

РАЗРАБОТКА ПЕПТИДА, УСТОЙЧИВОГО К ПРОТЕОЛИЗУ, С ПОСЛЕДУЮЩИМ СИНТЕЗОМ ПЛАЗМИДЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В БИООБЪЕКТЕ

С.Л. Тихонов^{1,2}, tihonov75@bk.ru

Н.В. Тихонова¹, tihonov75@bk.ru

Ш.С. Валиева¹, sholpan.v85@gmail.com

С.В. Шихалев³, sershih@rambler.ru

¹ Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия

³ Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия

Аннотация. Проведены исследования по конструированию биоактивной устойчивой к протеолизу пептидной последовательности белка CDF-11 с последующим синтезом плазмиды, кодирующей его экспрессию в *E.coli*. Прогнозирование биологической активности, устойчивости к протеолизу и биодоступности пептидной последовательности проводили на платформе ADMET. Синтез плазмид пептидной последовательности нового рекомбинантного белка осуществляли в Российской биотехнологической компании «Евроген» (г. Москва) методом циклической сборки из олигонуклеотидов. Молекулярно-массовое распределение пептидной последовательности оценивали масс-спектрометрическим методом. Идентификацию пептида осуществляли методом MALDI-TOF MS Ultraflex. Проведена циклизация пептидной последовательности белка GDF-11 LQIIYGGKIPR путем введения и сшивания трех остатков цистеина. В результате получена новая последовательность LQCIIYCGKICPR. Прогнозируемые значения показателей биодоступности и клинического применения нового пептида свидетельствуют об эффективности предложенной его модификации и возможности перорального применения. Для экспрессии рекомбинантного белка с повышенной стабильностью к протеолизу и биодоступностью, содержащего последовательность циклического пептида, получена и синтезирована плазида, определена последовательность аминокислот в ней. Дальнейшие исследования будут направлены на экспрессию модифицированного белка GDF 11 mut в *E.coli*.

Ключевые слова: пептидная последовательность, протеолиз, биодоступность, циклическая сборка, плазмиды, экспрессия

Для цитирования: Разработка пептида, устойчивого к протеолизу, с последующим синтезом плазмиды, кодирующей его последовательность для экспрессии в биообъекте / С.Л. Тихонов, Н.В. Тихонова, Ш.С. Валиева, С.В. Шихалев // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2024. Т. 12, № 4. С. 74–82. DOI: 10.14529/food240408

Original article

DOI: 10.14529/food240408

DEVELOPMENT OF A PEPTIDE RESISTANT TO PROTEOLYSIS FOLLOWED BY SYNTHESIS OF A PLASMID ENCODING ITS SEQUENCE FOR EXPRESSION IN A BIOLOGICAL OBJECT

S.L. Tikhonov^{1,2}, tihonov75@bk.ru
N.V. Tikhonova¹, tihonov75@bk.ru
Sh.S. Valieva¹, sholpan.v85@gmail.com
S.V. Shikhalev³, sershih@rambler.ru

¹ Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia

² Ural State Forestry University, Yekaterinburg, Russia

³ Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Studies have been conducted on the construction of a bioactive proteolysis-resistant peptide sequence of the CDF-11 protein followed by the synthesis of a plasmid encoding its expression in *E.coli*. The prediction of biological activity, resistance to proteolysis and bioavailability of the peptide sequence was carried out on the ADMET platform. The synthesis of plasmids of the peptide sequence of a new recombinant protein was carried out in the Russian biotechnology company “Eurogen” (Moscow) by cyclic assembly of oligonucleotides. The molecular weight distribution of the peptide sequence was evaluated by mass spectrometry. The peptide sequence was identified by the MALDI-TOF MS Ultraflex method. The peptide sequence of the GDF-11 LQIYGGKIPR protein was cyclized by introducing and crosslinking three cysteine residues and a new LQIYGGKIPR sequence was obtained. The predicted values of the bioavailability and clinical use of the new peptide indicate the effectiveness of its proposed modification and the possibility of oral administration. For the expression of a recombinant protein with increased stability to proteolysis and bioavailability containing a cyclic peptide sequence, a plasmid was obtained and synthesized, and the sequence of amino acids in it was determined. Further research will focus on the expression of the modified GDF 11 mut protein in *E.coli*.

