

RIASSUNTO

Il principale ruolo dell'Acetilcolinesterasi (AChE) è quello di interrompere l'azione del neurotrasmettitore acetilcolina che è un mediatore chimico della trasmissione degli impulsi nervosi, nel sistema nervoso centrale e periferico. E' stato dimostrato che i sintomi del morbo di Alzheimer sono associati ad un deficit della funzione colinergica a livello celebrale e pertanto l'impiego di inibitori dell'acetilcolinesterasi è ancora oggi considerato l'approccio farmacologico più promettente nella terapia sintomatica di questa malattia.

Oggetto della tesi di dottorato è stata la determinazione della struttura cristallografica della TcAChE in complesso con quattro nuovi inibitori, potenziali farmaci per la terapia sintomatica del morbo di Alzheimer.

L'AChE è stata isolata e purificata a partire dagli organi elettrici della *Torpedo californica*, che costituiscono una matrice naturale particolarmente ricca di questo enzima. La scelta dell'AChE da *Torpedo californica* è stata dettata dal suo elevato grado di omologia e di identità di sequenza (rispettivamente 74% e 57%) con quella di origine umana. Successivamente, sono state esplorate, mediante un approccio fattoriale, le condizioni di cristallizzazione della TcAChE utilizzando il metodo dell' "hanging drop". I cristalli dell'enzima nativo sono stati sottoposti alla procedura di "soaking" (incubazione) con quattro nuovi inibitori dell'AChE: la ganstigmina (CHF-2819; *Chiesi farmaceutici S.p.a.*, Parma, Italia) e l' N^1, N^8 -bisnorcimserina (*National Institute of Health*, U.S.A.), entrambi appartenenti alla classe degli inibitori carbammici e l'SPH-1371 e l'SPH-1373 (*Sanochemia Pharmazeutica*, Vienna, Austria) appartenenti alla classe degli inibitori reversibili.

I cristalli dei quattro complessi sono stati caratterizzati mediante un'analisi cristallografica utilizzando come sorgente di raggi X la luce di sincrotrone presso *ELETTRA*, Trieste. I dati di diffrazione (le risoluzioni ottenute per ciascuno dei complessi studiati sono riportati in tabella), sono stati raccolti con un rivelatore bidimensionale MAR CCD e sono stati elaborati utilizzando i programmi biocristallografici DENZO, SCALEPACK e CCP4. La struttura 3D è stata determinata mediante il metodo della sostituzione molecolare utilizzando il programma AMoRe. L'affinamento della struttura, eseguito utilizzando il programma CNS, a convergenza ha raggiunto i valori di R e di R_{free} riportati per ciascun complesso in tabella.

L'interesse nella risoluzione della struttura cristallografica del complesso con la ganstigmina è stato suggerito dal buon profilo farmacodinamico

mostrato dall'inibitore. La struttura tridimensionale del complesso ha evidenziato la presenza di una densità elettronica residua nel sito catalitico, attribuibile alla specie etilfenilcarbammica covalentemente legata (1.38 Å) all'Oγ della Ser200. Il gruppo uscente, la geneserolina, non è stato invece trovato nella cavità enzimatica, avvalorando l'ipotesi, già presupposta nel caso del complesso tra l'enzima ed un altro inibitore carbammico analogo della fisostigmina, il MF268, dell'esistenza una "porta di servizio" dalla quale l'enzima eliminerebbe i prodotti della reazione. La risoluzione della struttura cristallografica ha permesso di studiare da un punto di vista strutturale le interazioni esistenti tra il gruppo carbammico della ganstigmina e la triade catalitica, in particolare l'His440. La lunga durata di azione di questo inibitore può essere attribuita ad una alterazione della funzionalità della triade catalitica. Questa osservazione ha permesso di evidenziare come l'Acetilcolinesterasi possa subire delle modificazioni strutturali importanti ad opera degli inibitori carbammici.

L' N¹,N⁸-bisorcimserina, derivato della fisostigmina, è un inibitore ben tollerato *in vivo*, oltrepassa la barriera ematoencefalica e, testato sui roditori, ha mostrato di aumentare le risposte cognitive. Come nel caso del MF268 e della ganstigmina, ci si aspettava di trovare nel sito catalitico una densità elettronica residua attribuibile al gruppo paraisopropilfenilcarbammico legato covalentemente all'Oγ della Ser200. Inaspettatamente, invece, alla base della gola enzimatica è stata trovata una densità elettronica residua corrispondente al gruppo uscente, la nor-eserolina, mentre non è stato possibile identificare il gruppo carbammico covalentemente legato alla Ser200. Questo risultato, del tutto inatteso, potrebbe essere attribuito alla presenza di impurezze, presenti nel composto di sintesi. Il risultato ottenuto si è rivelato di grande interesse in quanto per la prima volta è stata determinata la struttura della TcAChE in complesso con il gruppo uscente degli inibitori carbammici analoghi della fisostigmina.

