

RISULTATI E DISCUSSIONE

CAPITOLO 6. STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA DEL COMPLESSO TRA LA TcAChE ED IL NUOVO FARMACO GANSTIGMINA (CHF-2819).

6.1 Introduzione.

La fisostigmina (Fig.5.2) e la geneserina (Fig.6.1) sono i due principali alcaloidi isolati e purificati dalla pianta tropicale Fava di Calabar (*Physostigma venenosum*). Entrambe le molecole appartengono alla classe degli inibitori carbammici. Il meccanismo di azione è caratterizzato da una rapida carbamoilazione del sito esteratico dell'enzima, seguita da una lenta rigenerazione del sito attivo (vedi Fig.5.3). Come già descritto nel capitolo 5 (vedi par.5.2) gli analoghi della fisostigmina sono stati ampiamente studiati come potenziali farmaci per l'AD [Liston *et al.* 2004].

I derivati della geneserina non sono stati altrettanto studiati. La geneserina, pur mostrando una minore attività inibitoria verso l'AChE rispetto alla fisostigmina [Robinson *et al.* 1968], presenta una significativa capacità inibitoria sull'attività colinesterasica plasmatica in volontari sani [Astier *et al.* 1985]. Inoltre, studi effettuati su AChE eritrocitaria e su BChE plasmatica hanno rivelato che la geneserina presenta una selettività maggiore verso la BChE (rapporto AChE:BChE= 1:12) [Pietra *et al.* 1999].

Sono stati dunque sintetizzati, presso i laboratori dell'industria farmaceutica *Chiesi Farmaceutici S.p.a.*, Parma, Italia, nuovi derivati alchilici ed arilici della geneserina (Fig.6.1) [Pietra *et al.* 1999], con lo scopo di saggiarne l'attività verso le due forme di colinesterasi.

Tra queste molecole la ganstigmina, (-)-O-[(2')-etilfenil]carbamoil]geneserolina cloridrato (CHF-2819) (Fig.6.2A) ha mostrato una forte selettività verso l'AChE eritrocitaria rispetto alla BChE plasmatica (115:1) ed un buon profilo pre-clinico. Oltre a presentare un'attività colinergica, è stato dimostrato che la ganstigmina diminuisce la neurodegenerazione indotta dal peptide β -amiloide 25-35, non influenza l'espressione ed il metabolismo dell'*Amyloid Precursor Protein*, ed attenua l'amnesia indotta dall'anticolinergico scopolamina [Trabace *et al.* 2000; Catinella *et al.* 2001; Trabace *et al.* 2001; Trabace *et al.* 2002; Cassano *et al.* 2002; Mazzucchelli *et al.* 2003; Windisch *et al.* 2003]. Questo inibitore dell'AChE presenta dunque buone potenzialità per essere impiegato come farmaco per l'AD. Sono ora disponibili i risultati dei primi test clinici effettuati per valutarne la sicurezza, la tollerabilità ed il profilo

farmacodinamico: l'inibitore è ben tollerato ad una dose compresa tra i 5 ed i 10 mg ed è sufficiente una sola somministrazione giornaliera orale [Jhee *et al.* 2003]. Inoltre, come recentemente riportato in letteratura, la somministrazione orale ed intraperitoneale della ganstigmina, può invertire il deficit colinergico e comportamentale in topi con fenotipo neurodegenerativo AD11 *anti-nerve growth factor* [Capsoni *et al.* 2004]. Recentemente è stata anche valutata l'attività anticolinesterasica degli analoghi della geneserina che possono andare incontro a tautomerismo tra le strutture N-ossido ed 1,2-ossaziniche, in funzione del pH e del tempo [Yu *et al.* 2002].

Per chiarire il meccanismo della ganstigmina a livello molecolare, è stata risolta la struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* e l'inibitore in questione.

6.2 Struttura cristallografica della TcAChE in complesso con la ganstigmina.

Risultati.

La struttura ai raggi X del complesso in esame è stata determinata a 2.3 Å di risoluzione e l'affinamento della struttura ha raggiunto, a convergenza, un valore di R e di R_{free} rispettivamente del 19.0% e del 23.7%. In Tabella 8.I sono riportati alcuni dati statistici relativi alla raccolta dati ed all'affinamento della struttura.