Keywords: peptide sequence, proteolysis, bioavailability, cyclic assembly, plasmids, expression

For citation: Tikhonov S.L., Tikhonova N.V., Valieva Sh.S., Shikhalev S.V. Development of a peptide resistant to proteolysis followed by synthesis of a plasmid encoding its sequence for expression in a biological object. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2024, vol. 12, no. 4, pp. 74–82. (In Russ.) DOI: 10.14529/food240408

Введение

В качестве функциональных ингредиентов пищевых продуктов в основном используются биологически активные вещества (БАВ) с молекулярной массой более 5000 Да, в частности, белки и полипептиды. Короткие и олигопептиды находятся в диапазоне молекулярных масс от 500–5000 Да и имеют много преимуществ перед другими БАВ и пептидами, в частности, более простая структура (линейная), способность взаимодействовать с малоизученными мишенями, недорогой синтез, пониженная иммуногенность и улучшенное проникновение в ткани. На фармацевтическом рынке США, Европы и Японии пред-

ставлено более 100 пептидных препаратов, используемых для лечения ряда заболеваний. В основном это пептидные препараты для инъекций, но следует отметить, что наиболее удобным методом применения БАВ является пероральный, поскольку позволяет потребителю принимать его самостоятельно.

Одним из современных направлений в пищевой промышленности является создание обогащенных продуктов, в том числе функционального и специализированного назначения с использованием в рецептуре пищевых пептидов. Вопросам разработки обогащенных мясopодуKтов биологически активными веществами посвящены исследования авторов

[1, 2]. Для пищевых целей биологически активные пептиды можно выделить из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [3, 4]. Следует отметить, что существенным ограничением производства и применения пероральных пептидов является их низкая или вообще отсутствующая пероральная биодоступность в результате гидролиза в желудочно-кишечном тракте (жкт). Поэтому перед биотехнологической промышленностью стоит сложная и в некоторых случаях даже может быть невыполнимая задача создание пептидов, устойчивых к протеолизу. Пептиды, поступая в желудочно-кишечный тракт (жкт), подвергаются ферментативному гидролизу под действием амилазы и липазы, катепсина, пепсина, трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы [5]. Другим недостатком всех пептидов является их короткий период полураспада в крови, который определяется действием экзопептидаз, ответственных за химическую нестабильность и распад пептидов в кровотоке [6]. Проблема биодоступности пероральных пептидов связана также с тем, что в клубочках почек имеются поры в размером ~8 нм, и циркулирующие пептиды с массой менее 25 кДа фильтруются через эти клубочки и не реабсорбируются через почечные канальцы [7]. Поэтому немногие пероральные пептидные препараты подтвердили эффективность в клинических испытаниях. Но вместе с тем выделяют эффективные пептиды для приема внутрь, в частности, семаглутид, который используется для лечения сахарного диабета 2 типа. Семаглутид применяется с Натрий N-[8-(2-гидроксибензоил)аминокаприлат], который действует как буферный агент в желудке, что позволяет снизить активность протеолизующих ферментов [6].

Для повышения эффективности применения пероральных пептидов необходимо предотвратить их ферментативный гидролиз, что возможно путем циклизации пептидных связей тремя способами: от начала пептида к концу, от начала или конца пептида к боковой цепи, от боковой цепи к боковой цепи. Последний носит название «сшивание». Этот способ позволяет зафиксировать вторичную структуру пептида и усилить его биологические свойства. Существуют две подгруппы пептидных сшивающих средств (СС): однокомпонентные (1С) и двухкомпонентные (2С). В однокомпонентном пептидном сшивании (1С-СС) имеется внутримолекулярная связь

между боковыми цепями аминокислот и может допускаться циклизация в зависимости от вторичной структуры. Циклизация вторичной структуры позволяет стабилизировать линейные пептиды [8, 9], уменьшая потерю энтропии при связывании с мишенью. Дисульфидная связь является наиболее распространенным типом циклизации. Богатые дисульфидами пептиды, такие как циклотид, используются в клинических целях [10]. Высокую эффективность применения показал сшитый пептид ALRN-5281, который используется для лечения дефицита гормона роста [11].

Общая концепция 2С-СС заключается в сшивании трех остатков цистеина с трехфункциональным линкером с образованием устойчивой конструкции пептида [12].

Также для решения проблемы быстрого выведения пептидов необходимо увеличить общий суммарный заряд пептидной последовательности. Пептиды, которые приобретают суммарный низкий положительный заряд, как правило, имеют более длительный период полураспада по сравнению с пептидами с суммарным отрицательным зарядом [13].

