ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536
https://elibrary.ru/LVZREP

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Идентификация и предиктивный анализ аминокислотных паттернов, обуславливающих потенциальную антигиперурикемическую активность пептидов

А. В. Смирнова[1,2], С. Л. Тихонов[3,4,*]

[1] *Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия*

[2] *Фонд поддержки проектов Национальной технологической инициативы, Москва, Россия*

[3] *Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия*

[4] *Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия*

Поступила в редакцию: 15.01.2024
Принята после рецензирования: 26.02.2024
Принята к публикации: 05.03.2024

**С. Л. Тихонов: tihonov75@bk.ru, https://orcid.org/0000-0003-4863-9834*
А. В. Смирнова: https://orcid.org/0000-0003-1668-1149

© А. В. Смирнова, С. Л. Тихонов, 2024

Аннотация.
Пептиды являются потенциально перспективными аналогами синтетических лекарственных препаратов для лечения гиперурикемии. Цель исследования – идентифицировать устойчивые аминокислотные паттерны, обуславливающие ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов, предложить на их основе новые антигиперурикемические пептиды с доказанной посредством использования методологии пред иктивной аналитики *in silico* эффективностью. Объектами исследования являлись пептиды, обладающие ингибирующей ксантиноксидазной активностью. В работе применялась авторская программа поиска, идентификации и количественной оценки повторяющихся сочетаний аминокислотных остатков в целевых пептидных последовательностях. Проводили оценку физико-химических и фармакокинетических свойств, ингибирующей ксантиноксидазной активности, общей и целевой биологической активности, а также токсичности идентифицированных пептидов. Количество аминокислот в цепи, изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном pH, молекулярная масса пептидов и индекс гидрофобности были рассчитаны теоретически.
Идентифицированы аминокислотные паттерны, ответственные за процесс ингибирования фермента ксантиноксидазы, сгенерированы новые пептидные последовательности. Идентифицированы 49 нетоксичных пептидов с различной длиной аминокислотной последовательности, обладающих потенциально высокой антимикробной и ингибирующей активностью в отношении целевых мишеней лекарственных препаратов, используемых при гиперурикемии и сахарном диабете 2 типа. Пептиды охарактеризовали как низкомолекулярные соединения гидрофильной (преимущественно) и гидрофобной природы длиной от 4 до 7 аминокислот, содержащие в структуре преимущественно аминокислотные остатки пролина, триптофана и фенилаланина со средней молекулярной массой 723 Да и отрицательным зарядом.
Результаты данного исследования являются важным шагом в понимании молекулярных механизмов ингибирования фермента ксантиноксидазы и открывают новые перспективы для разработки антигиперурикемических пептидных препаратов.

Ключевые слова. Пептиды, гиперурикемия, ингибиторы ксантиноксидазы, аминокислотные паттерны, IC_{50}

Для цитирования: Смирнова А. В., Тихонов С. Л. Идентификация и предиктивный анализ аминокислотных паттернов, обуславливающих потенциальную антигиперурикемическую активность пептидов // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 687–700. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536
https://elibrary.ru/LVZREP

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Amino Acid Patterns that Determine Antihyperuricemic Activity of Peptides: Identification and Predictive Analysis

Anastasia V. Smirnova[1,2], Sergey L. Tikhonov[3,4,*]

[1] *Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia*

[2] *National Technology Initiative Project Support Fund, Moscow, Russia*

[3] *Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia*

[4] *Ural State Forest Engineering University, Yekaterinburg, Russia*

Received: 15.01.2024
Revised: 26.02.2024
Accepted: 05.03.2024

**Sergey L. Tikhonov: tihonov75@bk.ru, https://orcid.org/0000-0003-4863-9834*
Anastasia V. Smirnova: https://orcid.org/0000-0003-1668-1149

© A.V. Smirnova, S.L. Tikhonov, 2024

Abstract.
Peptides offer a promising analogue to synthetic drugs in treating hyperuricemia. This article introduces reliable amino acid patterns that cause the inhibitory xanthine oxidase (CSR) activity of peptides. The research objective was to propose new antihyperuricemic peptides and prove their effectiveness by predictive analytics *in silico*.
The study featured peptides with inhibitory xanthine oxidase activity. The authors developed a protocol for searching, identifying, and quantifying patterns of amino acid residues in target peptide sequences. The identified peptides were tested for physicochemical properties, pharmacokinetic profile, inhibitory xanthine oxidase activity, general and target biological activity, and toxicity.
The research revealed amino acid patterns responsible for inhibiting the xanthine oxidase enzyme, as well as generated new peptide sequences. Forty-nine non-toxic peptides with different lengths of amino acid sequences demonstrated high antimicrobial and inhibitory potential against the targeted drugs used to treat hyperuricemia and type 2 diabetes mellitus. The peptides were low-molecular compounds of predominantly hydrophilic and hydrophobic nature, 4–7 amino acids long. They contained negatively charged amino acid residues of proline, tryptophan, and phenylalanine with an average molecular weight of 723 Da. The study offers an important insight into the molecular mechanisms of xanthine oxidase inhibition and opens up new prospects for developing novel antihyperuricemic peptide drugs.

Keywords. Peptides, hyperuricemia, xanthine oxidase inhibitors, amino acid patterns, IC_{50}

For citation: Smirnova AV, Tikhonov SL. Amino Acid Patterns that Determine Antihyperuricemic Activity of Peptides: Identification and Predictive Analysis. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):687–700. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536

Введение

Гиперурикемия является одним из самых распространенных метаболических нарушений текущего времени (нарушений обмена пуриновых оснований) и оказывает значительное влияние на качество жизни современного человека. Согласно статистическим данным, в Российской Федерации распространенность гиперурикемии достигает 16,8 %, в том числе 25,3 % – среди мужчин и 11,3 % – среди женщин [1]. Риск развития гиперурикемии увеличивается у мужчин после 30 лет, а у женщин – после 50. Возраст является одним из факторов риска для развития гиперурикемии, однако заболевание может возникнуть и у молодых людей, включая детей и подростков [2].

Гиперурикемию можно охарактеризовать как метаболическое состояние, при котором избыточно вырабатывается мочевая кислота или происходит дисфункциональная экскреция в сыворотку крови. Избыточная выработка мочевой кислоты может происходить из-за повышенного образования пуриновых оснований или из-за нарушений в процессе их метаболизма. Некоторые продукты питания содержат большое количество пуриновых оснований, что может привести к увеличению образования мочевой кислоты в плазме крови вследствие их избыточного потребления. Другая причина гиперурикемии – дисфункциональная экскреция мочевой кислоты в кровь. Почки отделяют и выводят ее из плазмы естественным путем (через физиологические жидкости), но при некоторых заболеваниях или нарушениях функции почек экскреция мочевой кислоты может быть нарушена, что приводит к ее накоплению в крови [3]. Концентрацию мочевой кислоты в сыворотке крови можно регулировать, либо ингибируя ее синтез, либо облегчая ее выведение [4].

Гиперурикемия может быть связана с различными атипичными физиологическими состояниями и забо-

леваниями, такими как подагра, хроническая почечная недостаточность, метаболический синдром, атеросклероз, инсулинорезистентность и др. [3].

