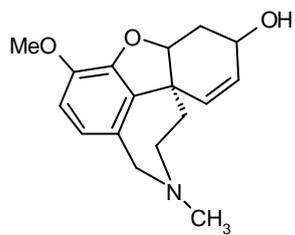


## **CAPITOLO 8. STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA DEL COMPLESSO TRA LA TcAChE E GLI INIBITORI SPH-1371 E SPH-1373.**

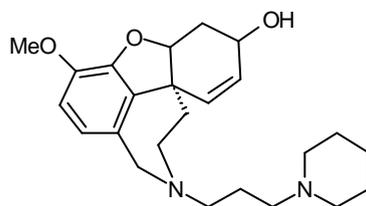
### **8.1 Introduzione.**

Gli inibitori SPH-1371 ed SPH-1373 (Fig.8.1) sono derivati della galantamina, farmaco approvato dalla FDA nel Marzo 2001 con il nome di Reminyl® (vedi par.5.3). La sintesi di derivati della galantamina è stata perseguita da numerosi gruppi di ricerca [Han *et al.* 1992; Bores *et al.* 1996a; Bores *et al.* 1996b; Mary *et al.* 1998]. La molecola presenta quattro siti che possono essere modificati: la funzione ossidrilica, l'anello cicloesenolico, l'azoto amminico e la funzione metossilica. I derivati sull'azoto amminico dell'anello tetraidroazepinico della galantamina hanno mostrato i migliori profili farmacodinamici (in Fig.8.2 sono riportati alcuni derivati con le relative IC<sub>50</sub>).

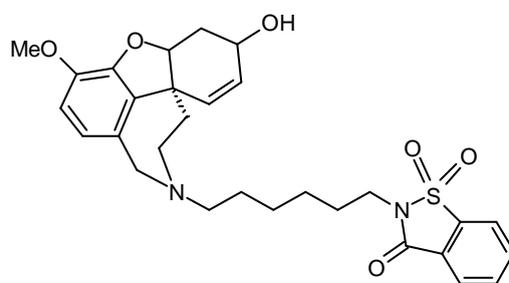
Presso i laboratori di ricerca della *Sanochemia Pharmazeutika*, Vienna, Austria, sono stati sintetizzati un certo numero di composti modificati sull'azoto amminico sopramenzionato, con lo scopo di trovare un derivato della galantamina con attività inibitoria e proprietà farmacodinamiche superiori. La progettazione e la sintesi di questi derivati è avvenuta sulla base della struttura tridimensionale del complesso tra la TcAChE e la galantamina [Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001], e sulla base di studi di *molecular modelling e molecular docking* [Pilger *et al.* 2001] effettuati in collaborazione con il gruppo del Prof. Gregor Fels dell'Università di Paderborn, Germania. Gli studi di *drug design* eseguiti sulla base della conoscenza della struttura tridimensionale sono infatti uno strumento importante nello sviluppo di potenziali farmaci derivati da un capostipite o *lead compound*. In Fig.8.3 è riportato uno schema in cui vengono menzionati tutti i procedimenti che possono essere impiegati per uno studio di *drug design*. I riquadri evidenziati in giallo si riferiscono a tutti i passaggi utilizzati per ottenere e studiare i composti in esame. Lo schema seguito è stato infatti il seguente: la galantamina (Ligando naturale già caratterizzato farmacologicamente) è stata studiata strutturalmente in complesso con la TcAChE (nello schema: *Protein-Ligand Complex e Crystallization, X-ray*); dall'analisi delle principali interazioni nella



**GALANTAMINA**

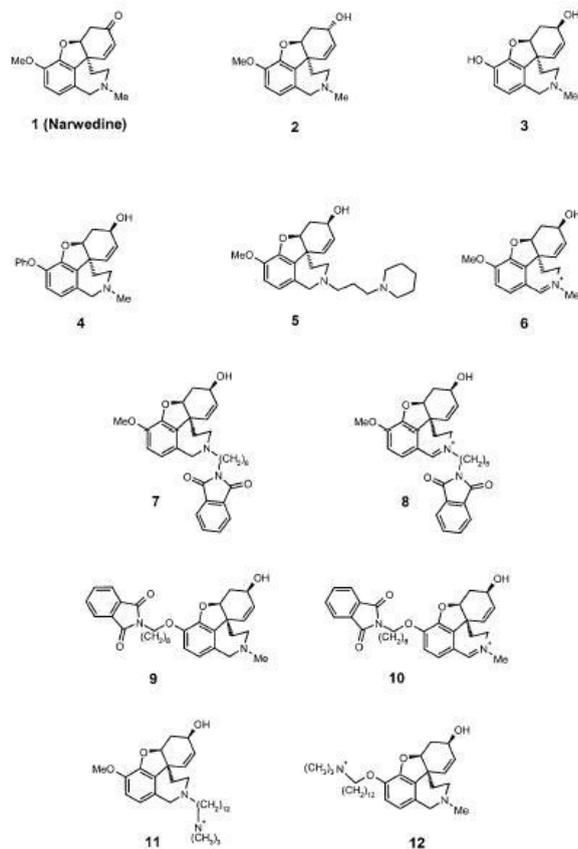


**SPH-1371**



**SPH-1373**

**Fig.8.1** Galantamina, SPH-1371, SPH-1373.



**Fig.8.2** Derivati della Galantamina con relativi valori delle  $IC_{50}$  (tabella) testati su AChE da *Electrophorus Electricus*.

