

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования

«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА
ЛУМУМБЫ»

На правах рукописи

Леденев Олег Владимирович

**РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВОДНЫХ
РАСТВОРОВ ПЕПТИДОВ**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Сыроешкин Антон Владимирович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
1.1 Пептиды как активный фармацевтический ингредиент	16
1.1.1 Исторические предпосылки применения пептидов в медицине.....	16
1.1.2 Современное место пептидов в фармации	17
1.1.3 Глобальный рынок пептидных препаратов.....	18
1.1.4 Значение пептидов в контексте фармакопейных требований.....	19
1.1.5 Перспективы лекарственных средств на пептидной основе	19
1.2 Классификация пептидов.....	20
1.2.1 Классификация по количеству аминокислот	21
1.2.2 Классификация по способам модификации молекулы	22
1.3 Механизмы действия пептидных лекарственных средств.....	23
1.3.1 Взаимодействие с мембранными рецепторами	24
1.3.2 Влияние на внутриклеточные сигнальные пути	25
1.3.3 Антагонисты и ингибиторы	25
1.3.4 Антимикробные и противоопухолевые механизмы.....	26
1.3.5 Иммуномодулирующее действие	27
1.4 Методы получения пептидных молекул для лекарственных средств... 27	27
1.4.1 Химический синтез пептидных молекул.....	28
1.4.2 Биотехнологическое получение пептидов.....	29
1.4.3 Ферментативный синтез и полусинтетические методы.....	29
1.4.4 Современные тенденции и инновации в области синтеза пептидных молекул.....	30
1.5 Методы контроля качества пептидных лекарственных средств.....	32
1.5.1 Аналитическая стратегия: критические показатели (атрибуты) качества (CQA, Critical Quality Attributes), подход «Качество через проектирование» (QbD, Quality by Design) и жизненный цикл методик.....	32

1.5.2 Хроматографические методы: ВЭЖХ в обращённо-фазовом режиме (ОФ-ВЭЖХ, RP-HPLC), ионообменная хроматография (ИEX), гель-фильтрация (SEC) и гидрофильная хроматография (HILIC).....	33
1.5.3 Электрофоретические и спектроскопические методы	35
1.5.4 Масс-спектрометрия высокого разрешения: электроспрей-ионизация (ESI-MS), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI-TOF), tandemная масс-спектрометрия (MS/MS) и анализатор орбитальной ионной ловушки (Orbitrap)	36
1.5.5 Подтверждение структуры: пептидное картирование, аминокислотный анализ и контроль концевых групп	38
1.5.6 Примеси и стабильность.....	40
1.5.7 Регуляторные и фармакопейные требования	42
1.6 Примеры лекарственных препаратов и биологически активных добавок на пептидной основе.....	44
1.6.1 Гормональные пептиды	44
1.6.2 Антимикробные и противоопухолевые пептиды	45
1.6.3 Кардиопротекторные и нейропротекторные пептиды	46
1.6.4 Биологически активные добавки (БАДы) на основе пептидов	46
1.7 Вывод литературного обзора	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 Объекты исследования	49
2.1.1 Лекарственные препараты на основе пептидов	49
2.1.2 Биологически активные олигопептиды – продукты химического синтеза.	50
2.1.3 Биологически активные пептиды растительного происхождения	50
2.1.4 Остальные реактивы для исследований.....	51
2.2 Методы исследования	52
2.2.1 Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС, DLS, Dynamic Light Scattering)	52
2.2.2 Кинетика диффузного отражения света (ДСО, 2D-DLS)	55

2.2.3 Детекция собственного радиотеплового излучения.....	59
2.2.4 Spirotox тест (биотестирование)	62
2.2.5 Метрологическое обеспечение	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	64
3.1 Размеры биологически активных пептидов животного и растительного происхождения.....	64
3.2 Индукция плотностных неоднородностей биоактивными пептидами ..	66
3.3 Метод диффузного отражения в качестве экспресс-метода контроля качества лекарственных средств на основе пептидов	71
3.3.1 Валидация методики 2D-DLS для контроля качества водных растворов регуляторных пептидов по показателю «подлинность»	73
3.3.1.1 Расчёт дескрипторных показателей и их интерпретация	73
3.3.1.2 Обработка данных и исключение выбросов	74
3.3.1.3 Нормализация показателей	74
3.3.1.4 Сводные статистические результаты.....	75
3.3.1.5 Кластерный анализ дескрипторных профилей	77
3.3.1.6 Тепловая карта нормализованных дескрипторных профилей	79
3.3.1.7 Валидация по критериям ОФС «Валидация аналитических методик» (ОФС.1.1.0012)	81
3.3.1.8 Алгоритм применения методики.....	84
3.3.1.9 Вывод по разделу валидации 2D-DLS	87
3.4 Возможность специфического контроля подлинности лекарственных пептидов и полипептида в непрозрачной первичной упаковке.....	88
3.5 Возможный механизм аномального взаимодействия пептидов с водными кластерами	89
3.6 Термодинамическая интерпретация влияния электромагнитных колебаний пептидных растворов на стабильность клеточной среды.....	92
3.7 Определение токсичности водных растворов регуляторных пептидов на модели Spirotox.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100

ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В организме человека и животных присутствует широкий пул биологически активных пептидов, формирующийся в результате различных биохимических процессов. Одним из ключевых механизмов образования этого пула является катаболизм эндогенных белков [1]. В процессе пищеварения также происходит гидролиз экзогенных полипептидов [2], что приводит к образованию новых биологически активных фрагментов. Кроме того, пептиды могут синтезироваться *de novo* [3] и поступать в организм человека в готовом виде - парентерально, интраназально или парабульбарно [4].

Согласно концепции, предложенной в работе [5], совокупность эндогенных и экзогенных пептидов может рассматриваться как низовой уровень регуляции метаболизма. Примером таких соединений является дипептид карнозин, обладающий антиоксидантной активностью и участвующий в поддержании внутриклеточного pH ($pK \approx 7,0$). Биологически активные пептиды способны опосредованно влиять на азотный метаболизм, перенаправляя потоки азотсодержащих соединений по различным биохимическим путям.

Пептид-зависимые механизмы метаболической регуляции обеспечивают динамическое равновесие между катаболизмом и анаболизмом за счёт локальной модуляции энергетических параметров реакций, что способствует сохранению метаболической пластичности клетки [6]. Таким образом, пептиды можно рассматривать не только как структурные и сигнальные молекулы, но и как универсальные регуляторы клеточной энергетики.

Некоторые пептиды взаимодействуют со специфическими рецепторами, вызывая активацию вторичных мессенджеров, что делает их механизм действия сходным с гормональной регуляцией [7]. Особенно это характерно для нейропептидов - энкефалинов и эндорфинов [8].

Биоактивные пептиды представлены как линейными, так и циклическими структурами [9], нередко содержащими гликозилированные остатки [10], β -

аминокислоты или D-аминокислотные компоненты [11,12]. Их источниками могут быть ткани животных [13], растения [14], грибы [15], насекомые [16] и бактериальная биомасса [17].

Для фармацевтической химии особый интерес представляют пептиды, обладающие клинически доказанной эффективностью - ноотропной (включая применение в постинсультной реабилитации) [18], противоинфекционной [19] и противоопухолевой активностью [20]. Контроль качества таких препаратов необходим не только для подтверждения их чистоты и подлинности, но и для предотвращения возможной контаминации прионами, способной инициировать медленные конформационные перестройки белковых структур [21].

В настоящей работе в качестве объектов исследования были выбраны биологически активные пептиды и полипептиды животного, и растительного происхождения. Для них продемонстрировано применение новых неразрушающих методов экспресс-контроля качества - метода диффузного отражения и регистрации собственного радиотеплового излучения. Кроме того, предложено обоснование механизма действия пептидов и полипептидов при наномолярных концентрациях, что расширяет представления о закономерностях их физико-химического поведения в водных средах.

Степень разработанности темы исследования

Современные лекарственные препараты на основе пептидов на российском фармацевтическом рынке можно условно разделить на три группы: полипептидные средства, олигопептидные средства и смешанные пептидные препараты. Представители лекарственных средств на основе полипептидных молекул: Кортексин - полипептиды коры головного мозга скота (ноотропное средство); Церебролизин - комплекс пептидов, полученных из головного мозга свиньи (ноотропный препарат); Ретиналамин - полипептиды сетчатки глаз скота (препарат, улучшающий регенерацию тканей сетчатки, для системного применения в офтальмологии). Представители лекарственных средств на основе олигопептидных молекул: Семакс – гептапептид (ноотропное средство); Дельтаран – нонапептид (антигипоксантное средство).

Действующие вещества перечисленных препаратов позволяют судить о технологии получения активного фармацевтического ингредиента (АФИ): для полипептидных средств – экстракция из органов и тканей животных, а для олигопептидных – производственный синтез. Подход к получению и контролю качества таких молекул трудозатратен и материалоемок. Предполагается экстракция с последующим дифференциальным центрифугированием и хроматографической очисткой от примесей. Контроль качества растворов пептидов требует использования масс-спектрометрии (MALDI-TOF, Orbitrap). Для искусственно синтезированных препаратов производители в большинстве случаев используют поддающийся автоматизации метод твердофазного синтеза пептидной цепи.

Все современные методы контроля качества лекарственных средств на основе пептидов начиная с высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обратной фазе с tandemной масс-спектрометрией, металл-хелатной хроматографии, изопикнического центрифугирования и заканчивая классическим электрофорезом в полиакриламидном геле в додецилсульфате натрия хорошо зарекомендовали себя с точки зрения чувствительности и селективности. Но все эти методы объединяет невозможность сохранения исследуемого образца после проведенного анализа. Именно поэтому разработка и использование современных методик в качестве неразрушающих экспресс-методов контроля качества является актуальным направлением современной фармации. В настоящей работе использован разработанный на кафедре фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН [22] метод контроля качества дисперсных сред на основе кинетики диффузного отражения. Разновидность этого метода с использованием топологической модели обработки результатов кинетики светорассеяния адаптирована в настоящей работе для контроля качества водных растворов регуляторных пептидов по показателю «подлинность».

Цель работы:

Разработать экспресс-методы контроля качества и биологической активности пептидов для обеспечения потребностей фармацевтической промышленности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Определить распределение по размерам плотностных неоднородностей (одиночных молекул пептида и их ассоциатов, а также гигантских кластеров воды, индуцированных пептидами) в растворе биологически активных пептидов.
2. Оптимизировать метод диффузного отражения в качестве экспресс-метода контроля качества лекарственных средств на основе пептидов.
3. Определить возможность специфического контроля подлинности лекарственных пептидов и полипептидов в первичной упаковке.
4. Охарактеризовать валидационные параметры разработанных подходов контроля качества водных растворов биологически активных пептидов с помощью метода динамического лазерного светорассеяния, метода диффузного отражения и метода радиотепловой эмиссии наночастиц.

Научная новизна работы.

Впервые в мировой практике была показана специфическая индукция плотностных неоднородностей биологическими активными пептидами. **Впервые** в мировой практике была предложена методика использования метода диффузного отражения в качестве экспресс-метода контроля качества лекарственных средств на основе пептидов по показателю «подлинность».

Теоретическая и практическая значимость работы.

В работе впервые показан возможный механизм аномального взаимодействия пептидов с водными кластерами и выдвинута гипотеза о механизме биорегуляции пептидными молекулами гомеостаза в части стабилизации внутриклеточных электромагнитных полей. Практическая значимость научной работы заключается в использовании специфических свойств биологически активных пептидов в водных растворах (формирование плотностных неоднородностей) в контроле качества по

показателю «подлинность», что является основополагающим параметром лекарственных средств для защиты населения от контрафактных и фальсифицированных препаратов. Результаты использования кинетики диффузного отражения света (2D-DLS) пептидных препаратов демонстрируют дифференцировку олиго- и полипептидов различной природы, такая методика экспресс-анализа может быть реализована на производстве в качестве поточного контроля продукции.

Практическая значимость научной работы также заключается в прямом использовании методики регистрации радиотеплового излучения от водных растворов биологически активных веществ (пептиды разной природы, вирусоподобные частицы и т.д.) на производстве вакцин в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи по Государственному контракту РУДН с ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» № 12-04/24-044 от 10.04.24 в рамках НИР № 033324-3-000.

Методология и методы исследования.

Методологическую основу диссертационного исследования составили анализ и систематизация данных отечественных и зарубежных литературных источников, посвящённых теме работы (более 200 источников). Методы анализа и синтеза пептидных препаратов соответствовали современным стандартам фармацевтической химии – для олигопептидов природного и искусственного происхождения – синтез на твёрдой фазе с использованием Fmoc технологии; очистка: высокоэффективная жидкостная хроматография; верификация: масс-спектрометрия с использованием орбитальной ионной ловушки (Orbitrap).

В диссертационной работе значительное внимание уделено следующим методам анализа гетерогенных сред: динамическое рассеяние света (DLS), кинетика диффузного отражения света (оно же двумерное динамическое светорассеяние – 2D-DLS), позволяющим регистрировать как фактическое наличие плотностных неоднородностей в растворе с записью размеров, так и кинетику формирования и распада этих гетерогенных структур в толще раствора. В результате кинетических процессов водные растворы пептидных препаратов

излучали в миллиметровом диапазоне – регистрацию радиотепловой эмиссии проводили методом измерения собственного радиотеплового излучения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биологически активные пептиды способны индуцировать специфическим образом образование субмикронных и микронных плотностных неоднородностей в растворе.

2. Размерный спектр плотностных неоднородностей, индуцированных биологически активными пептидами, использован для контроля качества водных растворов пептидов по показателю «подлинность» методом динамического лазерного светорассеяния.

3. Процесс формирования и распада плотностных неоднородностей сопровождается радиотепловой эмиссией, что позволяет проводить измерения собственного радиотеплового излучения водных растворов пептидов в миллиметровом диапазоне.

4. Водный раствор регуляторных пептидов специфическим образом излучает в EHF (Extremely High Frequencies, крайне высокие частоты - КВЧ) диапазоне электромагнитных волн.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность полученных научных результатов обеспечивается использованием современных валидированных методик (динамическое и двумерное динамическое светорассеяние, регистрация собственного радиотеплового излучения), а также стандартных методов физико-химического анализа и биологического тестирования, общепринятых в фармацевтической химии. Метрологическое обеспечение проведено с помощью экспериментов на повторяемость данных ($n=45$) и многократного воспроизведения опытов (не менее семи серий экспериментов для каждого образца). Статистическая обработка с доказательством нормального распределения данных проведена с применением программного пакета OriginPro 2021 и показала, что среднеквадратичные отклонения не превышают 7% при доверительной вероятности 0,98.

Репрезентативность выборки обеспечена включением в исследование олиго- и полипептидов различного происхождения, включая лекарственные препараты аптечного ассортимента.

Апробация результатов диссертационной работы. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященной памяти академика РАМН А.П. Арзамасцев «Неделя Фармации – 2023» (Москва, Россия, 13-17 ноября 2023); VII Межфакультетская студенческая научно-практическая конференция «Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future» (Москва, Россия, 23-24 января 2024); Ежегодная общеуниверситетская научная конференция, посвященная 270-летию МГУ «Ломоносовские чтения - 2024» Секция: Биология (Москва, Россия, 26 марта - 4 апреля 2024) Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2024" Секция: Биохимия (Москва, Россия, 12-26 апреля 2024); 7-ая Всероссийская конференция "Физика водных растворов"(Москва, Россия, 18-20 ноября 2024); XI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Электрогорск, Московская область, Россия, 29 ноября 2024); IV Международная научно-практическая конференция «Нанохимия и современные нанотехнологии» (Москва, Россия, 25-27 июня 2025); а также неоднократно на научном семинаре кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе научных статей в журналах, индексируемых в Scopus – 2, Chemical Abstracts – 4, и статьи в сборниках конференции – 4.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования (п. 1 и 3):

Пункт 1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

Пункт 3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении научных экспериментов и получении экспериментальных данных, обработке и интерпретации полученных результатов, апробации и внедрении результатов исследования, а также совместной с другими авторами подготовке публикаций по выполненной работе.

Структура и объём диссертации. Полный объём диссертации составляет 185 страниц, в том числе 59 рисунков и 9 таблиц. Библиографический список содержит 244 наименования. Описание представляемого исследования включает введение, 3 главы, заключение, библиографический список и два приложения.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации
Статьи в журналах, индексируемых в международных базах Scopus и
Chemical Abstracts

1. **Ledenev O.V.**, Petrov G.V., Skripnikov A.Y., Syroeshkin A.V. Development of a method for quality control of peptide drugs without opening the primary packaging // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17, № 5. – P. 1–6. DOI: 10.22159/ijap.2025v17i5.54386.
2. **Ledenev O.V.**, Levitskaya O.V., Syroeshkin A.V. Drugs based on bioactive oligopeptides // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15, № 6. – P. 244–252. DOI: 10.22270/jddt.v15i6.7194.
3. **Ledenev O.V.**, Filatov I.E., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Dyachenko I.A., Slashcheva G.A., Shaykhutdinova E.R., Kazakova E.N., Sadovnikova E.S., Patsap O.I., Lebedeva V.V., Murashev A.N., Grebennikova T.V. Toxicity evaluation of a VLP-based vaccine against human rotavirus infection following a single administration in rats: serum biochemistry and histopathological examination of organs and injection site // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15, № 8. – P. 69–79. DOI: 10.22270/jddt.v15i8.7314.
4. Nazarov A.A., **Ledenev O.V.**, Petrov G.V., Levitskaya O.V., Syroeshkin A.V. New method of quality and quantity control of the insulin glulisine pharmaceuticals based on intrinsic radiothermal emission // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15, № 6. – P. 116–125. DOI: 10.22270/jddt.v15i6.7189.
5. Petrov G.V., Koldina A.M., **Ledenev O.V.**, Tumasov V.N., Nazarov A.A., Syroeshkin A.V. Nanoparticles and nanomaterials: a review from the standpoint of pharmacy and medicine // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – Art. 655. – 25 p. DOI: 10.3390/pharmaceutics17050655.
6. Levitskaya O.V., Petrov G.V., **Ledenev O.V.**, Yakunin D.Y., Grebennikova T.V. Non-destructive remote determination of total native protein concentration in virus-like particle vaccine preparations // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15, № 8. – P. 95–100. DOI: 10.22270/jddt.v15i8.7320.

Статьи в сборниках конференций

7. Леденев О.В., Скрипников А.Ю., Сыроешкин А.В. Специфическая индукция плотностных неоднородностей водными растворами лекарственных пептидных средств // Физика водных растворов: сборник тезисов VII Всероссийской конференции (Москва, 18–20 ноября 2024 г.). – М.: ООО «МЕСОЛ», 2024. – С. 64–65. DOI: 10.24412/cl-35040-2024-64-65. EDN: EPTJAJ.

8. Леденев О.В., Скрипников А.Ю., Сыроешкин А.В. Экспресс-контроль качества иммунобиологических ЛС и ЛС на основе пептидов без вскрытия первичной упаковки // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Электрогорск, Московская обл., 29 ноября 2024 г.). – Электрогорск: АО «ЭКОлаб», 2025. – С. 104–105. EDN: BFRMNY.

9. Леденев О.В., Петров Г.В., Колдина А.М., Назаров А.А., Сыроешкин А.В. Наночастицы, модифицированные пептидами: синтез, применение, контроль качества // Нанохимия и современные нанотехнологии: материалы IV Международной научно-практической конференции (Москва, 25–27 июня 2025 г.). – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2025. – С. 152–155. EDN: DAPWSB.

10. Назаров А.А., Петров Г.В., **Леденев О.В.,** Колдина А.М., Сыроешкин А.В. Контроль качества наноразмерного препарата инсулина на основе собственного радиотеплового излучения // Нанохимия и современные нанотехнологии: материалы IV Международной научно-практической конференции (Москва, 25–27 июня 2025 г.). – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2025. – С. 159–162. EDN: LQZEIY.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Пептиды как активный фармацевтический ингредиент

1.1.1 Исторические предпосылки применения пептидов в медицине

Первые исследования в области применения пептидов в качестве лекарственных средств относятся к началу XX века. В этот период активно развивалась эндокринология, и именно здесь пептиды впервые показали свою терапевтическую значимость. Наибольшим прорывом стало открытие инсулина в 1921 году Ф. Бантингом и Д. Маклеодом, что позволило перейти от симптоматического лечения сахарного диабета к патогенетической терапии. Введение инсулина в практику в 1922 году стало настоящей революцией: впервые удалось контролировать заболевание, ранее приводившее к неминуемой смерти. Научное сообщество соответствующим образом отметило значение открытия: Фредерик Бантинг и Джон Маклеод получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1923 году, а своими частями премии они поделились с ассистентами Джеймсом Коллипом и Чарльзом Бестом [23].

После этого успеха внимание исследователей было обращено и на другие регуляторные пептиды. В 1950-1960-х годах в клиническую практику вошли окситоцин [24] и вазопрессин [25], используемые для стимуляции родовой деятельности и регулирования водно-солевого баланса. В 1960-1970-е годы был выделен и внедрён в медицину глюкагон для лечения гипогликемии. В дальнейшем появились препараты кальцитонина [26], применяемые в терапии остеопороза. Эти примеры показали универсальность пептидных молекул и их потенциал для воздействия на самые разные физиологические системы организма.

Однако первые поколения пептидных препаратов имели серьёзные ограничения. Они получались из тканей животных, что вызывало проблемы с очисткой, стандартизацией и безопасностью. Кроме того, они отличались нестабильностью, быстро разрушались под действием протеаз и требовали частых

инъекций. Развитие методов биотехнологического синтеза во второй половине XX века, в том числе рекомбинантных технологий, позволило преодолеть эти трудности и стало основой для индустриального производства пептидных препаратов.

1.1.2 Современное место пептидов в фармации

На современном этапе пептиды рассматриваются как один из наиболее перспективных классов активных фармацевтических ингредиентов. По состоянию на 2025 год известно более 100 зарегистрированных пептидных препаратов, применяемых в клинической практике, и более 200 кандидатов находятся в различных фазах клинических испытаний. Их терапевтические ниши чрезвычайно разнообразны: от эндокринологии (инсулины, агонисты ГПП-1 (GLP-1, глюкагоноподобный пептид-1) [27]) до онкологии (интернализуемые пептиды [28], пептидные комплексы с наночастицами [29], пептидные модификации существующих молекул онкологических препаратов [30]), от неврологии (ноотропные пептиды [31]) до офтальмологии (ретинопротекторы [32]), кроме этого активно развиваются направления: создание антибиотических препаратов на пептидной основе; модифицирование наночастиц пептидами, а также использование пептидов, как наночастиц.

Главное достоинство пептидов заключается в их высокой селективности [33]: они взаимодействуют с определёнными рецепторами и сигнальными каскадами в минимальных концентрациях, минимизируя побочные эффекты. Кроме того, большинство терапевтических пептидов являются аналогами эндогенных молекул [34], что обеспечивает их физиологичность и снижает риск токсических реакций. На фоне роста числа пациентов с хроническими заболеваниями (диабет, онкология, нейродегенеративные патологии) востребованность пептидных препаратов продолжает увеличиваться.

Тем не менее, их применение сопряжено с определёнными ограничениями. Пептиды плохо всасываются в ЖКТ и, как правило, неэффективны при

пероральном введении. Они быстро разрушаются в плазме крови и имеют короткий период полувыведения, что вынуждает применять инъекционные формы. Для преодоления этих ограничений используются наночастичные модификации лекарственных средств: включение пептидных активных ингредиентов в липосомы [35,36], получение комплексов с биологически активными наноразмерными металлами (например, Ag-peptide - комплекс серебряных наночастиц с пептидной последовательностью [37]).

Высокая стоимость синтеза и сложность контроля качества также остаются важными проблемами. Решение этих задач стало возможным благодаря модификациям молекул (пегилирование [38], липидирование [39], циклизация [40]), разработке пролекарств и применению инновационных систем доставки (наночастицы, липосомы, трансдермальные пластыри).

1.1.3 Глобальный рынок пептидных препаратов

По данным GlobalData (2024), объём мирового рынка пептидных препаратов к 2030 году достигнет более 50 млрд американских долларов. Основными драйверами роста являются препараты для лечения сахарного диабета (агонисты ГПП-1 - семаглутид [41,42], лираглутид [43,44]), а также средства для терапии ожирения, которое сегодня рассматривается как глобальная медицинская и социальная проблема. Отдельный сегмент занимают противоопухолевые средства - пептидные конъюгаты и вакцины [45]. В последние годы особое внимание уделяется разработке антимикробных пептидов в условиях растущей антибиотикорезистентности.

Ведущей тенденцией стало внедрение пероральных форм пептидов. Примером служит семаглутид в форме таблеток [46], который уже прошёл клинические испытания и вышел на рынок (PIONEER 6) [47]. Это событие стало прорывом, подтвердившим возможность преодоления барьеров биодоступности. Другим перспективным направлением является создание персонализированных

противоопухолевых пептидных вакцин [48], которые подбираются индивидуально для каждого пациента с учётом профиля опухолевых антигенов.

1.1.4 Значение пептидов в контексте фармакопейных требований

Признание пептидов как полноценного класса лекарственных средств закреплено на нормативном уровне. Европейская фармакопея (Ph. Eur.), Фармакопея США (USP), Японская фармакопея (JP) и Государственная фармакопея РФ включают специальные статьи и методики, регламентирующие контроль качества пептидных препаратов. Ключевыми параметрами являются идентификация, количественное определение, оценка примесей и стабильности.

Современные аналитические методы позволяют достоверно контролировать качество пептидов: ВЭЖХ с градиентным элюированием [49], капиллярный электрофорез [50], масс-спектрометрия высокого разрешения (Orbitrap, Q-TOF, MALDI-TOF) [51], пептидное картирование. Для биотехнологических пептидов большое значение имеет проверка посттрансляционных модификаций и валидация методов в соответствии с требованиями ИСН (международный совет по гармонизации технических требований для лекарственных препаратов для медицинского применения) и внутригосударственными стандартами.

1.1.5 Перспективы лекарственных средств на пептидной основе

Перспективы пептидных препаратов связаны с несколькими направлениями. Во-первых, продолжается активное внедрение новых технологий синтеза: твёрдофазный синтез с автоматизацией [52], ферментативные и гибридные методы, использование «зелёных» химических подходов. Во-вторых, расширяется арсенал модификаций молекул, позволяющих преодолевать ограничения фармакокинетики и улучшать фармакодинамику. В-третьих, усиливается интерес к персонализированной медицине, включая создание индивидуальных вакцин и терапий.

Значимым трендом стало применение искусственного интеллекта для рационального дизайна пептидов: предсказания их конформаций, взаимодействий с рецепторами и фармакокинетических свойств [53–56]. В перспективе это позволит ускорить разработку и снизить стоимость новых лекарственных средств.

Развитие пептидно-фармацевтического направления отражает общие тенденции современной фармацевтики: уход от универсальных препаратов к более селективным, индивидуализированным и безопасным средствам терапии.

1.2 Классификация пептидов

Классификация пептидов имеет ключевое значение для систематизации знаний о строении, свойствах и механизмах действия этих молекул. Она позволяет выделить группы препаратов с близкими характеристиками и определить стратегию их разработки и применения в медицине. В современной литературе существует большое количество классификаций пептидных молекул, их препаратов и готовых лекарственных форм, в настоящей диссертационной работе мы сосредоточимся на наиболее распространённых классификациях, применяемых в фармацевтической и токсикологической химии: по количеству аминокислот в составе, по характеру модификаций молекулы, по биологическим функциям и фармакологическим свойствам. В данном разделе рассмотрим наиболее значимые критерии, имеющие прямое отношение к фармацевтическим технологиям.

1.2.1 Классификация по количеству аминокислот

Традиционно пептиды разделяют в зависимости от длины цепи аминокислотных остатков (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Классификация пептидных молекул по длине цепи
Пептиды (до 10 аминокислот).

Короткие молекулы, обладающие высокой скоростью биосинтеза и сравнительно низкой устойчивостью. Среди них выделяют биологически активные пептиды, выполняющие роль сигнальных молекул (например, ангиотензин II [57]). Их терапевтическое значение связано с возможностью точечной регуляции физиологических процессов.

Олигопептиды (10–30 аминокислот).

Более протяжённые молекулы, часто выполняющие регуляторные функции. Примером служит глюкагон [58,59] - пептид из 29 аминокислот, регулирующий уровень глюкозы в крови. В медицинской практике применяются также синтетические аналоги олигопептидов, используемые в качестве гормональных и нейромодулирующих препаратов.

Полипептиды (30–50 аминокислот).

Занимают промежуточное положение между олигопептидами и белками. В этой группе находятся многие терапевтические гормоны (инсулин - 51

аминокислота), а также нейропептиды [60]. Для них характерна большая структурная сложность и наличие вторичной структуры.

Олигомерные белки (свыше 50 аминокислот).

Такие молекулы ближе к белкам, однако в фармацевтической практике они всё ещё могут рассматриваться как пептидные препараты. Они обладают высокой биологической активностью, но требуют сложных методов получения и контроля качества.

1.2.2 Классификация по способам модификации молекулы

Современные технологии позволяют изменять искусственно синтезированные и природные пептидные молекулы, улучшая их фармакокинетические и фармакодинамические свойства (Таблица 1).

Гликозилированные пептиды. Ковалентное присоединение углеводных остатков повышает растворимость и биодоступность, а также защищает молекулу от ферментативного распада. Гликозилирование активно используется при создании пептидных вакцин и иммуномодуляторов [61,62].

Циклические пептиды. Образуются за счёт замыкания полипептидной цепи. Такая конфигурация значительно повышает устойчивость к протеолизу и может усиливать аффинность к рецепторам. В терапевтической практике используются циклоспорин (иммуносупрессор) [63] и бацитрацин (антибиотик) [64].

Пептиды с D-аминокислотами. Замена L-форм аминокислот на D-изомеры повышает устойчивость к протеазам и пролонгирует период полувыведения. Это особенно важно для создания пероральных препаратов и средств с продолжительным действием [65].

Пегилированные пептиды. Присоединение полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG) повышает липофильность и молекулярную массу активного фармацевтического ингредиента, замедляет клиренс и увеличивает стабильность [38]. В результате удаётся сократить кратность введения препарата и повысить его эффективность.

Липидированные пептиды. Присоединение жирных кислот различной природы позволяет улучшать биодоступность препарата, улучшать проникновение через мембраны и способствует образованию депо-препаратов [66,67]. Яркий пример - агонисты ГПП-1 с модификацией жирной кислотой, обладающие пролонгированным действием.

Таблица 1 - Основные модификации пептидов и их фармацевтическое значение

Вид модификации	Эффект	Примеры препаратов
Гликозилирование	Повышение растворимости и стабильности	Пептидные вакцины
Циклизация	Устойчивость к протеолизу, аффинность	Циклоспорин, бацитрацин
Включение D-аминокислот	Защита от ферментов, пролонгация терапевтического эффекта	Антимикробные пептиды
Пегилирование	Увеличение $T_{1/2}$, снижение иммуногенности, повышение липофильных свойств	Пэгвисомант[68]
Липидирование	Образование депо-препаратов, улучшение проникновения через мембраны	Лираглутид, семаглутид

1.3 Механизмы действия пептидных лекарственных средств

Механизм действия пептидных препаратов во многом определяется их природной близостью к эндогенным регуляторным молекулам. Они либо напрямую воспроизводят функции природных пептидов, либо модифицированы для пролонгации и усиления эффекта. Ключевые механизмы включают взаимодействие с мембранными рецепторами, активацию внутриклеточных

сигнальных каскадов, блокирование избыточной активности биологических систем, прямое цитотоксическое действие и иммуномодуляцию [69,70].

1.3.1 Взаимодействие с мембранными рецепторами

Наиболее распространённый путь реализации эффекта пептидных препаратов - связывание с мембранными рецепторами клеток-мишеней. Примером служит инсулин, который связывается с рецептором тирозинкиназы, что запускает фосфорилирование внутриклеточных белков и активирует каскады PI3K–Akt и MAPK [71]. В результате усиливается транспорт глюкозы в клетки и синтез гликогена, а также подавляется глюконеогенез в печени. Это классический пример точного и предсказуемого рецепторного действия.

Другим показателем силы рецепторного взаимодействия являются агонисты ГПП-1 (лираглутид [43], семаглутид [72]). Они имитируют действие инкретиновых гормонов, связываясь с ГПП-1-рецепторами, что приводит к стимуляции секреции инсулина в ответ на приём пищи, снижению секреции глюкагона и замедлению опорожнения желудка. Эти препараты сегодня широко применяются для лечения диабета 2 типа и ожирения.

К этой же категории можно отнести вазоактивные регуляторные пептиды. Например, вазопрессин связывается с V2-рецепторами в почках, усиливая реабсорбцию воды, и с V1-рецепторами в сосудах, вызывая вазоконстрикцию. На этой основе разработаны синтетические аналоги (десмопрессин [73], терлипрессин [74]), применяемые в терапии несахарного диабета и при кровотечениях из варикозно расширенных вен пищевода.

1.3.2 Влияние на внутриклеточные сигнальные пути

После связывания с рецептором пептиды активируют сложные внутриклеточные каскады. Один из наиболее универсальных - PI3K/Akt/mTOR (ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR), регулирующий метаболизм, пролиферацию и апоптоз [75]. Так действует инсулин, а также факторы роста, применяемые в регенеративной медицине. Через этот путь реализуется стимуляция синтеза белка и подавление апоптоза, что имеет значение для восстановления тканей.

Другим примером является путь JAK/STAT (янус-киназы и преобразователь сигналов и активатор транскрипции), который активируется под действием интерлейкинов и колониестимулирующих факторов [76]. Эти препараты применяются для стимуляции кроветворения (например, филграстим [77] - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). Запуск сигнального пути приводит к активации транскрипции генов, регулирующих выработку и созревание клеток крови, что крайне важно при лечении больных после химиотерапии.

Также значим путь MAPK/ERK (митоген-активируемая протеинкиназа и киназа, регулируемая внеклеточными сигналами), связанный с ростовыми факторами и пептидными гормонами. Его активация стимулирует клеточную пролиферацию и дифференцировку [78]. Это объясняет интерес к применению пептидных факторов роста в офтальмологии (например, при дегенеративных заболеваниях сетчатки) и в косметологии (регенеративные пептиды, стимулирующие синтез коллагена).

1.3.3 Антагонисты и ингибиторы

Не все пептидные препараты действуют как агонисты. В ряде случаев они выступают в роли антагонистов или ингибиторов. Примером являются аналоги соматостатина (октреотид [79], ланреотид [80]), которые связываются с рецепторами соматостатина и подавляют секрецию гормона роста, гастрина,

инсулина и других гормонов. Это используется в терапии акромегалии и нейроэндокринных опухолей.

Другой пример - пептидные антагонисты рецепторов ангиотензина II [81], блокирующие ренин-ангиотензиновую систему и применяемые для лечения артериальной гипертензии. Хотя в клинике чаще используются малые молекулы, исследования показали эффективность пептидных структур в качестве селективных блокаторов.

Кроме того, пептиды могут выступать как ингибиторы протеаз или других ферментов. Например, бортезомиб [82] (ингибитор протеасом, являющийся пептидоподобным активным ингредиентом) используется при лечении множественной миеломы [83]. Это показывает, что пептидные структуры могут избирательно блокировать ключевые ферменты опухолевых клеток.

1.3.4 Антимикробные и противоопухолевые механизмы

Антимикробные пептиды (АМП) - это естественный компонент врождённого иммунитета. Они обладают способностью связываться с мембранами микроорганизмов и нарушать их целостность. Например, дефензины [84,85] и кателицидины [86] формируют поры в мембране бактерий, что приводит к гибели клеток. На основе этих природных молекул создаются синтетические аналоги, перспективные для лечения антибиотикорезистентных инфекций.

Противоопухолевые пептиды действуют через различные механизмы [87–89]. Одни из них индуцируют апоптоз опухолевых клеток, другие подавляют ангиогенез (например, ангиостатин), третьи блокируют взаимодействие факторов роста с их рецепторами. Пептидные вакцины против опухолей стимулируют Т-клеточный ответ против специфических опухолевых антигенов, что особенно перспективно в иммунотерапии.

В ряде исследований пептиды комбинируются с наночастицами или конъюгируются с антителами для таргетной доставки в опухолевые клетки [90–92].

Это направление является одним из самых быстроразвивающихся в современной онкологии.

1.3.5 Иммуномодулирующее действие

Пептиды играют значительную роль в иммуномодуляции [93–95]. Они могут быть как антигенами, так и адъювантами. Пептидные вакцины [96,97] создаются на основе коротких аминокислотных последовательностей, соответствующих иммунодоминантным эпитопам возбудителя или опухолевого антигена. Введение таких пептидов индуцирует активацию Т-лимфоцитов и выработку специфических антител.

Примером служат пептидные вакцины против вируса папилломы человека (HPV) [98–100], разрабатываемые для профилактики рака шейки матки, и пептидные вакцины против меланомы. Эти препараты могут быть персонализированными: для каждого пациента подбирается набор эпитопов, соответствующих профилю опухолевых мутаций.

Кроме вакцин, существуют пептиды-иммуномодуляторы, которые регулируют активность врождённого и адаптивного иммунитета. Например, тимические пептиды (тимозин, тимопозтин) применялись для стимуляции иммунитета при иммунодефицитных состояниях [101]. Это направление сохраняет актуальность и сегодня в разработке средств для онкологии и инфекционной терапии [102–105].

1.4 Методы получения пептидных молекул для лекарственных средств

Современная фармацевтическая индустрия располагает целым арсеналом технологий получения пептидных молекул, которые могут использоваться в качестве активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Эти методы развивались более ста лет - от первых трудоёмких подходов к синтезу пептидных цепей до автоматизированных роботизированных систем. Условно их можно разделить на три большие группы: химический синтез, биотехнологические

методы (рекомбинантные технологии и ферментативный синтез) и гибридные подходы, совмещающие возможности обеих стратегий.

1.4.1 Химический синтез пептидных молекул

Исторически именно химический синтез стал первой технологией получения искусственных пептидов. В 1950-х годах были разработаны методы последовательного присоединения аминокислот к растущей цепи, что позволило впервые получить синтетические аналоги природных гормонов. Революцию в этой области совершил Роберт Брюс Меррифилд, предложивший в 1963 году метод твёрдофазного пептидного синтеза (SPPS - Solid Phase Peptide Synthesis) [106,107]. За это открытие он был удостоен Нобелевской премии в 1984 году.

Сегодня SPPS остаётся «золотым стандартом» для лабораторного и промышленного синтеза пептидов. Он основан на пошаговом присоединении аминокислот к пептидной цепи, закреплённой на нерастворимом носителе по следующему принципу (Fmoc-технология) [108]: обработка смолы (самыми популярными являются: смола Меррифилда [109], полиэтиленгликоль-привитый полистирол (PEG-PS) [38], акриламидопропилполиэтиленгликоль (PEGA) [110]) защищенной аминокислотой Fmoc PG (Fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group) в щелочной среде → снятие защиты Fmoc → присоединение второй аминокислоты с Fmoc PG как ацилирующего агента [111] к первой аминокислоте, в результате образуется пептидная связь → удаление защитной группы и снова присоединение аминокислоты с Fmoc PG → и так до тех пор, пока не соберётся необходимый пептид → в конце отщепление полученного пептида со смолы → очистка обращённо-фазовой хроматографией. Такой подход обеспечивает высокую эффективность реакции, лёгкость промывки и удаления побочных продуктов. Благодаря автоматизации стали возможны синтезы пептидов длиной до 50 аминокислот [112–118].

Однако у химического синтеза есть свои ограничения. Во-первых, при увеличении длины цепи снижается выход и возрастает риск образования побочных изомеров. Во-вторых, процесс требует большого количества растворителей и

реагентов, что делает его дорогим и экологически небезопасным. Тем не менее, для большинства терапевтических пептидов, включающих до 40–50 аминокислот, метод остаётся основным.

1.4.2 Биотехнологическое получение пептидов

Вторая стратегическая линия развития производства пептидных молекул - использование биотехнологических методов [119,120]. Здесь пептиды синтезируются живыми клетками, растениями или ферментами [121–123]. Наиболее распространённый подход - рекомбинантная ДНК-технология. В геном микроорганизма (обычно *E. coli* или дрожжей) встраивается ген, кодирующий нужный пептид, после чего клетка продуцирует его в больших количествах [124]. Так сегодня получают инсулин, интерфероны, колониестимулирующие факторы.

Существенным преимуществом биотехнологии является возможность получать длинные и сложные пептиды, а также белки с посттрансляционными модификациями, недостижимыми при химическом синтезе [125]. Кроме того, этот метод экономически выгоднее при больших масштабах производства.

Однако он сопряжён с рядом проблем. Во-первых, пептиды, полученные в бактериальных клетках, требуют тщательной очистки от эндотоксинов. Во-вторых, не всегда удаётся воспроизвести нужные модификации, например гликозилирование, свойственное клеткам млекопитающих. Поэтому часто используются гибридные системы - бактериальный синтез с последующей химической модификацией.

1.4.3 Ферментативный синтез и полусинтетические методы

Ферментативный синтез [126–128] основан на использовании специфических пептидаз и лигаз, которые способны собирать пептидные цепи с высокой точностью. В отличие от химических реакций, ферменты обеспечивают стереоспецифичность и чистоту продукта. Этот подход особенно ценен при

создании пептидов с нестандартными аминокислотами или модификациями [129,130].

Интересным направлением является полусинтез, когда часть молекулы получают биотехнологическим путём, а затем модифицируют химически [131]. Такой подход позволяет объединить высокую производительность рекомбинантных технологий с точностью химического синтеза. Примером могут служить пролонгированные аналоги инсулина, получаемые путём модификации рекомбинантного белка с помощью замены аминокислоты в определённой позиции на другую [132].

Недостатком ферментативных методов остаётся сложность масштабирования и высокая стоимость ферментов. Поэтому на данный момент этот подход используется преимущественно в научных исследованиях и при производстве высокоспецифичных терапевтических средств.

1.4.4 Современные тенденции и инновации в области синтеза пептидных молекул

Современные технологии активно развиваются в направлении автоматизации и устойчивого производства [133,134]. Автоматические синтезаторы нового поколения позволяют получать пептиды длиной до 100 аминокислот с высокой степенью чистоты. Ведутся исследования «зелёного» пептидного синтеза с минимальным использованием органических растворителей [52].

Особое внимание уделяется комбинированным методам: сначала пептид синтезируется химически, затем подвергается ферментативной модификации или конъюгируется с другими молекулами. Такие гибридные подходы дают возможность создавать пептиды с уникальными свойствами: увеличенным временем действия, целевой доставкой и улучшенной биодоступностью [135–137].

Кроме того, активно внедряются технологии компьютерного моделирования и искусственного интеллекта. Они позволяют предсказать оптимальные стратегии

синтеза, выбрать подходящие модификации и ускорить процесс разработки новых пептидных препаратов. Таблица 2 демонстрирует сравнительную характеристику вышеописанных методов.

Таблица 2 - Сравнение методов получения пептидных молекул

Метод	Преимущества	Недостатки	Примеры препаратов
Химический синтез	Универсальность, автоматизация, высокая точность	Ограничение по длине цепи, высокая стоимость, получение изомеров	Октреотид, лираглутид
Рекомбинантные технологии	Масштабируемость, низкая себестоимость	Необходимость очистки, сложные модификации	Инсулин, интерфероны
Ферментативный синтез	Высокая стереоспецифичность, чистота	Дороговизна, сложность масштабирования	Прототипы антимикробных пептидов
Полусинтетические методы	Комбинация преимуществ биотехнологии и химии	Сложность производства	Пролонгированные аналоги инсулина

1.5 Методы контроля качества пептидных лекарственных средств

1.5.1 Аналитическая стратегия: критические показатели (атрибуты) качества (CQA, Critical Quality Attributes), подход «Качество через проектирование» (QbD, Quality by Design) и жизненный цикл методик

Контроль качества пептидного препарата начинается с определения критических показателей (атрибутов) качества (CQA). Это параметры (преимущественно фармакопейные), которые напрямую влияют на эффективность и безопасность лекарственного средства: чистота, наличие примесей, агрегаты, правильность аминокислотной последовательности, стереохимия (наличие D- или L-изомеров), модификации концевых групп, остаточные реагенты и соли-противоионы.

Современный подход «Качество через проектирование» (QbD) требует выстраивать стратегию контроля, исходя из целевого профиля качества препарата. Это означает, что выбирается набор аналитических методик, которые в комплексе закрывают все показатели качества препарата. При этом важно, чтобы методы дополняли друг друга. Например, ВЭЖХ в обращённо-фазовом режиме (ОФ-ВЭЖХ, RP-HPLC - Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography) эффективно разделяет близкородственные примеси [49], а капиллярный электрофорез (CE, Capillary Electrophoresis) позволяет обнаружить зарядовые изомеры [138].

Для пептидов особенно важны так называемые стабильности-индикаторные методы, которые могут выявлять продукты форсированных деградаций: деамидирование, окисление, расщепления в аминокислотной последовательности. Эти методы верифицируются на примерах искусственно состаренного препарата и должны обеспечивать разделение всех типичных продуктов распада.

В жизненный цикл аналитической методики входят: разработка, валидация по критериям Международного совета по гармонизации (ICH Q2) и внутригосударственным стандартам (Например: ГФ РФ), рутинное применение в

контроле качества, а также мониторинг воспроизводимости при переносе методики в другие лаборатории. Обязательным элементом является система пригодности (system suitability), которая позволяет удостовериться, что методика работает при заданных параметрах - например, что разрешение между основным пиком и ближайшей примесью не менее 1,5, а погрешность масс-спектрометрии не превышает ± 5 ppm (parts per million - частей на миллион).

Контроль качества пептидов строится как многоуровневая система, где каждый метод отвечает за свой набор показателей, а их комбинация обеспечивает полное представление о качестве и стабильности препарата.

1.5.2 Хроматографические методы: ВЭЖХ в обращённо-фазовом режиме (ОФ-ВЭЖХ, RP-HPLC), ионообменная хроматография (ИЭХ), гель-фильтрация (SEC) и гидрофильная хроматография (HILIC)

Хроматографические методы занимают центральное место в контроле качества пептидных лекарственных средств. Наиболее распространённым подходом является обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ, RP-HPLC - Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). ВЭЖХ позволяет эффективно разделять пептиды и их близкородственные примеси благодаря различиям в гидрофобности. В частности, примеси, где отсутствует одна или две аминокислоты (делецийные примеси), имеют сдвинутое время удерживания и могут быть надёжно определены [139–149].

Классическим элюентом в ОФ-ВЭЖХ является смесь воды и ацетонитрила или метанола с добавлением модификаторов подвижной фазы. Наиболее часто используют трифторуксусную кислоту (TFA), которая улучшает форму пиков, но снижает чувствительность масс-спектрометрии. Поэтому в контроле качества часто применяют два режима: ОФ-ВЭЖХ с TFA для оценки чистоты и ОФ-ВЭЖХ с летучими буферами (формиат или ацетат) в связке с масс-спектрометрией для подтверждения идентичности.

Ионообменная хроматография (ИЕХ - Ion Exchange Chromatography) применяется для разделения пептидов, различающихся по заряду. Она особенно полезна для контроля изомеров и продуктов деградации, например, при деамидировании Asn (аспарагин) или Gln (глутамин). Катионообменный режим позволяет выявлять примеси с изменённым зарядом, которые могут быть неотличимы в ОФ-ВЭЖХ [150].

Гель-фильтрация, или эксклюзионная хроматография (SEC - Size Exclusion Chromatography), используется для оценки наличия агрегатов и высокомолекулярных примесей. Этот метод важен для полипептидов и конъюгированных молекул, которые склонны к самоассоциации. SEC даёт информацию о распределении по молекулярной массе и помогает выявлять склонность препарата к образованию агрегатов в процессе хранения [151].

Гидрофильная хроматография (HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) служит полезным дополнением к RP-HPLC, так как лучше разделяет очень полярные соединения и фрагменты. Например, короткие гидрофильные пептиды могут сливаться с фронтом в ОФ-ВЭЖХ, но хорошо разделяются в HILIC. Поэтому этот метод часто используют в качестве дополнительного [152,153].

Современные системы хроматографии оснащаются различными детекторами: ультрафиолетовыми (обычно 214 и 280 нм), флуоресцентными, а также универсальными детекторами типа CAD (детектор зарядового аэрозоля) или ELSD (детектор испарения с рассеянным светом). В связке с масс-спектрометрией (ЖХ-МС, LC-MS [154]) хроматография становится мощным инструментом для одновременной оценки чистоты, идентичности и профиля примесей.

Комбинация хроматографических методов позволяет выявить широкий спектр возможных примесей пептидов, оценить их агрегатное состояние и подтвердить идентичность молекулы. Это делает хроматографию базовой платформой контроля качества пептидных лекарственных средств.

1.5.3 Электрофоретические и спектроскопические методы

Капиллярный электрофорез (CE - Capillary Electrophoresis) [155] и его разновидности - зонный капиллярный электрофорез (CZE - Capillary Zone Electrophoresis) [156], капиллярный гель-электрофорез (CGE - Capillary Gel Electrophoresis), а также электрофорез с додецилсульфатом натрия (CE-SDS - Capillary Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate) [157] - являются важными методами контроля качества пептидов. Они обеспечивают разделение молекул по заряду и массе и позволяют выявлять даже те примеси, которые трудно обнаружить с помощью ВЭЖХ. Например, деамидированные формы или эпимеры могут хорошо различаться именно в электрофоретических системах [158,159].

Круговой дихроизм (CD - Circular Dichroism) [160,161] и инфракрасная спектроскопия (ИК) Фурье (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) [162] применяются для оценки вторичной структуры пептидов. Эти методы особенно важны для циклических и модифицированных пептидов, где пространственная организация напрямую влияет на их биологическую активность. С помощью CD можно различать α -спиральные и β -структуры, а FTIR позволяет оценить конформацию в разных средах и при стрессовых условиях.

Флуоресцентная спектроскопия [163] также используется для контроля микроокружения ароматических аминокислот (например, триптофана). Сдвиг флуоресцентных максимумов и изменение квантового выхода излучения сигнализируют о сворачивании пептида или образовании агрегатов. Эти методы являются быстрыми и малозатратными и применяются для экспресс-контроль качества и стабильности.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР - NMR, Nuclear Magnetic Resonance) используется для детального подтверждения структуры пептидов, особенно в случаях, когда требуется доказать правильность концевых модификаций или выявить цис/транс-изомеры [164]. Несмотря на то, что ЯМР применяется реже в классическом контроле качества, он незаменим при валидации эталонных образцов и разработке новых молекул [165].

Динамическое рассеяние света (ДЛС – DLS, Dynamic Light Scattering) - один из ключевых методов для контроля качества пептидов, склонных к агрегации. Он позволяет измерять гидродинамический диаметр частиц в растворе и выявлять наличие олигомеров и агрегатов. Для пептидов и их конъюгатов ДЛС даёт информацию о распределении по размерам и может фиксировать даже ранние стадии агрегации, которые не видны в SEC [166].