В терапевтические стратегии лечения подагры включено снижение уровня мочевой кислоты и предотвращение ассоциированных с гиперурикемией осложнений, т. е. изменение рациона питания, употребление большего количества жидкости, а также применение лекарственных препаратов, которые уменьшают образование мочевой кислоты или способствуют ее выведению из организма. Ингибирование синтеза мочевой кислоты может быть достигнуто с помощью лекарственных препаратов, которые замедляют процесс е образования. Некоторые из таких препаратов воздействуют на ферменты, участвующие в синтезе мочевой кислоты, ингибируют их активность и тем самым снижают уровень ее содержания в плазме. Существуют лекарственные препараты-урикозурики, повышающие экскрецию мочевой кислоты почками и тем самым снижающие ее уровень в плазме. В настоящее время 3 категории лекарственных препаратов применяются при лечении гиперурикемии: 1) лекарственные препараты-ингибиторы ксантиноксидазы (аллопуринол, фебуксостат и топироксостат); 2) лекарственные препараты, способствующие выведению уратов (пробенецид, RDEA594); 3) лекарственные препараты-катализаторы превращения мочевой кислоты в аллантоин (пеглотиказа) [5–8]. Ингибирование активности ферментной системы ксантиноксидазы было признано основной стратегией снижения уровня мочевой кислоты и окислительного стресса при гиперурикемии [6]. Недавние исследования показали, что ингибиторы ксантиноксидазы играют существенную роль в лечении гиперурикемии, т. к. ксантиноксидаза катализирует превращение гипоксантина в ксантин, а затем превращает её в мочевую кислоту с одновременным синтезом супероксиданионов (O_2^-), перекиси водорода (H_2O_2) и активных форм кислорода в каталитическом процессе [9]. Ксантиноксидаза считается эффективной мишенью для снижения концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови. Некоторые препараты, ингибирующие ксантиноксидазу, такие как аллопуринол, фебуксостат и топироксостат, эффективны в ингибировании синтеза мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина и в снижении концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови [5–7]. Существуют очевидные побочные эффекты, связанные с длительным применением этих ингибиторов, в связи с чем приобретает особое значение поиск альтернативных наиболее безопасных (с минимальными побочными эффектами) ингибиторов ксантиноксидазы [9].

Недавние исследования доказали, что флавоноиды, фенольные кислоты, терпены, алкалоиды и другие соединения способствуют снижению уровня мочевой кислоты, но стоимость извлечения природных активных веществ чрезвычайно высока, что ограничивает их промышленное применение. Биологически активные пептиды, снижающие уровень мочевой кислоты, обладают такими характеристиками, как высокая эффективность, безопасность, легкая абсорбция, стабильность и специфичность, которые привлекли внимание исследователей в последние годы. Было обнаружено, что некоторые биологически активные пептиды не только обладают ингибирующей ксантиноксидазной активностью *in vitro*, но и обладают активностью, снижающей уровень мочевой кислоты *in vivo* [9].

Выделение биологически активных пептидов из натуральных источников микробиологического, растительного и животного происхождения стало одной из альтернатив использования лекарственных веществ ингибиторов ксантиноксидазы в последние годы. На сегодняшний день известны антигиперурикемические пептиды, извлеченные из: 1) белков животного происхождения: молочных белков (казеина, сывороточных протеинов альбумина и глобулина, лактоферрина), белков яйца (овальбумина, овотрансферрина и др.), белков мышечной ткани (миозина, актина, миоглобина и др.), а также белков побочных продуктов переработки животных и морепродуктов (коллагена, гемоглобина и др.); 2) белков растительного происхождения: белков тканей растений и грибов [8, 10–16, 7–18]. Ферментолизаты микробной биомассы являются потенциальными источниками биопептидов, использующихся в технологиях пищевых функциональных ингредиентов [38]. Пептиды вступают в реакцию с другими активными веществами с образованием биологически активных комплексов, которые могут быть использованы в составе функциональных продуктов питания [39].

Количество биологически активных пептидов с ингибирующей ксантиноксидазной активностью *in vitro* и снижающих уровень мочевой кислоты *in vivo*, используемых в качестве лекарственных препаратов незначительно. Получение и использование нативных биологически активных пептидов имеют и недостатки: не всегда представляется возможным выделить аналогичные биологически активные пептиды, т. к. натуральное сырье отличается различным химическим составом, процесс гидролиза белка-предшественника пептидов зависит от многих факторов и др. Поэтому, в качестве лекарственных препаратов используют синтезированные биологически активные пептиды. Выявление аминокислотных последовательностей в нативных пептидах, ингибирующих ксантиноксидазную активность *in vitro* и снижающих уровень мочевой кислоты, позволяет создать на их основе новые эффективные биологически активные пептиды с вышеуказанной биологической активностью.

Цель исследования – идентифицировать устойчивые аминокислотные паттерны, обуславливающие ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов, предложить на их основе новые антигиперурикемические пептиды с доказанной посредством использования методологии предиктивной аналитики *in silico* эффективностью.

Объекты и методы исследования

Разработка программы поиска, идентификации и количественной оценки совпадающих аминокислотных сочетаний (паттернов), характеризующих антигиперурикемическую активность пептидов. Авторы данного исследования разработали программу поиска, идентификации и количественной оценки повторяющихся сочетаний аминокислотных остатков в целевых пептидных последовательностях. Для написания программы использовали язык программирования Python. Разработанная программа позволяет выявлять паттерны длиной от 2 и более символов (аминокислот) в цепи среди заданного набора аминокислотных последовательностей (цепочек), что является ключевым при исследовании биологически значимых доменов и их функций в разнообразных белках и пептидах.

Вследствие обзора иностранных источников научной литературы был сформирован массив данных, содержащих набор известных (ранее выявленных) пептидов, которые проявили себя как ингибиторы ксантиноксидазы. В качестве входных данных использовали массив, состоящий из 90 уникальных аминокислотных последовательностей, представленных в формате однобуквенного кода.

После ввода в программную среду Python массива данных выполнялось внесение пептидных последовательностей в словарь программы. Для проверки уникальности данных элементов массива выполняли поиск дубликатов и их удаление, после чего уникальные элементы массива выводили в виде табличных данных. В цикле программы методом перебора выполняли попарное сравнение уникальных последовательностей по заданному критерию (наличие в последовательности совпадающих сочетаний 2 и более символов). Для определения максимально совпадающих сочетаний символов использовали метод поиска подстрок, при нахождении ранее выявленного совпадения символов в массиве происходил пересчет и вывод в табличном виде количества идентифицированных повторений.

Посредством алгоритма программы с применением комбинаторики были сгенерированы комбинации символьных сочетаний (сочетаний аминокислот, встречающихся 5 и более раз в антигиперурикемических пептидах), выявленных посредством биоинформатического анализа. Комбинации символьных сочетаний представляли собой новые аминокислотные последовательности, обладающие потенциальной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы. Комбинации генерировались в лексикографическом порядке, алгоритм работал с порядковыми индексами элементов множества. Множество состояло из 16 элементов – ранее выявленных сочетаний аминокислот, наиболее часто встречающихся в известных антигиперурикемических пептидах. Комбинации генерировались по критерию длины (размера), целевые длины комбинаций – от 2 до 3.

Оценка физико-химических свойств пептидов. Количество аминокислот в цепи, изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном pH и молекулярная масса пептидов были теоретически рассчитаны посредством мощностей онлайн-предиктора [40].

Индекс гидрофобности (IG_fob) пептидов рассчитывали по шкале относительной гидрофобности аминокислотных остатков J. Kyte и R. E. Doolittle [41]. При IG_fob > 0 пептид считался гидрофобным, при IG_fob < 0 – гидрофильным.

Оценка ингибирующей ксантиноксидазной активности пептидов. В качестве количественного индикатора ингибирующей активности пептидов использовали концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}), при которой действие ингибитора достигает 50 % ингибирования целевой функции.

Посредством алгоритма программы, созданной N. Kumar с соавторами [43], для новых пептидных последовательностей, идентифицированных посредством алгоритма, рассчитаны pIC_{50}, а далее с помощью формулы 1 для всех исследуемых последовательностей рассчитаны IC_{50}.

$$IC_{50} = \text{antilog} \times (pIC_{50}) \quad (1)$$

где IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования, pIC_{50} – логарифмическое преобразование IC_{50} с обратным знаком.

Для перевода pIC_{50} в IC_{50} использовали программу, разработанную A. Thakur и V. Mehta [44].

Оценка общей и целевой биологической активности пептидов. Оценка токсичности пептидов. Биологическую активность пептидов оценивали посредством использования инструмента Peptide Ranker. Для оценки токсичности, антиоксидантной активности, ингибирующей дипептидилпептидазу-4 активности, антимикробной активности (антибактериальной, противовирусной, противогрибковой), активности, определяющей кворум, использовали универсальную архитектуру глубокого обучения для прогнозирования биоактивных пептидов UniDL4BioPep [44].