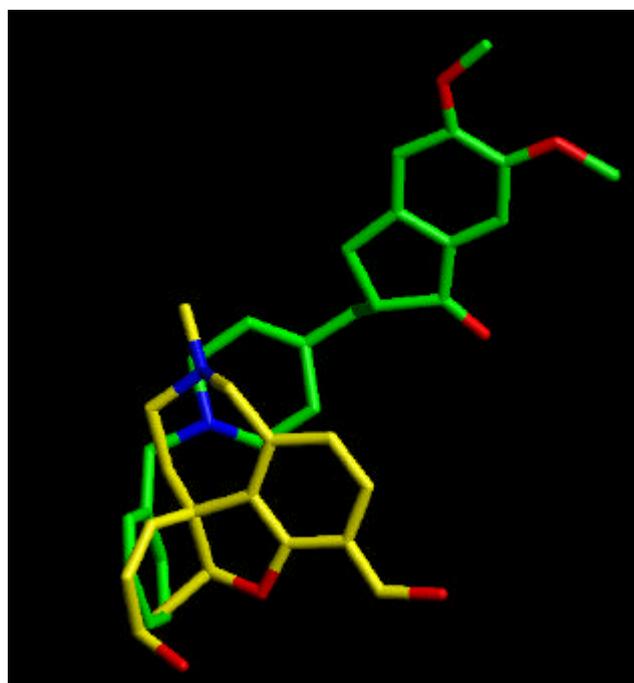
<i>Molecola</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>
Galantamina	0.36
1(Nawerdina)	30.0
2	30.0
3	0.03
4	3.15
5	0.03
6	0.14
7	0.28
8	0.01
9	2.50
10	0.07
11	0.08
12	1.30

cavità enzimatica è stato possibile proporre i gruppi funzionali della galantamina da derivatizzare (*Computer Graphics*). Successivamente, utilizzando la struttura cristallografica del complesso TcAChE-galantamina è stato possibile eseguire studi di *docking* che hanno permesso prevedere il posizionamento dei derivati nella gola enzimatica (*Simulating by MD*). Il disegno e la sintesi dei derivati hanno dunque preso spunto da queste considerazioni strutturali (*Knowledge based design* e *Medicinal Organic Chemistry*). Una volta testati farmacologicamente, alcuni tra i derivati sono stati scelti per una nuova analisi cristallografica. Il nostro gruppo di ricerca si è occupato di tutta la parte cristallografica descritta in questo schema; l'oggetto della presente tesi in particolare riguarda l'ultimo *step* menzionato: la risoluzione della struttura tridimensionale di due complessi dell'enzima con due nuovi derivati.

Data la difficoltà ed il costo connessi con gli studi cristallografici risulta evidente che di molte molecole progettate solo le più interessanti e promettenti siano state "prescelte" per l'analisi. La scelta dell'SPH-1371 è stata suggerita dal valore dell'attività inibitoria superiore di un fattore 10 rispetto a quella della galantamina; la presenza di un gruppo alchilico contenente soli tre atomi di carbonio, terminante con un gruppo propilpiperidinico, ha suggerito l'idea di studiare le interazioni esistenti con i residui amminoacidici che si trovano a metà della gola enzimatica. Come verrà discusso in seguito, l'orientazione prevista con il *molecular docking* non si è dimostrata corretta, perché la molecola ha mostrato un'orientazione inaspettata del gruppo propilpiperidinico.

L'SPH-1373 è invece stato scelto sulla base del confronto tra le interazioni con la cavità enzimatica mostrate dalla galantamina stessa (Fig.5.8), dal decametonio (Fig.5.6a), dall'E2020 (Fig.5.7) e dal MF268 (5.4). Questi ultimi tre inibitori, come precedentemente descritto (vedi par.5.2 e 5.3), interagiscono direttamente con il Trp279 del *Peripheral Anionic Site*, estendendosi lungo tutta la cavità enzimatica. Inoltre il gruppo sulfossido presente sull'anello saccarinico avrebbe potuto formare un'interazione aggiuntiva con gli idrogeni ammidici della *main chain* dell'enzima. In questo caso le previsioni proposte con il *molecular docking* sono state confermate. La struttura mostra proprio le suddette interazioni che giustificano la notevole attività inibitoria di questo derivato, superiore quasi di un fattore 100 rispetto alla galantamina.