Пептидные последовательности определяют биологические свойства белков. Одним из необходимых белков для организма человека является белок GDF-11- фактор роста. Он синтезируется во многих органах и тканях человека и способен предотвращать процессы старения [14, 15]. В исследованиях на лабораторных мышах доказано, что введение в рацион белка GDF-11 животным предупреждает гипертрофию сердца и фиброз. Эффективность применения белка зависит от дозировки, способа введения (пероральный, инъекция и др.), при этом высокие дозы не токсичны [16].

Целью исследований является конструирование биоактивной устойчивой к протеолизу пептидной последовательности белка CDF-11 с последующим синтезом плазмиды, кодирующей его экспрессию в *E.coli*.

Следует отметить, что использование генно-модифицированных пищевых продуктов запрещено Федеральным законом от 3 июля 2016 г. № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности», но научные исследования в области биотехнологии рекомбинантных белков и пептидов разрешены и приветствуются.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований использованы:

- белок CDF-11, частью которого являются пептидная последовательность LQPIYGKIPR;
- новый пептид LQCIYCGKICPR с циклизацией по способу двухкомпонентного пептидного сшивания;
- кодирующая плазида синтез нового пептида LQCIYCGKICPR с условным названием pET-25b(+)_GDF-11_mut.

Белок CDF-11 имеет трехмерную структуру, которая определяет его биологическую активность. На рис. 1 представлена трехмерная структура белка CDF-11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10220#gene-expression>).



Рис. 1. Трехмерная структура белка CDF-11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10220#gene-expression>)

Для изучения биоактивности и биодоступности новой пептидной последовательности белка GDF-1 предварительно ее преобразовали в строку программы SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) (<https://novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>) с помощью инструмента PepSMI.

Прогнозирование биологической активности, устойчивости к протеолизу и биодоступности пептидной последовательности проводили на платформе ADMET (<https://admetmesh.scbdd.com/>).

Синтез плазмид пептидной последовательности LQCIYCGKICPR нового рекомби-

нантного белка осуществляли в Российской биотехнологической компании «Евроген» (г. Москва) методом циклической сборки из олигонуклеотидов (PCA, polymerase cycling assembly). Сначала были синтезированы олигонуклеотиды, комплементарные либо одной, либо другой цепи гена, перекрывающиеся участками в 20–30 пар оснований. Затем с помощью ДНК-полимеразы были достроены цепи с заполнением промежутков между олигонуклеотидами. На последнем этапе сконструированный ген амплифицировался путем стандартной ПЦР. Последовательности, кодирующие белок GDF-11mut, после амплификации обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и XhoI и клонировали в вектор pET-25b(+) по сайтам узнавания этих ферментов. Клоны были отсекужены методом Сэнгера.

Молекулярно-массовое распределение пептидной последовательности оценивали масс-спектрометрическим методом [17]. Идентификацию пептидной последовательности осуществляли методом MALDI-TOF MS Ultraflex (Bruker, Германия) [18].

Результаты исследований

Проведена циклизация пептидной последовательности белка GDF-11 LQPIYGKIPR путем введения и сшивания трех остатков цистеина, так как белок имеет трехмерную структуру и не является линейным. Полученная последовательность LQCIYCGKICPR позволяет создать устойчивую конструкцию всего белка, который можно в дальнейшем рассматривать как перспективный пищевой ингредиент при условии доказательства безопасности применения.

Кроме того, циклизация пептида позволяет повысить проницаемость им клеток, снизить общий почечный клиренс, что увеличивает период полувыведения пептида из системы кровообращения [8, 9].

Пептид может определяться как «лекарственно подобное вещество», если он удовлетворяет критериям правила Липински. Это правило включает несколько фундаментальных критериев: молекулярная масса (< 500 Да), количество доноров с Н-связью ≤ 5 , акцепторов с Н-связью ≤ 10 и $\log P < 5$. Молекулы, удовлетворяющие этим требованиям, будут биодоступны при приеме внутрь [19], но встречаются пептиды, характеристики которых не соответствуют правилу Липински, но они эффективны при пероральном приме-

нении. Для приема внутрь пептидам необходимо иметь молекулярную массу до 1200 Да и быть в диапазоне по показателю $\log P$ от 5 до 8 ед. Доступные пероральные пептиды содержат в 5 раз больше доноров и акцепторов Н-связей [19].