Оценка фармакокинетических свойств пептидов. Вследствие перевода последовательностей аминокислот из однобуквенного кода в формат SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) по методологии A. Daina и др. [45] была рассчитана ингибирующая активность пептидов в отношении изоферментов цитохрома P450, которые играли важную роль в метаболизме многих лекарственных препаратов и других веществ в организме человека (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). Определили, являются ли пептиды субстратом P-гликопротеина (P-gp).

Результаты и их обсуждение

Исследование влияния структуры и физико-химических свойств известных пептидов на ингибирующую ксантиноксидазную активность. Вследствие

анализа источников научной литературы выявили 90 биологически активных пептидов, обладающих ингибирующей ксантиноксидазной активностью. Выявленные пептиды вошли в массив данных, в пределах которого для каждого из пептидов были оценены количество и состав аминокислот в цепи, а также основные физико-химические свойства – изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном pH и молекулярная масса, индекс гидрофобности.

Среди массива было обнаружено 25 тетрапептидов, 13 гексапептидов, 12 три- и пентапептидов, 8 дипептидов, 7 декапептидов, 3 гепта- и нонапептида, 2 окта- и ундекапептида и 1 додека-, тридека- и тетрадекапептида. Среди анализируемых пептидов наиболее часто встречались последовательности с 6, 5, 4 и 3 аминокислотными остатками в цепи. Самый длинный биологически активный пептид из выборки состоял из 14 аминокислотных остатков, самый короткий – из 2 аминокислотных остатков. Средняя длина анализируемых биологически активных пептидов составила 5 аминокислотных остатков.

Доказано, что аминокислотная последовательность пептида определяет то, какой тип биологической активности будет проявлять молекула, вследствие чего в данном исследовании массив данных был проанализирован с точки зрения структуры аминокислотной последовательности [10, 44, 45].

Встречаемость (частота появления) аминокислот в пептидных массивах была следующая: серин – 111, пролин – 60, триптофан – 47, фенилаланин – 44, аланин – 29, глицин – 29, лейцин – 28, изолейцин – 27, валин – 27, тирозин – 24, аргинин – 23, глутаминовая кислота – 21, аспарагиновая кислота – 17, лизин – 17, аспарагин – 16, треонин – 14, гистидин – 12, метионин – 10, глутамин – 10 и цистеин – 9.

Серин, пролин, триптофан, фенилаланин, аланин, глицин показали наиболее высокую встречаемость в выборке. Лейцин, изолейцин, валин, тирозин, аргинин и глутаминовая кислота демонстрировали среднюю встречаемость в массиве. Низкая встречаемость была характерна для аспарагиновой кислоты, лизина, аспарагина, треонина, гистидина, метионина, глутамина и цистеина.

Большинство идентифицированных на сегодняшний день антигиперурикемических пептидов содержали тирозин, фенилаланин, пролин, изолейцин и лейцин с вкраплениями полярных остатков лизина, аргинина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, что характеризует эти молекулы как превосходные антиоксиданты в системе [11].

Результаты исследований A. B. Nongonierma и др. показали, что ингибирующую ксантиноксидазную активность проявляли только триптофансодержащие пептиды, а другие аминокислоты, находящиеся в аминокислотной последовательности, не усиливали ингибирующую активность триптофана и сами не обладали свойствами ингибитора ксантиноксидазы [47].

Массив данных был представлен 48 гидрофобными и 42 гидрофильными пептидами. Кислотные остатки содержали только 3 пептида из выборки, основные остатки присутствовали у 13 пептидов, а нейтральные – у 31 пептида, что согласуется с данными о том, что пептиды гидрофобной природы с алифатическими и ароматическими цепями оказывают значительное влияние на молекулярные взаимодействия, обеспечивающее требуемую активность против ксантиноксидазы, и что нейтральные или слабощелочные пептиды, а не кислые пептиды, с большей вероятностью выступают ее ингибиторами [47, 48].

Пептиды, содержащие остаток триптофана, обладали относительно высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью, а расположение аминокислотного остатка оказывало определенное влияние на ингибирующую активность пептида. Увеличение количества остатков триптофана может эффективно улучшать ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов [48]. Введение триптофана в среднее положение пептида может усилить его активность как ингибитора. При условии умеренной длины последовательности пептиды, содержащие больше остатков триптофана, могут лучше встраиваться в активный карман ксантиноксидазы и связываться с критическими остатками, и таким образом демонстрируют более высокую ингибирующую активность [32]. M. Hou с соавторами продемонстрировали, что пептиды с остатком триптофана на С-конце ингибируют ксантиноксидазой [26]. Триптофан-содержащие пептиды обладают значительной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы, среди всех аминокислот триптофан – единственная аминокислота, которая образуется из индола. Индольное кольцо обладает значительными гидрофобными свойствами, что облегчает взаимодействия «белок-белок», «белок-пептид» или «белок-биомолекула» посредством гидрофобных эффектов, π–π укладки и сил Ван-дер-Ваальса и позволяет выступать в качестве донора водородных связей при связывании и распознавании белка [49]. Ингибирующие свойства триптофана объясняются его сходством с лекарственными ингибиторами ксантиноксидазы, которые имеют ксантиноподобные структуры: триптофан с индольной группой имеют сходную с препаратом аллопуринол кольцевую структуру C6 и C5, при этом тирозин и фенилаланин не ингибируют ксантиноксидазы, предположительно, из-за того, что они не обладают ксантиноподобными структурными особенностями [26].

Остатки аминокислот Glu802, Glu1261 и Arg880 в молибденовом центре полости фермента ксантиноксидазы играют ключевую роль в катализе окисления ксантина, тогда как некоторые остатки на входе в полость (Leu648, Phe649, Phe914, Phe1009, Val1011, Phe1013 и Leu1014) модулируют окисление ксантина, проникновение в центр небольших молекул, включая субстраты или ингибиторы. [15].

Авторы H. E. Weiwei и S. U. Guowan установили, что домен молибдена ксантиноксидазы состоит из Phe649, Asn768, Glu802, Leu873, Arg880 и Phe914, Phe1009, Thr1010, Leu1014 и Glu1261, среди которых Glu802, Leu873, Arg880 и Pro1076 играли ключевую роль в ингибирующей реакции [50]. Обнаружили, что аминокислоты Glu802, Leu873, Arg880 и Pro1076 образуют активный сайт ксантиноксидазы, и ингибирующие фермент пептиды, вероятно, взаимодействуют с ними.

В ходе ряда исследований было доказано, что остатки Glu802, Phe1009 и Arg880 могут играть ключевую роль в каталитической реакции ксантиноксидазы; ключевыми межмолекулярными силами, ингибирующими ее активность, могут быть особые типы водородных связей, включая взаимодействия углеродводородных связей и взаимодействия зарядов притяжения. Каталитические ингибиторы обычно связываются с активным центром молибден-молибдоптерина, образуя множественные взаимодействия с его ключевыми аминокислотными остатками, участвующими в катализе, полностью перекрывается (блокируется) канал, ведущий к центру молибдена и окружающему его пространству, что препятствует связыванию ксантина [15].

Согласно результатам, полученным Q. Li, C. Shi и др. известно, что аминокислотные остатки Arg880 и Glu802 в ксантиноксидазе, образуют с пептидами гидрофобные связи, а Leu873 и Pro1076 соединяются с пептидами благодаря силам Ван-дер-Ваальса [51]. Однако один и тот же аминокислотный остаток не всегда приводит к одинаковому взаимодействию. Например, аминокислотный остаток Glu802 в ксантиноксидазе образовывал с пептидами AM и AL как водородную связь, так и гидрофобное взаимодействие, при этом с пептидами PM и GL он образовывал только гидрофобное взаимодействие.

