

CAPITOLO5. INIBITORI DELL'ACHÉ.

5.1 Classificazione degli inibitori in base al meccanismo di azione. Importanza della determinazione delle strutture cristallografiche dei complessi cristallini TcACHÉ-inibitore.

Nel tentativo di alleviare i sintomi di patologie a carico dei sistemi periferici autonomi e di quello centrale, si è introdotto l'uso di agenti anticolinesterasici, dapprima per la cura della miastenia grave e per le disfunzioni a livello del sistema autonomo, e, da circa venti anni a questa parte, per la cura sintomatica dell'AD.

Gli enzimi colinesterasici, come visto in precedenza, sono l'ACHÉ e la BChE. Per questo motivo un inibitore ideale dell'ACHÉ deve avere come importante requisito la specificità verso l'enzima senza interagire con la BChE; deve poi passare la barriera ematoencefalica ed avere un'azione prolungata nel tempo.

Gli inibitori (farmaci o tossine) che mostrano un'azione verso l'ACHÉ possono essere divisi in due classi in base alla loro struttura ed al meccanismo di azione: la prima, cui appartengono gli organofosfati ed i carbammati, comprende le molecole che si legano covalentemente all'enzima; la seconda classe include tutte le molecole, contenenti un gruppo amminico o ammonico, che interagiscono con l'ACHÉ reversibilmente senza formare alcun legame covalente.

La risoluzione della struttura cristallografica di complessi dell'ACHÉ con vari inibitori appartenenti alle due classi, è stata fondamentale al fine di comprenderne il meccanismo d'azione.

Negli ultimi anni sono state risolte le strutture della TcACHÉ complessata con vari inibitori tra cui citiamo in ordine temporale:

- decametonio, tacrina [PDB entry code: 1ACL, 1ACJ; Harel *et al.* 1993];
- edrofonio [1ACK, 1AX6; Harel *et al.* 1993; Ravelli *et al.* 1998];
- μ -trimetilammonio-(2,2,2-trifluoroacetofenone) [1AMN; Harel *et al.* 1996];
- huperzina (-)-HupA [1VOT; Raves *et al.* 1997];
- E2020 [1EVE; Kryger *et al.* 1999];
- MF268 [1OCE; Bartolucci *et al.* 1999];
- diisopropilfosforofluoridrato [2DFP; Millard *et al.* 1999a];
- O-isopropilmetilfosfonofluoridrato (sarin) [1CFJ; Millard *et al.* 1999a];

- O-pinacolilmetilfosfonocloridrato (soman) [1SOM; Millard *et al.* 1999a];
- O-etil-S-[2-[Bis(1-metiletil)ammino]etil]metilfosfotioato (Vx) [1VXR, 1VXO; Millard *et al.* 1999b];
- galantamina [1DX6, 1QTI; Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001; Pilger *et al.* 2001];
- 4-ammino-5-fluoro-2-metil-3(3-trifluoroacetilbenziltiometil)chinolina [1HBJ; Doucet-Personeni *et al.* 2001];
- rivastigmina [1GQR, 1GQS; Bar-On *et al.* 2002];
- huperzina enantiomero sintetico (+)-HupA [1GPK; Dvir *et al.* 2002a];
- hupB [1GPN; Dvir *et al.* 2002b];
- huprina X [1E66; Dvir *et al.* 2002b];
- Bw284c51 [1E3Q; Felder *et al.* 2002];
- PEG-SH [1JJB; Koellner *et al.* 2002];
- dimeri di HupA [1H22, 1H23; Wong *et al.* 2003].

Verranno di seguito analizzate le due classi di inibitori. Per ogni classe verranno descritte solamente le strutture cristallografiche inerenti alla discussione dell'oggetto della tesi. Riguardo agli altri complessi si rimanda alla letteratura sopra citata.

5.2 Inibitori che si legano covalentemente all'AChE: organofosfati e carbammati.

Organofosfati.

Gli organofosfati sono gli inibitori più potenti che si conoscano, hanno una IC_{50} (concentrazione per la quale l'inibizione risulta pari al 50%) compresa tra 10^{-8} e 10^{-10} M [Whittaker 1994]. L'inibizione è irreversibile, poiché si legano covalentemente, tramite il fosforo centrale, alla serina del sito attivo [Enz *et al.* 1996]. Essendo molto tossici vengono utilizzati come insetticidi; soltanto il metrifonato è stato impiegato come farmaco (Fig.5.1).

I tanto temuti gas nervini, come il tabun, il sarin ed il soman sono proprio organofosfati. L'inibizione irreversibile dell'AChE umana interrompe la conduzione del segnale nervoso e la morte di norma sopraggiunge per paralisi respiratoria.

Le strutture cristallografiche della *TcAChE* in complesso con il diisopropilfosforofluoridrato, l'O-isopropilmetilfosfonofluoridrato (sarin) e l'O-pinacolilmetilfosfonocloridrato (soman) [PDB *entry code*: 2DFP, 1CFJ, 1SOM; Millard *et al.* 1999] hanno spiegato l'irreversibilità dell'inibizione mostrando come le forti interazioni strutturali impedissero la riattivazione enzimatica. Da notare soprattutto la distruzione della triade catalitica a causa della formazione di un legame idrogeno tra l'azoto Nε2 dell'His440 e l'ossigeno dell' organofosfato.

