



a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

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

L'interazione tra eparina e proteina spike di SARS-CoV-19

Durante la recente pandemia, l'uso di anticoagulanti, come l'eparina, ha ridotto la mortalità dei pazienti COVID-19 durante il ricovero. Oltre ad avere un'azione antinfiammatoria e ovviamente anticoagulante, l'ipotesi è che l'eparina possa avere un effetto antivirale dipendente dall'interazione con la spike (S) del virus. È noto come questa proteina legandosi al recettore ACE2 presente sulla superficie delle cellule umane, permetta la fusione della membrana virale e cellulare, dando inizio dell'infezione. L'interazione spike-ACE2 è facilitata da glicoproteine presenti sulla cellula e formate da catene anioniche di eparan solfato (HSPGs) capaci di legarsi alle regioni cariche positivamente della spike [T.M. Clausen *et al.*, *Cell*, 2020, **183**, 1043]. L'ipotesi del meccanismo di azione dell'eparina è basata su una competizione con HSPGs. La proteina S sulla superficie del virus è in una conformazione 'chiusa' o inattiva formata da due subunità S1 ed S2 e da una giunzione S1/S2 ricca di residui basici. Una proteasi umana, la furina, riconosce i residui carichi della regione S1/S2 e, tagliando la proteina, la attiva inducendo un cambio conformazionale che espone il dominio RBD al riconoscimento con ACE2.

L'eparina sembra legarsi al dominio RBD della spike in un sito carico positivamente adiacente e non sovrapposto a quello di ACE2. Il sito è disponibile quando la proteina S è nella conformazione aperta ed il legame tra la spike, ACE2 ed eparina sembra possa avvenire simultaneamente. Nella conformazione chiusa la spike può legare l'eparina, ma con minore affinità visto che il sito dell'RBD è parzialmente occluso. Sperimentalmente è stato osservato come la tipologia, la lunghezza della catena ed il numero di

gruppi solfato influiscano sulla capacità dell'eparina di legarsi alla spike.

In questo lavoro gli autori [X. Wang *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, 2022, **62**, 656] hanno generato un modello dell'interazione tra una molecola di eparina (formata da otto unità) e la spike utilizzando il software di docking Vina-Carb, specifico per i carboidrati. Il docking è stato fatto nella tasca del dominio RBD della spike a partire dal complesso spike-ACE2. L'oligosaccaride assume una conformazione 'U-shaped' planare per ottimizzare le interazioni con i gruppi carichi positivamente del sito di legame. Dall'analisi delle simulazioni di dinamica molecolare si osserva, inoltre, che il legame con l'eparina influenza la dinamica di un loop coinvolto nell'interazione con ACE2.

In questo lavoro [G. Paiardi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2022, **298**(2), 101507], gli autori applicano un protocollo di calcoli di docking e dinamica molecolare per studiare l'interazione tra l'eparina (formata da 31 monosaccaridi) e il trimero della spike con tutte le catene nella conformazione chiusa ed con un monomero nella conformazione aperta.

Oltre al sito nel dominio RBD, gli autori localizzano

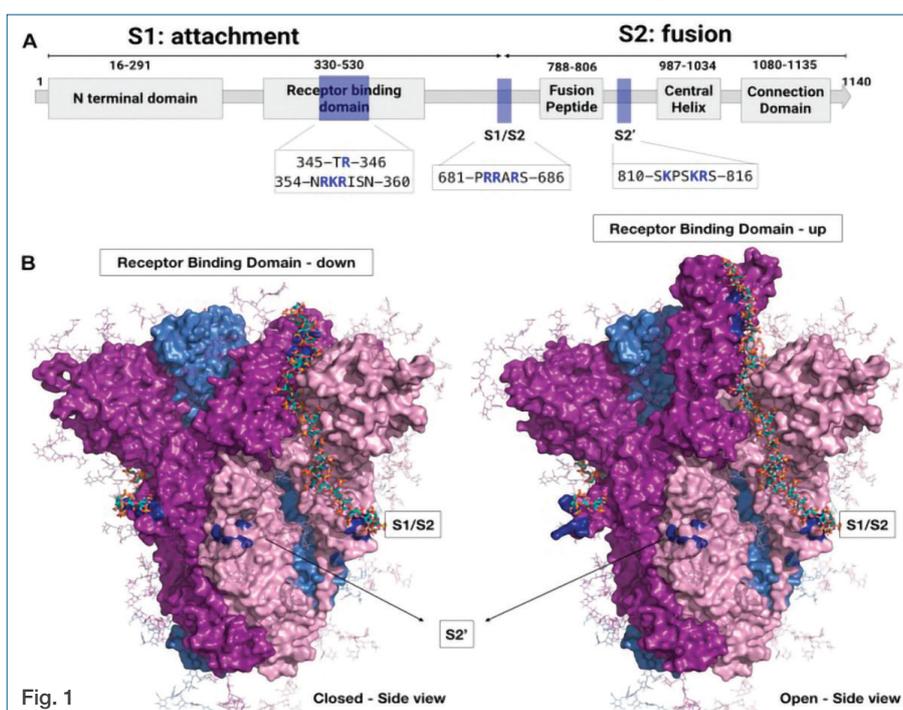
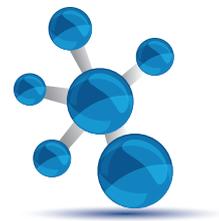