Известны результаты исследований, которые свидетельствуют о том, что биологически активные пептиды, содержащие фенилаланин, обладали более сильной ингибирующей активностью, чем биологически активные пептиды, содержащие триптофан, что связано со строением ксантиноксидазы. Активный центр фермента ксантиноксидазы состоит из гидрофобного мешка, следовательно, пептиды, содержащие больше гидрофобных аминокислот, могут легко попадать в гидрофобную зону активного центра ксантиноксидазы [47].

H. E. Weiwei с соавторами доказали, что щелочные аминокислоты играют ключевую роль в ингибирующей активности дипептидов, содержащих фенилаланин и щелочные аминокислоты, и обладают сильной ингибирующей ксантиноксидазной активностью [48]. Биологически активные пептиды-ингибиторы ксантиноксидазы содержали по меньшей мере один конец ароматической аминокислоты. Известно, что N-концевое положение остатков ароматических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина, гистидина – обеспечивало высокую активность полипептидов, ингибирующих ксантиноксидазы [52].

В исследованиях Y. Xu, H. Gong и др. выявлено, что все ингибирующие ксантиноксидазные пептиды имели гидрофобные или ароматические аминокислоты на C- или N-конце [53]. Ингибирование ксантиноксидазы обусловлено взаимодействием различных аминокислотных остатков или химических групп, которые могут вступать в контакт с активным центром фермента, что подтверждено X.-N. Huang и др. [54], которые выявили, что полученные из природных белков биологически активные пептиды ингибиторы-ксантиноксидазы содержали ароматические аминокислоты и аминокислоты с разветвленной цепью.

Ксантиноксидаза генерировала активную форму кислорода путем использования молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [55]. Фенольные и индольные группы выступали донорами водорода, аминокислоты, содержащей ароматические остатки, проявляли значительное антиоксидантное действие. Ароматические аминокислоты с заряженными остатками взаимодействовали с ионами металлов и ограничивали окислительную активность. Активность пептидов усиливалась за счет снижения уровня активных форм кислорода. Пептиды с остатками тирозина и (или) гистидина, пролина и (или) фенилаланина обладали высокой антиоксидантной активностью [56, 57].

Функциональные группы – гидроксильные группы тирозина или серина, амидная группа аспарагина или глутамина или тиоловая группа цистеина, могли образовывать водородные связи или другие типы химических взаимодействий с активным центром ксантиноксидазы. Аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, такие как валин, изолейцин или фенилаланин, могли вступать в гидрофобные взаимодействия с соответствующими участками активного центра ксантиноксидазы, например изменяя его пространственную структуру и тем самым ограничивая его активность [8, 26, 56]. Гидрофобный карман, образованный аминокислотными остатками Leu873, Phe914 и Phe1009 и выстланный Glu802, Leu873, Arg880, Phe914, Phe1009 и Glu1261, вблизи активного центра ксантиноксидазы действует как критический структурный домен, доступный для пептидов с большим количеством гидрофобных пептидов [26].

Средняя молекулярная масса пептидов массива составила 683,5 Да, что подтверждает тезис о том, что низкая молекулярная масса пептидов (до 1000 Да) может обуславливать их ингибирующую активность в отношении ксантиноксидазы. Это связано с наибольшей активностью низкомолекулярных пептидов в реакциях с участками-мишенями ксантиноксидазы, по сравнению с высокомолекулярными пептидами [10]. Молекулярная масса зарегистрированных пептидов, ингибирующих ксантиноксидазу, в настоящее время составляет < 1 кДа, большинство из них находится в диапазоне молекулярных масс от 400 до 800 Да [12].

Пептиды с низкой молекулярной массой, гидрофобные, содержащие ароматические аминокислотные остатки, нейтральные или слабощелочные потенциально обладают высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью.

Идентификация и анализ *in silico* новых пептидов антигиперурикемического профиля. Вследствие использования разработанной авторами статьи программы, написанной на языке Python, выявили 194 символьных сочетания (сочетания аминокислот), после чего методом пузырька словарь с данными отсортировали по частоте повторяющихся сочетаний символов (от 5 и более повторений). Были получены 16 символьных сочетаний (сочетаний аминокислот), выведенных в заданном диапазоне длин (от 2 символов в цепи) с указанием количества повторений. В массиве: каждое из 8 сочетаний аминокислот AG, IW, PE, PG, SF, VY, WP, VYP встречалось 5 раз; каждое из 4 сочетаний аминокислот GP, PI, PW, PFP – 6 раз; сочетание аминокислот YP – 7 раз; каждое из 2 сочетаний аминокислот PF и PP – 8 раз; сочетание аминокислот FP – 13 раз. Изучение выходных данных позволило выявить и другие совпадающие сочетания аминокислот различной длины. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего исследования структурных особенностей и связанных с ними функциональных свойств пептидных последовательностей, в том числе в отношении молекулярных мишеней, таких как ксантиноксидаза.

Вследствие применения комбинаторики на основе имеющихся 16 символьных сочетаний созданы их случайные комбинации с длиной последовательности от 5 до 7 символов. Комбинации символьных сочетаний представляли собой новые аминокислотные последовательности, обладающие потенциальной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы. Комбинации генерировали в лексикографическом порядке, алгоритм работал с порядковыми индексами элементов множества. Множество состояло из 16 элементов (ранее выявленных сочетаний аминокислот, наиболее часто встречающихся в антигиперурикемических пептидах): PG, SF, VY, VYP, WP, GP, PFP, PI, PW, YP, PF, PP, FP. Комбинации генерировали по критерию длины (размера) комбинации (целевые длины от 2 до 3). В результате получены 182 тетра-, 56 пента-, 2186 гекса-, 7644 гептапептида, которые были посредством использования методов *in silico* аналитически проверены на предмет их эффективности как ингибиторов ксантиноксидазы.

Первично каждая из групп пептидов была проверена посредством использования расчетных методов *in silico* с точки зрения потенциальной биологической активности. Вследствие проверки отобраны биологически активные пептиды, вероятность биологической активности которых была от 0,95 до 1 (при *max* = 1).

Далее биологически активные пептиды последовательно проверены на антиоксидантную активность, токсичность, антимикробную активность (антивирусную, антибактериальную, антигрибковую), активность кворума, ингибирующую активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV), на сродство в отношении изоферментов цитохрома P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) и принадлежность к классу субстратов P-гликопротеина. В таблице 1 представлены результаты анализа функциональных свойств полученных пептидов.

Таблица 1. Функциональные свойства пептидов

Table 1. Functional profile of peptides

Пептид	Длина пептида	Концентрация полумаксимального ингибирования ксантиноксидазы (IC_{50}, мкМ)	Прогнозируемая вероятность биологически активного пептида (ПВБА)	Токсичность	Антиоксидантная активность	Антибактериальная активность	Антивирусная активность	Противогрибковая активность	Ингибирующая активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV)	Активность, ингибирующая микробиологический кворум (QS)	Принадлежность к классу субстратов P-гликопротеина (P-gp)	Принадлежность к классу соединений CYP1A2	Принадлежность к классу соединений CYP2C19	Принадлежность к классу соединений CYP2C9	Принадлежность к классу соединений CYP2D6	Принадлежность к классу соединений CYP3A4
WPSF	4	0,30	0,95	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
SFWPFP	6	0,30	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPPWWD	6	0,46	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPFWD	6	0,46	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
PFPFPWD	7	0,46	0,97	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
GPWP	4	0,48	0,95	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
WPPG	4	0,48	0,95	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
PPPW	4	0,59	0,96	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
PPWP	4	0,59	0,96	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–

Примечание. Данные отсортированы по критерию IC_{50} от наибольшей активности к наименьшей.

Продолжение таблицы 1.