**Fig.8.4** Sovrapposizione delle strutture cristallografiche della galantamina, in giallo e dell'E2020, in verde.

## 8.2 Struttura cristallografica del complesso tra la TcAChE e l'SPH-1371.

### **Risultati.**

La struttura del complesso è stata risolta a 2.2 Å di risoluzione ed affinata fino a convergenza del valore di R pari al 18.0 % e di  $R_{free}$  pari al 21.2 %. I dati statistici dell'analisi cristallografica e dell'affinamento sono riportati nella tabella 8.I. In figura 8.5 è riportata la densità elettronica residua trovata all'interno della cavità enzimatica, chiaramente corrispondente all'inibitore che era stato diffuso nei cristalli proteici.

La struttura rivela che la molecola, eccettuato il gruppo propilpiperidinico sull'azoto, presenta le stesse interazioni già osservate nel complesso tra l'enzima e la galantamina [Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001] (Fig. 8.6).

L'inibitore si posiziona sul fondo della gola, tra l'*acyl-binding pocket* ed il Trp84.

Il gruppo propilpiperidinico si ripiega verso l'anello tetraidroazepinico (Fig.8.7). Questa conformazione è stabilizzata da interazioni di non legame tra l'azoto protonato del gruppo piperidinico e l'elettron pair libero dell'azoto dell'anello tetraidroazepinico (2.92 Å) (Fig.8.8).

Ad un valore di pH pari a 6.0 del tampone usato per il "soaking" del cristallo della proteina con l'SPH-1371, l'azoto dell'anello piperidinico ( $pK_a=11.25$ ) è protonato rispetto all'azoto dell'anello tetraidroazepinico ( $pK_a=8.33$ ) [Mihailova *et al.* 1986].

Inoltre il gruppo piperidinico si posiziona all'interno di una tasca idrofobica costituita dai residui Phe330, Phe331 e Tyr334. I contatti più vicini avvengono tra l'anello piperidinico e gli anelli della Phe330, della Phe331 e della Tyr334 (distanze tra i centroidi pari a: 3.86 Å, 3.81 Å e 3.99 Å, rispettivamente) (Fig.8.8).

Esaminando le molecole di acqua trovate all'interno della cavità enzimatica, si riscontra che alcune di esse, la W1, la W3, la W9 e la W84 coincidono con alcune acque trovate nel complesso TcAChE-galantamina [PDB entry code: 1QTI], rispettivamente la W840, la W717, la W820 e la W803. Le altre molecole di acqua che, nel complesso con la galantamina, hanno un ruolo cruciale nel mediare le interazioni tra l'inibitore ed i residui amminoacidici della cavità enzimatica (la W702, la W712 e la W854), nella presente struttura sono invece sostituite dal gruppo propilpiperidinico.

**Tabella 8.I** Parametri del cristallo, raccolta dati ed affinamento statistico del complesso *TcAChE*- SPH-1371.

<i>Parametri del Cristallo</i>	
Gruppo spaziale	P3121
Costanti di cella	a=b= 112.19 Å , c=137.19 Å $\alpha=\beta=90^\circ$ , $\gamma= 120^\circ$
Mosaicità, °	0.63
<i>Raccolta Dati</i>	
Sorgente di raggi X	XRD1, ELETTRA, Trieste (Italy)
Lunghezza d'onda, Å	1.00
Temperatura, K	100.0
Intervallo di RISOLUZIONE, Å	32.3 - 2.26 (2.28 - 2.26) <sup>§</sup>
Misure	439740
Riflessi unici I=0s(I)	47210 (957) <sup>§</sup>
Completezza, %	99.7 (97.3) <sup>§</sup>
Molteplicità	9.3 (2.9) <sup>§</sup>
R <sub>sym</sub> <sup>†</sup> , %	4.7 (41.8) <sup>§</sup>
Media I/s(I) dei dati merged	8.8 (2.0) <sup>§</sup>
<i>Statistica di Affinamento</i>	
Resolution used, Å	32.3 - 2.26
Reflection used F=0s (F <sub>o</sub> )	46874
R <sub>cryst</sub> , R <sub>free</sub> <sup>‡</sup> , %	18, 21.2
R.m.s.d. on bond lengths, * Å	0.011
R.m.s.d. on bond angles, * °	1.6
<i>Numero di atomi</i>	
Protein	4263
Water	400
Carbohydrates	42
Inhibitor	29
Ligand (PEG)	-
All atoms	4734
<i>Fattori di temperatura medi, Å</i>	
Protein	39.5
Water	47.8
Carbohydrates	63.4
Inhibitors	40.6
Ligand (PEG)	-
R.m.s.d. ?B, # Å <sup>2</sup>	3.9

<sup>§</sup> I numeri in parentesi di riferiscono all'intervallo contenente i dati a più alta risoluzione.

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

<sup>‡</sup>  $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} F_{obs}$  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  $\Delta B$  è lo scarto quadratico medio dei fattori di temperatura B (modello isotropo) tra gli atomi covalentemente legati.