Carbammati.

I carbammati sono invece molecole che si comportano da pseudo-substrati (Fig.5.2); il meccanismo infatti è lo stesso dell'idrolisi del substrato (Fig.5.3 e Fig.3.3), in quanto avviene un attacco nucleofilo della serina al carbonile carbammico, con formazione di un intermedio tetraedrico che si dissocia originando l'enzima carbamoilato. L'idrolisi di questo intermedio è però molto più lenta di quella dell'enzima acetilato e ciò porta ad un'inattivazione dell'AChE che può durare anche ore [Enz *et al.* 1996].

Il capostipite di questa classe è la fisostigmina, o eserina, un alcaloide tricyclico che si estrae da una pianta tropicale, la Fava di Calabar (*Phisostigma venenosum*). L'affinità di questa molecola per il sito attivo è data dalla presenza di due gruppi amminici terziari, protonabili in condizioni fisiologiche, che simulano il gruppo ammonico dell'AChE e dunque si suppone che interagiscano con il Trp84 (vedi cap.4). Sebbene abbia dato discreti risultati nel recupero delle funzioni cognitive alterate, la fisostigmina non ha però una buona applicazione terapeutica, in quanto agisce sul sistema nervoso periferico, è instabile, ed ha un'emivita troppo breve (15 min. a 37°) [Giacobini *et al.* 1987].

Molti sono stati gli inibitori disegnati sulla base dello scheletro della fisostigmina, basti ricordare, a titolo d'esempio, la neostigmina, l'eptilstigmina ed il MF268 (Fig.3.8).

Le prime due molecole, sono farmaci impiegati nella cura di malattie come la miastenia, ma non utilizzati contro l'AD, perché non riescono a superare la barriera ematoencefalica.

L'eptilstigmina invece è stata oggetto di intense ricerche; è un prodotto sintetizzato "*ad hoc*", in cui il gruppo alchilico a lunga catena, posizionato sull'N-terminale, è stato introdotto con lo scopo di aumentare la lipofilia della molecola, favorendone così la penetrazione all'interno della barriera

ematoencefalica. Sebbene le speranze riposte in questa molecola fossero molte, il suo impiego è stato impedito dall'insorgenza di casi di neutropenia nella seconda fase di sperimentazione clinica.

Per eliminare l'effetto neutropenico, sono state sintetizzate varie serie di derivati N-alchilici della fisostigmina. I derivati più interessanti si sono rivelati quelli contenenti un gruppo morfolinico, con una basicità bassa, tale da permettere una elevata velocità di assorbimento orale e di penetrazione della barriera ematoencefalica [Alisi *et al.* 1995].

Un compromesso tra proprietà farmacocinetiche e attività inibitoria è stato raggiunto con le catene a otto atomi di carbonio. In queste condizioni, l'attività inibitoria è maggiore dell'epitilstigmina, perché, contemporaneamente, il gruppo carbamoileserolinico interagisce con il sito catalitico, e l'azoto morfolinico con il PAS.

MF268.

Il MF268 (8-(2,6-cisdimetilmorfolino)ottilfisostigmina) è uno dei migliori rappresentanti di questo gruppo; studi di cinetica hanno infatti dimostrato che il meccanismo con il quale agisce è praticamente irreversibile. Per questo motivo gli effetti anticolinesterasici in vivo dovrebbero essere più duraturi rispetto all'epitilstigmina: potrebbero infatti dipendere soltanto dalla velocità di biosintesi di nuovo enzima [Perola *et al.* 1997].

Il MF268 è stato sottoposto ad analisi cristallografica per comprenderne l'attività inibitoria [PDB *entry code*: 1OCE; Bartolucci *et al.* 1999]. Nella struttura, il gruppo carbammico è covalentemente legato alla serina catalitica. Il gruppo alchilico occupa tutta la gola estendendosi fino al PAS, dove il gruppo morfolinico forma un'interazione di tipo $\pi-\pi$ con il Trp279, bloccando l'ingresso della cavità catalitica (Fig.5.4). Questa disposizione impedisce all' eserolina, il gruppo uscente, di essere eliminata ripercorrendo in senso inverso la gola. Il fatto che il gruppo eserolinico non sia stato trovato in nessuna regione dell'enzima depone a favore dell'esistenza della "back door", come già affermato nel capitolo 4. La sostanziale irreversibilità dell'azione inibitoria è dunque dovuta all'interazione del gruppo carbammico con il PAS che blocca la catena alchilica nella gola; in questo modo il legame covalente tra il gruppo carbammico e la Ser200 viene idrolizzato ma poi, dato che la geometria della triade catalitica è mantenuta, viene riformato. Questo ciclo continuo di idrolisi seguito da carbamoilazione

inibisce praticamente in maniera irreversibile l'enzima. In realtà l'idrolisi stessa è limitata dall'ingombro sterico causato dalla catena alchilica nella gola, in quanto un ridotto numero di molecole di acqua può raggiungere il sito attivo.