Проведено прогнозирование показателей новой пептидной последовательности LQCIYCGKICPR на соответствие правил Липински и другим критериям биодоступности. Результаты представлены в таблице.

Предварительно пептид был преобразован в строку SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System), т. е. проведена ком-

пьютерная сборка пептида в виде строки текста, однозначно описывающей каждый атом и связь в молекуле способом, доступным машинной обработке. Получен следующий результат:

N[C@@]([H])(CC(C)C)C(=O)N[C@@]([H])(CC(=O)N)C(=O)N[C@@]([H])([C@]([H])(CC)C)C(=O)N[C@@]([H])([C@]([H])(CC)C)C(=O)N[C@@]([H])(Cc1ccc(O)cc1)C(=O)NCC(=O)N[C@@]([H])(CCCCN)C(=O)N[C@@]([H])([C@]([H])(CC)C)C(=O)N1[C@@]([H])(CCC1)C(=O)N[C@@]([H])(CCCN(C(=O)N)C(=O)O,
 который был использован для создания 2D-модели пептида, представленной на рис. 2.

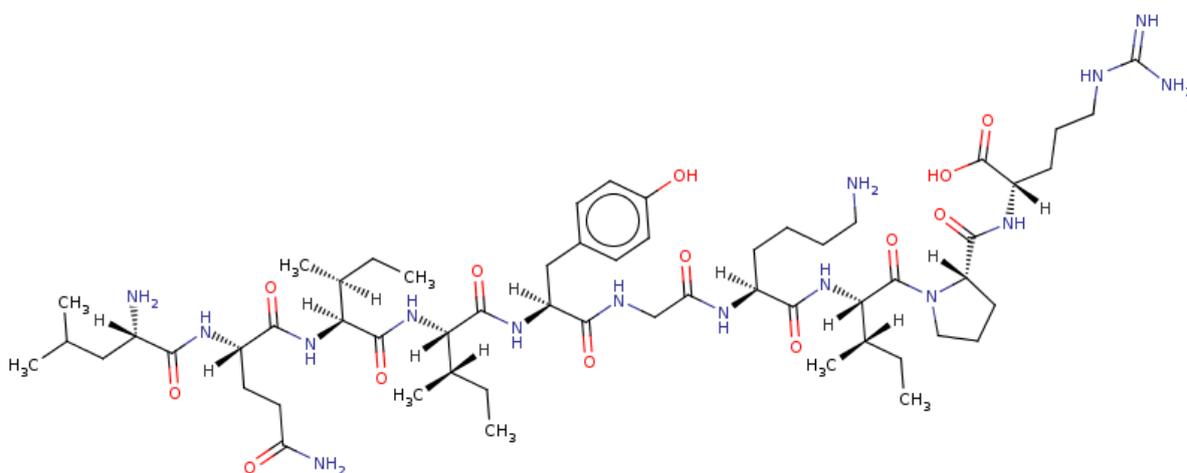


Рис. 2. 2D-модель новой пептидной последовательности LQCIYCGKICPR

Прогнозирование показателей новой пептидной последовательности LQCIYCGKICPR

Показатель	Прогнозируемое значение	Рекомендуемое значение
Молекулярная масса, Да	1199,74	До 1200 Да
$\log P$, моль/л	5,63	5–8
$\log D_{7.4}$, логарифмических моль /л	1,01	Менее 3
Количество доноров акцепторов nHD, ед.	20,0	Более 16
pKa (кислота), ед.	6,17	Ниже базового 6,862
Fu, %	95,312	Более 20
PPB, %	8,152	Менее 90
CL плазма, мл/мин/кг	2,03	0–5: отлично; 5–15: средний; > 15: плохо
T1/2, ч	4,286	Средний период полувыведения от 4 до 8
VDss, л/кг	0,237	0 до 20
Fsp ³ , ед.	0,684	Более 0,42
MCE-18, ед.	104,833	Более 45

Результаты исследования характеристик пептидной последовательности свидетельствуют о том, что она устойчива к протеолизу и соответствует рекомендуемым показателям для пероральных пептидов, представленных в работе [19], и правилу Липински. Так, молекулярная масса составляет до 1200 кДа, показатель $\log P$, отражающий липофильность и возможность пептида растворяться, на уровне 5,63 при рекомендуемом значении от 5 до 8 моль/л [20]. Одним из важных показателей биодоступности пероральных пептидов является $\log D_{7.4}$, отражающий баланс между липофильностью и гидрофильностью. По нему оценивают возможность пептида проникать в клетку, т. е. достигать клеток-мишеней. В исследуемом пептиде $\log D_{7.4}$ на уровне 1,01 логарифмических моль/л при оптимальном значении менее 3.