## ***Discussione.***

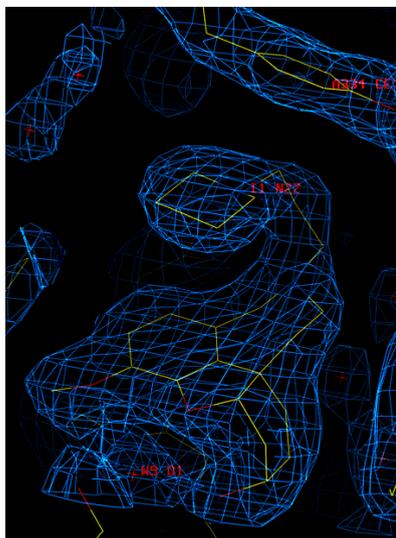
Studi di *molecular modelling* effettuati sulla galantamina avevano dimostrato che entrambe le orientazioni, assiale ed equatoriale, del metile dell'anello tetraidroazepinico, sono energeticamente favorite (Fig.8.9). La risoluzione della struttura cristallografica del complesso tra l'enzima e la galantamina ha permesso di verificare che l'orientazione del metile è equatoriale.

Anche per l'SPH-1371 non è stato possibile distinguere, sulla base delle sole rispettive stabilità energetiche, tra le due conformazioni della catena alchilica terminante con il gruppo N-propilpiperidinico. La struttura cristallografica rivela invece che l'anello a sette atomi di carbonio tetraidroazepinico dell'inibitore assume una conformazione a sedia, in cui la catena alchilica terminante con il gruppo N-propilpiperidinico ha una orientazione equatoriale, come osservato nel caso della galantamina (Fig.8.7).

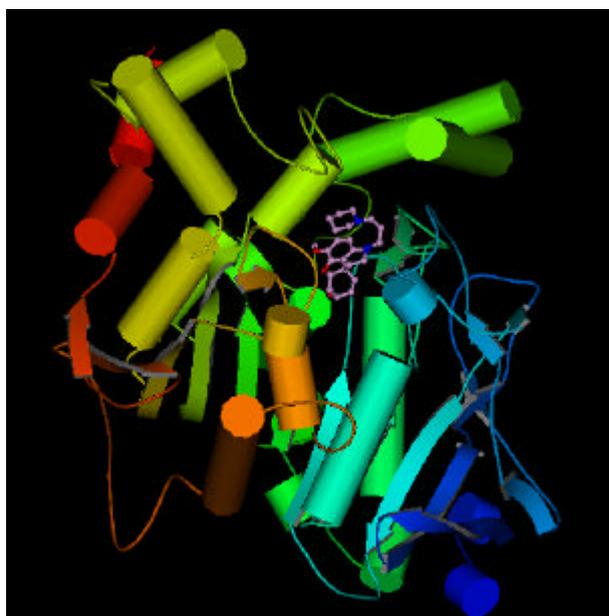
Studi di *docking*, basati sulla struttura tridimensionale del complesso tra la TcAChE e gli inibitori reversibili decametonio [PDB entry code: 1ACL; Harel *et al.* 1993], BW284C51 [PDB entry code: 1E3Q; Felder *et al.* 2002], E2020 [PDB entry code: 1EVE; Kryger *et al.* 1999], e con l'inibitore carbammico MF268 [PDB entry code: 1OCE; Bartolucci *et al.* 1999], prevedevano che analoghi della galantamina con sostituenti a lunga catena alchilica sull'azoto avrebbero presentato la catena estesa verso l'entrata della cavità enzimatica in grado di interagire con il Trp279 [Pilger *et al.* 2001] (Fig.8.10).

La struttura cristallografica ha invece mostrato che il gruppo N-propilpiperidinico si ripiega sopra l'anello tetraidroazepinico. La gola dell'enzima (vedi Fig.4.4) presenta un restringimento in prossimità della Phe 330, che rende impossibile una conformazione completamente estesa della catena alchilica dell'SPH-1371. Infatti, i soli tre gruppi metilenici della catena alchilica non permettono al gruppo N-propilpiperidinico di superare la strozzatura; come risultato il gruppo si ripiega sul fondo della gola. Il gruppo propilpiperidinico in questa posizione è anche stabilizzato dalle interazioni con la tasca idrofobica formata dalla Phe330, dalla Phe331 e dalla Tyr334.