Rivastigmina.

Un'altra molecola di sintesi è la rivastigmina ((+)-S-N-etil-3-[(1-dimetilamino)etil]-N-metilfenilcarbammato) (Fig.5.2), che è analoga ad una serie di derivati della miotina, i quali presentano azione inibitoria verso l'AChE sia *in vivo* che *in vitro* [Weinstock *et al.* 1986].

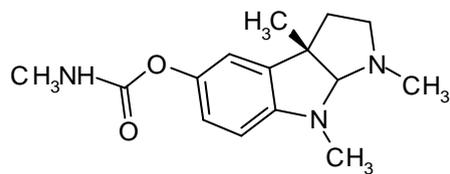
Rispetto ad altri carbammati ad uso clinico, ha una durata di azione maggiore *in vivo* e inibisce prevalentemente l'AChE dell'ippocampo e della corteccia. E' già in uso per il trattamento dell'AD con il nome di Exelon®.

La rivastigmina carbammina la *TcAChE* molto lentamente mentre la costante di velocità bimolecolare per l'inibizione della *hAChE* è >1600 volte più alta. La riattivazione spontanea dei complessi con la rivastigmina è estremamente lenta rispetto a quella dei complessi con gli altri carbammati.

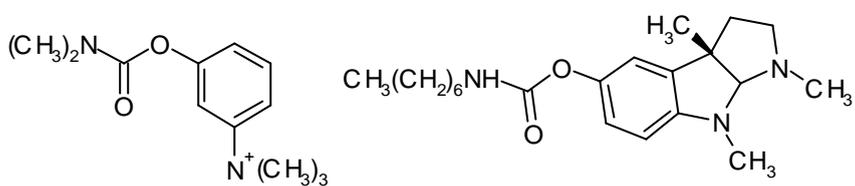
La struttura cristallografica [PDB *entry code*: 1GQR, 1GQS; Bar-On *et al.* 2002] mostra che il gruppo carbammico è legato covalentemente alla Ser200 della triade, mentre il gruppo uscente (il gruppo dimetilamminoetilfenolo o NAP) è trattenuto nel sito anionico.

In questa struttura è da evidenziare lo spostamento dell'His440 dalla sua normale posizione: essa non forma più il legame idrogeno con il Glu327 ma ne forma un altro con il Glu199. In questo modo la geometria della triade catalitica viene distorta; questa evidenza spiegherebbe della lenta cinetica di riattivazione.

Questo movimento dell'His440 era stato già osservato nella struttura della *TcAChE* complessata con gli organofosfati [PDB *entry code*: 2DFP, 1CFJ, 1SOM; Millard *et al.* 1999a] e nella struttura della *TcAChE* con il Vx [PDB *entry code*: 1VXR, 1VXO; Millard *et al.* 1999b].

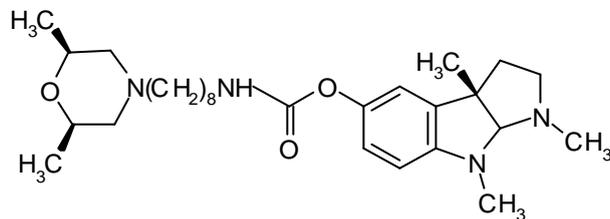


FISOSTIGMINA

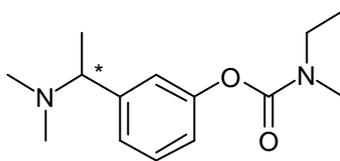


NEOSTIGMINA

EPTILSTIGMINA



MF268



RIVASTIGMINA

Fig.5.2 Carbammati.

