

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2 (M^{pro}) ПУТЁМ ЭЛЕКТРООКИСЛЕНИЯ ОСТАТКА ТИРОЗИНА В МОДЕЛЬНОМ ПЕПТИДЕ

© 2025 Т.А. Филиппова^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, Т.Е. Фарафонова¹,
Ю.Ю. Худоклинова², В.В. Шумянцева^{1,2}, С.А. Мошковский^{2,3}, А.В. Кузиков^{1,2*}

¹ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: alexeykuzikov@gmail.com

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет),
117513 Москва, Россия

³ Институт междисциплинарных исследований Общества Макса Планка,
37077 Гёттинген, Германия

Поступила в редакцию 23.10.2024

После доработки 06.12.2024

Принята к публикации 10.12.2024

Разработан подход для определения каталитической активности главной протеазы SARS-CoV-2 (M^{pro}), основанный на регистрации площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептидного субстрата CGGGAVLQSGY, иммобилизованного на поверхности печатного графитового электрода (ПГЭ), модифицированного наночастицами золота (AuНЧ). AuНЧ были получены методом электросинтеза. Определены параметры стационарной кинетики M^{pro} по отношению к модельному пептиду: константа каталитическая (k_{cat}) – $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$; константа Михаэлиса (K_M) – $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ М}$; эффективность катализа (k_{cat}/K_M) – $8659 \text{ с}^{-1}/\text{М}$. Предел обнаружения (LOD) для M^{pro} с помощью разработанной электрохимической системы был определён как 44 нМ. Разработанный подход перспективен для поиска новых ингибиторов M^{pro} в качестве лекарственных препаратов для лечения коронавирусных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеаза M^{pro}, электроокисление тирозина, модифицированные электроды, наночастицы золота, модельный пептид.

DOI: 10.31857/S0320972525010095 EDN: CPGXII

ВВЕДЕНИЕ

Главные протеазы коронавирусов (M^{pro}), также известные как 3С-подобные протеазы (3CL^{pro}) или неструктурные белки 5 (Nsp5), являются высококонсервативными ферментами группы цистеиновых протеаз, играющих важную роль в жизненном цикле β -коронавирусов, в том числе коронавируса, вызывающего тяжёлый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2) [1, 2]. Функция данной группы ферментов состоит в посттрансляционном процессинге белков pp1a и pp1b, необходимых для процессов инвазии, репликации и транскрипции вирусов [1, 3, 4]. M^{pro} SARS-CoV-2 (EC 3.4.22.69) – гомодимерный фермент, на 96% идентичный M^{pro}

коронавируса тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) [5]. Этот фермент является перспективной мишенью для действия лекарственных препаратов для лечения коронавирусных инфекций [6]. M^{pro} обладает рядом уникальных свойств, что может быть использовано для разработки эффективных и селективных препаратов для лечения коронавирусных инфекций, в том числе коронавирусного инфекционного заболевания 2019 года (COVID-19), не оказывающих побочного эффекта на протеазы хозяина [2, 7–9]. Так, например, в связи с отсутствием гомологов M^{pro} среди протеаз в клетках человека, обладающих специфичностью, схожей с таковой для коронавирусной протеазы, перспективными соеди-

Принятые сокращения: ПГЭ – печатный графитовый электрод; AuНЧ – наночастицы золота; DABCYL – 4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензойная кислота; EDANS – 5-((2-аминоэтил)амино)нафтален-1-сульфоновая кислота; FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии.

* Адресат для корреспонденции.

нениями для лечения коронавирусных инфекций являются пептидомиметики [6]. Предполагается, что использование M^{pro} , имеющей высокую консервативность аминокислотной последовательности и структуры, в качестве мишени для терапии коронавирусных инфекций может позволить снизить риск устойчивости к терапии новых вариантов коронавирусов [10, 11]. В связи с необходимостью быстрого поиска эффективной стратегии фармакотерапии коронавирусных инфекций в условиях пандемии, ряд препаратов, ингибирующих M^{pro} , был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для применения в клинической практике. Однако многие из одобренных препаратов не соответствуют оптимальным параметрам биодоступности, токсичности и эффективности [12]. Более того, появление новых штаммов вирусов, в том числе имеющих мутантные формы M^{pro} , обуславливает их резистентность к одобренным препаратам и делает необходимым поиск новых противовирусных препаратов для лечения коронавирусных инфекций [12, 13].

Представленные в литературе значения кинетических параметров M^{pro} находятся в широком диапазоне. Отсутствие консенсуса о кинетических параметрах данного фермента усложняет объективную и точную оценку ингибиторных свойств новых соединений [7]. На данный момент существуют различные подходы к изучению свойств протеаз, основанные на использовании в качестве субстратов меченых пептидов [14]. Ранее для изучения кинетики M^{pro} были использованы методы, основанные на фёрстеровском резонансном переносе энергии (FRET) и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS), при этом последний подход характеризуется высокой трудоёмкостью [7]. Подходы с использованием FRET также имеют ряд недостатков, таких как искажение реальных значений кинетических параметров фермента из-за снижения фактической интенсивности флуоресценции вследствие межмолекулярных взаимодействий молекулы гасителя, 4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензойной кислоты (DABCYL), и флуорофора, 5-((2-аминоэтил)амино)нафтален-1-сульфоновой кислоты (EDANS) [1, 7]. Кроме того, использование субстратов, меченных парами гаситель-флуорофор, сопряжено с трудоёмким процессом их синтеза и низкой стабильностью при длительном хранении [1, 7, 15, 16]. В связи с этим представляется актуальной разработка новых, высокоэффективных и удобных в практическом использовании систем для определения протеазной активности M^{pro} , позволяющих охарактеризовать кинетические параметры данного фермента и проводить

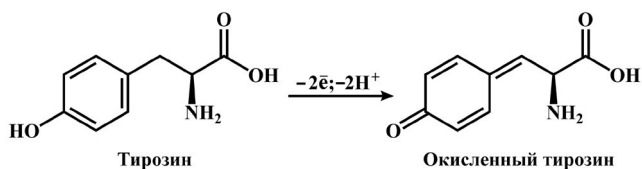


Схема 1. Предполагаемый механизм электрохимического окисления тирозина

анализ ингибиторной активности новых соединений, перспективных для лечения COVID-19 [1, 16, 17].

Электрохимические системы, основанные на использовании модельных пептидов для определения каталитической активности протеаз, имеют особое значение, поскольку обладают высокой чувствительностью и малым объёмом используемого аналита [16, 18, 19]. Распространённым принципом электрохимических систем для определения протеазной активности является подход «Signal-off», позволяющий регистрировать активность протеаз по снижению сигнала (тока и/или площади пика) электрохимического окисления или восстановления дополнительных редокс-меток, включённых в состав иммобилизованных на поверхности электрода пептидов. Несмотря на то что подобный подход широко применяется на практике, введение дополнительных меток в состав пептидов усложняет процесс их синтеза, а также может влиять на кинетические параметры ферментов и снижать стабильность аналитической системы [20–22]. Таким образом, актуальной задачей является разработка и повышение стабильности электрохимических систем без использования синтетических меток для определения активности протеаз.

Известно, что ряд аминокислот обладает способностью к необратимому электрохимическому окислению [23–27], что может быть использовано для регистрации каталитической активности протеаз электрохимическими методами. Так, тирозин подвергается электрохимическому окислению в соответствии со схемой 1.

