



Data do relatório: 25/10/2021

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 protese (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			X
Processos			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.	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 anadamento. Estamos com dificuldades técnicas de obter a proteína recombinante da Mpro, por isso estamos padronizando a expressão, o que está atrasando o	em desenvolvimento

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)	20/11/21	Triagem experimental será iniciada após a etapa 3.	Não iniciado
Etapa 6: Realizar a caracterização bioquímica dos melhores inibidores (Meta 2)	15/01/22	será iniciada após a etapa 5	Não iniciado
Etapa 7: - Realizar ensaios antivirais dos compostos com melhores atividade inibitórias (Meta 3).	15/02/22	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	Foi adquirido um novo plasmídeo.	

PRINCIPAIS AÇÕES REALIZADAS (PERÍODO ANTERIOR)

set/21

No período, foram realizadas análises dos resultados da triagem virtual baseada em ensemble docking dos compostos da quimioteca do MNHN contra seis estruturas tridimensional da enzima PLpro. Já havíamos realizado as etapas de cálculos de ensemble docking; cálculos de eficiência do ligante e agrupamento dos compostos, baseada em similaridade estrutural. A partir dessas análises, selecionamos 136 compostos para fazer a predição de atividade em SARS-CoV-2, através dos modelos de QSAR fenotípicos. Desses, 45 compostos foram preditos como ativo frente ao SARS-CoV-2, pelos modelos de QSAR fenotípico. Realizamos a análise de inspeção visual das poses de docking desses e comparação com inibidores

co-cristalizados (posição no sítio e interações realizadas com os resíduos da protease). No total, além dos 45 compostos, priorizamos mais 33 compostos, que apresentaram boa sobreposição ao inibidor conhecido e cocristalizado da PLpro. No total, 78 compostos e fragmentos foram selecionados para serem testados em ensaios enzimáticos de inibição da PLpro. Iremos solicitar o encaminhamento desses compostos para o Brasil para realização dos ensaios.

Em relação a protease Mpro, anteriormente já havíamos selecionado cinco estruturas representativas da Mpro, para realização dos cálculos de ensemble docking. Também realizamos a catalogação de inibidores de Mpro descritos na literatura, através de uma busca em artigos científicos e banco de dados bindingDB. No total, 127 compostos ativos da Mpro que se ligam de forma não covalente a enzima foram selecionados. Geramos 5842 decoys (compostos inativos). Preparamos as estruturas dos compostos e das estruturas 3D selecionadas e geramos os grids de docking. Realizamos os dockings desses compostos no servidor DockThor contra uma das estruturas 3D da Mpro. Os resultados serão avaliados através de cálculos de métricas de validação. Com relação a etapa experimental, a enzima PL-Pro foi produzida, purificada e testada quanto a sua atividade e já está pronta para os testes de inibição. O plasmídeo de expressão contendo o gene da MPro já foi transformado e a primeira indução foi realizada e está em fase de análise para avaliar a expressão na fração solúvel, para posterior purificação. Também foram realizadas reuniões semanais com a equipe de pesquisadores e estudantes para atualizações periódicas do trabalho.

PRINCIPAIS AÇÕES PLANEJADAS (PRÓXIMO PERÍODO)

out/21

As próximas etapas serão: 1) solicitação do envio dos compostos MNHN selecionados para o Brasil; 2) realização dos ensaios de atividade enzimática da PLpro frente aos compostos; 3) realização dos dockings com ativos e inativos da Mpro contra todas as 5 estruturas; 4) cálculo das métricas de validação; 5) Expressão e purificação da MPro.

INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA STAKEHOLDERS