Количество доноров акцепторов позволяют судить о возможности пептида проникать через стенки кишечника и всасываться в кровь. Оптимальное значение для пептидов с возможностью перорального применения более 16,0 в исследуемом пептиде составляет 20 ед.

При рКа ниже базового пептид характеризуется высокой всасываемостью. Базовое значение этого показателя у исследуемого пептида составляет 6,862 ед. Установлено, что рКа (кислота) пептида составляет 6,17 ед., что ниже базового.

Показатель F_u отражает возможность

пептида находиться в несвязанном состоянии в крови и проникать в клетки-мишени. Значение показателя более 20 % свидетельствует о его стабильности в кровотоке и доступности клеткам. У исследуемого пептида F_u равен 95,312 %, что согласуется со значением РРВ (уровень связывания с белками плазмы). Вещества со значением РРВ менее 90 % характеризуются высокой эффективностью клинического применения. У исследуемого пептида РРВ составляет 8,152 %.

Пептид относится к веществам со средним периодом выведения и с необходимым плазменным клиренсом. Показатель VD_{ss} пептида имеет оптимальное значение, что отражает наряду с плазменным клиренсом его устойчивость к действию протеолитических ферментов, доступности организму и эффективности действия. Показатель F_{sp^3} показывает эффективность клинического применения на основании хорошей растворимости. Значение F_{sp^3} исследуемого пептида соответствует оптимальному. По показателю МСЕ-18 судят в целом о биологической активности пептидов. Значение более 45 является оптимальным. У исследуемого пептида – на уровне 104,833 ед.

Таким образом, циклический пептид LQCIIYCGKICPR соответствует правилу Липински для пероральных пептидов, устойчив к протеолизу в ЖКТ и ферментам крови, является биодоступным и эффективным. Следова-

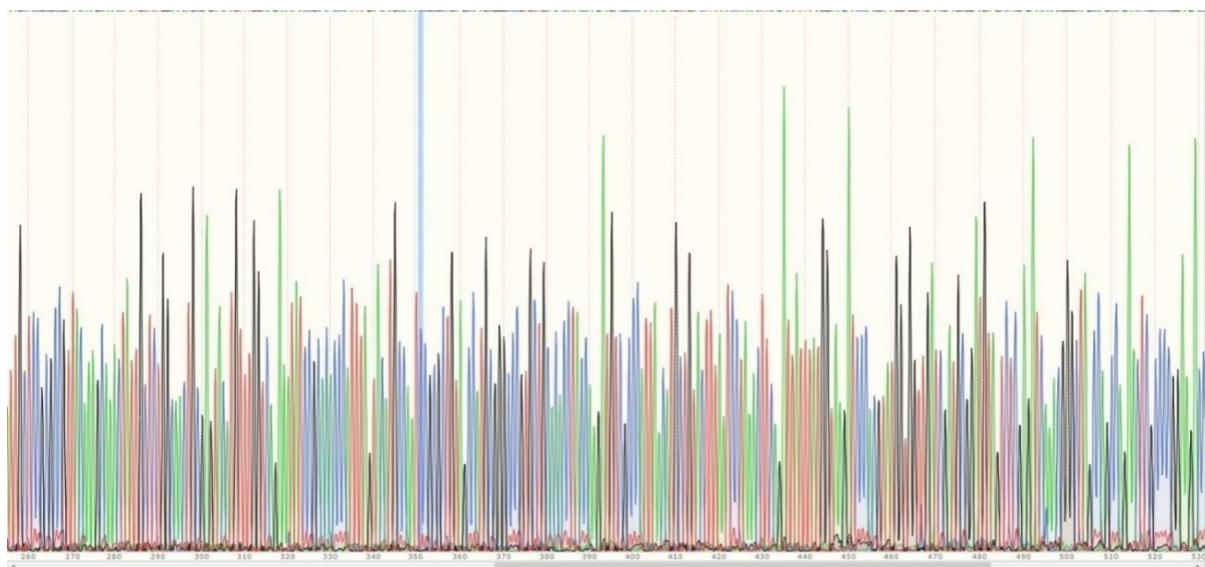


Рис. 3. Хроматограмма праймера плазмиды pET-25b(+)_GDF-11_mut, кодирующая экспрессию пептида LQCIIYCGKICPR в *E.coli*

тельно, целесообразно рассмотреть возможность его биологического синтеза в живом организме для последующего выделения и использования.