Пептид	Длина пептида	Концентрация полумаксимального ингибирования ксантиноксидазы (IC_{50}, мкМ)	Прогнозируемая вероятность биологически активного пептида (ПВБА)	Токсичность	Антиоксидантная активность	Антибактериальная активность	Антивирусная активность	Противогрибковая активность	Ингибирующая активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV)	Активность, ингибирующая микробиологический кворум (QS)	Принадлежность к классу субстратов P-гликопротеина (P-gp)	Принадлежность к классу соединений CYP1A2	Принадлежность к классу соединений CYP2C19	Принадлежность к классу соединений CYP2C9	Принадлежность к классу соединений CYP2D6	Принадлежность к классу соединений CYP3A4
PGWPPW	6	0,62	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
WPGPFP	6	0,62	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
WPGPPFP	7	0,62	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPGPPW	6	0,62	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
AGWPPW	6	0,68	0,97	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
WPPWPF	6	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPFPPF	7	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPFPFP	7	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPWFP	6	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPFPPW	7	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPFFP	6	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
PWPFFP	6	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
PWPPFP	6	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
WPPFPP	6	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
PWPFP	5	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
WPPFP	5	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
PFPWP	5	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
FPWP	4	0,78	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
PWWP	4	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
PFWP	4	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
PFPW	4	0,78	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
IWWPPW	6	0,93	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
IWPFPFP	7	0,93	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
IWWPFP	6	0,93	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
IWPWPF	6	0,93	0,99	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
IWPFFP	6	0,93	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPPFPYP	7	0,93	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
WPPWYP	6	0,93	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
PWYPFP	6	0,93	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPPIPW	6	0,93	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPPFVW	6	0,93	0,97	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
WPIW	4	0,94	0,97	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
FPIW	4	0,94	0,96	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
IWPFP	5	0,94	0,97	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+
YPPW	4	0,94	0,95	–	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
PPPF	4	1,00	0,96	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
FPPF	4	1,37	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
PFPFP	5	1,37	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
PFPYPFP	7	1,62	0,98	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+
PWIW	4	2,45	0,95	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+

Примечание: S – серин, P – пролин, W – триптофан, F – фенилаланин, A – аланин, G – глицин, L – лейцин, I – изолейцин, V – валин, Y – тирозин, R – аргинин, E – глутаминовая кислота, D – аспарагиновая кислота, K – лизин, N – аспарагин, T – треонин, H – гистидин, M – метионин, Q – глутамин и C – цистеин.

Note: S – serine, P – proline, W – tryptophan, F – phenylalanine, A – alanine, G – glycine, L – leucine, I – isoleucine, V – valine, Y – tyrosine, R – arginine, E – glutamic acid, D – aspartic acid, K – lysine, N – asparagine, T – threonine, H – histidine, M – methionine, Q – glutamine, C – cysteine.

Отбирали обладающие антиоксидантной и антимикробной активностью нетоксичные биологически активные пептиды, способные подавлять межклеточную коммуникацию бактерий («quorum sensing», «чувство кворума», QS) [58]. При лечении гиперурикемии, сопровождающей разного рода заболевания, в том числе и подагру, может быть полезно свойство пептида проявлять антимикробную активность, т. к. на сегодняшний день существуют результаты исследований, подтверждающие влияние дисбиоза кишечной микробиоты на патогенез подагры [59]. Все идентифицированные биологически активные пептиды обладали антимикробной активностью разного спектра, кроме того, они были способны влиять на активность микробиологического кворума, что характеризует полученные пептиды как перспективных кандидатов на роль терапевтических антигиперурикемических пептидов. YPPW – единственный из пептидов, который не обладал противогрибковой активностью. Пептиды PPPW, PPWP, PPPF, YPPW не обладали активностью в отношении микробиологического кворума.

При гиперурикемии развиваются сопутствующие патологические состояния, одним из которых является сахарный диабет 2 типа, поэтому пептиды были проверены на ингибирующую активность DPP IV, которая является основной мишенью при диабете [60]. Все 49 биологически активных пептидов проявляли активность в отношении DPP IV, что расширяет профиль их действия и характеризует в качестве потенциально перспективных кандидатов.

Далее пептиды были проверены на предмет того, какие изоферменты цитохрома P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) их метаболизируют, а также на предмет принадлежности к классу субстратов P-gp. Изоферменты цитохрома P450 играли важную роль в метаболизме различных лекарственных препаратов и иных веществ в организме. Каждый из указанных ферментов обладал своей уникальной специфичностью и отвечал за метаболическую активацию или детоксикацию определенных классов лекарственных препаратов и соединений. CYP3A4 – самый распространенный фермент, ответственный за метаболизм около 50 % всех лекарственных препаратов разного спектра (антибиотики, антигистаминные препараты, противоэпилептические препараты, статины и многие другие) и он являлся наиболее вероятным кандидатом для каталитического метаболизма созданных пептидов. Метаболизм пептидов мог происходить не только через ферменты CYP, но и через другие механизмы (например посредством протеаза и пептидаза).

Ингибиторы P-gp – мембранный белок, выполняющий функцию клеточного транспорта различных веществ. Из выборки 6 тетрапептидов (PPWP, FPWP, PFWP, PFPW, FPIW, FPPF), 1 пентапептид (PFPFP), 15 гексапептидов (SFWPFP, WPPWWD, WPPFWD, WPPWPF, WPPWFP, WPPFFP, PWPFFP, IWWPPW, IWWPFP, IWPWPF, IWPFFP, WPPWYP, PWYPFP, WPPIPW, WPPFVW) и 8 гептапептидов (PFPFPWD, WPGPPFP, WPPFPPF, WPPFPFP, WPPFPPW, IWPFPFP, WPPFPYP, PFPYPFP) оказались субстратами P-gp. Соответственно, указанные пептиды могут быть транспортированы через клеточную мембрану посредством данного мембранного белка. Транспорт через P-gp может влиять на фармакокинетику пептида, его доступность к мишеням в организме и общую эффективность. Знание о том, что пептид является субстратом P-gp, может быть полезно для предотвращения взаимодействия пептида с лекарственными препаратами, которые также могут быть субстратами или ингибиторами P-gp.

75 % предложенных пептидов метаболизируются CYP3A4: 5 гексапептидов (PWWP, PFWP, WPIW, FPIW, PWIW), 4 пентапептида (PWPFP, WPPFP, PFPWP, IWPFP), 21 гексапептид (SFWPFP, WPPWWD, WPPFWD, PGWPPW, WPGPFP, WPGPPW, AGWPPW, WPPWPF, WPPWFP, WPPFFP, PWPFFP, PWPPFP, WPPFPP, IWWPPW, IWWPFP, IWPWPF, IWPFFP, WPPWYP, PWYPFP, WPPIPW, WPPFVW) и 7 гептапептидов (WPGPPFP, WPPFPPF, WPPFPFP, WPPFPPW, IWPFPFP, WPPFPYP, PFPYPFP). CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 не были определены как основные ферменты метаболизма идентифицированных пептидов. В качестве основного изофермента, играющего ключевую роль в метаболизме пептидов, был определен CYP3A4.

Для порядка 50 % полученных пептидных последовательностей были характерны принадлежность к субстратам P-gp и одновременно с этим участие в их метаболическом пути изоферментов CYP2C9 и CYP3A4. Пептиды, которые не относились ни к субстратам P-gp, ни к соединениям, которые метаболизируются одним изоферментом цитохрома P450, не были удалены из выборки в целях дальнейшего изучения их фармакокинетических свойств.

Все предложенные антигиперурикемические пептиды обладали потенциально высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью, что было подтверждено расчетными значениями IC_{50}, вычисленными с применением методов *in silico*.

Наибольшей ингибирующей ксантиноксидазной активностью обладали тетрапептид WPSF и гексапептид SFWPFP, для которых расчетная IC_{50} составила 0,30 мкМ. Гексапептидам WPPWWD и WPPFWD, и гептапептиду PFPFPWD с расчетной IC_{50} 0,46 мкМ, а также тетрапептидам GPWP и WPPG (IC_{50} = 0,48 мкМ) была свойственна высокая активность против ксантиноксидазы.

