



Data do relatório: 21/09/2021

RELATÓRIO EXECUTIVO DO PROJETO

Nome do projeto	Prospecção de moléculas inibitórias das proteases quimi tripsina-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
Demandante(s)	FAPDF	Vigência do projeto	12 Meses
Valor do projeto	R\$ 390.000,00	Data assinatura	31/07/2020
			Data fim (previsão)
			10/09/2021

RESUMO DO PROJETO

Objeto	Expressar e purificar as proteases quimi tripsinalike 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 (KPIs)

	NOK	ATENÇÃO	OK
Orçamento			
Cronograma		X	
Governança			X
Escopo			X
Time / pessoas			X
Gestão de riscos			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. (Metas 2 e 3)	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 início da etapa de purificação.	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 indetificar a falha na expressão das proteínas recombinantes. Possível erro de síntese, como já constatado previamente.	

PRINCIPAIS AÇÕES REALIZADAS (PERÍODO ANTERIOR)

Mês/Ano

ago/21

No período, foram realizadas análises dos resultados da triagem virtual baseada em ensemble docking dos compostos da quimioteca do MNHN contra estruturas tridimensionais da enzima PLpro. Para análise dos top 10% melhores compostos, consideramos os parâmetros: score de docking, eficiência do ligante, clusterização baseada em similaridade estrutural e análise de inspeção visual das poses de docking de cada composto e comparação com inibidores co-cristalizados. A partir dessas análises, selecionamos 136 compostos para fazer a predição de atividade em SARS-CoV-2, através dos modelos de QSAR fenotípicos. Além disso, realizamos a catalogação de inibidores de Mpro descritos na literatura, através de uma busca em artigos científicos e banco de dados bindingDB. Realizamos análises de componentes principais (PCA) das estruturas tridimensionais da Mpro disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB), utilizando o programa Bio3D. As estruturas foram agrupadas em quatro grupos, indicando mudanças conformacionais nos pockets S4 e S5 da Mpro, principalmente. Dessa forma, selecionamos um representante de cada grupo para realizar os cálculos de docking. Também foram realizadas reuniões semanais com a equipe de pesquisadores e estudantes para atualizações periódicas do trabalho.

PRINCIPAIS AÇÕES PLANEJADAS (PRÓXIMO PERÍODO)

Mês/Ano

set/21

As próximas etapas serão: 1) predição da atividade dos compostos selecionados para PLpro em SARS-CoV-2, através de modelos de QSAR fenotípicos; 2) solicitação do envio dos compostos selecionados; 3) realização dos ensaios de atividade enzimática da PLpro frente aos compostos; 4) realizar a validação com ativos e inativos da Mpro; 5) preparação das estruturas 3D da Mpro para docking; 6) preparação dos grids de docking; 7) realização dos dockings com ativos e inativos da Mpro; 8) cálculo das métricas de validação.

INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA STAKEHOLDERS