Малоугловое лазерное светорассеяние (LALLS - Low Angle Laser Light Scattering) используется для оценки молекулярной массы и полидисперсности пептидов в растворе. Этот метод особенно ценен для анализа конъюгированных и липидированных пептидов, где классические хроматографические методы могут давать искажённые результаты. В сочетании с SEC (SEC-LALLS) он обеспечивает прямое измерение молекулярной массы без зависимости от калибровочных стандартов [167].

Измерение ζ -потенциала (zeta-potential) позволяет оценить поверхностный заряд пептидных частиц или их агрегатов в растворе. Этот показатель напрямую связан с коллоидной стабильностью: чем выше модуль ζ -потенциала (обычно более ± 30 мВ), тем устойчивее система. Для пептидов ζ -потенциал используют как критерий выбора буферов и условий хранения, а также для прогнозирования склонности к агрегации [168].

Совокупность электрофоретических, спектроскопических и лазерных методов позволяет сформировать «биофизический портрет» пептида: его конформацию, стабильность, зарядовые характеристики и склонность к агрегации. Эти данные играют критическую роль не только при выпуске препарата, но и на этапе разработки и выбора готовой лекарственной формы.

1.5.4 Масс-спектрометрия высокого разрешения: электроспрей-ионизация (ESI-MS), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI-TOF), tandemная масс-спектрометрия (MS/MS) и анализатор орбитальной ионной ловушки (Orbitrap)

Масс-спектрометрия (МС - MS, Mass Spectrometry) является одним из наиболее мощных инструментов в контроле качества пептидов. Она позволяет не только подтвердить молекулярную массу и аминокислотную последовательность, но и выявить продукты деградации, посттрансляционные модификации и близкородственные примеси. Благодаря высокой чувствительности и специфичности МС стала «золотым стандартом» для структурного анализа биомолекул [169–174].

Электроспрей-ионизация (ESI-MS - Electrospray Ionization Mass Spectrometry) обеспечивает мягкую ионизацию пептидов и образование многозарядных ионов, что облегчает анализ даже длинных цепей. В связке с жидкостной хроматографией (LC-ESI-MS) метод позволяет одновременно разделять и идентифицировать примеси, включая примесные продукты и модифицированные формы. Этот подход стал стандартом для идентификации терапевтических пептидов в спецификациях [175].

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с анализом по времени пролёта (MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) удобна для быстрого скрининга молекулярной массы. Метод часто применяется для проверки «массы-как-ожидалось» и выявления крупных примесей. MALDI-TOF требует минимальной подготовки образца и позволяет анализировать десятки проб в течение нескольких минут, что делает его полезным в рутинном контроле качества. Однако метод менее чувствителен к низкоуровневым примесям и менее информативен для структурного анализа [176].

Особое значение имеет использование масс-спектрометров высокого разрешения (HRMS - High-Resolution Mass Spectrometry), таких как анализатор орбитальной ионной ловушки (Orbitrap) и квадруполь-времяпролётные системы (Q-TOF). Эти приборы обеспечивают определение точной массы с погрешностью в единицы ppm. Это позволяет различать изобарные соединения, например продукты окисления (+16 Да) и деамидирования (+1 Да), а также выявлять редкие формы деградации, такие как образование дикетопиперазина (–18 Да) [177].

Тандемная масс-спектрометрия (МС-МС, MS/MS, Tandem Mass Spectrometry) используется для подтверждения аминокислотной последовательности и локализации модификаций. В режиме коллизионной индуцированной диссоциации (CID, Collision-Induced Dissociation) [178] или высокоэнергетической диссоциации (HCD, Higher-energy Collisional Dissociation) [179] формируются ионы b- и y-рядов, которые позволяют «прочитать» последовательность пептида. Электронная диссоциация переноса (ETD, Electron Transfer Dissociation) [180] или комбинированная фрагментация (EThcD) применяются для анализа нестабильных модификаций, таких как гликозилирование или липидирование [181].

Для количественного анализа критических примесей всё шире применяются методы целевого мониторинга: PRM (Parallel Reaction Monitoring - параллельный мониторинг реакций) [182] и SRM (Selected Reaction Monitoring - выборочный мониторинг реакций) [183]. Эти методы позволяют отслеживать заранее известные ионные переходы и количественно определять примеси на уровне долей процента, что важно для контроля продуктов деградации, которые могут влиять на безопасность.

Масс-спектрометрия высокого разрешения обеспечивает как качественный, так и количественный контроль пептидных лекарственных средств. В современном контроле качества её используют в тандемном режиме: жидкостная хроматография – масс-спектрометрия высокого разрешения (ЖХ-МСВР, LC-HRMS) для идентификации и структурного анализа, а параллельный и выборочный мониторинг реакций (PRM/SRM) для рутинного количественного мониторинга специфических примесей. Такой подход объединяет глубину исследования и скорость анализа, что делает масс-спектрометрию незаменимой частью аналитического арсенала.

1.5.5 Подтверждение структуры: пептидное картирование, аминокислотный анализ и контроль концевых групп

Подтверждение структуры является ключевым этапом контроля качества пептидных лекарств. Даже если молекулярная масса совпадает с теоретической, это не гарантирует правильность последовательности или наличие всех требуемых модификаций. Поэтому применяются несколько взаимодополняющих методик, каждая из которых позволяет оценить определённый аспект структуры.

Пептидное картирование (peptide mapping - картирование пептидных фрагментов) является «золотым стандартом» для подтверждения аминокислотной последовательности. Суть метода заключается в ферментативном гидролизе пептида протеазами (обычно трипсином или химотрипсином) с последующим анализом фрагментов с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС, LC-MS/MS). Полученный набор пептидных карт сопоставляют с теоретически ожидаемым, что позволяет подтвердить полную идентичность последовательности, а также локализовать посттрансляционные модификации - окисление Met (метионина), деамидирование Asn/Gln, циклизацию N-концевого глутамина [184,185].

Аминокислотный анализ (ААА - Amino Acid Analysis) используется для количественного подтверждения состава пептида. Образец гидролизуют в условиях, при которых аминокислоты высвобождаются в свободной форме (обычно при 6М HCl, 110 °С, 24 ч), после чего проводят их количественное определение с помощью ВЭЖХ или капиллярного электрофореза. Сравнение экспериментального и теоретического состава подтверждает правильность синтеза и отсутствие крупных ошибок. ААА часто используют для калибровки эталонных стандартов и при выпуске серии в промышленном масштабе [186,187].

Определение концевых групп необходимо для контроля правильности модификаций N- и С-концов пептида. Для N-конца часто применяется деградация по Эдману (Edman degradation), при которой происходит последовательное отщепление аминокислот с N-конца и их идентификация. Этот метод позволяет подтвердить первые 20–30 остатков пептида, что критически важно для доказательства идентичности. Для С-конца используются методы дериватизации и

масс-спектрометрия, позволяющие подтвердить наличие амидирования или свободной карбоксильной группы [188–190].

Наличие модификаций на концах пептида (ацетилирование, амидирование) играет важную роль в фармакокинетике. Например, ацетилирование N-конца защищает молекулу от экзопептидаз, а амидирование C-конца повышает её стабильность. Поэтому подтверждение этих модификаций является обязательным требованием при выпуске терапевтических пептидов.

В ряде случаев применяются дополнительные методы — спектроскопия ЯМР (NMR) для подтверждения стереохимии, а также масс-спектрометрия с использованием методов ETD (Electron Transfer Dissociation) или EThcD, которые позволяют точно локализовать модификации и концевые группы [165].

Комбинация пептидного картирования, аминокислотного анализа и определения концевых групп обеспечивает полное подтверждение структуры пептида и служит базовым элементом спецификаций в международной и государственной фармакопее.

1.5.6 Примеси и стабильность

Пептидные лекарственные препараты характеризуются сложным профилем примесей и чувствительностью к различным факторам внешней среды. Поэтому контроль примесей и оценка стабильности играют критическую роль в обеспечении их качества и безопасности.

Примеси синтетического происхождения. При химическом синтезе пептидов (особенно методом твёрдофазного синтеза, SPPS) образуются характерные примеси: делецийные и вставочные продукты, эпи-изомеры, продукты неполной деацилиации и побочные циклизации. Эти примеси могут обладать иной фармакологической активностью или вызывать иммуногенность. Для их выявления применяют RP-HPLC, HILIC и масс-спектрометрию высокого разрешения (Orbitrap, Q-TOF) [191].

Продукты деградации. Наиболее распространённые пути деградации пептидов включают: деамидирование (Asn, Gln $\rightarrow$ Asp, Glu), которое приводит к изменению заряда; окисление (Met, Trp, Cys), изменяющее гидрофобность и конформацию; образование дикетопиперазина (DKP) за счёт циклизации N-концевых аминокислот; расщепления в последовательности, особенно по Asp и в участках с Gly.

Эти процессы ускоряются при повышенной температуре, экстремальном pH или воздействии света.

Остаточные реагенты и растворители. При синтезе и очистке пептидов используются такие вещества, как диметилформамид (ДМФА, DMF), дихлорметан (DCM), трифторуксусная кислота (TFA). Их уровни контролируются в соответствии с руководством ICH Q3C («Остаточные растворители») и ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители», чаще всего с помощью газовой хроматографии (ГХ, GC).

Элементные примеси. При использовании катализаторов и реактивов могут попадать тяжёлые металлы (Pd, Pt, Ni). Их контроль обязателен по требованиям ICH Q3D («Элементные примеси») и ОФС.1.1.0040 «Элементные примеси» ГФ РФ XV издания. Для этого применяются методы масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС, ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), а также «атомно-эмиссионная спектрометрия», «атомно-абсорбционная спектрометрия», «рентгеновская флуоресцентная спектрометрия», «атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой»

Агрегация и физическая стабильность. Пептиды склонны к образованию димеров, олигомеров и агрегатов. Для их контроля используются методы SEC, DLS, LALLS и измерение ζ -потенциала. Эти методы позволяют оценить распределение по размерам, молекулярную массу и поверхностный заряд, что служит критерием устойчивости препарата.

Испытания стабильности (ОФС.1.1.0009.18 "Стабильность и сроки годности лекарственных средств"). Проводятся в двух режимах: долгосрочные (обычно при 5 ± 3 °C или 25 °C) и ускоренные (40 °C, высокая влажность).

Дополнительно применяются форсированные условия (стресс-тесты), при которых препарат подвергается экстремальному нагреву (60°C и выше), ультрафиолетовому излучению, окислителям или кислым/щелочным средам. Цель - убедиться, что выбранные аналитические методы действительно специфичны и способны фиксировать все продукты деградации.

Критическая роль стабильности. Даже незначительные изменения в составе примесей могут влиять на иммуногенность и эффективность пептида. Поэтому международные и национальные фармакопеи требуют обязательного включения данных о деградации и стабильности в регистрационное досье. В спецификации указываются допустимые уровни примесей (обычно <1 % для каждой индивидуальной примеси и <5 % для суммы).

Система контроля примесей и стабильности пептидов включает сочетание химических, физико-химических и биофизических методов, позволяющих выявлять и количественно определять все возможные продукты синтеза и деградации. Это гарантирует безопасность и воспроизводимость действия препарата на протяжении всего срока хранения.

1.5.7 Регуляторные и фармакопейные требования

Контроль качества пептидных лекарственных средств осуществляется в соответствии с требованиями как международных, так и национальных регуляторных органов. Главная цель заключается в том, чтобы гарантировать безопасность, эффективность и воспроизводимость действия препарата на протяжении всего жизненного цикла.

Фармакопейные требования. Европейская фармакопея (Ph. Eur.), Фармакопея США (USP), Японская фармакопея (JP) и Государственная фармакопея Российской Федерации (Государственная фармакопея Российской Федерации) содержат специальные главы, посвящённые контролю качества пептидных препаратов. В них описаны методы идентификации (ВЭЖХ, масс-спектрометрия), испытания на чистоту (определение примесей и остаточных

растворителей), количественное определение (обычно с использованием ВЭЖХ или аминокислотного анализа), а также тесты на стабильность.

Руководства ICH. Международный совет по гармонизации технических требований к фармацевтическим средствам (ICH, International Council for Harmonisation) разработал ряд ключевых документов:

- ICH Q2 - «Валидация аналитических процедур» (Validation of Analytical Procedures);
- ICH Q3A–Q3D - «Примеси» (Impurities), включая органические, неорганические и остаточные растворители;
- ICH Q5C - «Стабильность биотехнологических/биологических препаратов» (Stability of Biotechnological/Biological Products).

Эти документы гармонизируют требования разных стран и позволяют строить единую стратегию контроля.

Валидация методик (ОФС.1.1.0012 "Валидация аналитических методик"). Каждая аналитическая методика должна быть валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, прецизионность, диапазон, точность, воспроизводимость, пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ). Например, метод ОФ-ВЭЖХ для определения примесей валидируется так, чтобы минимальный пик примеси (~0,1 %) был отчётливо обнаружен и количественно определён.

GMP-требования. В условиях промышленного производства контроль качества проводится в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (GMP, Good Manufacturing Practice). Это включает квалификацию оборудования, валидацию аналитических методик, систему управления изменениями, прослеживаемость эталонов и образцов, а также контроль электронных данных в соответствии с принципами ALCOA+ (Attributable (Приписываемость), Legible (Разборчивость), Contemporaneous (Своевременность), Original (Оригинальность), Accurate (Точность) + Complete (Полнота), Consistent (Последовательность), Enduring (Устойчивость, долговечность), Available (Доступность)).

Жизненный цикл аналитических процедур. Современные подходы требуют рассматривать методики не как статичные, а как динамичные инструменты, которые должны сопровождать продукт от разработки до постмаркетингового контроля. Это подразумевает постоянное совершенствование методов, введение новых технологий (например, масс-спектрометрия высокого разрешения, CE-MS, DLS) и адаптацию спецификаций в зависимости от накопленных данных.

Регистрационное досье. Для регистрации пептидного препарата производитель обязан представить полный пакет данных: описание субстанции, спецификации, методы контроля, валидационные отчёты, результаты испытаний стабильности и доказательства воспроизводимости производства. На международном уровне это соответствует требованиям CTD (Common Technical Document - Единый технический документ), который принимается EMA, FDA и другими агентствами.

Таким образом, регуляторная система опирается на фармакопейные стандарты, международные руководства ICH и практику GMP, обеспечивая единый и прозрачный подход к контролю качества пептидных лекарственных средств. Это гарантирует не только их соответствие требованиям безопасности, но и глобальную взаимозаменяемость аналитических данных между странами.

1.6 Примеры лекарственных препаратов и биологически активных добавок на пептидной основе

1.6.1 Гормональные пептиды

Классическим примером пептидных лекарственных средств является инсулин - первый терапевтический полипептид, полученный для лечения сахарного диабета. Изначально он выделялся из поджелудочной железы животных, но сегодня производится рекомбинантными методами. Разработаны многочисленные аналоги инсулина (гларгин, детемир, деглудек), которые отличаются скоростью наступления эффекта и длительностью действия. Это

позволило адаптировать терапию под индивидуальные потребности пациентов [192–194].

Другим важным гормональным пептидом является глюкагоноподобный пептид-1 и его аналоги (лираглутид, семаглутид). Эти препараты применяются для лечения диабета 2 типа и ожирения, так как регулируют уровень глюкозы и снижают аппетит. Их модификации (липидирование, пегилирование) продлевают время действия до 1 недели [195,196].

Окситоцин и вазопрессин являются примерами коротких циклических регуляторных пептидных гормонов. Окситоцин используется в акушерстве для стимуляции родовой деятельности, а вазопрессин и его аналоги (десмопрессин, терлипрессин) применяются для контроля диуреза и лечения кровотечений.

1.6.2 Антимикробные и противоопухолевые пептиды

Антимикробные пептиды (АМП), такие как дефензины и кателицидины, рассматриваются как альтернатива традиционным антибиотикам. Их механизм основан на разрушении мембран микроорганизмов за счёт образования пор. В настоящее время ведутся клинические исследования синтетических аналогов АМП для лечения устойчивых бактериальных инфекций и грибковых заболеваний [67,197–215].

Противоопухолевые пептиды могут действовать двумя путями: напрямую вызывать гибель опухолевых клеток или служить в качестве направляющих лигандов для доставки химиотерапевтических агентов. Например, пептиды RGD, связывающиеся с интегринами, используются для адресной доставки лекарств в опухолевую ткань [216–218].

Разрабатываются также вакцинные пептиды для онкологии. Такие препараты содержат фрагменты опухолевых антигенов, способные индуцировать Т-клеточный иммунный ответ. Клинические испытания показывают перспективность пептидных вакцин при меланоме, раке простаты и раке лёгкого [219,220].

1.6.3 Кардиопротекторные и нейропротекторные пептиды

Пептиды, влияющие на сердечно-сосудистую систему, включают аналоги натрийуретических пептидов (несиритид), которые используются для лечения сердечной недостаточности. Они снижают преднагрузку и постнагрузку на сердце, а также способствуют выведению натрия и воды.

Ангиотензиновые пептиды и их синтетические аналоги играют важную роль в регуляции артериального давления. Исследуются пептиды-блокаторы рецепторов ангиотензина II, обладающие мягким гипотензивным действием. Они могут стать альтернативой традиционным ингибиторам АПФ при непереносимости последних.

Нейропротекторные пептиды (Семакс, Селанк, Ренобрейн СМ, Кортексин) разработаны в России и применяются для коррекции когнитивных нарушений, тревожных состояний и последствий инсульта. Их действие связано с модуляцией нейропептидных систем мозга и влиянием на экспрессию нейротрофических факторов[13,18,221–224].

1.6.4 Биологически активные добавки (БАДы) на основе пептидов

Широкое распространение получили БАДы с пептидами животного происхождения — гидролизаты коллагена, казеина, соевого белка. Они содержат смесь коротких пептидов и аминокислот, которые позиционируются как средства для укрепления суставов, кожи, волос и ногтей. Их эффективность частично подтверждена клиническими исследованиями, но во многом остаётся предметом дискуссий [225].

Пептиды животного происхождения (например, цитомедины) применяются в России и странах СНГ как регуляторы функций органов и тканей. Предполагается, что они действуют как сигнальные молекулы, стимулируя процессы регенерации. Однако их клиническая доказательная база ограничена.

На рынке также присутствуют синтетические пептиды-космецевтики, такие как аргирелин (Argireline), который позиционируется как «альтернатива ботоксу»

для уменьшения мимических морщин. Эти средства популярны в косметологии и демонстрируют хороший коммерческий успех, хотя их медицинская ценность ограничена [226].

1.7 Вывод литературного обзора

Суммируя данные литературы, можно утверждать, что ключевым вызовом современной фармацевтической химии остаётся создание экспресс-методов контроля пептидных лекарственных средств, способных подтвердить их подлинность и стабильность без разрушения образца. Особый интерес вызывает поиск методик, учитывающих уникальную способность регуляторных пептидов формировать плотностные неоднородности и излучать в миллиметровом диапазоне.

В настоящем исследовании акцент был сделан на применении и развитии трёх методических направлений: динамического лазерного светорассеяния, кинетики диффузного отражения (2D-DLS) и регистрации радиотеплового излучения растворов пептидов. Эти методы, а также используемые препараты (олиго- и полипептиды животного и растительного происхождения, аптечные лекарственные формы) подробно описаны в следующем разделе «Материалы и методы».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Лекарственные препараты на основе пептидов

1) Лекарственный препарат (ЛП) «Семакс» рег. № ЛП-(009449)-(РГ-RU) от 26.03.25, классификация анатомо-терапевтическо-химическая (АТХ) N06BX метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин, производителя АО "ИНПЦ "Пептоген", Россия. Лекарственная форма – капли назальные. Содержание действующего вещества (ДВ) – 0.1%. Концентрация - 1,1 μM (1 мл);

2) ЛП «Кортексин» рег. № ЛП-№(000620)-(РГ-RU) от 09.03.2022, классификация АТХ N06BX Полипептиды коры головного мозга скота, производителя ООО "ГЕРОФАРМ", Россия. Лекарственная форма – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Содержание ДВ – 5 мг в 1 флаконе. Концентрация – 0,5 μM (1 мл);

3) ЛП «Ретиналамин» рег. № ЛП-№(000519)-(РГ-RU) от 21.01.2022, классификация АТХ S01XA Полипептиды сетчатки глаз скота, производителя ООО "ГЕРОФАРМ", Россия. Лекарственная форма – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и парабульбарного введения. Содержание ДВ – 5 мг в 1 флаконе. Концентрация – 0,5 μM (1 мл);

4) ЛП «Церебролизин» рег. № ЛП-№(009552)-(РГ-RU) от 02.04.2025, классификация АТХ N06BX комплекс пептидов из головного мозга свиньи, производителя ЭВЕР Нейро Фарма ГмбХ, Австрия. Лекарственная форма – раствор для инъекций. Содержание ДВ – 215.2 мг/мл. Концентрация – 20 нМ (1 мл);

5) ЛП «Ренобрейн СМ» рег. № ЛП-№(005724)-(РГ-RU) от 11.06.2024, классификация АТХ N06BX Полипептиды коры головного мозга скота, производителя ООО "Самсон-Мед", Россия. Лекарственная форма – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Содержание ДВ – 10 мг в 1 флаконе. Концентрация – 1 μM (1 мл).

2.1.2 Биологически активные олигопептиды – продукты химического синтеза.

1) Пептид дельта сна, ранее был активным фармацевтическим ингредиентом препарата «Дельтаран» (DSIP), CAS No.: 62568-57-4, Аминокислотная последовательность: Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (848.81 Да) производителя ООО "Рашн Пептаид", Россия. Форма – раствор. Содержание пептида: 0,05% (5 мг). Концентрация – 6 μ M (1 мл);

2) Окситоцин (Oxytocin), CAS No.: 50-56-6, Аминокислотная последовательность: Cys(1)-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys(1)-Pro-Leu-Gly-NH₂ (1007,19 Да) производителя ООО "Рашн Пептаид", Россия. Форма – раствор. Содержание пептида: 40 МЕ/мл.

3) Меланотан-2 (Melanotan-2(II)), CAS No.: 121062-08-6, Аминокислотная последовательность: Ac-Nle-cyclo[Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-NH₂ (1024,179 Да) производителя ООО "Рашн Пептаид", Россия. Форма – раствор. Содержание пептида: 10 мг. Концентрация – 10 μ M (1 мл).

2.1.3 Биологически активные пептиды растительного происхождения

1) Пептид КН9, Аминокислотная последовательность: КНКНКНКНКНКНКНКНКНKKLFKKILKYL. Интернализуемый пептид (СРР). Пептид был получен путем твердофазного синтеза на базе флуоренилметоксикарбонильной защитной группы (FMOC) технологии. После проведения очистки пептида методом ВЭЖХ и лиофилизации была подтверждена чистота и идентичность пептидного препарата на уровне 95% методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии - расчетный моноизотопный молекулярный ион с массой 3808,33 Да. Концентрация – 1 μ M (1 мл). Любезно предоставлен ГНЦ ИБХ РАН

2) Пептид StSys1, Аминокислотная последовательность: AVHSTPPSKRDPPKMQTD. Сигнальный пептид картофеля *Solanum tuberosum* (системин). Пептид получен путем твердофазного синтеза на базе FMOC

технологии, очищенный методом ВЭЖХ и верифицированный с использованием масс-спектрометрии. Расчетная масса по двум изотопам равняется 1992,221 Да, а расчетный моноизотопный молекулярный ион имеет массу 1990,979 Да. Концентрация – 1 μM (1 мл). Любезно предоставлен ГНЦ ИБХ РАН;

3) Пептид StPep1, Аминокислотная последовательность: ATERRGRPPSRPKVGSGPPPQNN. Эндогенный пептидный элиситор. Пептид был получен твердофазным синтезом на базе FMOC технологии. После проведения очистки пептида методом ВЭЖХ и лиофилизации была подтверждена чистота и идентичность пептидного препарата на уровне 95% методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии - расчетный моноизотопный молекулярный вес пептида с одним протоном – 2455,29 Да, с двумя протонами – 1228,15 Да. Концентрация – 1 μM (1 мл). Любезно предоставлен ГНЦ ИБХ РАН.

2.1.4 Остальные реактивы для исследований

Деионизированная высокоомная вода (18,2 $\text{M}\Omega \times \text{см}$ при 25 °C), прошедшая очистку на установке Milli-Q производителя Merck Millipore, США. Содержание дейтерия в воде $[\text{D}/\text{H}] = 140,0 \pm 1,0 \text{ ppm}$; Буфер TNC (0.01 М Трис(гидроксиметил)аминометан; 0,14 М NaCl; 0,01 М CaCl₂; pH 7,2–7,4); Натрия хлорид Реневал буфус ампулы 0,9% 5мл №10, ATX V07AB

2.2 Методы исследования

2.2.1 Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС, DLS, Dynamic Light Scattering)

Метод динамического лазерного светорассеяния (ДЛС, DLS, Dynamic Light Scattering) [227] является одним из наиболее широко применяемых биофизических подходов для анализа пептидных и белковых препаратов. Его принцип основан на регистрации флуктуаций интенсивности рассеянного света, возникающих при броуновском движении частиц в растворе. По этим колебаниям рассчитывается коэффициент диффузии частиц, который, в свою очередь, позволяет определить их гидродинамический диаметр. Размер частиц рассчитывается с использованием уравнения Стокса–Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

где D – коэффициент диффузии, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость, а r – радиус частицы.

Одним из ключевых достоинств метода ДЛС является его неразрушающий характер: анализ проводится в растворе без предварительной модификации или метки молекул. Это особенно важно для пептидов, которые чувствительны к внешним воздействиям и могут изменять свои свойства при агрессивных аналитических процедурах (ВЭЖХ, электрофорез и тд.). В условиях физиологических буферов ДЛС позволяет объективно оценить распределение частиц по размерам, гетерогенность образца, а также наличие агрегатов, что критически важно при контроле качества пептидных препаратов.

Применительно к пептидным лекарственным препаратам метод ДЛС используется для решения целого ряда задач. Во-первых, он позволяет определять степень агрегации, которая может возникать при хранении или в процессе растворения препарата. Агрегаты, образующиеся даже в небольших количествах, способны значительно снижать биологическую активность и повышать риск

иммуногенности. Во-вторых, ДЛС позволяет оценивать стабильность пептидов в различных условиях: при изменении температуры, pH, ионной силы среды.

Особое внимание при применении ДЛС уделяется параметру полидисперсности (PDI, polydispersity index), который отражает гомогенность или, напротив, неоднородность распределения частиц в растворе. Для пептидных препаратов низкие значения PDI (0,05–0,20) свидетельствуют о наличии преимущественно мономерных или равномерных олигомерных форм, тогда как увеличение показателя говорит о формировании агрегатов. В случае комплексных препаратов высокая полидисперсность является ожидаемой и отражает естественную вариабельность фракционного состава.

Важной возможностью метода ДЛС является проведение температурных и временных серий экспериментов. При поэтапном изменении температуры можно регистрировать момент начала денатурации или агрегации пептида, что служит индикатором его физико-химической стабильности. Динамические измерения во времени позволяют отслеживать процессы самоассоциации или деградации, что особенно ценно при оценке стабильности в моделируемых условиях хранения.

Приборы для ДЛС (например, Zetasizer Nano ZSP, Malvern Instruments, Великобритания) обеспечивают высокую чувствительность и позволяют регистрировать частицы в диапазоне от 0,1 нм до нескольких микрометров. В исследовании пептидных препаратов данная методика применялась для анализа как синтетических олигопептидов, так и фармацевтических композиций. Полученные данные позволили судить о молекулярной стабильности, склонности к агрегации и специфичности взаимодействий пептидов с компонентами растворителя. Графическое представление экспериментальной установки показано на Рисунке 2.

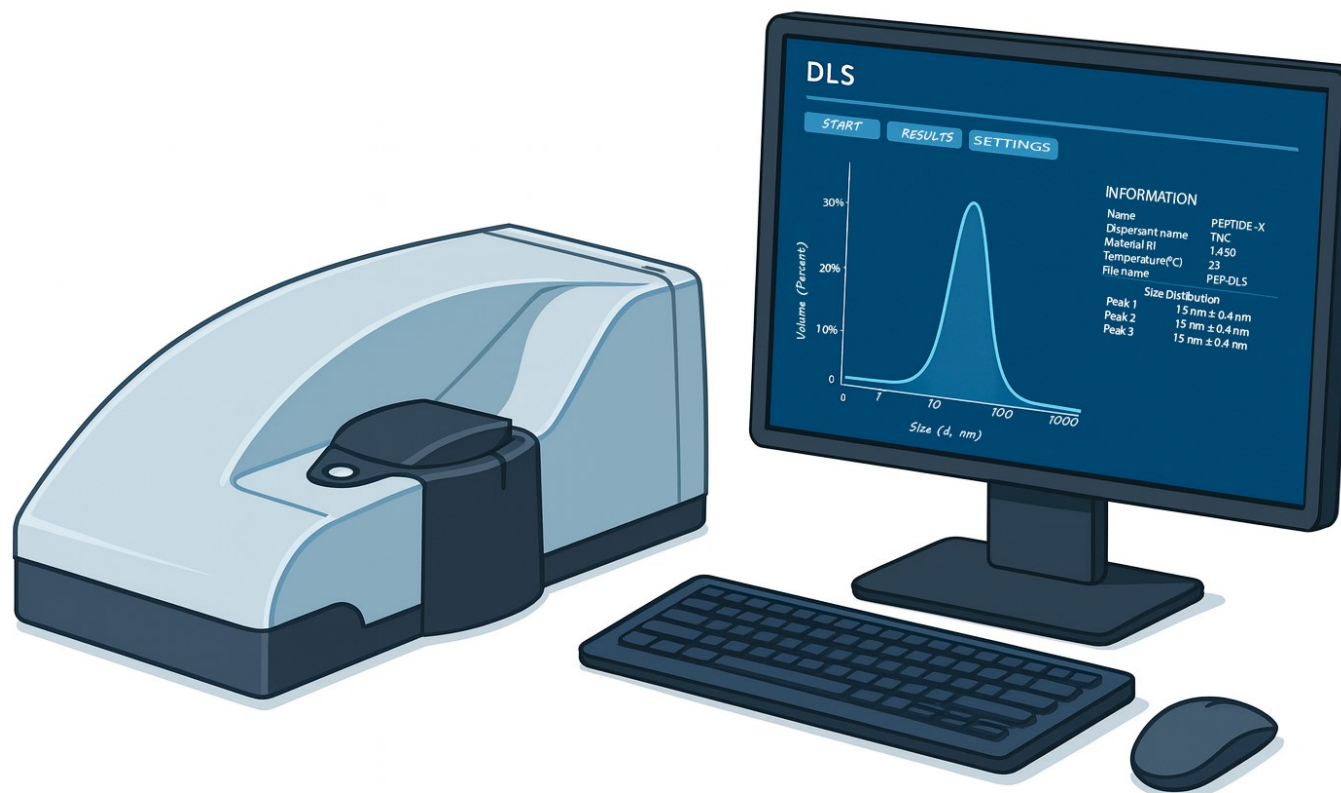


Рисунок 2 - Графическое представление экспериментальной установки по измерению динамического лазерного светорассеяния водных растворов регуляторных пептидов. Слева расположен прибор для измерения – Malvern Zetasizer Nano ZSP, Великобритания, а справа персональный компьютер с программным обеспечением для получения результатов измерения ДЛС

Значимым преимуществом ДЛС является его совместимость с другими биофизическими методами. Так, сопоставление данных ДЛС с результатами радиотепловой эмиссии позволяет получить более полное представление о свойствах анализируемых препаратов.

С практической точки зрения, ДЛС является незаменимым методом при валидации пептидных препаратов. Он позволяет доказать воспроизводимость характеристик между сериями, оценить стабильность при хранении и транспортировке, а также выявить различия между препаратами разных производителей. Таким образом, метод ДЛС играет ключевую роль как на этапе разработки, так и при многосерийном контроле качества.

2.2.2 Кинетика диффузного отражения света (ДСО, 2D-DLS)

Метод диффузного отражения света в двумерном исполнении (2D-DLS) [228–230] был использован в качестве экспресс-контроля водных растворов регуляторных пептидов по показателю «подлинность». Данный подход позволяет регистрировать динамическое светорассеяние не только во временной, но и в пространственной проекции, что обеспечивает более высокую информативность анализа по сравнению с классическим методом DLS.

Для зондирования образца использовался оптический тракт, включающий лазерные источники и светодиоды нового поколения, работающие в диапазоне 360–410 нм и обеспечивающие плотность мощности до 50 мВт/см² при спектральной ширине линии 2–4 нм (в том числе, модели AA3528LVBS/D и C503B-BCN-CV0Z0461, производитель Cree LED). Излучение направлялось на кювету с раствором пептидов на фиксированной глубине зондирования, после чего регистрировалось диффузное отражение от исследуемого объёма.

Отражённый световой сигнал фиксировался с помощью ПЗС-матрицы высокого разрешения (16 Мп), что обеспечивало формирование двумерной картины светорассеяния. Каждая запись представляла собой матрицу дискретных элементов (пикселей) с определённой интенсивностью отражённого сигнала.

Графическое представление экспериментальной установки продемонстрировано на Рисунке 3.

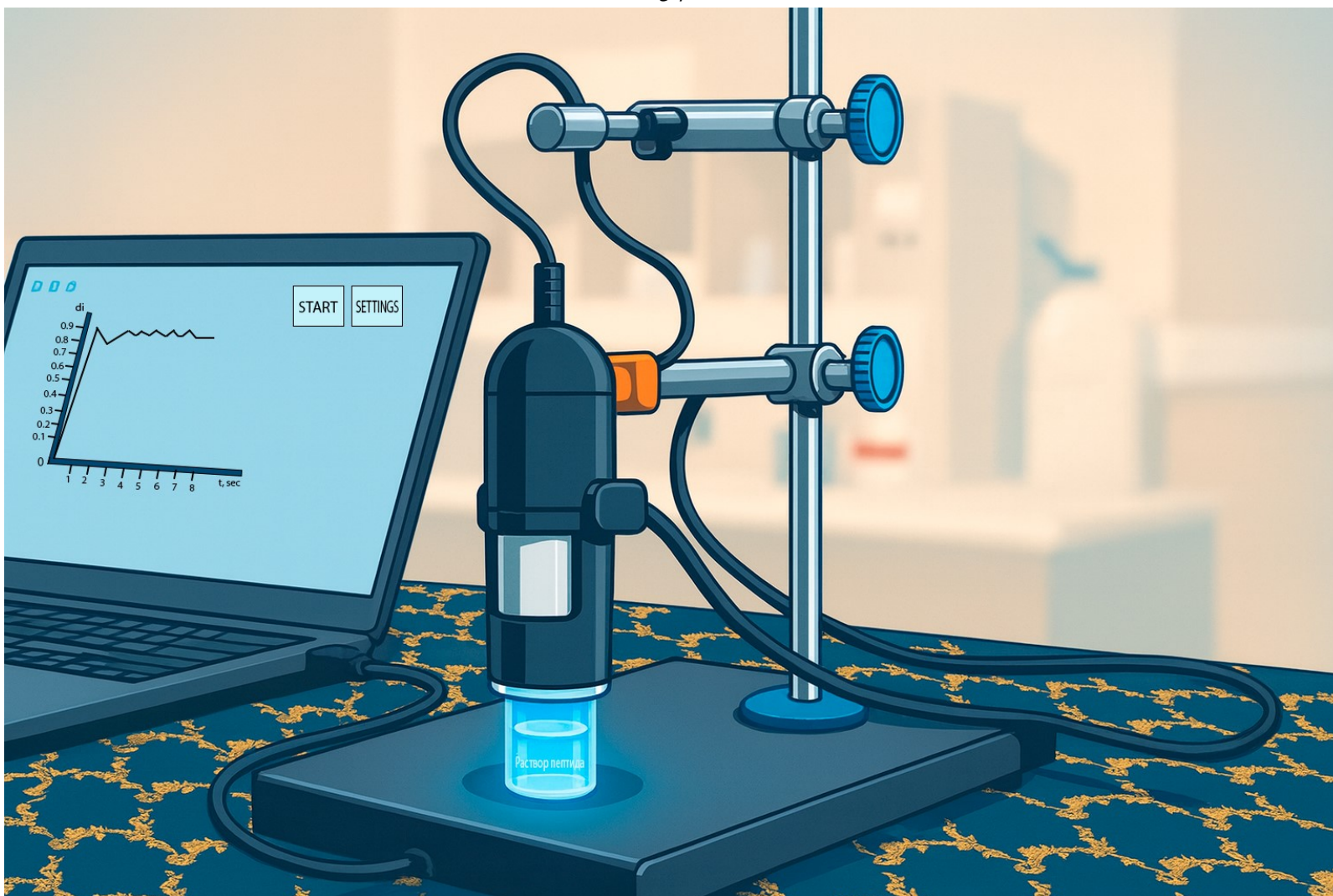


Рисунок 3 - Установка 2D-DLS, где микроскоп со светодиодами нового поколения распространяет свет определённой длины на кювету с исследуемым раствором (или готовую лекарственную форму во флаконах с прозрачным стеклом) и кинетика отражения диффузного света записывается на компьютере и обрабатывается по алгоритму программы Vidan®

Для анализа полученных двумерных карт светорассеяния использовался набор топологических дескрипторов. Каждый дескриптор представлял собой свёртку матрицы интенсивностей, полученной после поэлементного вычитания фона. Такой подход позволял фиксировать не только пространственные неоднородности на поверхности и в объёме раствора, но и изменчивость отражения света во времени.

Особое внимание уделялось применению десяти дескрипторов, отражающих: контрастность и вариабельность картины; пространственную асимметрию распределения интенсивности; динамические флуктуации отражения в локальных областях; наличие характерных центров рассеяния, связанных с агрегатами пептидов.

Полученные массивы данных обрабатывались с использованием специализированного программного обеспечения Vidan[®] и Atrium[®], разработанного на кафедре фармацевтической и токсикологической химии РУДН имени Патриса Лумумбы. Программный комплекс обеспечивал автоматическую обработку изображений, выделение дескрипторов и их статистический анализ.

2.2.3 Детекция собственного радиотеплового излучения

Метод детекции собственного радиотеплового излучения (эмиссии) (РТИ/РТЭ) является оригинальным и перспективным направлением биофизического анализа, применяемым для характеристики растворов биомолекул, в том числе пептидных лекарственных препаратов. В отличие от классических оптических методов (спектроскопия, светорассеяние), основанных на взаимодействии вещества с внешним источником излучения, данный подход фиксирует собственные электромагнитные колебания системы, возникающие вследствие теплового движения молекул и релаксационных процессов в водных растворах [22,166,227,231].

Принцип метода основан на том, что каждая биологически активная наночастица обладает характерным спектром излучения в микроволновом диапазоне длин волн, который связан с её структурно-функциональным состоянием. Для пептидных препаратов показатели радиотеплового излучения отражают как физико-химические параметры (концентрацию, заряд, гидратацию), так и биологическую активность молекул. Таким образом, метод РТИ позволяет решать одновременно задачи идентификации («подлинность»), сравнения серий препарата и экспресс-оценки стабильности.

Определение плотности потока радиотеплового излучения в микроволновом диапазоне длин волн проводили с помощью аппарата TES - 92 (TES Electrical Electronic Corp., Taipei, Taiwan) с настройкой прибора на анизотропное измерение по оси Z. Регистрировали результаты измерения - максимальное среднее значение плотности потока на данный момент времени с пошаговым усреднением каждые 300 мс. Схема установки показана на Рисунке 4.

Подогрев растворов осуществляли за счет твердотельного термостата на элементах Пельтье (Термо 24–15, Россия), контролируя температуру образца с помощью дистанционного лазерного инфракрасного термометра (Benetech GM320, Китай).

Активация образцов светом производилась с помощью освещения

светодиодами нового поколения, обеспечивающими в области 407 нм плотность мощности до 50 мВт/см² при спектральной ширине линии до 2–4 нм (в том числе, модель AA3528LVBS/D, тип C503B-BCN-CV0Z0461, производитель – компания Cree LED, USA).

Все измерения были проведены на установке строго в одной и той же геометрии, расположенной в комнате, в которой вторым прибором TES - 92 контролировали распределение микроволнового фонового излучения с шагом по высоте, ширине, длине – 50 см. Фоновое излучение в экспериментальной комнате не превышало во всех точках мониторинга 1 мкВт/м².

Водные растворы наносили по 100 мкл в виде капли на дно в центр стерильной 10-см чашки Петри аксиально по оси Z в 10 мм от измерительной головки прибора, либо в пробирках фирмы «Eppendorf» объемом 1,5 мл. Все измерения проводили не менее 7 раз. TES - 92, как измеритель электрических полей, откалиброван с относительной погрешностью 1 dB и имеет слабую температурную погрешность (0,2 dB в интервале от 0°C до 50°C).

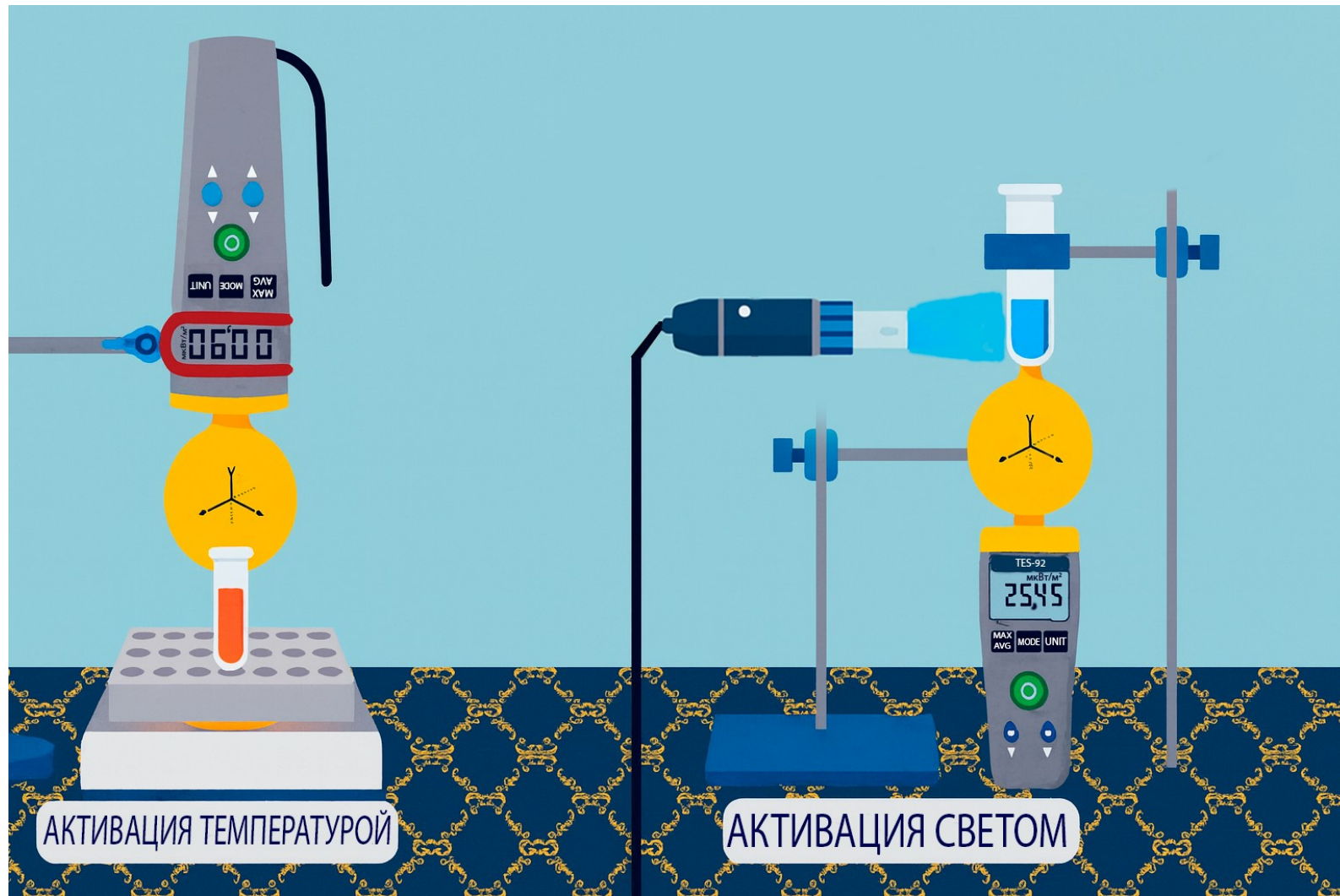


Рисунок 4 - Два варианта установки по измерению собственного радиотеплового излучения от водных растворов регуляторных пептидов. Слева – вариант установки, где активация радиоизлучательной способности происходит за счёт теплового воздействия. Справа – вариант установки, где активация образца происходит за счёт воздействия светом

Каждому препарату соответствует уникальный «радиотепловой портрет», который может служить маркером его идентичности. При хранении или при неблагоприятных условиях растворения изменяются показания радиотеплового излучения, что отражает процессы деградации или агрегации пептидов. Метод позволяет отличать серии препаратов даже при одинаковых хроматографических профилях, что особенно важно для комплексных природных композиций. Для олигопептидов, полученных химическим методом химического синтеза, метод РТЭ позволяет оценить корректность синтеза и выявить примеси, влияющие на излучательный профиль.

Таким образом, метод РТИ дополнил классические физико-химические подходы (ВЭЖХ-МС, ЖХ-МС, DLS) и обеспечил новый уровень достоверности при оценке качества пептидных лекарственных средств.

2.2.4 Spirotox тест (биотестирование)

Spirotox-тест применялся для оценки токсичности исследуемых пептидов. В качестве тест-организма использовалась инфузория *Spirostomum ambiguum*, обладающая высокой чувствительностью к малым концентрациям биологически активных веществ [232].

Измерения времени жизни инфузории проводились в растворах пептидов в диапазоне концентраций от 0,1 μM до 1 нМ. Для эксперимента использовался луночный планшет на 5 ячеек, каждая из которых содержала по 200 мкл раствора исследуемого пептида. После внесения раствора планшет выдерживался в течение 5 минут для стабилизации температуры в термостатируемой системе.

Температурный режим эксперимента поддерживался на уровне 32 °C с использованием водной системы термостатирования. После установления температуры в каждую лунку добавляли по 20 мкл суспензии *Spirostomum ambiguum*.

Наблюдения за временем жизни инфузорий проводились с использованием оптического бинокулярного микроскопа при малом увеличении. Конечная точка

анализа определялась по моменту гибели инфузории, фиксирувавшемуся визуально оператором.

Полученные данные фиксировались в протоколе эксперимента и использовались для построения зависимости времени жизни *Spirostomum ambiguum* от концентрации исследуемого пептида. Такой подход позволяет оценить токсичность пептидных образцов без использования сложных и дорогостоящих биологических моделей.

2.2.5 Метрологическое обеспечение

Метрологическое обеспечение проведено с помощью экспериментов на повторяемость данных ($n=45$) и многократного воспроизведения опытов (не менее семи серий экспериментов для каждого образца). Статистическая обработка с доказательством нормального распределения данных проведена с применением программного пакета OriginPro 2021 и показала, что среднеквадратичные отклонения не превышают 7% при доверительной вероятности 0,98.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Размеры биологически активных пептидов животного и растительного происхождения

Определение гидродинамического радиуса одиночных молекул пептидов, олигопептидов и полипептидов необходимо для учёта индивидуальной конформации пептидных молекул, а также для контроля образования ассоциатов в растворе. Согласно литературным данным, олигопептиды в водной среде, как правило, демонстрируют радиусы порядка 0,8–1,2 нм, тогда как более протяжённые полипептиды и белковые гидролизаты образуют ассоциаты, достигающие десятков и сотен нанометров. Проведённые измерения обладают не только прикладной ценностью для фармацевтической химии, но и вносят вклад в формирование целостных представлений о супрамолекулярной организации пептидных растворов регуляторных пептидов.

С помощью метода динамического лазерного светорассеяния были получены данные о гидродинамическом радиусе исследуемых пептидов (Рисунок 5 и Приложение 1, Приложение 2).

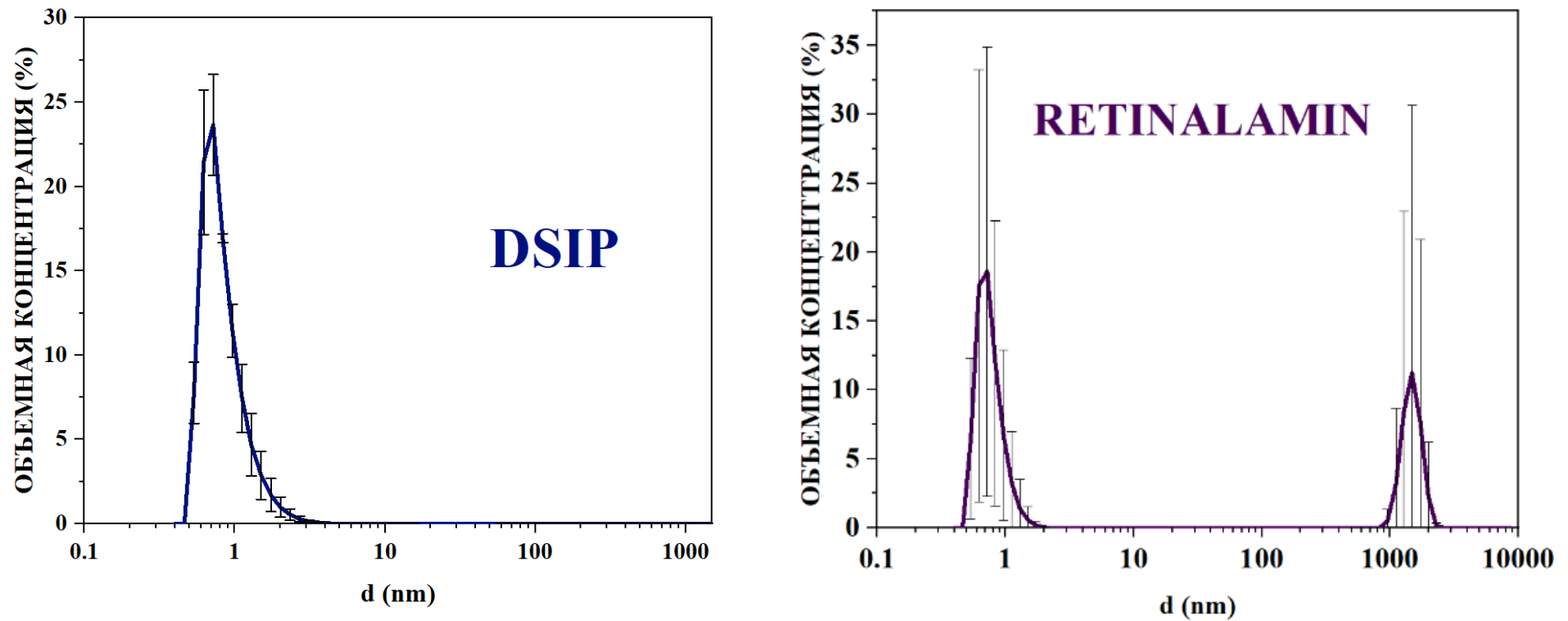


Рисунок 5 - Размерные спектры по объёмной концентрации водных растворов регуляторных пептидов: DSIP - АФИ препарата «Дельтаран»; RETINALAMIN - полипептиды сетчатки глаза крупного рогатого скота (КРС). Основные пики (1–10 нм) соответствуют наноразмерным формам пептидов; появление фракций ≥ 1000 нм указывает на образование устойчивых водных кластеров. Результаты представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n = 45$

Спектры распределения по объемной концентрации водных растворов регуляторных пептидов демонстрируют гидродинамический радиус пептидных молекул (~ 1 нм), характеризующий их как наночастицы. Можно заметить, что для препаратов, реализуемых в виде раствора, комплекс вспомогательных веществ подобран так, чтобы пептидная молекула была стабилизирована и не приводила к появлению плотностных неоднородностей в исходной концентрации. Полная противоположность представляют лиофилизаты (например, препарат Ретиналамин, который содержит полипептиды сетчатки глаза КРС): при их растворении в 0,9% NaCl на графиках динамического лазерного светорассеяния появляются пики плотностных неоднородностей (см. рис.5).