Расчетная (прогнозная) концентрация полумаксимального ингибирования всех идентифицированных пептидов была ниже 1 мкМ, за исключением тетра-пептидов PPPF, FPPF и PWIW, пентапептида PFPFP и гептапептида PFPYPFP. Самая высокая расчетная (прогнозная) IC_{50} в выборке соответствовала 2,45 мкМ и была характерна для тетрапептида PWIW, что ниже IC_{50} аллопуринола, для которого полумаксимальная

концентрация ингибирования, рассчитанная по той же методологии, равнялась 2,60 мкМ. Пептиды, предлагаемые в качестве потенциальных терапевтических агентов при гиперурикемии, более эффективны, чем синтетические препараты, применяемые при стандартной терапии гиперурикемии. Терапевтический спектр рассматриваемых пептидных препаратов по прогнозу *in silico* существенно выше, чем у любого другого класса препаратов синтетической природы.

С целью описания и идентификации пептидов изучены физико-химические свойства молекул, рассчитана молекулярная масса, изоэлектрическая точка и заряд молекул при нейтральной реакции среды, индекс гидрофобности, определена брутто-формула (табл. 2).

Вследствие анализа индекса гидрофобности выявили, что в выборке преобладали гидрофильные пептиды, при этом гидрофобные пептиды составляли порядком 25 % от всей выборки, что противоречит гипотезе о преимущественно гидрофобной природе антигиперурикемических пептидов [26, 53].

Наиболее часто встречающимися аминокислотными остатками в выборке выступили пролин, триптофан, фенилаланин, которые составили 48, 24, 17 % соответственно. В пептидах встречались и другие аминокислотные остатки с меньшей частотой, в порядке убывания частоты (встречаемости) в выборке: изолейцин, глицин, тирозин, аспарагиновая кислота, серин, валин, аланин. Выявленные в ходе анализа закономерности в части структурных свойств пептидов и их взаимосвязи с активностью против ксантиноксидазы имели пересечения с результатами, полученными авторами иностранных научных статей [8, 26, 51, 55].

Таблица 2. Физико-химические свойства пептидов

Table 2. Physicochemical properties of peptides

Пептид	Длина пептида	Молекулярная масса, Да	Брутто-формула	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH = 7 (Z)	Индекс гидрофобности (I_{G_fob})
WPSF	4	535,6	C28H33N5O6	5,99	–0,004	–0,5
SFWPFP	6	779,89	C42H49N7O8	5,58	–0,007	0,7
WPPWWD	6	885,98	C47H51N9O9	2,98	–1,003	–9,4
WPPFWD	6	846,94	C45H50N8O9	2,98	–1,003	–5,7
PFPFPWD	7	905,02	C48H56N8O10	2,98	–0,999	–3,6
GPWP	4	455,52	C23H29N5O5	5,81	–0,002	–4,5
WPPG	4	455,52	C23H29N5O5	5,87	–0,004	–4,5
PPPW	4	495,58	C26H33N5O5	5,91	0,000	–5,7
PPWP	4	495,58	C26H33N5O5	6,30	0,000	–5,7
PGWPPW	6	738,84	C39H46N8O7	5,91	0,000	–7,0
WPGPFP	6	699,81	C37H45N7O7	5,70	–0,004	–3,3
WPGPPFP	7	796,92	C42H52N8O8	5,70	–0,004	–4,9
WPGPPW	6	738,84	C39H46N8O7	5,31	–0,004	–7,0
AGWPPW	6	712,81	C37H44N8O7	5,42	–0,002	–3,6
WPPWPF	6	828,97	C46H52N8O7	5,99	–0,004	–3,8
WPPFPPF	7	887,05	C49H58N8O8	5,99	–0,004	–1,7
WPPFPFP	7	887,05	C49H58N8O8	5,70	–0,004	–1,7
WPPWFP	6	828,97	C46H52N8O7	5,70	–0,004	–3,8
WPPFPPW	7	926,08	C51H59N9O8	5,31	–0,004	–5,4
WPPFFP	6	789,93	C44H51N7O7	5,70	–0,004	–0,1
PWPFFP	6	789,93	C44H51N7O7	6,30	0,000	–0,1
PWPPFP	6	739,87	C40H49N7O7	6,30	0,000	–4,5
WPPFPP	6	739,87	C40H49N7O7	5,70	–0,004	–4,5
PWPFP	5	642,76	C35H42N6O6	6,30	0,000	–2,9
WPPFP	5	642,76	C35H42N6O6	5,70	–0,004	–2,9
PFPWP	5	642,76	C35H42N6O6	6,30	0,000	–2,9
FPWP	4	545,64	C30H35N5O5	5,62	–0,005	–1,3
PWWP	4	584,68	C32H36N6O5	6,30	0,000	–5,0
PFWP	4	545,64	C30H35N5O5	6,30	0,000	–1,3
PFPW	4	545,64	C30H35N5O5	5,91	0,000	–1,3
IWWPPW	6	884,05	C49H57N9O7	5,49	–0,001	–1,4
IWPFPFP	7	903,09	C50H62N8O8	5,89	–0,001	4,4
IWWPFP	6	845,01	C47H56N8O7	5,89	–0,001	2,3
IWPWPF	6	845,01	C47H56N8O7	6,18	–0,001	2,3

Продолжение таблицы 2.

Пептид	Длина пептида	Молекулярная масса, Да	Брутто-формула	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH = 7 (Z)	Индекс гидрофобности (I_{G_fob})
IWPFFP	6	805,97	C45H55N7O7	5,89	–0,001	6,0
WPPFPYP	7	903,05	C49H58N8O9	5,66	–0,004	–5,8
WPPWYP	6	844,97	C46H52N8O8	5,66	–0,004	–7,9
PWYPFP	6	805,93	C44H51N7O8	5,99	–0,001	–4,2
WPPIPW	6	794,95	C43H54N8O7	5,31	–0,004	–2,1
WPPFVW	6	830,98	C46H54N8O7	5,31	–0,004	2,0
WPIW	4	600,72	C33H40N6O5	5,31	–0,004	1,1
FPIW	4	561,68	C31H39N5O5	5,23	–0,005	4,8
IWPFP	5	658,8	C36H46N6O6	5,89	–0,001	3,2
YPPW	4	561,64	C30H35N5O6	5,15	–0,008	-5,4
PPPF	4	456,54	C24H32N4O5	6,59	0,000	–2,0
FPPF	4	506,60	C28H34N4O5	5,92	–0,005	2,4
PFPFP	5	603,72	C33H41N5O6	6,30	0,000	0,8
PFPYPFP	7	864,01	C47H57N7O9	5,99	–0,001	–2,1
PWIW	4	600,72	C33H40N6O5	5,91	0,000	1,1

Примечание: S – серин, P – пролин, W – триптофан, F – фенилаланин, A – аланин, G – глицин, L – лейцин, I – изолейцин, V – валин, Y – тирозин, R – аргинин, E – глутаминовая кислота, D – аспарагиновая кислота, K – лизин, N – аспарагин, T – треонин, H – гистидин, M – метионин, Q – глутамин, C – цистеин.

Note: S – serine, P – proline, W – tryptophan, F – phenylalanine, A – alanine, G – glycine, L – leucine, I – isoleucine, V – valine, Y – tyrosine, R – arginine, E – glutamic acid, D – aspartic acid, K – lysine, N – asparagine, T – threonine, H – histidine, M – methionine, Q – glutamine, C – cysteine.

В среднем молекулярная масса анализируемых пептидов была на уровне 723 Да, изоэлектрическая точка – на уровне 5,66, заряд при нейтральном pH – на уровне 0,1.

Выводы

Проведенное комплексное исследование позволило идентифицировать аминокислотные паттерны, ответственные за ингибирование фермента ксантиноксидазы посредством созданного авторами статьи программного обеспечения на языке Pyhton. Выявленные паттерны послужили основой для создания новых пептидных последовательностей, которые были подвергнуты анализу на предмет различных спектров биологической активности, токсичности и фармакокинетических свойств.