Ранее мы разработали электрохимическую систему для определения активности и специфичности трипсина, основанную на регистрации уменьшения площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельных пептидов, иммобилизованных на поверхности печатного графитового электрода (ПГЭ), после их протеолитического расщепления [28]. Преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости введения дополнительной синтетической редокс-метки в процессе получения пептидов. Мы предположили, что аналогичный подход может быть применён для создания электрохимической системы для определения

активности М^{рго}. Таким образом, целью настоящей работы явилась разработка электрохимической системы для определения активности М^{рго}, основанной на регистрации площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В данной работе были использованы следующие реактивы: золотохлористоводородной (III) кислоты тригидрат от «Alfa Aesar» (Германия); дигидрофосфат калия ($\geq 99\%$), гидрофосфат калия тригидрат ($\geq 99\%$), хлорид натрия (99,5%) от «Acros Organics» (США); глицерин ($\geq 99\%$) от «PanReac AppliChem» (Испания); соляная кислота (30%) от «Sigma-Aldrich» (США); N-9-фторенил-метоксикарбонил (Fmoc)-аминокислоты ($\geq 99\%$), O-(1H-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (HCTU) ($\geq 98\%$), 2,4,6-триметилпиридин (TMP) ($\geq 99\%$), 4-метил-пиперидин (Mpip) ($\geq 98\%$) от «Novabiochem» (Германия); трифторуксусная кислота (99%), ацетонитрил ($\geq 99,9\%$) и анизол (99%) от «Sigma-Aldrich» (Германия); 3,6-диоксо-1,8-октандитиол (95%) от «Sigma-Aldrich» (США); триизопропилсилан (98%) от «Merck» (Германия); N,N-диметилформамид (DMF) ($\geq 99,9\%$), метил-трет-бутиловый эфир ($\geq 98\%$) и петролейный эфир 70-100 ($\geq 95\%$) от «ЭКОС-1» (Россия); М^{рго} коронавируса SARS-CoV-2 (рекомбинантный белок, лиофилизированный порошок, чистота по SDS-PAGE $\geq 90\%$) от «Sigma-Aldrich» (США), кат. # SAE0172. Леофилизированную М^{рго} разводили, в соответствии с рекомендацией производителя, в 100 мкл дистиллированной воды, содержащей 10% глицерина. Полученный раствор М^{рго} с концентрацией белка 59,2 мкМ разделяли на аликвоты и хранили при -20°C .

Синтез модельного пептида. Пептид с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY был получен методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-защищённых аминокислот в DMF, HCTU/TMP и Mpip на системе Overture («Protein Technologies», США), как было описано ранее [29]. Снятие защиты и отщепление пептида проводились путём инкубации с кислотным коктейлем (91,5% трифторуксусной кислоты, 2,5% анизол, 2,5% воды, 2,5% 3,6-диоксо-1,8-октандитиола, 1% триизопропилсилана) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем в раствор пептида добавляли восьмикратный объём смеси метил-трет-бутилового эфира и петролейного эфира (1 : 2 по объёму), полученную суспензию инкубировали в течение 30 мин при температуре -20°C . Далее суспензию пептида центрифуги-

ровали при 4°C и 4000 g в течение 10 мин, а затем удаляли супернатант и растворяли пептид в смеси вода-ацетонитрил (1 : 1 по объёму). Полученный раствор пептида анализировали с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией на хроматографе Agilent ChemStation 1200 Series с масс-спектрометром Agilent 1100 Series LC/MSD Trap XCT Ultra. Полученный пептид очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя хроматограф Agilent ChemStation 1200 Series с масс-спектрометром Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS.

Электроды и электрохимическое оборудование. В данной работе были использованы ПГЭ с графитовым рабочим (геометрическая площадь $0,0314\text{ см}^2$) и вспомогательным электродами, а также хлоридсеребряным (Ag/AgCl) электродом сравнения, полученные от «КолорЭлектроникс» (Москва, Россия).

Электрохимические измерения проводились с использованием потенциостата/гальваностата $\mu\text{Stat 400}$ («Metrohm Autolab BV», Нидерланды) с программным обеспечением DropView 8400.

Все потенциалы в работе приведены относительно Ag/AgCl электрода сравнения.

Модификация ПГЭ наночастицами золота (AuНЧ) и иммобилизация модельного пептида. AuНЧ для модификации рабочих ПГЭ были получены методом электросинтеза по методике, описанной ранее [30]. Кратко: в горизонтальном режиме на поверхность ПГЭ наносили 60 мкл 5 мМ HAuCl_4 в 0,1 М HCl. Электросинтез проводился при потенциале рабочего электрода $-0,5\text{ В}$ в течение 180 с. После проведения электросинтеза раствор смывался с поверхности электрода дистиллированной водой. Иммобилизация модельного пептида с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY на поверхности модифицированных AuНЧ рабочих электродов осуществлялась за счёт образования химических связей между меркаптогруппами N-концевых остатков цистеина молекул модельного пептида и AuНЧ. Для этого на поверхность модифицированных AuНЧ рабочих электродов наносили 50 мкл водного раствора пептида с концентрацией 0,5–6 мМ. Электроды с нанесённым раствором пептида инкубировались в течение 2 ч при 4°C . После инкубации электроды отмывались от несвязанного модельного пептида дистиллированной водой.

Определение протеазной активности М^{рго}. Определение протеазной активности М^{рго} проводилось по регистрации уменьшения площади пика электроокисления остатка тирозина в модельном пептиде CGGGAVLQSGY, иммобилизованном на поверхности ПГЭ, модифицированных AuНЧ (ПГЭ/AuНЧ), вследствие протеолитического

расщепления пептидной связи, образованной карбонильной группой остатка глутамина и аминокислотной группой остатка серина. Для этого на поверхность ПГЭ/АuНЧ с иммобилизованным пептидом наносили 25 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 20% глицерина (по объёму) и различные концентрации M^{pro} (0–1500 нМ). ПГЭ/АuНЧ инкубировались при 37 °С в диапазоне 300–1200 с. После инкубации раствор смывался с поверхности ПГЭ/АuНЧ дистиллированной водой. Далее, на ПГЭ/АuНЧ с иммобилизованным пептидом наносили 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, с последующей регистрацией методом циклической вольтамперометрии площади пика окисления остатков тирозина в области 0,55 В. Циклические вольтамперограммы регистрировались в диапазоне потенциалов от 0,35 до 0,7 В и скорости сканирования 50 мВ/с. Площади пиков, соответствующих окислению остатка тирозина иммобилизованного пептида, рассчитывались после приведения вольтамперометрической кривой к базовой линии с помощью программного обеспечения DropView 8400 к потенциостату/гальваностату. Все электрохимические измерения проводились при комнатной температуре (22 ± 3 °С).

Поверхностная концентрация электроактивного модельного пептида рассчитывалась по уравнению 1 [31]:

$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nFA}, \quad (1)$$

где Γ_0 – поверхностная концентрация электроактивного модельного пептида на поверхности электрода (моль/см²); Q – заряд, рассчитанный путём интегрирования окислительного пика остатка тирозина модельного пептида (Кл); n – количество электронов, участвующих в электрохимическом процессе (для остатка тирозина равно 2); F – постоянная Фарадея (96 485 Кл/моль); A – площадь поверхности электрода (см²).

Расчёт Γ_0 проводился в начальный момент времени и после время-зависимой инкубации иммобилизованного модельного пептида на ПГЭ/АuНЧ с ферментом ($\Gamma_{0,t}$).

Доля нерасщеплённого модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ/АuНЧ, выражалась как отношение $\Gamma_{0,t}$ к значению Γ_0 , умноженное на 100%, в соответствии с уравнением 2:

$$\text{Нерасщеплённый пептид, \%} = \frac{\Gamma_{0,t}}{\Gamma_0} \times 100\%, \quad (2)$$

где $\Gamma_{0,t}$ – поверхностная концентрация электроактивного пептида на поверхности ПГЭ/АuНЧ после время-зависимой инкубации с M^{pro} (моль/см²).

Доля расщеплённого модельного пептида после инкубации с M^{pro} (θ) рассчитывалась по уравнению 3 [32]:

$$\theta = 1 - \frac{\Gamma_{0,t}}{\Gamma_0}, \quad (3)$$

где θ – доля расщеплённого модельного пептида.

Зависимости θ от времени инкубации (t) иммобилизованного на ПГЭ/АuНЧ модельного пептида с различными концентрациями M^{pro} были аппроксимированы экспоненциальной функцией в соответствии с уравнением 4 [33]:

$$\theta = a[1 - e^{-tk_{eff}}], \quad (4)$$

где a – предельное значение доли расщеплённого пептида при индивидуальной концентрации M^{pro} , представляющее собой горизонтальную асимптоту, к которой стремится график зависимости θ от t при неполном расщеплении модельного пептида; e – экспонента (2,718); t – время инкубации (с); k_{eff} – эффективная константа скорости (с⁻¹).

