



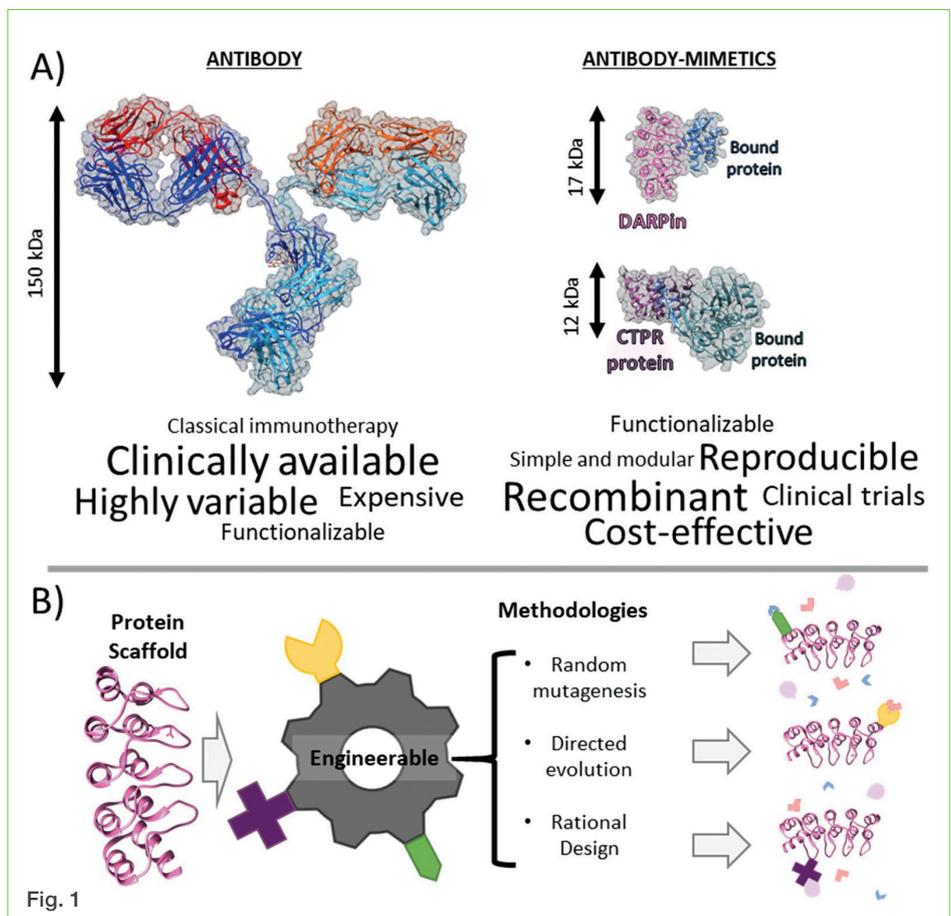
a cura di **Silvia Cauteruccio e Monica Civera**  
 Dipartimento di Chimica  
 Università di Milano  
 silvia.cauteruccio@unimi.it  
 monica.civera@unimi.it

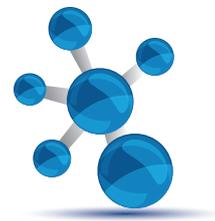
## De novo design di proteine per applicazioni in campo biomedico

Le proteine, interagendo con altre proteine, agiscono da modulatori di una risposta biologica e hanno, quindi, un elevato potenziale terapeutico. Offrono il vantaggio di essere biocompatibili, biodegradabili e altamente versatili. Gli anticorpi monoclonali sono già utilizzati in campo oncologico o infettivo e rappresentano il classico esempio di questa nuova generazione di farmaci. Tuttavia, le grandi dimensioni, la complessa struttura quaternaria e le modifiche post-traslazionali necessarie al loro funzionamento implicano una limitata stabilità e alti costi di produzione e stoccaggio. Per superare questi limiti, negli ultimi anni sono stati sviluppati dei mimetici di anticorpi, ovvero piccole proteine ingegnerizzate, dette *scaffolds* [X. Yu, *Annu. Rev. Anal. Chem.*,

2017, doi: [10.1146/annurev-anchem-061516-045205](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045205)], che, rispetto agli anticorpi originali, sono molto stabili, facilmente modificabili e sintetizzabili su larga scala. Gli *scaffolds*, hanno la caratteristica di non alterare stabilità o conformazione della proteina a seguito di mutazioni o inserimenti di una sequenza di riconoscimento specifica per un dato target. Il *de novo design* di queste proteine ingegnerizzate si avvale di diversi *tools* computazionali che hanno l'obiettivo sia di studiarne la struttura che l'interazione *in silico* con il target. Il gruppo di Sesterhenn ha sviluppato un software per la progettazione di *scaffold* proteici che espongono epitopi discontinui, utilizzato per lo sviluppo di vaccini [F. Sesterhenn, *Science*, 2020, doi: [10.1126/science](https://doi.org/10.1126/science).

