

Diss. ETH Nr. 15220

**Novel ligands for the Neuronal nAChR:
Synthesis, in vitro Characterizations and
Binding Models**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

William H. Bisson

Laurea in Chimica
University of Padua, Italy

born April 28th, 1974
citizen of Treviso, Italy

accepted on the recommendation of

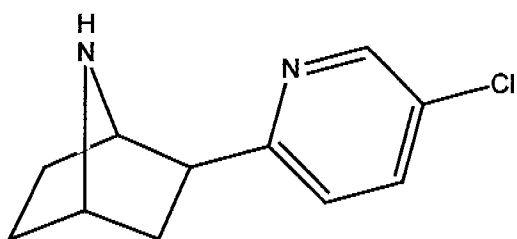
Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner
Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner
Dr. G. Westera, co-examiner

2003

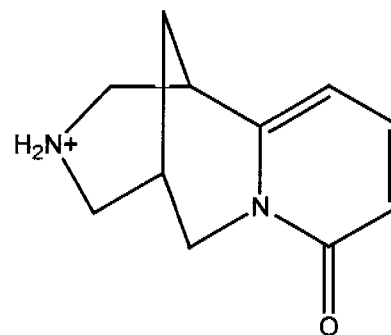
SUMMARY

The present project is aimed at the design and development of non-toxic ligands with specificity and subtype selectivity towards the neuronal nAChRs. The potential benefit of nicotinic ligands for a variety of neurodegenerative diseases (like AD), due to the involvement of nAChRs in cognitive processes, has energised research efforts in this direction.

The natural ligands (-)-epibatidine and (-)-cytisine proved to exhibit high affinity and agonism activity towards neuronal nAChRs but their clinical use, cause of their toxicity, is precluded.



(-)-epibatidine



(-)-cytisine

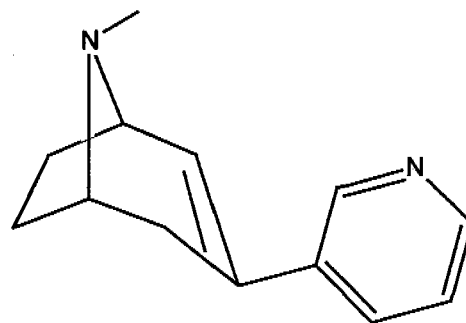
A series of epibatidine and cytisine derivatives were synthesised and investigated by *in vitro* binding and electrophysiology studies. This permitted to put into correlation the ligand chemical structure and the affinity and biological response towards different nAChR subtypes.

Binding-experiments on the two most present subtypes in the brain, were performed using the competition assay with [³H]-cytisine ($\alpha_4\beta_2$ nAChR) and [¹²⁵I]-alpha-bungarotoxin (α_7 nAChR) as radioligands.

Voltage clamp electrophysiology was performed on neuronal ($\alpha_4\beta_2$ and α_7) and ganglionic ($\alpha_3\beta_4$) nAChRs reconstituted in *Xenopus* oocytes.

All compounds showed, by binding studies, low affinity towards the α_7 neuronal nicotinic receptor and much higher affinity for the $\alpha_4\beta_2$ subtype, which indicates high selectivity towards the $\alpha_4\beta_2$ neuronal subtype.

The affinity for $\alpha_4\beta_2$ neuronal nicotinic receptor is related to the chemical structure of the ligand. All compounds synthesised possess the three geometrically independent pharmacophoric structural features requested for binding recently mentioned by Nicolotti et al. Nevertheless the affinity obtained varied a lot among the compounds studied. Bromocytisine showed the highest affinity ($K_i = 0.153$ nM) towards the $\alpha_4\beta_2$ subtype but low subtype selectivity due to its full agonism towards the ganglionic $\alpha_3\beta_4$ subtype receptor. Compound (\pm)-33bMet, shown below, exhibited high affinity ($K_i = 2$ nM) and partial agonism for the $\alpha_4\beta_2$ subtype but significant subtype selectivity too.



Compound (\pm)-33bMet was then injected intravenously into mice and was proved to be relatively non-toxic with a median lethal dose of > 0.5 mg/kg mouse body weight.

All the binding, electrophysiology and toxicology data found make compound (\pm)-33bMet to be a potential radiotracer for *in vivo* brain PET investigations.

Recently the crystalline structure of the acetylcholine-binding protein (AChBP), isolated from snails, has been resolved. It is a soluble homopentamer protein revealing in the binding site region high homology with the extracellular N-terminal domain of different species nAChR subunits. This would give then the possibility to model some of the existing nAChR subtypes.

In the present work the homology-models of the extracellular domain of the rat and human neuronal ($\alpha_4\beta_2$) and (α_7) and of the rat ganglionic ($\alpha_3\beta_4$) nAChR subtypes were built, energetically minimized and their stability was assessed using molecular dynamics.