L'analisi delle mappe di densità elettronica, aventi rispettivamente coefficienti $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ e $(F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$, calcolate al termine dell'affinamento cristallografico a seguito del solo contributo, nel calcolo delle fasi, derivante dagli atomi appartenenti alla proteina (PDB *entry code*: 2ACE con esclusione delle acque), ha rivelato la presenza del gruppo 2-etilfenil carbammico legato covalentemente all'ossigeno ossidrilico della serina catalitica (Figura 6.2B, Fig.6.3).

Il legame covalente tra l'Oγ della Ser200 ed il carbonile del gruppo etilfenilcarbammico è confermato dal valore della distanza che corrisponde ad 1.4Å, ottenuto dall'affinamento eseguito senza imporre vincoli geometrici energetici. Il gruppo carbammico è inoltre stabilizzato dalla presenza di legami idrogeno tra l'ossigeno carbonilico e gli idrogeni ammidici dei residui che cosituiscono la buca ossianionica: Gly118, Gly119, a 2.6 Å di

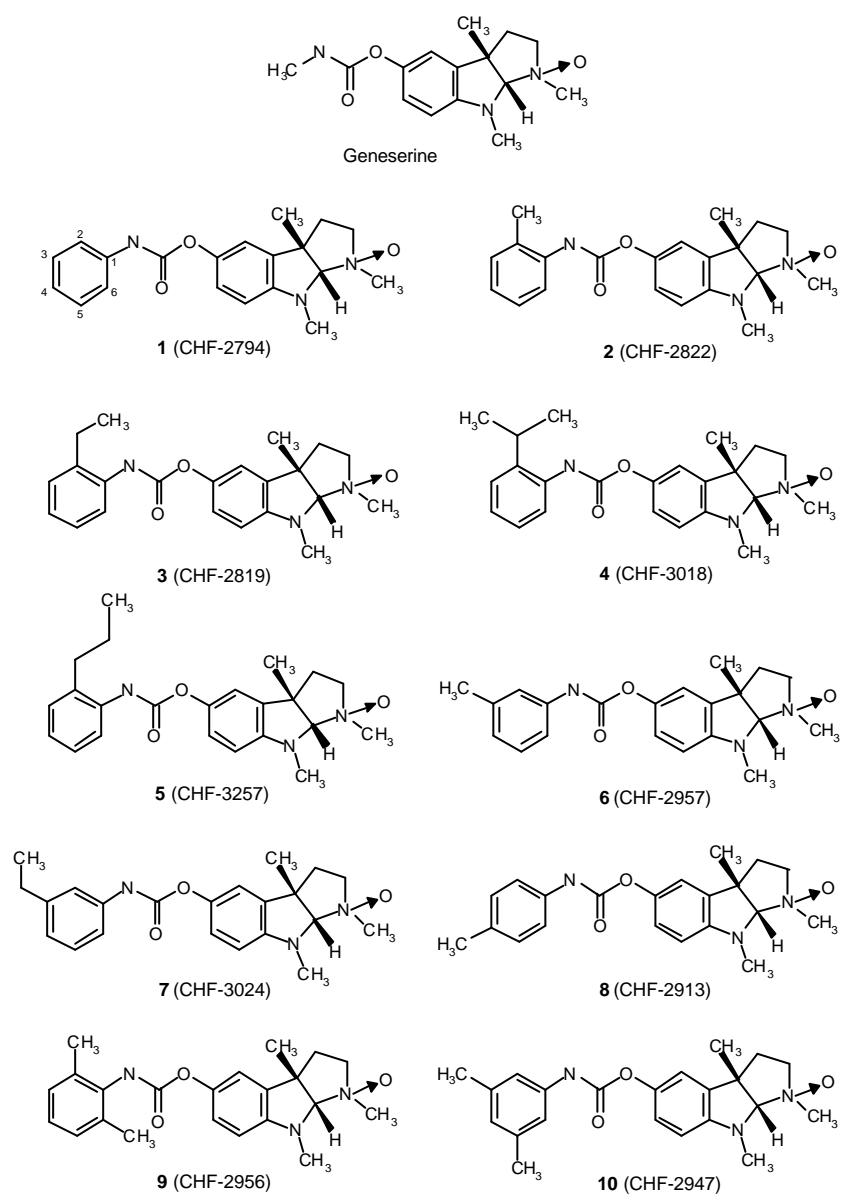
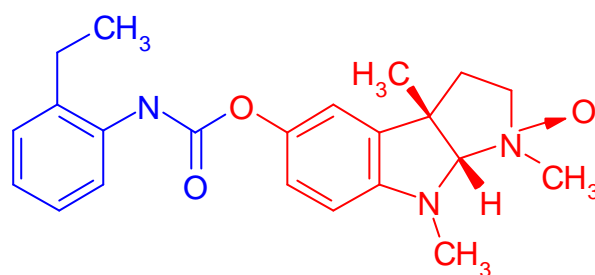
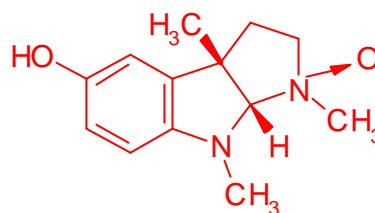
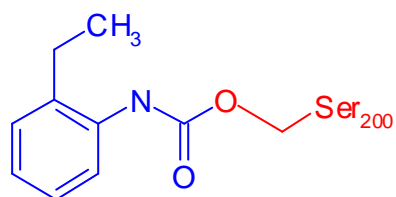