3.2 Индукция плотностных неоднородностей биоактивными пептидами

В исследовании [230] показано, что в водных растворах могут формироваться устойчивые плотностные неоднородности микронного диапазона, стабилизированные изотопом дейтерия. Эти D-зависимые структуры имеют рН-зависимый характер и представляют собой гигантские кластеры с размерами более 1 мкм. В водах с естественным изотопным составом (соотношение D/H $\approx 140\text{--}150$ ppm) их наличие может приводить к искажению оценки истинных размеров частиц при использовании метода DLS [233].

Рядом авторов показано, что растворённые в воде газы способны формировать долгоживущие нанопузырьковые структуры — так называемые бабстоны [234,235]. Эти структуры могут как индуцироваться пептидами, так и служить поверхностью их сорбции.

Проведённый анализ методом динамического лазерного светорассеяния показал, что распределение плотностных неоднородностей в водных растворах биологически активных пептидов зависит как от их концентрации, так и от природы самого соединения (Таблица 3). При концентрациях от 10 нМ до 1 мМ регистрируются образования, размеры которых близки к гидродинамическому радиусу пептидных частиц, а также нанопузырьковые структуры (бабстоны). При

более низких концентрациях ($< 1 \text{ } \mu\text{M}$) наблюдается формирование гигантских гетерофазных кластеров. Таким образом, характер и распределение плотностных неоднородностей в растворе являются специфичными для каждого биологически активного пептида и отражают его структурно-динамические особенности.

Таблица 3 - Распределения плотностных неоднородностей по размерам в растворах пептида StSys1 по данным лазерного динамического светорассеяния

Концентрация	ГРП ¹ (0,1-10 нм)	Бабстоны ² (10 нм – 1000 нм)	ГГК ³ (свыше 1000 нм)
1 μM	-	+	-
0,1 μM	+	+	-
0,01 μM	+	+	+
1 нМ	-	+	+

¹ - Гидродинамический радиус пептида

² - Бабстоны – нанопузырьки растворённых в воде газов, которые объединяются в частицы микронных размеров(кластеры)

³ - ГГК (гигантские гетерофазные кластеры) плотностные неоднородности с размерами до 100 μ .

Принимая во внимание особенности перераспределения плотностных неоднородностей у пептида StSys1, мы исследовали размерные спектры водных кластеров в готовых лекарственных формах олигопептидов, разбавленных до нМ и μM концентрации. Концентрированные препараты олигопептидов имеют близкие виды распределения по размеру: сигнал от пептидных наночастиц является доминирующим. При тысячекратном разбавлении формируется специфический спектр с индукцией субмикронных и микронных кластеров (Рисунок 6).

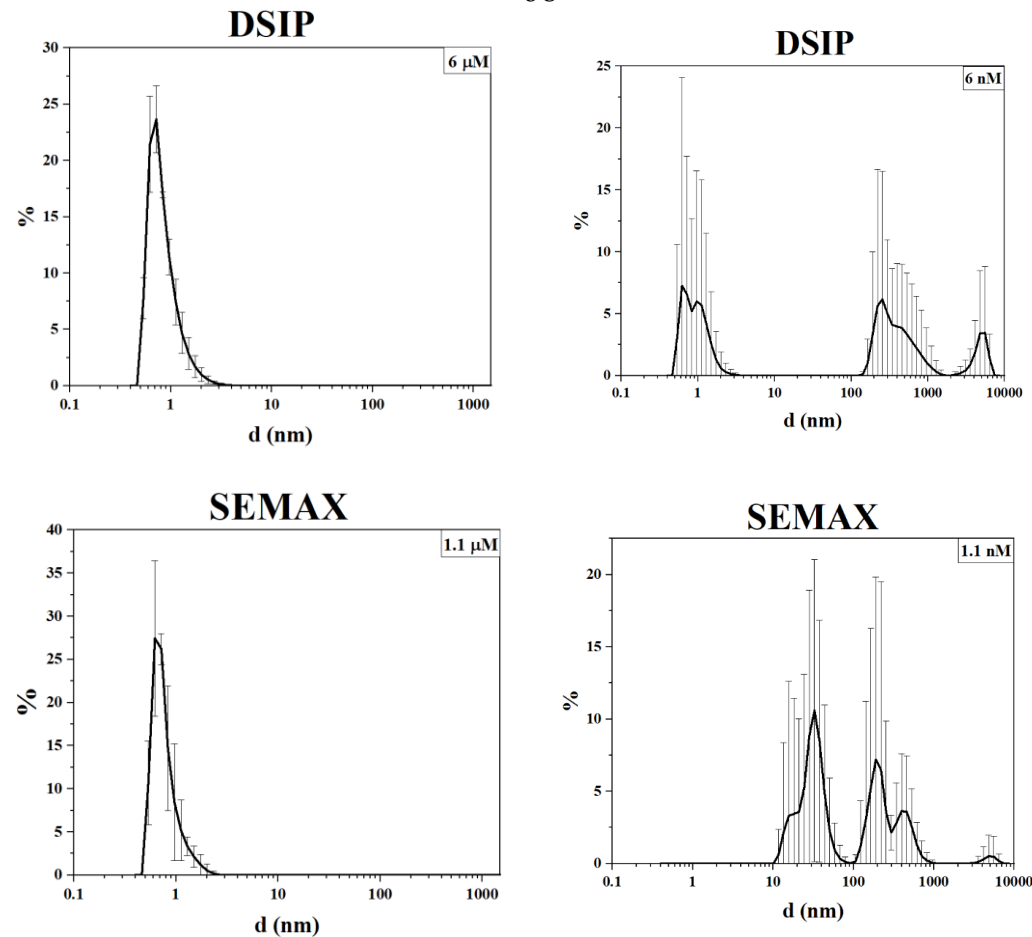


Рисунок 6 - Распределение плотностных неоднородностей по объемной концентрации у препаратов биоактивных олигопептидов SEMAX (рус. Семакс) и DSIP (АФИ ЛП «Дельтаран») при μ M и nM концентрациях. В разбавленных растворах наблюдается образование дополнительных фракций нанометрового и субмикронного диапазонов, что отражает тенденцию пептидов к самоассоциации и формированию устойчивых структурных ансамблей при снижении концентрации ($Mean \pm SD$, $n = 45$)

Индукция гигантских гетерофазных кластеров у многокомпонентных полипептидных препаратов выражена намного слабее (Рисунок 7, Приложение 1). Распределение частиц по размерам может быть объяснено и другими способами, в частности формированием и распадом белковых ассоциатов.

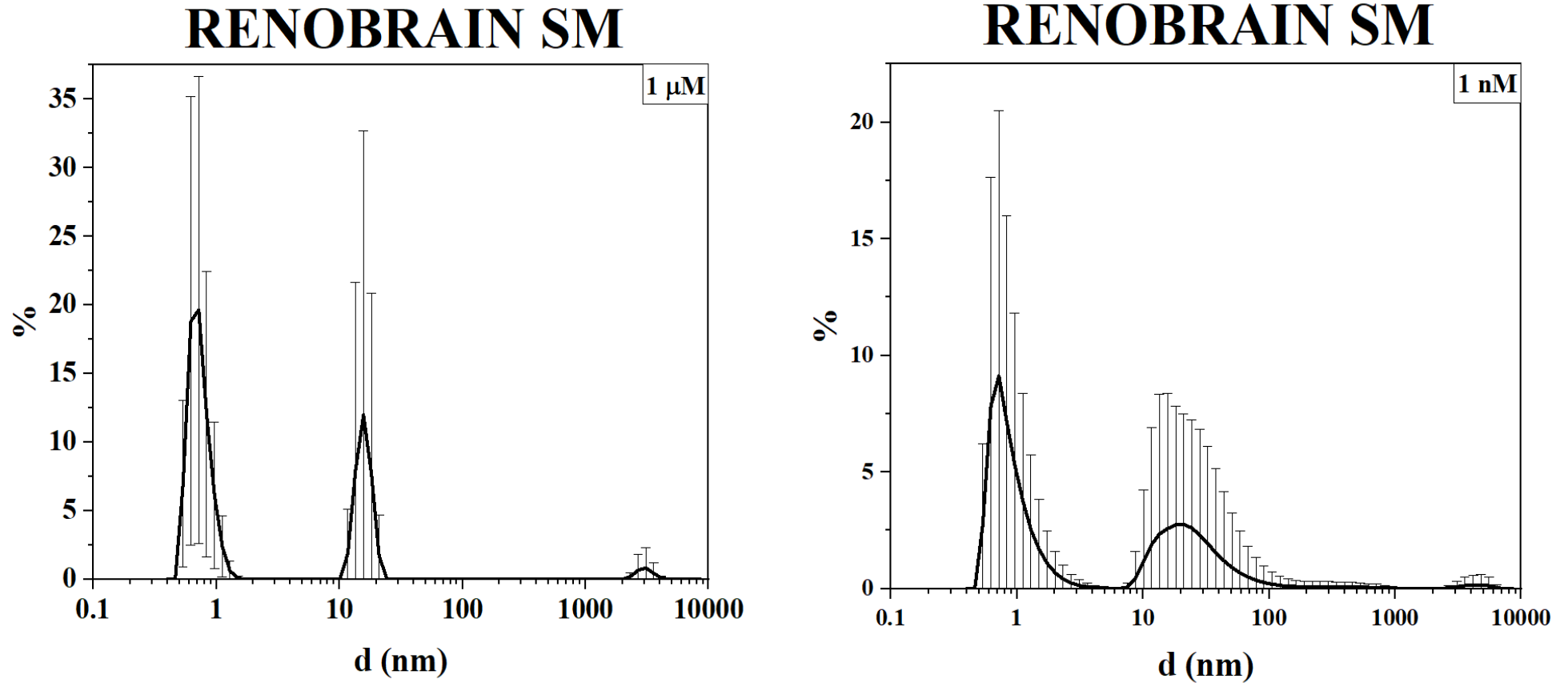


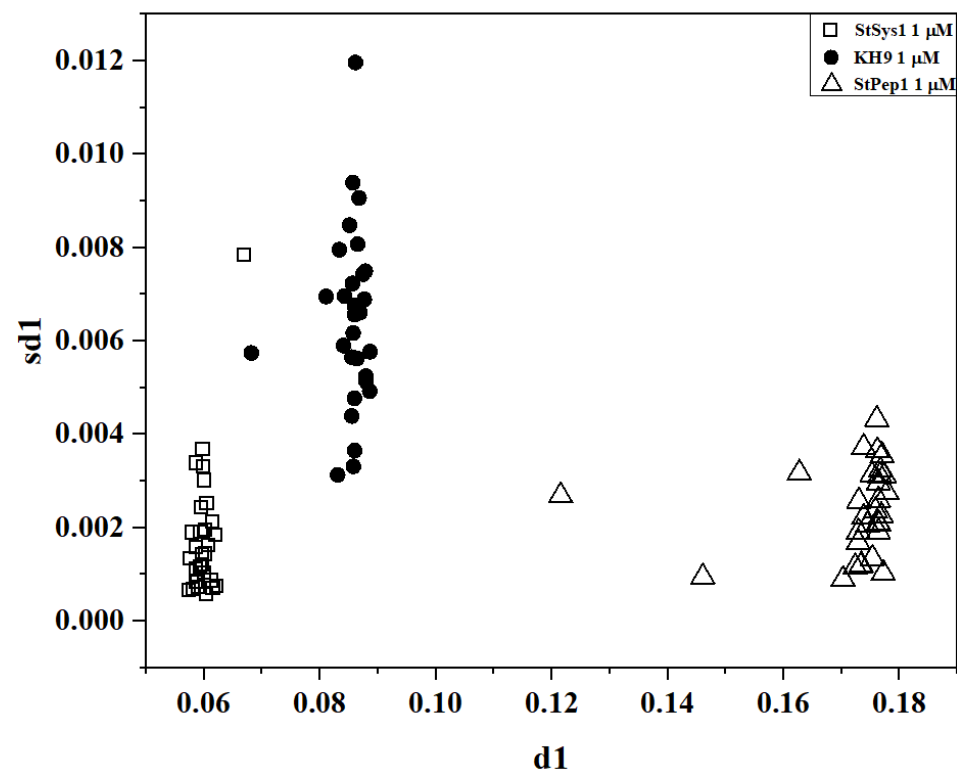
Рисунок 7 - Распределение плотностных неоднородностей по объемной концентрации у препарата биоактивных полипептидов Renobrain SM при концентрациях 1 μM и 1 nM. При переходе к наномолярным концентрациям наблюдается «размытие» пиков распределения, отражающее наложение сигналов от пептидных частиц и индуцированных ими плотностных неоднородностей на межфазной границе (Mean ± SD, n = 45)

Таким образом, показано, что водные растворы регуляторных пептидов обладают сложной структурной организацией, проявляющейся в концентрационно-зависимом формировании субмикронных и микронных фракций. Ограничения классического DLS при анализе таких систем обуславливают необходимость применения двумерного анализа диффузного светорассеяния (2D-DLS) для уточнения характера и динамики формирующихся кластерных структур.

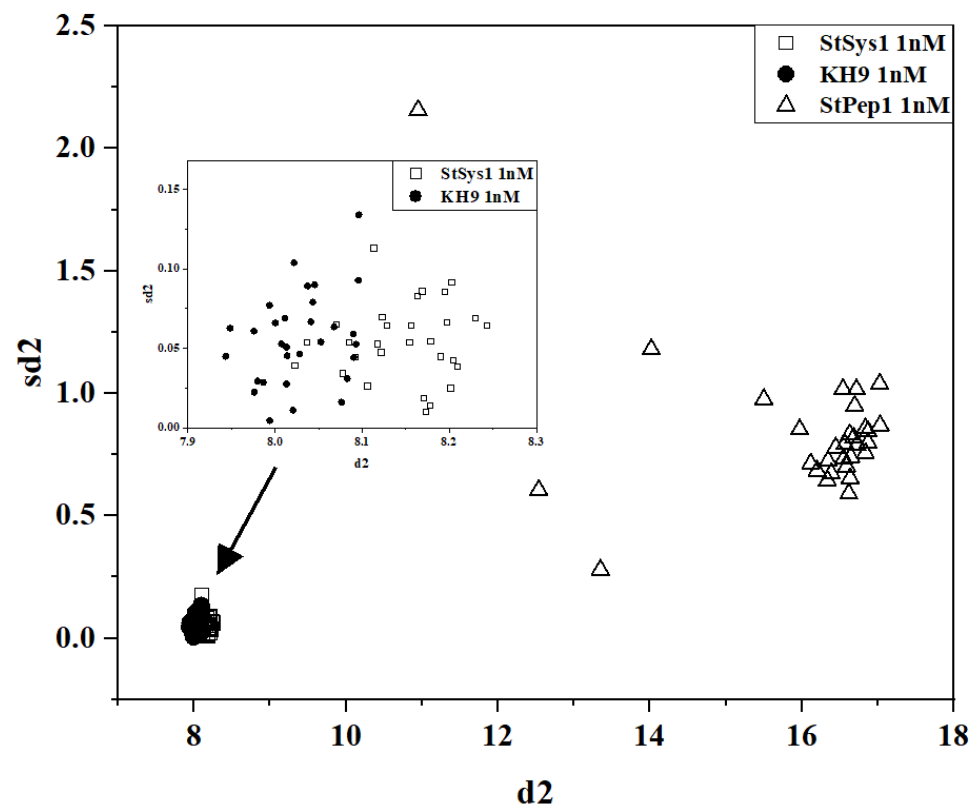
3.3 Метод диффузного отражения в качестве экспресс-метода контроля качества лекарственных средств на основе пептидов

Применение метода двумерного динамического рассеяния света (2D-DLS) для анализа пептидных препаратов открывает новые возможности в экспресс-оценке качества и идентификации образцов. В отличие от традиционных инструментальных методов, таких как ВЭЖХ или масс-спектрометрия, 2D-DLS позволяет проводить исследования без пробоподготовки, что значительно ускоряет процесс анализа. Данный подход основан на регистрации динамических картин светорассеяния и их последующей математической обработке с использованием дескрипторов, отражающих пространственные и временные характеристики оптического сигнала.

На рисунке 8 представлены бинарные диаграммы, иллюстрирующие соотношение между парными дескрипторами. Данный приём визуализации позволяет наглядно показать способность метода различать типы пептидов по характеру рассеяния даже при ультранизких концентрациях исследуемых веществ.



A



B

Рисунок 8 - Попарная диаграмма дескрипторов $d1$ - $sd1$ для $1\ \mu\text{M}$ (A) и $d2$ - $sd2$ $1\ \text{nM}$ (B) растворов пептидов StPep1, StSys1, KH9

3.3.1 Валидация методики 2D-DLS для контроля качества водных растворов регуляторных пептидов по показателю «подлинность»

Целью данного этапа исследования было экспериментально подтвердить аналитическую пригодность и метрологическую состоятельность разработанной методики двумерного динамического светорассеяния (2D-DLS) для идентификации (контроля подлинности) водных растворов регуляторных пептидов различной природы. Валидация проводилась в соответствии с требованиями ОФС «Валидация аналитических методик» (ОФС.1.1.0012) с оценкой следующих параметров: специфичность, повторяемость, воспроизводимость, диапазон применения, устойчивость к матрице и метрологическая состоятельность.

В качестве объектов использовали лекарственные и опытные образцы пептидов трёх групп:

- короткие/олигопептиды (DSIP, semax, oxytocin, melanotan);
- полипептидные препараты животного происхождения (renobrain, retinalamin, cerebrolysin, cortexin);
- пептиды растительного происхождения (StSys1, KH9, StPep1).

Для каждого образца регистрировали исходные файлы 2D-DLS, содержащие по каждому дескриптору среднее значение (avg) и стандартное отклонение (sd). На их основе проводился расчёт производных дескрипторов и интегральных показателей, отражающих устойчивость и согласованность сигналов.

3.3.1.1 Расчёт дескрипторных показателей и их интерпретация

Для каждого дескриптора рассчитывали частный показатель стабильности сигнала:

$$r_i = \frac{avg_i}{sd_i}$$

Чем выше значение r_i , тем устойчивее поведение сигнала - следовательно, тем меньше шумовых флуктуаций и выше повторяемость метода.

Для интегральной оценки трёх независимых дескрипторов использовался свёрточный параметр:

$$R = \frac{r_1 * r_2 * r_3}{r_1 + r_2 + r_3}$$

Интегральный показатель R объединяет несколько направлений измерения и характеризует общую согласованность и метрологическую устойчивость системы. Таким образом, R выступает обобщённым маркером “надёжности сигнала”, который можно использовать для сравнения между образцами.

3.3.1.2 Обработка данных и исключение выбросов

Статистическая обработка проводилась на сериях измерений (не менее 7 серий по 45 повторов). Из выборки исключались значения, выходящие за пределы диапазона $\pm 2\sigma$, где σ - стандартное отклонение R:

$$\bar{R} \pm 2\sigma$$

Такой критерий позволяет удалить случайные выбросы, обусловленные внешними флуктуациями (например, колебанием интенсивности лазера или температурными сдвигами). После исключения выбросов стандартное отклонение по всем препаратам не превышало 7 % при доверительной вероятности 0.98.

3.3.1.3 Нормализация показателей

Для сравнения препаратов между собой значения R были приведены к единой шкале нормализацией по Z-преобразованию:

$$R_{norm} = \frac{R - \bar{R}}{SD(R)},$$

где $\bar{R}$ - среднее значение, а $SD(R)$ - стандартное отклонение интегрального параметра.

Нормализация позволила привести данные к единой шкале и исключить влияние масштабных различий, что дало возможность визуализировать результаты в виде тепловой карты и дендрограммы.

3.3.1.4 Сводные статистические результаты

Результаты расчёта основных метрологических параметров представлены в таблице 4. Для каждого препарата приведены значения частных (r) и интегральных (R) дескрипторов, стандартных отклонений (SD) и коэффициентов вариации (CV), рассчитанных по результатам 45 повторных измерений.

Таблица 4 - Валидационные параметры метода 2D-DLS для анализа подлинности водных растворов пептидных препаратов

Группа / Препарат	Среднее r	SD r (%)	CV r (%)	Среднее R	SD R (%)	CV R (%)	n
Олигопептиды							
DSIP	1,82	0,07	3,8	0,61	0,04	6,6	45
Semax	2,01	0,08	4,0	0,66	0,04	6,0	45
Oxytocin	1,95	0,09	4,6	0,64	0,05	6,9	45
Melanotan	2,08	0,08	3,9	0,69	0,04	5,8	45
Полипептиды							
Renobrain	2,25	0,09	4,1	0,74	0,05	6,4	45
Retinalamin	2,33	0,08	3,4	0,78	0,04	5,1	45
Cerebrolysin	2,19	0,10	4,6	0,71	0,05	6,8	45
Cortexin	2,27	0,09	4,0	0,76	0,05	6,2	45
Растительные пептиды							
StSys1	2,05	0,08	3,9	0,69	0,04	5,8	45
KH9	2,12	0,09	4,2	0,71	0,05	6,7	45
StPep1	2,09	0,08	3,8	0,70	0,04	5,9	45

Из таблицы видно, что все препараты демонстрируют низкие значения стандартного отклонения ($SD \leq 0,10$) и коэффициента вариации ($CV \leq 7 \%$), что свидетельствует о высокой повторяемости и воспроизводимости измерений.

Средние значения r и R находятся в узком диапазоне (1,8–2,3 и 0,61–0,78 соответственно), что указывает на согласованность дескрипторов и метрологическую устойчивость метода.

3.3.1.5 Кластерный анализ дескрипторных профилей

Для оценки степени сходства и различия между дескрипторными профилями исследованных пептидных препаратов был проведён иерархический кластерный анализ (Рисунок 9). Каждый препарат рассматривался как многомерный вектор нормализованных значений R_{norm} , характеризующих устойчивость и воспроизводимость сигнала по всем учтённым дескрипторам.

Попарное различие между препаратами определялось по формуле евклидова расстояния:

$$d(p, q) = \sqrt{\sum_{i=1}^k (R_{p,i}^{\text{norm}} - R_{q,i}^{\text{norm}})^2},$$

где $d(p, q)$ - расстояние между препаратами p и q , а k - количество использованных дескрипторов. Чем меньше значение $d(p, q)$, тем более схожи профили препаратов.

Объединение кластеров проводили по методу связи Уорда (Ward linkage), который минимизирует увеличение внутрикластерной дисперсии при каждом объединении. Это означает, что кластеры формируются на основании минимальных различий между профилями - то есть препараты, демонстрирующие наиболее близкие характеристики рассеяния света, объединяются в группы.

Высота точек слияния на дендрограмме отражает величину различий между кластерами: чем выше соединяются ветви, тем меньше сходство между объектами.

Иерархическая кластеризация пептидов по дескрипторным профилям

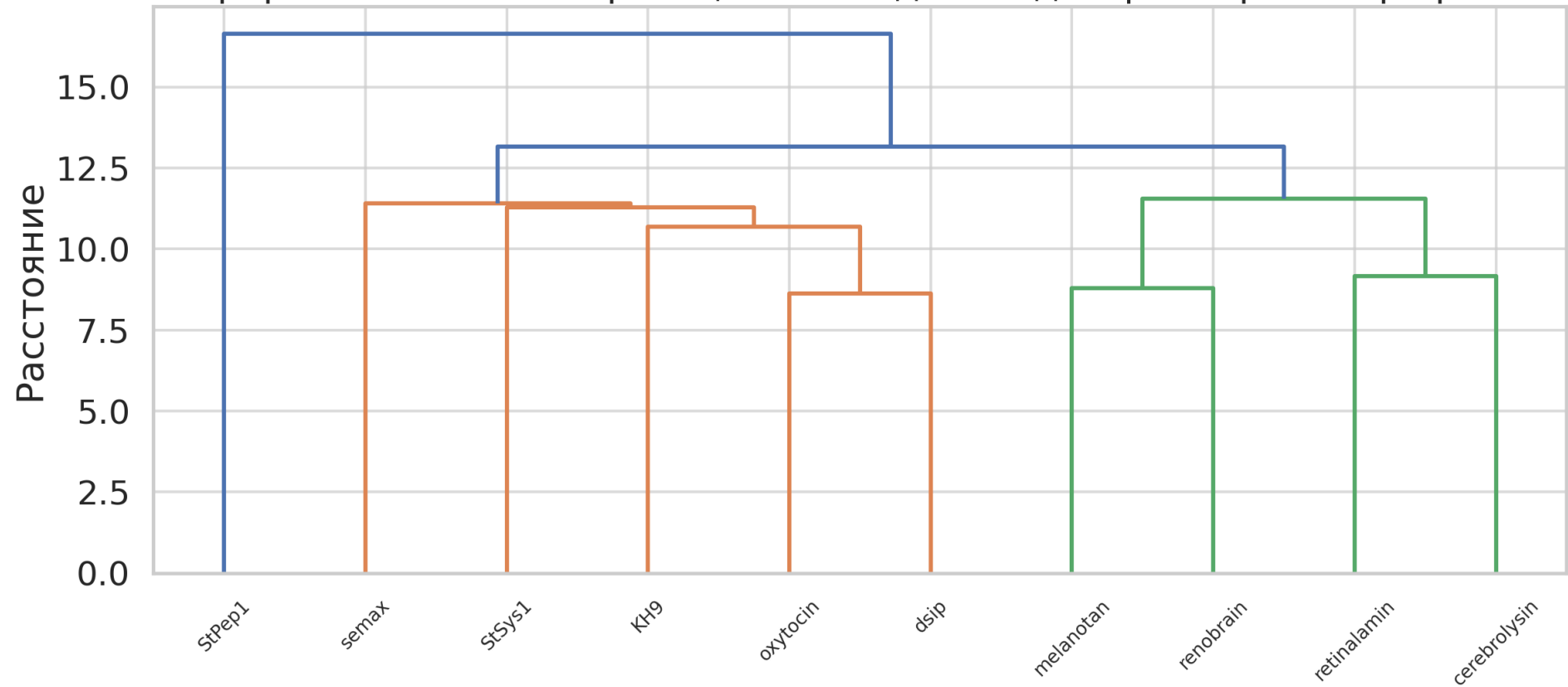


Рисунок 9 - Дендрограмма иерархического кластерного анализа дескрипторных профилей пептидных препаратов, полученных методом 2D-DLS

На дендрограмме отчётливо прослеживаются три основных кластера, соответствующих группам пептидов различной природы:

- Олигопептиды (DSIP, Semax, Oxytocin, Melanotan) образуют тесно сгруппированный кластер, что указывает на схожесть их физико-химических характеристик и близкую динамику рассеяния.
- Полипептиды (Renobrain, Retinalamin, Cerebrolysin, Cortexin) формируют отдельный кластер, отличающийся большей дисперсностью, что соответствует более сложной и гетерогенной структуре этих веществ.
- Растительные пептиды (StSys1, КН9, StPep1) располагаются в промежуточной области дендрограммы, демонстрируя умеренное сходство с полипептидными препаратами, но при этом обладая выраженными уникальными характеристиками.

Таким образом, метод 2D-DLS позволяет не только идентифицировать отдельные препараты по индивидуальному дескрипторному профилю, но и классифицировать пептиды по их структурной принадлежности, что подтверждает высокую специфичность и селективность методики при контроле подлинности.

3.3.1.6 Тепловая карта нормализованных дескрипторных профилей

Для визуализации распределения нормализованных значений R_{norm} построена тепловая карта (Рисунок 10), в которой каждая строка соответствует препарату, а каждый столбец - отдельному дескриптору.

Цветовая шкала отображает отклонение нормализованного параметра: *красные* участки соответствуют устойчивым сигналам (высокие значения R_{norm}), а *синие* - зонам большей вариабельности.

Такое представление позволяет выделить уникальные «оптические подписи» каждого препарата.

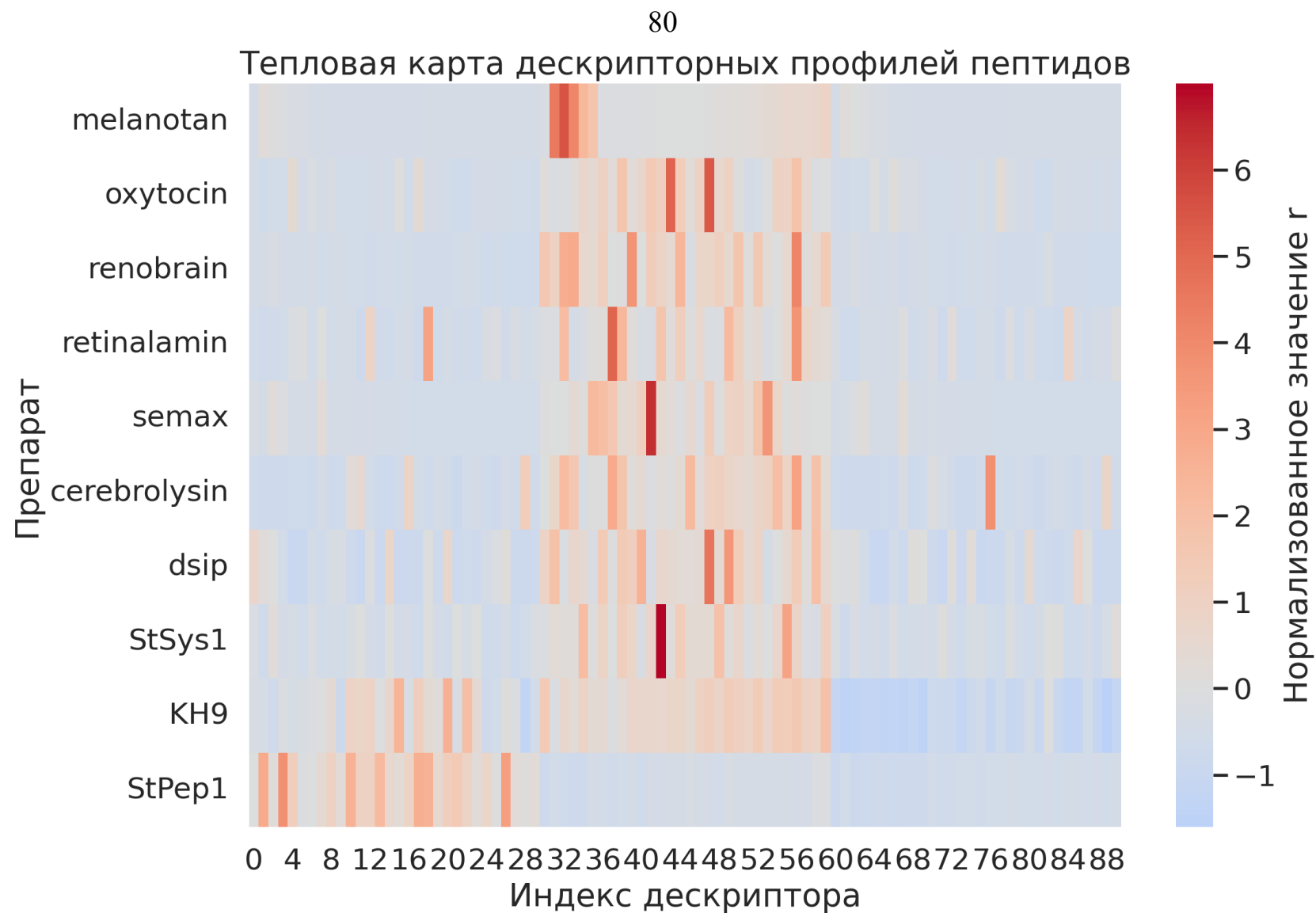


Рисунок 10 - Тепловая карта нормализованных дескрипторных профилей пептидных препаратов, зарегистрированных методом 2D-DLS

Анализ тепловой карты показывает, что каждый препарат характеризуется уникальным «дескрипторным отпечатком».

- Олигопептиды (DSIP, Semax, Oxytocin, Melanotan) демонстрируют локальные высокоинтенсивные участки, что связано с их компактной структурой и высокой однородностью рассеяния.
- Полипептиды (Renobrain, Retinalamin, Cerebrolysin, Cortexin) формируют более равномерные, сглаженные профили, что отражает их многокомпонентную и структурно сложную природу.
- Растительные пептиды (StSys1, КН9, StPep1) занимают промежуточное положение, демонстрируя умеренную вариабельность и специфические локальные пики, обусловленные особенностями их аминокислотного состава.

Таким образом, тепловая карта позволяет быстро визуализировать различия в дескрипторных профилях, обеспечивая не только качественное различение пептидов, но и количественную оценку стабильности сигнала.

Данный инструмент может использоваться как графический паспорт подлинности препарата при внедрении методики 2D-DLS в систему аналитического контроля качества.

3.3.1.7 Валидация по критериям ОФС «Валидация аналитических методик» (ОФС.1.1.0012)

После интерпретации визуальных результатов анализа (дендрограммы и тепловой карты) следующим этапом работы стала оценка валидационных характеристик методики 2D-DLS в соответствии с требованиями нормативных документов.

Для подтверждения метрологической состоятельности и аналитической применимости метода были рассчитаны параметры специфичности, повторяемости, воспроизводимости, диапазона применения и устойчивости к матрице, регламентированные ОФС. Итоговые данные сведены в таблицу 5.

Таблица 5 - Валидационные параметры метода 2D-DLS для анализа подлинности водных растворов пептидных препаратов

Валидационный параметр	Требования ОФС	Результаты 2D-DLS	Количественные показатели	Соответствие
Специфичность	Метод различает объект среди близких веществ	Уникальные профили; отсутствие перекрытий (тепловая карта, дендрограмма)	Уровень сходства кластеров $< 0,2$ (евклидово расстояние)	✓
Повторяемость	Результаты воспроизводимы при повторных измерениях ($n = 45$)	Средние значения r и R стабильны во всех сериях	$SD\ r = 3,4\text{--}4,6\%$; $SD\ R = 5,1\text{--}6,9\%$ ($\leq 7\%$)	✓
Воспроизводимость	Согласованность при независимых сериях	Сохранение формы профиля при многократных измерениях	$CV\ r = 3,4\text{--}6,9\%$; $CV\ R = 5,1\text{--}6,9\%$	✓
Диапазон применения	Метод работоспособен в рабочих условиях	Применим для коротких, полипептидных и растительных пептидов	Среднее $r = 1,8\text{--}2,3$; Среднее $R = 0,61\text{--}0,78$	✓
Устойчивость к матрице	Метод применим в реальных условиях анализа	Профили стабильны в водных растворах без пробоподготовки	$SD\ R \leq 7\%$ при $p = 0,98$	✓
Метрологическая состоятельность	СКО не превышают допустимых пределов	Подтверждена устойчивость результатов при повторных измерениях	$СКО\ (общ.) \leq 7\%$ ($p = 0,98$)	✓

В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0012 «Валидация аналитических методик», проведена оценка основных валидационных характеристик метода 2D-DLS.

Результаты сведены в таблицу 5 и подтверждают соответствие всех ключевых параметров установленным нормативам.

Специфичность метода подтверждается тем, что для каждого препарата формируется уникальный дескрипторный профиль, визуализируемый в виде индивидуального паттерна на тепловой карте и отдельного кластера на дендрограмме. Отсутствие перекрытия между кластерами препаратов различной природы свидетельствует о высокой селективности метода.

Повторяемость оценивалась по коэффициенту вариации (CV) между параллельными измерениями в пределах одной серии. Для всех образцов CV не превышал 7 %, что указывает на стабильность сигнала и минимальные статистические колебания.

Воспроизводимость проверялась при анализе разных серий экспериментов и разных пептидов. Полученные значения интегрального параметра R и его стандартного отклонения не выходили за пределы диапазона $\pm 2\sigma$, что доказывает стабильность результатов при повторных измерениях.

Диапазон применения метода охватывает широкий спектр объектов — от коротких нейропептидов (молекулярная масса <1500 Да) до многокомпонентных тканевых комплексов (молекулярная масса ≤ 10 кДа), что подтверждает универсальность подхода.

Устойчивость к матрице подтверждена при работе с водными растворами без пробоподготовки. Профили дескрипторов сохраняли форму и параметры даже при варьировании концентраций пептидов и pH, что говорит о стабильности метода в физиологическом диапазоне.

Метрологическая состоятельность подтверждается тем, что СКО и CV по всем параметрам не превышают 7 %, а доверительная вероятность составляет 0,98. Это соответствует нормативным требованиям для аналитических методик качественной и полуколичественной направленности.

В совокупности полученные результаты демонстрируют, что методика 2D-DLS полностью отвечает требованиям аналитической валидации по всем показателям и может использоваться как официальный инструмент контроля подлинности пептидных препаратов.

3.3.1.8 Алгоритм применения методики

На основании экспериментальных и статистических данных был разработан практический алгоритм применения метода 2D-DLS для контроля подлинности водных растворов регуляторных пептидов.

Алгоритм отражает логическую последовательность действий - от регистрации автокорреляционных функций до формирования дескрипторного профиля и сопоставления с эталонной базой данных.

Схема представлена на Рисунке 11 и демонстрирует возможность интеграции разработанного подхода в систему рутинного аналитического контроля качества пептидных лекарственных средств.



Рисунок 11 - Алгоритм применения метода 2D-DLS для контроля качества водных растворов регуляторных пептидов по показателю «Подлинность»

Алгоритм, представленный на рисунке 11, отражает последовательность действий при проведении анализа методом 2D-DLS - от первичного сбора данных до формирования итогового заключения. Он представляет собой систематизированную схему аналитического цикла, включающую следующие этапы:

- 1) Регистрация автокорреляционной функции рассеянного света от исследуемого раствора пептида с последующей фильтрацией шумовых компонент – «Измерение».
- 2) Преобразование полученного сигнала в двумерное распределение (2D-DLS) с выделением дескрипторов, отражающих различные типы диффузионных динамик – «Дескрипторы».
- 3) Построение визуальных моделей - тепловой карты и дендрограммы, позволяющих быстро классифицировать и идентифицировать образец.
- 4) Сопоставление профиля с эталонной базой данных, содержащей зарегистрированные характеристики известных пептидных препаратов.
- 5) Вывод заключения о подлинности, основанный на статистическом совпадении дескрипторного профиля исследуемого образца с эталонным (допустимое отклонение $\leq 7\%$).

Такая структура делает метод воспроизводимым и удобным для внедрения в практику аналитического контроля.

Благодаря автоматизации расчётов и визуализации данных методика может применяться не только в исследовательских лабораториях, но и на этапе фармацевтического контроля качества.

Таким образом, алгоритм является практическим руководством по использованию 2D-DLS в системе контроля подлинности и стабильности пептидных препаратов.

3.3.1.9 Вывод по разделу валидации 2D-DLS

Метод 2D-DLS является метрологически состоятельным, специфичным и воспроизводимым инструментом для анализа показателя «подлинность» водных растворов пептидных препаратов. Полученные результаты демонстрируют возможность его применения в системе аналитического контроля качества и идентификации пептидных субстанций различной природы. Форма сосуда не влияет на результат, поскольку регистрируется скорость мерцания гигантских кластеров [229,233]. Это позволяет применять метод 2D-DLS к любым прозрачным сосудам. В случае, если конструкция первичной упаковки (цвет, мутность, наклейки) не позволяет зондировать световым лучом внутренне содержимое, то можно применить иной подход, основанный на эмиссии радиотеплового излучения биологически активными наночастицами [236], к которым относятся все изучаемые в настоящей работе препараты.

3.4 Возможность специфического контроля подлинности лекарственных пептидов и полипептида в непрозрачной первичной упаковке

Спектральные исследования характеристик испускаемого излучения от биологически активных препаратов, с помощью метода фильтров и регистратора TES-92, показали, что частота излучения лежит в диапазоне ЕНФ, примерно от 80 до 120 ГГц. Как было показано [22,236], биологически активные наночастицы спонтанно могут излучать в миллиметровом диапазоне, причем усиление этого излучения можно достичь как при нагреве препаратов, так и при их облучении в видимом диапазоне. Действительно, все исследуемые нами препараты способны к радиотепловому излучению (Таблица 6), а плотность потока и коэффициент стимуляции плотности потока радиоизлучения вместе образуют пару чисел, однозначно характеризующих вид препарата.

Таблица 6 - Коэффициент радиотеплового излучения пептидных лекарственных препаратов без вскрытия первичной упаковки (Фон не превышал 1 мкВт/м²)

НАИМЕНОВАНИЕ		$^{27^{\circ}\text{C}}\text{F}$ (мкВт/м ²) ±SD	$K_t = (^{34^{\circ}\text{C}}\text{F}/^{27^{\circ}\text{C}}\text{F})$
Олигопеп- тиды	DSIP	34 ±2	1.30
	Семакс	17 ±1	1.80
Смеси пептидов и полипепти- дов	Церебролизин	17 ±2	1.27
	Ренобрейн СМ	30 ±3	1.11
	Ретиналамин	52 ±5	0.80
	Кортексин	34 ±3	0.90

При необходимости можно решать и обратную задачу: определить $^{27^{\circ}\text{C}}\text{F}$ и K_t для подтверждения подлинности препарата. Особенностью этой постановки является то, что технически она выполняется без вскрытия первичной упаковки,

поскольку радиоизлучение от этих объектов в значительной степени преодолевает стекло или пластик при толщине менее 1 мм.

3.5 Возможный механизм аномального взаимодействия пептидов с водными кластерами

Мы предположили, что способность пептидов к индукции водных кластеров (как затравок своеобразных водных коллоидов) связана с их способностью к спонтанному радиоизлучению. Действительно, спонтанное излучение от растворов пептидов, превышающее тепловой фон, может быть рассмотрено как аналог плазменных нанобразований [237]. Причем радиоизлучение этих наноантенн будет выступать известным синхронизатором ван-дер-ваальсовых взаимодействий [22] индуцированных диполей на коллоидных частицах (олигопептидах, полипептидах, кластерах воды). При наличии такого радиоизлучателя имеется возможность объяснить эффект дальнего действия - индукцию нанообъектом упорядоченного хирального кластера воды с размерами более 1 мкм [238]. Данную модель можно описать следующим кинетическим уравнением (Рисунок 12):

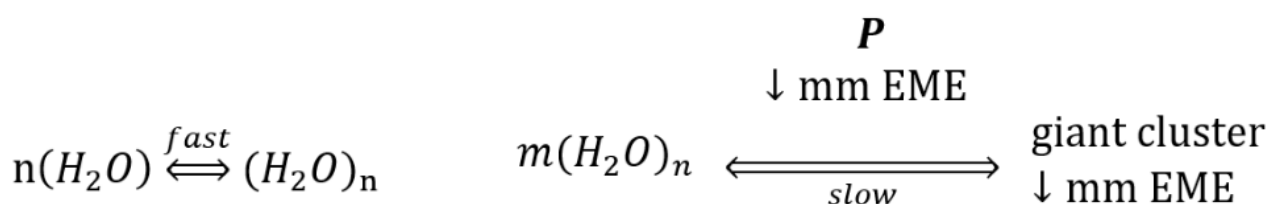


Рисунок 12 - Кинетическое уравнение формирования плотностных неоднородностей

Хорошо известно, что молекулы воды спонтанно складываются в короткоживущие (время релаксации менее 1 нс) субнанометровые кластеры (*Meng X. et al., 2015*). Пептид (на схеме – P) за счет плазмоподобной генерации миллиметрового излучения (mm EME) способствует упорядочиванию

нанокластеров в гигантские гетерофазные кластеры, излучающие такой же спектр, как исходный пептид.

Эта модель предполагает, что водные D-стабилизированные гигантские кластеры будут своеобразными усилителями излучения от пептида или полипептида. Действительно, при тысячекратном разведении плотность потока (линейно зависящая от концентрации излучателей – наночастиц в неводных средах [22]) падает в 2–3 раза (Таблица 7), а для растительных пептидов значительно возрастает. Это явление хорошо объясняет, почему для биоактивных пептидов возможно применение столь низких терапевтических дозы (также и в фитопатологии [239]). Если расчетные концентрации в фармакокинетике пептидов в плазме крови достигнут хотя бы 1 нМ, то константа диссоциации потенциального рецептора должна быть 100 пМ. Такую аффинность к олигопептидам невозможно объяснить, поскольку она предполагает квазинеобратимое связывание.

Таблица 7 - Изменение плотности потока радиотеплового излучения водных растворов пептидных препаратов при разбавлении (Аликвота – 100 мкл. Фон не превышал 1 мкВт/м²)

Наименование		³³ °C F (мкВт/м ²) ±SD	
		Исходный раствор	Тысячекратное разведение
Олигопептиды: животные и растительные	DSIP	37 ±2	19 ±2 (52%**)
	StPep1*	8 ±1	15 ±1 (187%)
Смеси пептидов и полипептидов	RENOBRAIN SM	37 ±2	14 ±1 (38%)

* исходная концентрация – 1 μМ

** в процентах к концентрированному раствору

С учетом радиоусиления сигнала от пептидов на кластерах воды возможна своеобразная мимикрия, когда дисперсионно имитируются воздействие на рецептор в части организации мерцающих диполей и конформационных превращений.

3.6 Термодинамическая интерпретация влияния электромагнитных колебаний пептидных растворов на стабильность клеточной среды

Взаимодействие регуляторных пептидов с водной средой приводит к формированию нанокластеров, обладающих способностью излучать низкоинтенсивные электромагнитные колебания в радиотепловом диапазоне. Эти колебания можно рассматривать как локальные возмущения электромагнитных условий, в том числе электрического и магнитного компонентов поля, которые в совокупности способны изменять ряд фундаментальных термодинамических параметров клеточной среды.

Поскольку биологическая система представляет собой многофакторный открытый термодинамический объект, её состояние в любой момент времени определяется параметрами физико-химической среды, от которых зависят: стабильность биомакромолекул, активность ферментов, мембранный потенциал, скорость транспорта веществ, гидратационная структура ионных оболочек и общее энергетическое состояние клетки.

На сегодняшний день установлено, что статистически значимые изменения таких параметров, как температура, pH, ионная сила, вязкость, осмоляльность, электрическая и магнитная напряжённость, способны оказывать к выраженным эффектам на уровень структуры и функции белков, их конформационную подвижность, активность рецепторов, состояние цитоскелета и стабильность мембран.

Эти утверждения подтверждаются большим количеством экспериментальных данных:

- влияние pH и ионной силы на структуру и активность белков [60]
- влияние физических полей на макромолекулы [240]
- влияние электромагнитных колебаний на клеточные процессы [241]
- роль водных структур и кластеров в передаче энергии и стабилизации макромолекул [234,235]

- чувствительность белков к слабым магнитным и электрическим воздействиям [242]
- влияние осмоляльности и плотности среды на стабильность клеток [243,244]

Учитывая данные результаты, можно утверждать, что пептидные кластеры, действующие как низкоомощные излучающие наноантенны, способны модулировать локальные параметры среды в пределах, достаточных для возникновения биологически значимых эффектов - особенно при концентрациях, характерных для регуляторных пептидов (наномолярный диапазон).

Такой подход позволяет интегрировать данные радиотеплового анализа в общую физико-химическую модель взаимодействия пептидов с клеточными системами.

Для удобства интерпретации ключевые параметры, определяющие состояние клетки и потенциально изменяемые локальными электромагнитными колебаниями, представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Физико-химические параметры клеточной среды, дополненные радиотепловым излучением пептидных растворов

Параметр	Определение / что означает	Как проявляется / за что отвечает	Единицы измерения
Температура	Средняя кинетическая энергия молекул	Скорость биохимических реакций; стабильность белков и мембран	°С, К
Плотность	Масса в единице объёма раствора	Вязкость, диффузия, растворимость макромолекул	кг/м ³
pH	Активность водородных ионов	Заряд белков; активность ферментов; стабильность пептидов	безразмерно
Ионная сила	Суммарная концентрация ионов с учётом их зарядов	Сворачивание белков, экранирование зарядов, мембранный потенциал	моль/л
Вязкость	Сопротивление движению частиц в растворе	Диффузия, конформационная подвижность белков	Па·с

Продолжение таблицы 8

Параметр	Определение / что означает	Как проявляется / за что отвечает	Единицы измерения
Осмоляльность	Количество осмотически активных частиц	Осмотическое давление; баланс воды в клетке	мОсм/кг
Химический потенциал	Свободная энергия компонента раствора	Направление и скорость транспорта веществ	Дж/моль
Электрическое поле (локальная напряжённость)	Сила воздействия на заряженные частицы	Конформация белков, работа ионных каналов, мембранный потенциал	В/м
Магнитное поле (локальная напряжённость)	Магнитный компонент электромагнитных колебаний	Динамика электронных состояний, слабые спиновые эффекты	А/м, Тл
Плотность мощности радиотеплового излучения пептидных кластеров	Мощность электромагнитного сигнала, излучаемого самоорганизованными пептидными/водными структурами	Потенциальная модуляция локальных электромагнитных условий	мкВт/м ²

Таким образом, комплексный физико-химический анализ позволяет рассматривать радиотепловое излучение пептидных растворов как физический фактор, способный изменять ключевые параметры клеточной среды и, следовательно, её функциональное состояние. Предложенная модель демонстрирует, что даже слабые электромагнитные колебания, возникающие при формировании пептидно-водных кластеров, могут вносить вклад в регуляцию биологических процессов, определяя функциональные эффекты регуляторных пептидов при наномолярных концентрациях.

3.7 Определение токсичности водных растворов регуляторных пептидов на модели Spirotox.