В результате проведенного исследования авторами были идентифицированы 49 нетоксичных антигиперурикемических пептидов с различной длиной аминокислотной последовательности: 21 гексапептид, 15 тетрапептидов, 8 гептапептидов, 5 пентапептидов. Для предложенных пептидов были определены структурные характеристики и основные физико-химические свойства. Это позволило охарактеризовать их как низкомолекулярныесоединения гидрофильной (преимущественно) и гидрофобной природы длиной от 4 до 7 аминокислот в цепи. Пептиды содержали в структуре преимущественно аминокислотные остатки пролина, триптофана и фенилаланина, в среднем имели молекулярную массу на уровне 723 Да, изоэлектрическую точку на уровне 5,66 и отрицательный заряд при нейтральной реакции среды – на уровне 0,1.

Результаты данного исследования являются важным шагом в понимании молекулярных механизмов ингибирования фермента ксантиноксидазы и открывают перспективы для разработки новых антигиперурикемических пептидных препаратов. Для подтверждения эффективности и безопасности предложенных пептидов должны быть проведены дальнейшие исследования методами *in vitro* и *in vivo*. Необходимо проведение дополнительных исследований в целях анализа молекулярных механизмов ингибирования предложенными пептидами целевого фермента.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследованиях и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The authors are equally responsible for the research and manuscript.

Conflict of interest

The authors reported no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Shalnova SA, Deev AD, Artamonova GV, Duplyakov DV, Efanov AYu, Zhernakova YuV, *et al.* Hyperuricemia and its correlates in the Russian population: ESSE-RF epidemiological study. Rational Pharmacotherapy In Cardiology. 2014;10 (2):153–159. (In Russ.). [Гиперурикемия и ее корреляты в российской популяции (результаты эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ) / С. А. Шальнова [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2014. Т. 10. № 2. С. 153–159.]. https://elibrary.ru/SCOUHN

2. Zhernakova YuV. Hyperuricemia as risk factor for cardiovascular disease – what's new? Medical Alphabet. 2020;(13): 5–11. (In Russ.). https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-13-5-11; https://elibrary.ru/MUQHSO

3. Yeliseyev MS, Yeliseyeva MYe. Modern aspects of pathogenesis and correction of hyperuricemia and associated conditions. Effective Pharmacotherapy. 2019;15(8):32–40. (In Russ). https://doi.org/10.33978/2307-3586-2019-15-8-32-40; https://elibrary.ru/SNGWTM

4. Li Q, Kang X, Shi C, Li Y, Majumder K, Ninga Z. Moderation of hyperuricemia in rats *via* consuming walnut protein hydrolysate diet and identification of new antihyperuricemic peptides. Food and Function. 2018;9(1):107–116. https://doi.org/10.1039/c7fo01174a

5. Lai S-W, Hwang B-F, Kuo Y-H, Liu C-S, Liao K-F. Allopurinol use and the risk of dementia a meta-analysis of case-control studies. Medicine.2022;101(26):e29827. http://doi.org/10.1097/md.0000000000029827

6. van der Pol KH, Koenderink J, van den Heuvel JJMW, van den Broek P, Peters J, van Bunningen IDW, *et al.* Effects of allopurinol and febuxostat on uric acid transport and transporter expression in human umbilical vein endothelial cells. PLoS ONE. 2024;19(6):e0305906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305906

7. Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T. FYX-051: A novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2011;336(1):95–103. https://doi.org/10.1124/jpet.110.174540

8. Li Q, Kang X, Shi C, Li Y, Majumder K, Ninga Z. Moderation of hyperuricemia in rats *via* consuming walnut protein hydrolysate diet and identification of new antihyperuricemic peptides. Food and Function. 2018;9(1):107–116. https://doi.org/10.1039/c7fo01174a

9. Mehmood A, Zhao L, Wang C, Nadeem M, Raza A, Ali N, *et al.* Management of hyperuricemia through dietary polyphenols as a natural medicament. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019;59(9):1433–1455. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1412939

10. Gao Y-F, Liu M-Q, Li Z-H, Zhang H-L, Hao J-Q, Liu B-H, Li X-Y, *et al.* Purification and identification of xanthine oxidase inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of α-lactalbumin and bovine colostrum casein. Food Research International. 2023;169:112882. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112882

11. Nongonierma AB, Fitzgerald RG. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. Peptides. 2012;37(2):263–272. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.030

12. Qi X, Chen H, Guan K, Sun Y, Wang R, Li Q, *et al.* Novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein: identification, *in vitro* inhibition mechanism and *in vivo* activity validation. Bioorganic Chemistry. 2022;128:106097. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106097

13. Xu Y, Gong H, Zou Y, Mao X. Antihyperuricemic activity and inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein by virtual screening. Journal Dairy Science.2024;107(4):1877–1886. https://doi.org/10.3168/jds.2023-24028

14. Ahmed AS, El-Bassiony T, Elmalt LM, Ibrahim HR. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. Food Research International. 2015;74:80–88. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032

15. Yu Zh, Cao Y, Kan R, Ji H, Zhao W, Wu S, *et al.* Identification of egg protein-derived peptides as xanthine oxidase inhibitors: virtual hydrolysis, molecular docking, and *in vitro* activity evaluation. Food Science and Human Wellness. 2022;11(6):1591–1597. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.06.017

16. Thaha A, Wang B-S, Chang Y-W, Hsia S-M, Huang T-C, Shiau C-Y, *et al*. Food-derived bioactive peptides with antioxidative capacity, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activity. Processes. 2021;9(5):747. https://doi.org/10.3390/pr9050747

17. Bu Y, Wang F, Zhu W, Li X. Combining bioinformatic prediction and assay experiment to identify novel xanthine oxidase inhibitory peptides from Pacific bluefin tuna (*Thunnus Orientalis*). E3S Web of Conferences. 2020;185:04062. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202018504062

18. Zhang P, Jiang Z, Lei J, Yan Q, Chang C. Novel hemoglobin-derived xanthine oxidase inhibitory peptides: Enzymatic preparation and inhibition mechanisms. Journal of Functional Foods. 2023;102:105459. https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105459

19. Murota I, Taguchi S, Sato N, Park EY, Nakamura Y, Sato K. Identification of antihyperuricemic peptides in the proteolytic digest of shark cartilage water extract using in vivo activity-guided fractionation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014;62(11):2392–2397. https://doi.org/10.1021/jf405504u

20. Li Y, Kang X, Li Q, Shi C, Lian Y, Yuan E, *et al.* Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on in vivo hyperuricemic model and in vitro xanthine oxidase inhibitory activity. Peptides. 2018;107:45–53. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.001

21. Hu X, Zhou Y, Zhou S, Chen S, Wu Y, Li L, *et al.* Purification and identification of novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from round scad (*Decapterus Maruadsi*) protein hydrolysates. Marine Drugs. 2021;19(10):538. https://doi.org/10.3390/md19100538

22. Song M. Screening of xanthine oxidase inhibiting peptides in meat Protein of bluespot mackerel based on ligand fishing. BoHai University. 2020. [Internet]. [cited 2023 Dec 18]. Available from: https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10167-1020750025.htm

23. Cui F, Xi L, Zhao G, Wang D, Tan X, Li J, *et al.* Screening of xanthine oxidase inhibitory peptides by ligand fishing and molecular docking technology. Food Bioscience. 2022;50:102152. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102152

24. Zhong H, Abdullah, Zhang Y, Deng L, Zhao M, Tang J, *et al.* Exploring the potential of novel xanthine oxidase inhibitory peptide (ACECD) derived from Skipjack tuna hydrolysates using affinity-ultrafiltration coupled with HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS. Food Chemistry. 2021;347:129068. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129068

25. Zhang H, Saravanan KM, Zhang JZH, Wu X. Deep-learning based bioactive peptides generation and screening against Xanthine oxidase. bioRxiv. 2023;11:523536. https://doi.org/10.1101/2023.01.11.523536