Fig.6.1 Geneserina e suoi derivati sintetici. La molecola numero 3 corrisponde alla ganstigmina (CHF-2819).



A



B

Fig.6.2 Meccanismo di inibizione dell' AChE da parte della ganstigmina (CHF-2819).
 A: In blu è riportato il gruppo carbammico (etilfenilico) ed in rosso il gruppo geneserolinico.
 B: In blu è disegnato il gruppo carbammico legato alla Ser200 ed in rosso, rispettivamente, la Ser200 ed il gruppo uscente geneserolina.

Tabella6.I Parametri del cristallo, raccolta dati ed affinamento statistico del complesso TcAChE- ganstigmina.

<i>Crystal parameters</i>	
Gruppo spaziale	P3 ₁ 21
Costanti di cella	a=b= 111.74 Å , c=136.82 Å α=β=90 ° , γ= 120°
Mosaicità, °	0.73
<i>Data Collection</i>	
Sorgente di raggi X	XRD1, ELETTRA, Trieste (Italy)
Lunghezza d'onda, Å	1.00
Temperatura, K	120.0
Intervallo di RISOLUZIONE, Å	27.95 – 2.40 (2.44-2.40) [§]
Misure	517559
Riflessi unici I=0s(I)	37817 (2303) [§]
Completezza, %	96.4 (97.4) [§]
Molteplicità	6.0 (5.1) [§]
R _{sym} [†] , %	0.057 (0.422)
Media I/s(I) dei dati merged	0.063 (0.470)
<i>Refinement statistics</i>	
Risoluzione usata, Å	27.95 – 2.40
Riflessi usati F=0s(F _o)	37576
R _{cryst} , R _{free} [*] , %	19.0, 23.7
R.m.s.d. sulle lunghezze dei legami, * Å	0.010
R.m.s.d. sugli angoli di legame, * °	1.595
<i>Number of atoms</i>	
Proteina	4245
Acqua	276
Carboidrati	28
Inibitore	11
Ligando (PEG, MES buffer)	16, 24
Tutti gli atomi	4600
<i>Average temp. Factors, Å</i>	
Proteina	43.9
Acqua	48.1
Carboidrati	73.1
Inibitore	50.1
Ligando (PEG, MES buffer)	80.9, 92.5
R.m.s.d. ?B, # Å ²	4.24

[§] I numeri in parentesi di riferiscono all'intervallo contenente i dati a più alta risoluzione.

