

CONCLUSIONI

La determinazione delle strutture cristallografiche dei complessi tra la *TcAChE* ed i quattro inibitori selezionati sulla base del loro potenziale impiego nella terapia sintomatica del morbo di Alzheimer hanno permesso di ottenere delle nuove informazioni strutturali sulle modalità che determinano l'inattivazione dell'enzima.

La struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-ganstigmina è stata determinata per l'interessante profilo farmacodinamico mostrato dalla ganstigmina; è infatti un composto ben tollerato *in vivo*, inoltre mostra una spiccata selettività verso l'*AChE* rispetto alla *BChE* ed esplica diverse altre attività a livello neurologico oltre a quella colinergica. Per queste sue caratteristiche l'inibitore ha buone possibilità di essere utilizzato nella terapia per il morbo di Alzheimer ed i primi test clinici hanno dato esiti positivi.

I risultati descritti hanno permesso di analizzare le interazioni esistenti tra il gruppo carbammico della ganstigmina ed i residui che costituiscono il sito catalitico e che definiscono la buca ossianionica. La lunga durata di azione di questo inibitore può essere attribuita ad un'alterazione della funzionalità della triade catalitica, a causa della formazione di un forte legame idrogeno tra l'azoto ammidico del gruppo etilfenilcarbammico della ganstigmina e l'Ne2 dell'His440.

La determinazione della struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* e la N¹,N⁸-bisnorcimserina ha mostrato un risultato inatteso.

Nel sito attivo dell'enzima è stata identificata infatti la nor-eserolina, gruppo uscente della N¹,N⁸-bisnorcimserina. In realtà si prevedeva di osservare il gruppo carbammico legato covalentemente alla serina catalitica, come nel caso della ganstigmina e di altri inibitori carbammici.

Il risultato del tutto inaspettato ha però permesso, per la prima volta, di visualizzare (identificare) la posizione, nell'ambito del sito catalitico, del prodotto (in questo caso della nor-eserolina) della reazione di acilazione dell'enzima. La struttura cristallografica del complesso dell'enzima con la nor-eserolina, unitamente alla struttura cristallografica del complesso con un altro inibitore carbammico, il MF268, rappresenta una base solida per uno studio di simulazione (dinamica molecolare ab initio) del *pathway* di inibizione enzimatica da parte degli inibitori carbammici dell'*AChE*.

Il confronto della struttura del complesso *TcAChE*-nor-eserolina con quella di altri inibitori reversibili, quali la tacrina e la huprinaX ha permesso

di ipotizzare modifiche funzionali *ad hoc* utili per successivi studi di *drug design*.

La struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-galantamina, precedentemente determinata nel nostro gruppo di ricerca ha permesso di progettare su base strutturale numerosi nuovi derivati della galantamina tra i quali l'SPH-1371 e l'SPH-1373, aventi un valore di IC_{50} inferiori rispettivamente di un fattore 10 e quasi 100 se confrontati con quello del capostipite galantamina.

Le determinazioni delle strutture dei rispettivi complessi hanno permesso di identificare ed analizzare in dettaglio le interazioni tra i due inibitori ed i residui amminoacidici che delimitano la gola enzimatica.

Nel caso del complesso *TcAChE*-SPH-1371, la posizione dell'inibitore nella cavità enzimatica ha costituito un risultato del tutto inatteso ed in contrasto con le previsioni ottenute da precedenti studi di *molecular docking*. Questa evidenza ha confermato l'importanza degli studi cristallografici nello studio delle interazioni che si verificano tra un enzima ed il suo inibitore, ed, in generale, tra una proteina ed il suo ligando.

La struttura del complesso *TcAChE*-SPH-1373 ha confermato la presenza di un'interazione aggiuntiva, rispetto al capostipite galantamina, tra l'inibitore ed un residuo del *Peripheral Anionic Site* dell'enzima (*stacking* π - π tra il gruppo saccarinico dell'SPH-1373 e l'anello indolico del Trp279 del PAS). La struttura cristallografica ha consentito dunque di verificare che la derivatizzazione dell'azoto dell'anello tetraidroazepinico della galantamina con una catena alchilica a sei gruppi metilenici rende questa interazione ottimale.

E' stato pertanto possibile spiegare, alla luce dei dati strutturali, i promettenti valori delle attività mostrati da questi due composti.

Entrambi gli inibitori sono al momento in fase clinica I per la terapia sintomatica dell'Alzheimer.

Le strutture cristallografiche dei quattro complessi *TcAChE*-inibitori hanno permesso di razionalizzare le proprietà farmacologiche delle molecole esaminate e, nel loro insieme, costituiscono una solida base di partenza per i successivi studi di *molecular modelling* e *drug design*.