26. Hou M, Xiang H, Hu X, Chen Sh, Wu Y, Xu J, *et al*. Novel potential XOD inhibitory peptides derived from Trachinotus ovatus: isolation, identification and structure-function analysis. Food Bioscience. 2022;47:101639. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101639

27. Wei L, Hongwu JI, Song W, Peng S, Zhan S, Qu Y, *et al.* Identification and molecular docking of two novel peptides with xanthine oxidase inhibitory activity from *Auxis thazard*. Food Science and Technology. 2022;42:e106921. https://doi.org/10.1590/fst.106921

28. Chen X, Guan W, Li Y, Zhang J, Cai L. Xanthine oxidase inhibitory peptides from *Larimichthys polyactis:* characterization and *in vitro/in silico* evidence. Foods. 2023;2:982. https://doi.org/10.3390/foods12050982

29. Zhao Q, Meng Y, Liu J, Hu Z, Du Y, Sun J, *et al.* Separation, identification and docking analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from pacific cod bone-flesh mixture. LWT. 2022;167:113862. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113862

30. Yu Z, Kan R, Wu S, Guo H, Zhao W, Ding L, *et al.* Xanthine oxidase inhibitory peptides derived from tuna protein: virtual screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2021;101(4):1349–1354. https://doi.org/10.1002/jsfa.10745

31. Zhao Q, Jiang X, Mao Zh, Zhang J, Sun J, Mao X. Exploration, sequence optimization and mechanism analysis of novel xanthine oxidase inhibitory peptide from *Ostrea rivularis Gould*. Food Chemistry. 2023;404:134537. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134537

32. Mao Zh, Jiang H, Sun J, Mao X. Virtual screening and structure optimization of xanthine oxidase inhibitory peptides from whole protein sequences of Pacific white shrimp *via* molecular docking. Food Chemistry. 2023;429:136837. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136837

33. Liu N, Wang Y, Yang M, Bian W, Zeng L, Yin S, *et al.* A new rice-derived short peptide potently alleviated hyperuricemia induced by potassium oxonate in rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry.2019;67(1):220–228. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05879

34. Li QY. Study on the structure-activity mechanism of targeting inhibition of xanthine oxidase by uric acid-lowering peptides derived from walnut. [dissertation]. China: South China University of Technology, 2018.

35. Wu Y, He H, Hou T. Purification, identification, and computational analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from kidney bean. Journal of Food Science. 2021;86(3):1081–1088. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15603 15603

36. Dong Y, Sun N, Ge Q, Lv R, Lin S. Antioxidant soy peptide can inhibit xanthine oxidase activity and improve LO2 cell damage. Food Bioscience. 2023;52:102455. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102455

37. Jang I-T, Hyun S-H, Shin J-W, Lee Y-H, Ji J-H, Lee J-S. Characterization of an antigout xanthine oxidase inhibitor from pleurotusostreatus. Mycobiology.2014;42(3):296–300. https://doi.org/10.5941/myco.2014.42.3.296

38. Serba EM, Yuraskina TV, Rimareva LV, Tadzibova PYu, Sokolova EN, Volkova GS. Microbial Biomass as a Bioresource of Functional Food Ingredients: A Review. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(3):426–444. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2446; https://www.elibrary.ru/OYPVMI

39. Halavach TM, Kurchenko VP, Tarun EI, Romanovich RV, Mushkevich NV, Kazimirov AD, et al. Chitosan complexes with amino acids and whey peptides: Sensory and antioxidant properties. Foods and Raw Materials. 2024;12(1):13–21. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-584; https://elibrary.ru/XMDORK

40. Classical and molecular biology [Internet]. [cited 2023 Dec 21]. Available from: https://molbiol.ru/?&langid=en

41. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology. 1982;157(1):105–132. https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0

42. Kumar N, Kaur K, Bedi PMS. Hybridization of molecular docking studies with machine learning based QSAR model for prediction of xanthine oxidase activity. Computational and Theoretical Chemistry. 2023;1227:114262. https://doi.org/10.1016/J.COMPTC.2023.114262

43. Thakur A, Kumar A, Sharma V, Mehta V. PIC50: An open source tool for interconversion of PIC50 values and IC50 for efficient data representation and analysis. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18440.70408

44. Du Z, Ding X, Xu Y, Li Y. UniDL4BioPep: a universal deep learning architecture for binary classification in peptide bioactivity. Briefings in Bioinformatics. 2023;24(3):bbad135. https://doi.org/10.1093/bib/bbad135

45. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific Reports. 2017;7:42717. https://doi.org/10.1038/srep42717

46. Manzoor M, Singh J, Gani A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *in vitro, in silico* and *in vivo* studies. Food Chemistry. 2021;373:131395. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131395

47. Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. Food Chemistry. 2013;141(1):644–653. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.115

48. Bellaver EH, Kempka AP. Potential of milk-derived bioactive peptides as antidiabetic, antihypertensive, and xanthine oxidase inhibitors: a comprehensive bibliometric analysis and updated review. Amino Acids. 2023;55:1829–1855. https://doi.org/10.1007/s00726-023-03351-9

49. Li Y, Kang X, Li Q, Shi C, Lian Y,Yuan E, *et al.* Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on *in vivo* hyperuricemic model and *in vitro* xanthine oxidase inhibitory activity. Peptides. 2018;107:45–53. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.001

50. He W, Su G, Sun-Waterhouse D, Waterhouse GIN, Zhao M, Liu Y. *In vivo* anti-hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions. Food Chemistry. 2019;272:453–461. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.057

51. Li Q, Shi C, Wang M, Zhou M, Liang M, Zhang T, *et al.* Tryptophan residue enhances *in vitro* walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. Journal of Functional Foods. 2019;53:276–285. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.024

52. Zhao L, Ai X, Pan F, Zhou N, Zhao L, Cai S, *et al*. Novel peptides with xanthine oxidase inhibitory activity identified from macadamia nuts: integrated *in silico* and *in vitro* analysis. European Food Research and Technology. 2022;248:2031–2042. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04028-5

53. Xu Y, Gong H, Zou Y, Mao X. Antihyperuricemic activity and inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein by virtual screening. Journal Dairy Science. 2023;107(4):1877–1886. https://doi.org/10.3168/jds.2023-24028

54. Huang X-N, Zhang Y-M, Wen Y, Jiang Y, Wang C-H. Protease-catalyzed rational synthesis of uric acid-lowering peptides in non-aqueous medium. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2022;28:61. https://doi.org/10.1007/s10989-022-10367-4

55. Allahyari M, Samadi-Noshahr Z, Hosseinian S, Salmani H, Noras M, Khajavi-Rad A. Camel milk and allopurinol attenuated adenine-induced acute renal failure in rats Iranian Journal of Science. 2021;45:1539–1548. https://doi.org/10.1007/s40995-021-01155-8

56. Li Q, Li X, Wang J, Liu H, Kwong JS-W, Chen H, *et al*. Diagnosis and treatment for hyperuricemia and gout: a systematic review of clinical practice guidelines and consensus statements. BMJ Open. 2019;9:e026677. http://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026677

57. Huang Y, Fan S, Lu G, Sun N, Wang R, Lu C, *et al.* Systematic investigation of the amino acid profiles that are correlated with xanthine oxidase inhibitory activity: Effects, mechanism and applications in protein source screening. Free Radical Biology and Medicine. 2021;177:326–336. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.004

58. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology. 2001;55:165–199. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165

59. Shirvani-Rad S, Khatibzade-Nasari N, Ejtahed H-S, Larijani B. Exploring the role of gut microbiota dysbiosis in gout pathogenesis: a systematic review. Frontiers in Medicine. 2023;10:1163778. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1163778

60. Zheliabina OV, Eliseev MS, Glukhova SI, Nasonov EL. Contributing Factors of Diabetes Mellitus among Patients wth Gout (Results of the Long-Term Prospective Study). Doklady Biochemistry and Biophysics. 2023;511(1):195–202. https://doi.org/10.1134/S1607672923700321; https://elibrary.ru/TWNBMB