В эксперименте по оценке токсичности нами были проверены пептиды, отвечающие за иммунный ответ растений, а также другие биологически активные пептиды. Таким образом, Таблица 9 демонстрирует результаты реакции модельного организма - *Spirostomum ambiguum* на введение в раствор биологически активных пептидов различного происхождения. Микроорганизм *Spirostomum ambiguum* не погибает в водных растворах регуляторных пептидов в течение более 30 минут. Расчёт энергии активации для пересчёта в LD50 при пероральном введении грызунам (крысам) становится нецелесообразным. Полученные данные свидетельствуют о безопасности исследуемых препаратов

Таблица 9 - Продолжительность жизни *Spirostomum ambiguum* в водных растворах

Название образцов	t _ж , мин
H ₂ O* (D/H = 140 ppm)	≥30
Deuterium depleted water (вода, обедненная по дейтерию) (D/H = 5 ppm)	3±0,3
H ₂ O (D/H = 300 ppm)	2±0,1
Водные растворы пептидов**	≥30

*-все образцы бидистиллированной воды отличаются только концентрацией дейтерия

** -относится ко всем исследованным пептидам в интервале концентрации 1 нМ – 0,1 μМ

Проведённое исследование позволило выявить новые свойства регуляторных пептидов в водных растворах, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение для фармацевтической химии. Впервые было показано, что биологически активные пептиды способны индуцировать образование субмикронных и

гигантских гетерофазных кластеров, причём характер и динамика их формирования зависят от концентрации и природы препарата. Этот результат существенно дополняет ранее опубликованные данные о способности растворённых в воде газов образовывать долгоживущие ассоциаты (бабстоны), а также о формировании плотностных неоднородностей в растворах с различным изотопным составом. В отличие от описанных систем, показано, что именно пептиды выступают инициаторами кластеризации, что ранее не отмечалось в литературе.

Особое значение имеет адаптация метода диффузного отражения (2D-DLS) для проведения неразрушающего экспресс-контроля подлинности пептидных препаратов. Современные методы анализа пептидных средств - ВЭЖХ, масс-спектрометрия или электрофорез - демонстрируют высокую эффективность, но связаны с разрушением образца и требуют сложной пробоподготовки. В отличие от них, предложенный подход обеспечивает возможность верификации лекарственных форм без вскрытия первичной упаковки, что соответствует современным тенденциям повышения надёжности контроля качества. Подобный методологический сдвиг можно рассматривать как перспективный вклад в развитие технологий защиты рынка от фальсифицированных препаратов.

Рассмотренный механизм аномального взаимодействия пептидов с водными кластерами и сопровождающая его генерация радиотеплового излучения представляют собой новое возможное объяснение биологической активности пептидов в наномолярных концентрациях. Эти данные согласуются с концепцией низкоуровневой регуляции метаболизма пептидами и расширяют её, предлагая модель, основанную на электромагнитной стабилизации клеточных процессов. Тем самым становится возможным объяснение высокой эффективности препаратов, применяемых в клинической практике, например, Семакса, Кортексина и Церебролизина, даже в малых дозах.

Безопасность исследованных растворов регуляторных пептидов была подтверждена на модели Spirotox: микроорганизм *Spirostomum ambiguum* не проявил токсической чувствительности к пептидам в широком диапазоне

концентраций. Этот результат соответствует литературным данным о хорошей переносимости пептидных препаратов.

Таким образом, в работе получены новые результаты, которые не только восполняют пробелы в понимании физико-химических свойств регуляторных пептидов, но и открывают возможности для разработки инновационных методов контроля качества. Сочетание выявленных фундаментальных эффектов с практической значимостью позволяет рассматривать предложенный подход как перспективное направление развития современной фармацевтической химии и фармакогнозии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование показало, что регуляторные пептиды в водных растворах способны инициировать образование субмикронных и гигантских гетерофазных структур. Эти процессы отражают их способность к самоорганизации и во многом определяют особенности биологической активности. Установлено, что растворы пептидов представляют собой самоорганизующиеся супранадмолекулярные системы, способные к радиотепловому излучению и характеризующиеся переменной, динамически изменяющейся внутренней структурой. Полученные результаты имеют фундаментальное значение и формируют новое представление в фармацевтической химии: лекарственное средство следует рассматривать не только как индивидуальное химическое соединение, но и как инициатор структурной самоорганизации водной среды организма на супрамолекулярном уровне. Практическая значимость работы заключается в разработке неразрушающих экспресс-методов контроля подлинности и качества пептидных препаратов, что открывает возможности для совершенствования технологий стандартизации и создания лекарственных средств нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Разработана экспресс-методика на основе кинетики диффузного рассеяния света для контроля качества биологически активных пептидов, обеспечивающая потребности фармацевтической промышленности.

2. Установлено, что пептиды животного и растительного происхождения, являясь наночастицами, способны специфически индуцировать образование устойчивых водных супрамолекулярных ассоциатов - субмикронных структур (бабстонов), гигантских гетерофазных кластеров.

3. Метод 2D-DLS апробирован и адаптирован для целей фармацевтического анализа водных растворов пептидов: показана возможность дифференциации олиго- и полипептидов различного происхождения в широком диапазоне концентраций (от μM до nM); проведена валидация метода и его применимость для экспресс-контроля подлинности.

4. Доказана принципиальная возможность идентификации пептидных препаратов по параметрам радиотеплового излучения без вскрытия упаковки: показано, что комбинация коэффициента радиотеплового излучения и параметров его стимуляции формирует уникальный идентификационный профиль каждого препарата.

5. Подтверждена метрологическая состоятельность разработанных подходов: проведены многосерийные эксперименты (не менее 7 серий по 45 повторов), установлены статистические характеристики, показана высокая воспроизводимость результатов (среднеквадратичные отклонения $\leq 7\%$ при доверительной вероятности 0,98).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФИ — активный фармацевтический ингредиент

АМП — антимикробные пептиды

ВЭЖХ (HPLC) — высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации

ДЛС (DLS) — динамическое лазерное светорассеяние

ЖХ-МС (LC-MS) — жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

ИК-Фурье (FTIR) — инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

КВЧ (EHF) — крайне высокие частоты

ОФ-ВЭЖХ (RP-HPLC) — обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФС — общая фармакопейная статья

РТИ — радиотепловое излучение

УФ — ультрафиолетовое излучение

ЯМР (NMR) — ядерный магнитный резонанс

2D-DLS — двумерное динамическое светорассеяние (кинетика диффузного отражения света)

ACN — ацетонитрил

CQA — критические атрибуты качества (Critical Quality Attributes)

CV — коэффициент вариации

DSIP — дельта-сон-индуцирующий пептид (Delta Sleep-Inducing Peptide)

ESI / HESI — электроспрей-ионизация / нагретая электроспрей-ионизация

ESI-MS — масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией

Fmoc — 9-флуоренилметоксикарбонильная защитная группа

GMP — надлежащая производственная практика (Good Manufacturing Practice)

HILIC — гидрофильная хроматография взаимодействия

ICH — Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения

IEX — ионообменная хроматография

LALLS — лазерное малоугловое светорассеяние

MALDI-TOF — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с
временным масс-анализатором

MeOH — метанол

MS/MS — tandemная масс-спектрометрия

PDI — индекс полидисперсности

QbD — подход «Качество через проектирование» (Quality by Design)

Q-TOF — квадруполь-временный масс-анализатор

SD — стандартное отклонение

SEC — эксклюзионная (гель-фильтрационная) хроматография

SPPS — твердофазный синтез пептидов (Solid-Phase Peptide Synthesis)

TES-92 — прибор для регистрации радиотеплового излучения

TFA — трифторуксусная кислота

VLP — вирусоподобные частицы (Virus-Like Particles)

α -MSH — α -меланоцитстимулирующий гормон

ζ -потенциал — электрокинетический (зета-) потенциал

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Serebrenik Y.V., Mani D., Maujean T., Burslem G.M., Shalem O. Pooled Endogenous Protein Tagging and Recruitment for Systematic Profiling of Protein Function // *Cell Genomics*. – 2024. – Vol. 4. – Art. 100651. – DOI 10.1016/j.xgen.2024.100651.
2. Toldrá F., Reig M., Aristoy M.-C., Mora L. Generation of Bioactive Peptides during Food Processing // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 267. – P. 395–404. – DOI 10.1016/j.foodchem.2017.06.119.
3. Merz M.L., Habeshian S., Li B., David J.-A.G.L., Nielsen A.L., Ji X., Il Khwildy K., Duany Benitez M.M., Phothirath P., Heinis C. De Novo Development of Small Cyclic Peptides That Are Orally Bioavailable // *Nature Chemical Biology*. – 2024. – Vol. 20. – P. 624–633. – DOI 10.1038/s41589-023-01496-y.
4. Yarandi S.S., Hebbar G., Sauer C.G., Cole C.R., Ziegler T.R. Diverse Roles of Leptin in the Gastrointestinal Tract: Modulation of Motility, Absorption, Growth, and Inflammation // *Nutrition*. – 2011. – Vol. 27. – P. 269–275. – DOI 10.1016/j.nut.2010.07.004.
5. Karelin A.A., Blishchenko E.Y., Ivanov V.T. A Novel System of Peptidergic Regulation // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 428. – P. 7–12. – DOI 10.1016/S0014-5793(98)00486-4.
6. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine // *Physiological Reviews*. – 2013. – Vol. 93. – P. 1803–1845. – DOI 10.1152/physrev.00039.2012.
7. Smith N.K., Hackett T.A., Galli A., Flynn C.R. GLP-1: Molecular Mechanisms and Outcomes of a Complex Signaling System // *Neurochemistry International*. – 2019. – Vol. 128. – P. 94–105. – DOI 10.1016/j.neuint.2019.04.010.

8. Kamm K. CGRP: Vom Neuropeptid zum Therapeutischen Target (Hintergründe und Pathophysiologie) // Fortschritte der Neurologie – Psychiatrie. – 2024. – Vol. 92. – P. 267–276. – DOI 10.1055/a-2331-0783.
9. Li T., Li T., Wang Z., Jin Y. Cyclopeptide-Based Anti-Liver Cancer Agents: A Mini-Review // Protein and Peptide Letters. – 2023. – Vol. 30. – P. 201–213. – DOI 10.2174/0929866530666230217160717.
10. Angata K., Wagatsuma T., Togayachi A., Sato T., Sogabe M., Tajiri K., Ozawa T., Nagashima I., Shimizu H., Iijima S. O-Glycosylated HBsAg Peptide Can Induce Specific Antibody Neutralizing HBV Infection // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. – 2022. – Vol. 1866. – Art. 130020. – DOI 10.1016/j.bbagen.2021.130020.
11. Kiss L., Mándity I.M., Fülöp F. Highly Functionalized Cyclic β -Amino Acid Moieties as Promising Scaffolds in Peptide Research and Drug Design // Amino Acids. – 2017. – Vol. 49. – P. 1441–1455. – DOI 10.1007/s00726-017-2439-9.
12. Lander A.J., Jin Y., Luk L.Y.P. D-Peptide and D-Protein Technology: Recent Advances, Challenges, and Opportunities // ChemBioChem. – 2023. – Vol. 24. – DOI 10.1002/cbic.202200537.
13. Gomazkov O.A. Cortexin. Molecular Mechanisms and Targets of Neuroprotective Activity // Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. – 2015. – Vol. 115. – P. 99–104. – DOI 10.17116/jnevro20151158199-104.
14. Kaufmann C., Sauter M. Sulfated Plant Peptide Hormones // Journal of Experimental Botany. – 2019. – Vol. 70. – P. 4267–4277. – DOI 10.1093/jxb/erz292.
15. Landi N., Clemente A., Pedone P.V., Ragucci S., Di Maro A. An Updated Review of Bioactive Peptides from Mushrooms in a Well-Defined Molecular Weight Range // Toxins (Basel). – 2022. – Vol. 14. – Art. 2084. – DOI 10.3390/toxins14020084.
16. Yi H.-Y., Chowdhury M., Huang Y.-D., Yu X.-Q. Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications // Applied Microbiology and

Biotechnology. – 2014. – Vol. 98. – P. 5807–5822. – DOI 10.1007/s00253-014-5792-6.

17. Suchi S.A., Nam K.B., Kim Y.K., Tarek H., Yoo J.C. A Novel Antimicrobial Peptide YS12 Isolated from *Bacillus velezensis* CBSYS12 Exerts Anti-Biofilm Properties against Drug-Resistant Bacteria // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2023. – Vol. 46. – P. 813–828. – DOI 10.1007/s00449-023-02864-7.

18. Ziganshina L.E., Abakumova T., Nurkhametova D., Ivanchenko K. Cerebrolysin for Acute Ischaemic Stroke // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2023. – Art. CD007026. – DOI 10.1002/14651858.CD007026.pub7.

19. Boparai J.K., Sharma P.K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications // *Protein and Peptide Letters*. – 2019. – Vol. 27. – P. 4–16. – DOI 10.2174/0929866526666190822165812.

20. Qiao Y., Xu B. Peptide Assemblies for Cancer Therapy // *ChemMedChem*. – 2023. – Vol. 18. – DOI 10.1002/cmdc.202300258.

21. Rigter A., Priem J., Langeveld J.P.M., Bossers A. Prion Protein Self-Interaction in Prion Disease Therapy Approaches // *Veterinary Quarterly*. – 2011. – Vol. 31. – P. 115–128. – DOI 10.1080/01652176.2011.604976.

22. Syroeshkin A.V., Petrov G.V., Taranov V.V., Pleteneva T.V., Koldina A.M., Gaydashev I.A., Kolyabina E.S., Galkina D.A., Sorokina E.V., Uspenskaya E.V. Radiothermal Emission of Nanoparticles with a Complex Shape as a Tool for the Quality Control of Pharmaceuticals Containing Biologically Active Nanoparticles // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – Art. 966. – DOI 10.3390/pharmaceutics15030966.

23. Magerramova S.T., Odarchenko A.S., El-Taravi Y.A., Erikenova D.K., Shestakova M.V. On the 100th Anniversary of the Nobel Prize “For the Discovery of Insulin” // *Diabetes Mellitus*. – 2023. – Vol. 26. – P. 203–210. – DOI 10.14341/DM13012.

24. Rigney N., de Vries G.J., Petrulis A., Young L.J. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities // *Endocrinology*. – 2022. – Vol. 163. – DOI 10.1210/endocr/bqac111.
25. Sacha G.L., Bauer S.R. Optimizing Vasopressin Use and Initiation Timing in Septic Shock // *Chest*. – 2023. – Vol. 164. – P. 1216–1227. – DOI 10.1016/j.chest.2023.07.009.
26. Srinivasan A., Wong F.K., Karponis D. Calcitonin: A Useful Old Friend // *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. – 2020. – Vol. 20. – P. 600–609.
27. Popoviciu M.-S., Păduraru L., Yahya G., Metwally K., Cavalu S. Emerging Role of GLP-1 Agonists in Obesity: A Comprehensive Review of Randomised Controlled Trials // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Art. 10449. – DOI 10.3390/ijms241310449.
28. Liu W., Tang H., Li L., Wang X., Yu Z., Li J. Peptide-Based Therapeutic Cancer Vaccine: Current Trends in Clinical Application // *Cell Proliferation*. – 2021. – Vol. 54. – DOI 10.1111/cpr.13025.
29. Sharma R., Borah S.J., Bhawna, Kumar S., Gupta A., Singh P., Goel V.K., Kumar R., Kumar V. Functionalized Peptide-Based Nanoparticles for Targeted Cancer Nanotherapeutics: A State-of-the-Art Review // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7, № 41. – P. 36092–36107. – DOI 10.1021/acsomega.2c03974.
30. Zhu Y., Xu W., Chen W., Li B., Li G., Deng H., Zhang L., Shao C., Shan A. Self-Assembling Peptide with Dual Function of Cell Penetration and Antibacterial as a Nano Weapon to Combat Intracellular Bacteria // *Science Advances*. – 2025. – Vol. 11. – DOI 10.1126/sciadv.ads3844.
31. Kalmykova G.V., Chefranova Zh.Yu., Rybnikova V.F., Zubova K.O. Cortixin Administration Due to Improvement of Cognitive and Behavioral Disorders in Children and Teenagers with Epilepsy // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. – 2021. – Vol. 121. – P. 127–132. – DOI 10.17116/jnevro2021121031127.

32. Suetov A.A., Alekperov S.I., Odinskaya M.A., Kostina A.A. Retinoprotective Effects of Retinalamin Studied in an Experimental Model of Photochemical Damage to Rabbit Retinas // *Vestnik Oftalmologii*. – 2021. – Vol. 137. – P. 57–63. – DOI 10.17116/oftalma202113705157.
33. Nakamura T., Ramos-Álvarez I., Iordanskaia T., Moreno P., Mantey S.A., Jensen R.T. Molecular Basis for High Affinity and Selectivity of Peptide Antagonist Bantag-1 for the Orphan BB3 Receptor // *Biochemical Pharmacology*. – 2016. – Vol. 115. – P. 64–76. – DOI 10.1016/j.bcp.2016.06.013.
34. Montone C.M., Aita S.E., Cavaliere C., Cerrato A., Laganà A., Piovesana S., Capriotti A.L. High-Resolution Mass Spectrometry and Chemometrics for the Detailed Characterization of Short Endogenous Peptides in Milk By-Products // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – Art. 6472. – DOI 10.3390/molecules26216472.
35. Li G., Liu S., Chen Y., Zhao J., Xu H., Weng J., Yu F., Xiong A., Udduttula A., Wang D. An Injectable Liposome-Anchored Teriparatide Incorporated Gallic Acid-Grafted Gelatin Hydrogel for Osteoarthritis Treatment // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – Art. 3159. – DOI 10.1038/s41467-023-38597-0.
36. Martins S., Sarmento B., Ferreira D.C., Souto E.B. Lipid-Based Colloidal Carriers for Peptide and Protein Delivery: Liposomes versus Lipid Nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. – 2007. – Vol. 2. – P. 595–607.
37. Zhao X., Kuipers O.P. Synthesis of Silver-Nisin Nanoparticles with Low Cytotoxicity as Antimicrobials against Biofilm-Forming Pathogens // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 206. – Art. 111965. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2021.111965.
38. Allen R.J., Mathew B., Rice K.G. PEG-Peptide Inhibition of Scavenger Receptor Uptake of Nanoparticles by the Liver // *Molecular Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 15. – P. 3881–3891. – DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00355.

39. Zheng Y., Cong Y., Schmidt E.W., Nair S.K. Catalysts for the Enzymatic Lipidation of Peptides // *Accounts of Chemical Research*. – 2022. – Vol. 55. – P. 1313–1323. – DOI 10.1021/acs.accounts.2c00108.
40. Pei Z., Song Q., Xu J., Yu S., Ma H. The Cyclic Antimicrobial Peptide C-LR18 Has Enhanced Antibacterial Activity, Improved Stability, and a Longer Half-Life Compared to the Original Peptide // *Antibiotics*. – 2025. – Vol. 14. – Art. 312. – DOI 10.3390/antibiotics14030312.
41. Smits M.M., Van Raalte D.H. Safety of Semaglutide // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – DOI 10.3389/fendo.2021.645563.
42. Demidova T.Yu., Ushanova F.O., Bogacheva T.L. Semaglutide in Type 2 Diabetes Management: Review of Current Evidence from Concept to Date // *FOCUS. Endocrinology*. – 2023. – Vol. 4. – P. 13–28. – DOI 10.15829/2713-0177-2023-3-11.
43. Marso S.P., Daniels G.H., Brown-Frandsen K., Kristensen P., Mann J.F.E., Nauck M.A., Nissen S.E., Pocock S., Poulter N.R., Ravn L.S. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375. – P. 311–322. – DOI 10.1056/NEJMoa1603827.
44. Lundgren J.R., Janus C., Jensen S.B.K., Juhl C.R., Olsen L.M., Christensen R.M., Svane M.S., Bandholm T., Bojsen-Møller K.N., Blond M.B. Healthy Weight Loss Maintenance with Exercise, Liraglutide, or Both Combined // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384. – P. 1719–1730. – DOI 10.1056/NEJMoa2028198.
45. Huang X., Zhang G., Tang T.-Y., Gao X., Liang T.-B. Personalized Pancreatic Cancer Therapy: From the Perspective of mRNA Vaccine // *Military Medical Research*. – 2022. – Vol. 9. – Art. 53. – DOI 10.1186/s40779-022-00416-w.
46. Bækdal T.A., Donsmark M., Hartoft-Nielsen M., Søndergaard F.L., Connor A. Relationship Between Oral Semaglutide Tablet Erosion and Pharmacokinetics: A Pharmacoscintigraphic Study // *Clinical Pharmacology & Drug Development*. – 2021. – Vol. 10. – P. 453–462. – DOI 10.1002/cpdd.938.

47. Bain S.C., Mosenzon O., Arechavaleta R., Bogdański P., Comlekci A., Consoli A., Deerochanawong C., Dungan K., Faingold M.C., Farkouh M.E. Cardiovascular Safety of Oral Semaglutide in Patients with Type 2 Diabetes: Rationale, Design and Patient Baseline Characteristics for the PIONEER 6 Trial // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2019. – Vol. 21. – P. 499–508. – DOI 10.1111/dom.13553.
48. Latzer P., Zelba H., Battke F., Reinhardt A., Shao B., Bartsch O., Rabsteyn A., Harter J., Schulze M., Okech T. A Real-World Observation of Patients with Glioblastoma Treated with a Personalized Peptide Vaccine // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – Art. 6870. – DOI 10.1038/s41467-024-51315-8.
49. González-López N.M., Insuasty-Cepeda D.S., Huertas-Ortiz K.A., Reyes-Calderón J.E., Martínez-Ramírez J.A., Fierro-Medina R., Rivera-Monroy Z.J., García-Castañeda J.E. Gradient Retention Factor Concept Applied to Method Development for Peptide Analysis by RP-HPLC // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7. – P. 44817–44824. – DOI 10.1021/acsomega.2c04907.
50. Weaver S.D., Schuster-Little N., Whelan R.J. Preparative Capillary Electrophoresis Fractionation of Protein Digests Improves Peptide and Protein Identification in Bottom-Up Proteomics // *Analytical Methods*. – 2022. – Vol. 14. – P. 1103–1110. – DOI 10.1039/D1AY02145A.
51. Jiang R., Rempel D.L., Gross M.L. MALDI Peptide Mapping for Fast Analysis in Protein Footprinting // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2023. – Vol. 490. – Art. 117080. – DOI 10.1016/j.ijms.2023.117080.
52. Leko M., Filippova P., Rustler K., Bruckdorfer T., Burov S. Solid-Phase Synthesis of Peptide Hydrazides: Moving Toward Green Chemistry // *Journal of Peptide Science*. – 2025. – Vol. 31. – DOI 10.1002/psc.70010.
53. Bhinder B., Gilvary C., Madhukar N.S., Elemento O. Artificial Intelligence in Cancer Research and Precision Medicine // *Cancer Discovery*. – 2021. – Vol. 11. – P. 900–915. – DOI 10.1158/2159-8290.CD-21-0090.

54. Bilgin G.B., Bilgin C., Burkett B.J., Orme J.J., Childs D.S., Thorpe M.P., Halfdanarson T.R., Johnson G.B., Kendi A.T., Sartor O. Theranostics and Artificial Intelligence: New Frontiers in Personalized Medicine // *Theranostics*. – 2024. – Vol. 14. – P. 2367–2378. – DOI 10.7150/thno.94788.
55. Jarab A.S., Abu Heshmeh S.R., Al Meslamani A.Z. Artificial Intelligence (AI) in Pharmacy: An Overview of Innovations // *Journal of Medical Economics*. – 2023. – Vol. 26. – P. 1261–1265. – DOI 10.1080/13696998.2023.2265245.
56. Mikolajczak D.J., Berger A.A., Koksche B. Catalytically Active Peptide–Gold Nanoparticle Conjugates: Prospecting for Artificial Enzymes // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – Vol. 59. – P. 8776–8785. – DOI 10.1002/anie.201908625.
57. Valencia L., Shamoony R., Romero A., De la Cuesta F., Sánchez-Ferrer C.F., Peiró C. Angiotensin-(1–7), a Protective Peptide against Vascular Aging // *Peptides* (N.Y.). – 2022. – Vol. 152. – Art. 170775. – DOI 10.1016/j.peptides.2022.170775.
58. Müller T.D., Finan B., Bloom S.R., D'Alessio D., Drucker D.J., Flatt P.R., Fritsche A., Gribble F., Grill H.J., Habener J.F. Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) // *Molecular Metabolism*. – 2019. – Vol. 30. – P. 72–130. – DOI 10.1016/j.molmet.2019.09.010.
59. Lawitz E.J., Fraessdorf M., Neff G.W., Schattenberg J.M., Nouredin M., Alkhouri N., Schmid B., Andrews C.P., Takács I., Hussain S.A. Efficacy, Tolerability and Pharmacokinetics of Survodutide, a Glucagon/GLP-1 Receptor Dual Agonist, in Cirrhosis // *Journal of Hepatology*. – 2024. – Vol. 81. – P. 837–846. – DOI 10.1016/j.jhep.2024.06.003.
60. Yadav A., Pandey D., Ashraf G.M., Rachana. Peptide-Based Therapy for Neurological Disorders // *Current Protein and Peptide Science*. – 2021. – Vol. 22. – P. 656–665. – DOI 10.2174/1389203722666210920151810.

61. Hykollari A., Malzl D., Wilson I.B.H., Paschinger K. Protein-Specific Analysis of Invertebrate Glycoproteins // In: *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – P. 421–435.
62. Sikora K., Bauer M., Bartoszewska S., Neubauer D., Kamysz W. Glycosylated Lipopeptides: Synthesis and Evaluation of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13. – Art. 172. – DOI 10.3390/biom13010172.
63. de Paiva C.S., Pflugfelder S.C., Ng S.M., Akpek E.K. Topical Cyclosporine A Therapy for Dry Eye Syndrome // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2019. – Art. CD010051. – DOI 10.1002/14651858.CD010051.pub2.
64. Ganesan N., Mishra B., Felix L., Mylonakis E. Antimicrobial Peptides and Small Molecules Targeting the Cell Membrane of *Staphylococcus aureus* // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2023. – Vol. 87. – DOI 10.1128/mmbr.00037-22.
65. Abdulbagi M., Wang L., Siddig O., Di B., Li B. D-Amino Acids and D-Amino Acid-Containing Peptides: Potential Disease Biomarkers and Therapeutic Targets? // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 1716. – DOI 10.3390/biom11111716.
66. Haddadzadegan S., Dorkoosh F., Bernkop-Schnürch A. Oral Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins: Technology Landscape of Lipid-Based Nanocarriers // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2022. – Vol. 182. – Art. 114097. – DOI 10.1016/j.addr.2021.114097.
67. Aisenbrey C., Amaro M., Pospíšil P., Hof M., Bechinger B. Highly Synergistic Antimicrobial Activity of Magainin 2 and PGLa Peptides Is Rooted in the Formation of Supramolecular Complexes with Lipids // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Art. 11652. – DOI 10.1038/s41598-020-68416-1.
68. Neggers S.J., van der Lely A.J. Pegvisomant for Acromegaly: Does It Always Work? // *Archives of Endocrinology and Metabolism*. – 2019. – Vol. 63. – P. 318–319. – DOI 10.20945/2359-3997000000163.

69. Goldberg K., Lobov A., Antonello P., Shmueli M.D., Yakir I., Weizman T., Ulman A., Sheban D., Laser E., Kramer M.P. Cell-Autonomous Innate Immunity by Proteasome-Derived Defence Peptides // *Nature*. – 2025. – Vol. 639. – P. 1032–1041. – DOI 10.1038/s41586-025-08615-w.
70. Yano Y. Cell-Surface Initial Aggregation Process of Amyloid- β Peptides Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy // *Yakugaku Zasshi*. – 2021. – Vol. 141. – P. 825–829. – DOI 10.1248/yakushi.20-00251-2.
71. Pan L., Cheng Y., Yang W., Wu X., Zhu H., Hu M., Zhang Y., Zhang M. Nintedanib Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, Inflammation, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating PI3K/Akt/mTOR Pathway in Mice // *Inflammation*. – 2023. – Vol. 46. – P. 1531–1542. – DOI 10.1007/s10753-023-01825-2.
72. Chao A.M., Tronieri J.S., Amaro A., Wadden T.A. Semaglutide for the Treatment of Obesity // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 2023. – Vol. 33. – P. 159–166. – DOI 10.1016/j.tcm.2021.12.008.
73. McCarty T.S., Patel P. Desmopressin // – 2025.
74. Baker D.E. Formulary Drug Reviews: Terlipressin // *Hospital Pharmacy*. – 2023. – Vol. 58. – P. 544–548. – DOI 10.1177/00185787221150921.
75. Wragg J.W., White P.-L., Hadzhiev Y., Wanigasooriya K., Stodolna A., Tee L., Barros-Silva J.D., Beggs A.D., Müller F. Intra-Promoter Switch of Transcription Initiation Sites in Proliferation Signaling-Dependent RNA Metabolism // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 30. – P. 1970–1984. – DOI 10.1038/s41594-023-01156-8.
76. Hu X., Li J., Fu M., Zhao X., Wang W. The JAK/STAT Signaling Pathway: From Bench to Clinic // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – Art. 402. – DOI 10.1038/s41392-021-00791-1.
77. Gascón P., Harbeck N., Rapoport B.L., Anderson R., Brueckmann I., Howe S., Aapro M. Filgrastim Biosimilar (EP2006): A Review of 15 Years' Post-Approval Evidence // *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. – 2024. – Vol. 196. – Art. 104306. – DOI 10.1016/j.critrevonc.2024.104306.

78. Livingston M.J., Zhang M., Kwon S.-H., Chen J.-K., Li H., Manicassamy S., Dong Z. Autophagy Activates EGR1 via MAPK/ERK to Induce FGF2 in Renal Tubular Cells for Fibroblast Activation and Fibrosis during Maladaptive Kidney Repair // *Autophagy*. – 2024. – Vol. 20. – P. 1032–1053. – DOI 10.1080/15548627.2023.2281156.
79. Fleseriu M., Nachtigall L.B., Samson S.L., Melmed S. Oral Octreotide Capsules for Acromegaly Treatment: Application of Clinical Trial Insights to Real-World Use // *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. – 2024. – Vol. 19. – P. 367–375. – DOI 10.1080/17446651.2024.2363540.
80. Caplin M.E., Pavel M., Ćwikła J.B., Phan A.T., Raderer M., Sedláčková E., Cadiot G., Wolin E.M., Capdevila J., Wall L., et al. Lanreotide in Metastatic Enteropancreatic Neuroendocrine Tumors // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 371, No. 3. – P. 224–233. – DOI 10.1056/NEJMoa1316158.
81. Skiba M.A., Sterling S.M., Rawson S., Zhang S., Xu H., Jiang H., Nemeth G.R., Gilman M.S.A., Hurley J.D., Shen P. Antibodies Expand the Scope of Angiotensin Receptor Pharmacology // *Nature Chemical Biology*. – 2024. – Vol. 20. – P. 1577–1585. – DOI 10.1038/s41589-024-01620-6.
82. Gulla A., Morelli E., Samur M.K., Botta C., Hideshima T., Bianchi G., Fulciniti M., Malvestiti S., Prabhala R.H., Talluri S. Bortezomib Induces Anti-Multiple Myeloma Immune Response Mediated by CGAS/STING Pathway Activation // *Blood Cancer Discovery*. – 2021. – Vol. 2. – P. 468–483. – DOI 10.1158/2643-3230.BCD-21-0047.
83. Sogbein O., Paul P., Umar M., Chaari A., Batuman V., Upadhyay R. Bortezomib in Cancer Therapy: Mechanisms, Side Effects, and Future Proteasome Inhibitors // *Life Sciences*. – 2024. – Vol. 358. – Art. 123125. – DOI 10.1016/j.lfs.2024.123125.
84. Zhai Y.-J., Feng Y., Ma X., Ma F. Defensins: Defenders of Human Reproductive Health // *Human Reproduction Update*. – 2023. – Vol. 29. – P. 126–154. – DOI 10.1093/humupd/dmac032.

85. Gao X., Ding J., Liao C., Xu J., Liu X., Lu W. Defensins: The Natural Peptide Antibiotic // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2021. – Vol. 179. – Art. 114008. – DOI 10.1016/j.addr.2021.114008.
86. Scheenstra M.R., van Harten R.M., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P., Coorens M. Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01137.
87. Zhang L., Huang Y., Lindstrom A.R., Lin T.-Y., Lam K.S., Li Y. Peptide-Based Materials for Cancer Immunotherapy // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – P. 7807–7825. – DOI 10.7150/thno.37194.
88. Alas M., Saghaeidehkordi A., Kaur K. Peptide–Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64. – P. 216–232. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.0c01530.
89. Choi M.S., Lee C.Y., Kim J.H., Lee Y.M., Lee S., Kim H.J., Heo K. Gramicidin, a Bactericidal Antibiotic, Is an Antiproliferative Agent for Ovarian Cancer Cells // *Medicina (Buenos Aires)*. – 2023. – Vol. 59. – Art. 2059. – DOI 10.3390/medicina59122059.
90. Chen W., Li Z., Yu N., Zhang L., Li H., Chen Y., Gong F., Lin W., He X., Wang S. Bone-Targeting Exosome Nanoparticles Activate Keap1/Nrf2/GPX4 Signaling Pathway to Induce Ferroptosis in Osteosarcoma Cells // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2023. – Vol. 21. – Art. 355. – DOI 10.1186/s12951-023-02129-1.
91. Zhang B., Sun X., Mei H., Wang Y., Liao Z., Chen J., Zhang Q., Hu Y., Pang Z., Jiang X. LDLR-Mediated Peptide-22-Conjugated Nanoparticles for Dual-Targeting Therapy of Brain Glioma // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – P. 9171–9182. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.08.039.
92. Hong S.-T., Lin H., Wang C.-S., Chang C.-H., Lin A.M.-Y., Yang J.C.-H., Lo Y.-L. Improving the Anticancer Effect of Afatinib and MicroRNA by Using Lipid Polymeric Nanoparticles Conjugated with Dual pH-Responsive and Targeting Peptides // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2019. – Vol. 17. – Art. 89. – DOI 10.1186/s12951-019-0519-6.

93. Ou X., Wang H., Tie H., Liao J., Luo Y., Huang W., Yu R., Song L., Zhu J. Novel Plant-Derived Exosome-Like Nanovesicles from *Catharanthus roseus*: Preparation, Characterization, and Immunostimulatory Effect via TNF- α /NF- κ B/PU.1 Axis // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2023. – Vol. 21. – Art. 160. – DOI 10.1186/s12951-023-01919-x.
94. Ikeda M., Okusaka T., Ohno I., Mitsunaga S., Kondo S., Ueno H., Morizane C., Gemmoto K., Suna H., Ushida Y. Phase I Studies of Peptide Vaccine Cocktails Derived from GPC3, WDRPUH and NEIL3 for Advanced Hepatocellular Carcinoma // *Immunotherapy*. – 2021. – Vol. 13. – P. 371–385. – DOI 10.2217/imt-2020-0278.
95. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. Interferons, Interferon-like Cytokines, and Their Receptors // *Immunological Reviews*. – 2004. – Vol. 202. – P. 8–32. – DOI 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.
96. Bruun T.U.J., Andersson A.-M.C., Draper S.J., Howarth M. Engineering a Rugged Nanoscaffold to Enhance Plug-and-Display Vaccination // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12. – P. 8855–8866. – DOI 10.1021/acsnano.8b02805.
97. Yang H., Cao J., Lin X., Yue J., Zieneldien T., Kim J., Wang L., Fang J., Huang R.-P., Bai Y. Developing an Effective Peptide-Based Vaccine for COVID-19: Preliminary Studies in Mice Models // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – Art. 449. – DOI 10.3390/v14030449.
98. Androphy E.J., Hubbert N.L., Schiller J.T., Lowy D.R. Identification of the HPV-16 E6 Protein from Transformed Mouse Cells and Human Cervical Carcinoma Cell Lines // *EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – P. 989–992. – DOI 10.1002/j.1460-2075.1987.tb04849.x.
99. Goldstone S.E. Human Papillomavirus (HPV) Vaccines in Adults: Learnings from Long-Term Follow-up of Quadrivalent HPV Vaccine Clinical Trials // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2023. – Vol. 19. – DOI 10.1080/21645515.2023.2184760.
100. Setiawan D., Nurulita N.A., Khoirunnisa S.M., Postma M.J. The Clinical Effectiveness of One-Dose Vaccination with an HPV Vaccine: A Meta-

Analysis of 902 368 Vaccinated Women // PLoS One. – 2024. – Vol. 19. – Art. e0290808. – DOI 10.1371/journal.pone.0290808.

101. Wolf E., Milazzo S., Boehm K., Zwahlen M., Horneber M. Thymic Peptides for Treatment of Cancer Patients // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2011. – Art. CD003993. – DOI 10.1002/14651858.CD003993.pub3.

102. Lee J.H., Paik H.-D. Anticancer and Immunomodulatory Activity of Egg Proteins and Peptides: A Review // Poultry Science. – 2019. – Vol. 98. – P. 6505–6516. – DOI 10.3382/ps/pez381.

103. Khare S., Radian A.D., Dorfleutner A., Stehlik C. Measuring NLR Oligomerization I: Size Exclusion Chromatography, Co-Immunoprecipitation, and Cross-Linking // Methods in Molecular Biology. – 2016. – P. 131–143.

104. Nireeksha, Varma S.R., Damdoun M., Alsaegh M.A., Hegde M.N., Kumari S.N., Ramamurthy S., Narayanan J., Imran E., Shabbir J. Immunomodulatory Expression of Cathelicidins Peptides in Pulp Inflammation and Regeneration: An Update // Current Issues in Molecular Biology. – 2021. – Vol. 43. – P. 116–126. – DOI 10.3390/cimb43010010.

105. Weiß F., Schnabel A., Planatscher H., van den Berg B.H.J., Serschnitzki B., Nuessler A.K., Thasler W.E., Weiss T.S., Reuss M., Stoll D. Indirect Protein Quantification of Drug-Transforming Enzymes Using Peptide Group-Specific Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – Art. 8759. – DOI 10.1038/srep08759.

106. Noki S., de la Torre B.G., Albericio F. Safety-Catch Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis // Molecules. – 2024. – Vol. 29. – Art. 1429. – DOI 10.3390/molecules29071429.

107. Sabatino G., Papini A.M. Advances in Automatic, Manual and Microwave-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis // Current Opinion in Drug Discovery and Development. – 2008. – Vol. 11. – P. 762–770.

108. Behrendt R., White P., Offer J. Advances in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis // Journal of Peptide Science. – 2016. – Vol. 22. – P. 4–27. – DOI 10.1002/psc.2836.

109. Pisk J., Agustin D., Poli R. Organic Salts and Merrifield Resin Supported $[PM_{12}O_{40}]^{3-}$ (M = Mo or W) as Catalysts for Adipic Acid Synthesis // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Art. 783. – DOI 10.3390/molecules24040783.
110. Renil M., Ferreras M., Delaisse J.M., Foged N.T., Meldal M. PEGA Supports for Combinatorial Peptide Synthesis and Solid-Phase Enzymatic Library Assays // *Journal of Peptide Science*. – 1998. – Vol. 4. – P. 195–210. – DOI 10.1002/(SICI)1099-1387(199805)4:3<195::AID-PSC141>3.0.CO;2-R.
111. Yang X., Lin H., Lu W., Wang D. Compatibility Study of Merrifield Linker in Fmoc Strategy Peptide Synthesis // *Protein and Peptide Letters*. – 2013. – Vol. 20. – P. 140–145. – DOI 10.2174/092986613804725343.
112. Liu Y., Lu X., Chen M., Wei Z., Peng G., Yang J., Tang C., Yu P. Advances in Screening, Synthesis, Modification, and Biomedical Applications of Peptides and Peptide Aptamers // *BioFactors*. – 2024. – Vol. 50. – P. 33–57. – DOI 10.1002/biof.2001.
113. Noki S., Saneii H., de la Torre B.G., Albericio F. Base-Labile Safety-Catch Linker: Synthesis and Applications in Solid-Phase Peptide Synthesis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – Art. 2210. – DOI 10.3390/ijms26052210.
114. Cai Y., Ma Z., Jiang J., Lo C.C.L., Luo S., Jalan A., Cardon J.M., Ramos A., Moyá D.A., Joaquin D. Convergent Total Synthesis of Yaku'amide A // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2021. – Vol. 60. – P. 5162–5167. – DOI 10.1002/anie.202014238.
115. Samson D., Rentsch D., Minuth M., Meier T., Loidl G. The Aspartimide Problem Persists: Fmoc-SPPS Chain Termination Due to Formation of N-Terminal Piperazine-2,5-diones // *Journal of Peptide Science*. – 2019. – Vol. 25. – DOI 10.1002/psc.3193.
116. Sharma A., Kumar A., de la Torre B.G., Albericio F. Liquid-Phase Peptide Synthesis (LPPS): A Third Wave for the Preparation of Peptides // *Chemical Reviews*. – 2022. – Vol. 122. – P. 13516–13546. – DOI 10.1021/acs.chemrev.2c00132.

117. Kokona B., Winesett E.S., von Krusenstiern A.N., Cryle M.J., Fairman R., Charkoudian L.K. Probing the Selectivity of β -Hydroxylation Reactions in Non-Ribosomal Peptide Synthesis Using Analytical Ultracentrifugation // *Analytical Biochemistry*. – 2016. – Vol. 495. – P. 42–51. – DOI 10.1016/j.ab.2015.11.011.
118. Tulla-Puche J., Barany G. On-Resin Native Chemical Ligation for Cyclic Peptide Synthesis // *Journal of Organic Chemistry*. – 2004. – Vol. 69. – P. 4101–4107. – DOI 10.1021/jo049839d.
119. Vaida V., Deal A.M. Peptide Synthesis in Aqueous Microdroplets // *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. – 2022. – Vol. 119. – Art. e2216015119. – DOI 10.1073/pnas.2216015119.
120. Ruth D.M., McMahon G., Ó'Fágáin C. Peptide Synthesis by Recombinant *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 // *Biochimie*. – 2006. – Vol. 88. – P. 117–120. – DOI 10.1016/j.biochi.2005.06.004.
121. Dullius A., Fassina P., Girolodi M., Goettert M.I., Volken de Souza C.F. A Biotechnological Approach for the Production of Branched-Chain Amino Acid Containing Bioactive Peptides to Improve Human Health: A Review // *Food Research International*. – 2020. – Vol. 131. – Art. 109002. – DOI 10.1016/j.foodres.2020.109002.
122. Wang T., Zhang Y.-R., Liu X.-H., Ge S., Zhu Y.-S. Strategy for the Biosynthesis of Short Oligopeptides: Green and Sustainable Chemistry // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9. – Art. 733. – DOI 10.3390/biom9110733.
123. Shanmugaraj B., Bulaon C.J.I., Malla A., Phoolcharoen W. Biotechnological Insights on the Expression and Production of Antimicrobial Peptides in Plants // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – Art. 4032. – DOI 10.3390/molecules26134032.
124. Merrick W.C., Pavitt G.D. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2018. – Vol. 10. – P. a033092. – DOI 10.1101/cshperspect.a033092.

125. Bionda N., Fasan R. Ribosomal Synthesis of Natural-Product-Like Bicyclic Peptides in *Escherichia coli* // *ChemBioChem*. – 2015. – Vol. 16. – P. 2011–2016. – DOI 10.1002/cbic.201500179.
126. Jaradat D.M.M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid-Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation // *Amino Acids*. – 2018. – Vol. 50. – P. 39–68. – DOI 10.1007/s00726-017-2516-0.
127. Czelej M., Garbacz K., Czernecki T., Rachwał K., Wawrzykowski J., Waśko A. Whey Protein Enzymatic Breakdown: Synthesis, Analysis, and Discovery of New Biologically Active Peptides in Papain-Derived Hydrolysates // *Molecules*. – 2025. – Vol. 30. – P. 1451. – DOI 10.3390/molecules30071451.
128. Oliveira C.S., Torres M.D.T., Pedron C.N., Andrade V.B., Silva P.I., Silva F.D., de la Fuente-Nunez C., Oliveira V.X. Synthetic Peptide Derived from Scorpion Venom Displays Minimal Toxicity and Anti-Infective Activity in an Animal Model // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 7. – P. 2736–2745. – DOI 10.1021/acsinfecdis.1c00261.
129. Griffiths R.C., Smith F.R., Li D., Wyatt J., Rogers D.M., Long J.E., Cusin L.M.L., Tighe P.J., Layfield R., Hirst J.D., et al. Cysteine-Selective Modification of Peptides and Proteins via Desulfurative C–C Bond Formation // *Chemistry – A European Journal*. – 2023. – Vol. 29. – DOI 10.1002/chem.202202503.
130. Tamura K., Ono M., Kawabe T., Yonemochi E. Impact of Magnesium Stearate Content: Modeling of Drug Degradation Using a Modified Arrhenius Equation // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. – 2020. – Vol. 68. – P. 1049–1054. – DOI 10.1248/cpb.c20-00443.
131. Pan B., Park J.H., Ramlall T., Eliezer D., Rhoades E., Petersson E.J. Chemoenzymatic Semi-synthesis Enables Efficient Production of Isotopically Labeled α -Synuclein with Site-Specific Tyrosine Phosphorylation // *ChemBioChem*. – 2021. – Vol. 22. – P. 1440–1447. – DOI 10.1002/cbic.202000742.

132. Wilson L.M., Castle J.R. Recent Advances in Insulin Therapy // *Diabetes Technology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 22. – P. 929–936. – DOI 10.1089/dia.2020.0065.
133. Guarrochena X., Kaudela B., Mindt T.L. Automated Solid-Phase Synthesis of Metabolically Stabilized Triazolo-Peptidomimetics // *Journal of Peptide Science*. – 2023. – Vol. 29. – DOI 10.1002/psc.3488.
134. Mäde V., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2014. – Vol. 10. – P. 1197–1212. – DOI 10.3762/bjoc.10.118.
135. Parker M.G., Scrace G.T. Regulation of Protein Synthesis in Rat Ventral Prostate: Cell-Free Translation of mRNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1979. – Vol. 76. – P. 1580–1584. – DOI 10.1073/pnas.76.4.1580.
136. Giovine M., Gasparini A., Scarfi S., Damonte G., Sturla L., Millo E., Tonetti M., Benatti U. Synthesis and Characterization of a Specific Peptide Nucleic Acid That Inhibits Expression of Inducible NO Synthase // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 426. – P. 33–36. – DOI 10.1016/S0014-5793(98)00302-0.
137. Hastie N.D., Held W.A. Analysis of mRNA Populations by cDNA·mRNA Hybrid-Mediated Inhibition of Cell-Free Protein Synthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1978. – Vol. 75. – P. 1217–1221. – DOI 10.1073/pnas.75.3.1217.
138. Lombard-Banek C., Yu Z., Swiercz A.P., Marvar P.J., Nemes P. A Microanalytical Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry Assay for Quantifying Angiotensin Peptides in the Brain // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 411. – P. 4661–4671. – DOI 10.1007/s00216-019-01771-9.
139. Scrosati P.M., Konermann L. Atomistic Details of Peptide Reversed-Phase Liquid Chromatography from Molecular Dynamics Simulations // *Analytical Chemistry*. – 2023. – Vol. 95. – P. 3892–3900. – DOI 10.1021/acs.analchem.2c05667.

140. Wang L., Hu Z., Chen J., Wang T., Wu P., Ying Y. Simultaneous Determination of 12 Preservatives in Pastries Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry // *Foods*. – 2023. – Vol. 12. – P. 3819. – DOI 10.3390/foods12203819.
141. Takadi T. Confirmation of Molecular Weight of *Aspergillus oryzae* α -Amylase Using the Low Angle Laser Light Scattering Technique in Combination with High Pressure Silica Gel Chromatography // *The Journal of Biochemistry*. – 1981. – Vol. 89. – P. 363–368. – DOI 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133210.
142. Josic D., Kovac S. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Proteins // *Current Protocols in Protein Science*. – 2010. – Vol. 61. – DOI 10.1002/0471140864.ps0807s61.
143. Lohr J., Baukmann S., Block J., Upmann M., Spieß A.C. Understanding Adsorption Behavior of Antiviral Labyrinthopeptin Peptides in Anion Exchange Chromatography // *Journal of Chromatography A*. – 2023. – Vol. 1690. – P. 463792. – DOI 10.1016/j.chroma.2023.463792.
144. Von Bahr-Lindström H., Moberg U., Sjö Dahl J., Jónvall H. Ion-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography Steps in Peptide Purifications // *Bioscience Reports*. – 1982. – Vol. 2. – P. 803–811. – DOI 10.1007/BF01114940.
145. Nika H., Nieves E., Hawke D.H., Angeletti R.H. Phosphopeptide Enrichment by Covalent Chromatography after Derivatization of Protein Digests Immobilized on Reversed-Phase Supports // *Journal of Biomolecular Techniques*. – 2013. – Vol. 24. – P. 154–177. – DOI 10.7171/jbt.13-2403-004.
146. Hallin P., Renlund S. Evaluation of Several Strategies for Preparing a Bovine Gonadotropin-like Peptide Using Isotachopheresis, Isoelectrofocusing and High-Performance Liquid Chromatography // *Journal of Chromatography A*. – 1986. – Vol. 363. – P. 251–260. – DOI 10.1016/S0021-9673(01)83744-4.
147. Nag B., Mukku P.V., Arimilli S., Kendrick T., Deshpande S.V., Sharma S.D. Separation of Complexes of Major Histocompatibility Class II Molecules and Known Antigenic Peptide by Metal Chelate Affinity

Chromatography // Journal of Immunological Methods. – 1994. – Vol. 169. – P. 273–285. – DOI 10.1016/0022-1759(94)90271-2.

148. Cheung M.Y., Bruce J., Euerby M.R., Field J.K., Petersson P. Investigation into Reversed-Phase Chromatography Peptide Separation Systems. Part V: Establishment of a Screening Strategy for Development of Methods for Assessment of Pharmaceutical Peptides' Purity // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1668. – P. 462888. – DOI 10.1016/j.chroma.2022.462888.

149. Treblin M., von Oesen T., Class L.-C., Kuhn G., Clawin-Rädecker I., Martin D., Fritsche J., Rohn S. Two-Dimensional High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Characterization of Milk Peptide Properties and a Prediction of the Retention Behavior – a Proof-of-Principle Study // Journal of Chromatography A. – 2021. – Vol. 1653. – P. 462442. – DOI 10.1016/j.chroma.2021.462442.

150. Zhang Z., Zhou S., Han L., Zhang Q., Pritts W.A. Impact of Linker-Drug on Ion Exchange Chromatography Separation of Antibody-Drug Conjugates // mAbs. – 2019. – Vol. 11. – P. 1113–1121. – DOI 10.1080/19420862.2019.1628589.

151. Xia Z., Liu Z., Kong F., Fan L., Xiao H., Cao C. Comparison of Antimicrobial Peptide Purification via Free-Flow Electrophoresis and Gel Filtration Chromatography // Electrophoresis. – 2017. – Vol. 38. – P. 3147–3154. – DOI 10.1002/elps.201700187.

152. Abou-Zeid L., Pell A., Amaral Saraiva M., Delangle P., Bresson C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: An Efficient Tool for Assessing Thorium Interaction with Phosphorylated Biomimetic Peptides // Journal of Chromatography A. – 2024. – Vol. 1735. – P. 465341. – DOI 10.1016/j.chroma.2024.465341.

153. Anderson K.W., Hudgens J.W. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography at Subzero Temperature for Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2023. – Vol. 34. – P. 2672–2679. – DOI 10.1021/jasms.3c00243.