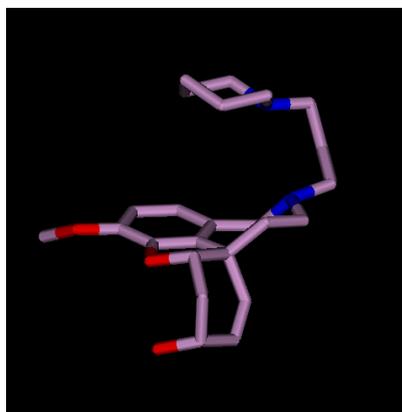
La struttura cristallografica non ha consentito di definire l'orientamento dell'anello piperidinico. Infatti entrambi i rotameri soddisfano la densità elettronica. In questo caso gli studi di *molecular modelling* hanno suggerito il rotamero energeticamente più favorevole. La Fig.8.6 rappresenta



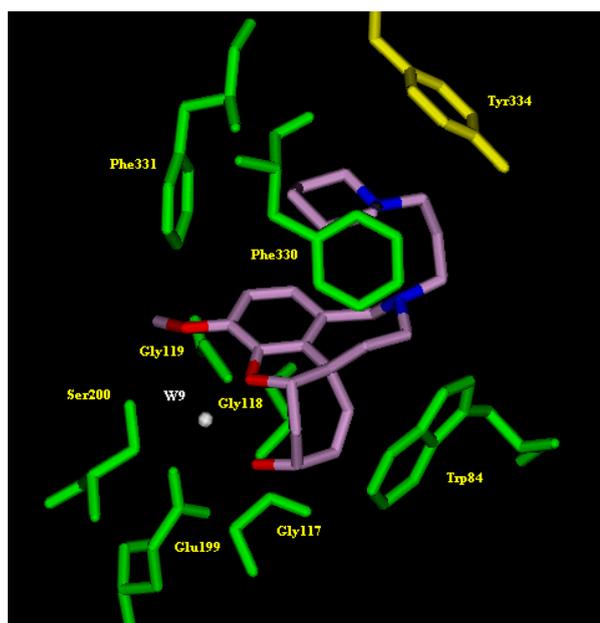
**Fig.8.5** Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1371. Densità elettronica residua attribuita all'SPH-1371.



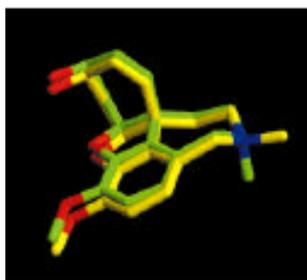
**Fig.8.6 5** Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1371.



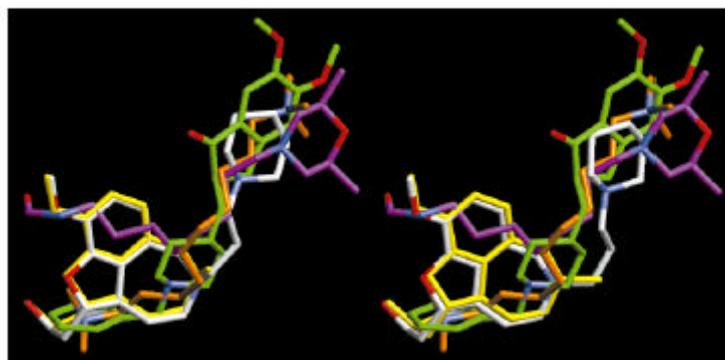
**Fig.8.7.** SPH-1371: orientazione equatoriale della catena alchilica; l'anello piperidinico presenta l'azoto rivolto verso l'anello tetraidroazepinico.



**Fig.8.8** 5 Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1371. Visione ravvicinata delle interazioni tra l'SPH-1371 e la gola catalitica enzimatica.



**Fig.8.9** Orientazione del metile dell'anello tetraidroazepinico della galantamina: equatoriale, in giallo e assiale, in verde.



**Fig.8.10** Sovrapposizione dell'SPH1371, in bianco, (orientazione assiale, sin., ed equatoriale, dx.) con le corrispondenti orientazioni della galantamina, in giallo, risultanti da studi di *molecular modelling*. Sono mostrate anche le sovrapposizioni con le strutture cristallografiche del decametonio, in marrone, dell'E2020, in verde e del MF268, in viola.

l'inibitore che ha la conformazione dell'anello piperidinico in cui l'azoto è rivolto verso l'anello tetraidroazepinico. Grazie ai suggerimenti del *molecular modelling* è stato possibile selezionare questo rotamero ed inserirlo nella densità elettronica residua.

La maggiore attività inibitoria mostrata verso l'Acetilcolinesterasi dal derivato SPH-1371, superiore di un fattore 10 rispetto a quella della galantamina, può essere dunque spiegata considerando il minor costo entropico, a causa della rigidità della struttura tetraciclica, il maggior volume della gola enzimatica occupato che causa anche la desolvatazione della stessa, ed, infine, un certo numero di interazioni da moderate a deboli con la proteina.

### **8.3 Struttura cristallografica del complesso tra la TcAChE e l'SPH-1373.**

#### ***Risultati.***

La struttura ai raggi X del complesso in esame è stata determinata a 2.2 Å di risoluzione e, con l'affinamento, ha raggiunto a convergenza un valore di R pari al 18.3 % e di R<sub>free</sub> pari al 21.1%. La statistica relativa all'analisi cristallografica ed all'affinamento è mostrata in tabella 8.II. In figura 8.11 è riportata la densità elettronica residua riscontrata nella cavità enzimatica ed assegnata all'inibitore.