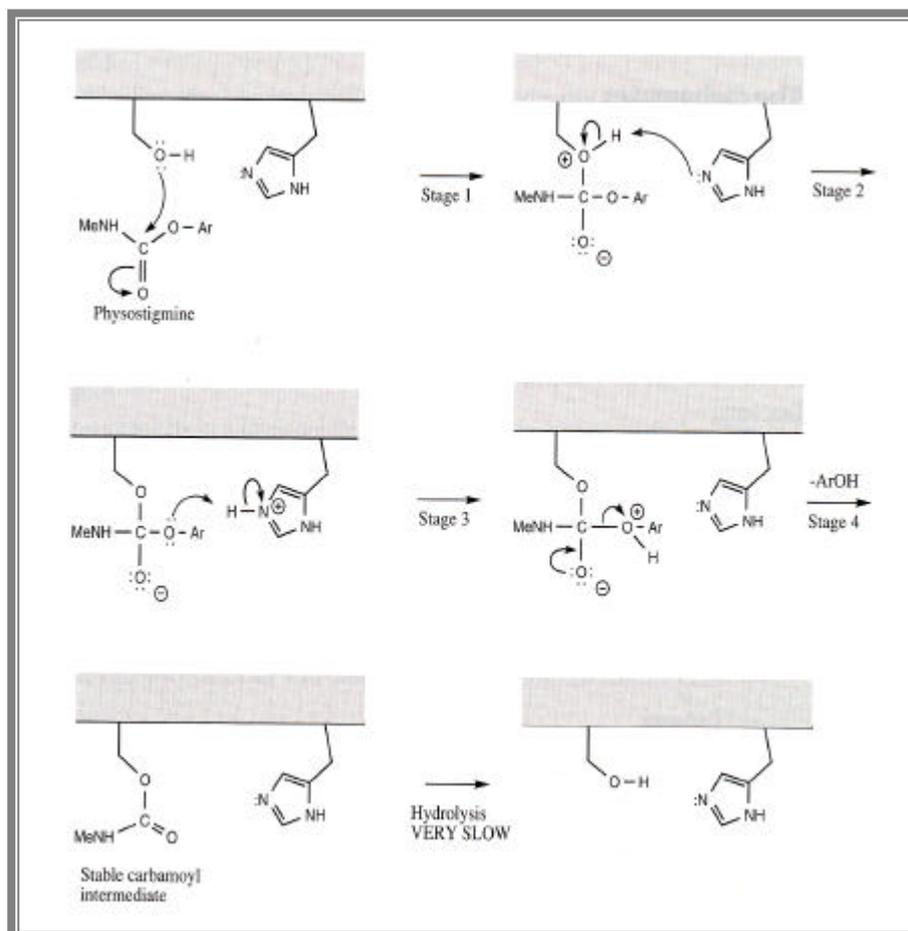


Fig.5.3 Meccanismo di inibizione dell'AChE da parte dei carbammati.

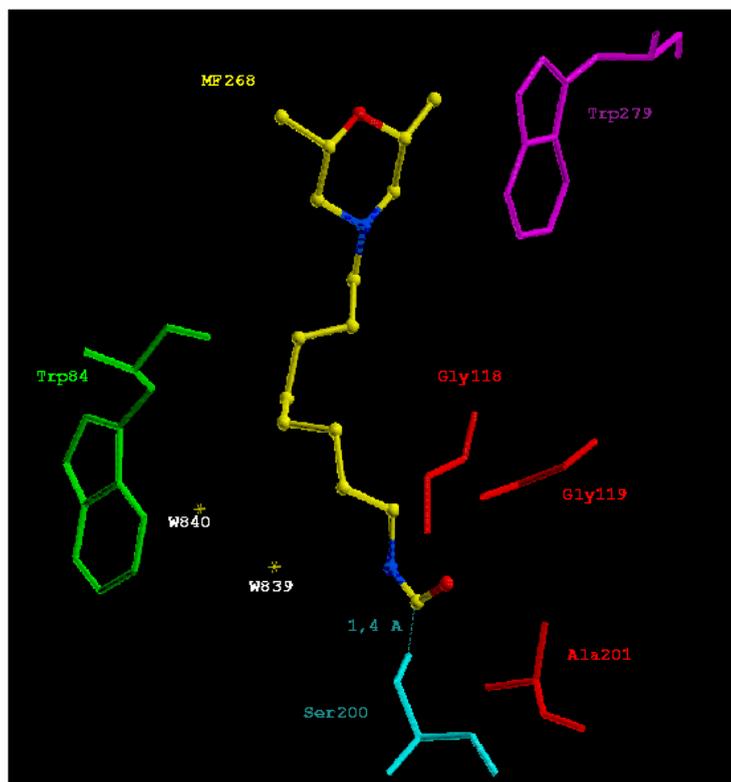


Fig. 5.4 Struttura cristallografica del complesso tra la TcAChE ed il MF268. Visione ravvicinata delle principali interazioni tra l'inibitore e la gola catalitica. Il gruppo carbammico dell'inibitore è rappresentato in giallo; in viola: Trp279; in rosso: la buca ossianionica; in verde: Trp84; in azzurro: Ser200; in bianco: molecole di acqua (W).

5.3 Inibitori reversibili.

A questa seconda classe appartengono gli inibitori (Fig.5.5) contenenti un azoto amminico o ammonico che agiscono con un meccanismo differente; essi, infatti, non formano un legame covalente con l'enzima, ma un'interazione reversibile di tipo elettrostatico o idrofobico. Alcuni interagiscono con il Trp84 del sito catalitico, altri con il Trp279 del PAS ed altri ancora con entrambi (sono poi ancora da chiarire le interazioni con altri siti).

Edrofonio.

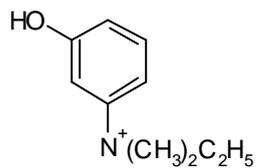
Il capostipite di questo gruppo è l'edrofonio, che, con il suo gruppo ammonico, interagisce con il Trp84 del MAS, e tramite il gruppo ossidrilico in meta, forma un legame idrogeno con la serina della triade [PDB *entry code*: 1ACK, 1AX6; Harel *et al.* 1993; Ravelli *et al.* 1998].

Decametonio.

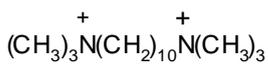
Un altro inibitore importante è il decametonio che contiene due gruppi ammoniaci posizionati ai due estremi di una catena alchilica di dieci atomi di carbonio. La struttura cristallografica [1ACL; Harel *et al.* 1993] ha rivelato come il decametonio interagisca con il Trp84 in fondo alla gola e con il Trp279 del PAS all'entrata (Fig.5.6a). Con il decametonio è stata osservata per la prima volta la duplice interazione con il fondo della gola e con l'ingresso della stessa, motivo per il quale l'inibizione è duratura nel tempo.

