



A CURA DI SILVIA CAUTERUCCIO E MONICA CIVERA

Dipartimento di Chimica
Università di Milano
silvia.cauteruccio@unimi.it
monica.civera@unimi.it

Sintesi peptidica su fase solida: nuovi studi per ottimizzare efficienza e selettività

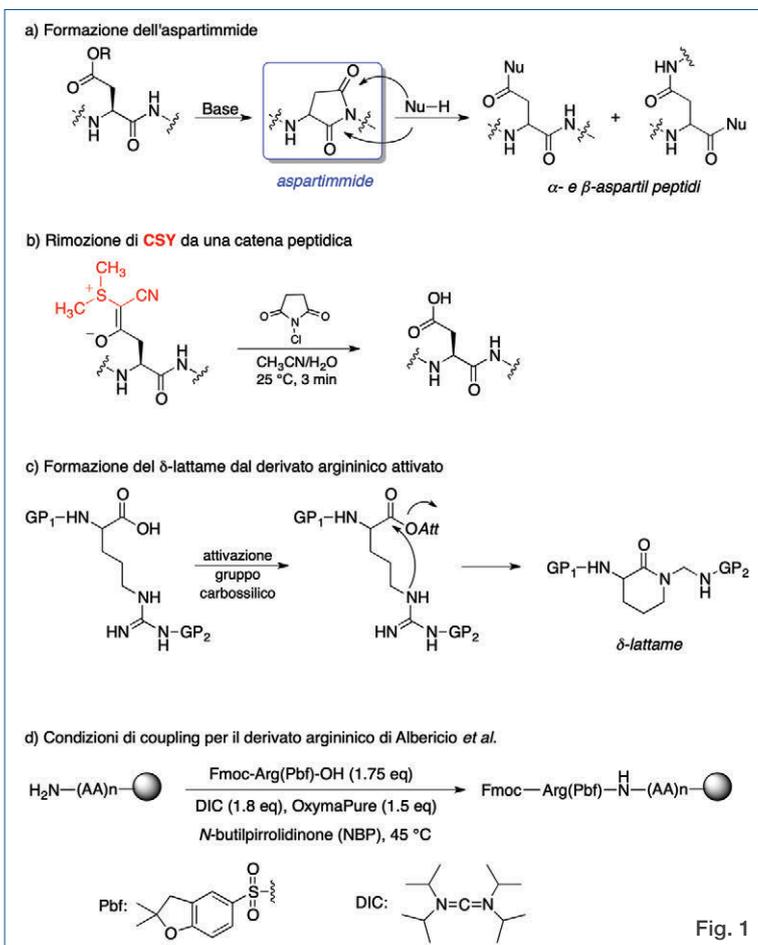
Il numero di farmaci a base di peptidi che raggiungono il mercato farmaceutico è in continua crescita, contando che più di 170 peptidi sono attualmente in fase di sperimentazione clinica [J.M. Nuss, *J. Med. Chem.*, 2017, **61**, 1382]. Lo sviluppo di questi nuovi farmaci richiede la sintesi di peptidi sempre più complessi da un punto di vista strutturale, per i quali la sintesi su fase solida (SPPS) rappresenta una metodologia tra le più vantaggiose, in quanto permette di effettuare numerosi passaggi con rese eccellenti, senza purificazione ed isolamento degli intermedi. La possibilità di condurre il tutto in un unico reattore ha fatto sì che il processo potesse essere automatizzato, permettendo l'utilizzo di sintetizzatori peptidici. Nel corso degli anni sono stati fatti innumerevoli studi per ottimizzare i diversi passaggi della SPPS e per ridurre processi indesiderati, quali la racemizzazione, anche se esistono ancora diverse reazioni secondarie che limitano l'efficienza della SPPS e rendono particolarmente difficile la purificazione finale dei peptidi.