Тангенсы начальных линейных участков зависимостей θ от t при каждой концентрации M^{pro} соответствовали значениям k_{eff} . Далее из зависимости k_{eff} от концентрации M^{pro} , аппроксимированной гиперболической функцией, были определены значения константы каталитической (k_{cat}) и константы Михаэлиса (K_M) в соответствии с уравнением 5 [32, 33]:

$$k_{eff} = \frac{k_{cat}}{1 + (K_M/[E])}, \quad (5)$$

где k_{cat} – константа каталитическая (с⁻¹), K_M – константа Михаэлиса (М), $[E]$ – концентрация фермента (М).

Математическая и статистическая обработка данных. Построение и анализ кривых выполнены с помощью программы OriginPro (версия 8.1). Статистическая обработка данных была произведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2019. Все измерения проводили не менее трёх раз. Представлены средние значения \pm стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн электрохимической системы для определения активности M^{pro} . Для разработки электрохимической системы были выбраны ПГЭ, модифицированные АuНЧ (ПГЭ/АuНЧ). ПГЭ позволяют проводить анализ ферментативной активности, не требующий трудоёмкой подготовки и позволяющий использовать небольшие объёмы аналита [34]. Возможность модификации ПГЭ наноматериалами позволяет создавать поверхность,

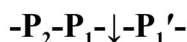


Схема 2. Фрагмент пептида, расщепляемого M^{pro} , где P_1 – остаток глутамина; P_1' – остаток аминокислоты, имеющей небольшой радикал (серин, аланин или глицин); P_2 – гидрофобный аминокислотный остаток (лейцин, фенилаланин или валин). Стрелкой показан сайт расщепления под действием M^{pro}

подходящую для иммобилизации биологических молекул, в том числе ферментов, миниатюризовать аналитическую систему, а также повысить её чувствительность и селективность [34]. AuНЧ обладают оптимальным набором физико-химических свойств, таких как электропроводимость, биосовместимость, а также удобство синтеза и функционализации путём формирования стабильных и прочных связей с тиольными группами биологических молекул [35–38]. В данной работе AuНЧ были получены методом электросинтеза на рабочем электроде при восстановлении $AuCl_4^-$ до $Au^0 + 4Cl^-$ из 60 мкл 5 мМ $HAuCl_4$ в 0,1 М HCl при потенциале $-0,5$ В в течение 180 с. Размер полученных AuНЧ на поверхности ПГЭ составлял 100–700 нм, что было показано нами ранее с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [28].

Нами была смоделирована последовательность пептида в качестве субстрата M^{pro} для последующей иммобилизации на поверхности ПГЭ/AuНЧ. В ряде работ была исследована субстратная специфичность M^{pro} и было показано, что фермент расщепляет пептидную связь, образованную карбонильной группой глутамина, при этом аминокислота должна принадлежать остатку аминокислоты, имеющей небольшой радикал (серин, аланин или глицин), и, кроме того, до остатка глутамина должен располагаться гидрофобный аминокислотный остаток (лейцин, фенилаланин или валин) [39–42] (схема 2). Остатки глутамина и аминокислот в положении P_1' и P_2 имеют наиболее важное значение для протеазной активно-

сти M^{pro} . Аминокислотные остатки, окружающие описанную консенсусную последовательность, менее консервативны и необходимы для распознавания и стабильного связывания субстрата. Показано, что последовательность AVLQS наиболее эффективно расщепляется M^{pro} в условиях *in vitro* [3, 43, 44].

Для иммобилизации пептида на поверхности ПГЭ/AuНЧ в аминокислотную последовательность смоделированного пептида был включён *N*-концевой остаток цистеина, таким образом, меркаптогруппа цистеина формировала химическую связь с AuНЧ [45, 46]. Последовательность аминокислот, выступающая в качестве природного спейсера, придаёт пептиду большую подвижность и обеспечивает более высокую плотность пептида, иммобилизованного на поверхности электрода [18, 47, 48], в связи с этим в модельный пептид были включены три остатка глицина. В качестве природной редокс-метки был выбран остаток тирозина, обладающий способностью подвергаться необратимому электрохимическому окислению, что может быть зарегистрировано электрохимическими методами [27, 49, 50]. Таким образом, был смоделирован и получен методом твердофазного синтеза пептид с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY, способный расщепляться под действием M^{pro} с образованием октапептида CGGGAVLQ и трипептида SGY.

Дизайн модификации электродов AuНЧ и иммобилизации пептида представлен на рис. 1.

После инкубации ПГЭ/AuНЧ с различными концентрациями пептида (0–6 мМ) и отмывки неиммобилизовавшихся молекул был зарегистрирован пик в области 0,55 В методом циклической вольтамперометрии, соответствующий электрохимическому окислению остатков тирозина молекул модельного пептида (рис. 2).

Известно, что высокая плотность пептида на поверхности электрода может приводить к стерическим ограничениям протеазного расщепления пептида, а также снижать соотношение

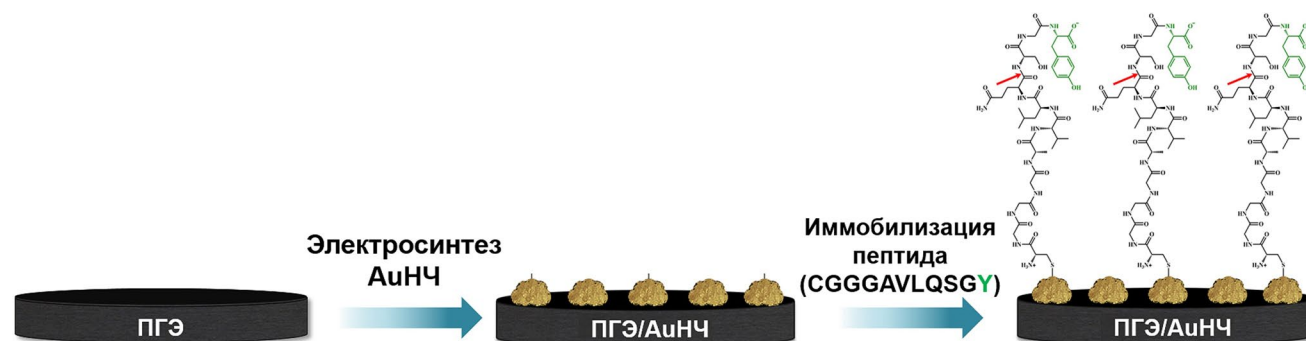


Рис. 1. Модификация ПГЭ AuНЧ, полученными электросинтезом, и иммобилизация модельного пептида CGGGAVLQSGY за счёт образования химической связи между меркаптогруппой цистеина и AuНЧ. Стрелкой показан сайт расщепления пептида под действием M^{pro}

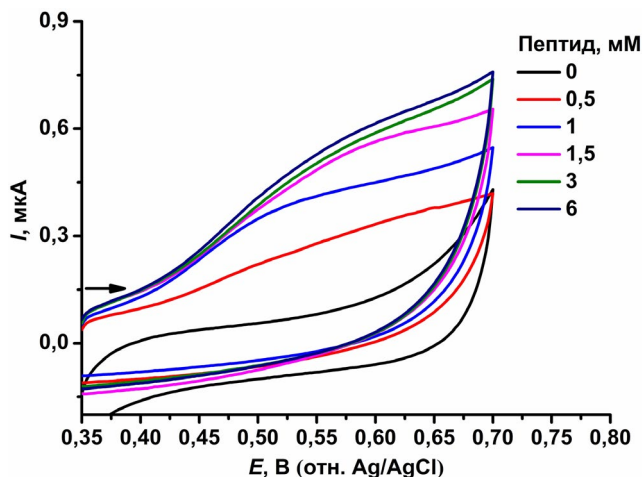


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы ПГЭ/AuНЧ после инкубации с различными концентрациями модельного пептида CGGGAVLQSGY (0–6 мМ) в течение 2 ч при 4 °С. Измерения проводились в 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с. Стрелка показывает направление сканирования