[†] $R_{sym}(I) = \sum_{hkl} S_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} S_i |I_{hkl,i}|$ con $\langle I_{hkl} \rangle$ Intensità media delle osservazioni multiple delle $I_{hkl,i}$ dei riflessi correlati per simmetria.

^{*} $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} F_{obs}$ dove F_{obs} and F_{calc} sono le ampiezze dei fattori di struttura rispettivamente per i riflessi hkl. L' R_{free} è stato calcolato omettendo il 5% dei riflessi osservati dai dati.

^{*} I criteri stereo chimici sono quelli di Engh and Huber (*Acta Crystallogr.* (1991) A47, 392-400).

[#] R.m.s.d ΔB è lo scarto quadratico medio dei fattori di temperatura B (modello isotropo) tra gli atomi covalentemente legati.

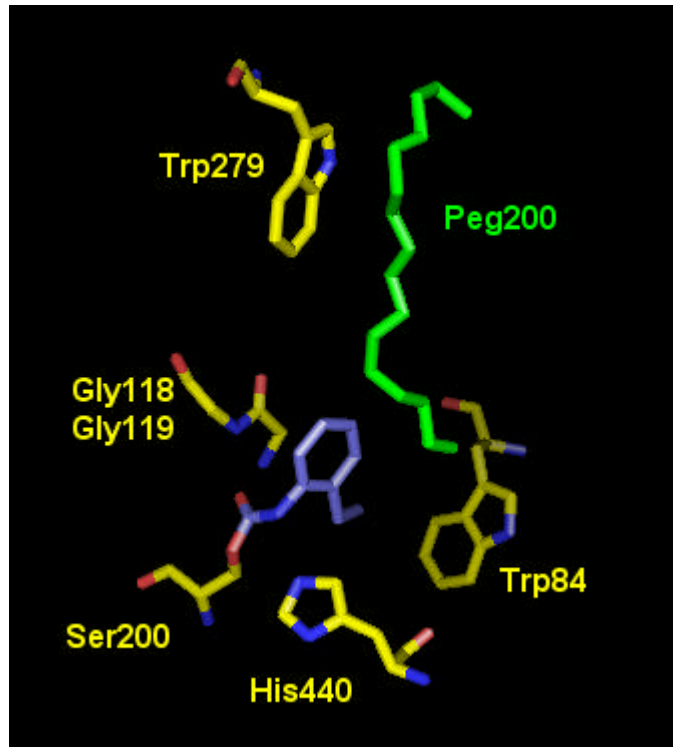
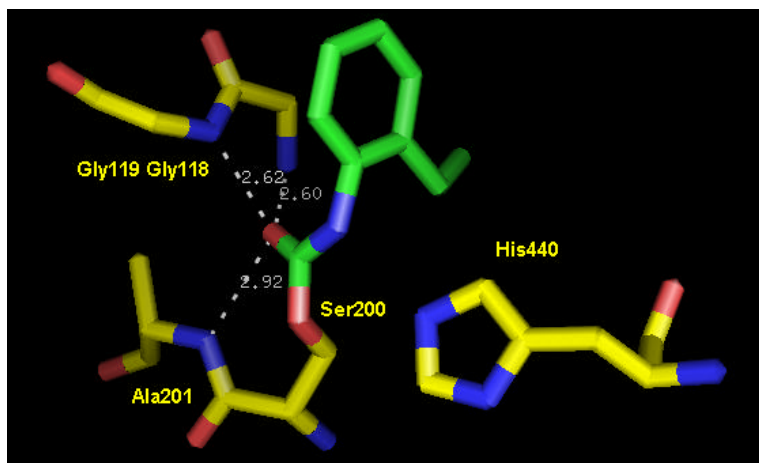
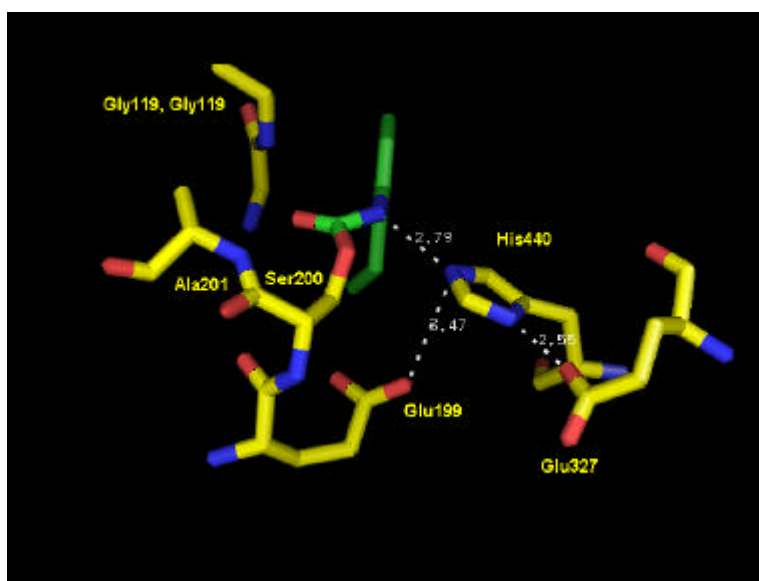