Fig. 1



un altro possibile sito di legame per l'eparina nella regione carica positivamente del dominio S1/S2. L'eparina si lega a cavallo tra il sito S1/S2 di un monomero e il sito RBD di un monomero adiacente (Fig. 1). Quando l'eparina è legata allo stato chiuso della *spike*, il trimero è stabilizzato e non si osserva l'apertura del dominio RBD, nel caso della conformazione aperta, si osserva una rotazione del dominio RBD che potrebbe alterare il riconoscimento con ACE2.

Inoltre l'eparina, legandosi alla regione S1/S2, sembrerebbe nascondere il sito di riconoscimento della furina, impendendo la scissione della *spike* e, di conseguenza, la sua attivazione.

Cyrene™: una valida alternativa ai comuni solventi aprotici dipolari

La ricerca di solventi biocompatibili rappresenta un obiettivo molto importante nell'ambito della chimica verde al fine di sostituire solventi nocivi, cancerogeni e tossici, e rendere quindi i processi chimici più sostenibili.

Numerosi solventi sono infatti altamente tossici e provengono a loro volta da prodotti petrolchimici, e, in particolare, i solventi aprotici dipolari come la dimetilformammide (DMF) e l'*N*-metil-2-pirrolidone (NMP) sono soggetti a continue restrizioni a causa della loro tossicità. A partire dal maggio 2020, ad esempio, l'UE ha imposto rigorose condizioni di utilizzo per l'NMP sia ai fini della sicurezza dei dipendenti sia in termini di sostenibilità ambientale, vietando di fatto l'impiego di prodotti di consumo contenenti quantità di NMP superiori allo 0,3%.

Nel Regolamento UE 2021/2030, pubblicato nel novembre 2021, sono state invece inserite ulteriori restrizioni per l'impiego della DMF (modifiche allegato XVII del REACH, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R2030&from=EN>).

I solventi a base di carboidrati non alimentari, come il diidrolevogluosenone (nome commerciale Cyrene), rappresentano una delle alternative più sicure e biocompatibili per DMF e NMP.

Cyrene™ è un solvente a bassa tossicità, biodegradabile, biocompatibile e riciclabile, che ripro-

duce efficacemente le proprietà solubilizzanti della DMF e dell'NMP e può essere utilizzato in reazioni condotte in un ampio intervallo di temperature avendo un elevato punto di ebollizione (227 °C).

La sua produzione non si basa su materie prime fossili derivanti dal petrolio, ma si ottiene dalla cellulosa mediante un processo a due passaggi, che prevede la pirolisi della cellulosa e successiva riduzione dell'intermedio levogluosenone (LGO, Fig. 2). Cyrene™ è stato impiegato con successo come solvente in numerosi ambiti, che spaziano dalla sintesi organica, alla biocatalisi e alla chimica dei materiali (sintesi di MOF, polimerizzazioni e preparazione di membrane) [N.A. Stini, *Green Chem.*, 2022, **24**, 6435]. L'elevata viscosità di Cyrene™ (14,5 cP), decisamente più alta rispetto a quella di DMF (0,94 cP) e NMP (1,7 cP), se da un lato può favorire alcune applicazioni nell'ambito dei materiali e della sintesi in fase solida, in molte altre reazioni rappresenta una limitazione soprattutto per processi condotti su larga scala. Con l'obiettivo di diminuire la viscosità di Cyrene™ il gruppo di ricerca della Sigma-Aldrich di Milwaukee [C. Sullivan, *Green Chem.*, 2022, DOI: [10.1039/d2gc01911f](https://doi.org/10.1039/d2gc01911f)] ha messo a punto delle miscele formate da Cyrene™ e altri solventi organici (γ -valerolattone, 2-metil-tetraidrofurano e acetonitrile), che presentano valori di viscosità decisamente più bassi (<5 cP). Tali miscele, stabili per lungo tempo a temperature fino a 40 °C, si sono dimostrate delle valide alternative in termini di efficienza rispetto a DMF, NMP e Cyrene™ puro, su un diverso numero di reazioni (coupling di Suzuki e Sonogashira, reazioni S_NAr e di *N*-alchilazione, formazione di legami ammidici mediati da HATU). La miscela Cyrene™/2-MeTHF è stata utilizzata con successo anche su reazioni a partire da 50 g di substrati di partenza in 200 mL di solvente.

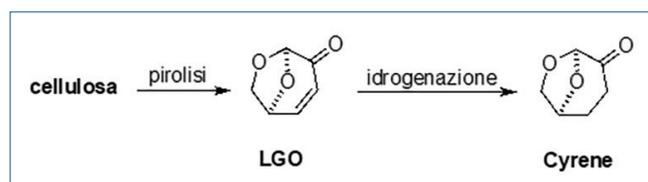


Fig. 2 - Sintesi del Cyrene