L'SPH-1371 e l'SPH-1373 sono derivati della galantamina, farmaco già in uso terapeutico con il nome di Reminyl®. Essi sono stati disegnati e sintetizzati con lo scopo di identificare un candidato che presenti migliori capacità inibitorie e proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche superiori a quelle della stessa galantamina. Le strutture cristallografiche dei complessi tra la TcAChE e queste due nuove molecole, hanno evidenziato un differente orientamento dei due gruppi funzionali sostituenti sull'azoto dell'anello tetraidroazepinico della galantamina, fornendo una base razionale per l'interpretazione delle loro rispettive proprietà farmacologiche. Il sostituito propilpiperidinico dell'SPH-1371, ha mostrato un orientamento

nella gola catalitica dell'AChE del tutto inatteso e in disaccordo con le previsioni ottenute da studi di *molecular modelling*. Infatti la specie propilpiperidinica non presenta una conformazione estesa, ma ripiegata con l'anello piperidinico sopra l'anello tetraidroazepinico della galantamina. Questa conformazione è stabilizzata da numerose interazioni di non legame. Il maggiore potere inibitorio mostrato da questo inibitore è imputabile sia alla rigidità della struttura tetraciclica (ridotta entropia), sia ad un maggiore volume occupato nell'ambito della gola catalitica oltre che alle numerose interazioni moderate e deboli che caratterizzano l'interazione dell'inibitore con i residui che delimitano la gola enzimatica. La struttura del complesso con l'inibitore SPH-1373, ha mostrato che la catena alchilica, costituita da sei gruppi metilenici e funzionalizzata con un gruppo saccarinico, assume una conformazione estesa all'interno della gola enzimatica e presenta una interazione di tipo π - π con il Trp279 del *Peripheral Anionic Site*, situato all'ingresso della cavità enzimatica. Questa ulteriore interazione spiega il maggiore potere inibitorio del derivato SPH1373 rispetto alla stessa galantamina.

Le strutture cristallografiche dei complessi TcAChE-inibitori presentate hanno permesso di razionalizzare le proprietà farmacologiche delle molecole utilizzate e nel loro complesso costituiscono una solida base di partenza per i successivi studi di *molecular modelling* e *drug design*. In particolare, nel caso degli inibitori carbammici, disponendo di dettagliate informazioni strutturali sia dei complessi dell'enzima carbamoilato (MF268 e ganstigmina) sia dell'enzima in complesso con il gruppo uscente della reazione di carbamoilazione (nor-eserolina) sarà possibile affrontare, con un approccio concertato di metodi classici (meccanica molecolare, dinamica molecolare) ed avanzati (dinamica molecolare *ab initio*) di simulazione molecolare, la ricostruzione dei vari stadi del complesso meccanismo di azione dell'Acetilcolinesterasi.

Tabella: Valori della risoluzione e dei parametri di affinamento delle strutture dei complessi tra la TcAChE ed i quattro inibitori.

	Risoluzione (Å)	R (%)	R _{free} (%)
ganstigmina	2.40	19.0	23.7
nor-eserolina	2.26	21.0	25.1
SPH-1371	2.26	18.0	21.2
SPH-1373	2.19	18.3	21.1

ABSTRACT

The main role of Acetylcholinesterase (AChE) is to stop the action of the neurotransmitter acetylcholine, a chemical mediator involved in nervous transmission. It has been demonstrated that the Alzheimer's disease symptoms are connected with a deficit of cerebral cholinergic action. For this reason the use of AChE inhibitors is still considered promising in the symptomatic therapy of this disease.

Object of this PhD thesis is the determination of crystallographic structures of complexes between *TcAChE* and four new inhibitors, examined as potential drugs in the symptomatic therapy of Alzheimer's disease.

The AChE was extracted and purified from *Torpedo californica* electric tissues, which are particularly rich in this protein. The choice of AChE from *Torpedo californica* was dictated by its high degree of sequence homology and identity with the human AChE (74% and 57% respectively). The crystallization conditions were explored using the *hanging drop* method. The native crystals were soaked with four different inhibitors of AChE: ganstigmine (CHF-2819; *Chiesi farmaceutici S.p.a.*, Parma, Italy) and N¹,N⁸-bisnorcymserine (*National Institute of Health*, U.S.A.), both carbammic inhibitors, as well as SPH-1371 and SPH-1373 (*Sanochemia Pharmazeutica*, Vienna, Austria), two reversible inhibitors.

The X-ray diffraction data of the four crystal complexes, were collected at the XRD-1 beam line of the Italian Synchrotron facility *ELETTRA*, Trieste, using a bidimensional detector MAR CCD and were processed with the biocrystallography software DENZO, SCALEPACK and CCP4. The crystal structures were solved by molecular replacement method, using the software AMoRe and were refined using the software CNS up to reach convergence of R and R_{free} values. Resolution as well as R and R_{free} values for each complex are reported in the table.