Проведены исследования по созданию плазмиды, кодирующей пептид LQCIYCGKICPR с возможностью ее встраивания в биологический объект *E. Coli* и с последующей экспрессии исследуемого пептида.

Полученная плаزمида получила условное название pET-25b(+)_GDF-11_mut. Хроматограмма праймера плазмиды, кодирующая экспрессию пептида LQCIYCGKICPR в *E.coli*, представлена на рис. 3.

Хроматограмма имеет следующую последовательность аминокислот:

AACAATCAGCTTCTTTCGGGCTTTGTTAG
CAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGG
TGCTCGACATCCTCGGGGTCTTCCGGGGC
GAGTTCTGGCTGGCTAGCCCGTTTGATCT
CGAGACTACATCCGCATCGATCAACCACC
ATACGTGGGATCTTACCATAAATAATCTG
AAGTTTAGGATTAAGTACAGCATGTTAA
TGGGCGACATCTTGGTAGGTGTGCAGCAC
GGCCCGCATGGCTACAGCGCGGATTGG

CATGTAATAAATGGGTGTGCGGATATTTTC
TGACCAAACATGTAAGTCTCGCAGTTGCCAGA
GCAATAGTTTGGCTTTGTAACGGCGCGGAG
CAATGATCCAATCCCAGCCGAACGCTTCG
AAATCGACCGTCAGCGGATAACGA.

Выводы

В результате исследований проведена циклизация части пептидной последовательности белка GDF 11. Получена новая последовательность аминокислот LQCIYCGKICPR путем введения и сшивания трех остатков цистеина для образования устойчивой к протеолизу в жкт и крови конструкции пептида. Прогнозируемые значения показателей биодоступности и клинического применения пептида свидетельствуют об эффективности предложенной циклизации пептида и возможности перорального применения. Для экспрессии рекомбинантного белка с повышенной стабильностью к протеолизу и биодоступностью, содержащего последовательность циклического пептида, получена и синтезирована плаزمида, определена последовательность аминокислот в ней. Дальнейшие исследования будут направлены на экспрессию белка GDF 11 mut *E.coli*.

Список литературы

1. Мясной паштет для геродиетического питания при активном образе жизни / Е.А. Мифтахутдинова, С.Л. Тихонов, Н.В. Тихонова [и др.] // Ползуновский вестник. 2020. № 2. С. 70–74.
2. Miftahutdinova E.A., Tikhonov S.L., Tikhonova N.V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products // Theory and Practice of Meat Processing. 2020. Vol. 5, No. 1. P. 27–31. DOI: 10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31
3. Permyakova L., Sergeeva I., Ryabokoneva L., Atuchin V., Li Y. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the malt sprout extract: Preparation, identification and bioactivity // Food Bioscience. 2024. V. 61, 104867. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104867
4. Sergeeva I., Permyakova L., Markov A. et al. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the aquatic extract of *Atriplex sibirica* L. // ACS Food Science & Technology. 2024. V. 4(1). P. 173–189. DOI: 10.1021/acscfoodscitech.3c00455
5. Drucker DJ. Advances in oral peptide therapeutics // Nat Rev Drug Discov. 2020, 19(4):277–289. DOI: 10.1038/s41573-019-0053-0
6. Bucheit J.D., Pamulapati L.G., Carter N. et al. Oral Semaglutide: A Review of the First Oral Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist // Diabetes Technol Ther. 2020. V. 22(1). P. 10–18. DOI: 10.1089/dia.2019.018
7. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties // AAPS J. 2015. V. 17(1). P. 134–143. DOI: 10.1208/s12248-014-9687-3
8. Wu F., John P., Gelfanov V. Synthesis of Four-Disulfide Insulin Analogs via Sequential Disulfide Bond Formation // The Journal of Organic Chemistry. 2017. V. 82(7). P. 3506–3512. DOI: 10.1021/acs.joc.6b03078
9. Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J., Alewood P.F. Trends in peptide drug discovery // Nat Rev Drug Discov. 2021. V. 20(4). P. 309–325. DOI: 10.1038/s41573-020-00135-8
10. Liu X.Y., Ji X., Heinis C., Waser J. Peptide-Hypervalent Iodine Reagent Chimeras: Enabling Peptide Functionalization and Macrocyclization // Angew Chem Int Ed Engl. 2023. 14;62(33):e202306036. DOI: 10.1002/anie.202306036

