

Тест-система: Бесклеточная система скрининга ингибиторов протеазы 3CLpro (Mpro) SARS-CoV-2

Мишень/тест-система	Протеаза 3CLpro (Mpro) SARS-CoV-2
Клеточная линия	бесклеточная
Метод детекции	Флуоресценция, FRET
Активность	Ингибирование протеазы: IC ₅₀ , константа ингибирования
Методы контроля	Положительный контроль: ингибиторы PF-00835231 либо GC-376, в ДМСО Отрицательный контроль: ДМСО

Краткое описание тест-системы

Бесклеточная система скрининга ингибиторов протеазы 3CLpro (Mpro) SARS-CoV-2 позволяет в краткие сроки проводить определение эффективности ингибирования протеазы низкомолекулярными соединениями. Система основана на регистрации увеличения флуоресцентного сигнала продукта расщепления FRET-субстрата Dabcyl-KTSAVLQ↓SGFRKM-E(Edans)-NH₂ в ходе реакции протеолиза. Начальная скорость реакции рассчитывается в присутствии и в отсутствие ингибитора, отношение скоростей определяет остаточную активность фермента.

Протокол

Соединения для скрининга используют без дополнительной очистки; стоковые растворы концентрацией 5 мМ готовят в 100% ДМСО, если Заказчиком не запрошено иное, и хранят при -20 °С.

Для скрининга ингибиторов главной протеазы к 300 нМ 3CLpro SARS-CoV-2 добавляют 100 мкМ растворы соединений в реакционном буфере (pH 7.3, 20 мМ трис, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ), приготовленные путём разбавления стоковых растворов. В качестве отрицательного контроля используют соответствующие по концентрации растворы ДМСО. Смесь инкубируют в течение 30 минут при 30 °С и инициируют реакцию добавлением 10 мкМ FRET-субстрата (общий объем реакционной смеси 20 мкл, исследование проводится в чёрных 384-луночных планшетах (Greiner). Регистрация сигнала флуоресценции продолжается 1.5 часа при длинах волн $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 355/460 нм. Концентрацию флуоресцентного продукта рассчитывают по калибровочной кривой, построенной при полном протеолизе определенных концентраций субстрата. Начальная скорость реакции в присутствии и в отсутствие соединения рассчитывается из линейного участка кинетической кривой (первые 200 секунд). Остаточная активность рассчитывается как отношение начальных скоростей в присутствии и в отсутствие ингибитора.

Для определения активности (IC₅₀, K_i) строят зависимость остаточной активности фермента от концентрации ингибитора. Полученные S-образные кривые аппроксимируют с помощью нелинейной регрессии. Константа ингибирования (K_i) рассчитывается по уравнению $K_i = IC_{50}/(1+[S]/K_m)$, где IC₅₀ – концентрация ингибитора, при которой фермент обладает 50% активностью, [S] – концентрация субстрата и K_m – константа Михаэлиса. Константа Михаэлиса (K_m = 28.6 ± 8.3 мкМ) была получена из зависимости начальной скорости реакции фермента от концентрации субстрата (аппроксимация согласно уравнению Михаэлиса-Ментен).

Интерпретация результатов

При скрининге проводится определение остаточной активности фермента (%) в присутствии ингибиторов в концентрации 100 мкМ или максимально возможной в зависимости от растворимости. Хитами признаются соединения, остаточная активность в присутствии которых составляет не более 50%. Константа ингибирования определяется путём анализа концентрационной зависимости эффективности ингибирования в рамках математического аппарата кинетики Михаэлиса-Ментен. Высокоспецифичные ингибиторы имеют константу порядка единиц нМ, типичные хиты виртуального скрининга — порядка 20 мкМ.

Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе

- MY Zakharova, AA Kuznetsova, VI Uvarova, AD Fomina, LI Kozlovskaya, EN Kaliberda, IN Kurbatskaia, IV Smirnov, AA Bulygin, VD Knorre, OS Fedorova, A Varnek, DI Osolodkin, AA Ishmukhametov, AM Egorov, AG Gabibov, NA Kuznetsov. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral-Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 773198. DOI: 10.3389/fphar.2021.773198
- L Zhang, D Lin, X Sun, U Curth, C Drosten, L Sauerhering, S Becker, K Rox, R Hilgenfeld. Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved α -Ketoamide Inhibitors. *Science* **2020**, *368* (6489), 409–412. DOI: 10.1126/science.abb3405.

Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации

Ингибитор	K _i эксп., мкМ	K _i лит., мкМ
PF-00835231	0.004	0.00027
GC-376	0.03	0.06
Боцепревир	3.3	1.18
Телапревир	15.6	18 (IC ₅₀)

Дополнительные характеристики

Количество вещества для проведения одного исследования ≥ 1 мг

Производительность тест-системы Один эксперимент — 3 часа (без учёта пробоподготовки и анализа результатов).

До 30 соединений в одной постановке.

Дополнительная информация

- Тестируемые соединения не должны обладать флуоресценцией в рабочем диапазоне длин волн
- Дизайн эксперимента и альтернативные варианты постановок требуют дополнительного обсуждения.
- Дополнительные эксперименты могут быть проведены для активных соединений методом анализа сдвига температуры денатурации белка для определения эффективности связывания ингибитора с ферментом.

Организация

ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

<http://chumakovs.ru/>

Почтовый адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819

Контактное лицо

к.х.н. Дмитрий Иванович Осолодкин, эл. почта: osolodkin_di@chumakovs.ru