The good pharmacodynamic profile of ganstigmine prompted us to determine the crystal structure of this inhibitor in complex with *TcAChE*. The structure revealed a residual electron density given by the ethylphenylcarbamoyl moiety, which is covalently bound (1.38 Å) to the O_γ of Ser200. Geneseroline, the leaving group, is not retained in the *anionic* site, confirming the hypothesis of the existence of a *back door* implied by the elimination of reaction products. This had already been suggested in the analysis of the structure of the complex with MF268, another carbammic

inhibitor. The crystal structure of this complex allowed us to study the interactions between the carbammic group of gangstigmine and the catalytic residues, in particular His440. The long duration of action of this inhibitor could be due to a modification of the functionality of the catalytic triad. This evidence highlights that AChE undergoes important structural modifications by carbammic inhibitors.

The phisostigmine derivative N¹,N⁸-bisnorcymserine is well-tolerated *in vivo*, enters the blood-brain barrier, and improves cognitive performance in rodents. In analogy to MF268 and ganstigmine, it was expected that the residual electron density found in the catalytic site was due to the paraisopropylphenylcarbammic moiety, covalently bound to the O γ of catalytic serine. Surprisingly, the residual density observed at the bottom of the enzymatic gorge, corresponds to the leaving group, the nor- eseroline. We were not able to locate the carbammic moiety anywhere in the enzyme. This unexpected result could be due to impurities in the synthetic compound. The particular interest of this structure lies in the fact that it is the first one which shows only the leaving group of carbammic inhibitors analogues of phisostigmine.

SPH-1371 and SPH-1373 are both derivatives of galanthamine -a therapeutic drug commercialized as Reminyl®-. These compounds were designed and synthesized with the aim to obtain a molecule showing higher inhibition properties and a better pharmacodynamic and pharmacokinetic profile than galanthamine itself. The crystal structures of the complexes between *Tc*AChE and these new molecules revealed that the functional groups linked to the nitrogen of the tetrahydroazepine ring of galanthamine, had different orientations. This explains the different pharmacologic data showed by the two molecules.

The propylpiperidine group of SPH-1371 shows an unexpected orientation in the enzymatic gorge. This result is in contrast with the *molecular modelling* predictions. In fact the propylpiperidine moiety is not fully extended but the piperidine ring is folded over the tetrahydroazepine moiety of galanthamine. This conformation is stabilized by a number of non-bonded interactions. The higher activity shown by SPH-1371 over galanthamine appears to be caused by the rigidity of the tetracyclic structure (low entropic cost), by the fact that a larger volume of the gorge is occupied by the inhibitor itself, and by a number of moderate and weak interactions with the residues lining the enzymatic gorge.

The crystal structure of the complex with SPH-1373 shows that the six –methylene- alkyl chain ending with the saccharine moiety, is fully extended in the enzymatic gorge and forms a π - π stacking with Trp279 of the

Peripheral Anionic Site, located at the entrance of catalytic pocket. This added interaction explains the higher activity of SPH-1373 over galanthamine.

The crystal structures of the complexes between *TcAChE* and these inhibitors allowed us to rationalize their pharmacologic properties and represent an important starting point for future *molecular modelling* and *drug design* studies.

Detailed structural information of the complexes of the carbamoylated enzyme (MF268 and ganstigmina) as well as of the complex between the enzyme and the living group of the carbamoylation reaction (nor-eseroline), will allow to suggest a pathway explaining the steps of the complex mechanism of action of Acetylcholinesterase. This can be achieved through complementary studies of molecular mechanic and dynamic modelling.

Table: Resolution values and refinement parameters for the structures of the complexes between *TcAChE* and the four inhibitors.

	Resolution(Å)	R (%)	R _{free} (%)
ganstigmine	2.40	19.0	23.7
nor-eseroline	2.26	21.0	25.1
SPH-1371	2.26	18.0	21.2
SPH-1373	2.19	18.3	21.1

Abbreviazioni

Å	Ångstrom, $1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$
Ab	Peptide β -amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasi
AD	<i>Alzheimer's Disease</i> , morbo di Alzheimer
AMPA	acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
ATCh	Acetilcolina
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterasi
CCD	<i>Charged-Coupled Device</i>
ChAT	Colinaacetiltransferasi
F_{calc}	Fattore di struttura calcolato
F_{obs}	Fattore di struttura osservato (misurato)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
hAChE	Acetilcolinesterasi umana
IC₅₀	Concentrazione di un inibitore per la quale l'inibizione di un enzima risulta pari al 50%
MAP	<i>Microtubule Associated Protein</i>
MAS	<i>Main Anionic Site</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PAS	<i>Peripheral Anionic Site</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PHF	<i>Paired Helical Filaments</i>
PEG	Polietilenglicole
pH	$-\log[\text{H}^+]$
SAP	<i>Serum Amyloid Protein</i>
Tc	<i>Torpedo californica</i>
TcAChE	Acetilcolinesterasi da <i>Torpedo californica</i>
W	Molecola di acqua