

## Тест-система скрининга низкомолекулярных соединений на основе метода быстрой кинетики

<b>Мишень/тест-система</b>	Ингибирование главной протеазы SARS-CoV-2
<b>Клеточная линия (при наличии)</b>	н/п
<b>Метод детекции</b>	Флуоресценция
<b>Активность</b>	Ингибирование
<b>Методы контроля</b>	Положительный контроль: активность протеазы без ингибитора, активность протеазы в присутствии ингибитора-стандарта.

### Краткое описание тест-системы

Эффективность процесса ингибирования протеазы оценивается на основании предстационарного кинетического анализа, с регистрацией процесса, основанного на эффекте резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Для регистрации ферментативного процесса используется модельный FRET-субстрат Dabcyl-KTSAVLQSGFRKM-E(Edans)-NH<sub>2</sub>, содержащий пару краситель-тушитель. FRET-анализ позволяет выявить изменения расстояния между красителем и тушителем в таких процессах, как встраивание пептида в активный центр фермента, сопровождающееся образованием специфических контактов между боковыми цепями субстрата и соответствующими аминокислотными остатками в активном центре фермента, что впоследствии приводит к образованию каталитического фермент-субстратного комплекса, гидролизу пептидной связи и высвобождению продуктов реакции.

Раствор фермента смешивают с ингибитором и инкубируют на льду 5 мин для получения комплекса фермент-ингибитор. После этого иницируют гидролиз субстрата путем быстрого перемешивания предформированного комплекса фермент-ингибитор с FRET-субстратом с помощью спектрофотометра остановленного потока SX20 (Applied Photophysics, Великобритания) и регистрируют изменение FRET-сигнала. Для оценки остаточной ферментативной активности используют начальный наклон кинетических кривых. Сравнение наблюдаемой константы скорости, полученной в присутствии исследуемого вещества, с наблюдаемой константой скорости, полученной в отсутствие ингибитора, либо в присутствии ингибитора-стандарта, позволяет сделать выводы об эффективности действия тестируемого вещества.

### Протокол

№№	Процесс	Комментарии
1	Приготовление рабочих растворов субстрата и фермента.	<u>Раствор 1</u> : 500 мкл 5 мкМ FRET-субстрат Dabcyl-KTSAVLQSGFRKM-E(Edans)-NH <sub>2</sub> в буферном растворе (20 mM Tris-HCl pH 7.3, 100 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, and 1.0 mM DTT). <u>Раствор 2</u> : 500 мкл 5 мкМ протеазы Mpro и 5 мкМ исследуемого ингибитора в буферном растворе (20 mM Tris-HCl pH 7.3, 100 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, and 1.0 mM DTT).
2	Инкубирование раствора фермента с ингибитором на льду в течение 5 мин.	

3	Перенос растворов 1 и 2 в спектрофотометр остановленного потока SX20 (Applied Photophysics, Великобритания).	Инкубирование растворов в течение 5 мин при температуре 25°C.
4	Регистрация изменений FRET-сигнала.	Длина волны возбуждения $\lambda_{ex} = 340$ нм, интегральную интенсивность флуоресценции детектируют с использованием ФЭУ с установленным светофильтром GG-435 (Schott, Mainz, Germany).
5	Количественная обработка результатов эксперимента.	Origin 7.0 (OriginLab, США) и DynaFit (BioKin, США)
6	Сравнение наблюдаемой константы скорости, полученной в присутствии исследуемого ингибитора, с наблюдаемой константой скорости, полученной в отсутствие ингибитора, либо в присутствии ингибитора-стандарта.	Стандартными ингибиторами являются PF-00835231, GC-376, Воспреvir и Telaprevir.

### Интерпретация результатов

Количественную обработку результатов экспериментов проводят путем оптимизации параметров методом нелинейной регрессии, включающим численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса (Origin 7.0 (OriginLab, США) и DynaFit (BioKin, США)).

Для расчета наблюдаемых констант скорости, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции, используют уравнение:

$$F_c = F_b + \sum_{i=0}^N A_i \times \exp(-k_i \times t)$$

где  $F_c$  – экспериментальный сигнал,  $F_b$  – фоновое значение FRET-сигнала,  $i$  – номер стадии,  $A_i$  – амплитуда изменения сигнала,  $k_i$  – наблюдаемая константа скорости.

Предстаационарный кинетический анализ взаимодействия протеазы с модельным субстратом, позволяет «разложить» процесс взаимодействия на отдельные стадии и определить характеристики этого взаимодействия. Кроме того, этот подход позволяет определить влияние любого химического вещества на эти стадии при его добавлении в реакционную смесь.

Сравнение наблюдаемой константы скорости, полученной в присутствии тестируемого вещества, с наблюдаемой константой скорости, полученной в отсутствие ингибитора, либо в присутствии ингибитора-стандарта, позволяет сделать выводы об эффективности действия тестируемого вещества.

### Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе (при наличии)

Zakharova M.Yu., Kuznetsova A.A., Uvarova V.I., Fomina A.D., Kozlovskaya L.I., Kaliberda E.N., Kurbatskaia I.N., Smirnov I.V., Bulygin A.A., Knorre V.D., Fedorova O.S., Varnek A., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Egorov A.M., Gabibov A.G., Kuznetsov N.A. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral-Drug

## **Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации**

---

Для апробации быстрокинетической системы поиска ингибиторов основной протеазы коронавируса в качестве стандартных ингибиторов были использованы известные ковалентные ингибиторы протеазы: PF-00835231, GC-376, Воцепревир и Телапревир. Данные соединения относятся к семейству ингибиторов цистеиновых протеаз и содержат реакционноспособные группы, необходимые для образования ковалентной связи между молекулой ингибитора и остатком Cys145 в активном центре фермента. Для выполнения такой апробации метода, раствор фермента смешивали с ингибитором и инкубировали на льду 5 мин для получения комплекса фермент-ингибитор. После этого инициировали гидролиз субстрата путем быстрого перемешивания предформированного комплекса с FRET-субстратом с помощью спектрофотометра остановленного потока и регистрировали изменение FRET-сигнала. Для оценки остаточной ферментативной активности использовали начальный наклон кинетических кривых. Сравнение полученных данных позволило сделать вывод, что как GC-376, так и PF-00835231 являются наиболее мощными ковалентными ингибиторами Mpro. Воцепревир показал промежуточный уровень активности, тогда как телапревир имел наименьший ингибирующий эффект. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными.

## **Дополнительные характеристики**

---

Количество вещества для проведения одного исследования	500 мкл, 5 мкМ исследуемого вещества
Производительность тест-системы	30 мин на одно соединение

---

## **Организация**

---

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) совместно с Институтом биоорганической химии РАН и Научным центром исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова

## **Контактное лицо**

---

Кузнецова Александра Александровна, [sandra-k@niboch.nsc.ru](mailto:sandra-k@niboch.nsc.ru)