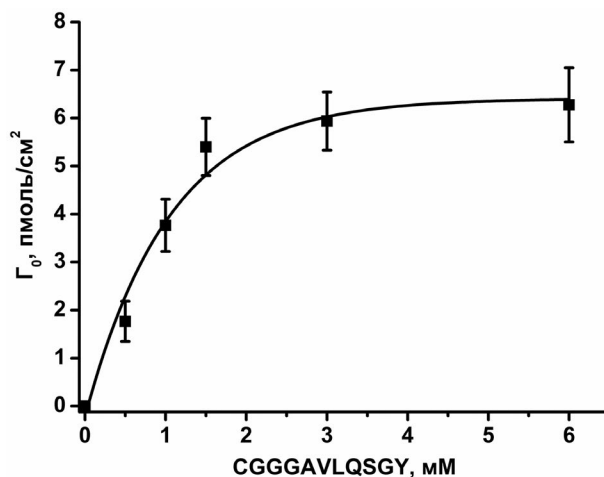


Рис. 3. Зависимость поверхностной концентрации (Γ_0) электроактивного пептида CGGGAVLQSGY от его концентрации в растворе, наносимом на ПГЭ/AuНЧ с последующей инкубацией в течение 2 ч при 4 °С. Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов \pm стандартные отклонения

сигнал/шум при электрохимических измерениях [51]. В работе Anne et al. при иммобилизации модельных пептидов на поверхности электродов Ultra-Flat TS-Gold Rotating Disc Electrodes для исследования активности трипсина и тромбина было показано, что при $\Gamma_0 < 10$ пмоль/см² достигается плотность пептида на поверхности электрода, способствующая эффективному протеолизу за счёт снижения вероятности межмолекулярных взаимодействий пептидов [32]. В связи с этим нами была проанализирована зависимость Γ_0 от концентрации пептида, наносимого на поверхность ПГЭ/AuНЧ для иммобилизации (рис. 3).

На основании зависимости, представленной на рис. 3, мы предположили, что 1,5 мМ концентрация пептида, наносимого на ПГЭ/AuНЧ, при которой достигается значение Γ_0 , равное $5,4 \pm 0,1$ пмоль/см², является оптимальной, поскольку при больших значениях Γ_0 плотность пептида на поверхности электрода может препятствовать эффективному протеазному расщеплению, а меньшей концентрации может быть недостаточно для регистрации кинетики ферментативной реакции из-за более быстрого истощения пептида. Таким образом, для дальнейшего исследования протеолитической активности M^{pro} была выбрана концентрация пептида, наносимого на ПГЭ/AuНЧ для его иммобилизации, равная 1,5 мМ.

Для оценки возможности электрохимической регистрации протеолитической активности M^{pro} мы провели инкубацию ПГЭ/AuНЧ с иммобилизованным пептидом в присутствии различных концентраций M^{pro} (0–1500 нМ) во временном

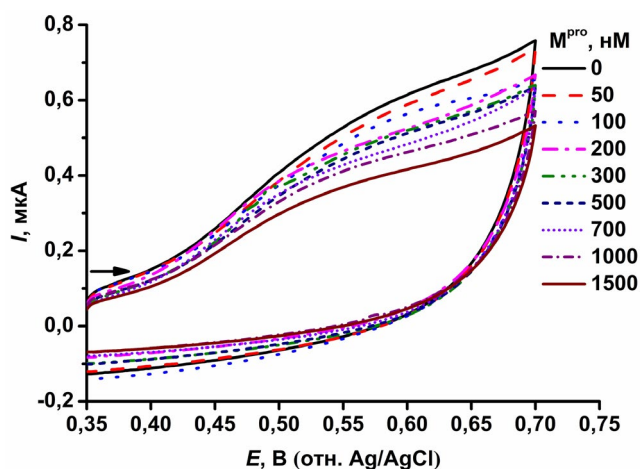


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы ПГЭ/AuНЧ с иммобилизованным модельным пептидом CGGGAVLQSGY после инкубации с различными концентрациями M^{pro} (0–1500 нМ) в течение 1200 с при 37 °С. Измерения проводились в 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с. Стрелка показывает направление сканирования

диапазоне 300–1200 с при 37 °С. Как видно на рис. 4, при увеличении концентрации фермента после инкубации в течение 1200 с регистрируется уменьшение тока и площади пика электрохимического окисления остатка тирозина в области 0,55 В, что свидетельствует о протеолитическом расщеплении пептида с высвобождением тирозин-содержащего фрагмента (SGY).

В соответствии с уравнением 2 мы определили значение доли нерасщеплённого пептида (%) при его инкубации с различными концентрация-

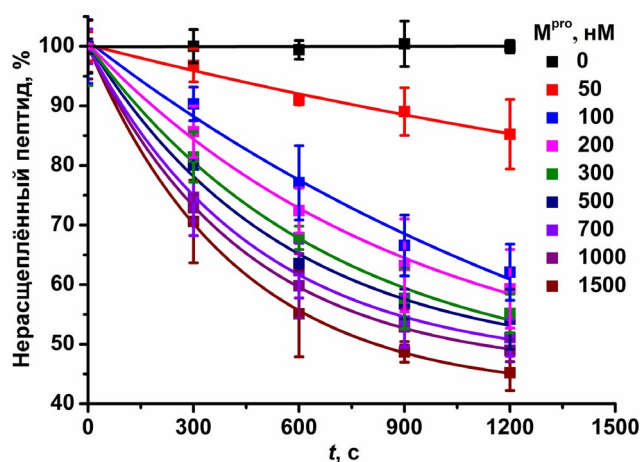


Рис. 5. Зависимости доли нерасщеплённого пептида CGGGAVLQSGY (%) от времени его инкубации (t) с различными концентрациями M^{pro} (0–1500 нМ). Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов \pm стандартные отклонения

ми M^{pro} (0–1500 нМ) в диапазоне 300–1200 с при 37 °C (рис. 5).

Из представленной зависимости доли нерасщеплённого пептида от t видно, что при увеличении концентрации M^{pro} увеличивается доля расщеплённого пептида (θ). При этом после инкубации ПГЭ/АuНЧ с иммобилизованным пептидом с раствором без M^{pro} практически не наблюдается снижения площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида в заданном диапазоне времени. Выбранный диапазон концентраций M^{pro} , при котором регистрируется время-зависимое расщепление пептида, был использован для дальнейшего определения кинетических параметров M^{pro} .

Таким образом, была показана возможность регистрации активности M^{pro} с помощью разработанной электрохимической системы.

Мы определили аналитические характеристики разработанной электрохимической системы. Зависимость доли нерасщеплённого пептида (%) от логарифма концентраций M^{pro} имела линейный характер и описывалась уравнением вида: $y = -(17,752 \pm 1,827)x + (101,19 \pm 4,69)$ со значением $R^2 = 0,9303$ (рис. 6). Из данного уравнения был рассчитан предел обнаружения (LOD) для M^{pro} с учётом трёхкратного стандартного отклонения среднего значения площади пика окисления тирозина (3σ) как 44 нМ. Коэффициент вариации (CV) был рассчитан как 7% ($n = 3$) для концентрации M^{pro} , равной 1500 нМ. Для сравнения, в работе Sondag et al. LOD для люминесцентного анализа с пептидным образцом, содержащим сайт специфического расщепления M^{pro} , находился в диапазоне 4–80 нМ [52], а в работе Xu et al. значение LOD составило 35 нМ для титрования с саморасщеп-

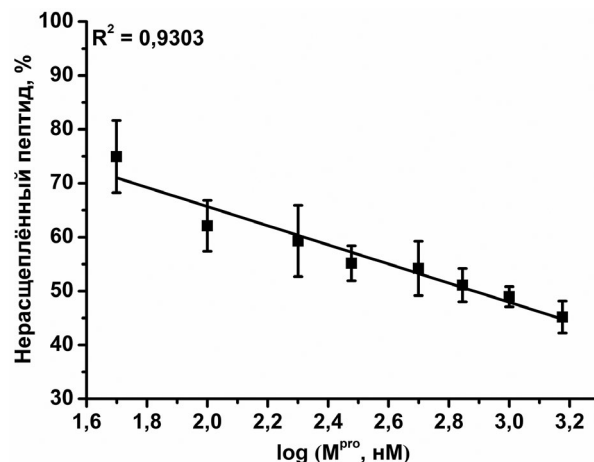


Рис. 6. Зависимость доли нерасщеплённого пептида (%) от логарифма концентраций M^{pro} . Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов \pm стандартные отклонения

ляющимся флуоресцентным субстратом для обнаружения M^{pro} [53].