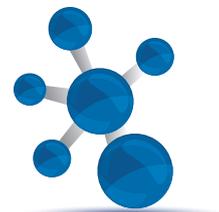
Una di queste reazioni riguarda la formazione dell'aspartimmide, che si forma in seguito alla ciclizzazione della catena laterale dell'acido aspartico (Asp) e che porta, a seguito di idrolisi o in presenza di specie nucleofile, a miscele di α - e β -aspartil peptidi (Fig. 1a).

Una soluzione proposta a questo problema prevede l'utilizzo di un'ilide di natura zwitterionica (**CSY**) come gruppo protettivo per la funzionalità carbossilica sulla catena laterale di Asp [J.W. Bode, *Nat. Commun.*, 2020, **11**, 982]. Questo gruppo protettivo, a differenza di quelli che portano alla formazione di derivati esterei, forma un legame carbonio-carbonio particolarmente stabile nelle condizioni sperimentali comunemente utilizzate nei diversi passaggi della SPPS ed è in grado di inibire completamente la formazione dell'aspartimmide. Inoltre, **CSY** può essere facilmente e selettivamente rimosso dalla catena peptidica in condizioni molto blande utilizzando specie elettrofile alogenurate in ambiente acquoso (Fig. 1b). La validità di

questa metodologia è stata dimostrata mediante la sintesi di diversi peptidi, tra i quali una lipoproteina (LDL_a) costituita da 41 amminoacidi, la cui sintesi è particolarmente difficile in quanto i suoi tre residui di acido aspartico tendono facilmente a subire il processo di ciclizzazione.

Un altro problema tutt'altro che risolto nella SPPS riguarda l'introduzione dell'arginina, nella quale il gruppo guanidinico della catena laterale attacca il gruppo carbossilico attivato, formando un δ -lattame molto stabile (Fig. 1c). Il gruppo di Albericio [F. Albericio, *Green Chem.*, DOI: [10.1039/c9gc03784e](https://doi.org/10.1039/c9gc03784e)] propone una procedura per l'incorporazione di Fmoc-Arg(Pbf)-OH durante la SPPS che prevede di attivare il gruppo carbossilico con DIC in NBP come solvente a 45 °C (Fig. 1d). Uno studio molto approfondito sulla viscosità del solvente, sul rapporto tra amminoacido ed attivante, nonché sull'ordine di ag-





giunta dei diversi reagenti ha permesso di ottenere le condizioni ottimizzate riportate in Fig. 1d, che sono in grado di minimizzare la formazione del lattame in favore del *coupling* ammidico.

La struttura Cryo-EM dello spike di 2019-nCoV in conformazione di pre-fusione

Recentemente, D. Wrapp [Science, 19 Feb 2020:eabb2507, DOI: [10.1126/science.abb2507](https://doi.org/10.1126/science.abb2507)] e il suo gruppo di ricerca hanno pubblicato la struttura cryo-EM del trimero dello *spike* (**S**) di 2019-nCoV nella conformazione di pre-fusione (risoluzione di 3,5 Å). Questa informazione strutturale potrà fornire preziose indicazioni per guidare la progettazione e lo sviluppo di un vaccino.

In generale, l'ingresso di coronavirus nelle cellule ospiti è mediato da **S**, una glicoproteina che forma omotrimeri sporgenti dalla superficie del virus. La struttura di **S** comprende due sub-unità funzionali responsabili dell'associazione all'*host*: il recettore cellulare **S1** e quello di fusione **S2**. Coronavirus diversi usano domini distinti all'interno della subunità **S1** per riconoscere i diversi recettori che mediano l'ingresso nelle cellule *host*.