154. Guan S., Moran M.F., Ma B. Prediction of LC-MS/MS Properties of Peptides from Sequence by Deep Learning // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2019. – Vol. 18. – P. 2099–2107. – DOI 10.1074/mcp.TIR119.001412.
155. Zhu D., Dai W., Srinivasan P., McClellan H., Braden D., Allee-Munoz A., Hurtado P.A.G., Miller L.H., Duffy P.E. Characterization of AMA1-RON2L Complex with Native Gel Electrophoresis and Capillary Isoelectric Focusing // *Electrophoresis*. – 2022. – Vol. 43. – P. 509–515. – DOI 10.1002/elps.202000365.
156. Krokhin O.V., Anderson G., Spicer V., Sun L., Dovichi N.J. Predicting Electrophoretic Mobility of Tryptic Peptides for High-Throughput CZE-MS Analysis // *Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 89. – P. 2000–2008. – DOI 10.1021/acs.analchem.6b04544.
157. Wang W.-H., Cheung-Lau J., Chen Y., Lewis M., Tang Q.M. Specific and High-Resolution Identification of Monoclonal Antibody Fragments Detected by Capillary Electrophoresis–Sodium Dodecyl Sulfate Using Reversed-Phase HPLC with Top-down Mass Spectrometry Analysis // *mAbs*. – 2019. – Vol. 11. – P. 1233–1244. – DOI 10.1080/19420862.2019.1646554.
158. Kielkopf C.L., Bauer W., Urbatsch I.L. Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2021. – Vol. 2021. – P. pdb.prot102228. – DOI 10.1101/pdb.prot102228.
159. Li Y., Ren D. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain-Based Plant Phosphoproteomics // *In: 2021*. – P. 159–168.
160. Cheeseman J.R., Frisch M.J., Keiderling T.A. Increased Accuracy of Vibrational Circular Dichroism Calculations for Isotopically Labeled Helical Peptides // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – Vol. 313. – P. 124097. – DOI 10.1016/j.saa.2024.124097.
161. Deni W.H., Gao T., Wu J. Protocol for Reconstituting Peptides/Peptidomimetics from DMSO to Aqueous Buffers for Circular Dichroism Analyses // *STAR Protocols*. – 2024. – Vol. 5. – P. 102850. – DOI 10.1016/j.xpro.2024.102850.

162. Waeytens J., Van Hemelryck V., Deniset-Besseau A., Ruyschaert J.-M., Dazzi A., Raussens V. Characterization by Nano-Infrared Spectroscopy of Individual Aggregated Species of Amyloid Proteins // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 2899. – DOI 10.3390/molecules25122899.
163. Jin F., Shen C., Wang Y., Wang M., Sun M., Hattori M. Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography Utilizing Nanobody Technology for Expression Screening of Membrane Proteins // *Communications Biology*. – 2021. – Vol. 4. – P. 366. – DOI 10.1038/s42003-021-01891-y.
164. Castiglia F., Zevolini F., Riolo G., Brunetti J., De Lazzari A., Moretto A., Manetto G., Fragai M., Algotsson J., Evenäs J., et al. NMR Study of the Secondary Structure and Biopharmaceutical Formulation of an Active Branched Antimicrobial Peptide // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 4290. – DOI 10.3390/molecules24234290.
165. Ernenwein D., Geisler I., Pavlishchuk A., Chmielewski J. Metal-Assembled Collagen Peptide Microflorettes as Magnetic Resonance Imaging Agents // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – P. 2953. – DOI 10.3390/molecules28072953.
166. Ledenev O.V., Petrov G.V., Skripnikov A.Y., Syroeshkin A.V. Development of a Method for Quality Control of Peptide Drugs without Opening the Primary Packaging // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2025. – P. 132–138. – DOI 10.22159/ijap.2025v17i5.54386.
167. Odnovorov A.I., Grebennikova T.V., Pleteneva T.V., Garaev T.M., Uspenskaya E.V., Khodorovich N.A., Levitskaya O.V., Koldina A.M. Physicochemical Properties and Biological Activity of the New Antiviral Substance // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2020. – P. 237–242. – DOI 10.22159/ijap.2020v12i4.38136.
168. Zhu M., Xu H., Liang Y., Xu J., Yue N., Zhang Y., Tian C., Yao J., Wang L., Nie Y., et al. Edible Exosome-like Nanoparticles from *Portulaca oleracea* L Mitigate DSS-Induced Colitis via Facilitating Double-Positive CD4⁺CD8⁺ T

Cells Expansion // Journal of Nanobiotechnology. – 2023. – Vol. 21. – P. 309. – DOI 10.1186/s12951-023-02065-0.

169. Végh E.I., Douka K. SpecieScan: Semi-Automated Taxonomic Identification of Bone Collagen Peptides from MALDI-ToF-MS // Bioinformatics. – 2024. – Vol. 40. – DOI 10.1093/bioinformatics/btae054.

170. Kabytayev K., Durairaj A., Shin D., Rohlfing C.L., Connolly S., Little R.R., Stoyanov A.V. Two-Step Ion-Exchange Chromatographic Purification Combined with Reversed-Phase Chromatography to Isolate C-Peptide for Mass Spectrometric Analysis // Journal of Separation Science. – 2016. – Vol. 39. – P. 676–681. – DOI 10.1002/jssc.201500989.

171. Huang Q., Gao Q., Chai X., Ren W., Zhang G., Kong Y., Zhang Y., Gao J., Lei X., Ma L. A Novel Thrombin Inhibitory Peptide Discovered from Leech Using Affinity Chromatography Combined with Ultra-High Performance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectroscopy // Journal of Chromatography B. – 2020. – Vol. 1151. – P. 122153. – DOI 10.1016/j.jchromb.2020.122153.

172. Badgett M.J., Boyes B., Orlando R. The Separation and Quantitation of Peptides with and without Oxidation of Methionine and Deamidation of Asparagine Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (HILIC-MS) // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2017. – Vol. 28. – P. 818–826. – DOI 10.1007/s13361-016-1565-z.

173. Patrick A.L., Polfer N.C. Peptide Fragmentation Products in Mass Spectrometry Probed by Infrared Spectroscopy // In: 2014. – P. 153–181.

174. Zhang G., Annan R.S., Carr S.A., Neubert T.A. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry // Current Protocols in Protein Science. – 2010. – Vol. 62. – DOI 10.1002/0471140864.ps1601s62.

175. Nie L.-X., Huang L.-Y., Wang X.-P., Lv L.-F., Yang X.-X., Jia X.-F., Kang S., Yao L.-W., Dai Z., Ma S.-C. Desorption Electrospray Ionization Mass

Spectrometry Imaging Illustrates the Quality Characters of *Isatidis Radix* // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13. – DOI 10.3389/fpls.2022.897528.

176. Liepold T., Klafki H.-W., Kumar S., Walter J., Wirths O., Wiltfang J., Jahn O. Matrix Development for the Detection of Phosphorylated Amyloid- β Peptides by MALDI-TOF-MS // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2023. – Vol. 34. – P. 505–512. – DOI 10.1021/jasms.2c00270.

177. Schilling B., Meyer J.G., Wei L., Ott M., Verdin E. High-Resolution Mass Spectrometry to Identify and Quantify Acetylation Protein Targets // In: 2019. – P. 3–16.

178. Mak T., Rossjohn J., Littler D.R., Liu M., Quinn R.J. Collision-Induced Affinity Selection Mass Spectrometry for Identification of Ligands // *ACS Bio & Med Chem Au*. – 2022. – Vol. 2. – P. 450–455. – DOI 10.1021/acsbiochemau.2c00021.

179. Guo Y., Chowdhury T., Seshadri M., Cupp-Sutton K.A., Wang Q., Yu D., Wu S. Optimization of Higher-Energy Collisional Dissociation Fragmentation Energy for Intact Protein-Level Tandem Mass Tag Labeling // *Journal of Proteome Research*. – 2023. – Vol. 22. – P. 1406–1418. – DOI 10.1021/acs.jproteome.2c00549.

180. Commodore J.J., Cassady C.J. Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry of Acidic Phosphorylated Peptides Cationized with Trivalent Praseodymium // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2018. – Vol. 53. – P. 1178–1188. – DOI 10.1002/jms.4291.

181. Moradian A., Goonatilleke E., Lin T.-T., Hatten-Beck M., Emrick M., Schepmoes A.A., Fillmore T.L., MacCoss M.J., Sechi S., Sobhani K., et al. Interlaboratory Comparison of Antibody-Free LC-MS/MS Measurements of C-Peptide and Insulin // *Clinical Chemistry*. – 2024. – Vol. 70. – P. 855–864. – DOI 10.1093/clinchem/hvae034.

182. Grossegessle M., Nitsche A., Schaade L., Doellinger J. Application of Spectral Library Prediction for Parallel Reaction Monitoring of Viral Peptides // *Proteomics*. – 2021. – Vol. 21. – DOI 10.1002/pmic.202000226.

183. Wang Q., Zhang M., Tomita T., Vogelstein J.T., Zhou S., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Vogelstein B. Selected Reaction Monitoring Approach for Validating Peptide Biomarkers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – P. 13519–13524. – DOI 10.1073/pnas.1712731114.
184. Lioi M., Tengattini S., D'Atri V., Massolini G., Daly S., Temporini C., Guillarme D. Evaluating the Potential of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Collagen Peptide Mapping Analysis // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – Vol. 1738. – P. 465473. – DOI 10.1016/j.chroma.2024.465473.
185. Bokka C.S., Veeramachaneni G.K., Thunuguntla V.B.S.C., Bobbillaipati J., Bondili J.S. Peptide Mapping, In Silico and In Vivo Analysis of Allergenic Sorghum Profilin Peptides // *Medicina (Buenos Aires)*. – 2019. – Vol. 55. – P. 178. – DOI 10.3390/medicina55050178.
186. Okyem S., Romanova E.V., Tai H.-C., Checco J.W., Sweedler J.V. Nontargeted Identification of D-Amino Acid-Containing Peptides through Enzymatic Screening, Chiral Amino Acid Analysis, and LC-MS // *In: 2024*. – P. 227–240.
187. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52. – P. 385–406. – DOI 10.1021/jf030490p.
188. Kühl T., Elsayed Y.Y., Terekhov A., Imhof D. DiPTH-Cystine and PTH-Cysteine in Disulfide Bond Analysis Using Automated Edman Degradation // *Journal of Peptide Science*. – 2025. – Vol. 31. – DOI 10.1002/psc.70053.
189. Timms R.T., Zhang Z., Rhee D.Y., Harper J.W., Koren I., Elledge S.J. A Glycine-Specific N-Degron Pathway Mediates the Quality Control of Protein N-Myristoylation // *Science (1979)*. – 2019. – Vol. 365. – DOI 10.1126/science.aaw4912.

190. Morikawa K., Nishida H., Imami K., Ishihama Y. One-Step N-Terminomics Based on Isolation of Protein N-Terminal Peptides from LysargiNase Digests by Tip-Based Strong Cation Exchange Chromatography // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2024. – Vol. 23. – P. 100820. – DOI 10.1016/j.mcpro.2024.100820.
191. Hayashi K., Ohya K., Yoshinari T., Hirose S., Shimizu S., Morita Y., Ohnishi T., Watanabe M., Taharaguchi S., Mekata H., et al. MALDI-TOF MS Analysis for Detection of Bovine Coronavirus with Tryptic Peptides from Viral Proteins // *Journal of Microorganism Control*. – 2024. – Vol. 29. – P. 143–151. – DOI 10.4265/jmc.29.4_143.
192. Sims E.K., Carr A.L.J., Oram R.A., DiMeglio L.A., Evans-Molina C. 100 Years of Insulin: Celebrating the Past, Present and Future of Diabetes Therapy // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27. – P. 1154–1164. – DOI 10.1038/s41591-021-01418-2.
193. Selivanova O.M., Grishin S.Yu., Glyakina A.V., Sadgyan A.S., Ushakova N.I., Galzitskaya O.V. Analysis of Insulin Analogs and the Strategy of Their Further Development // *Biochemistry (Moscow)*. – 2018. – Vol. 83. – P. S146–S162. – DOI 10.1134/S0006297918140122.
194. Tokarz V.L., MacDonald P.E., Klip A. The Cell Biology of Systemic Insulin Function // *Journal of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 217. – P. 2273–2289. – DOI 10.1083/jcb.201802095.
195. Papakonstantinou I., Tsioufis K., Katsi V. Spotlight on the Mechanism of Action of Semaglutide // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 46. – P. 14514–14541. – DOI 10.3390/cimb46120872.
196. Pinto S., Hosseini M., Buckley S.T., Yin W., Garousi J., Gräslund T., van Ijzendoorn S., Santos H.A., Sarmento B. Nanoparticles Targeting the Intestinal Fc Receptor Enhance Intestinal Cellular Trafficking of Semaglutide // *Journal of Controlled Release*. – 2024. – Vol. 366. – P. 621–636. – DOI 10.1016/j.jconrel.2024.01.015.

197. Zeiders S.M., Chmielewski J. Antibiotic–Cell–Penetrating Peptide Conjugates Targeting Challenging Drug-Resistant and Intracellular Pathogenic Bacteria // *Chemistry & Biology Drug Design*. – 2021. – Vol. 98. – P. 762–778. – DOI 10.1111/cbdd.13930.
198. Wong F., Krishnan A., Zheng E.J., Stärk H., Manson A.L., Earl A.M., Jaakkola T., Collins J.J. Benchmarking AlphaFold-Enabled Molecular Docking Predictions for Antibiotic Discovery // *Molecular Systems Biology*. – 2022. – Vol. 18. – DOI 10.15252/msb.202211081.
199. Mazurkiewicz-Pisarek A., Baran J., Ciach T. Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 9031. – DOI 10.3390/ijms24109031.
200. De Breij A., Riool M., Cordfunke R.A., Malanovic N., de Boer L., Koning R.I., Ravensbergen E., Franken M., van der Heijde T., Boekema B.K., et al. The Antimicrobial Peptide SAAP-148 Combats Drug-Resistant Bacteria and Biofilms // *Science Translational Medicine*. – 2018. – Vol. 10. – DOI 10.1126/scitranslmed.aan4044.
201. Ledenev O.V., Levitskaya O.V., Syroeshkin A.V. Drugs Based on Bioactive Oligopeptides // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15. – P. 244–252. – DOI 10.22270/jddt.v15i6.7194.
202. Zheng S., Tu Y., Li B., Qu G., Li A., Peng X., Li S., Shao C. Antimicrobial Peptide Biological Activity, Delivery Systems and Clinical Translation: Status and Challenges // *Journal of Translational Medicine*. – 2025. – Vol. 23. – P. 292. – DOI 10.1186/s12967-025-06321-9.
203. Khamaganova I.V., Akhmedov K.B., Tarabrina N.P., Khromova S.S., Mezentseva M.V., Koval'chuk L.V., Gankovskaia L.V., Degtiareva L.A. Effect of Combined Therapy Using Complex of Natural Cytokines and Antimicrobial Peptides in Urogenital Infections Caused by Chlamydia and Mycoplasma // *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. – 2011. – P. 90–93.

204. Deo S., Turton K.L., Kainth T., Kumar A., Wieden H.-J. Strategies for Improving Antimicrobial Peptide Production // *Biotechnology Advances*. – 2022. – Vol. 59. – P. 107968. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2022.107968.
205. Nazarian-Firouzabadi F., Torres M.D.T., de la Fuente-Nunez C. Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in Plants // *Biotechnology Advances*. – 2024. – Vol. 71. – P. 108296. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2023.108296.
206. Liu Q., Wang L., He D., Wu Y., Liu X., Yang Y., Chen Z., Dong Z., Luo Y., Song Y. Application Value of Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Tumors // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 16718. – DOI 10.3390/ijms242316718.
207. Bucataru C., Ciobanasu C. Antimicrobial Peptides: Opportunities and Challenges in Overcoming Resistance // *Microbiological Research*. – 2024. – Vol. 286. – P. 127822. – DOI 10.1016/j.micres.2024.127822.
208. Bakare O.O., Gokul A., Fadaka A.O., Wu R., Niekerk L.-A., Barker A.M., Keyster M., Klein A. Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs): Features, Applications, Production, Expression, and Challenges // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – P. 3703. – DOI 10.3390/molecules27123703.
209. Cresti L., Cappello G., Pini A. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application—A Long History to Be Concluded // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – P. 4870. – DOI 10.3390/ijms25094870.
210. Da Silva J., Leal E.C., Carvalho E. Bioactive Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents for Infected Diabetic Foot Ulcers // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – P. 1894. – DOI 10.3390/biom11121894.
211. Robles Ramirez O., Osuna G., Plisson F., Barrientos-Salcedo C. Antimicrobial Peptides in Livestock: A Review with a One Health Approach // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2024. – Vol. 14. – DOI 10.3389/fcimb.2024.1339285.
212. Chaparro E., da Silva P.I. Lacrain: The First Antimicrobial Peptide from the Body Extract of the Brazilian Centipede *Scolopendra viridicornis* //

International Journal of Antimicrobial Agents. – 2016. – Vol. 48. – P. 277–285. – DOI 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.015.

213. Li T., Ren X., Luo X., Wang Z., Li Z., Luo X., Shen J., Li Y., Yuan D., Nussinov R., et al. A Foundation Model Identifies Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides against Drug-Resistant Bacterial Infection // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – P. 7538. – DOI 10.1038/s41467-024-51933-2.

214. Mihaylova-Garnizova R., Davidova S., Hodzhev Y., Satchanska G. Antimicrobial Peptides Derived from Bacteria: Classification, Sources, and Mechanism of Action against Multidrug-Resistant Bacteria // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – P. 10788. – DOI 10.3390/ijms251910788.

215. Valenti G.E., Alfei S., Caviglia D., Domenicotti C., Marengo B. Antimicrobial Peptides and Cationic Nanoparticles: A Broad-Spectrum Weapon to Fight Multi-Drug Resistance Not Only in Bacteria // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – P. 6108. – DOI 10.3390/ijms23116108.

216. Sánchez M.L., Mangas A., Coveñas R. Glioma and Peptidergic Systems: Oncogenic and Anticancer Peptides // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – P. 7990. – DOI 10.3390/ijms25147990.

217. Collins A.R., Paspaliaris V., Pandey V., Uddin M.I., Spathakis M., Kolios G. Unveiling Anticancer Peptides: From the Mechanisms of Action to Their Development through Artificial Intelligence // *European Journal of Pharmacology*. – 2025. – Vol. 1005. – P. 178086. – DOI 10.1016/j.ejphar.2025.178086.

218. Chen Q., Wu J., Li X., Ye Z., Yang H., Mu L. Amphibian-Derived Natural Anticancer Peptides and Proteins: Mechanism of Action, Application Strategies, and Prospects // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 13985. – DOI 10.3390/ijms241813985.

219. Suginobe N., Nakamura M., Takanashi Y., Ban H., Gotoh M. Mechanism of Action of DSP-7888 (Adegramotide/Nelatimotide) Emulsion, a Peptide-Based Therapeutic Cancer Vaccine with the Potential to Turn up the Heat

on Non-Immunoreactive Tumors // *Clinical and Translational Oncology*. – 2022. – Vol. 25. – P. 396–407. – DOI 10.1007/s12094-022-02946-0.

220. Gorai S., Das N.C., Gupta P.S. Sen, Panda S.K., Rana M.K., Mukherjee S. Designing Efficient Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine by Targeting the Antioxidant Thioredoxin of Bancroftian Filarial Parasite // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 98. – P. 105237. – DOI 10.1016/j.meegid.2022.105237.

221. Trofimova S.V., Linkova N.S., Klimenko A.A., Kvetnaia T.V., Khavinson V.K. Pineamin Increased Pineal Melatonin Synthesis in Elderly People // *Advances in Gerontology*. – 2017. – Vol. 30. – P. 422–426.

222. Panikratova Ya.R., Lebedeva I.S., Sokolov O.Yu., Rumshiskaya A.D., Kupriyanov D.A., Kost N.V., Myasoedov N.F. Functional Connectomic Approach to Studying Selank and Semax Effects // *Doklady Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 490. – P. 9–11. – DOI 10.1134/S001249662001007X.

223. Lebedeva I.S., Panikratova Ya.R., Sokolov O.Yu., Kupriyanov D.A., Rumshiskaya A.D., Kost N.V., Myasoedov N.F. Effects of Semax on the Default Mode Network of the Brain // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 165. – P. 653–656. – DOI 10.1007/s10517-018-4234-3.

224. Fiani B., Covarrubias C., Wong A., Doan T., Reardon T., Nikolaidis D., Sarno E. Cerebrolysin for Stroke, Neurodegeneration, and Traumatic Brain Injury: Review of the Literature and Outcomes // *Neurological Sciences*. – 2021. – Vol. 42. – P. 1345–1353. – DOI 10.1007/s10072-021-05089-2.

225. Skibska A., Perlikowska R. Signal Peptides – Promising Ingredients in Cosmetics // *Current Protein & Peptide Science*. – 2021. – Vol. 22. – P. 716–728. – DOI 10.2174/1389203722666210812121129.

226. Chan L.K.W., Lee K.W.A., Lee C.H., Lam K.W.P., Lee K.F.V., Wu R., Wan J., Shivananjappa S., Sky W.T.H., Choi H., et al. Cosmeceuticals in Photoaging: A Review // *Skin Research and Technology*. – 2024. – Vol. 30. – DOI 10.1111/srt.13730.

227. Petrov G.V., Koldina A.M., Ledenev O.V., Tumasov V.N., Nazarov A.A., Syroeshkin A.V. Nanoparticles and Nanomaterials: A Review from the Standpoint of Pharmacy and Medicine // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17, No. 5. – P. 655. – DOI 10.3390/pharmaceutics17050655.
228. Koldina A.M., Uspenskaya E.V., Borodin A.A., Pleteneva T.V., Syroeshkin A.V. Light Scattering in Research and Quality Control of Deuterium Depleted Water for Pharmaceutical Application // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2019. – P. 271–278. – DOI 10.22159/ijap.2019v11i5.34672.
229. Syroeshkin A.V., Uspenskaya E.V., Levitskaya O.V., Kuzmina E.S., Kazimova I.V., Quynh H.T.N., Pleteneva T.V. New Approaches to Determining the D/H Ratio in Aqueous Media Based on Diffuse Laser Light Scattering for Promising Application in Deuterium-Depleted Water Analysis in Antitumor Therapy // *Scientia Pharmaceutica*. – 2024. – Vol. 92. – P. 63. – DOI 10.3390/scipharm92040063.
230. Goncharuk V.V., Lapshin V.B., Burdeinaya T.N., Pleteneva T.V., Chernopyatko A.S., Atamanenko I.D., Ul'yantsev A.S., Uspenskaya E.V., Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V., et al. Physicochemical Properties and Biological Activity of the Water Depleted of Heavy Isotopes // *Journal of Water Chemistry and Technology*. – 2011. – Vol. 33. – P. 8–13. – DOI 10.3103/S1063455X11010024.
231. Petrov G., Syroeshkin A.V. Express Method for Quality Control of Products after the Fluidized Bed Aerosol Chamber by Detecting Radio Thermal Emission of Nanoparticles // *European Chemical Bulletin*. – 2023. – Vol. 12. – DOI 10.48047/ecb/2023.12.6.273.
232. Kuzmenko E.E., Hoang Q.T.N., Koldina A.M., Petrov G.V., Syroeshkin A.V. Determination of the Toxicity of Zinc Sulphate Hydrate Solution Using the Spirotox Biotesting Method // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2025. – Vol. 15. – P. 89–96. – DOI 10.22270/jddt.v15i3.7047.
233. Goncharuk V.V., Syroeshkin A.V., Pleteneva T.V., Uspenskaya E.V., Levitskaya O.V., Tverdislov V.A. On the Possibility of Chiral Structure-Density

Submillimeter Inhomogeneities Existing in Water // *Journal of Water Chemistry and Technology*. – 2017. – Vol. 39. – P. 319–324. – DOI 10.3103/S1063455X17060029.

234. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Suyazov N.V., Babenko V.A., Sychev A.A., Penkov N.V., Belosludtsev K.N., Gudkov S.V. Formation and Dynamics of Ion-Stabilized Gas Nanobubble Phase in the Bulk of Aqueous NaCl Solutions // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – P. 1291–1303. – DOI 10.1021/acs.jpcc.5b11103.

235. Yurchenko S.O., Shkirin A.V., Ninham B.W., Sychev A.A., Babenko V.A., Penkov N.V., Kryuchkov N.P., Bunkin N.F. Ion-Specific and Thermal Effects in the Stabilization of the Gas Nanobubble Phase in Bulk Aqueous Electrolyte Solutions // *Langmuir*. – 2016. – Vol. 32. – P. 11245–11255. – DOI 10.1021/acs.langmuir.6b01644.

236. Petrov G.V., Galkina D.A., Koldina A.M., Grebennikova T.V., Eliseeva O.V., Chernoryzh Y.Yu., Lebedeva V.V., Syroeshkin A.V. Controlling the Quality of Nanodrugs According to Their New Property — Radiothermal Emission // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16. – P. 180. – DOI 10.3390/pharmaceutics16020180.

237. Kim D.-J., Jo E.-S., Cho Y.-K., Hur J., Kim C.-K., Kim C.H., Park B., Kim D., Choi Y.-K. A Frequency Reconfigurable Dipole Antenna with Solid-State Plasma in Silicon // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 14996. – DOI 10.1038/s41598-018-33278-1.

238. Petrov G.V., Gaidashev I.A., Syroeshkin A.V. Physical and Chemical Characteristics of Aqueous Colloidal Infusions of Medicinal Plants Containing Humic Acids // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2024. – P. 76–82. – DOI 10.22159/ijap.2024v16i1.49339.

239. Skripnikov A. Bioassays for Identifying and Characterizing Plant Regulatory Peptides // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1795. – DOI 10.3390/biom13121795.

240. Cifra M., Pospíšil P. Ultra-Weak Photon Emission from Biological Samples: Definition, Mechanisms, Properties, Detection and Applications // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2014. – Vol. 139. – P. 2–10. – DOI 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.009.

241. Perez F.P., Bandeira J.P., Perez Chumbiauca C.N., Lahiri D.K., Morisaki J., Rizkalla M. Multidimensional Insights into the Repeated Electromagnetic Field Stimulation and Biosystems Interaction in Aging and Age-Related Diseases // *Journal of Biomedical Science*. – 2022. – Vol. 29, № 1. – Art. 39. – DOI 10.1186/s12929-022-00825-y.

242. Pandey G., Saikia J., Sasidharan S., Joshi D.C., Thota S., Nemade H.B., Chaudhary N., Ramakrishnan V. Modulation of Peptide-Based Nano-Assemblies with Electric and Magnetic Fields // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – Art. 2726. – DOI 10.1038/s41598-017-02609-z.

243. Burg M.B., Ferraris J.D. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 12. – P. 7309–7313. – DOI 10.1074/jbc.R700042200.

244. Kalwarczyk T., Ziębach N., Bielejewska A., Zaboklicka E., Koynov K., Szymański J., Wilk A., Patkowski A., Gapiński J., Butt H.-J., Hołyst R. Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm of Mammalian Cells at the Nanoscale // *Nano Letters*. – 2011. – Vol. 11, № 5. – P. 2157–2163. – DOI 10.1021/nl2008218.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Размерные спектры по объемной концентрации водных растворов
регуляторных пептидов – *расширенная версия***

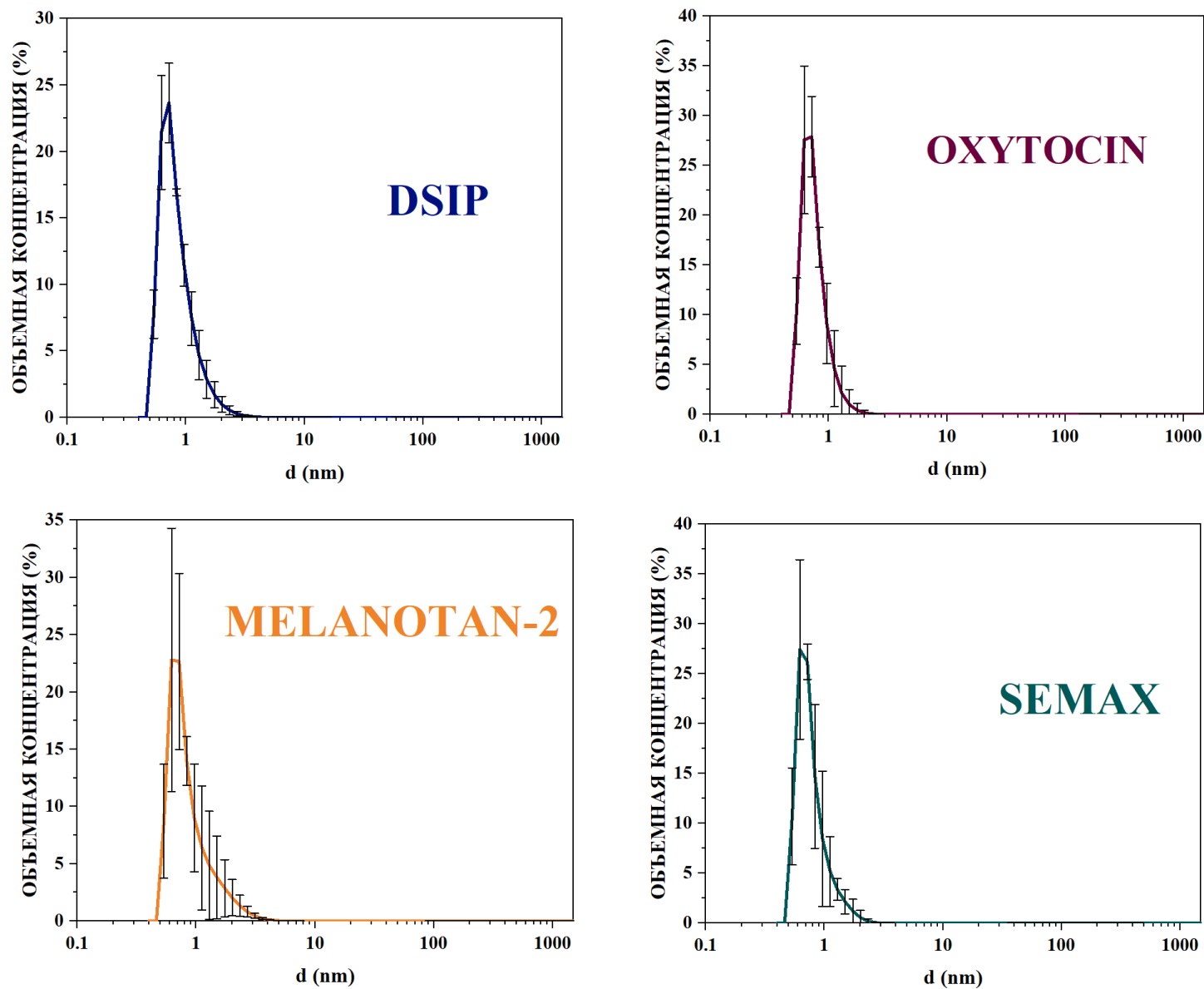


Рисунок 13 - Размерные спектры по объемной концентрации водных растворов олигопептидов (Mean $\pm$ SD, n = 45)

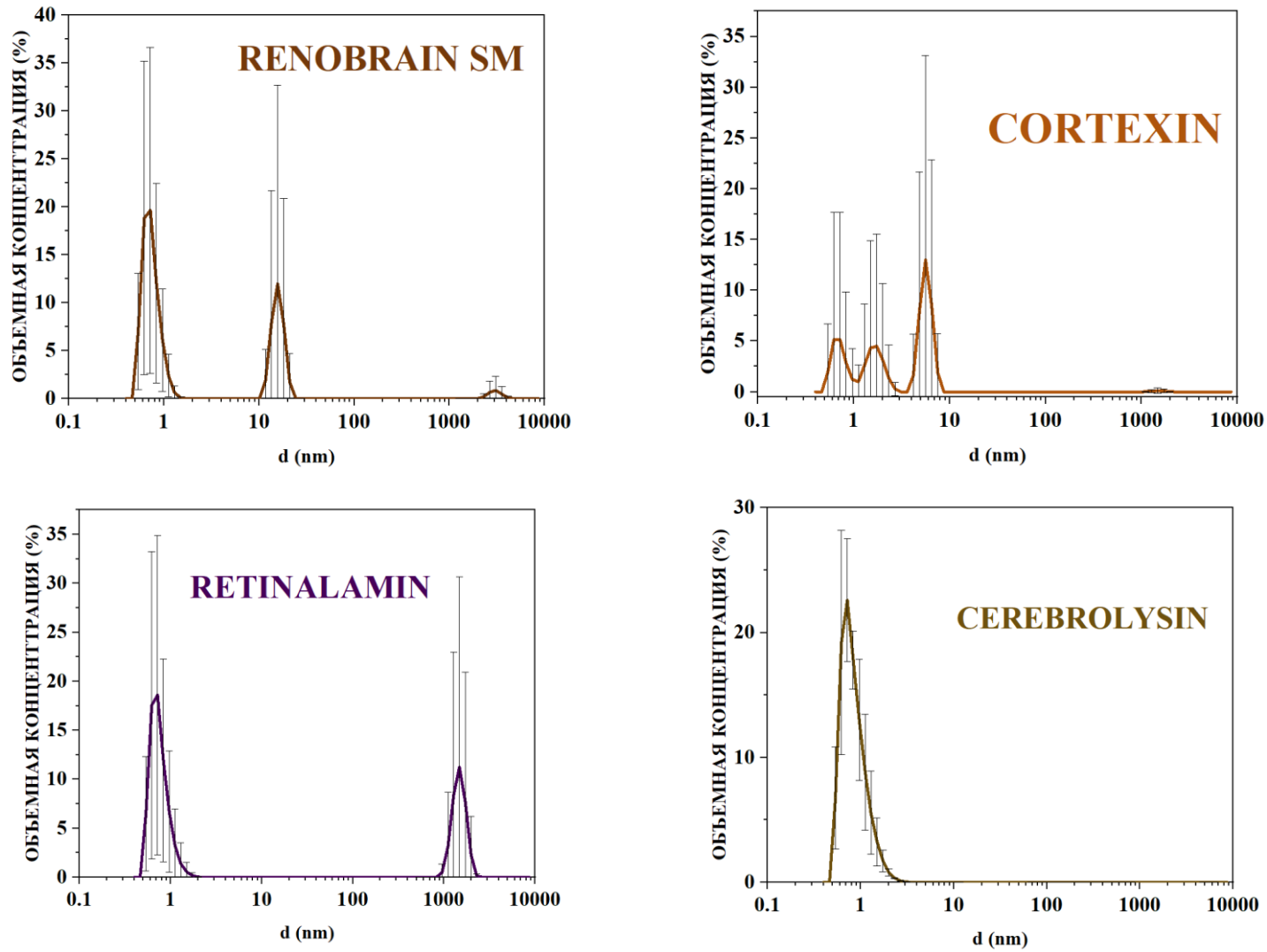


Рисунок 14 - Размерные спектры по объемной концентрации водных растворов полипептидных лекарственных средств
(Mean $\pm$ SD, n = 45)

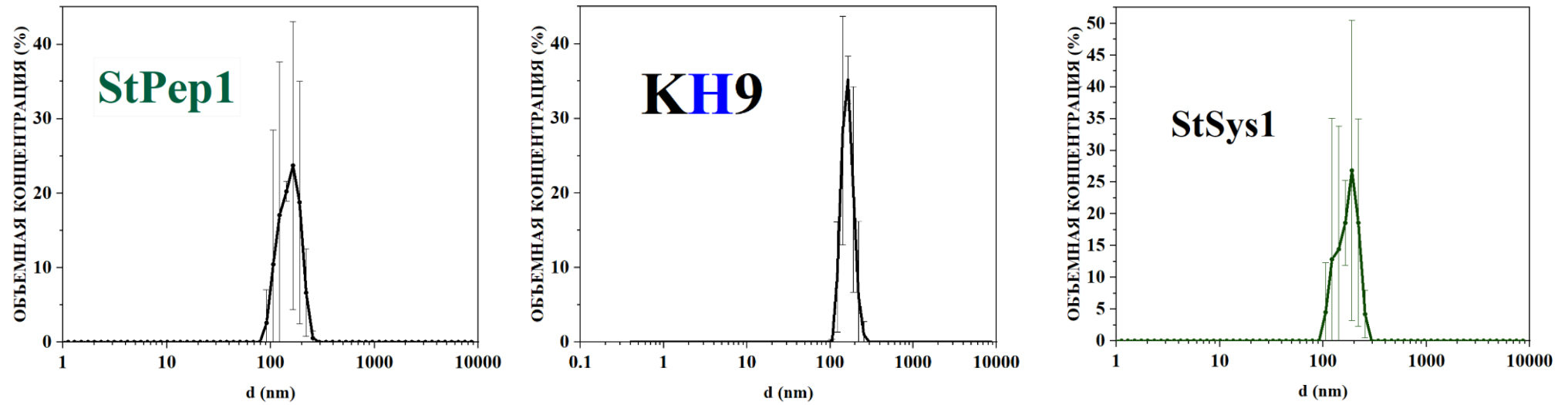


Рисунок 15 - Размерные спектры по объемной концентрации водных растворов регуляторных пептидов растительного происхождения (Mean $\pm$ SD, n = 45)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

**Многосерийные размерные спектры молекул регуляторных пептидов
растительного происхождения**

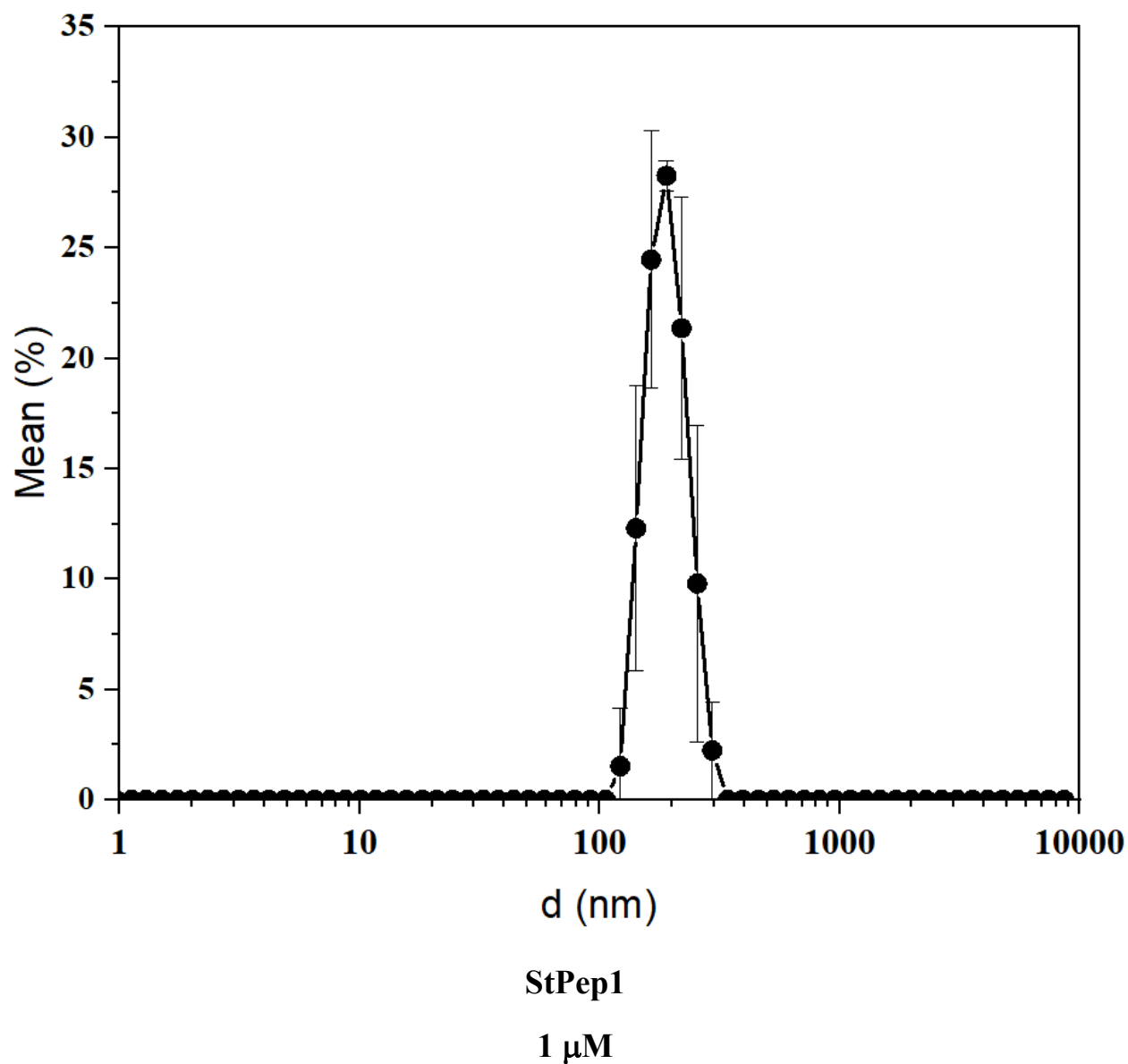


Рисунок 16 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсант H₂O Mili-Q (Mean $\pm$ SD, n = 45)

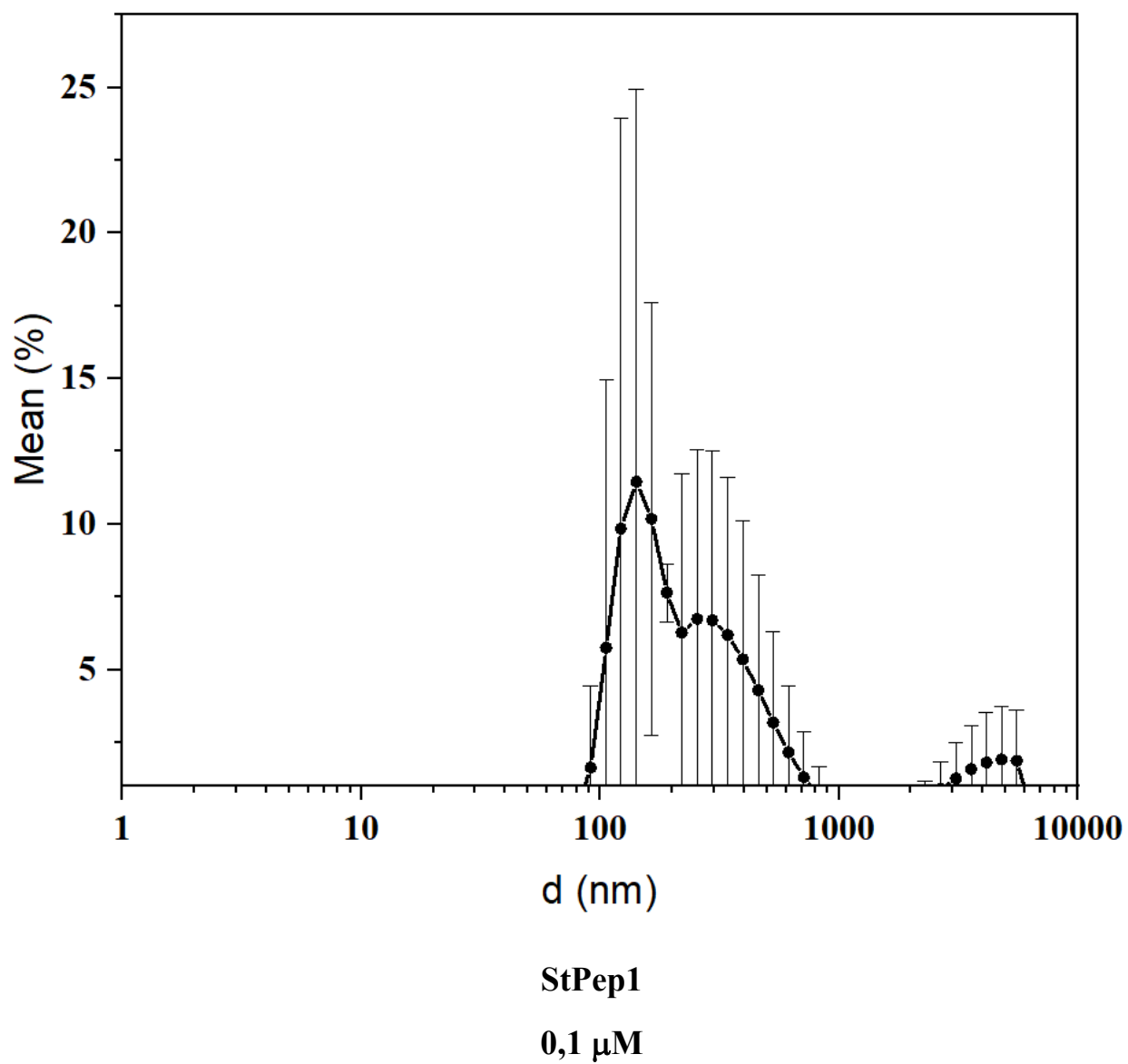
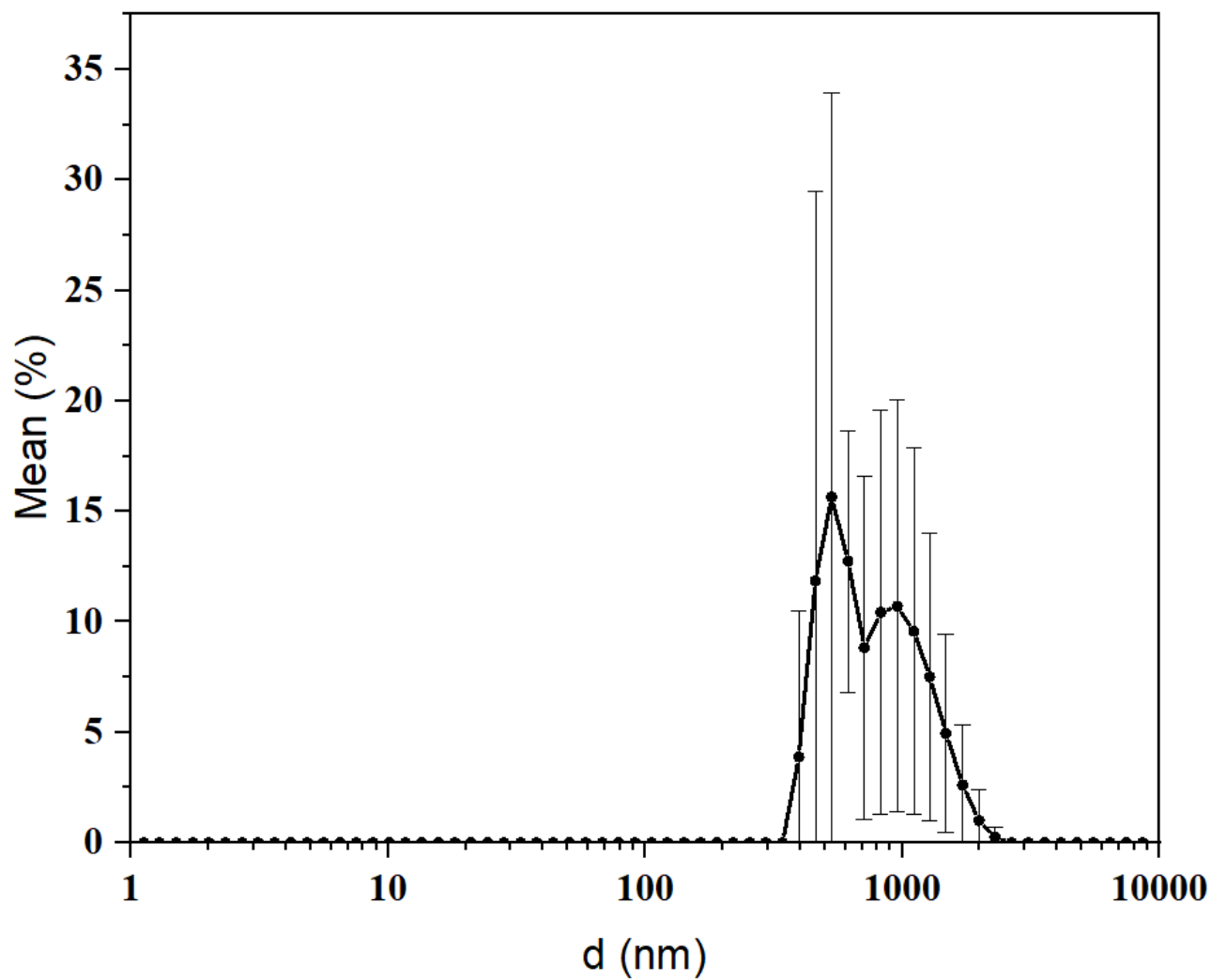


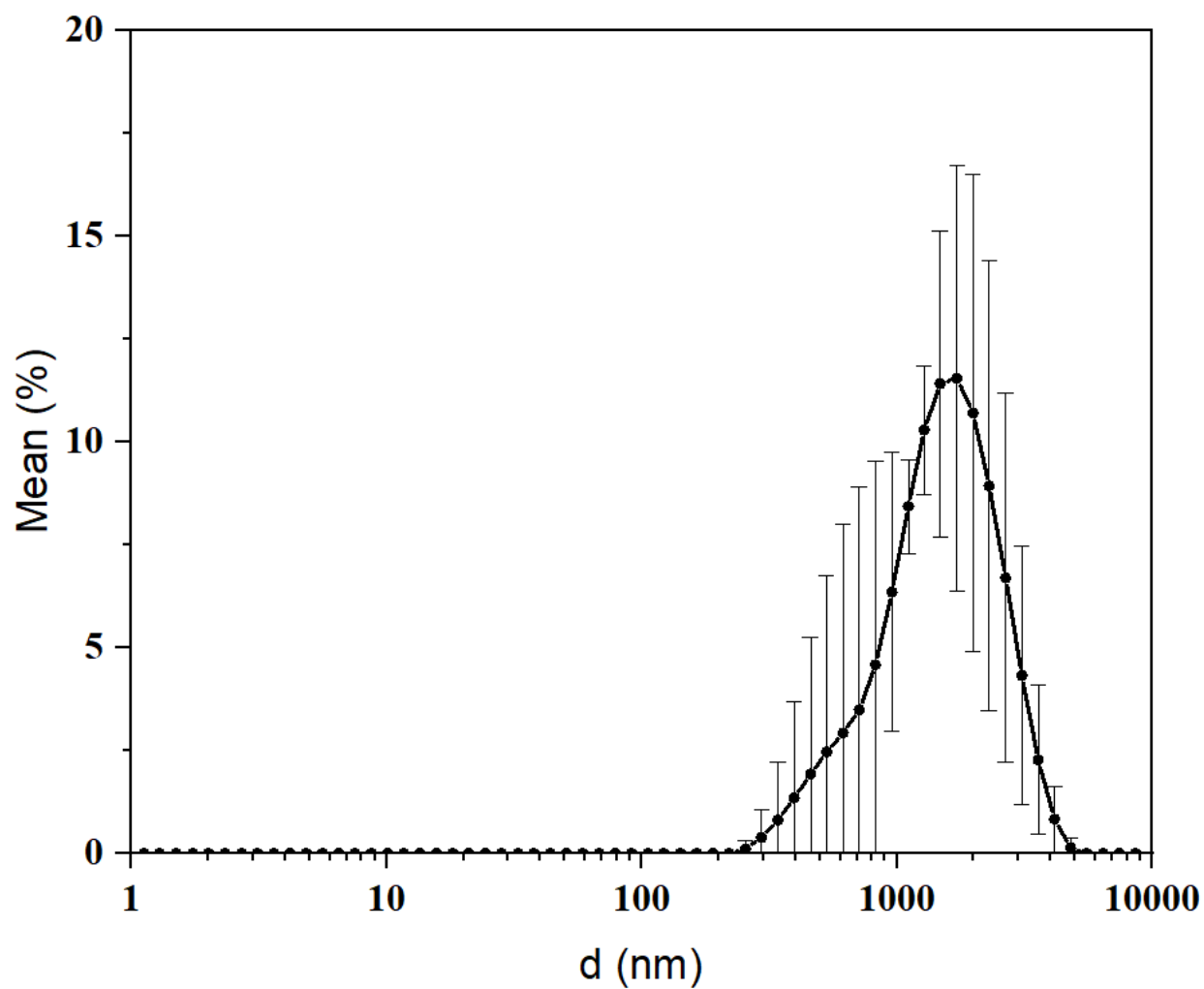
Рисунок 17 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант H₂O Mili-Q (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,01 μ M