11. Keppler J.K., Heyse A., Scheidler E. et al. Towards recombinantly produced milk proteins: physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein betalactoglobulin variants // *Food Hydrocoll.* 2021. 110:106132. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106132
12. Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014 Nov 25;111(47):16736–41. DOI: 10.1073/pnas.1412152111.
13. Huang J. Protein and Peptide Studies in Kidney Disease: Prediction, Diagnosis and Treatment // *Protein Pept Lett.* 2018. V. 25(6). P. 512–513. DOI: 10.2174/092986652506180810154427
14. Tomohiro K., Richard T. Lee, GDF-11 as a Potential Cardiac Pro-Angiogenic Factor* // *JACC: Basic to Translational Science.* 2023. V. 8, Iss. 6. P. 636–637. DOI: 10.1016/j.jacbts.2023.04.003
15. Lian J., Walker R.G., D'Amico A. et al. Functional substitutions of amino acids that differ between GDF11 and GDF8 impact skeletal development and skeletal muscle // *Life Sci Alliance.* 2023;6:e202201662. DOI: 10.26508/lsa.202201662
16. Harper S.C., Johnson J., Borghetti G. et al. GDF11 decreases pressure overload-induced hypertrophy, but can cause severe cachexia and premature death // *Circ Res.* 2018;123:1220–1231. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312955
17. Hubler S.L., Craciun G. Periodic patterns in distributions of peptide masses // *Biosystems.* 2012. V. 109(2). P. 179–185. DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.04.008
18. Webster J., Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry // *Methods mol. biol. (Clifton, N.J.).* 2012. V. 800. P. 227–240. DOI: 10.1007/978-1-61779-349-3_15
19. Santos G.B., Ganesan A., & Emery F.S. Oral Administration of Peptide-Based Drugs: Beyond Lipinski's Rule // *Chem Med Chem.* 2016. V. 11(20). P. 2245–2251. DOI: 10.1002/cmdc.201600288
20. Broccatelli F., Aliagas I., Zheng H. Why Decreasing Lipophilicity Alone Is Often Not a Reliable Strategy for Extending IV Half-life // *ACS Med Chem Lett.* 2018. No. 19. P. 522–527. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00047

References

1. Miftakhutdinova E.A., Tikhonov S.L., Tikhonova N.V. [et al.] Meat paste for herodietic nutrition with an active lifestyle. *Polzunovsky vestnik*, 2020, no. 2, pp. 70–74. (In Russ.)
2. Miftahutdinova E.A., Tikhonov S.L., Tikhonova N.V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products. *Theory and Practice of Meat Processing*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 27–31. DOI: 10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31
3. Permyakova L., Sergeeva I., Ryabokoneva L., Atuchin V., Li Y. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the malt sprout extract: Preparation, identification and bioactivity. *Food Bioscience*, 2024, vol. 61, 104867. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104867
4. Sergeeva I., Permyakova L., Markov A., Ryabokoneva L., Atuchin V., Anshukov A., Li Y., & Proskuryakova L. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the aquatic extract of *Atriplex sibirica* L. *ACS Food Science & Technology*, 2024, vol. 4(1), pp. 173–189. DOI: 10.1021/acfoodscitech.3c00455
5. Drucker D.J. Advances in oral peptide therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, 2020, vol. 19(4), pp. 277–289. DOI: 10.1038/s41573-019-0053-0
6. Bucheit J.D., Pamulapati L.G., Carter N., Malloy K., Dixon D.L., Sisson E.M. Oral Semaglutide: A Review of the First Oral Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist. *Diabetes Technol Ther*, 2020, vol. 22(1), pp. 10–18. DOI: 10.1089/dia.2019.018
7. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J.*, 2015, vol. 17(1), pp. 134–143. DOI: 10.1208/s12248-014-9687-3
8. Wu F., John P., Gelfanov V. Synthesis of Four-Disulfide Insulin Analogs via Sequential Disulfide Bond Formation. *The Journal of Organic Chemistry*, 2017, vol. 82(7), pp. 3506–3512. DOI: 10.1021/acs.joc.6b03078
9. Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J., Alewood P.F. Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 2021, vol. 20(4), pp. 309–325. DOI: 10.1038/s41573-020-00135-8
10. Liu X.Y., Ji X., Heinis C., Waser J. Peptide-Hypervalent Iodine Reagent Chimeras: Enabling Peptide Functionalization and Macrocyclization. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2023, vol. 14;62(33):e202306036. DOI: 10.1002/anie.202306036