Fig.6.3 Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-ganstigmina. Visione ravvicinata delle interazioni tra il gruppo etilfenilcarbammico della ganstigmina, in viola, ed i residui della gola della *TcAChE*, in giallo. In verde è rappresentata il pentamero di Peg200. Notare che l'inibitore è legato covalentemente alla Ser200.



A



B

Fig.6.4 Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-ganstigmina. Visione ravvicinata delle interazioni tra il gruppo etilfenilcarbammico della ganstigmina, in verde, ed i residui enzimatici, in giallo. **A:** Particolare delle distanze tra l'ossigeno carbammico dell'inibitore ed i residui della buca ossianionica (Gly118,Gly119, Ala201). **B:** Particolare delle distanze tra l'azoto ammidico dell'inibitore e l'N ϵ 2 dell'His440, tra l'N ϵ 2 dell'His440 e l'O ϵ 2 del Glu199 e tra l'N δ 1 dell'His440 e l'O ϵ 1 del Glu327.

distanza in entrambi i casi, ed Ala201 a distanza di 2.9 Å (Fig.6.4A). L'azoto ammidico del gruppo etilfenilcarbammico forma un legame idrogeno con l'Nε2 dell'His440 ad una distanza di 2.79 Å (Fig.6.4B). Non sono state identificate ulteriori interazioni tra la molecola ed i residui enzimatici vicini, né con le molecole di acqua circostanti. Nondimeno l'inibitore si posiziona all'interno della cavità catalitica con un'orientazione molto simile a quella dell'anello fenilico presente rispettivamente nella galantamina [Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001], nell'edrofonio [PDB entry code: 1ACK, 1AX6; Harel *et al.* 1993; Ravelli *et al.* 1998], nell'analogo dello stato di transizione μ-(N,N',N''-trimetilammonio) trifluoroacetofenone [PDB entry code: 1AMN; Harel *et al.* 1996] e nel Bw284C51 [PDB entry code: Felder *et al.* 2002]. In particolare, un esame delle strutture cristallografiche di queste molecole in complesso con la TcAChE, mostra che gli anelli aromatici sono più o meno paralleli l'uno all'altro con angoli di 9°, 10°, 15° e 9° rispettivamente e con una distanza media tra i centroidi di 0.9Å, 0.8Å, 1.2Å e 1.3Å. Come appare evidente, questi inibitori reversibili e non reversibili, occupano un'area comune sul fondo della gola (Fig 6.5 e Fig.6.6).