Кинетический анализ протеазной активности M^{pro} . Для определения параметров стационарной кинетики M^{pro} по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY с помощью разработанной электрохимической системы применялась математическая модель для квазинасыщенных ферментных систем, в которых концентрация M^{pro} превышала значение концентрации иммобилизованного пептида [54]. Зависимость θ от t в подобных гетерогенных ферментных системах является экспоненциальной и описывается уравнением 6 [32]:

$$\theta = 1 - e^{-t k_{eff}}. \quad (6)$$

Однако для соответствия экспериментально полученных данных этому уравнению значение θ должно достигать 1, что соответствовало бы полному расщеплению иммобилизованного пептида. Поскольку в таких системах чаще всего не происходит полного расщепления иммобилизованного пептида, для аппроксимации зависимости θ от t было использовано уравнение 4, содержащее дополнительную переменную a , соответствующую максимально возможному значению доли расщеплённого пептида при заданной концентрации M^{pro} . Для иммобилизованного модельного пептида при различных концентрациях M^{pro} были получены зависимости θ от t , представленные на рис. 7.

Значение a после инкубации иммобилизованного на поверхности ПГЭ/АuНЧ модельного пептида в течение 1200 с при максимальной концентрации M^{pro} , равной 1500 нМ, было рассчитано как 0,582, что согласуется с предположением

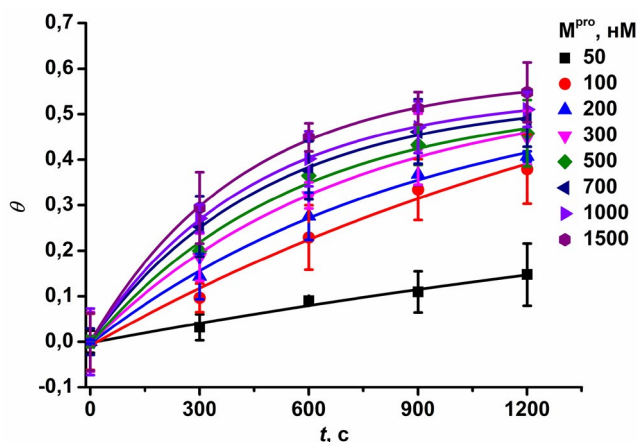


Рис. 7. Зависимости доли расщеплённого модельного пептида CGGGAVLQSGY под действием M^{pro} (θ) от времени инкубации (t) с различными концентрациями фермента (50–1500 нМ). Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов \pm стандартные отклонения

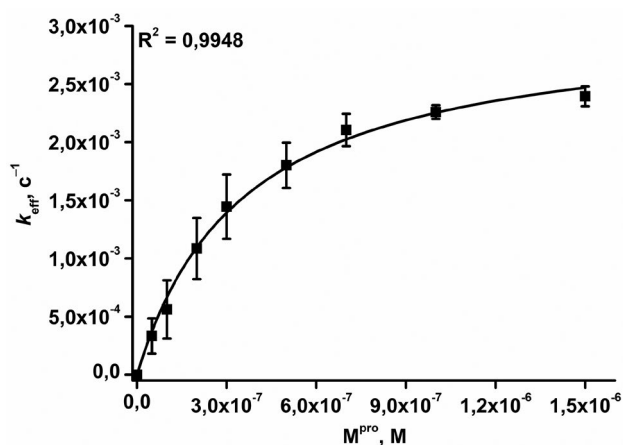


Рис. 8. Зависимость константы эффективной (k_{eff}) от концентрации M^{pro} , наносимой на поверхность ПГЭ/AuHЧ с иммобилизованным пептидом CGGGAVLQSGY. Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов \pm стандартные отклонения

о неполном расщеплении пептида. Неполное расщепление иммобилизованного пептида под действием фермента может объясняться стерическими ограничениями, возникающими из-за неравномерного покрытия пептидом структурно неоднородной поверхности рабочего электрода, а также наличия электрохимически инертных компонентов в составе рабочего электрода, способных влиять на кинетику гетерогенных электрохимических процессов [55]. Кроме того, известно, что протеазной активностью обладает димерная форма M^{pro} , тогда как мономерная форма обладает более низкой каталитической активностью или неактивна [56–58]. Таким образом, соотношение димерной и мономерной формы M^{pro} в растворе также может оказывать влияние на кинетику протеазного расщепления пептида в электрохимической системе.

Из полученных зависимостей θ от t были рассчитаны значения k_{eff} . Зависимость k_{eff} от концентрации M^{pro} имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9948$) и подчинялась уравнению 5, что характерно для гетерогенных систем (рис. 8).

Из полученной зависимости, представленной на рис. 8, были рассчитаны k_{cat} , K_M и эффективность катализа, выраженная как k_{cat}/K_M , которые соответствовали значениям $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ М}$ и $8659 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ соответственно. Мы сравнили кинетические параметры M^{pro} , полученные с помощью разработанной электрохимической системы, с аналогичными параметрами, полученными с помощью альтернативных систем для определения активности M^{pro} , основанных на использовании флуоресцентных методов и LC-MS. Так, в работе Sacco et al. с помощью метода FRET были получены кинетические параметры M^{pro} ,

M^{pro} с гистиридиновой меткой и M^{pro} , содержащей дополнительные N -концевые остатки гистидина и метионина, по отношению к пептидному субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS) [59]. Значения k_{cat} для этих ферментов находились в диапазоне от $0,01 \text{ с}^{-1}$ до $0,21 \text{ с}^{-1}$, значения K_M – от $27,8 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ до $53,1 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, значения k_{cat}/K_M – от $214 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ до $6689 \text{ с}^{-1}/\text{М}$. В работе Rut et al. аналогичные параметры были получены для M^{pro} по отношению к различным пептидам с флуоресцентными метками, в том числе содержащим непротеиногенные аминокислоты (Ac-Abu-Tle-LQ-ACC, Ac-Thz-Tle-LQ-ACC, Ac-VKLQ-ACC) [40]. Значения k_{cat} находились в диапазоне от $0,050 \text{ с}^{-1}$ до $0,178 \text{ с}^{-1}$, значения K_M – от $189,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ до $228,4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, значения k_{cat}/K_M – от $219 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ до $859 \text{ с}^{-1}/\text{М}$. Поскольку в данной работе M^{pro} обладала низкой активностью по отношению к тетрапептидам, авторы синтезировали более длинные пептидные субстраты ACC-G-Abu-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH₂, ACC-G-Thz-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH₂ и ACC-GVKLQSGFRK(DNP)K-NH₂, содержащие пары гаситель-флуорофор. Для соответствующих субстратов были рассчитаны значения k_{cat}/K_M , находящиеся в диапазоне от $6755 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ до $19\,424 \text{ с}^{-1}/\text{М}$. В работе Li et al. для определения кинетических параметров M^{pro} и меченой M^{pro} были применены методы FRET и LC-MS. При этом значения k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M , полученные с использованием FRET по отношению к FRET-субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS), были рассчитаны как $0,23 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$, $(34,2 \pm 4,8) \cdot 10^{-6} \text{ М}$ и $6800 \pm 976 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ для немеченого фермента соответственно и $0,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, $(139 \pm 22,2) \cdot 10^{-6} \text{ М}$ и $67,5 \pm 11,8 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ для меченого фермента соответственно [7]. Значения аналогичных параметров, полученных в данной работе для немеченой M^{pro} по отношению

Таблица 1. Параметры стационарной кинетики М^{рго}, полученные с помощью различных аналитических подходов