Tacrina.

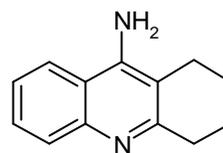
La tacrina, è stato il primo farmaco impiegato nel trattamento dell'AD con il nome di Cognex[®], approvato nel 1993 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) negli Stati Uniti [Davis *et al.* 1995]; essa porta ad un miglioramento delle facoltà cognitive, affiancato però da effetti collaterali a livello gastrointestinale e, soprattutto, epatico.



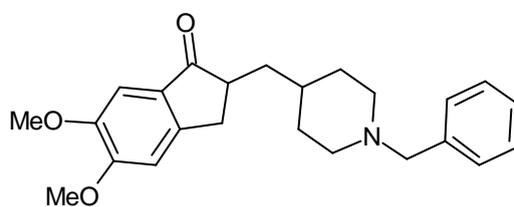
EDROFONIO



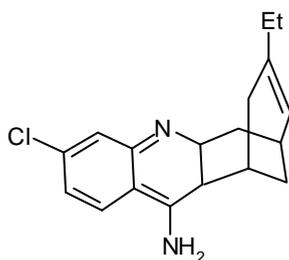
DECAMETONIO



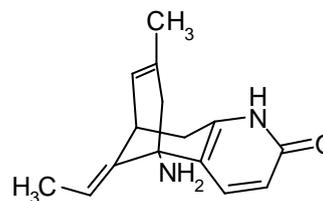
TACRINA



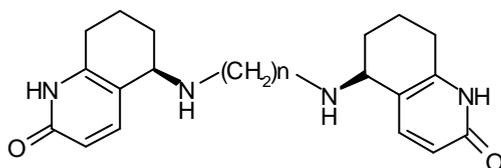
E2020



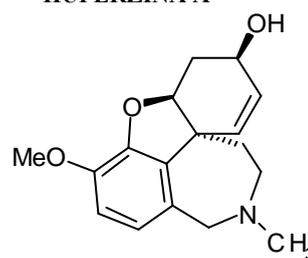
HUPRINA X



HUPERZINA A

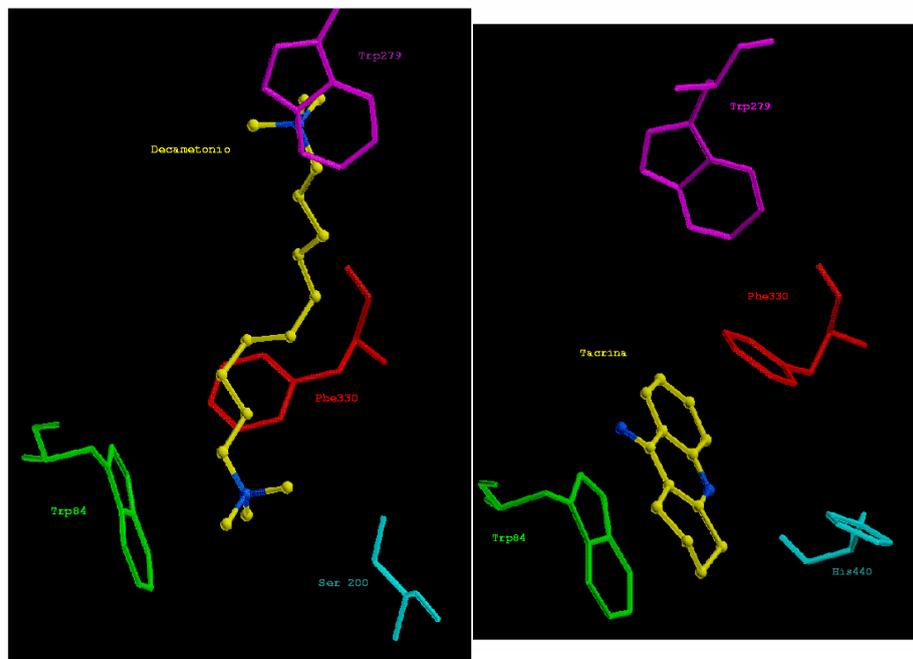


DIMERI DI HUPERZINA



GALANTAMINA

Fig. 5.5 Inibitori reversibili dell'AChE.



a

b

Fig.5.6 a. Struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* ed il decametonio.

b. Struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* e la tacrina.

Visione ravvicinata delle principali interazioni tra gli inibitori e la gola catalitica.

Gli inibitori sono rappresentati in giallo; in viola: Trp279; in rosso: Phe330; in verde: Trp84; in azzurro: Ser200 (a), His440 (b).