Рисунок 18 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант H₂O MiliQ (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

1 nM

Рисунок 19 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант H₂O Mili-Q (Mean ± SD, n = 45)

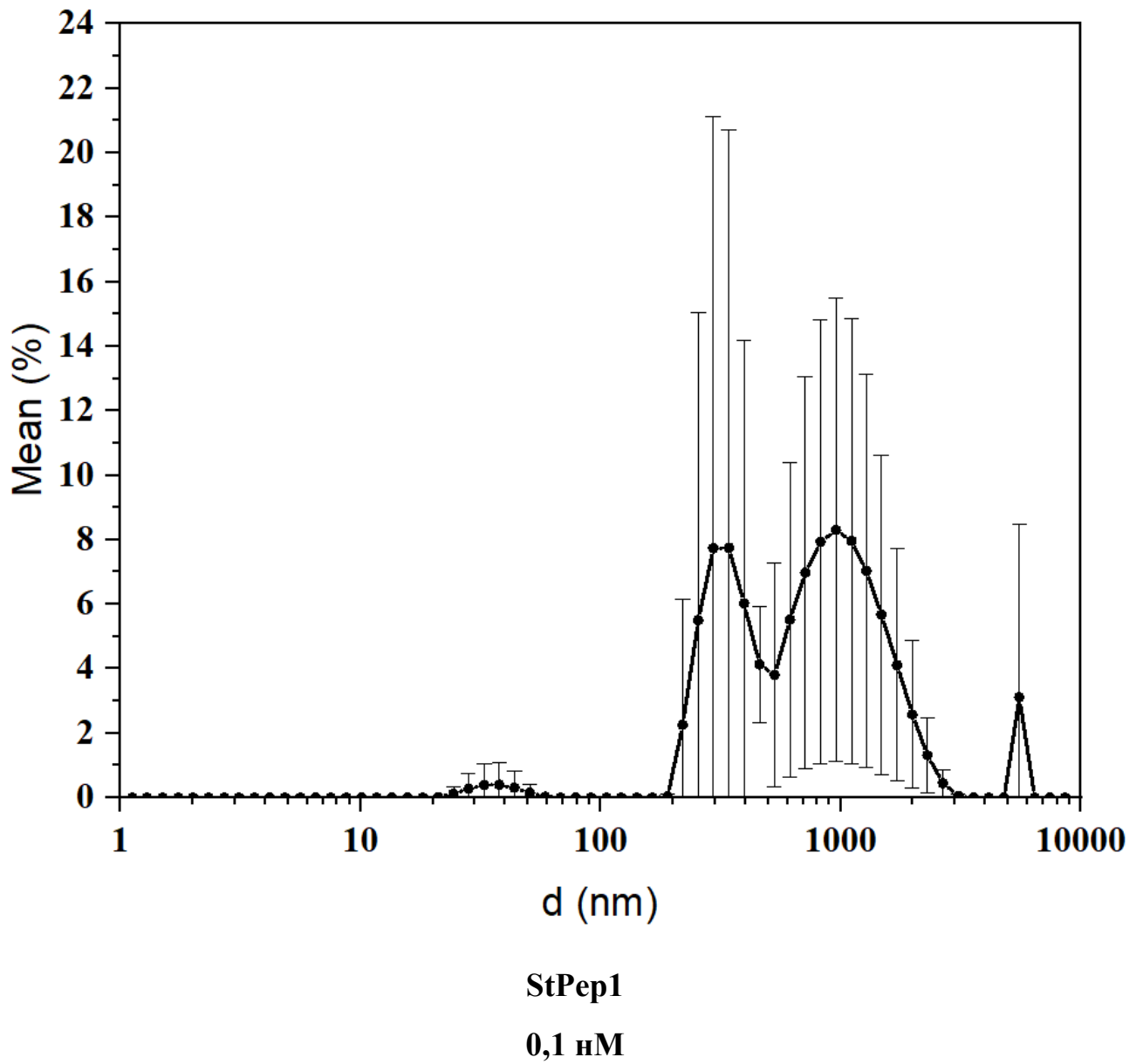
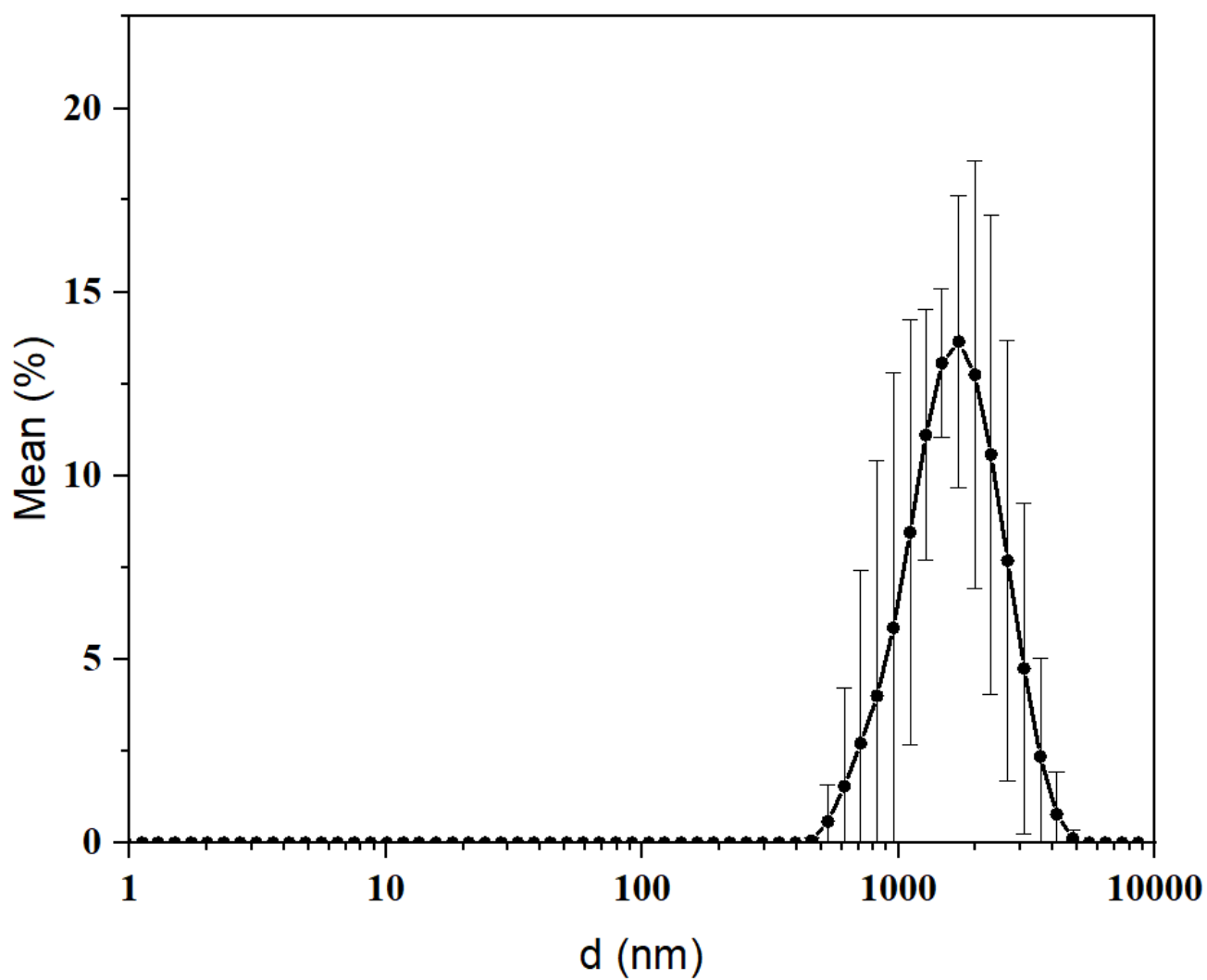


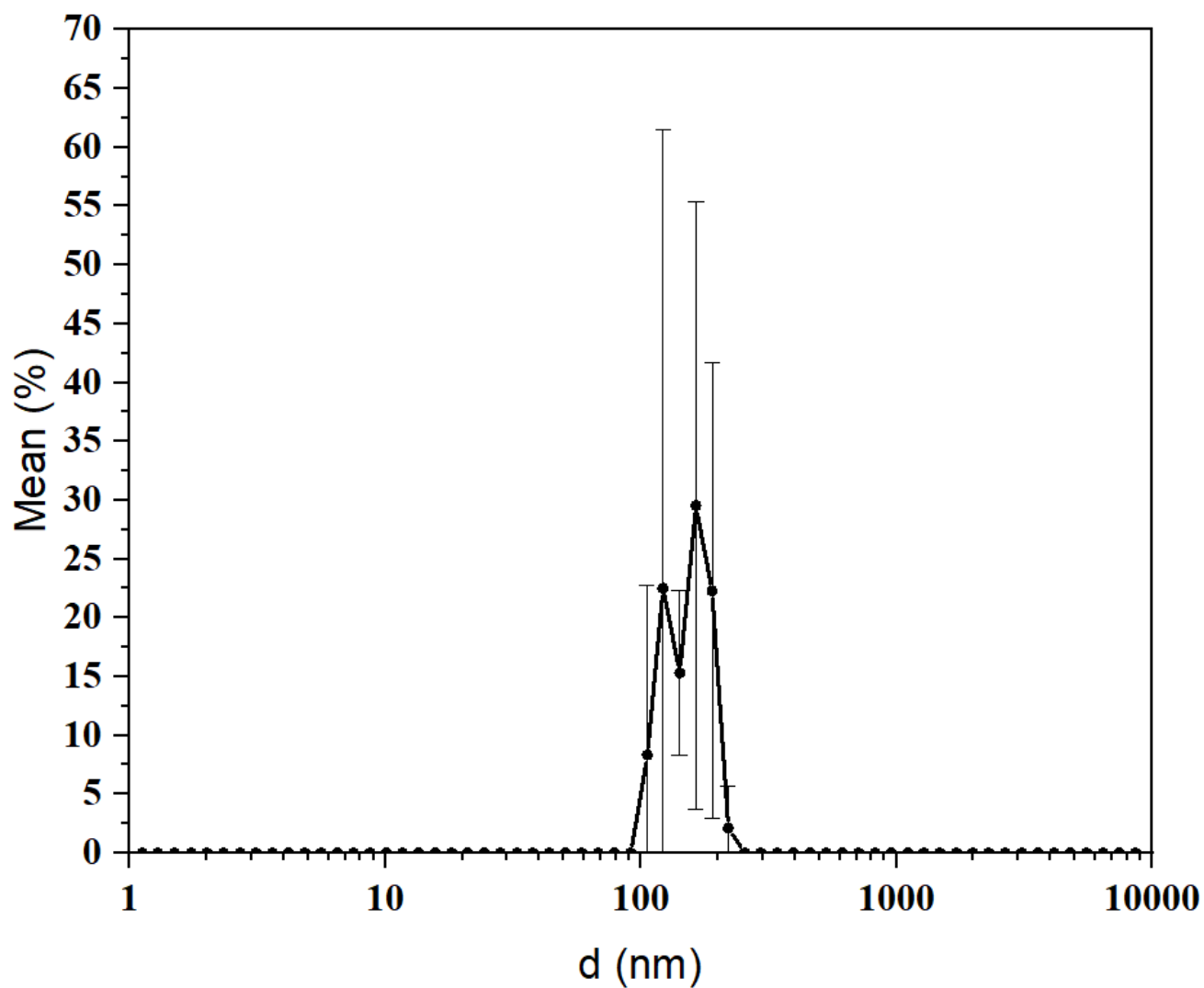
Рисунок 20 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант H₂O Mili-Q (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,01 нМ

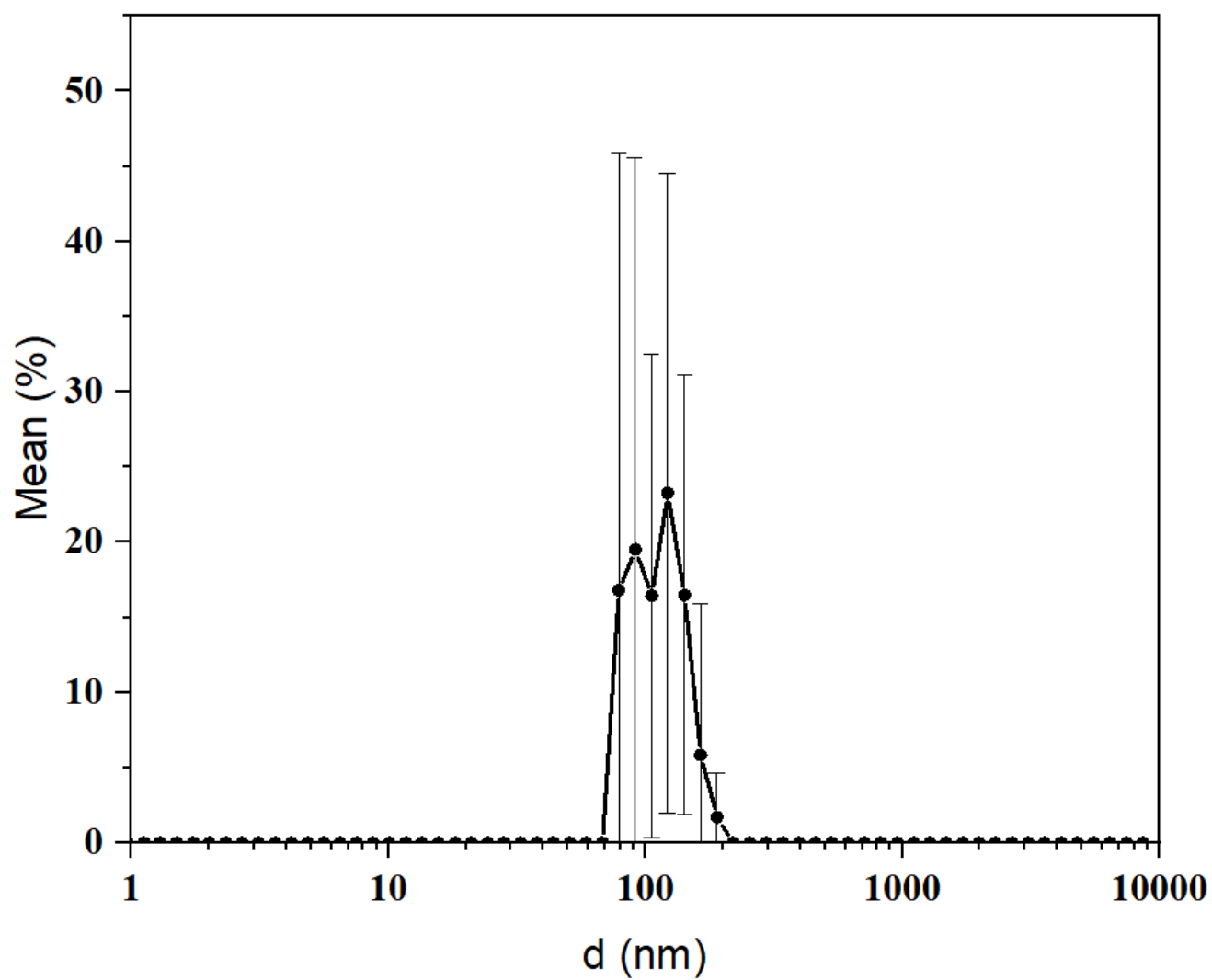
Рисунок 21 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: H₂O Mili-Q (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

1 μ M

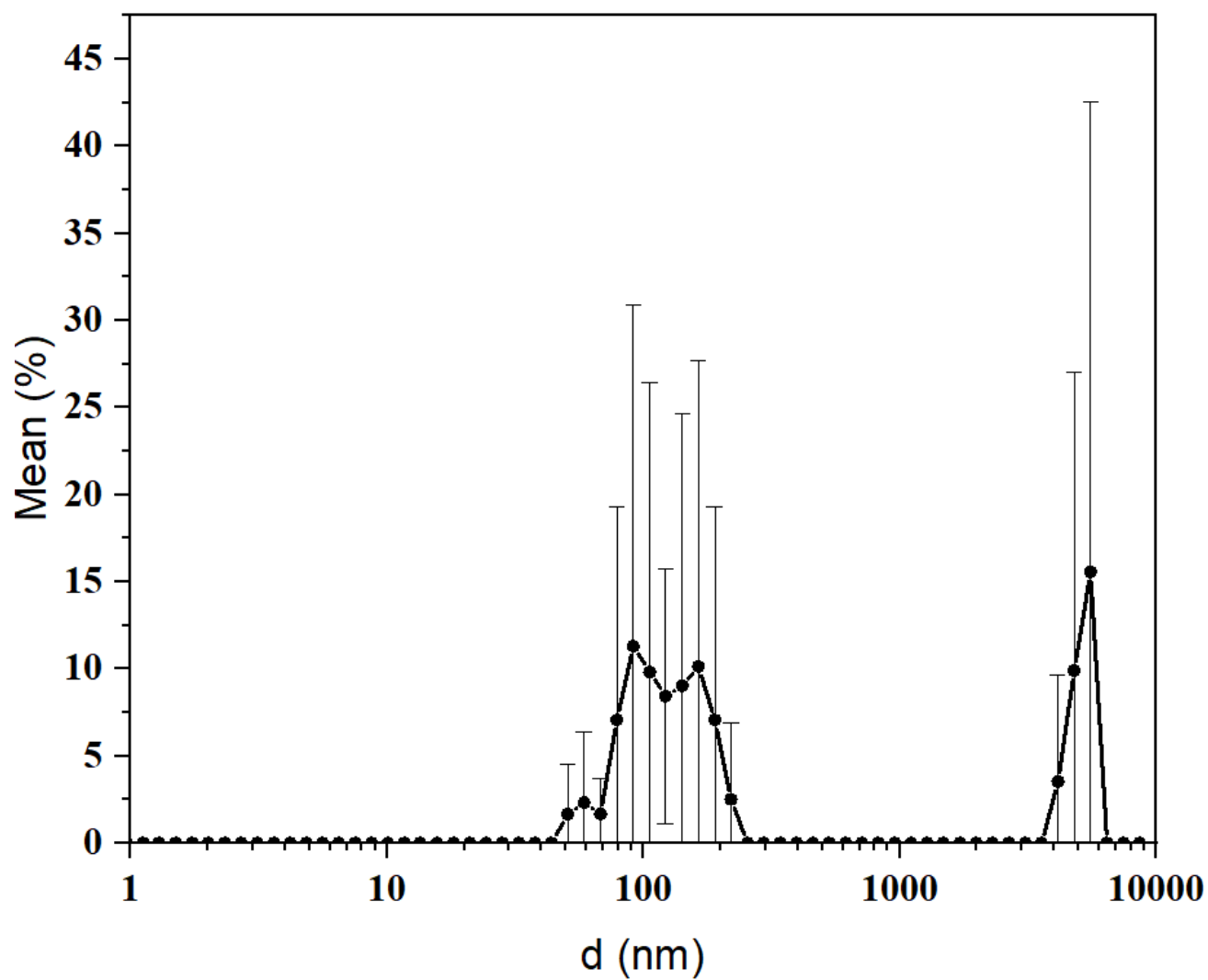
Рисунок 22 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсant: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,1 μ M

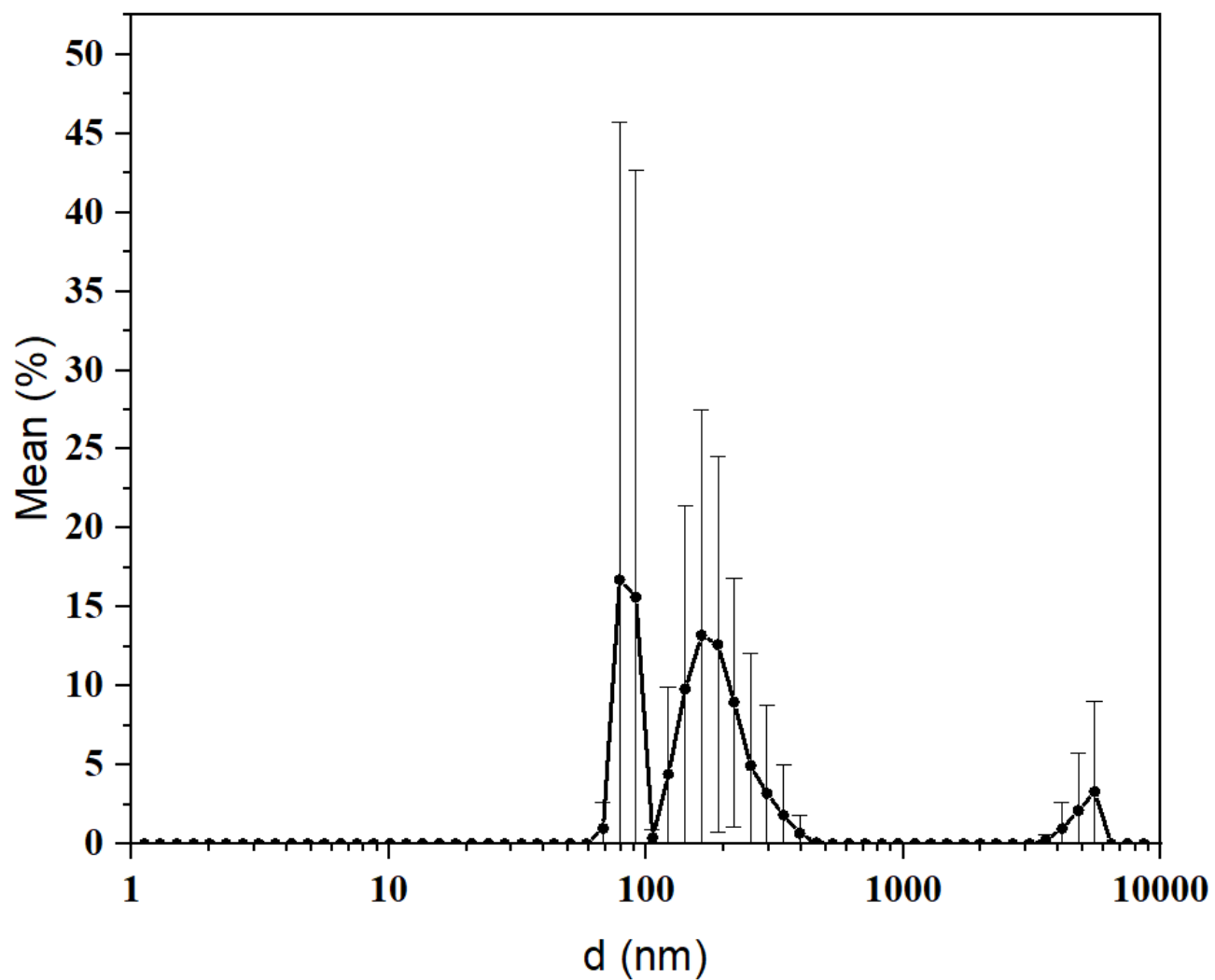
Рисунок 23 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,01 μ M

Рисунок 24 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

1 nM

Рисунок 25 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсant: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

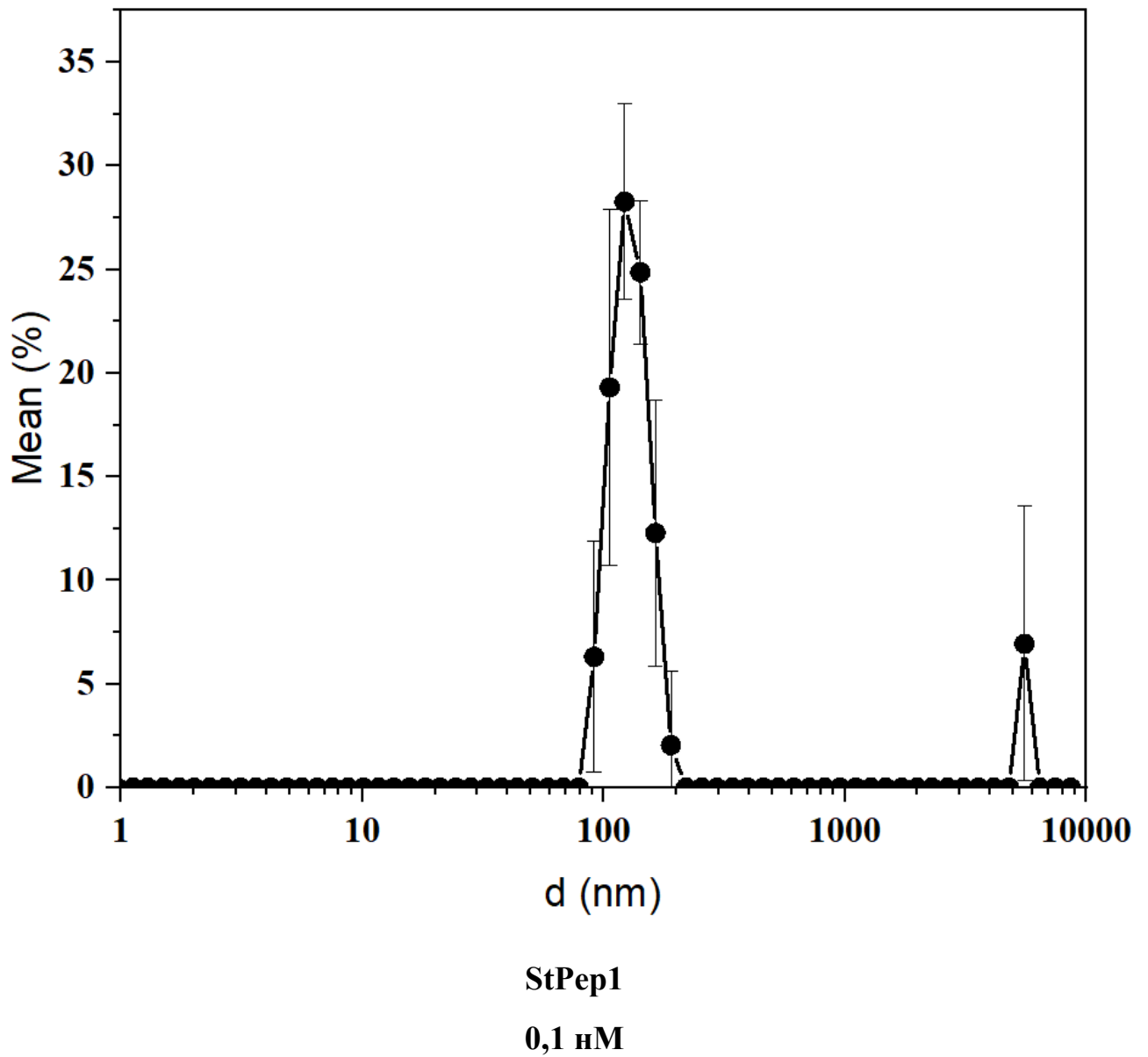
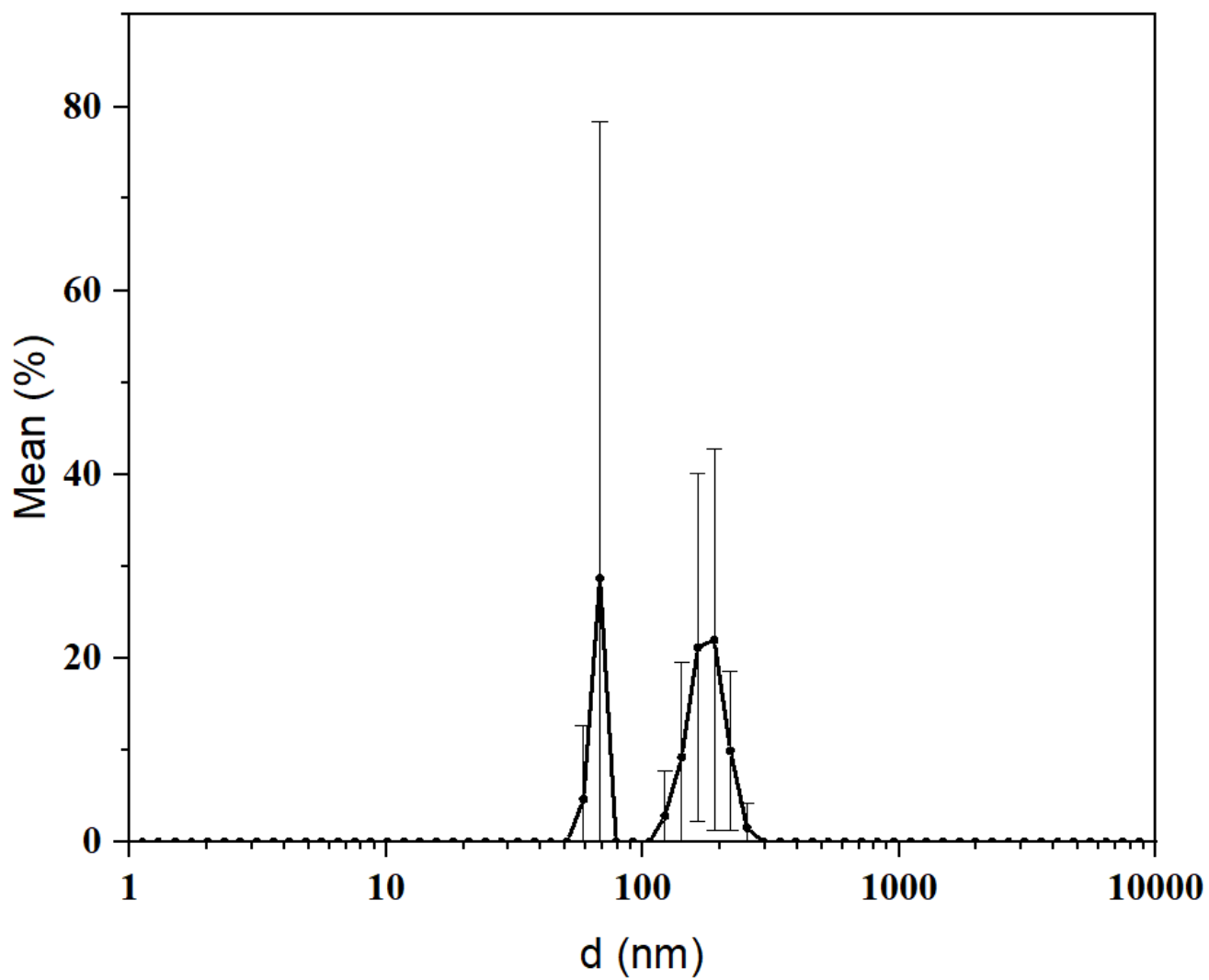


Рисунок 26 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,01 нМ

Рисунок 27 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

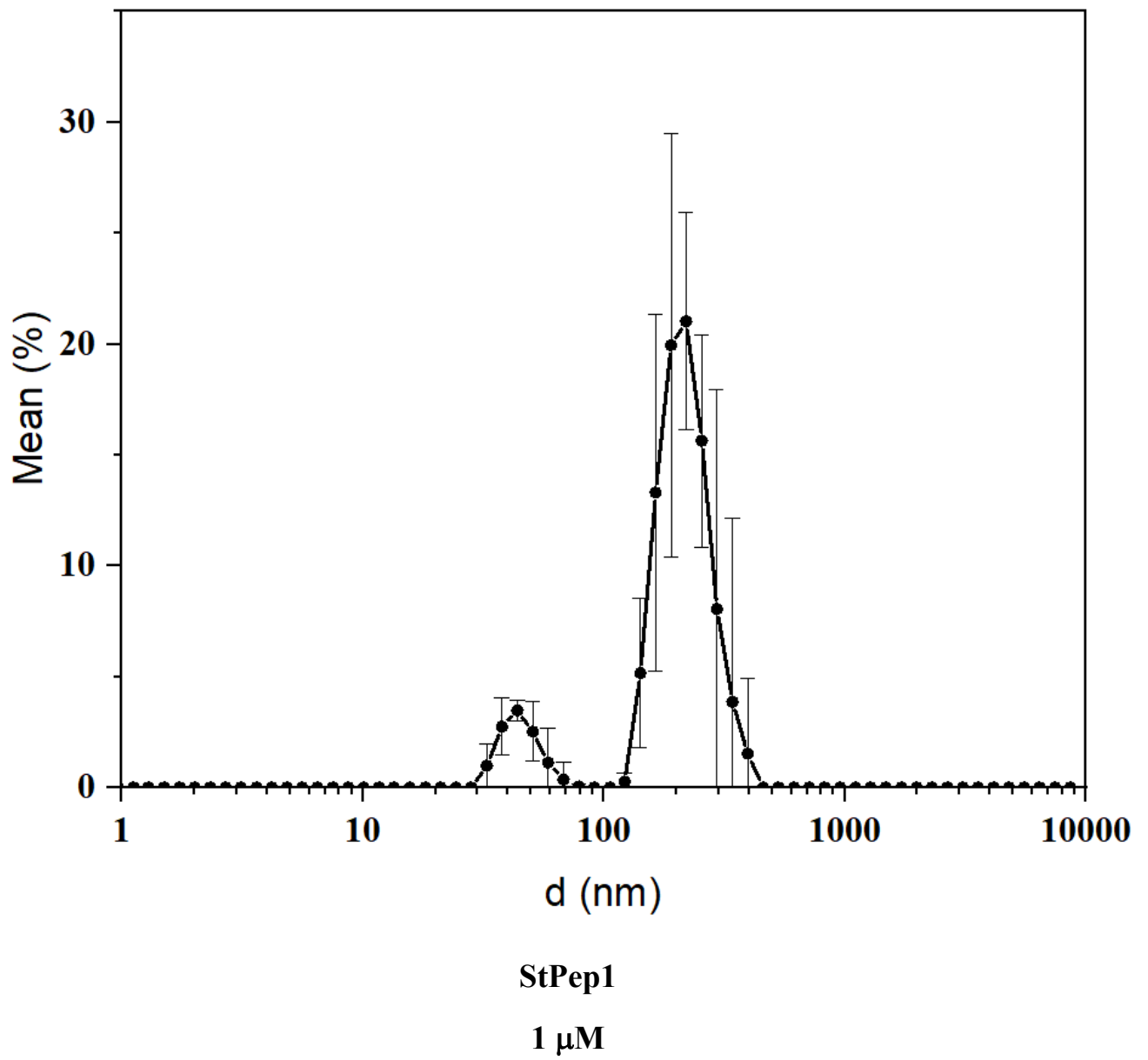
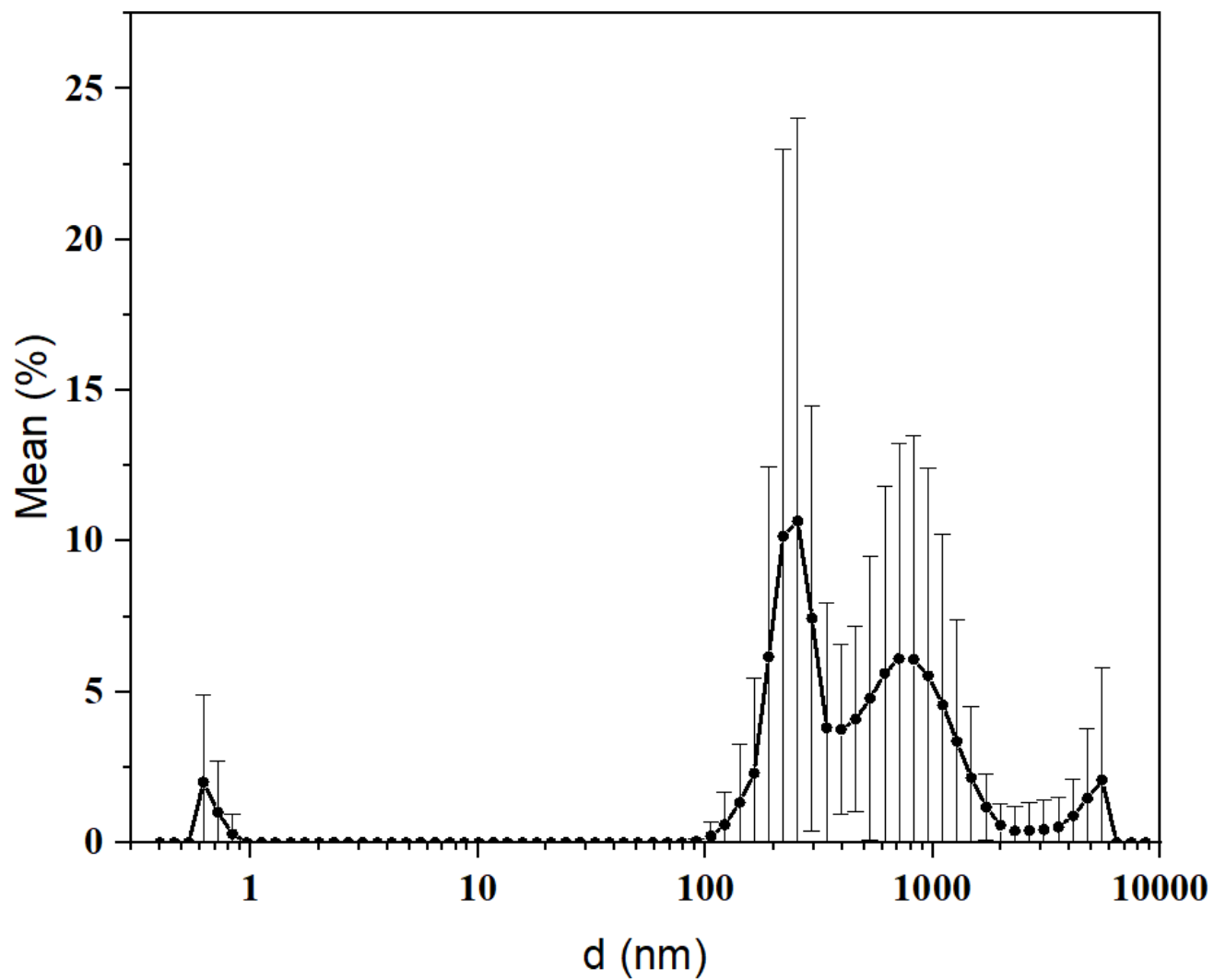


Рисунок 28 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсant: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,1 μ M

Рисунок 29 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

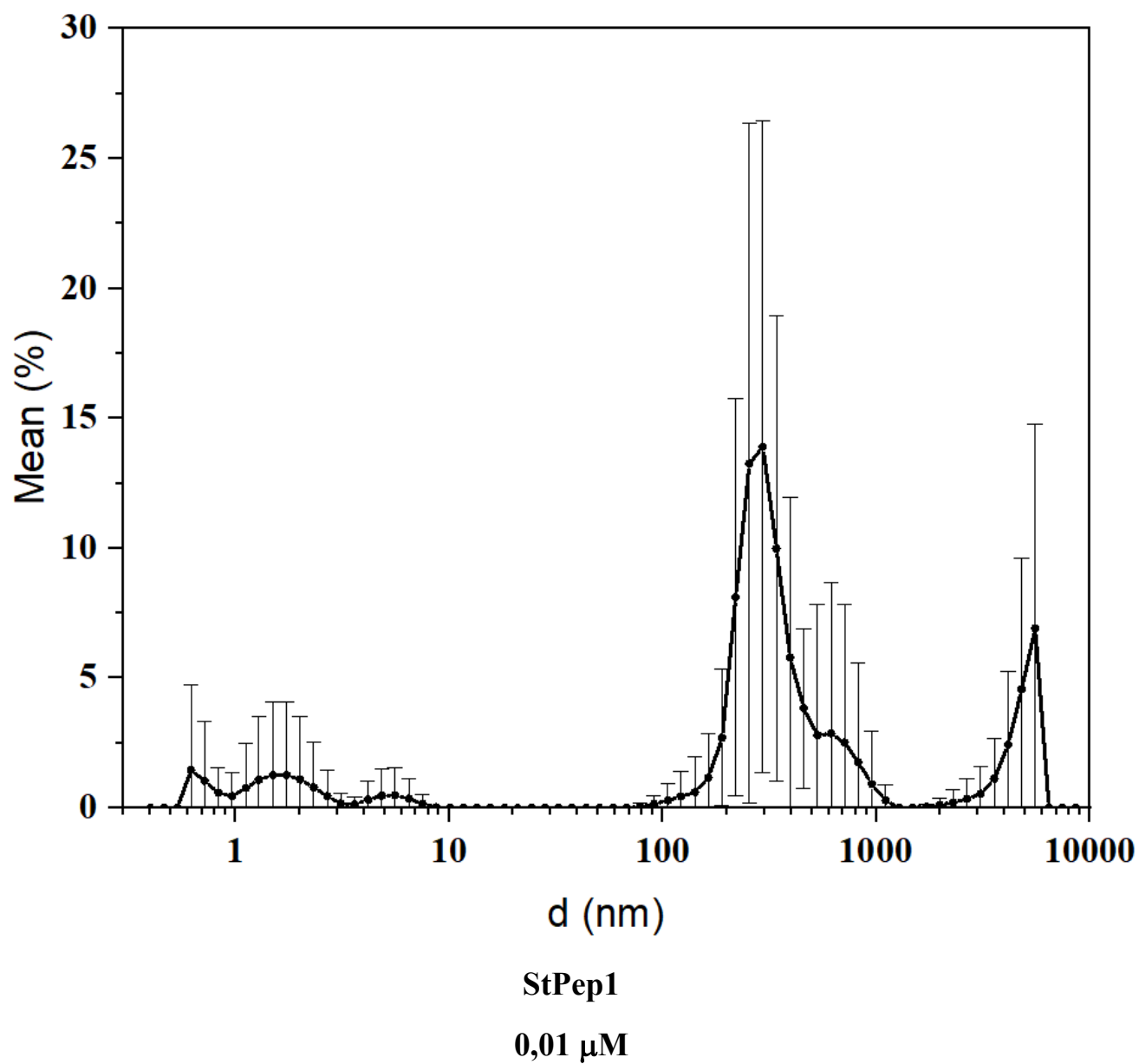
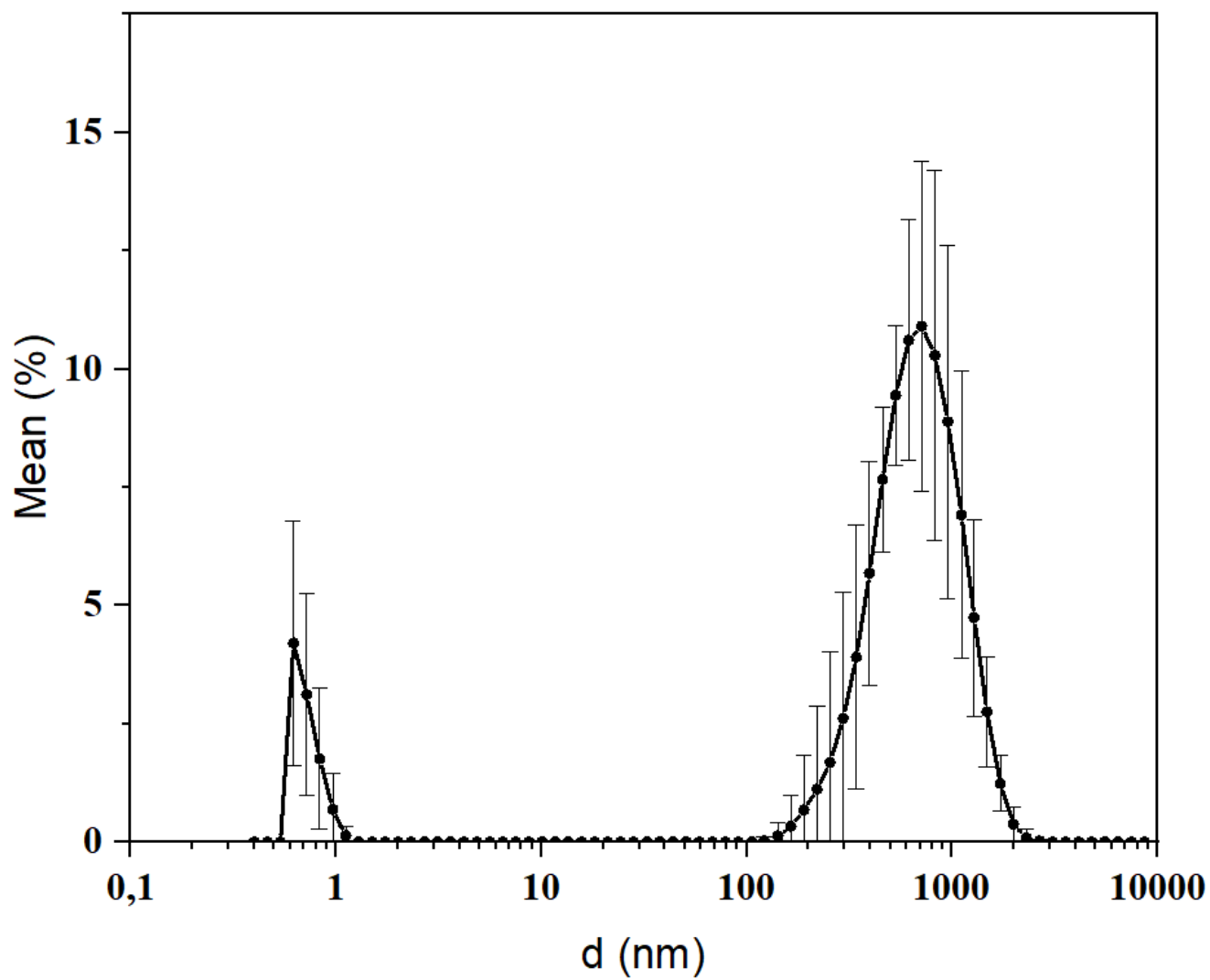


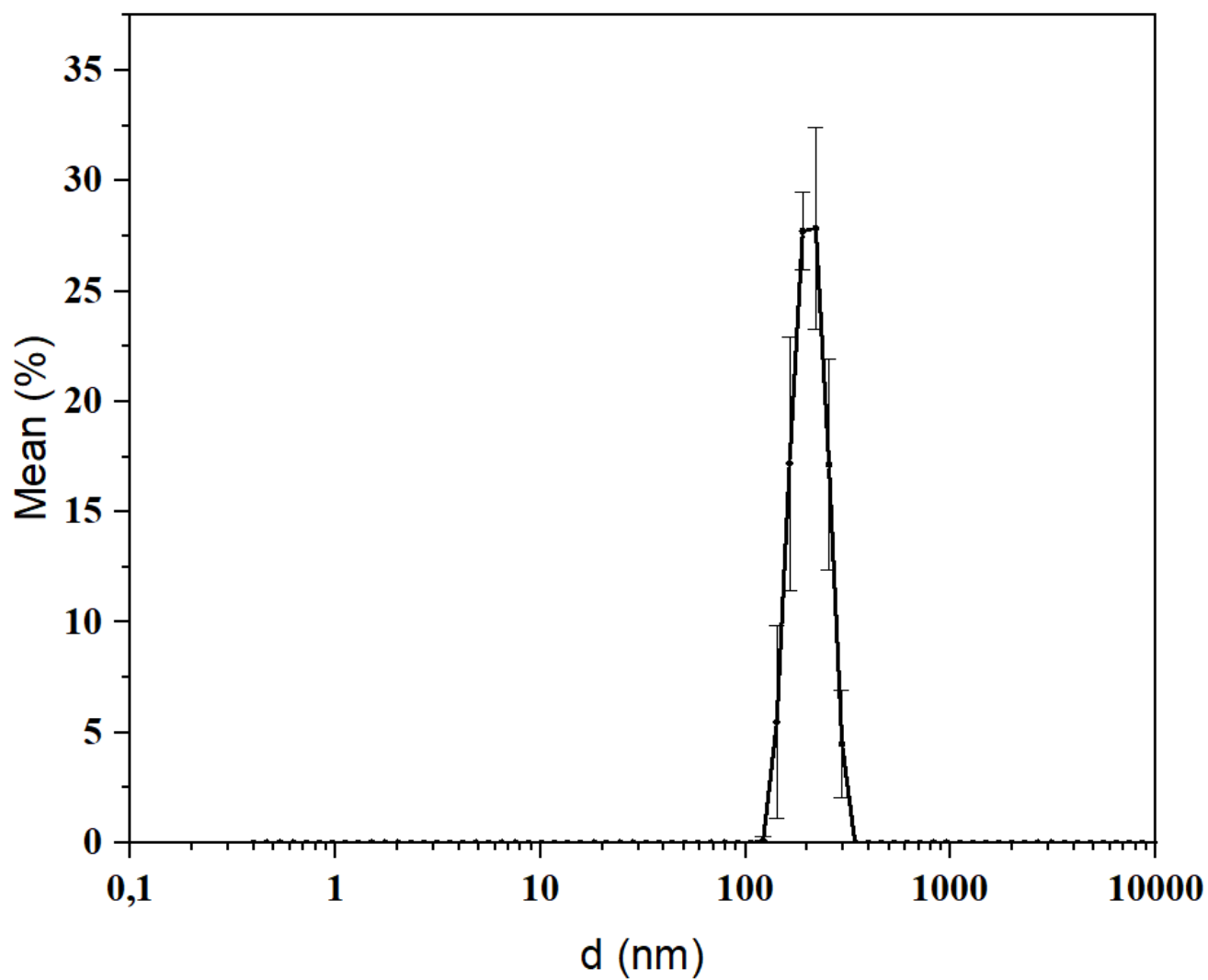
Рисунок 30 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

1 nM

Рисунок 31 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, $n = 45$)



StPep1

1 μ M

Рисунок 32 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1 – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