Anche in questo caso la struttura rivela che la parte dell'inibitore analoga alla galantamina si posiziona come osservato nel complesso con la galantamina stessa [PDB entry code: 1DX6, 1QTI; Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001] (Fig.8.12).

Il pKa della galantamina è 8.33 [Mikhailova *et al.* 1986]. Dunque a pH 6.0 (tampone di cristallizzazione, nel quale l'inibitore è stato diffuso), l'atomo di azoto dell'anello tetraidroazepinico della galantamina è protonato e può interagire, tramite la molecola d'acqua W289, con l'Oδ2 dell'Asp72 (la W289 si trova a distanza di 2.6 Å dall'azoto tetraidroazepinico e di 2.7 Å dall' Oδ2 dell'Asp72).

La catena alchilica a sei atomi di carbonio si estende lungo la gola fino al PAS (Fig.8.13). La distanza tra i centroidi del sistema π dell'anello indolico

del Trp279 ed il sistema  $\pi$  dell'anello saccarinico dell' SPH1373 è pari a 3.67 Å.

Analizzando il gruppo saccarinico si osservano un certo numero di interazioni mediate dalle molecole d'acqua. Il carbonile dell'anello saccarinico dista 2.8 Å dalla W66, la quale interagisce a sua volta con la W87 ad una distanza pari a 2.7 Å e con l'N della *main chain* della Phe288 a 2.8 Å. Il gruppo solfonico crea una rete di legami idrogeno con numerose molecole di acqua: uno dei due ossigeni dista 2.9 Å dalla W230, 2.7 Å dalla W149 e 3.2 Å dall'ossigeno ossidrilico della Tyr121, il quale dista a sua volta 2.8 Å dalla stessa W149; la W149 interagisce anche con la W289 a 2.5 Å di distanza ed a 3.0 Å di distanza con la W230 la quale a sua volta dista 3.0 Å dalla W151. La W230 si trova in posizione chiave poiché dista soli 2.7 Å dall'altro ossigeno del gruppo solfonico, trovandosi perciò ad interagire con entrambi gli ossigeni (Fig.8.13).

Come nel caso dell'SPH-1371, anche in questa struttura alcune molecole di acqua trovate all'interno della cavità enzimatica, rispettivamente la W1, la W5, la W17 e la W100 coincidono con alcune acque trovate nel complesso TcAChE-galantamina [PDB *entry code*: 1DX6, 1QTI; Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001], rispettivamente la W840, la W717, la W820 e la W803. Anche in questo caso le altre molecole di acqua che, nel complesso con la galantamina, mediano le interazioni tra l'inibitore ed i residui amminoacidici dell'enzima (la W702, la W712 e la W854), nella presente struttura sono invece sostituite dalla catena alchilica terminante con il gruppo saccarinico.

**Tabella 8.II** Parametri del cristallo, raccolta dati ed affinamento statistico del complesso *TcAChE*- SPH-1373.

<i>Parametri del Cristallo</i>	
Gruppo spaziale	P3121
Costanti di cella	a=b= 112.19 Å , c=137.19 Å $\alpha=\beta=90^\circ$ , $\gamma= 120^\circ$
Mosaicità, °	0.42
<i>Raccolta Dati</i>	
Sorgente di raggi X	XRD1, ELETTRA, Trieste (Italy)
Lunghezza d'onda, Å	1.00
Temperatura, K	100.0
Intervallo di RISOLUZIONE, Å	19.9 – 2.19 (2.28 – 2.19) <sup>§</sup>
Misure	402326
Riflessi unici I=0s(I)	50750 (5013) <sup>§</sup>
Completezza, %	99.6 (99.3) <sup>§</sup>
Molteplicità	8.3 (7.6) <sup>§</sup>
R <sub>sym</sub> <sup>†</sup> , %	3.7 (16.9) <sup>§</sup>
Media I/s(I) dei dati merged	10.5 (1.3) <sup>§</sup>
<i>Statistica di Affinamento</i>	
Resolution used, Å	19.9 – 2.19
Reflection used F=0s (F <sub>o</sub> )	50491
R <sub>cryst</sub> , R <sub>free</sub> <sup>‡</sup> , %	18.3, 21.1
R.m.s.d. on bond lengths, * Å	0.011
R.m.s.d. on bond angles, * °	1.6
<i>Numero di atomi</i>	
Protein	4245
Water	374
Carbohydrates	42
Inhibitor	38
Ligand (PEG)	-
All atoms	4699
<i>Fattori di temperatura medi, Å</i>	
Protein	35.2
Water	44.5
Carbohydrates	55.7
Inhibitors	40.1
Ligand (PEG)	-
R.m.s.d. $\Delta B$ , # Å <sup>2</sup>	3.6

<sup>§</sup> I numeri in parentesi di riferiscono all'intervallo contenente i dati a più alta risoluzione.