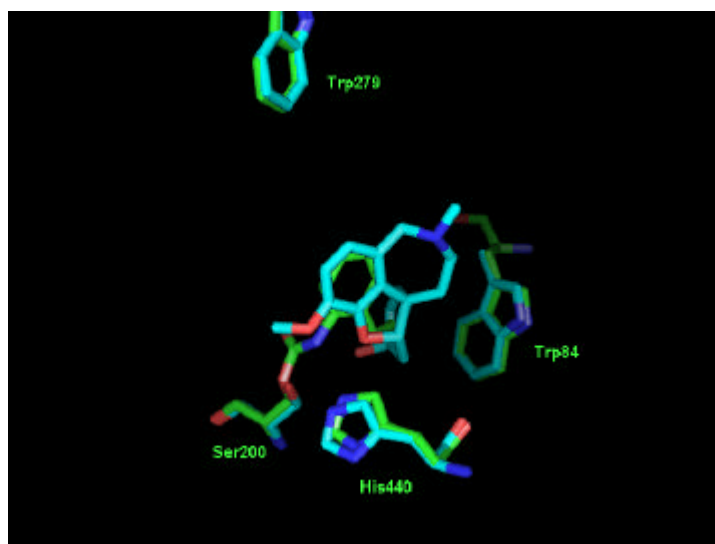
Nella struttura, inoltre, un pentamero di polietilenglicole 200, usato come agente precipitante nella cristallizzazione, occupa la gola enzimatica, così come nel caso della struttura cristallografica del complesso TcAChE-galantamina [PDB entry code: Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001] (Fig.6.3.). Recentemente è stata determinata la struttura tridimensionale dell'enzima in complesso con un frammento eptamerico di polietilenglicole terminante con un gruppo tiolico [Koellner *et al.* 2002].

Discussione.

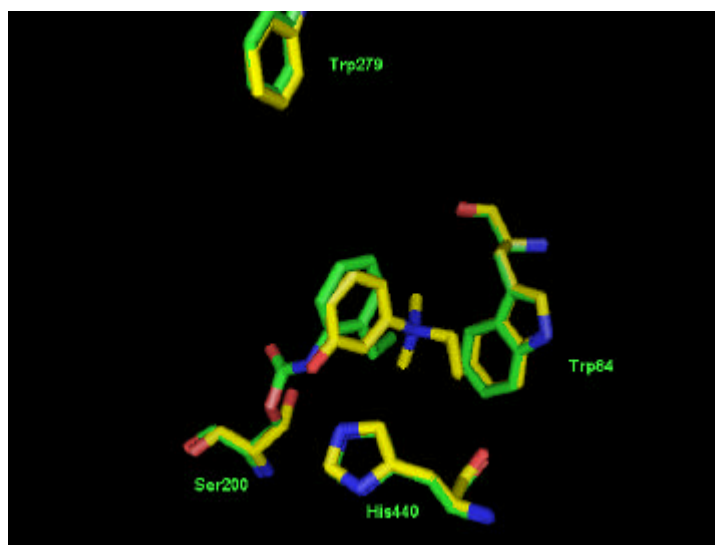
La ganstigmina, come già sottolineato, mostra una buona attività inibitoria verso l'AChE.

L'analisi strutturale dettagliata del sito catalitico ha permesso di comprendere la lunga durata di azione di questo inibitore.

Il legame covalente alla Ser200 provoca un'inattivazione funzionale della triade catalitica dovuta alla formazione di un forte legame idrogeno tra l'Nε2 dell'His440 e l'azoto ammidico del gruppo etilfenilcarbammico (Fig.6.4B). Come conseguenza, la funzionalità dell'His440 è compromessa e la sua successiva riattivazione rallentata.