L'azione è esplicata da una semplice interazione con il Trp84, che dunque non può interagire con l'azoto dell'acetilcolina; di conseguenza viene meno il corretto orientamento del substrato rispetto alla triade catalitica. La struttura cristallografica [1ACJ; Harel *et al.* 1993] mostra una interazione di tipo p-p tra il sistema aromatico acridinico della tacrina e quello indolico del Trp84. L'altra faccia dell'inibitore interagisce invece con la Phe330; in questo modo la tacrina viene bloccata da una interazione di tipo "sandwich" (Fig.5.6b). La cinetica è di tipo misto, poiché l'inibizione è competitiva ma, anche non competitiva, il che fa supporre una interazione anche con altri siti dell'enzima, in particolare con il PAS [Whittaker 1994].

E2020.

L'E2020 è stato il secondo farmaco impiegato nella terapia dell'AD; è stato approvato dalla FDA statunitense con il nome di Aricept® nel 1996, e presenta un'incidenza molto minore degli effetti collaterali, probabilmente a causa della struttura benzilpiperidinica [Kawakami *et al.* 1996].

La risoluzione della struttura del complesso [PDB *entry code*: 1EVE; Kryger *et al.* 1999] ha messo in evidenza come questo inibitore non interagisca direttamente con la triade catalitica, ma formi ben cinque interazioni chiave che comprendono quella tra l'N piperidinico con il Trp84 e quella dei metossili del sistema indanonico con il Trp279 (Fig.5.7). La selettività mostrata verso l'AChE rispetto alla BChE sarebbe dovuta alle differenze strutturali dei due enzimi. La BChE, la cui struttura è stata recentemente risolta, [PDB *entry code*: 1P0I; Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C. and Nachon, F. Structure of Human Butyrylcholinesterase and of its complexes with substrates and products. *To be Published*] è infatti priva del PAS. La cinetica, anche in questo caso di tipo misto è confermata proprio dalla complessità dell'interazione con i residui enzimatici.

Huperzina e derivati.

La famiglia delle huperzine comprende la (-)-huperzina A (HupA), e la

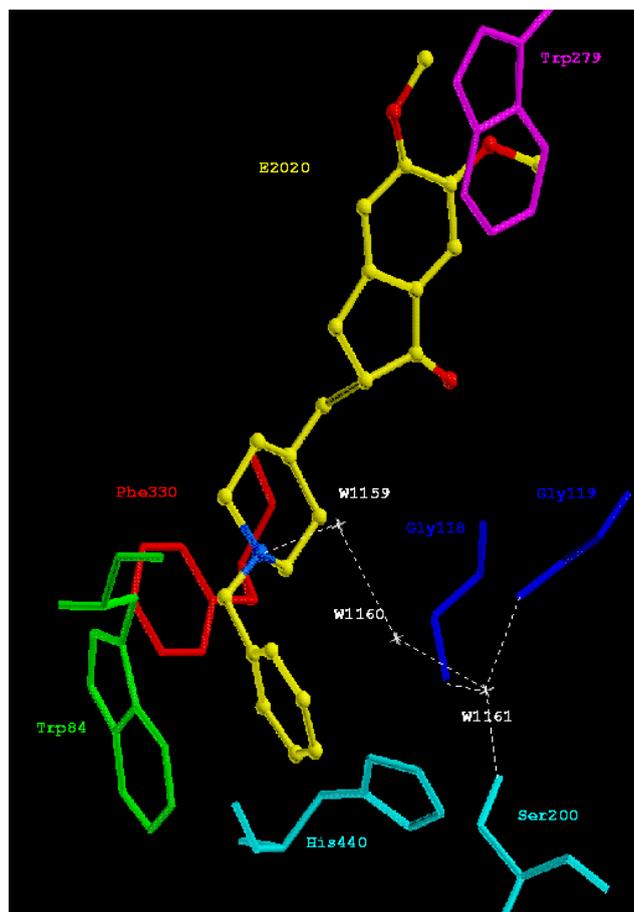


Fig.5.7 Struttura cristallografica del complesso tra la TcAChE e l'E2020. Visione ravvicinata delle principali interazioni tra l'inibitore e la gola catalitica. L'inibitore è rappresentato in giallo; in viola: Trp279; in rosso: Phe330; in verde: Trp84; in azzurro: Ser200, His440; in blu: la buca ossianionica; in bianco: molecole di acqua (W).

(-)-huperzine B (HupB), entrambe alcaloidi isolati dall'*Huperzia Serrata*, che viene impiegata come erba medicinale nella medicina cinese. Entrambe le molecole sono potenti inibitori reversibili dell'AChE [Wang *et al.* 1986; Kozikowski *et al.* 1991]. La (-)-HupA è la più studiata ed è stata già approvata in Cina come farmaco sintomatico per l'AD.

La strutture tridimensionali del complesso tra l'AChE e, rispettivamente la (-)-HupA [PDB entry code: 1VOT; Raves *et al.* 1997] e l'analogo (-)-HupB [PDB entry code: 1GPK; Dvir *et al.* 2002b] e l'enantiomero sintetico (+)-HupA [PDB entry code: 1GPN; Dvir *et al.* 2002a], mostrano gli inibitori interagire fortemente con il Trp84 e la Phe330. Per quanto riguarda la proteina si osserva uno spostamento del legame peptidico tra Gly117 e Gly118. Questo spostamento di residui potrebbe essere responsabile della inspiegabile lenta reazione di inibizione dell'AChE.