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , М	k_{cat}/K_M , с ⁻¹ /М	Субстрат	Ссылка
Флуоресцентные методы					
М ^{рго}	0,16	$(27,8 \pm 5,2) \cdot 10^{-6}$	5748	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[59]
	0,178 ± 0,016	$(207,3 \pm 12) \cdot 10^{-6}$	859 ± 57	Ac-Abu-Tle-LQ-ACC	[40]
	0,144 ± 0,006	$(189,5 \pm 2,7) \cdot 10^{-6}$	760 ± 50	Ac-Thz-Tle-LQ-ACC	
	0,050 ± 0,002	$(228,4 \pm 9,9) \cdot 10^{-6}$	219 ± 3	Ac-VKLQ-ACC	
	не приведены	не приведены	14 748 ± 684	ACC-G-Abu-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH ₂	
	не приведены	не приведены	19 424 ± 1176	ACC-G-Thz-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH ₂	
	не приведены	не приведены	6755 ± 208	ACC-GVKLQSGFRK(DNP)K-NH ₂	
	0,23 ± 0,01	$(34,2 \pm 4,8) \cdot 10^{-6}$	6800 ± 976	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[7]
Меченая М ^{рго}	$(0,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(139 \pm 22,2) \cdot 10^{-6}$	67,5 ± 11,8	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[7]
	0,21	$(30,9 \pm 3,8) \cdot 10^{-6}$	6689	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[59]
	0,01	$(53,1 \pm 8,1) \cdot 10^{-6}$	214	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	
	0,040	$11 \cdot 10^{-6}$	3640	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[60]
LC-MS					
М ^{рго}	2,2 ± 0,07	$(903,5 \pm 86,9) \cdot 10^{-6}$	2444 ± 248	TSAVLQSGFR	[7]
Электрохимические системы					
М ^{рго}	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(358 \pm 32) \cdot 10^{-9}$	8659	CGGGAVLQSGY	данная работа

Примечание. Abu – аминокислота; ACC – 7-амино-4-карбамоилметилкумарин; DNP – 2,4-динитрофенил; Thz – тиазолидин-4-карбоновая кислота; Tle – 2-амино-3,3-диметилмасляная кислота.

к пептиду TSAVLQSGFR с применением метода LC-MS, были рассчитаны как $2,2 \pm 0,07$ с⁻¹, $(903,5 \pm 86,9) \cdot 10^{-6}$ М и 2444 ± 248 с⁻¹/М соответственно. В работе Abian et al. значения k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M М^{рго} с гистиридиновой меткой по отношению к FRET-субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS) были рассчитаны как $0,040$ с⁻¹, $11 \cdot 10^{-6}$ М и 3640 с⁻¹/М соответственно [60]. В табл. 1 суммированы параметры стационарной кинетики, полученные с помощью альтернативных аналитических методов и электрохимической системы, разработанной нами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Коронавирусные протеазы, в частности, главная протеаза коронавирусов М^{рго}, являются потенциальной мишенью для терапии вирусных забо-

леваний, что обуславливает важность изучения свойств и поиска новых высокоэффективных ингибиторов этих ферментов. Существующие на сегодняшний день методы определения активности М^{рго} имеют ряд недостатков, среди которых необходимость использования меченых пептидных субстратов и высокая трудоёмкость аналитического процесса. В связи с этим разработка новых аналитических подходов к определению активности М^{рго} является актуальной задачей. Нами была разработана электрохимическая система для определения активности М^{рго}, основанная на регистрации методом циклической вольтамперометрии площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ/АuНЧ и используемого в качестве субстрата. Смоделированный пептид содержал N-концевой остаток цистеина для его ковалентной иммобилизации

на поверхности ПГЭ/AuНЧ, три остатка глицина в качестве спейсера, последовательность AVLQS (наиболее эффективно расщепляемую под действием M^{pro} по пептидной связи, образованной карбонильной группой остатка глутамина и аминокислотной группой остатка серина) и C-концевой дипептид, состоящий из остатков глицина и тирозина. Уменьшение площади пика электрохимического окисления остатка тирозина служило аналитическим сигналом каталитической активности M^{pro} . LOD в разработанной системе был сопоставим с аналогичным параметром других систем для определения активности M^{pro} . С помощью разработанного подхода нами были определены параметры стационарной кинетики M^{pro} по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY. Полученные нами значения k_{cat} и K_M для M^{pro} по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY отличались от аналогичных параметров, полученных с помощью других аналитических подходов. По-видимому, это связано с различной аминокислотной последовательностью пептидных субстратов, которые использовались в настоящей и вышеуказанных работах. Кроме того, в электрохимической системе пептидный субстрат находится в иммобилизованном на поверхности электрода состоянии. Однако значение k_{cat}/K_M для M^{pro} , которое было определено с помощью разработанной нами электрохимической системы, находится в диапазоне значений данного параметра, полученного с помощью вышеуказанных

альтернативных систем для определения активности M^{pro} (67,5–19 424 s^{-1}/M). Достоинством разработанного подхода является отсутствие необходимости включения дополнительной химической метки в пептидный субстрат. Мы полагаем, что разработанная электрохимическая система может быть использована для поиска новых ингибиторов M^{pro} , перспективных для лечения коронавирусных инфекций.

Вклад авторов. В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский, А.В. Кузиков – концепция и руководство исследованием; Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, Т.Е. Фарафонова, Ю.Ю. Худоклинова – проведение экспериментов; Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, А.В. Кузиков – написание текста статьи; Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, Т.Е. Фарафонова, Ю.Ю. Худоклинова, В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский, А.В. Кузиков – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период, 2021–2030 гг. (№ 122030100168-2).

Благодарности. В работе использовали оборудование ЦКП «Протеом человека» ИБМХ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan, H., Zhang, R., Yan, G., Liu, Z., Liu, X., Liu, X., and Chen, Y. (2023) Production of a versatile SARS-CoV-2 main protease biosensor based on a dimerization-dependent red fluorescent protein, *J. Med. Virol.*, **95**, e28342, <https://doi.org/10.1002/jmv.28342>.
2. Hu, Q., Xiong, Y., Zhu, G.-H., Zhang, Y.-N., Zhang, Y.-W., Huang, P., and Ge, G.-B. (2022) The SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19, *MedComm*, **3**, e151, <https://doi.org/10.1002/mco2.151>.
3. Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., Yang, X., and Yang, H. (2020), Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors, *Nature*, **582**, 289–293, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
4. Jin, Z., Mantri, Y., Retout, M., Cheng, Y., Zhou, J., Jorns, A., Fajtova, P., Yim, W., Moore, C., Xu, M., Creyer, M. N., Borum, R. M., Zhou, J., Wu, Z., He, T., Penny, W. F., O'Donoghue, A. J., and Jokerst, J. V. (2022) A charge-switchable zwitterionic peptide for rapid detection of SARS-CoV-2 main protease, *Angew. Chem.*, **134**, e202112995, <https://doi.org/10.1002/anie.202112995>.
5. Chan, H. T. H., Moesser, M. A., Walters, R. K., Malla, T. R., Twidale, R. M., John, T., Deeks, H. M., Johnston-Wood, T., Mikhailov, V., Sessions, R. B., Dawson, W., Salah, E., Lukacik, P., Strain-Damerell, C., Owen, C. D., Nakajima, T., Świderek, K., Lodola, A., Moliner, V., et al. (2021) Discovery of SARS-CoV-2 M^{pro} peptide inhibitors from modelling substrate and ligand binding, *Chem. Sci.*, **12**, 13686–13703, <https://doi.org/10.1039/d1sc03628a>.
6. Ullrich, S., and Nitsche, C. (2020) The SARS-CoV-2 main protease as drug target, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127377, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>.
7. Li, F., Fang, T., Guo, F., Zhao, Z., and Zhang, J. (2023) Comprehensive understanding of the kinetic behaviors of main protease from SARS-CoV-2 and SARS-CoV: new data and comparison to published parameters, *Molecules*, **28**, 4605, <https://doi.org/10.3390/molecules28124605>.

8. Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., and Christakopoulos, P. (2022) Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (M^{PRO}) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds, *Comput. Struct. Biotechnol.*, **20**, 1306-1344, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>.
9. Zhu, W., Xu, M., Chen, C. Z., Guo, H., Shen, M., Hu, X., Shinn, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S. G., and Zheng, W. (2020) Identification of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by a quantitative high-throughput screening, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **3**, 1008-1016, <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00108>.
10. Parigger, L., Krassnigg, A., Schopper, T., Singh, A., Tappler, K., Köchl, K., Hetmann, M., Gruber, K., Steinkellner, G., and Gruber, C. C. (2022) Recent changes in the mutational dynamics of the SARS-CoV-2 main protease substantiate the danger of emerging resistance to antiviral drugs, *Front. Med.*, **9**, 1061142, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1061142>.
11. Eberle, R. J., Sevenich, M., Gering, I., Scharbert, L., Strodel, B., Lakomek, N. A., Santur, K., Mohrlüder, J., Coronado, M. A., and Willbold, D. (2023) Discovery of all-d-peptide inhibitors of SARS-CoV-2 3C-like protease, *ACS Chem. Biol.*, **18**, 315-330, <https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00735>.
12. Huang, C., Shuai, H., Qiao, J., Hou, Y., Zeng, R., Xia, A., Xie, L., Fang, Z., Li, Y., Yoon, C., Huang, Q., Hu, B., You, J., Quan, B., Zhao, X., Guo, N., Zhang, S., Ma, R., Zhang, J., Wang, Y., and Yang, S. (2023) A new generation M^{PRO} inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 Omicron variants, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, 128, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01392-w>.
13. Chatterjee, S., Bhattacharya, M., Dhama, K., Lee, S.-S., and Chakraborty, C. (2023) Resistance to nirmatrelvir due to mutations in the M^{PRO} in the subvariants of SARS-CoV-2 Omicron: another concern? *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **32**, 263-266, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.013>.
14. Rodriguez-Rios, M., Megia-Fernandez, A., Norman, D. J., and Bradley, M. (2022) Peptide probes for proteases – innovations and applications for monitoring proteolytic activity, *Chem. Soc. Rev.*, **51**, 2081-2120, <https://doi.org/10.1039/d1cs00798j>.
15. Feng, Y., Liu, G., La, M., and Liu, L. (2022) Colorimetric and electrochemical methods for the detection of SARS-CoV-2 main protease by peptide-triggered assembly of gold nanoparticles, *Molecules*, **27**, 615, <https://doi.org/10.3390/molecules27030615>.
16. Zhang, Q., Liu, G., and Ou, L. (2022) Electrochemical biosensor for the detection of SARS-CoV-2 main protease and its inhibitor ebiselen, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **17**, 220421, <https://doi.org/10.20964/2022.04.19>.
17. Legare, S., Heide, F., Bailey-Elkin, B. A., and Stetefeld, J. (2022) Improved SARS-CoV-2 main protease high-throughput screening assay using a 5-carboxyfluorescein substrate, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101739, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101739>.
18. Escobar, V., Scaramozzino, N., Vidic, J., Buhot, A., Mathey, R., Chaix, C., and Hou, Y. (2023) Recent advances on peptide-based biosensors and electronic noses for foodborne pathogen detection, *Biosensors*, **13**, 258, <https://doi.org/10.3390/bios13020258>.
19. Filippova, T. A., Masamrekh, R. A., Khudoklinova, Y. Y., Shumyantseva, V. V., and Kuzikov, A. V. (2024) The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for investigation of their catalytic activity, *Biochimie*, **222**, 169-194, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.03.006>.
20. Zambry, N. S., Obande, G. A., Khalid, M. F., Bustami, Y., Hamzah, H. H., Awang, M. S., Aziah, I., and Manaf, A. A. (2022) Utilizing electrochemical-based sensing approaches for the detection of SARS-CoV-2 in clinical samples: a review, *Biosensors*, **12**, 473, <https://doi.org/10.3390/bios12070473>.
21. Lipińska, W., Grochowska, K., and Siuzdak, K. (2021) Enzyme immobilization on gold nanoparticles for electrochemical glucose biosensors, *Nanomaterials*, **11**, 1156, <https://doi.org/10.3390/nano11051156>.
22. Sanko, V., and Kuralay, F. (2023) Label-free electrochemical biosensor platforms for cancer diagnosis: recent achievements and challenges, *Biosensors*, **13**, 333, <https://doi.org/10.3390/bios13030333>.
23. Brabec, V., and Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.*, **625**, 43-50, [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).
24. Brabec, V., and Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids, *Biophys. Chem.*, **12**, 159-165, [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(80\)80048-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(80)80048-2).
25. Reynaud, J. A., Malfoy, B., and Bere, A. (1980) The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **116**, 595-606, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80281-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80281-6).
26. Reynaud, J. A., Malfoy, B., and Canesson, P. (1980) Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **114**, 195-211, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80447-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80447-5).
27. Shumyantseva, V. V., Suprun, E. V., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2014) Electrochemical methods for detection of post-translational modifications of proteins, *Biosens. Bioelectron.*, **61**, 131-139, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.001>.

28. Filippova, T. A., Masamrek, R. A., Shumyantseva, V. V., Latsis, I. A., Farafonova, T. E., Ilina, I. Y., Kanashenko, S. L., Moshkovskii, S. A., and Kuzikov, A. V. (2023) Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide, *Talanta*, **257**, 124341, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124341>.
29. Hood, C. A., Fuentes, G., Patel, H., Page, K., Menakuru, M., and Park, J. H. (2008) Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU, *J. Pept. Sci.*, **14**, 97-101, <https://doi.org/10.1002/psc.921>.
30. Shumkov, A. A., Suprun, E. V., Shatinina, S. Z., Lisitsa, A. V., Shumyantseva, V. V., and Archakov, A. I. (2013) Gold and silver nanoparticles for electrochemical detection of cardiac troponin I based on stripping voltammetry, *Bionanoscience*, **3**, 216-222, <https://doi.org/10.1007/s12668-013-0090-9>.
31. Rusling, J. F., Wang, B., and Yun, S. (2008) Electrochemistry of redox enzymes, in *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, Wiley, pp. 39-85, <https://doi.org/10.1002/9780470753842.ch2>.
32. Anne, A., Chovin, A., and Demaille, C. (2012) Optimizing electrode-attached redox-peptide systems for kinetic characterization of protease action on immobilized substrates. Observation of dissimilar behavior of trypsin and thrombin enzymes, *Langmuir*, **28**, 8804-8813, <https://doi.org/10.1021/la301316r>.
33. Ucar, A., González-Fernández, E., Staderini, M., Avlonitis, N., Murray, A. F., Bradley, M., and Mount, A. R. (2020) Miniaturisation of a peptide-based electrochemical protease activity sensor using platinum microelectrodes, *Analyst*, **145**, 975-982, <https://doi.org/10.1039/c9an02321f>.
34. Paimard, G., Ghasali, E., and Baeza, M. (2023) Screen-printed electrodes: fabrication, modification, and biosensing applications, *Chemosensors*, **11**, 113, <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>.
35. Icimoto, M. Y., Brito, A. M. M., Ramos, M. P. C., Oliveira, V., and Nantes-Cardoso, I. L. (2020) Increased stability of oligopeptidases immobilized on gold nanoparticles, *Catalysts*, **10**, 78, <https://doi.org/10.3390/catal10010078>.
36. Kamal, N. N. A., Anuar, N. S., Noordin, R., Rahumatullah, A., and Hamzah, H. H. (2022) Electrodeposited gold nanoparticle (AuNP)-film as a nanoplatform for a label-free electrochemical strongyloidiasis immunosensor, *J. Electrochem. Soc.*, **169**, 106514, <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac9434>.
37. Soldatkin, O. O., Soldatkina, O. V., Piliponskiy, I. I., Rieznicenko, L. S., Gruzina, T. G., Dybkova, S. M., Dzyadevych, S. V., and Soldatkin, A. P. (2022) Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors, *Appl. Nanosci.*, **12**, 995-1003, <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01807-6>.
38. Kilic, N. M., Singh, S., Keles, G., Cinti, S., Kurbanoglu, S., and Odaci, D. (2023) Novel approaches to enzyme-based electrochemical nanobiosensors, *Biosensors*, **13**, 622, <https://doi.org/10.3390/bios13060622>.
39. Zakharova, M. Y., 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., et al. (2021) Pre-steady-state kinetics of the SARS-CoV-2 main protease as a powerful tool for antiviral drug discovery, *Front. Pharmacol.*, **12**, 773198, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.773198>.
40. Rut, W., Groborz, K., Zhang, L., Sun, X., Zmudzinski, M., Pawlik, B., Wang, X., Jochmans, D., Neyts, J., Młynarski, W., Hilgenfeld, R., and Drag, M. (2021) SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 222-228, <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00689-z>.
41. Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., and Hilgenfeld, R. (2020) Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors, *Science*, **368**, 409-412, <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
42. Melano, I., Lo, Y.-C., and Su, W.-C. (2023) Characterization of host substrates of SARS-CoV-2 main protease, *Front. Microbiol.*, **14**, 1251705, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251705>.
43. Dey-Rao, R., Smith, G. R., Timilsina, U., Falls, Z., Samudrala, R., Stavrou, S., and Melendy, T. (2021) A fluorescence-based, gain-of-signal, live cell system to evaluate SARS-CoV-2 main protease inhibition, *Antiviral Res.*, **195**, 105183, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105183>.
44. Hartini, Y., Saputra, B., Wahono, B., Auw, Z., Indayani, F., Adelya, L., Namba, G., and Hariono, M. (2021) Biflavonoid as potential 3-chymotrypsin-like protease (3CL^{pro}) inhibitor of SARS-Coronavirus, *Results Chem.*, **3**, 100087, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100087>.
45. Park, J., and Kim, M. (2015) Strategies in protein immobilization on a gold surface, *Appl. Sci. Conver. Technol.*, **24**, 1-8, <https://doi.org/10.5757/ASCT.2015.24.1.1>.
46. Gatto, E., and Venanzi, M. (2013) Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: a new tool for bioinspired nanotechnology, *Polym. J.*, **45**, 468-480, <https://doi.org/10.1038/pj.2013.27>.
47. Snir, E., Amit, E., Friedler, A., and Yitzchaik, S. (2015) A highly sensitive square wave voltammetry based biosensor for kinase activity measurements, *Biopolymers*, **104**, 515-520, <https://doi.org/10.1002/bip.22653>.
48. Taraballi, F., Natalello, A., Campione, M., Villa, O., Doglia, S. M., Paleari, A., and Gelain, F. (2010) Glycine-spacers influence functional motifs exposure and self-assembling propensity of functionalized substrates tailored for neural stem cell cultures, *Front. Neuroeng.*, **3**, 1161, <https://doi.org/10.3389/neuro.16.001.2010>.
49. Suprun, E. V., Shumyantseva, V. V., and Archakov, A. I. (2014) Protein electrochemistry: application in medicine. A review, *Electrochim. Acta*, **140**, 72-82, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.089>.