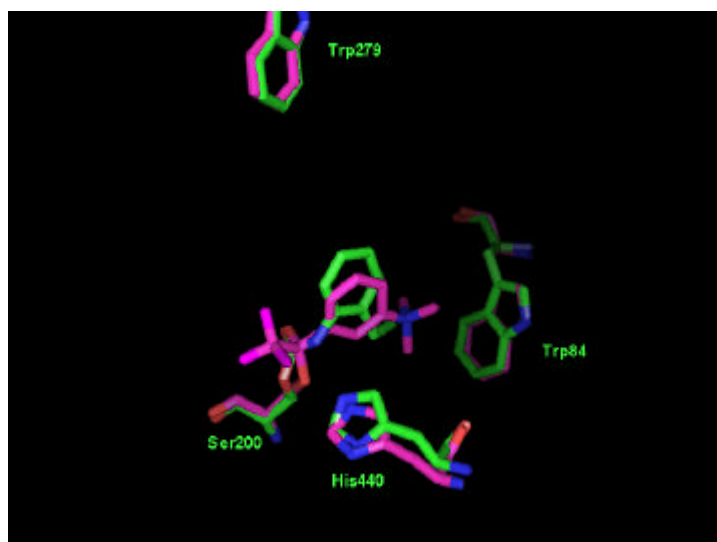


A

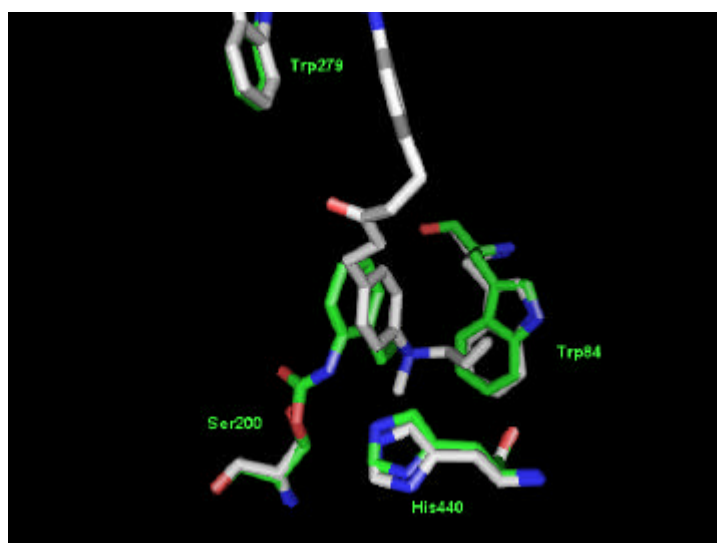


B

Fig.6.5 Sovrapposizione delle strutture cristallografiche dei complessi *TcAChE*-ganstigmina, in verde, rispettivamente con: *TcAChE*-galantamina, in celeste (**A**) e *TcAChE*-edrofonio, in giallo (**B**).



A



B

Fig.6.6 Sovrapposizione delle strutture cristallografiche dei complessi *TcAChE*-ganstigmina, in verde, rispettivamente con: *TcAChE*- μ -(N,N',N'' -trimetilammonio) trifluoroacetofenone, in fucsia (**A**) e *TcAChE*- Bw284C51, in bianco (**B**).

Nella proteina nativa [PDB *entry code*: 2ACE; Sussman *et al.* 1991] la distanza tra l'Oγ della Ser200 e l'Nε2 dell'His440 è 2.70 Å, nella struttura della TcAChE in complesso con la ganstigmina l'Nε2 dell'His440 dista dall'Oγ della Ser200 3.10 Å. La variazione della distanza con la serina catalitica è anche essa un'indice dell'inattivazione della triade catalitica.

Nei complessi della TcAChE con alcuni organofosfati [Millard *et al.* 1999a, 1999b] e con il carbammato rivastigmina [Bar-On *et al.* 2002] (vedi par.5.2), questo effetto è ancora più pronunciato, poiché si osserva una vera e propria distorsione geometrica della triade catalitica.

Nella struttura del complesso dell'enzima con il carbammato MF268, invece, la funzionalità e la geometria della triade si mantengono intatte; la distanza tra l'azoto ammidico del gruppo carbammico e l'Nε2 dell'His440 è di 3.26Å. La lenta riattivazione è dovuta all'interazione del gruppo carbammico con il PAS dell'enzima. La catena alchilica è dunque bloccata nella gola; di conseguenza, una volta avvenuta l'idrolisi, l'enzima può essere nuovamente carbamoiato (vedi discussione par..5.2).

Esperimenti di mutagenesi eseguiti sull'*hAChE* hanno evidenziato il coinvolgimento del Glu199 (202 nella *hAChE*) durante il processo di acilazione enzimatica [Radic *et al.* 1992; Shafferman *et al.* 1992]; la risoluzione della struttura cristallografica del mutante E202Q dell' *hAChE* [Kryger *et al.* 2000] ha confermato il ruolo del Glu199 (202) nella stabilizzazione dell'His440 (447) nel processo di acilazione.