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

<sup>‡</sup>  $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} F_{obs}$  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  $\Delta B$  è lo scarto quadratico medio dei fattori termici B (modello isotropo) tra gli atomi covalentemente legati.

## ***Discussione.***

Come osservato nella struttura cristallografica del complesso della *TcAChE* con la galantamina e con l'SPH-1371, l'anello a sette termini tetraidroazepinico della galantamina è in conformazione a sedia. In questo caso però, a differenza dei complessi appena citati, la catena alchilica sull'azoto dell'SPH-1373 assume un'orientazione assiale anziché equatoriale (Fig.8.14). Dalla densità elettronica questa orientazione risulta molto chiara (Fig.8.11).

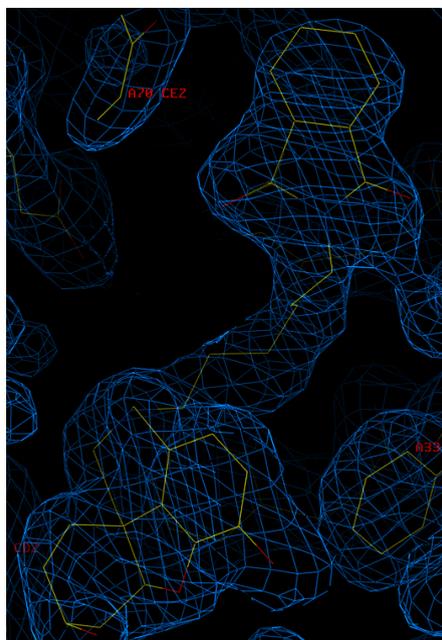
La predizione, ottenuta tramite metodi di *docking*, che la catena alchilica posizionata sull'azoto dell'anello tetraidroazepinico si sarebbe estesa verso il Trp279 del *Peripheral Anionic Site*, si è rivelata corretta [Pilger *et al.* 2001]. Infatti i sei atomi di carbonio che congiungono la galantamina all'anello saccarinico dell'SPH-1373, costringono la catena ad estendersi lungo la gola enzimatica. Si verifica dunque un'interazione  $\pi$ - $\pi$  di non legame tra il gruppo saccarinico dell'inibitore ed il Trp279 (Fig.8.13). Un'analogia interazione  $\pi$ - $\pi$  tra l'anello dimetossiindanonico e l'anello indolico del Trp279 è già stata precedentemente osservata nella struttura cristallografica del complesso tra l'enzima e l'E2020 [Kryger *et al.* 1999] (Fig.8.15). Come già descritto, la distanza tra i centroidi del sistema  $\pi$  dell'anello indolico del Trp279 ed il sistema  $\pi$  dell'anello saccarinico dell' SPH1373 è pari a 3.67 Å, mentre l'analogia distanza dal Trp279 del gruppo dimetossiindanonico nel complesso tra l'enzima e l'E2020 è di 4.15 Å.

Inoltre una sovrapposizione delle strutture cristalline dei complessi della *TcAChE* rispettivamente con l'SPH-1373, il decametonio [PDB entry code: 1ACL; Harel *et al.*1993], il BW284C51 [PDB entry code: 1E3Q; Felder *et al.* 2002] ed il MF268 [PDB entry code: 1OCE; Bartolucci *et al.* 1999] mostra che l'atomo di azoto del gruppo saccarinico dell'SPH-1373 si trova rispettivamente ad 1.0 Å, 3.2 Å e 0.5 Å dagli equivalenti atomi di azoto di questi inibitori (Fig.8.16).

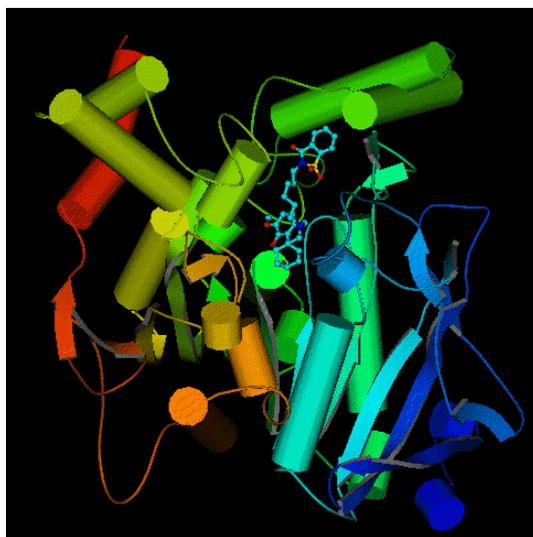
La risoluzione di questa struttura fornisce forti evidenze che la scelta di una catena alchilica a sei atomi di carbonio permette un'interazione ottimale con il PAS. Questo risultato può fornire informazioni utili per studi di *drug design* di nuovi inibitori, che si vogliono derivatizzare con una catena alchilica in modo tale da consentire un'interazione con il PAS. A questo proposito si veda anche la proposta per derivati della nor- eserolina (par.7.2, *discussione*).