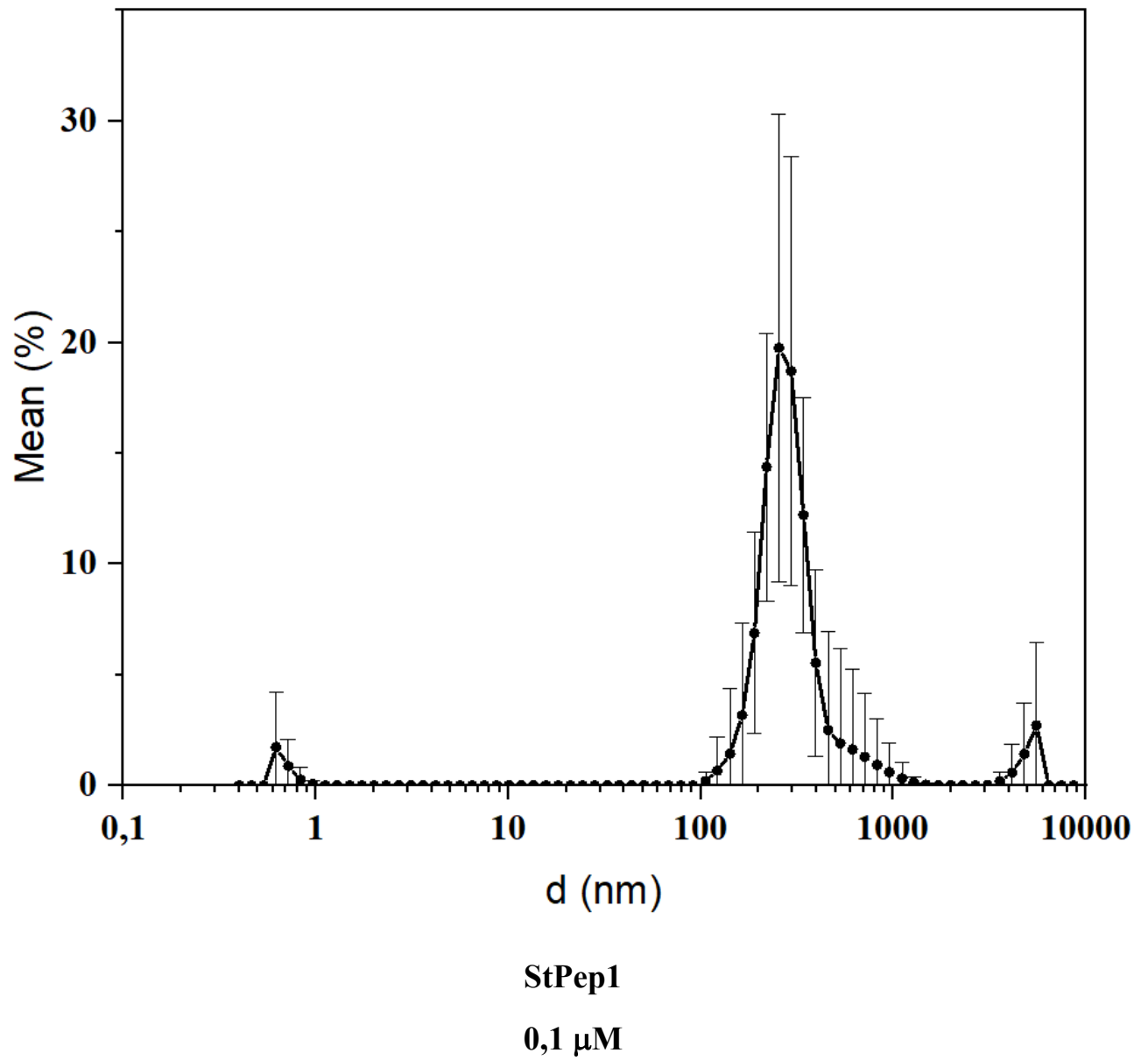
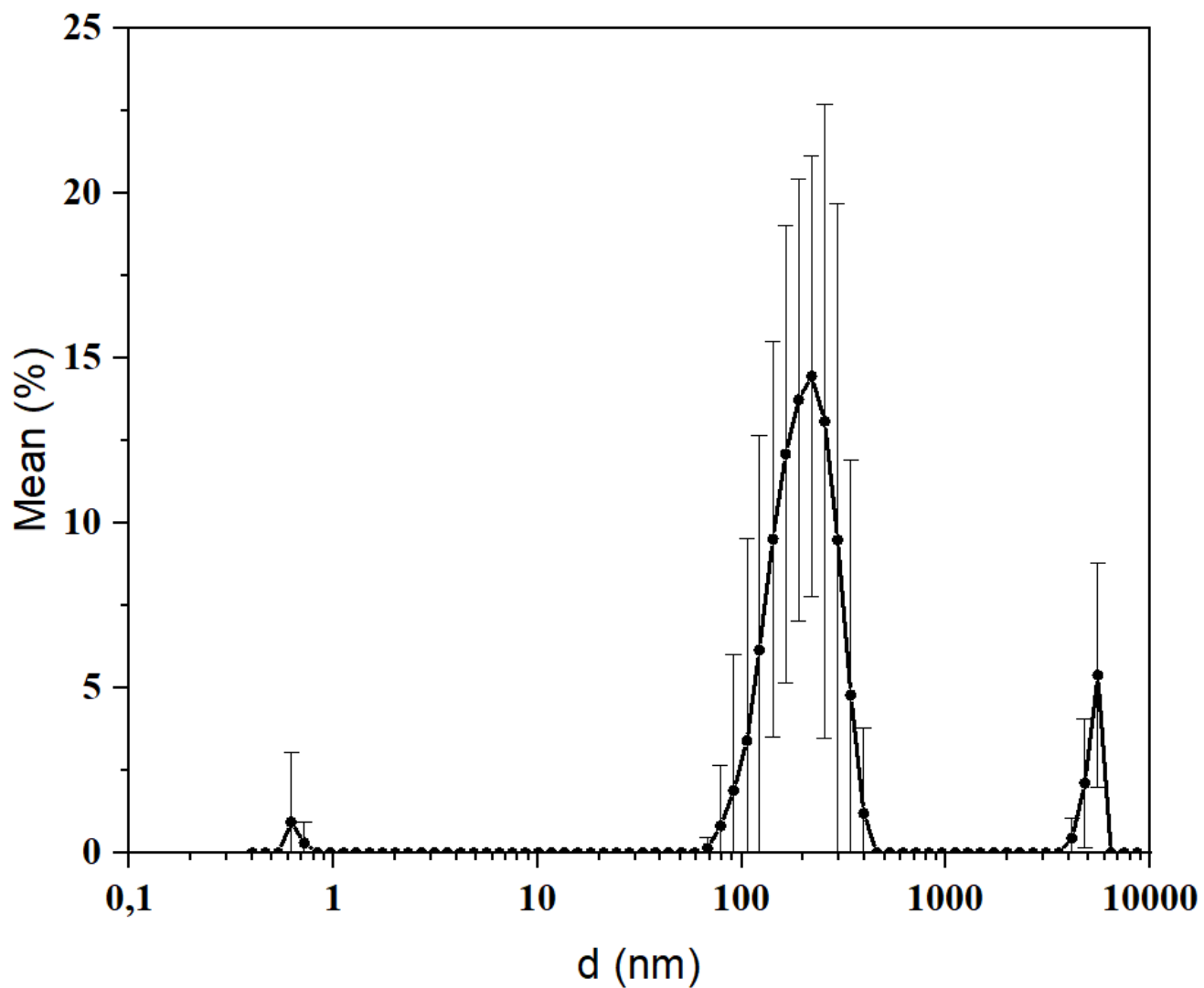


Рисунок 33 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StPep1

0,01 μM

Рисунок 34 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

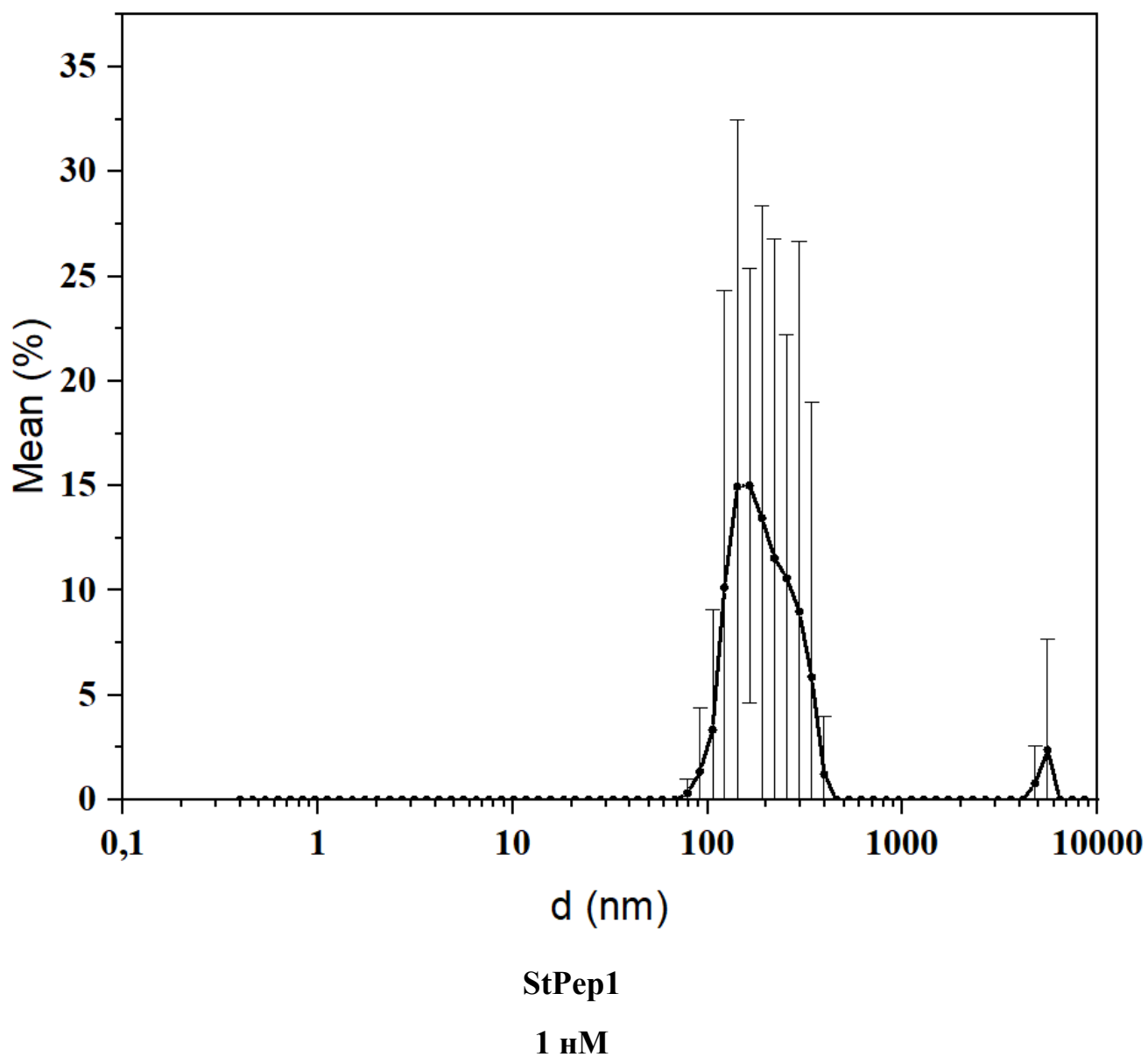
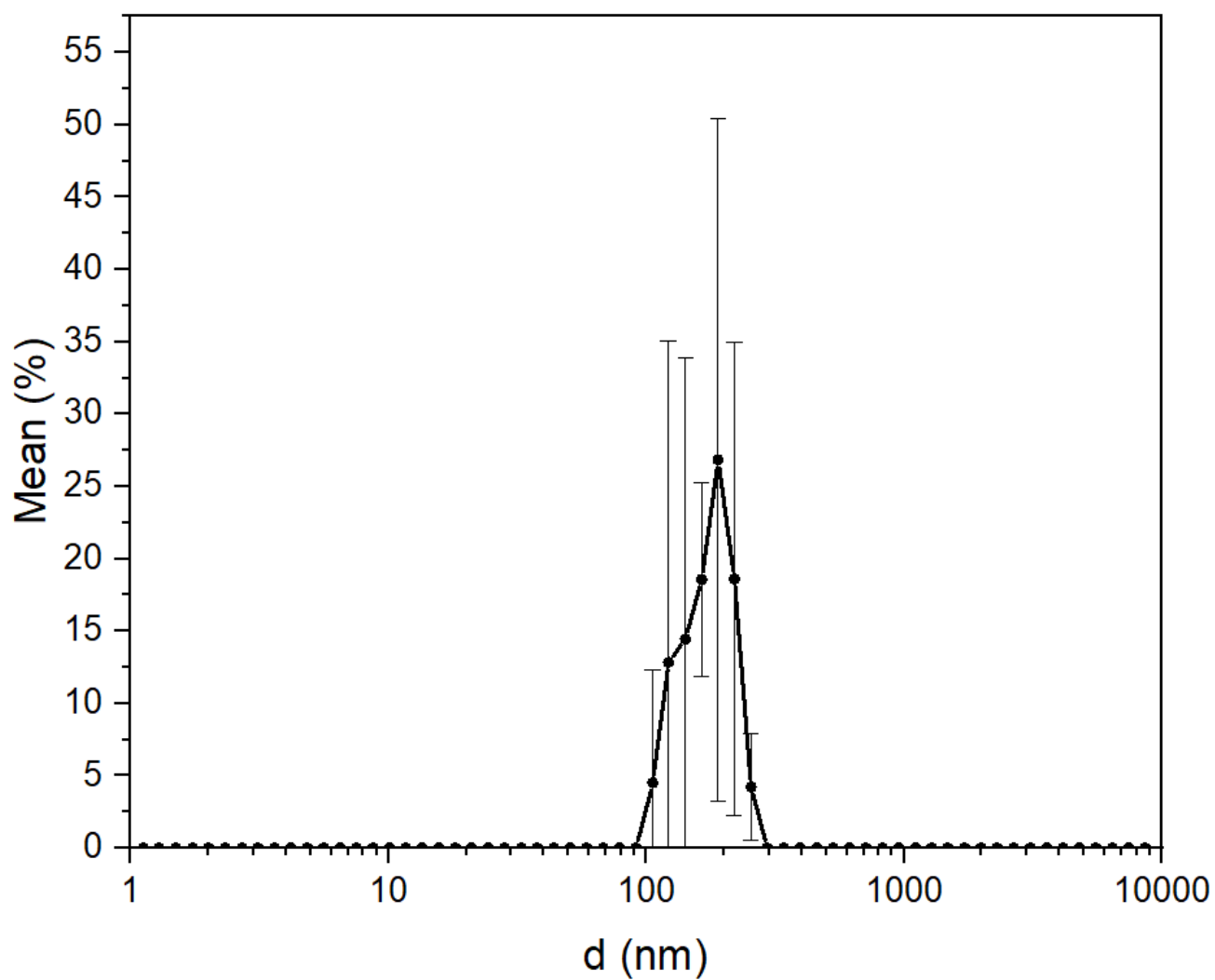


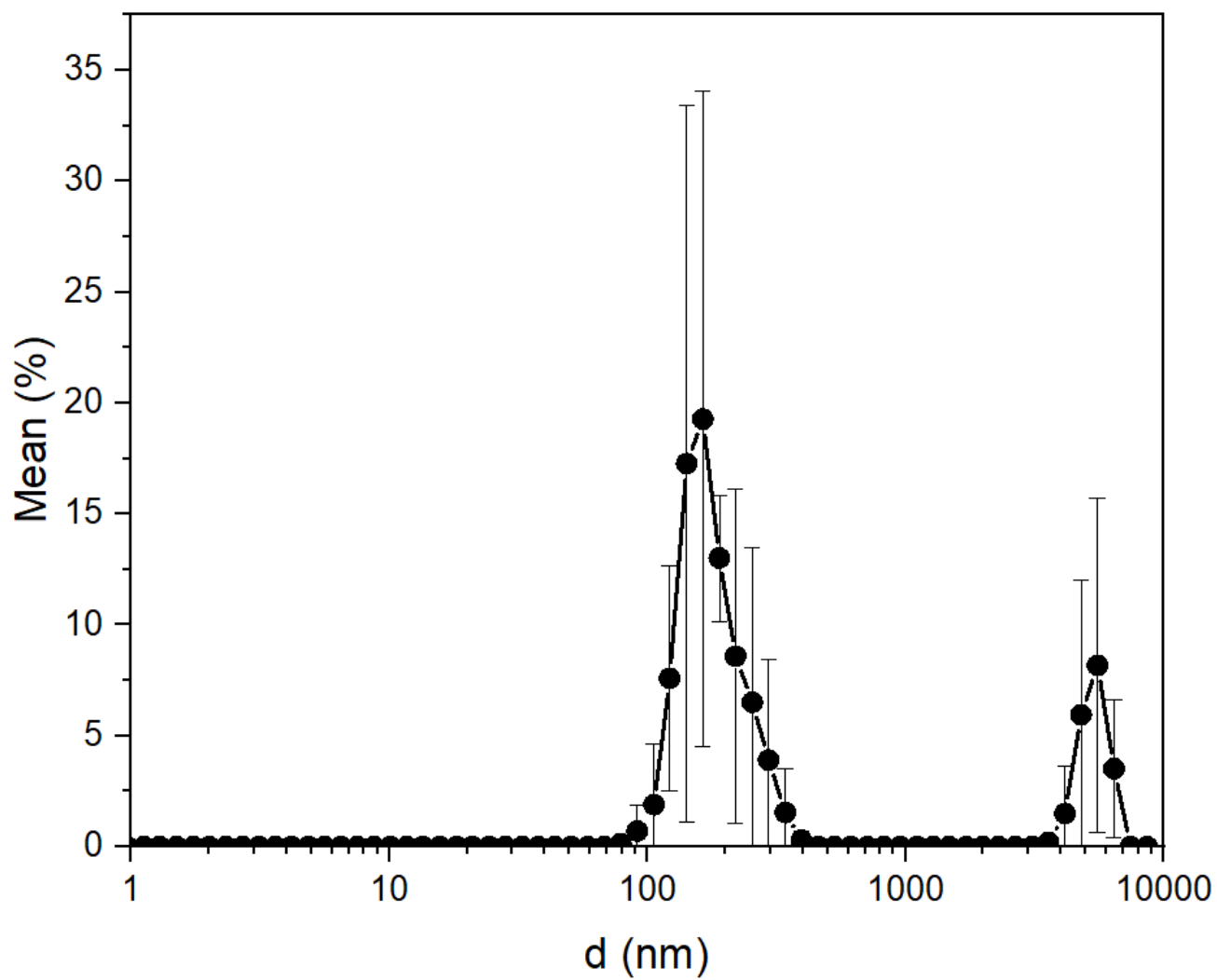
Рисунок 35 - Размерный спектр по интенсивности сигнала от растительного пептида StPep1– Дисперсant: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

1 μ M

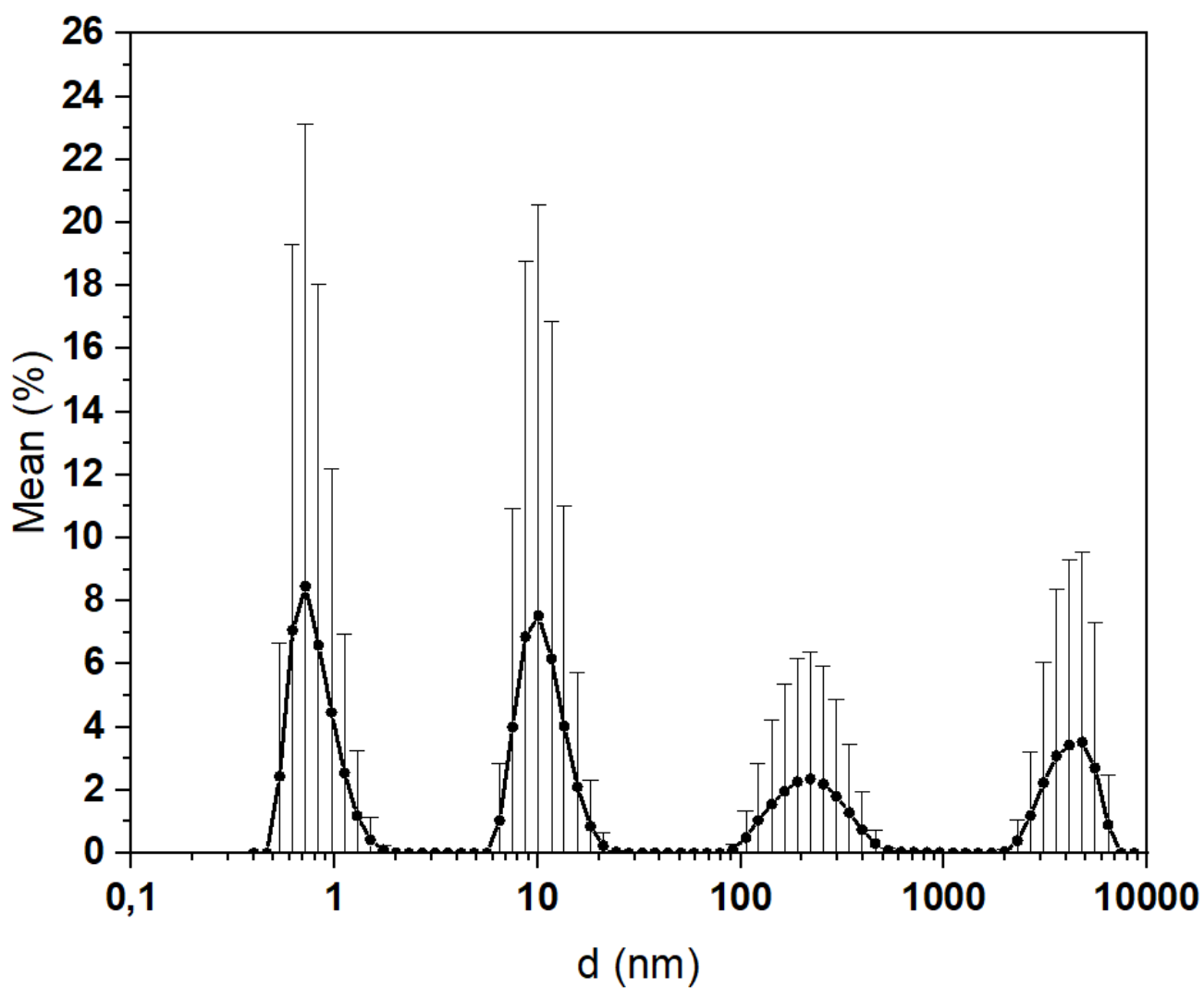
Рисунок 36 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,1 μM

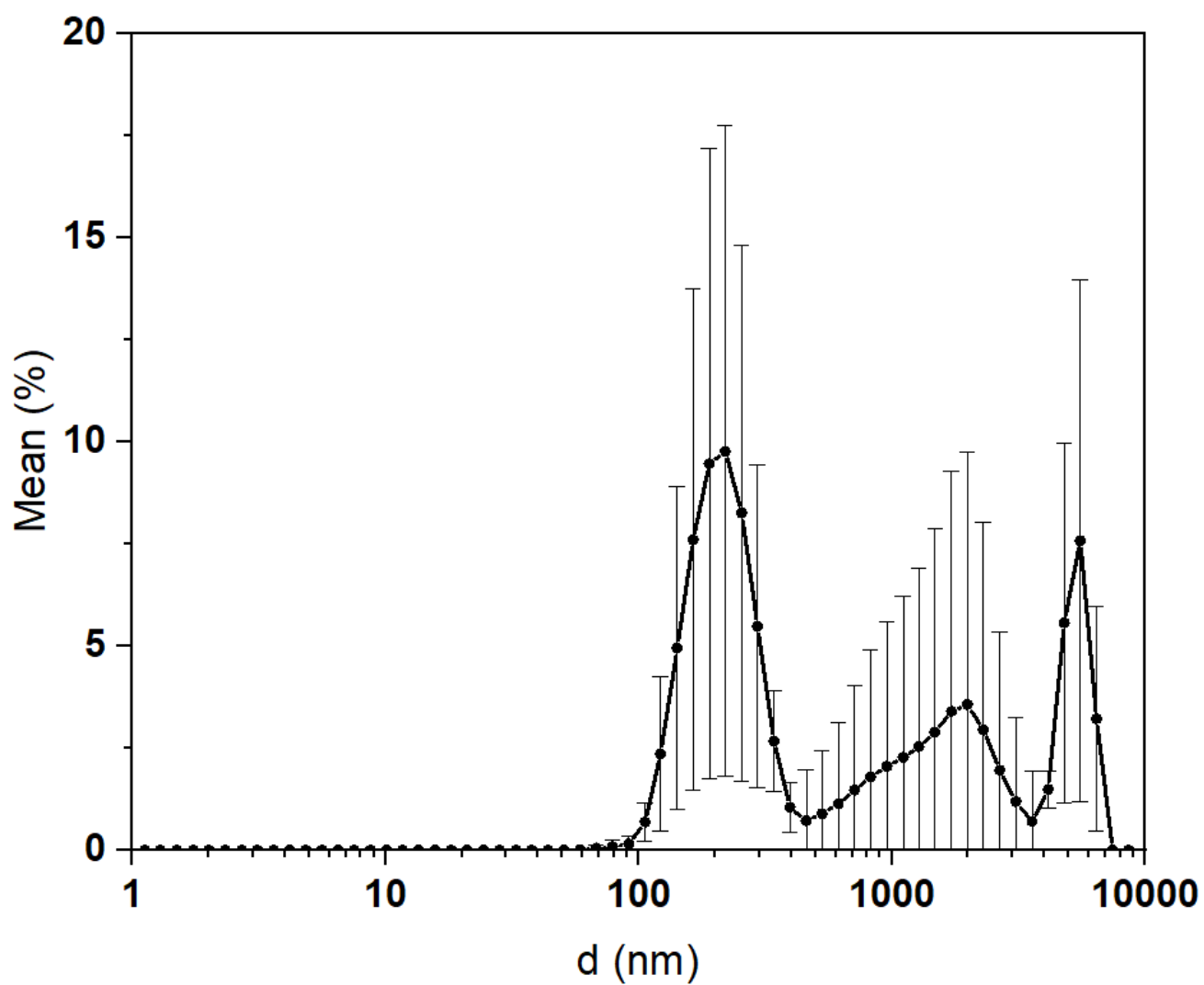
Рисунок 37 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,01 μ M

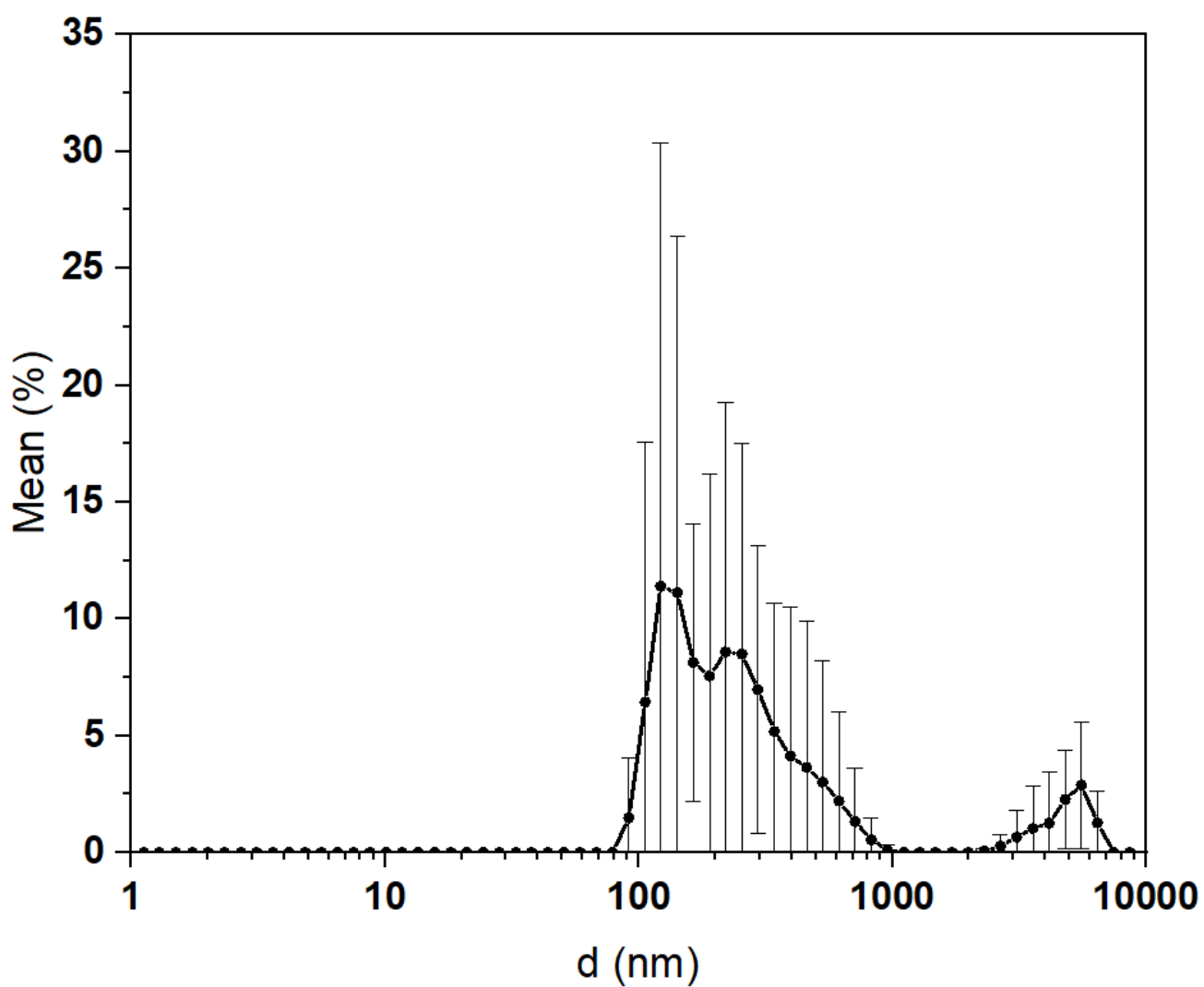
Рисунок 38 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

1 nM

Рисунок 39 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,1 нМ

Рисунок 40 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

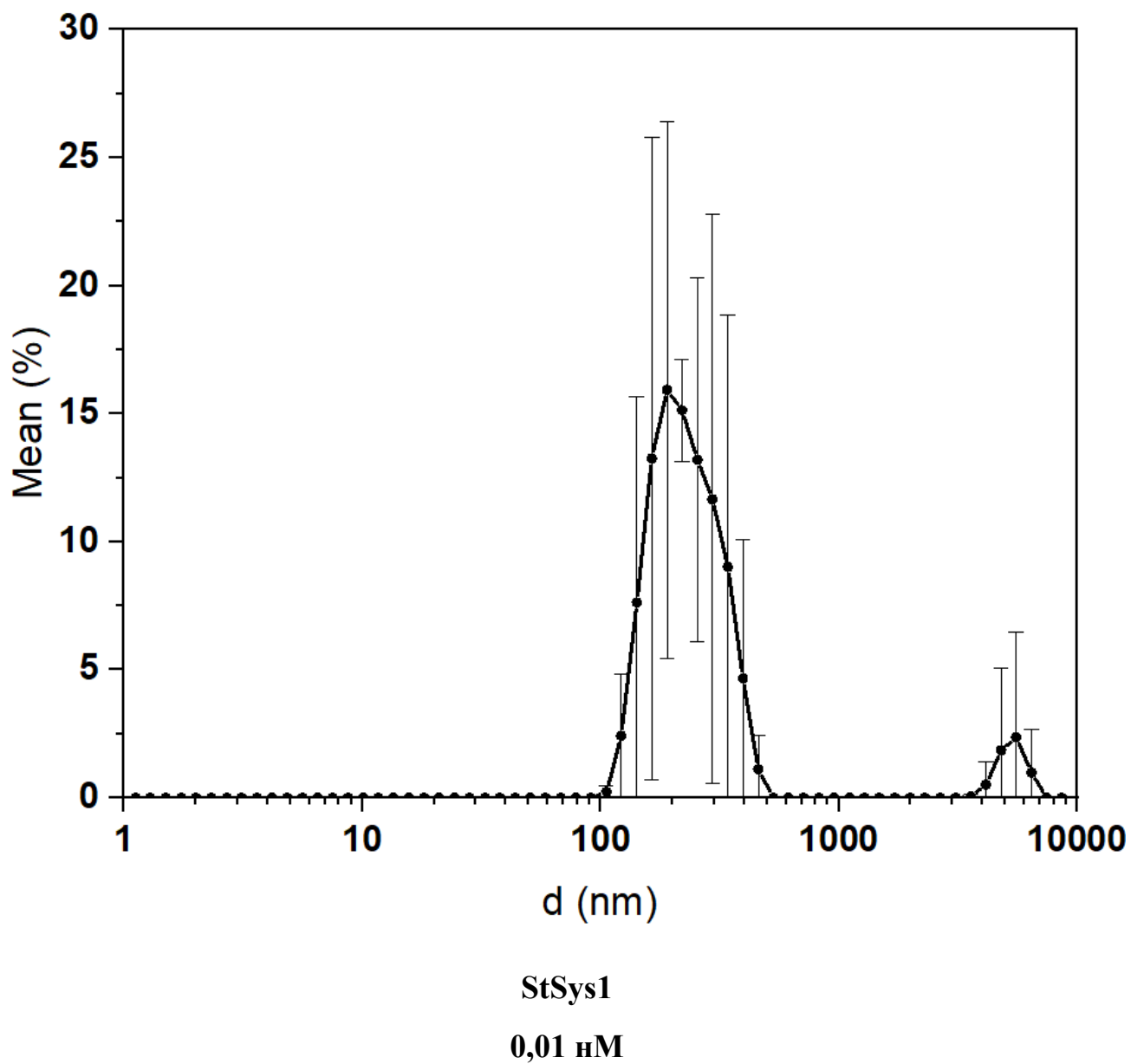
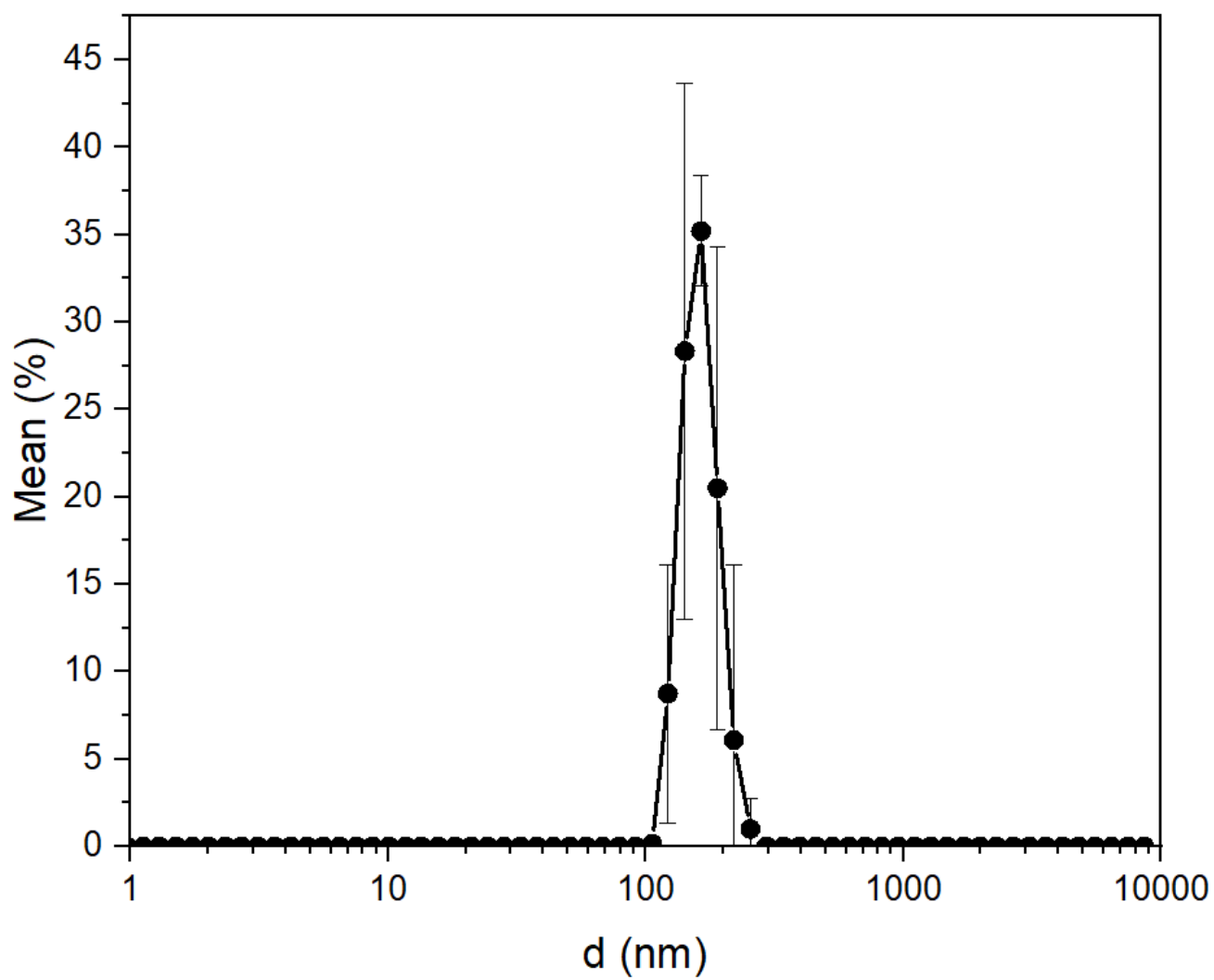


Рисунок 41 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

1 μ M

Рисунок 42 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсant: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

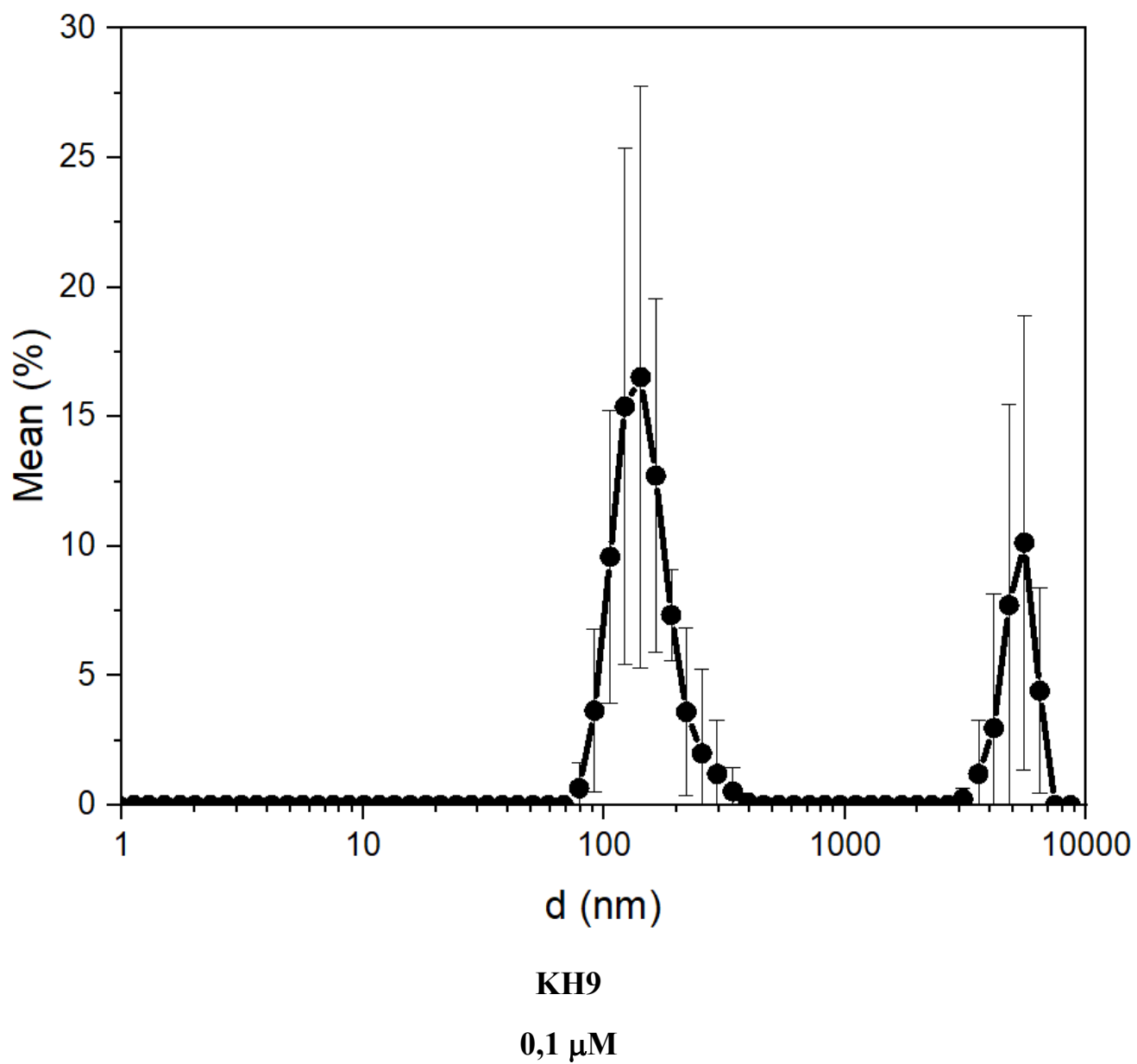
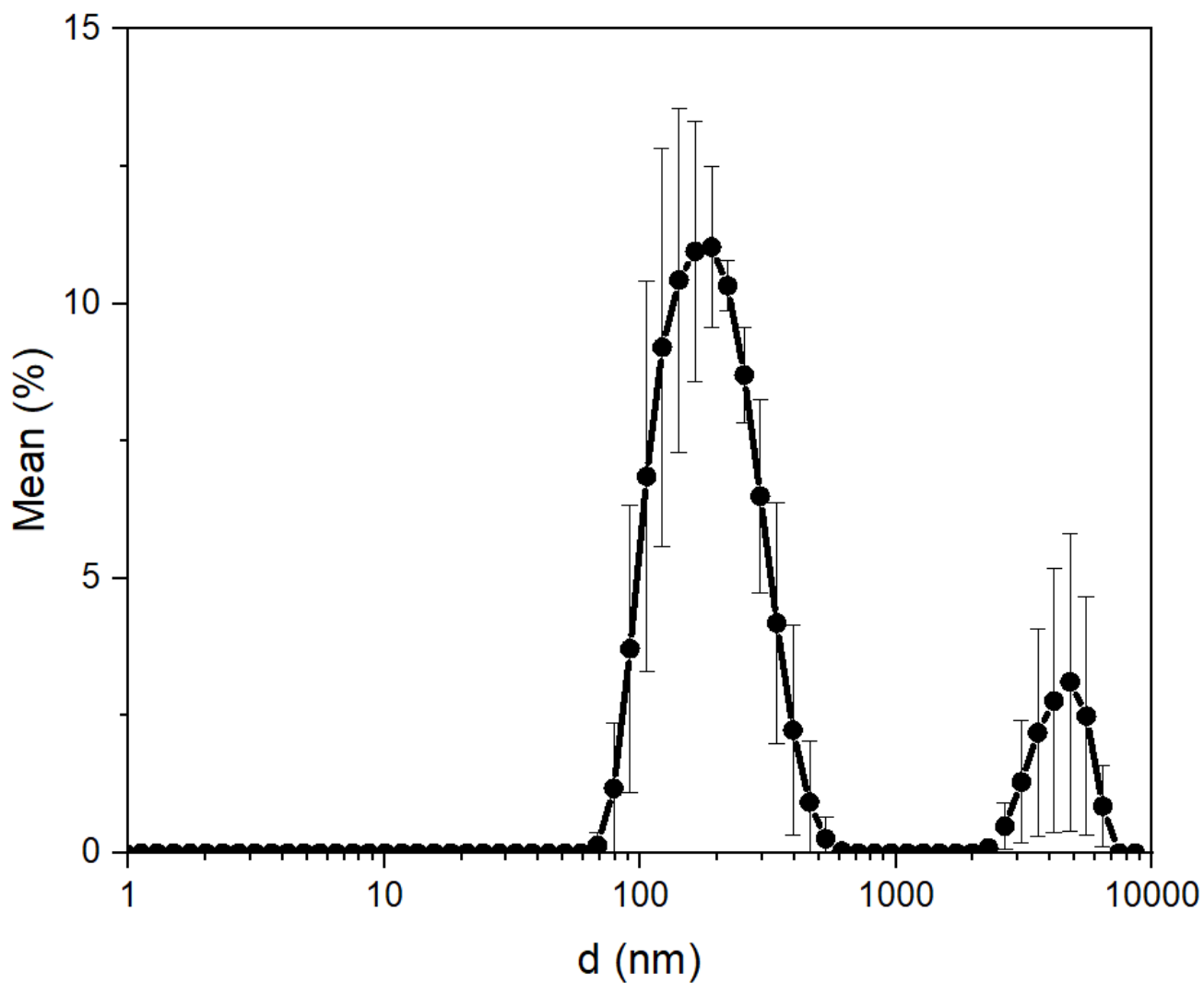


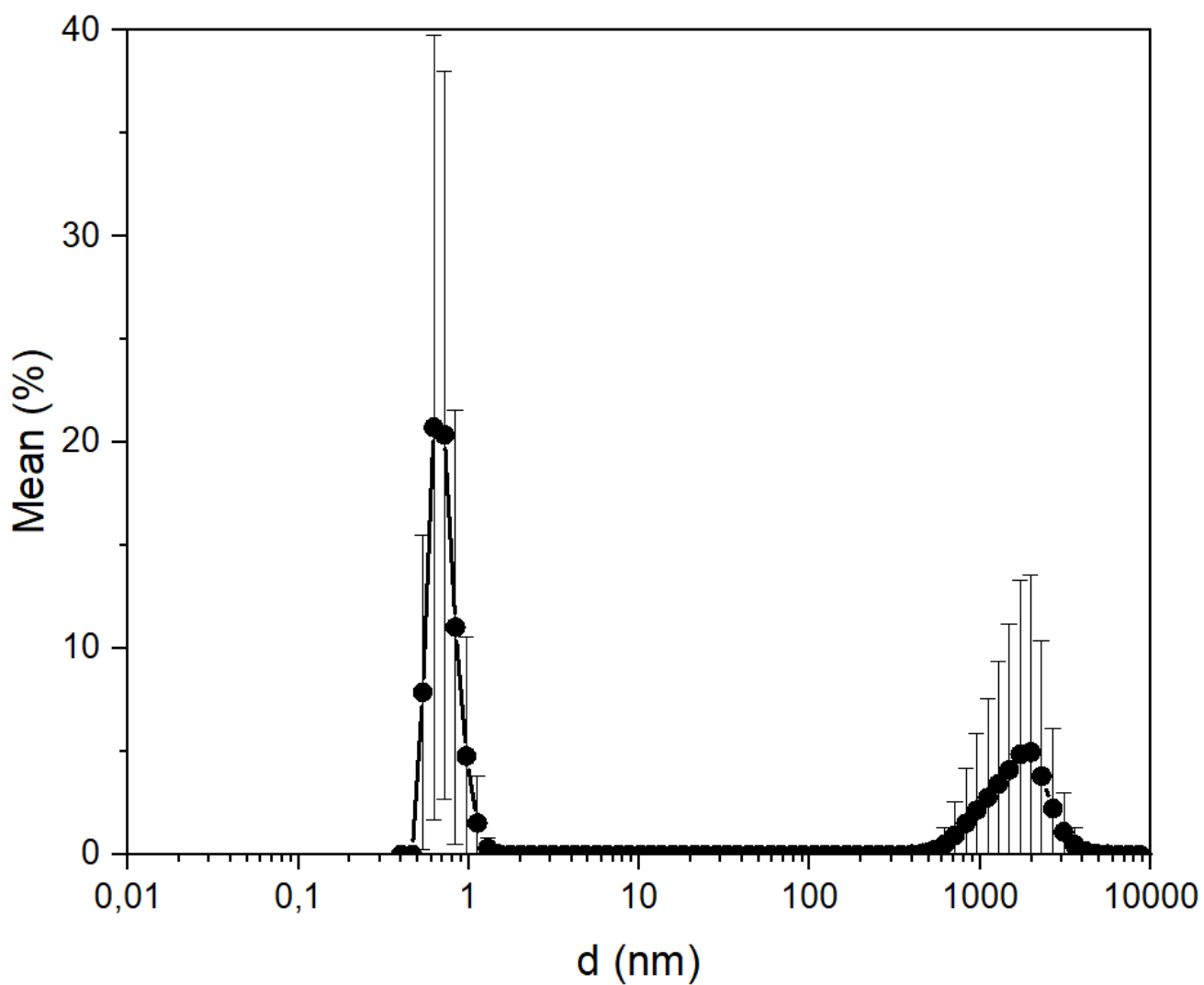
Рисунок 43 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,01 μ M

