kosorukov VS. Overview of fusion tags for recombinant proteins. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(3):187-200. DOI: 10.1134/S0006297916030019.
22. Biesemann N, Mendler L, Wietelmann A, et al. Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure. *Circulation Research*. 2014;115:296-310. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304185.
23. Poggioli T, Vujic A, Yang P, et al. Circulating growth differentiation factor 11/8 levels decline with age. *Circulation Research*. 2016;118:29-37. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307521.
24. Du GQ, Shao ZB, Wu J, et al. Targeted myocardial delivery of GDF11 gene rejuvenates the aged mouse heart and enhances myocardial regeneration after ischemia-reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2017;112:7. DOI: 10.1007/s00395-016-0593-y.
25. Walker RG, Czepnik M, Goebel EJ, et al. Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC Biology*. 2017;15:19. DOI: 10.1186/s12915-017-0350-1.
26. Lee YS, Lee SJ. Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:E3713-E3722. DOI: 10.1073/pnas.1309907110.
27. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283:7027-7035. DOI: 10.1074/jbc.M706678200.
28. Yadin D, Knaus P, Mueller TD. Structural insights into BMP receptors: specificity, activation and inhibition. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2016;27:13-34. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.005.
29. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2013;2:723-729. DOI: 10.1002/wdev.86.
30. Webster J, Oxley D. Protein identification by Peptide Mass Fingerprinting. *Methods in Molecular Biology*. 2012;Vol:723-730.
31. Hubler SL, Craciun G. Periodic patterns in distributions of peptide masses. *Biosystems*. 2012;109(2):179-187. DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.04.006.
32. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, et al. Trends in peptide drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(4):309-325. DOI: 10.1038/s41573-977-00135-8.
33. Liu XY, Ji X, Heinis C, et al. Peptide-hypervalent iodine reagent chimeras: enabling peptide functionalization and macrocyclization. *Angewandte Chemie International Edition*. 2023;62(23):e202306036. DOI: 10.1002/anie.202306036.
34. Holmes C, Kerwin W, McDaniel J, et al. Towards recombinantly producing milk-based proteins: physicochemical and emulsifying properties of recombinant whey protein beta-lactoglobulin variants. *Food Hydrocolloids*. 2021;110(2):106123. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106132.
35. Mund T, Lewis MJ, Maslen S, et al. Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(47):16736-16741. DOI: 10.1073/pnas.1412152111.

36. Grover T, Mishra R, Bushra, et al. An insight into biological activities of native cyclotides for potential applications in agriculture and pharmaceuticals. *Peptides*. 2021;135:170430. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170430.
37. Broccatelli F, Aliagas I, Zheng H. Why decreasing lipophilicity alone is often not a reliable strategy for extending IV half-life. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2018;4:522-527. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00047.
38. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012;10:75. DOI: 10.1517/17460441.2012.714363.
39. Yang ZY, Yang ZJ, Dong J, et al. Structural analysis and identification of colloidal aggregates in drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2019;59(5):3714-3726. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00541.
40. Duan YJ, Fu L, Zhang XC, et al. Improved GNNs for LogD7.4 prediction by transferring knowledge from low-fidelity data. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2023;24(3):2345-2359. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01540.
41. Lovering F, Bikker J, Humblet C. Escape from Flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009;52(21):6752-6756. DOI: 10.1021/jm901241e.

Статья принята к публикации 14.04.2025 / The article accepted for publication 14.04.2025.

Информация об авторах:

Сергей Леонидович Тихонов¹, профессор кафедры пищевой инженерии аграрного производства, заведующий кафедрой высшей школы биотехнологии, доктор технических наук, профессор

Наталья Валерьевна Тихонова², заведующая кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, доктор технических наук, профессор

Information about the authors:

Sergey Leonidovich Tikhonov¹, Professor at the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Head of the Department of the Higher School of Biotechnology, Doctor of Technical Sciences, Professor

Natalia Valerievna Tikhonova², Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Doctor of Technical Sciences, Professor