In tabella 6.II sono riportati i valori delle distanze tra alcuni atomi chiave dei residui Ser200, His440, Glu327 e Glu199, riscontrati nelle strutture dei carbammati. Si può osservare un avvicinamento (tranne nel caso MF268) dell'His440 al Glu199 rispetto alla struttura dell'AChE nativa, o, ancora più precisamente, rispetto alla struttura dell'AChE complessata con l'analogo dello stato di transizione μ-(N,N',N''-trimetilammonio) trifluoroacetofenone (PDB *entry code*: 1AMN). Di contro si osserva un allontanamento dell'His440 dalla Ser200 e dal Glu327 (sempre tranne nel caso del MF268).

Questo potrebbe confermare il fatto che lo stadio della deacilazione potrebbe essere ostacolato a causa di una maggiore interazione tra l'His440 ed il Glu199 e, contemporaneamente, a causa di una minore interazione tra l'His440 ed il Glu327. Queste variazioni delle distanze impedirebbero l'idrolisi enzimatica, la quale richiede una corretta distanza tra i tre residui della triade affinché possa avvenire il trasferimento di protoni.

Lo studio della struttura ha consentito inoltre di analizzare i dati di attività relativi ai derivati della geneserina.

Per avere dei dati coerenti con la struttura risolta, sono stati effettuati gli esperimenti di inibizione *in vitro* dei derivati della geneserina su TcAChE (vedi tabella 6.III, Chiesi Farmaceutici S.p.a.).

Alla luce della posizione occupata dal gruppo etilfenilcarbammico nella cavità enzimatica è stato possibile spiegare su base strutturale i valori di IC₅₀ osservati per i diversi composti (Fig.6.1).

I Gruppi troppo ingombranti in posizione orto rispetto al carbonile ammidico (composto 4 e 5) impediscono una corretta orientazione del gruppo carbammico nella cavità aromatica. La stessa considerazione vale per il composto con l'etile in meta (7) e con i metili nelle due posizioni meta (10). Il composto 9 mostra poi una diminuzione fortissima dell'attività inibitoria dovuta alla presenza di due metili nelle due posizioni orto; osservando, nella struttura cristallografica, la posizione del gruppo etilfenilcarbammico, si deduce che la presenza contemporanea dei due metili in posizione orto al gruppo ammidico impedirebbe la corretta orientazione del gruppo carbammico per la formazione del legame idrogeno tra l'azoto ammidico e l'Nε2 dell'His440.

I buoni valori mostrati dalla ganstigmina e dagli altri derivati contenenti gruppi in meta poco ingombranti si possono attribuire ad una giusta dimensione del gruppo fenilcarbammico che consente un posizionamento adatto all'interazione con la triade catalitica.

Tabella 6.II Valori delle distanze tra atomi dei residui implicati nell'attività catalitica, riscontrati nelle strutture cristallografiche della TcAChE nativa (2ACE) ed in complesso con: 1AMN: analogo dello stato di transizione μ -trimetilammonio-(2,2,2-trifluoroacetofenone); 1OCE: MF268; 1GOR: rivastigmina; 1HBJ: 4-ammino-5-fluoro-2-metil-3(3-trifluoroacetilbenziltiometil)chinolina; ganstigmina. Le sigle fanno riferimento agli *entry codes* del PDB.

	2ACE	1AMN	1OCE	1GOR	1HBJ	ganstigmina.
O γ Ser200- N ϵ 2 His440 (Å)	2.700	2.690	2.890	4.070	4.270	3.100
N δ 1 His440- O ϵ 1 Glu327 (Å)	2.520	2.660	2.390	4.020	3.540	2.550
N δ 1 His440- O ϵ 2 Glu199 (Å)	3.720	4.170	3.870	2.850	5.540	3.730
N ϵ 2 His440- O ϵ 2 Glu199 (Å)	3.640	3.300	4.030	4.210	4.670	3.470

Tabella 6.III Inibizione *in vitro* di TcAChE. La numerazione dei composti si riferisce alla Fig.6.1

Composti	IC ₅₀ (µM)
Rivastigmina	187.20
Geneserina	1.74
1	4.74
2	4.04
3	5.12
4	8.38
5	8.44
6	5.13
7	9.80
8	7.61
9	186.00
10	8.58