A series of nicotinic ligands were docked into the binding cavity of the non-dynamicised rat $\alpha_4\beta_2$ and $\alpha_3\beta_4$ subtypes to investigate the relationship between structure and affinity and between structure and subtype selectivity, which is probably connected to toxic side effects.

The docking in both modeled subtypes confirmed, for the protein-ligand complex, the importance of cation- π interactions between the quaternary positive nitrogen of the ligand and the aromatic pocket in the binding site region and the hydrogen bond between a hydrogen acceptor in the ligand and a hydrogen donor of a residue present in the receptor binding site.

In the rat $\alpha_4\beta_2$ subtype two docking orientations (clusters 1 shown in the Figure below and 2), with the highest consensus score, were identified involving high affinity ligands like epibatidine, dechloroepibatidine and (S)-A-85380. The docking orientations clusters 1 and 2 are preferred respectively by clinically toxic and non-toxic ligands, which turned to be an interesting result.

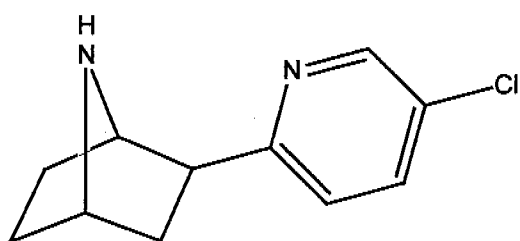
All ligands studied didn't dock well into the $\alpha_3\beta_4$ model with the exception of epibatidine, dechloroepibatidine, (\pm)-33bMet and the Abbott derivative (S)-A-98795. The docking data obtained reveal that the presence of the oxygen atom between the pyridine ring and the aliphatic moiety plays an important role in the $\alpha_4\beta_2$ subtype selectivity and that the flexibility constriction around the ligand C-O-C and C-C-C angles increases affinity towards the $\alpha_3\beta_4$ cavity.

These docking investigations showed that the studied nicotinic models are useful for structure-based design of specific and selective $\alpha_4\beta_2$ nAChR subtype ligands for therapeutic and diagnostic applications in neurological diseases.

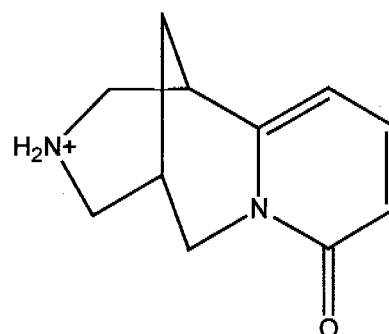
ZUSAMMENFASSUNG

Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, nicht-toxische Liganden zu entwerfen und zu entwickeln, die Spezifität und Subtyp-Selektivität gegenüber neuronalen nAChRs aufweisen. Der potentielle Nutzen von nicotinischen Liganden für eine Vielfalt von neurodegenerativen Erkrankungen (wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit), herrührend durch die Beteiligung von nAChRs in kognitiven Prozessen, hat die Forschung auf diesem Gebiet angetrieben.

Die natürlichen Liganden (-)-Epibatidin und (-)-Cytisin wiesen eine hohe Affinität sowie agonistische Aktivität gegenüber neuronalen nAChRs auf, deren klinischer Gebrauch ist jedoch wegen deren Toxizität ausgeschlossen.



(-)-epibatidine



(-)-cytisine

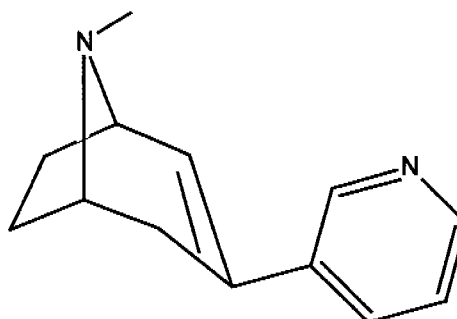
Darauffolgend wurde eine Reihe von Epibatidin- und Cytisinderivaten synthetisiert und *in vitro* mit Hilfe von Bindungs- und elektrophysiologischen Studien untersucht. Dies erlaubte, die chemische Ligandstruktur, die Affinität und die biologische Antwort auf verschiedene nAChR-Subtypen in Zusammenhang zu bringen. Bindungsstudien der beiden am häufigsten vorkommenden Subtypen im Gehirn wurden unter Anwendung des Competition Assays mit [³H]-Cytisin ($\alpha_4\beta_2$ nAChR) und [¹²⁵I]-alpha-bungarotoxin (α_7 nAChR) als Radoliganden durchgeführt. Des Weiteren wurden Voltage-clamp-Elektrophysiologiestudien an neuronalen ($\alpha_4\beta_2$ und α_7) und ganglionären ($\alpha_3\beta_4$) nAChR von *Xenopus* Oocyten vorgenommen.

Alle Verbindungen zeigten in den Bindungsstudien niedrige Affinität gegenüber des neuronalen α_7 -nikotinischen Rezeptors, aber weit höhere Affinität gegenüber dem

neuronalen $\alpha_3\beta_4$ -Subtyp, was für eine hohe Selektivität des neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -Subtyps spricht.