Рисунок 44 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

1 nM

Рисунок 45 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

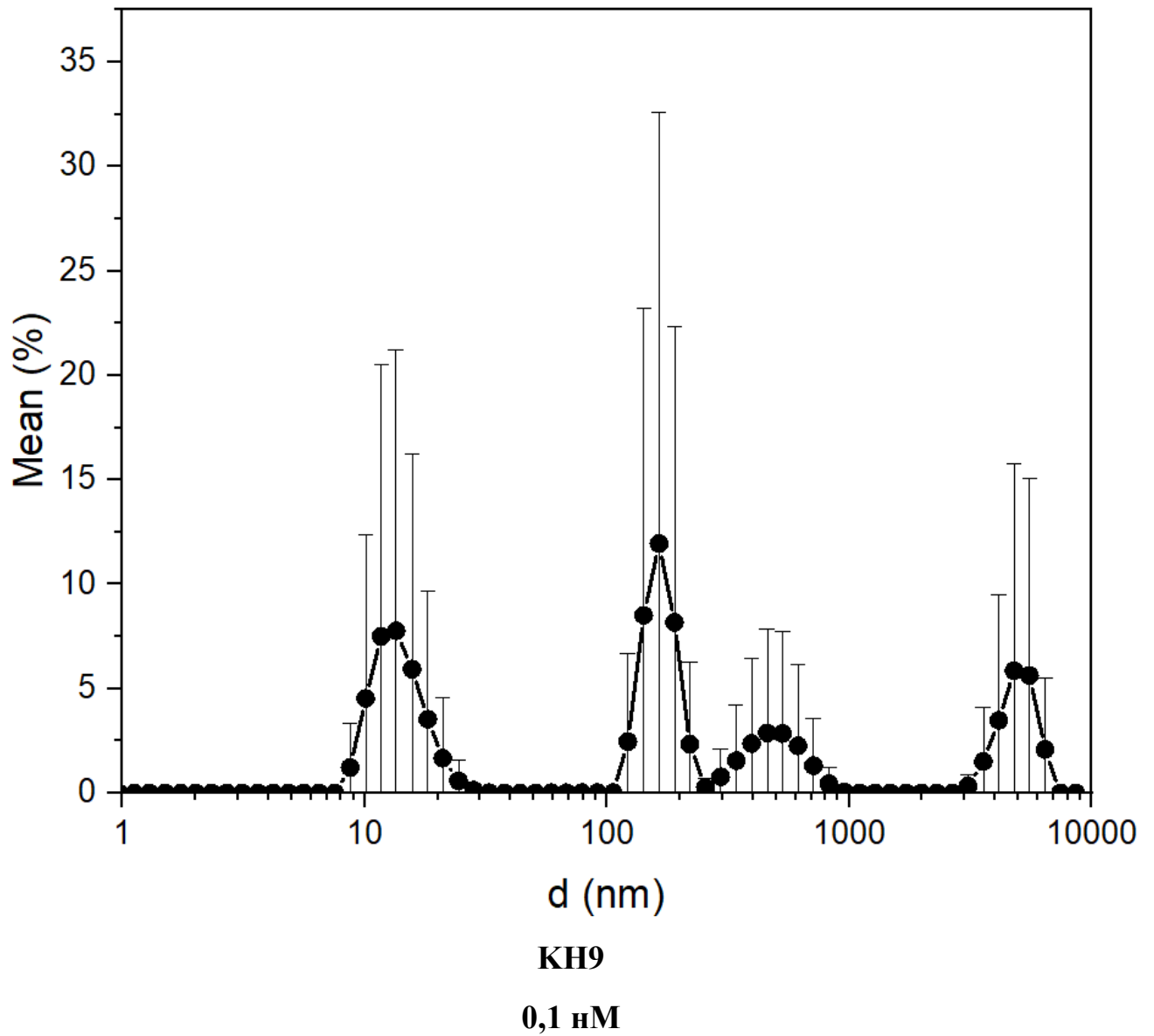
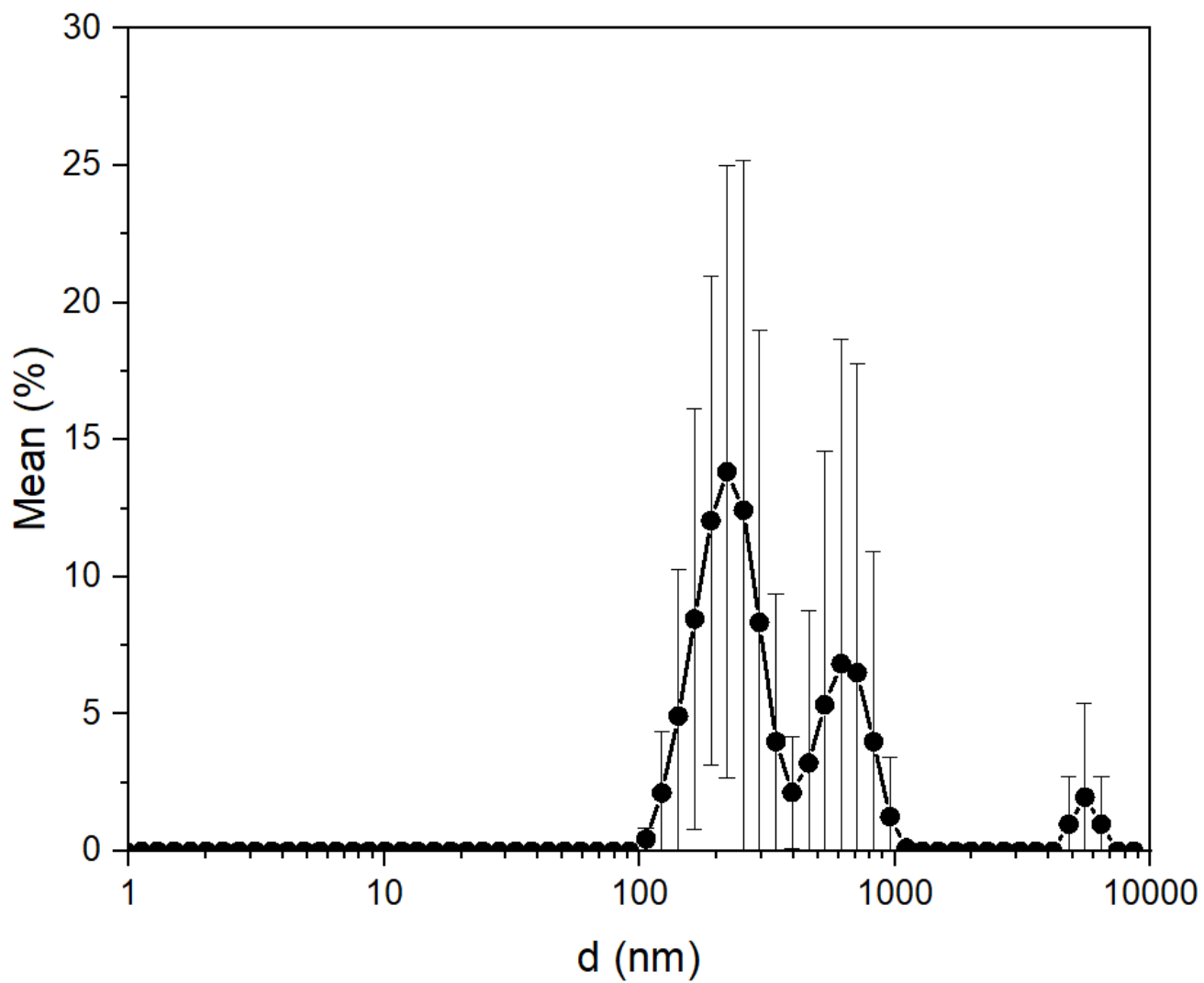


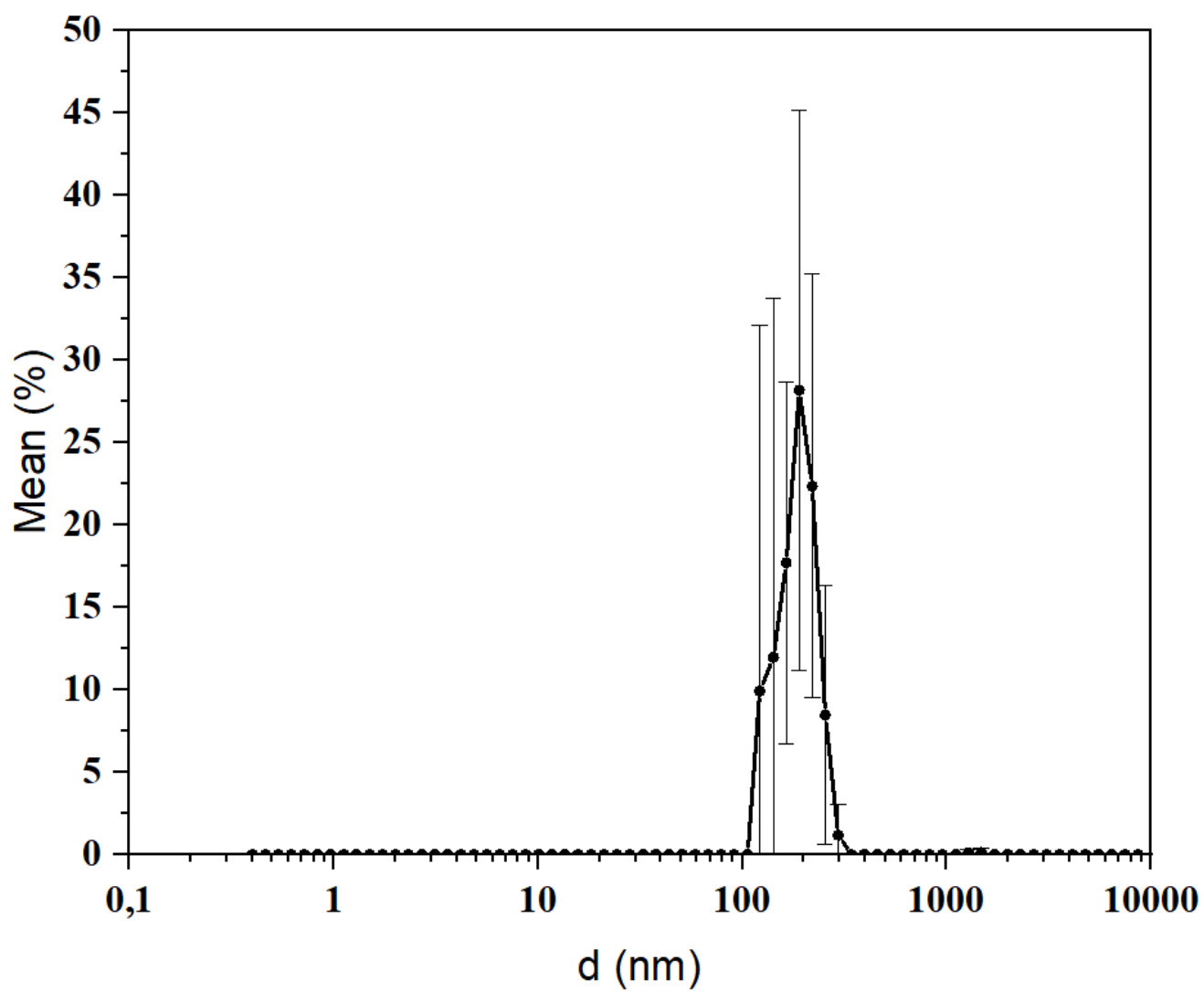
Рисунок 46 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,01 нМ

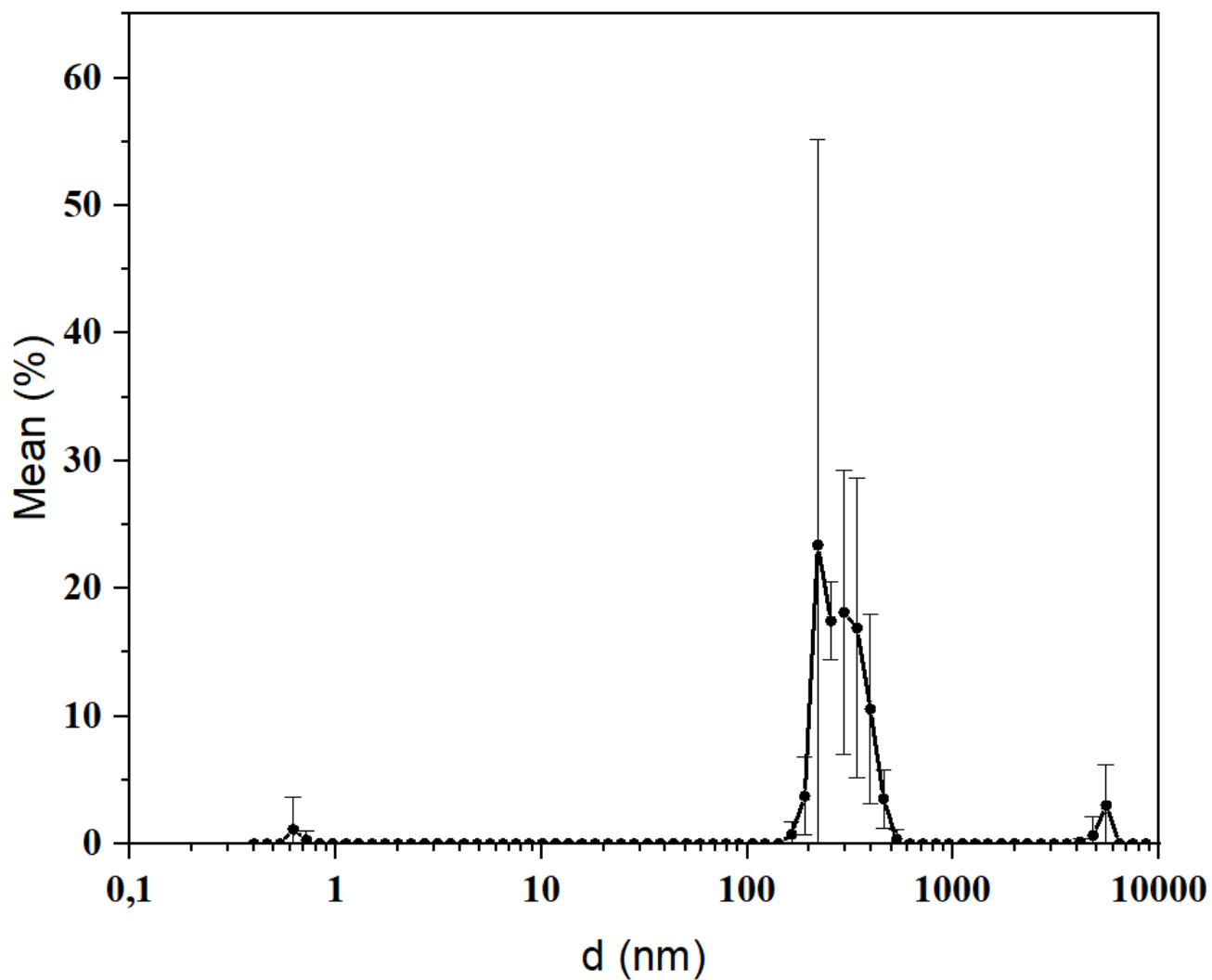
Рисунок 47 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по объемной концентрации – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



КН9

1 μ M

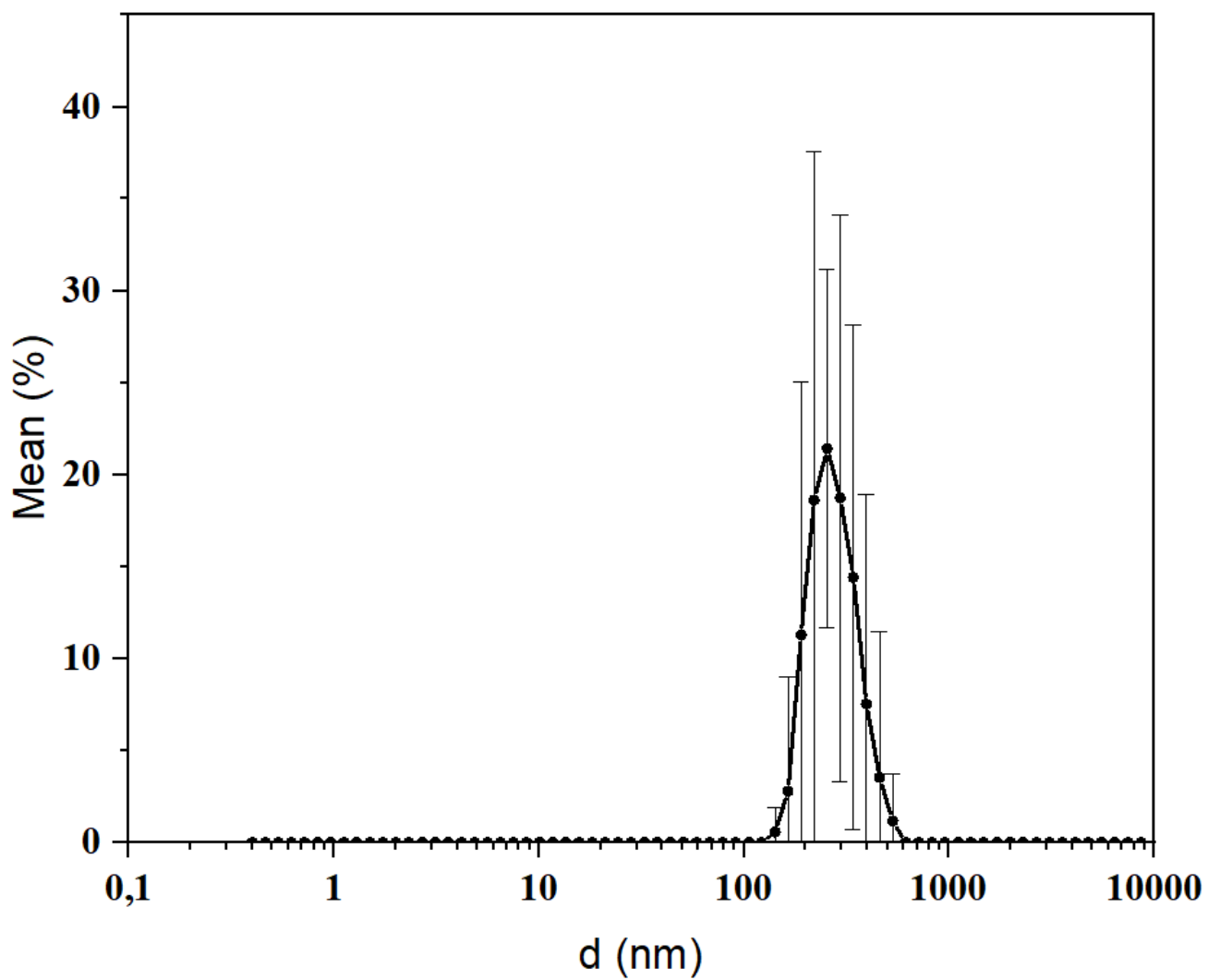
Рисунок 48 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,1 μ M

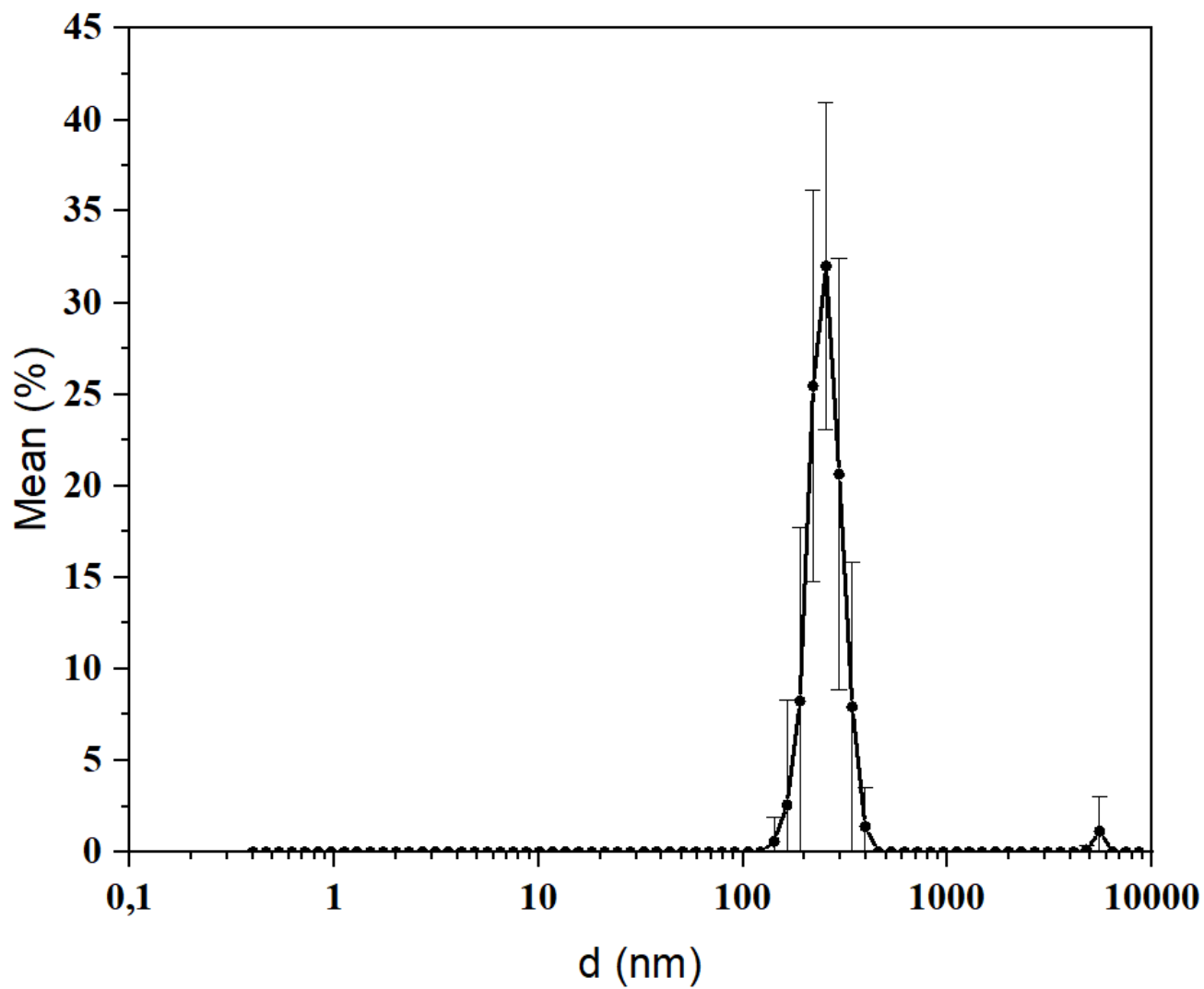
Рисунок 49 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,01 μ M

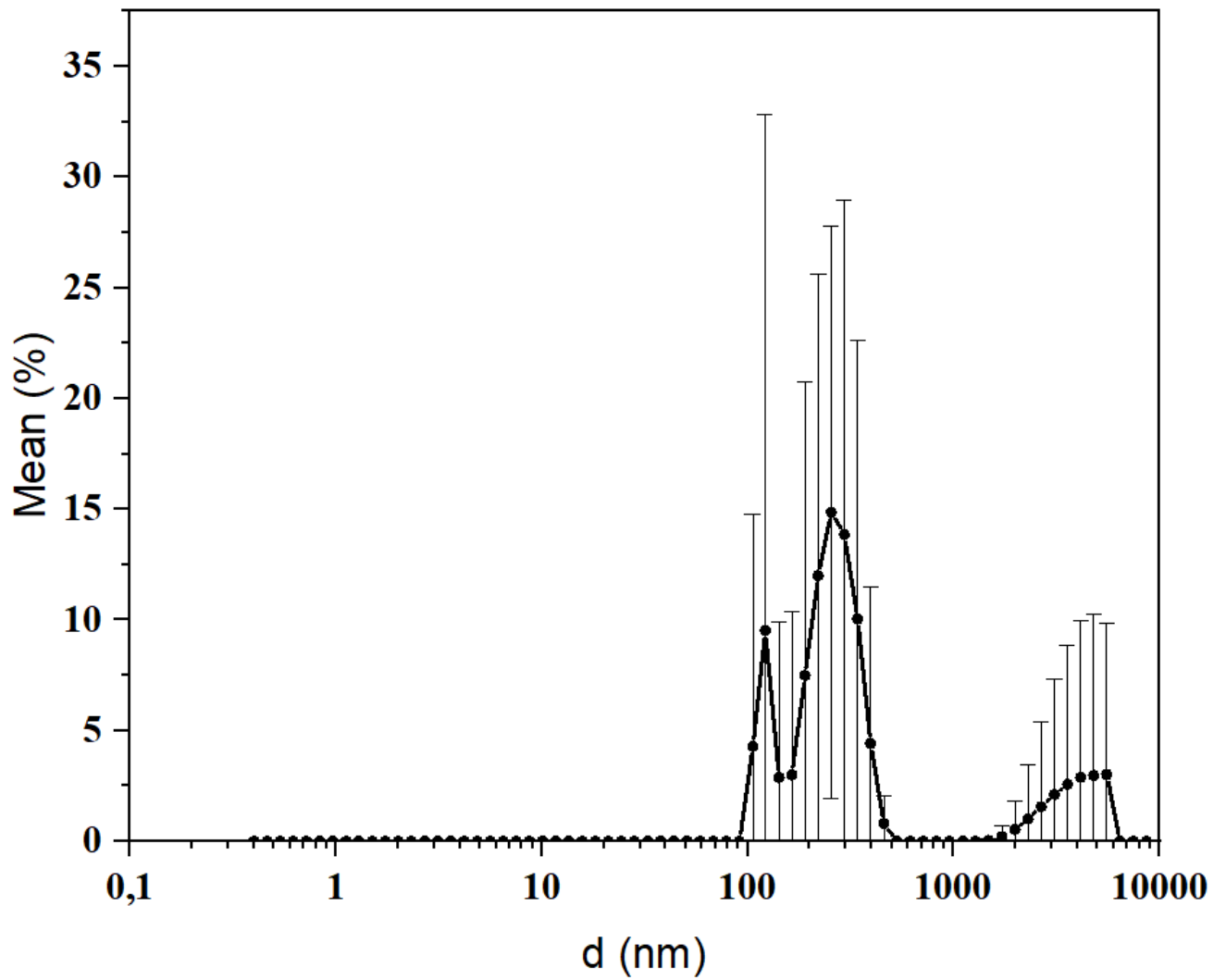
Рисунок 50 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

1 nM

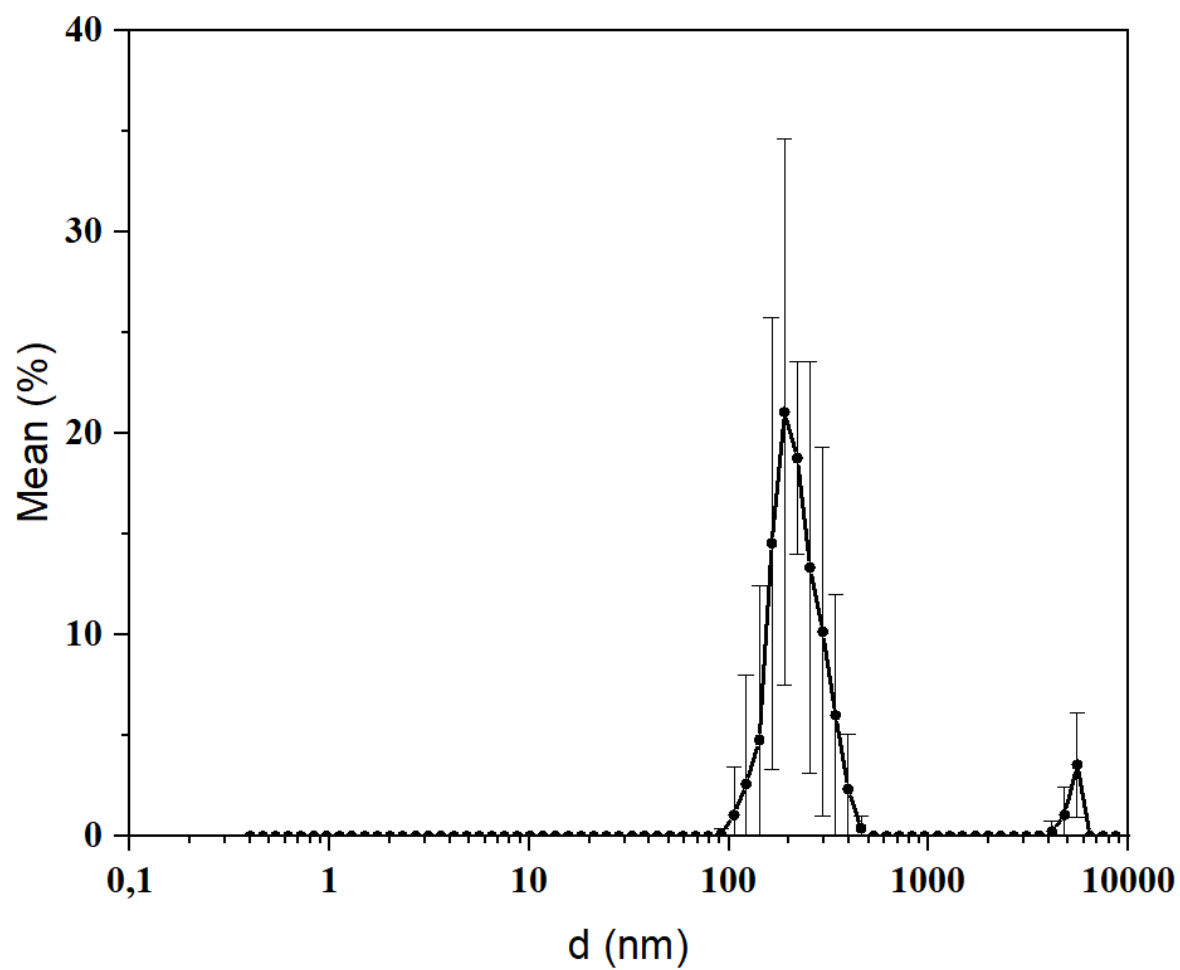
Рисунок 51 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,1 нМ

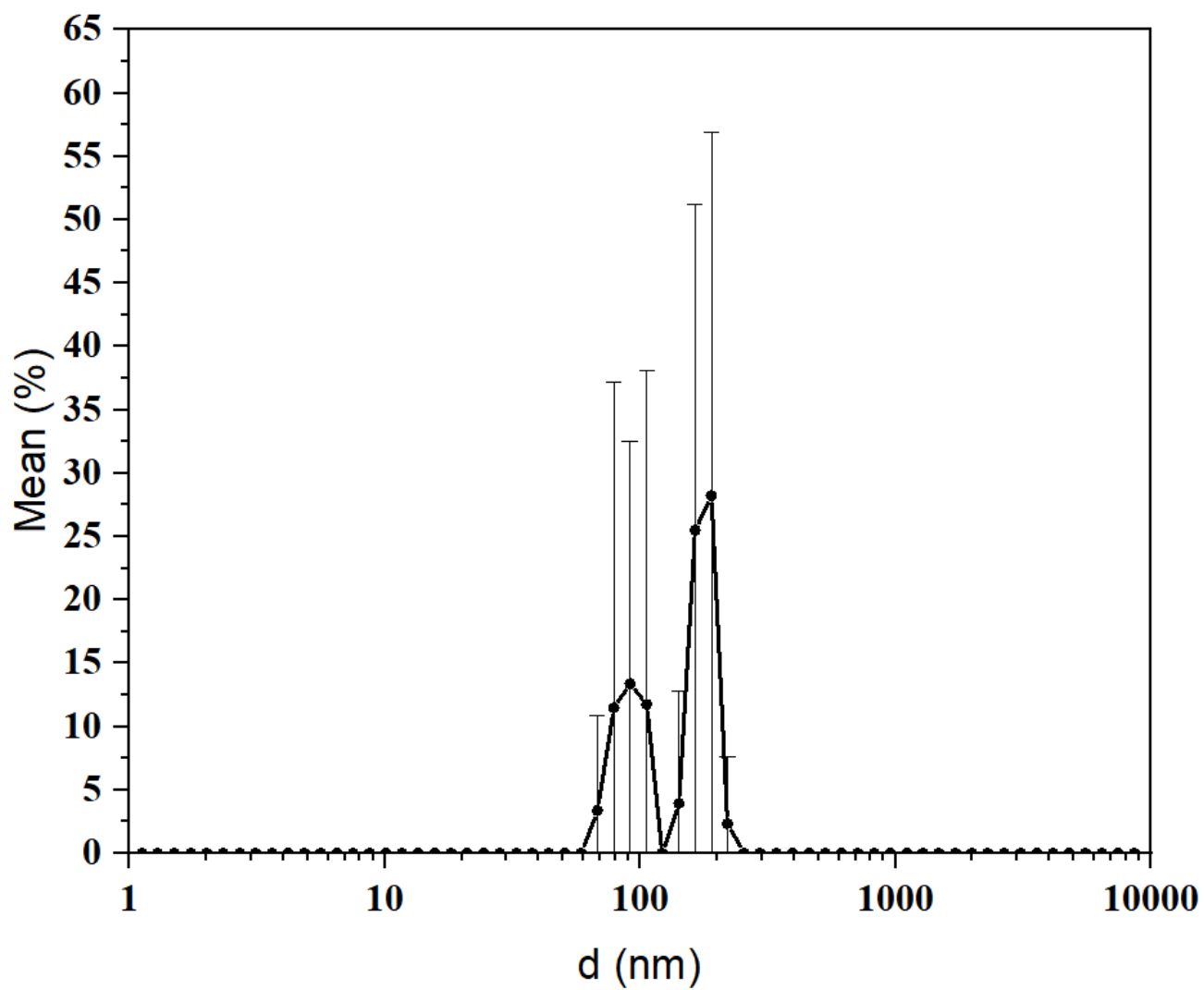
Рисунок 52 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



KN9

0,01 нМ

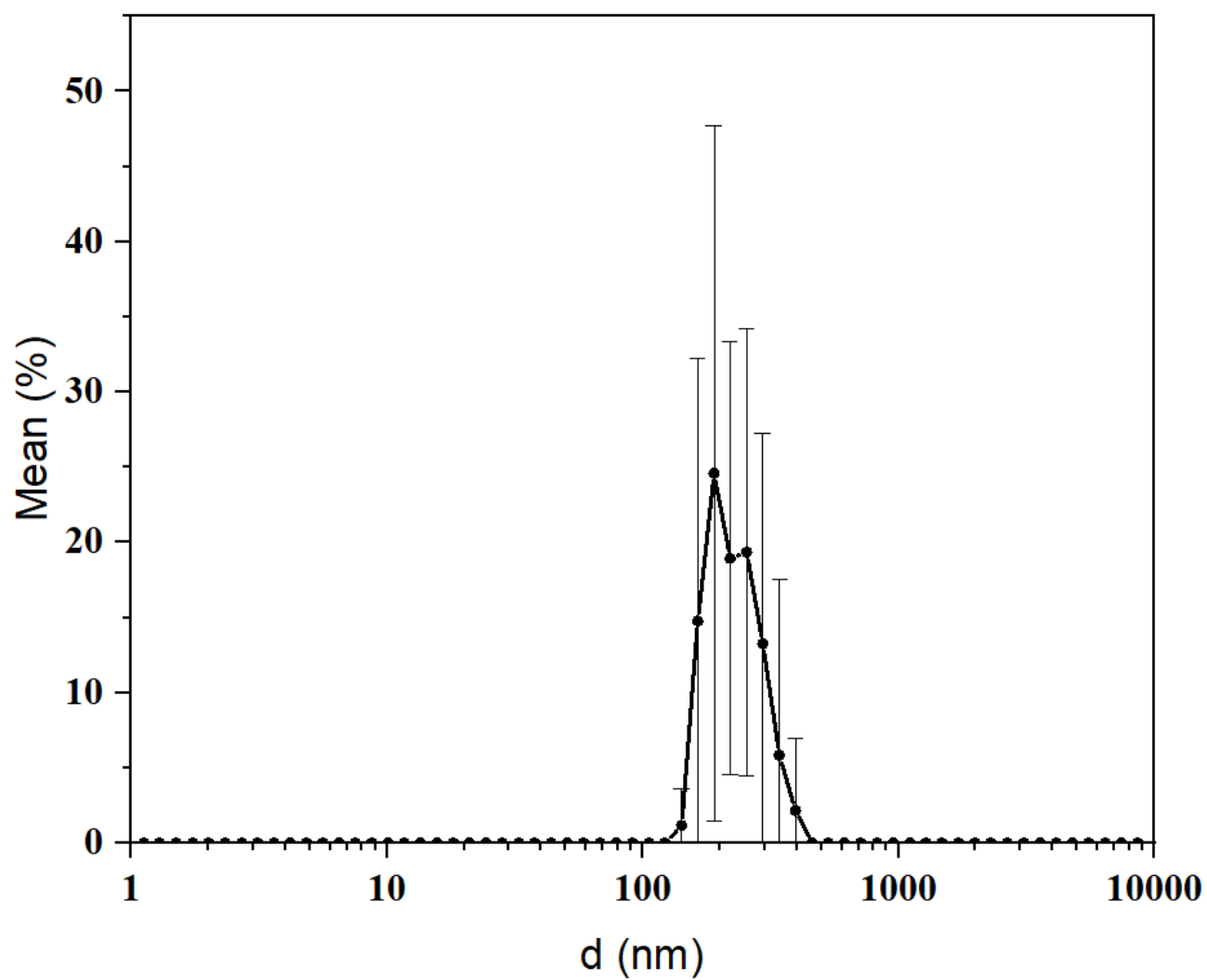
Рисунок 53 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

1 μ M

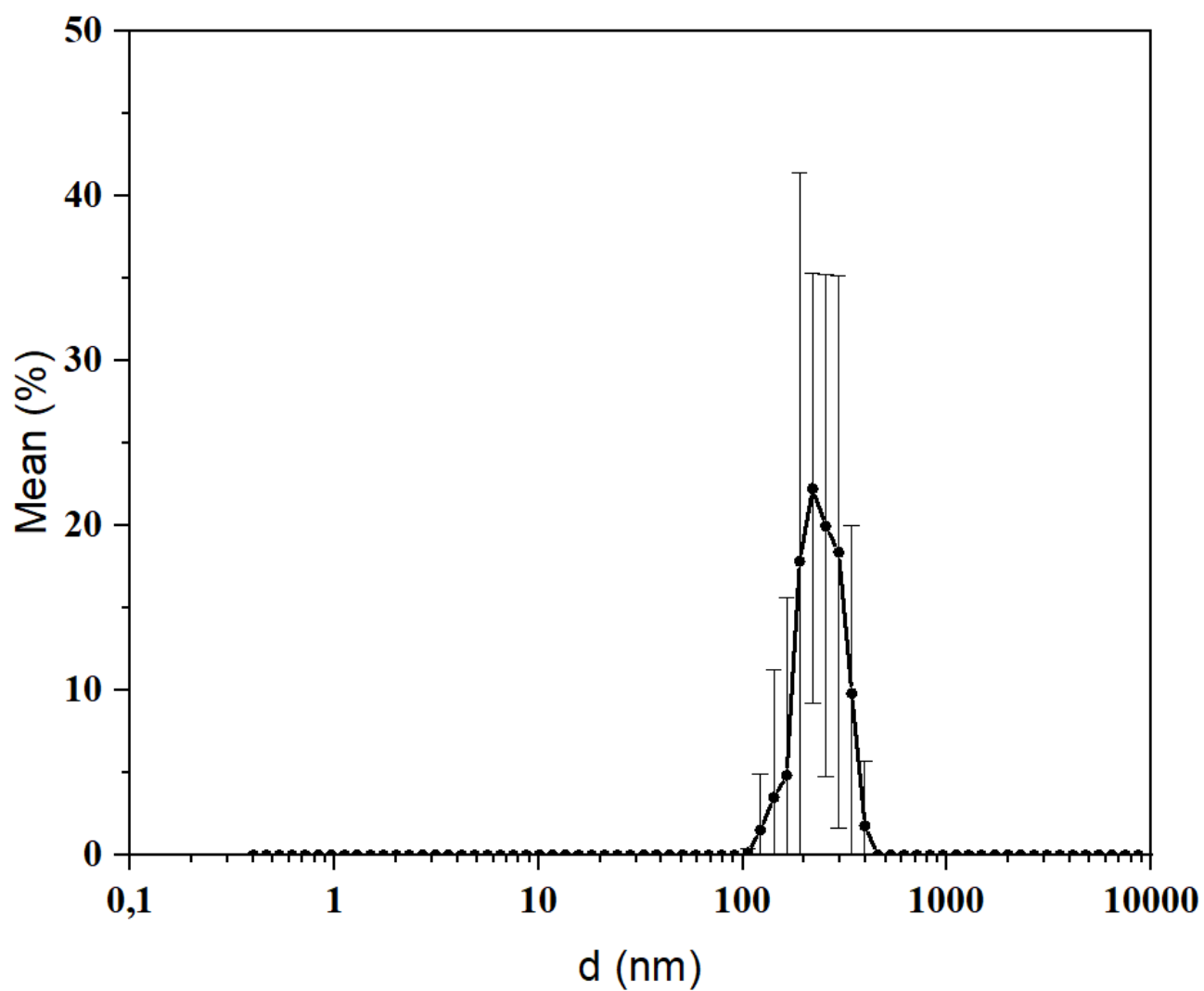
Рисунок 54 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,1 μM

Рисунок 55 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,01 μM

Рисунок 56 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)

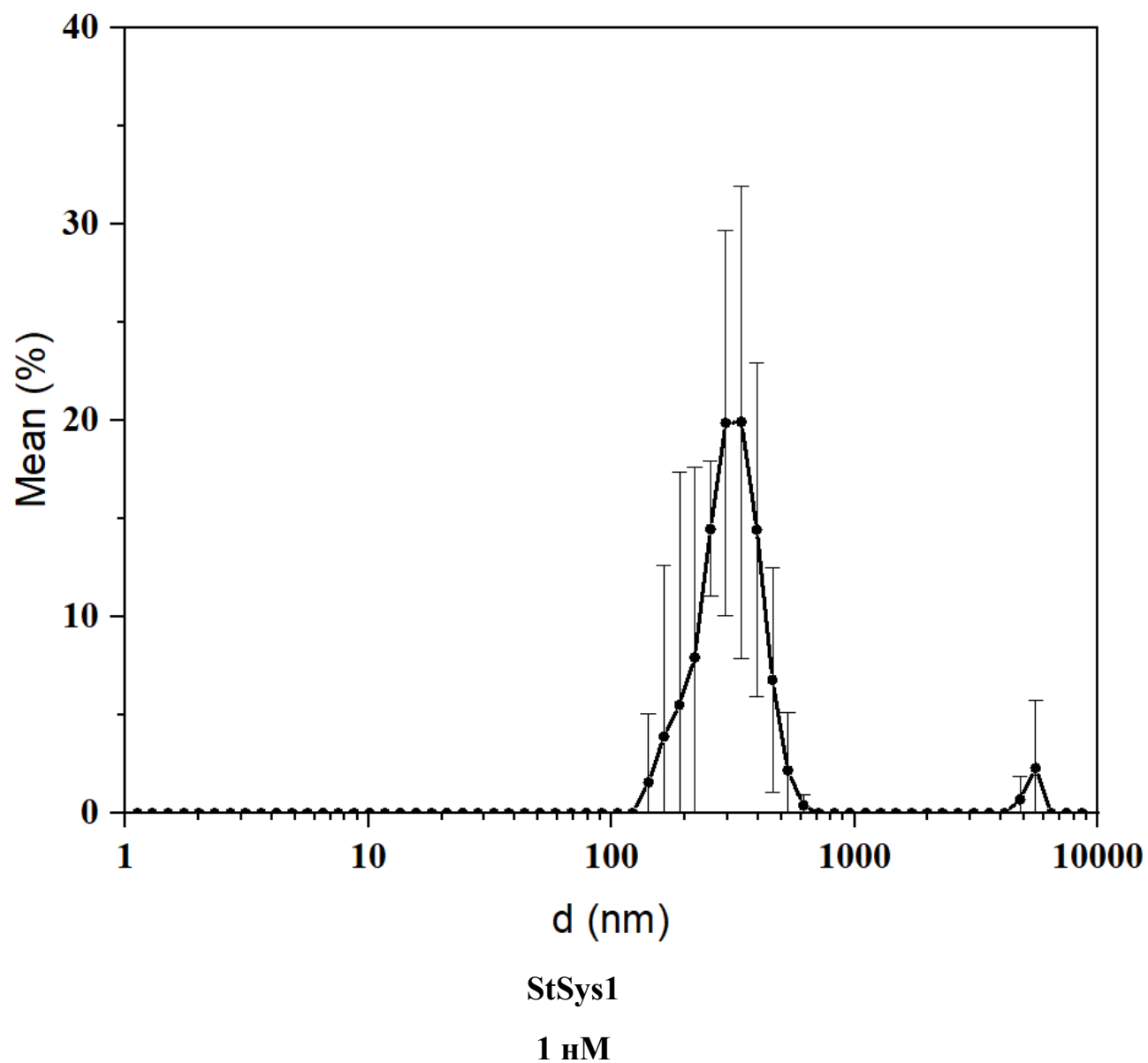
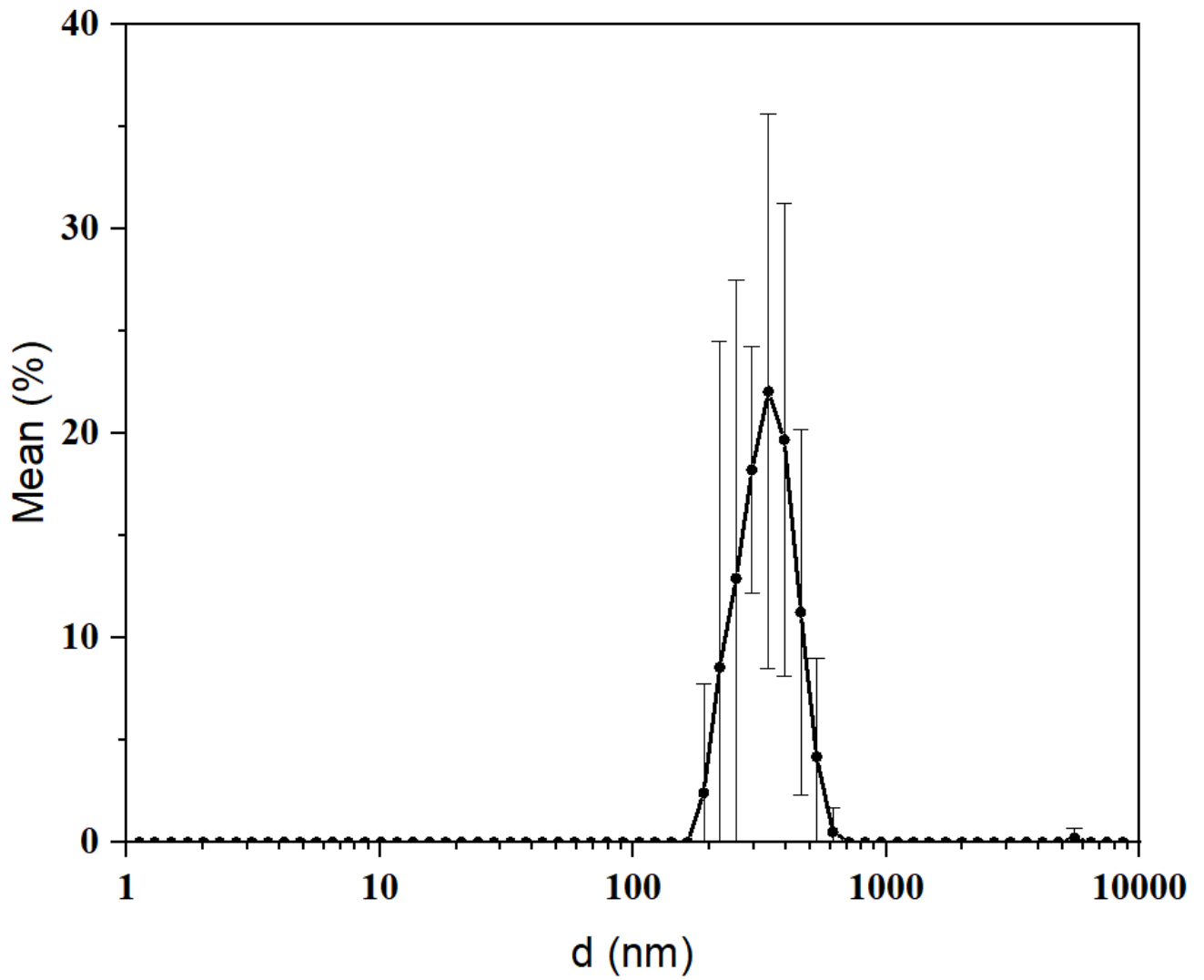


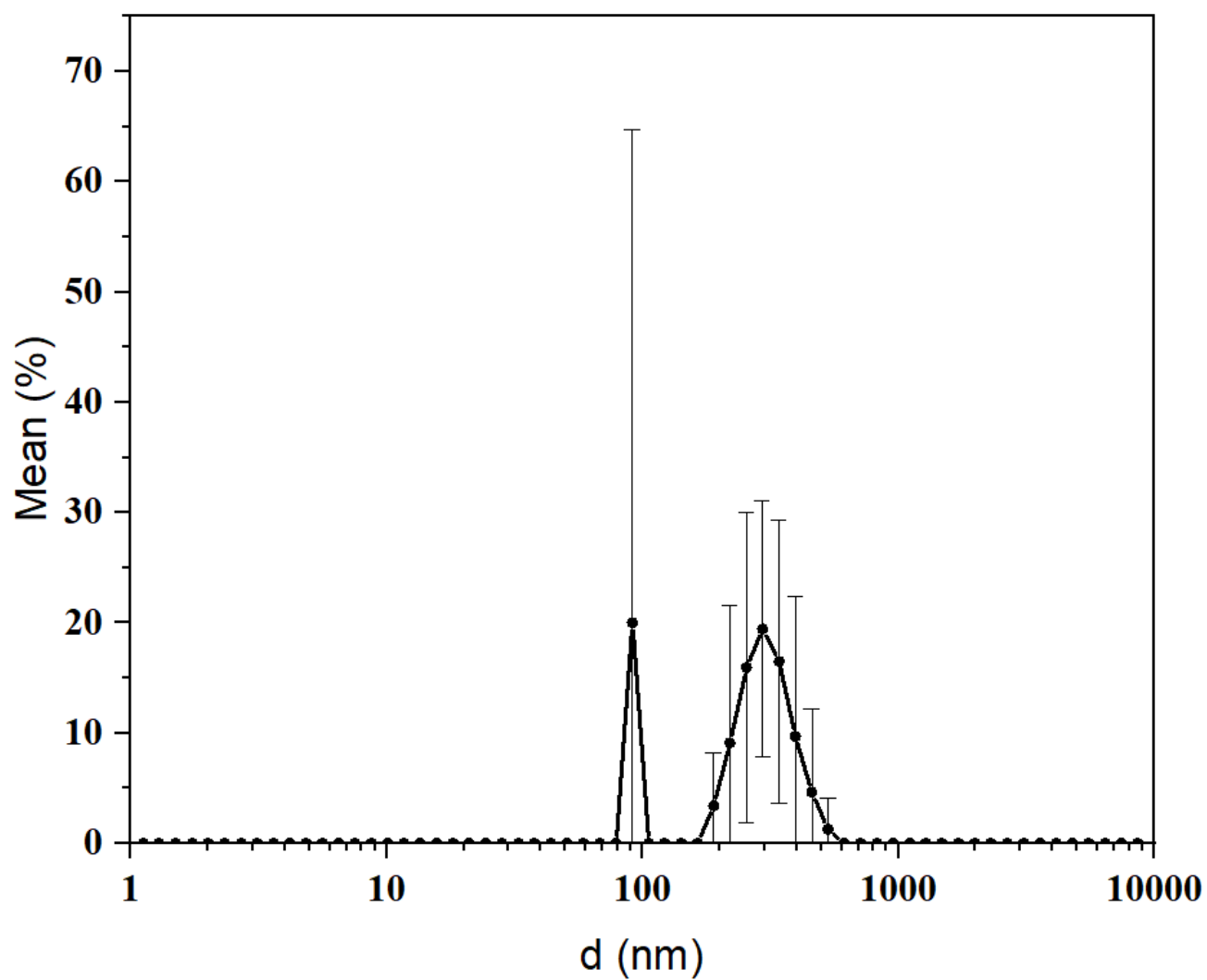
Рисунок 57 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,1 нМ

Рисунок 58 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)



StSys1

0,01 нМ

Рисунок 59 - Размерный спектр пептида растительного происхождения по интенсивности сигнала – Дисперсант: Буфер TNC (Mean $\pm$ SD, n = 45)