



Data do relatório: 20/08/2021

RELATÓRIO EXECUTIVO DO PROJETO

Nome do projeto	Prospecção de moléculas inibitórias das proteases quimiotripsina-like protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro), com atividade antiviral contra o Sars-Cov2				
Partícipe(s)	FAPDF, FINATEC, UnB				
Coordenador	IZABELA MARQUES DOURADO BASTOS	Instrumento jurídico	TOA nº 00193-00000529/2020-29		Nº SEI
Demandante(s)	FAPDF	Vigência do projeto	12 Meses		
Valor do projeto	R\$ 390.000,00	Data assinatura	31/07/2020		(previsão) 10/09/2021

RESUMO DO PROJETO

Objeto	Expressar e purificar as proteases quimiotripsinalike protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro), bem como realizar a prospecção de moléculas inibitórias (naturais e/ou sintéticas) para as referidas proteases e avaliar a atividade antiviral dos compostos com melhores atividades inibitórias.
Metas	M1- Produção das enzimas recombinantes M2- Ensaios de inibição enzimática e caracterização dos inibidores para os ensaios M3- Ensaios antivirais

Indicadores de Desempenho

	NOK	ATENÇÃO	OK
Orçamento			
Cronograma		X	
Governança			X
Escopo			X
Riscos			X
Gestão de recursos			X
Comunicação			X

Principais etapas programadas	Data Prevista	Estágio atual	Status
Etapa 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 teste, constatamos que um deles apresentou erro na síntese. A empresa já enviou o plasmídeo mas ainda não recebemos no laboratório.	Concluído
Etapa 2: obtenção de moléculas (óleos essenciais, moléculas oriundas da quimioteca do Museu Nacional de História Natural de Paris e moléculas resultantes de triagem virtual) para avaliar o potencial inibitório das protease PLPro e Mpro.	30/01/21	Óleos essenciais a serem adquiridos já foram escolhidos, bem como os inibidores (controle) das duas proteases. Os substratos das proteases Mpro e PL-pro também já foram selecionados.	Concluído
Etapa 3: expressão e purificação das enzimas recombinantes (Meta 1)	20/07/21	essa etapa foi iniciada, mas devido ao problema com um plasmídeo, somente o estudo da Mpro está em andamento. Estamos com dificuldades técnicas de obter a proteína recombinante da Mpro, por isso estamos padronizando a expressão, o que está atrasando o	Iniciado

Etapa 4. triagem dos compostos fornecidos pela biblioteca de compostos do MNHN e óleos essenciais pelos ensaios de inibição enzimática (Meta 2). Triagem computacional (virtual screening) das proteases com base nessa referida biblioteca.	10/08/21	Triagem experimental será iniciada após a etapa 3. Etapa 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.	em desenvolvimento
Etapa 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
Etapa 6: Realizar a caracterização bioquímica dos melhores inibidores (Meta 2)	30/08/21	será iniciada após a etapa 5	Não iniciado
Etapa 7: - Realizar ensaios antivirais dos compostos com melhores atividade inibitórias (Meta 3).	10/09/21	será iniciada após a etapa 6	Não iniciado

Pontos de atenção	Nível risco	Resolução / Providência	Responsável
Atraso na conclusão da Meta 1, devido a problemas técnicos indetificados no caso da PLPro, que consistiu no erro de síntese de plasmídeo, por parte da empresa contratada. Com relação a Mpro, identificamos que houve outro erro de síntese por parte da empresa.	ainda baixo	estamos trabalhando para indentificar a falha na expressão das proteínas recombinantes. Possível erro de síntese, como já constatado previamente.	

--	--	--	--

PRINCIPAIS AÇÕES REALIZADAS (PERÍODO ANTERIOR)	jul/21
--	--------

No período, foi realizada a triagem virtual baseada em ensemble docking dos compostos da quimioteca do MNHN contra estruturas tridimensional da enzima PLpro, além de expressão e purificação da enzima PLpro. Através dessa triagem, priorizaremos compostos, elucidaremos o modo de ligação dos inibidores, e posteriormente validaremos os resultados computacionais, através de ensaios enzimáticos. No período anterior, realizamos dockings utilizando o programa DockThor, mas a validação com ativos e inativos mostrou que o programa não apresentou bom desempenho para distinguir entre ativos e inativos. Dessa forma, optamos por utilizar apenas o programa Glide, que apresentou bom desempenho e realizar um ensemble docking (docking utilizando diferentes conformações da proteína). Os compostos da quimioteca do MNHN já haviam sido preparados anteriormente. Além disso, já havia sido realizada a catalogação de inibidores da PLpro experimentalmente testados. Etapas da triagem computacional realizadas no período: 1) análise e catalogação das estruturas 3D da enzima PLpro, disponíveis no Protein Data Bank; 2) seleção das estruturas 3D relevantes da PLpro, através do programa Bio3D (análise de componentes principais): PDB ID 7JN2, 7LBR, 6W9C, 6WX4, 6WZU e 7M1Y ; 3) preparação das seis estruturas 3D escolhidas (protonação de resíduos em pH 7,4); 4) preparação dos grids de docking no sítio de ligação a ligantes não-covalentes (BL2 loop); 5) realização dos cálculos de ensemble docking, utilizando o programa Glide; 6) seleção dos top 10% melhores resultados; 7) validação do ensemble docking com compostos ativos da PLpro e decoys e cálculos dos parâmetros de validação. Em relação a parte experimental do projeto, houve êxito na expressão da PLpro e estão sendo realizados ajustes na purificação e nos ensaios de atividade. Também foram realizadas reuniões semanais com a equipe de pesquisadores e estudantes para atualizações periódicas do trabalho.

PRINCIPAIS AÇÕES PLANEJADAS (PRÓXIMO PERÍODO)	ago/21
---	--------

As próximas etapas serão: 1) análise dos top 10% melhores resultados de docking (inspeção visual baseada em Química Medicinal, análise de propriedades drug-like dos compostos); 2) priorização de compostos; 3) predição da atividade dos compostos em SARS-CoV-2, através de modelos de QSAR fenotípicos; 4) realização dos ensaios de atividade enzimática da PLpro frente aos compostos.

INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA STAKEHOLDERS
--

--

