

Тест система: Ингибиторы 3CL протеазы SARS-CoV-2

Мишень/тест-система	Ингибиторы 3CL протеазы SARS-CoV-2
Клеточная линия (при наличии)	-
Метод детекции	Флуоресценция
Активность	Ингибирование
Методы контроля	Положительный контроль: без 3CL протеазы Отрицательный контроль: ДМСО

Краткое описание тест-системы

Тест-система исследования ингибирующей активности, включает три основных компонента:

1. рекомбинантную основную протеазу 3CLpro коронавируса SARS-CoV-2;
2. синтетический пептидный субстрат;
3. исследуемое соединение.

В качестве субстрата используется синтетический пептид следующего состава: DabcyI-KTSAVLQSGFRKME-Edans (DabcyI = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, Edans = 5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid) («CPC Scientific», США), соответствующий сайту протеолиза основной протеазы 3CL. В районе С-концевого участка субстрата находится флуорофор – Edans, на N-конце – тушитель DabcyI, при этом тушитель и флуорофор сближены таким образом, что за счет резонансного диполь-дипольного переноса энергии (FRET) от Edans к DabcyI флуоресценция минимальна. Гидролиз субстрата основной протеазы 3CL приводит к разгоранию флуоресценции из-за удаления флуорофора от тушителя. Увеличение флуоресценции отражает скорость ферментативной реакции.

Протокол

Пептидный субстрат растворить в DMSO до концентрации 1000 мкМ. Исследуемые соединения развести в 20 мМ Трис-НСl буфере (pH=7,3) + 10% DMSO до начальной концентрации 1 мМ. Анализ проводить по 10 точкам с разной концентрацией исследуемого соединения. Для этого провести последовательное разведение соединения 20 мМ буфером Трис-НСl (pH 7,3) в планшете для измерения (от 1 мМ до 1,95 мкМ) с шагом 0,5. Реакционные смеси содержат 20 мМ Трис-НСl буфер (pH=7,3), 150 нМ 3CL, 100 мкМ субстрата и исследуемое соединение в своей концентрации в каждой лунке.

Реакционные смеси готовить во льду в 384-луночном планшете, измерения проводить при 30°C.

Предварительно откалибровать прибора по раствору пептида с концентрацией 100 мкМ, подвергнутого полному гидролизу 3CL протеазой. Значение флуоресценции данной смеси считать за 80%. Измерение проводить в режиме кинетического сканирования. Длительность цикла и количество циклов определять индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. Все опыты проводить в трех повторах (n = 3).

Интерпретация результатов

Для тестирования ингибирующей способности предоставленных соединений определяют величину IC50, за которую принимают концентрацию тестируемого вещества, снижающую уровень флуоресценции на 50% от наблюдаемого без добавления ингибитора при деструкции рекомбинантной протеазой 3CLpro пептидного субстрата. Для расчета величины IC50 использовать программное обеспечение MARS Data Analysis («BMG LABTECH», Германия).

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

1. Shcherbakov D., Baev D., Kalinin M., Dalinger A., Chirkova V., Belenkaya S., Khvostov A., Krut'ko D., Medved'ko A., Volosnikova E., Sharlaeva E., Shanshin D., Tolstikova T., Yarovaya O., Maksyutov R., Salakhutdinov N., Vatsadze S. Design and Evaluation of Bispidine-Based SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors // ACS Med. Chem. Lett. 2022, 13, 1, 140–147.
2. Сулимов А.В., Шихалиев Х.С., Пьянков О.В., Щербаков Д.Н., Чиркова В.Ю., Ильин И.С., Кутов Д.К., Тащилова А.С., Крысин М.Ю., Крыльский Д.В., Столповская Н.В., Волосникова Е.А., Беленькая С.В.,

Сулимов В.Б. Разработка противовирусных лекарств на основе ингибиторов главной протеазы SARS-CoV-2 // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 3. С. 259-267.

Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации

В качестве препаратов сравнения использовать дисульфирам ($IC_{50} = 9.35 \pm 0.18$ мкМ), эбселен ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.06$ мкМ), ML188 ($IC_{50} 1.6 \pm 0.6$ мкМ) и GC376 ($IC_{50} 0.15 \pm 0.03$ мкМ) ингибирующая активность которых, в отношении главной протеазы SARS-CoV-2 была подтверждена ранее.

Дополнительные характеристики

Количество вещества для проведения одного исследования	100 мМ
Производительность тест-системы	10-20 веществ в неделю

Организация

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 630559, р.п.Кольцово, Новосибирская область, Россия

Контактное лицо

Щербаков Дмитрий Николаевич; e.mail: dshcherbakov@gmail.com; тел. +7-903-930-6331