11. Keppler J.K., Heyse A., Scheidler E., Uttinger M.J., Fitzner L., Jandt U., Heyn T.R., Lautenbach V., Loch J.I., Lohr J. et al. Towards recombinantly produced milk proteins: physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein betalactoglobulin variants. *Food Hydrocoll*, 2021, 110:106132. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106132
12. Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014 Nov 25;111(47):16736–41. DOI: 10.1073/pnas.1412152111
13. Huang J. Protein and Peptide Studies in Kidney Disease: Prediction, Diagnosis and Treatment. *Protein Pept Lett.*, 2018;25(6):512–513. DOI: 10.2174/092986652506180810154427
14. Tomohiro K., Richard T. Lee, GDF-11 as a Potential Cardiac Pro-Angiogenic Factor*. *JACC: Basic to Translational Science*, 2023, vol. 8, iss. 6, pp. 636–637. DOI: 10.1016/j.jacbts.2023.04.003
15. Lian J., Walker R.G., D’Amico A. et al. Functional substitutions of amino acids that differ between GDF11 and GDF8 impact skeletal development and skeletal muscle. *Life Sci Alliance*, 2023;6:e202201662. DOI: 10.26508/lsa.202201662
16. Harper S.C., Johnson J., Borghetti G. et al. GDF11 decreases pressure overload-induced hypertrophy, but can cause severe cachexia and premature death. *Circ Res.*, 2018, vol. 123, pp. 1220–1231. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312955
17. Hubler S.L., Craciun G. Periodic patterns in distributions of peptide masses. *Biosystems*, 2012, vol. 109(2), pp. 179–185. DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.04.008
18. Webster J., Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods mol. biol (Clifton, N.J.)*, 2012, v. 800, pp. 227–240. DOI: 10.1007/978-1-61779-349-3_15
19. Santos G.B., Ganesan A., & Emery F.S. Oral Administration of Peptide-Based Drugs: Beyond Lipinski’s Rule. *Chem Med Chem*, 2016, vol. 11(20), pp. 2245–2251. DOI: 10.1002/cmdc.201600288
20. Broccatelli F., Aliagas I., Zheng H. Why Decreasing Lipophilicity Alone Is Often Not a Reliable Strategy for Extending IV Half-life. *ACS Med Chem Lett.*, 2018, no. 19, pp. 522–527. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.8b00047

Информация об авторах

Тихонов Сергей Леонидович, профессор кафедры пищевой инженерии аграрного производства, д-р техн. наук, профессор, Уральский государственный аграрный университет; профессор кафедры химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия; tihonov75@bk.ru

Тихонова Наталья Валерьевна, заведующий кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, д-р техн. наук, профессор, Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия; tihonov75@bk.ru

Валиева Шолпан Сергеевна, аспирант, Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия; sholpan.v85@gmail.com

Шихалев Сергей Валерьевич, доцент кафедры пищевой инженерии, канд. техн. наук, доцент, Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия; sershih@rambler.ru

Information about the authors

Sergey L. Tikhonov, Professor of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Doctor of Technical Sciences, Professor, Ural State Agrarian University; Professor of the Department of Chemical Technology of Wood, Biotechnology and Nanomaterials, Ural State Forestry University, Yekaterinburg, Russia; tihonov75@bk.ru

Natalia V. Tikhonova, Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Doctor of Technical Sciences, Professor, Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia; tihonov75@bk.ru

Sholpan S. Valieva, Postgraduate student, Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia; sholpan.v85@gmail.com

Sergey V. Shikhalev, Associate Professor of the Department of Food Engineering, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor, Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia; sershih@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 14.09.2024

The article was submitted 14.09.2024