Die Affinität gegenüber dem neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -nikotinischen Rezeptor steht in Verbindung mit der chemischen Struktur des Liganden. Alle synthetisierten Verbindungen besitzen die drei geometrischen, voneinander unabhängigen pharmakophoren Strukturmerkmale, welche für die Bindung notwendig sind und die kürzlich von Nicolotti et al erwähnt wurden. Allerdings variierten die erhaltenen Affinitäten stark bei den betrachteten Verbindungen.

Bromocytisin zeigte die höchste Affinität ($K_i = 0.153$ nM) gegenüber dem $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp, jedoch geringe Subtyp-Selektivität wegen seines Agonismus gegenüber dem ganglionären $\alpha_3\beta_4$ -Subtyp-Rezeptor. Verbindung (\pm)-33bMet, wie unten gezeigt, wies gegenüber dem $\alpha_3\beta_4$ -Subtyp hohe Affinität ($K_i = 2$ nM) und partiellen Agonismus sowie signifikante Subtyp-Selektivität auf.



Verbindung (\pm)-33bMet wurde im Anschluss daran intravenös in Mäuse injiziert und erwies sich als relativ untoxisch mit einer mittleren letalen Dosis von >0.5 mg/kg Maus-Körpergewicht.

Alle gefundenen Bindungs-, Elektrophysiologie- und Toxizitätsdaten belegen, dass Verbindung (\pm)-33bMet ein potentieller Radiotracer für in vivo PET-Untersuchungen am Gehirn ist.

Kürzlich wurde die Kristallstruktur des Acetylcholin-Bindeproteins (AChBP), isoliert aus Schnecken, entschlüsselt. Es handelt sich um ein lösliches, homopentameres Protein, welches in seiner Bindungsseite eine hohe Homologie mit der extrazellulären, N-terminalen Domäne der nAChR-Untereinheiten verschiedener Spezies aufweist. Dies würde gegebenenfalls ermöglichen, einige der im Körper existierenden nAChR-Subtypen zu modellieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden demzufolge Homologie-Modelle der extrazellulären Domäne der ganglionären ($\alpha_3\beta_4$)-nAChR-Subtypen in der Ratte und der neuronalen ($\alpha_4\beta_2$)- und (α_7)-nAChR-Subtypen der Ratte und des Menschen erstellt, energetisch minimiert und ihre Stabilität mit Hilfe von molekularer Dynamik geprüft.

Eine Reihe nikotinischer Liganden wurden in die Bindungstasche der nicht-dynamisierten $\alpha_4\beta_2$ - und $\alpha_3\beta_4$ -Subtypen der Ratte eingepasst, um die Beziehung zwischen Struktur und Affinität sowie zwischen Struktur und Subtyp-Spezifität zu studieren, welche möglicherweise mit toxischen Nebeneffekten in Verbindung steht.

Das Docking in beiden modellierten Subtypen bekräftigte für den Protein-Ligand-Komplex die Wichtigkeit der Kationen- π -Interaktionen zwischen dem quaternären positiven Stickstoffatom des Liganden und der aromatischen Tasche in der Bindungsregion und der Wasserstoffbrücke zwischen einem Wasserstoff-Akzeptor im Liganden und einem Wasserstoff-Donor einer Aminosäure, die in der Rezeptorbindungsstelle vorhanden ist. Im $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp der Ratte wurden zwei Docking-Orientierungen (Cluster 1 und 2) mit dem höchsten Consensus Score identifiziert, die hochaffine Liganden wie Epibatidin, Dechloroepibatidin und (S)-A-85380 miteinbeziehen. Die Docking-Orientierung Cluster 1 wird von klinisch toxischen und die Docking-Orientierung Cluster 2 von nicht-toxischen Liganden bevorzugt, was sich als interessantes Resultat herausstellte.

Alle der studierten Liganden dockten nicht gut ans $\alpha_3\beta_4$ -Modell mit Ausnahme von Epibatidin, Dechloroepibatidin, (\pm)-33bMet und vom Abbott Derivat (S)-A-98795. Die erhaltenen Docking-Daten zeigen, dass die Anwesenheit vom Sauerstoffatom zwischen dem Pyridin-Ring und dem aliphatischen Teil eine wichtige Rolle in der $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp Selektivität spielt und dass die Flexibilitätseinschränkung um die C-O-C- und C-C-C-Winkel des Liganden die Affinität gegenüber der $\alpha_3\beta_4$ -Tasche erhöht.

Diese Docking-Untersuchungen zeigten, dass die untersuchten nicotinischen Modelle hilfreich für Struktur-basiertes Design von spezifischen und selektiven $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp Liganden sind, die für therapeutische und diagnostische Zwecke bei neurologischen Erkrankungen Anwendung finden.