50. Moulalee, K., and Neri, G. (2021) Electrochemical amino acid sensing: a review on challenges and achievements, *Biosensors*, **11**, 502, <https://doi.org/10.3390/bios11120502>.
51. Anderson, M. J., Song, Y., Fan, H., Wright, J. G., Ren, Z., Hua, D. H., Koehne, J. E., Meyyappan, M., and Li, J. (2020) Simultaneous, multiplex quantification of protease activities using a gold microelectrode array, *Biosens. Bioelectron.*, **165**, 112330, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112330>.
52. Sondag, D., Merx, J., Rossing, E., Boltje, T. J., Löwik, D. W. P. M., Nelissen, F. H. T. M. van Geffen, van't Veer, C., van Heerde, W. L., and Rutjes, F. P. J. T. (2022) Luminescent assay for the screening of SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors, *Chembiochem*, **23**, e202200190, <https://doi.org/10.1002/cbic.202200190>.
53. Xu, M., Zhou, J., Cheng, Y., Jin, Z., Clark, A. E., He, T., Yim, W., Li, Y., Chang, Y.-C., Wu, Z., Fajtová, P., O'Donoghue, A. J., Carlin, A. F., Todd, M. D., and Jokerst, J. V. (2022) A self-immolative fluorescent probe for selective detection of SARS-CoV-2 main protease, *Anal. Chem.*, **94**, 11728-11733, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02381>.
54. Gutiérrez, O. A., Salas, E., Hernández, Y., Lissi, E. A., Castrillo, G., Reyes, O., Garay, H., Aguilar, A., García, B., Otero, A., Chavez, M. A., and Duarte, C. A. (2002) An immunoenzymatic solid-phase assay for quantitative determination of HIV-1 protease activity, *Anal. Biochem.*, **307**, 18-24, [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00009-x](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00009-x).
55. Lee, J., Arrigan, D. W. M., and Silvester, D. S. (2016) Mechanical polishing as an improved surface treatment for platinum screen-printed electrodes, *Sensing BioSensing Res.*, **9**, 38-44, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.05.006>.
56. Nashed, N. T., Aniana, A., Ghirlando, R., Chiliveri, S. C., and Louis, J. M. (2022) Modulation of the monomer-dimer equilibrium and catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease by a transition-state analog inhibitor, *Commun. Biol.*, **5**, 160, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03084-7>.
57. Rebetez, T. (2022) SARS-CoV-2 main protease: a kinetic approach, *J. Phys. Chem. Biophys.*, **12**, 331, <https://doi.org/10.35248/2161-0398.22.12.331>.
58. Davis, D. A., Bulut, H., Shrestha, P., Yaparla, A., Jaeger, H. K., Hattori, S.-I., Wingfield, P. T., Mieyal, J. J., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (2021) Regulation of the dimerization and activity of SARS-CoV-2 main protease through reversible glutathionylation of cysteine 300, *MBio*, **12**, e0209421, <https://doi.org/10.1128/mBio.02094-21>.
59. Sacco, M. D., Ma, C., Lagarias, P., Gao, A., Townsend, J. A., Meng, X., Dube, P., Zhang, X., Hu, Y., Kitamura, N., Hurst, B., et al. (2020) Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveals strategy for developing dual inhibitors against M^{pro} and cathepsin L, *Sci. Adv.*, **6**, eabe0751, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0751>.
60. Abian, O., Ortega-Alarcon, D., Jimenez-Alesanco, A., Ceballos-Laita, L., Vega, S., Reyburn, H. T., Rizzuti, B., and Velazquez-Campoy, A. (2020) Structural stability of SARS-CoV-2 3CL^{pro} and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 1693-1703, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.235>.

DETERMINATION OF SARS-CoV-2 MAIN PROTEASE (M^{pro}) ACTIVITY BASED ON ELECTROOXIDATION OF THE TYROSINE RESIDUE OF A MODEL PEPTIDE

T. A. Filippova^{1,2}, R. A. Masamrekh^{1,2}, T. E. Farafonova¹, Yu. Yu. Khudoklinova²,
V. V. Shumyantseva^{1,2}, S. A. Moshkovskii^{2,3}, and A. V. Kuzikov^{1,2*}

¹ Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; e-mail: alexeykuzikov@gmail.com

² N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117513 Moscow, Russia

³ Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences, 37077 Göttingen, Germany

The proposed approach for determining the catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) is based on the registration of the peak area of the electrochemical oxidation of the tyrosine residue of the model peptide substrate CGGGAVLQSGY immobilized on the surface of a graphite screen-printed electrode (SPE) modified with gold nanoparticles (AuNP). The AuNP were obtained by electrosynthesis. The steady state kinetic parameters of M^{pro} towards the model peptide were determined: catalytic constant (k_{cat}) was $(3.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; Michaelis constant (K_M) was $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ M}$; catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) was $8659 \text{ s}^{-1}/\text{M}$. The limit of detection (LOD) determined for M^{pro} using the proposed electrochemical system was 44 nM. The proposed approach is a promising tool to search for new M^{pro} inhibitors as drugs for the treatment of coronavirus infections.

Keywords: M^{pro} protease, tyrosine electrooxidation, screen-printed electrodes, gold nanoparticles, model peptide