[aay5051](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00440)]. Le proteine CTPR (*consensus tetratricopeptide repeat*) sono un esempio di proteine utilizzate per diverse applicazioni di *de novo design* [K.B. Uribe, *Acc. Chem. Res.*, 2021, doi: [10.1021/acs.accounts.1c00440](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00440)]. Sono formate da 34 amminoacidi e caratterizzate da un motivo strutturale elica-turn-elica (TPR) la cui stabilità conformazionale dipende solo da 8 residui. Gli altri residui della sequenza possono essere modificati senza perturbare la struttura e questo permette una grande libertà di progettazione. L'unità CTPR può essere facilmente modificata o coniugata ad altri peptidi per generare proteine più grandi. Inoltre, il segmento TPR tende ad assemblare e formare aggregati con una complessa architettura supramolecolare che possono essere sfruttati nel campo dei materiali. Le CTPR sono anche la piattaforma ideale per





sviluppare nanomateriali proteici ibridi. Nel caso dell'agente teranostico CTPR390, costituito da tre unità di CTPR modificate per legarsi alla porzione C-terminale di Hsp90, l'unità ingegnerizzata è stata legata ad un nanocluster stabilizzante contenente un *probe* per il trattamento e la diagnosi *in vitro* and *ex vivo* della fibrosi cardiaca.

Uno dei colli di bottiglia nell'uso di mimetici anticorpali riguarda la protezione della loro proprietà intellettuale da parte degli sviluppatori. Le strutture e le sequenze di mimetici anticorpali sono protetti da brevetto e spesso non accessibili alla comunità scientifica, ostacolando così i potenziali progressi e l'uso in aree diverse da quelle terapeutiche.

### Estrazione di prodotti naturali mediante l'impiego di *Deep Eutectic Solvents*

I *Deep Eutectic Solvents* (DES) sono ormai considerati tra i solventi *green* più promettenti, in quanto sono caratterizzati da bassa volatilità, elevato potere solvente, basso costo ed elevata biodegradabilità, essendo costituiti generalmente da componenti non tossici e abbondanti in natura. Tutte queste caratteristiche permettono l'impiego dei DES in molteplici ambiti, che comprendono la biocatalisi, la sintesi organica, la preparazione di (nano)materiali e l'estrazione di biomolecole da fonti naturali [J.R. Sangoro, *Chem. Rev.*, 2021, **121**, 1232]. Numerosi studi si stanno focalizzando su quest'ultima applicazione, in quanto l'estrazione di molecole di origine naturale attraverso i DES permette di evitare l'impiego massiccio di solventi organici tossici, i cui residui nell'estratto ne limitano l'impiego, soprattutto a livello alimentare e cosmetico. In questo contesto un'estrazione efficiente e selettiva mediante l'uso dei DES la si ottiene in seguito ad un attento processo di ottimizzazione di numerosi parametri, tra i quali risulta spesso fondamentale il contenuto di acqua. Infatti, l'aggiunta di piccole quantità di acqua nel DES dà vita ad una miscela ternaria caratterizzata da una viscosità inferiore, che favorisce, di conseguenza, il processo di trasferimento di massa. Nel lavoro di M. Bisht è stato dimostrato come una soluzione acquosa (0,75 M)

di una miscela eutettica costituita da urea e acido lattico (rapporto molare 1:2) sia in grado di estrarre efficientemente il collagene di tipo I dagli scarti di pesce [M. Bisht, *Green Chem.*, 2021, DOI: [10.1039/d1gc01432c](https://doi.org/10.1039/d1gc01432c)]. La resa di estrazione, la purezza e la stabilità termica del collagene estratto tramite questa miscela eutettica sono risultate decisamente superiori rispetto a quelle ottenute effettuando l'estrazione attraverso processi convenzionali che vedono l'impiego di acido acetico. Questo lavoro risulta particolarmente interessante tenendo presente che, ad oggi, le principali fonti di collagene presentano problemi legati al rischio di trasferimento di malattie zoonotiche o questioni religiose, in quanto derivano dalla pelle e ossa di animali quali mucche e maiali. La ricerca di fonti alternative di collagene risulta quindi molto importante e, se tali fonti derivano da scarti industriali del pesce, sono ancora più interessanti in quanto rispondono alle esigenze di un'economia circolare.

Accanto ai tradizionali DES, i NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*), i cui componenti sono spesso zuccheri, amminoacidi o acidi organici, sono molto utilizzati nell'estrazione di sostanze naturali, nei processi cromatografici per la separazione di prodotti naturali e negli esperimenti biologici, quali solventi alternativi al dimetilsolfossido [G.F. Pauli, *J. Nat. Prod.*, 2018, **81**, 679].

Nel lavoro di A. Cruz Duarte vengono studiati differenti NADES come solventi sostenibili ed alternativi ai solventi organici (acetone, toluene o propanolo) comunemente utilizzati nella conservazione e restauro dei dipinti, soprattutto per la rimozione degli strati di vernice dai dipinti [A.R. Cruz Duarte, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2021, DOI: [10.1021/acssuschemeng.1c04591](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04591)].

Uno studio molto approfondito su polarità, solubilità, viscosità e densità di diverse miscele eutettiche attraverso misure sperimentali e modelli matematici ha permesso di stabilire che i NADES migliori per solubilizzare le vernici naturali, come la gomma dammar o il mastice, sono di natura idrofobica e costituiti da miscele a base di mentolo in combinazione con acido laurico, acido decanoico o timolo.