Le interazioni osservate tra la molecola ed il PAS insieme con le interazioni idrofobiche tra la catena alchilica ed i residui amminoacidici

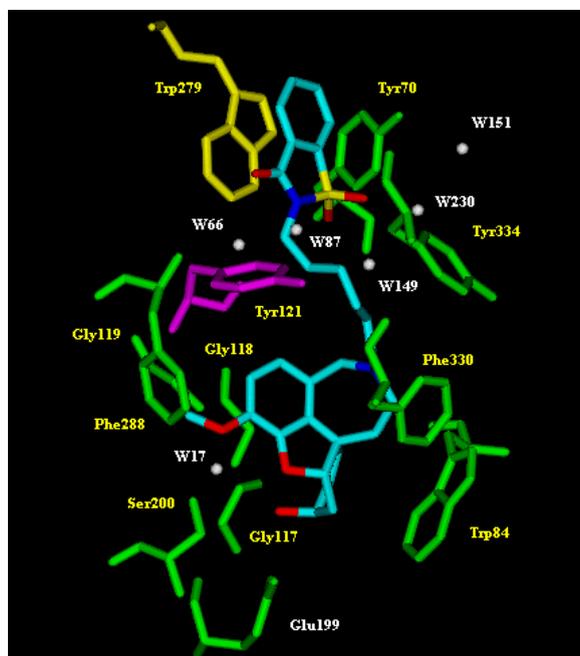
disposti lungo la gola enzimatica spiegano il valore dell'attività inibitoria mostrata da questo derivato verso l'Acetilcolinesterasi, valore superiore quasi di un fattore 100 rispetto a quello della galantamina.



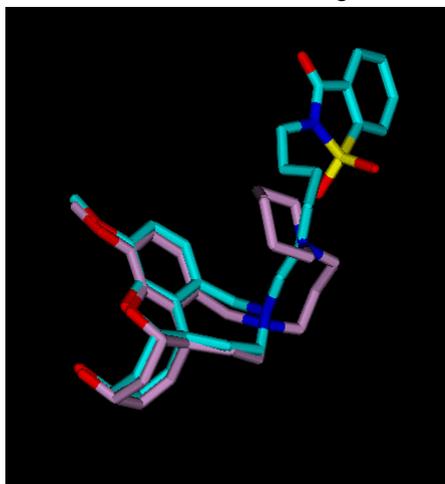
**Fig.8.11** Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1373. Densità elettronica residua attribuita all'SPH-1373.



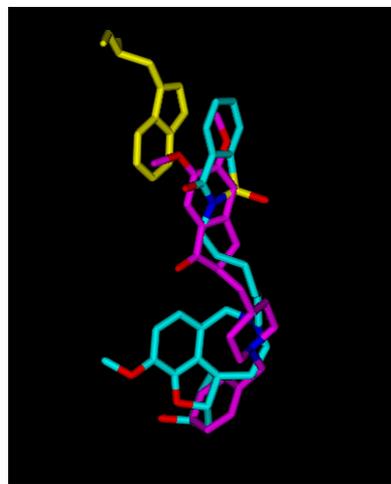
**Fig. 8.12** Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1373.



**Fig.8.13** Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-SPH-1373. Visione ravvicinata delle interazioni tra l'SPH-1373 e la gola catalitica enzimatica.



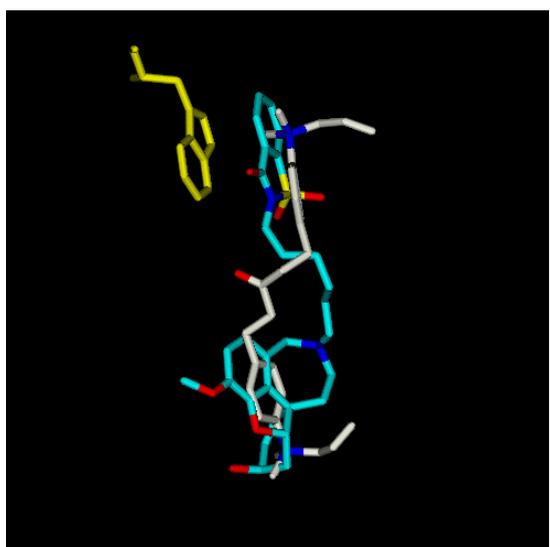
**Fig. 8.14** Sovrapposizione delle strutture cristallografiche dell'SPH-1373, in ciano e dell'SPH-1371, in violetto.



**Fig.8.15** Sovrapposizione tra i complessi della *TcAChE* con l'SPH-1373, in ciano e con l'E2020, in fucsia.



**A**



**B**

**Fig.8.16** Sovrapposizione dei complessi della *TcAChE* con l'SPH-1373, in ciano, con il MF268, in verde e con il decametonio, in arancione (**A**) con l'SPH-1373, in ciano e con il BW284C51 in bianco (**B**).