Il fatto che la (-)-HupA sia un prodotto naturale la cui sintesi chimica è complessa, ne ha frenato l'impiego come farmaco per l'AD. Sono stati dunque utilizzati analoghi semplificati della HupA come base per la sintesi di dimeri [Carlier *et al.* 1999a; Carlier *et al.* 1999b; Han *et al.* 1999].

L'affinità di questi dimeri per l'AChE risulta maggiore rispetto alla (-)-HupA, anche in relazione al numero di unità metilene che legano i due gruppi funzionali [Carlier *et al.* 2000]. La struttura cristallografica dei complessi di questi composti con la *TcAChE* [PDB entry code: 1H22, 1H23; Wong *et al.* 2003] ha permesso di chiarire le differenti attività mostrate in specie differenti di AChE anche sulla base del confronto tra le dimensioni della gola della *TcAChE*, più larga, e quella dell'AChE da *Mus Musculus* [PDB entry code: 1J06; Bourne *et al.* 2003], più stretta.

Recentemente sono state sintetizzate chimere contenenti i farmacofori della (-)-HupA e della tacrina, alcuni dei quali hanno mostrato un'attività anticolinesterasica maggiore dell'(-)-HupA e della tacrina stesse. La più potente tra queste molecole denominate huprine, è la huprina X, che è 180 volte più attiva della (-)-HupA e ben 1200 volte più attiva della tacrina [Camps *et al.* 2000].

La struttura cristallografica [PDB entry code: 1E66; Dvir *et al.* 2002b] mostra che l'inibitore si lega al sito anionico ed impedisce l'accesso al sito esteratico. La parte aromatica della molecola occupa lo stesso sito della tacrina formando uno "stacking" tra il Trp84 e la Phe330, mentre l'unità carbociclica si posiziona come la (-)-HupA. Il cloro si trova in una tasca idrofobica interagendo con i residui aromatici Trp432 e Phe330 e con i gruppi metilici della Met436 e della Ile439.

Galantamina.

Un altro farmaco di recente approvazione da parte della FDA americana (2001) è la galantamina (Reminyl®); questa molecola è un alcaloide naturale presente nelle piante della famiglia delle “*Amaryllidaceae*”, in particolare della *Galanthus Nivalis*. Fin dalla sua scoperta, circa cinquant’anni fa, è stata impiegata nella cura della miastenia grave e di altre malattie neuromuscolari; la sua capacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica ha suggerito di impiegarla nella cura dell’AD [Harvey 1995].

Di fatto la galantamina è un inibitore selettivo dell’AChE, competitivo, a lunga durata, e ad attività centrale; inoltre è resistente all’idrolisi, è solo moderatamente tossico, ed è più facilmente assorbito della fisostigmina [Han *et al.* 1992]. In alcuni casi ha aumentato le capacità mnemoniche dei pazienti, riducendo il deterioramento cognitivo (in base ad alcune scale neuropsichiatriche) e, soprattutto, è ben tollerata dall’organismo, non presentando epatotossicità. Inoltre agisce anche come attivatore dei recettori nicotinici [Maelicke *et al.* 1996], potenziandone le risposte e, determinando un aumento delle capacità cognitive [Santos *et al.* 2002; Dajas-Bailador *et al.* 2003].

Numerosi gruppi di ricerca hanno studiato e sintetizzato derivati della galantamina con lo scopo di ottenere farmaci più attivi, specifici e tollerabili [Han *et al.* 1992; Bores *et al.* 1996a; Bores *et al.* 1996b; Mary *et al.* 1998].

La struttura cristallina del complesso in esame [PDB entry code: 1DX6, 1QTI; Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001; Pilger *et al.* 2001] ha consentito di determinare la corretta orientazione della galantamina e le sue interazioni con il sito attivo.

Anche in questo caso, come per tutti gli altri inibitori, non sono comparsi significativi cambi conformazionali della TcAChE rispetto all’enzima nativo.

La galantamina si posiziona in fondo alla gola, occupando la regione responsabile del legame con il gruppo acilico dell’acetilcolina, e il sito di legame per i gruppi quaternari, in prossimità del Trp84 (Fig.5.9); molte sono le interazioni che i vari gruppi dell’inibitore formano con i residui enzimatici. Da sottolineare anche che la forte associazione osservata è da attribuire ad un contributo entropico favorevole dovuto alla sua rigida struttura ed alla presenza di alcune molecole di acqua trovate anche nella struttura nativa della TcAChE.

Il gruppo ossidrilico forma un forte legame idrogeno (2,7 Å) con l’Oε1 del Glu199, ed interagisce con due molecole d’acqua, la W820 e la W840,

entrambe cruciali “ponti” per il contatto con i residui proteici. La W820, a 2,7 Å dal gruppo ossidrilico della galantamina, si lega all'O γ della Ser200 della triade (2,7 Å), ed ai gruppi amminici dei residui della buca ossianionica, Gly118 (2,5 Å), Gly119 (3,2 Å) ed Ala201 (3,1 Å). Questa W820 forma anche un legame idrogeno con l'ossigeno (3,1 Å) dell'anello diidrofuranico della galantamina.

