

Wybuch pandemii COVID-19 oraz ciągły wzrost liczby nowych wariantów koronawirusa pokazują jak ważne jest poszukiwanie nowych, skutecznych leków przeciwwirusowych. Jeden ze skutecznych celów terapii przeciwwirusowej stanowią dwa białka kodowane przez wirusa SARS-CoV-2 proteazy M<sup>pro</sup> i PL<sup>pro</sup>, których aktywność jest niezbędna do namnażania się wirusa i infekcji ludzkich komórek. Zahamowanie aktywności tych dwóch białek prowadzi do zahamowania infekcji wirusowej. Wiele metod zostało wykorzystanych do identyfikacji potencjalnych związków hamujących aktywność wirusowych białek tzw. inhibitorów. Znaczny postęp nastąpił w przypadku poszukiwania inhibitorów proteazy M<sup>pro</sup> – związek zaprojektowany przez firmę Pfizer - Paxlovid został zaakceptowany jako lek. Poszukiwanie skutecznych inhibitorów drugiej proteazy – PL<sup>pro</sup> stanowi większe wyzwanie dla naukowców. Trudność ta wynika z preferencji substratowej SARS-CoV-2 PL<sup>pro</sup> oraz pełnionych przez nią funkcji. Enzym ten blokuje mechanizmy obronne organizmu przed tym patogenem, umożliwiając wirusowi skuteczną inwazję komórek gospodarza. Do tej pory tylko kilka związków zostało zidentyfikowanych jako potencjalne związki hamujące aktywność PL<sup>pro</sup> w testach komórkowych. Głównym czynnikiem limitującym prowadzenie badań na zainfekowanych wirusem komórkach są wymogi klasy bezpieczeństwa laboratorium, w którym wykonywane są tego typu badania (klasa 3), co znacznie ogranicza ilość związków, które mogą zostać przetestowane. Natomiast badania wykonywane z użyciem rekombinowanych białek nie odzwierciedlają warunków panujących w komórce, co powoduje iż zidentyfikowane w tych testach inhibitory są bardzo często nieskuteczne w testach komórkowych. Rozwiązaniem tego problemu jest opracowanie testu komórkowego umożliwiającego pomiar siły hamowania proteazy SARS-CoV-2 PL<sup>pro</sup> w laboratorium klasy 2 co stanowi cel niniejszego projektu. Osiągnięcie tego celu możliwe jest poprzez zaprojektowanie tzw. markera chemicznego czyli związku który selektywnie będzie wiązał się z proteazą PL<sup>pro</sup> i umożliwiał detekcję tego kompleksu. Struktura markera chemicznego będzie opierała się na białku rozpoznawanym przez proteazę PL<sup>pro</sup> – ubikwitynie.

Realizacja powyższego celu badawczego będzie polegała na modyfikacji C-końcowego fragmentu ubikwityny. W celu wyboru aminokwasów, które będą wprowadzone do C-końca, zostaną określone preferencje substratowe PL<sup>pro</sup>. Aktywność i selektywność zaprojektowanych markerów chemicznych zostaną określone w badaniach z użyciem rekombinowanych enzymów i w testach komórkowych. W ostatnim etapie badań zostanie opracowany test komórkowy umożliwiający pomiar aktywności inhibitorów proteazy PL<sup>pro</sup> z użyciem zaprojektowanego markera chemicznego.

Opracowany test komórkowy do pomiaru wewnątrzkomórkowej aktywności inhibitorów SARS-CoV-2 PL<sup>pro</sup> pozwoli na wyeliminowanie związków toksycznych lub nieprzepuszczalnych przez błony komórkowe. Jego wykorzystanie powinno znacznie przyspieszyć proces poszukiwania skutecznych leków przeciwwirusowych. Ponadto, opracowany marker chemiczny będzie mógł zostać wykorzystany do pomiaru aktywności proteazy PL<sup>pro</sup> w komórkach zainfekowanych wirusem SARS-CoV-2, co pozwoli na lepsze zrozumienie jej funkcji.