Nel caso di 2019-nCoV, si è osservata una conformazione metastabile di pre-fusione di **S** che subisce un drammatico ri-arrangiamento strutturale per fondere la membrana virale con la membrana della cellula ospite. Questo processo viene attivato quando **S1** si lega a un recettore della cellula ospite. Il legame destabilizza il trimero di pre-fusione, con conseguente *cleavage* di **S1** e transizione di **S2** a una conformazione stabile di post-fusione. Per legarsi ad un recettore della cellula ospite, il dominio di legame del recettore (RBD) di **S1** subisce movimenti conformazionali che nascondono o espongono temporaneamente le regioni di legame. Questi movimenti apparentemente stocastici di RBD sono stati osservati anche durante la caratterizzazione strutturale dei betacoronavirus SARS-CoV e MERS-CoV. I due stati principali vengono definiti conformazione "down" e conformazione "up" di RBD, la prima corrispondente allo stato

inaccessibile al recettore e la seconda corrispondente allo stato accessibile al recettore, ritenuto anche il meno stabile (Fig. 2).

La struttura cryo-EM di 2019-nCoV **S** ricorda quella di SARS-CoV **S**. Una delle maggiori differenze tra queste due strutture (sebbene minore) è la posizione dei domini RBD nelle rispettive conformazioni *down*. Mentre per SARS-CoV il dominio RBD si avvicina al dominio *N*-terminale (NTD) del protomero vicino, per 2019-nCoV il dominio RBD è orientato più vicino alla cavità centrale del trimero. Studi recenti, inoltre, hanno evidenziato come sia 2019-nCoV **S** che SARS-CoV **S** utilizzino lo stesso recettore delle cellule *host*: l'enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2). L'elevata affinità di 2019-nCoV **S** per ACE2 umano (10-20 volte maggiore di SARS-CoV) potrebbe contribuire all'apparente facilità con cui questo virus si diffonde da uomo a uomo. Tuttavia, nonostante il grado relativamente elevato di omologia strutturale tra il 2019-nCoV RBD e il SARS-CoV RBD, non è stato possibile rilevare alcun legame con il 2019-nCoV RBD per nessuno dei tre anticorpi già in uso per SARS-CoV RBD (S230, m396 e 80R).

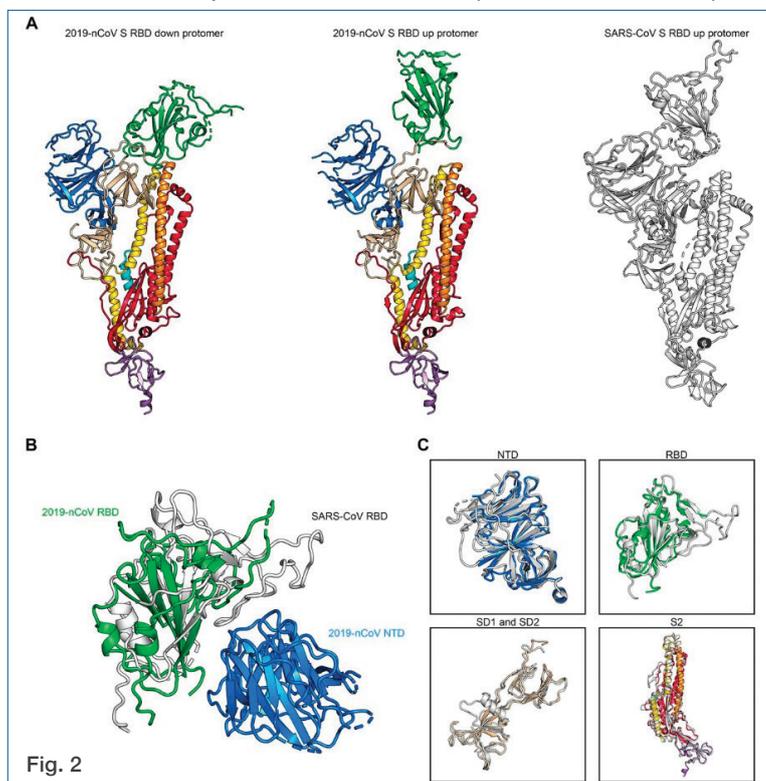


Fig. 2