E' chiaro che questa molecola d'acqua occupa una posizione fondamentale perché intreccia interazioni, ed in questo modo rimane bloccata nel suo sito (non può essere considerata alla stregua della altre molecole di acqua che sono “libere” di entrare ed uscire dalla gola). La seconda molecola di acqua coinvolta, la W840 dista 3,5 Å dal gruppo ossidrilico della galantamina. Essa interagisce anche con l'O η della Tyr130 (2,5 Å) e con l'N della Gly117 (2,8 Å).

L'anello cicloesenico ed i due gruppi metilenici (C11 e C12) dell'anello tetraidroazepinico della galantamina, si rivolgono verso l'anello indolico del Trp84. Il doppio legame del cicloesene forma interazioni π - π con il sistema π dell'anello indolico del Trp84; i contatti più forti si hanno tra il C2 della galantamina ed il C ϵ 3 del Trp84 (3,5 Å) e tra il C11 della galantamina ed il C ϵ 1 del Trp84 (3,8 Å).

Il metile del metossile occupa il sito di acilazione dell'AChE e la sua orientazione è stabilizzata da un'interazione σ - π di non legame tra il C ϵ 1 della Phe288 (3,2 Å) il C ζ della Phe290 (3,5 Å) ed il C ζ della Phe331 (3,7 Å). L'ossigeno del gruppo metossilico interagisce sia con l'O γ della Ser200 (3,0 Å), che con la W820 (3,3 Å).

Il gruppo N-metilico dell'anello tetraidroazepinico ha un'orientazione equatoriale e ci si aspetta porti la carica positiva dell'ammina poiché il pH del tampone di cristallizzazione è sei. Esso interagisce tramite un legame idrogeno non classico (3,6 Å) con l'O δ 2 dell'Asp72 e con la W803 ad una distanza di 3,2 Å.

L'azoto dell'ammina terziaria interagisce con la W712 che, a sua volta, forma un legame idrogeno aromatico con la Phe330 a 3,7 Å di distanza.

Sorprendentemente il gruppo protonato dell'ammina non interagisce direttamente né con il Trp84 (come visto per la tacrina, l'edrofonio, l'huperzina, il trifluoroacetofenone, il decametonio), né con la Phe330, sito addizionale di legame quaternario che si allinea nella gorge a metà strada (come visto nel caso dell'E2020).

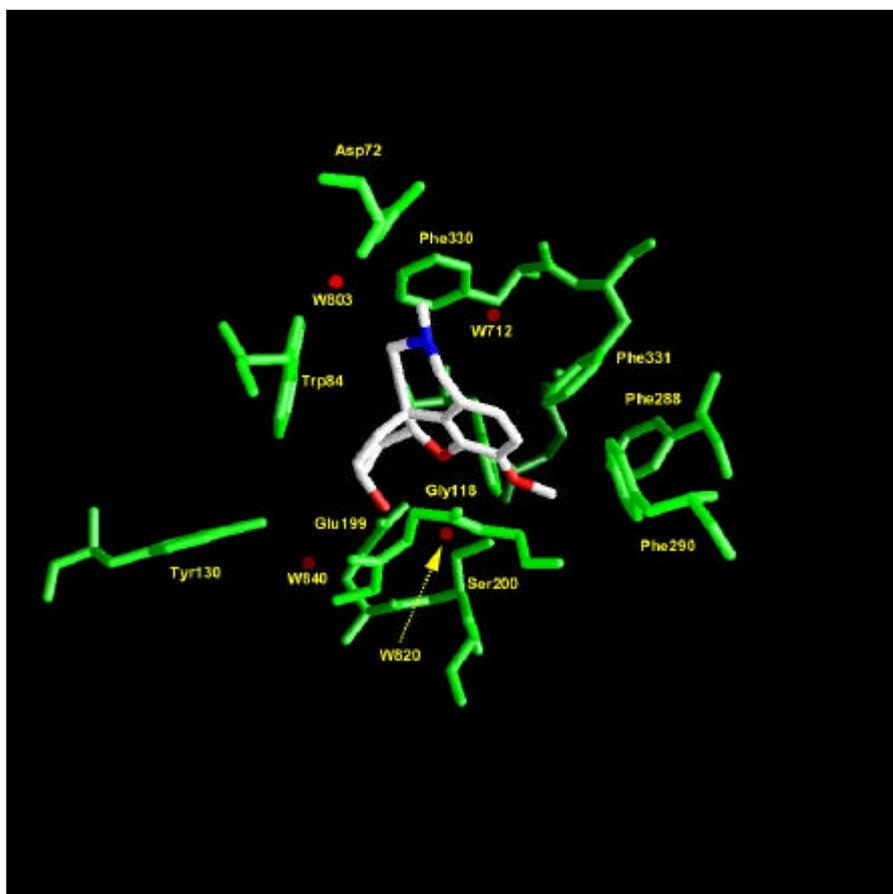


Fig.5.8. Struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* e la galantamina. Visione ravvicinata delle principali interazioni dell'inibitore con la gola catalitica. L'inibitore è rappresentato in bianco; in verde sono riportati i residui enzimatici; in rosso le molecole d'acqua (W).