



Data do relatório: 16/07/2021

## RELATÓRIO EXECUTIVO DO PROJETO

Nome do projeto	Prospecção de moléculas inibidoras das proteases quimiopripsina-like protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) com atividade antiviral contra o Sars-Cov-2		
FAPEDF	FINATEC	UNB	
IAZABELA MARQUES DOURADO			
BASTOS			
TOA nº	00193-000000528/2020-29	MSEI	
FAPEDF			12 Meses
RS 390.000,00			31/07/2020
			10/09/2021

RESUMO DO PROJETO		Indicadores de Desempenho		
Objeto	Objetivo	NOK	ATENÇÃO	OK
Objeto	Expressar e purificar as proteases quimiopripsina-like protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro), bem como realizar a prospecção de moléculas inibidoras (naturais e/ou sintéticas) para as referidas proteases e avaliar a atividade antiviral dos compostos com melhores atividades inibidoras.		X	
Metas	M1- Produção das enzimas recombinantes M2- Ensaios de inibição enzimática e caracterização dos inibidores para os ensaios M3- Ensaios antivirais			X

Principais etapas programadas	Data Prevista	Estágio atual	Status
Etapas 1: síntese de plasmídeos contendo o gene Mpro ou PLpro (Meta 1).	10/11/20	Os plasmídeos foram entregues no dia 22/01/2021, porém, após os primeiros testes, constatamos que um deles apresentou erro na síntese. A empresa já enviou o plasmídeo mas ainda não recebemos no laboratório.	Concluído
Etapas 2: obtenção de moléculas (decoys essenciais, moléculas oriundas da química do Museu Nacional de História Natural de Paris e moléculas resultantes de triagem virtual) para avaliar o potencial inibitório das proteases PLpro e Mpro.	30/01/21	Decoys essenciais a serem adquiridas já foram escolhidas, bem como os inibidores (controle) das duas proteases. Os substratos das proteases Mpro e PL-pro também já foram selecionados. Esta etapa foi iniciada, mas devido ao problema com um plasmídeo, somente o estudo da Mpro está em andamento.	Em processo de aquisição.
Etapas 3: expressão e purificação das enzimas recombinantes (Meta 1)	20/07/21	Estamos com dificuldades técnicas de obter a proteína recombinante da Mpro, por isso estamos priorizando a triagem experimental. Esta etapa será iniciada após a etapa 3. Etapas de triagem computacional já iniciada: 1) catalogação das estruturas químicas dos compostos da biblioteca do MNHN; 2) preparação dos compostos, para realização dos cálculos de docking molecular; 3) análise e seleção das estruturas 3D e conformações das enzimas Mpro e PLpro disponíveis no Protein Data Bank.	Iniciado
Etapas 4: triagem dos compostos fornecidos pela biblioteca de compostos do MNHN e decoys essenciais pelos ensaios de inibição enzimática (Meta 2). Triagem computacional (virtual screening) das proteases com base nessa referida biblioteca.	10/08/21		em desenvolvimento
Etapas 5: Determinar o valor da concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC50) dos compostos mais promissores provenientes da etapa de triagem. (Meta 2)	20/08/20	Triagem experimental será iniciada após a etapa 3.	Não iniciado
Etapas 6: Realizar a caracterização bioquímica dos melhores inibidores (Meta 2)	30/08/21	será iniciada após a etapa 5	Não iniciado
Etapas 7 - Realizar ensaios antivirais dos compostos com melhores atividade inibitórias (Meta 3).	10/09/21	será iniciada após a etapa 6	Não iniciado

Descrição do aspecto	Nível de risco	Relatório / Proposta de Resposta / Priorização	Responsável
Atraso na conclusão da Meta 1, devido a problemas técnicos identificados no caso da PLpro, que consistiu no erro de síntese de plasmídeos, por parte da empresa contratada. Com relação a Mpro, identificamos que houve outro erro de síntese por parte da empresa.	baixo	estamos trabalhando para identificar a falha na expressão das proteínas recombinantes. Possível erro de síntese, como já constatado previamente.	

### PRINCIPAIS AÇÕES REALIZADAS (PERÍODO ANTERIOR)

Neste período, foram realizadas reuniões semanais com a equipe de pesquisadores e estudantes para atualizações periódicas do trabalho. Realizamos a triagem virtual baseada em docking dos compostos da química do MNHN contra uma estrutura tridimensional da proteína PLpro. Além de priorizar compostos, os cálculos de docking molecular contribuíram para elucidar o modo de ligação dos inibidores, e determinação do mecanismo catalítico. Etapas da triagem computacional: 1) preparação das estruturas químicas dos compostos da biblioteca do MNHN (fórmula de propriedades químicas e verificação de duplicatas); 2) preparação dos compostos, para realização dos cálculos de docking molecular (geração de estruturas 3D, conformações e tautômeros em pH 7,4); 3) análise e seleção das estruturas 3D da enzima PLpro disponíveis no Protein Data Bank (análise de componentes principais e classificação das estruturas); 4) seleção das estruturas 3D da PLpro PDB ID 7JN2 e 7LBR para realização de ensemble docking; 5) preparação da estrutura 3D PDB ID 7JN2 (protonação de resíduos em pH 7,4); 6) preparação do grid de docking no sítio da B12 loop; 7) realização dos cálculos de docking para estrutura 7JN2 nos programas DockThor e Glide; 8) análises dos top 10% melhores resultados de docking de cada programa; 9) catalogação de inibidores da PLpro experimentalmente testados; 10) validação do docking com compostos ativos da PLpro e decoys e cálculos dos parâmetros de validação.

### PRINCIPAIS AÇÕES PLANEJADAS (PRÓXIMO PERÍODO)

As próximas etapas serão: 1) preparação da estrutura 3D PDB ID 7LBR (protonação de resíduos em pH 7,4); 2) realização dos cálculos de docking para estrutura 7LBR nos programas DockThor e Glide; 3) análises dos top 10% melhores resultados de docking de cada programa; 4) análise de consenso dos resultados de docking de ambas estruturas 7JN2 e 7LBR da PLpro, nos dois programas; 5) priorização de compostos; 6) predição da atividade dos compostos em modelos QSAR fenotípico de SARS-CoV-2; 7) realização dos ensaios enzimáticos; 8) expressão das proteases recombinantes.

### INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA STAKEHOLDERS