

## 5.60 Termodinamik ve Kinetik

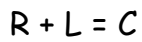
Bahar 2008

Bu malzemelere atıfta bulunmak veya kullanım şartlarını öğrenmek için <http://ocw.mit.edu/terms> sitesini ziyaret ediniz

### **Denge:İlaç Tasarımına Uygulanması**

Bu konu Sarkar,Lowenhaupt,Horan,Boone,Tidor ve Lauffenburger'in Nature Biotechnology,20,908(2002)'de yayınlanan"pH ile etkinleşmiş histidin dönüşümü kullanarak artmış ömür ve etkinlik için rasyonel sitokin tasarımı" adlı makalesine dayanmaktadır.

Dengeyi analiz etmek için ligand ve reseptörün proteinler olduğu ligand - reseptör bağlanması gibi reaksiyonlara kolaylıkla uygulanabilen kovalent bağların oluşup koptuğu bir reaksiyon alalım.



Burada R reseptörü, L ligandı C de ligand-reseptör kompleksini göstermektedir. Bu proteinler arasında hidrojen bağları, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gibi çok sayıda kovalent olmayan etkileşim vardır. Bu reaksiyonda da Gibbs serbest enerjisi ve denge sabiti arasında bizim bildiğimiz

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$$

ifadesi geçerlidir. Burada  $K_a$  denge sabitine assosiyasyon sabiti denir

$$K_a = \frac{[C]}{[R][L]}$$

$\Delta G^\circ$  değerini karakterize etmek için gerekli olan standart hal bir seri kendine has şarta göre tanımlanır(pH, tuz konsantrasyonu,vs...). Geleneksel olarak , ligandın bağlanma kuvveti ayrışma sabiti olarak bilinen bir denge sabiti ile cereyan eden ters işlem (ayrışma) tarafından karakterize edilir .Buna göre

$$K_D = \frac{[R][L]}{[C]}$$

$K_D$  ne kadar düşükse ligand o kadar iyidir( daha sıkı bağlanır)

Bir deneyde ligand radyoaktif olarak etiketlenmiş(  $^{125}\text{I}$  ile) ve ligandın hücre içine nufz etmesini önleyen şartlar altında (  $4^\circ\text{C}$ 'de) tutulan hücrelere eklenmiştir. Ligand miktarı reseptörlere nazaran aşırı olup denge durumunda iyi bir yaklaşımla  $[L]=[L]_0$  varsayımı yapılabilir(başka bir şekilde ligand konsantrasyonu etkin bir şekilde sabit kalır)

Eęer toplam reseptör konsantrasyonuna  $[R]_T$  dersek  $[R]_T=[R]+[C]$  olduğundan

$$K_D = \frac{([R]_T - [C]_{\text{denge}})[L]_0}{[C]_{\text{denge}}}$$

veya

$$\frac{[C]_{\text{denge}}}{[L]_0} = \frac{[R]_T}{K_D} - \frac{[C]_{\text{denge}}}{K_D}$$

$K_D$  deęeri (tabi ki  $\Delta G_0$ ) eřitli bařlangıř ligand konsantrasyonunda  $[L]_0$

(radyoaktif etiketleme ile) elde edilen kompleks konsantrasyonunu ölçüp  $\frac{[C]_{\text{denge}}}{[L]_0}$

deęerini  $[C]_{\text{denge}}$  'e karřı grafięe geçirmek suretiyle belirlenebilir.Elde edilen

doęrunun eęimi  $\frac{1}{K_D}$  olur. İřgal edilen reseptörlerin kesri

$$\frac{[C]_{\text{denge}}}{[R]_T} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_D}{[L]_0}\right)}$$

$$[L]_0 \ll K_D \text{ ise } \frac{[C]_{\text{denge}}}{[R]_T} \cong \frac{[L]_0}{K_D}$$

$$[L]_0 \gg K_D \text{ ise } \frac{[C]_{\text{denge}}}{[R]_T} \cong 1 - \frac{K_D}{[L]_0}$$

Reseptör-ligand bağlanma serbest enerjileri genellikle deneysel olarak tayin edilse de ( $K_D$  vasıtasıyla) ligandaki amino asitlerin birinin üzerindeki nokta mutasyonları ile ilgili olan serbest enerji değişimini bilgisayar hesaplamalarıyla belirlenir. Bu yaklaşım daha iyi özelliklere sahip yani daha sıkı bir şekilde bağlanan daha "iyi" ilaçlar geliştirmek için kullanılabilir. Bu tasarlanmış mutant ligandlara bir örnek "Granulosit Koloni Uyarma Faktörü (GCSF)" olarak bilinir. GCSF kemoterapi hastalarında akyuvar oluşumunu uyarmak için kullanılan bir protein ilacıdır.

GCSF'nin hücre yüzeyindeki reseptöre sıkı bir şekilde bağlanması (pH 7,4'de) istenir çünkü bu hücrenin gerekli proteinleri üretmesi için sinyal verir. Kompleks C hücrenin endosomal bölümüne girdiği (internalize olduğu) zaman (pH 5,5) GCSF'nin endosom içinde bozunmak yerine reseptörden koparak çözültüye geri dönmesi ve tekrar kullanılması arzu edilir. Dolayısıyla gelişmiş mutant GCSF tasarımındaki temel prensip GCSF'nin pH 5,5'deki (yani hücrenin içindeki) tutunma kapasitesinin pH 7,4'deki (hücre yüzeyine) tutulma kapasitesinden daha düşük veya bir başka deyişle  $K_D(\text{pH}5,5) > K_D(\text{pH}7,4)$  olmasıdır.

Vahşi tip (WT) GCSF için aşağıdaki veriler elde edilmiştir

	$K_D(\text{pH}7,4)$ , pM	$K_D(\text{pH}5,5) / K_D(\text{pH}7,4)$
WT	$270 \pm 90$	$1,7 \pm 0,5$

$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D$  olduğundan değişik pH değerleri için olan  $\Delta G^\circ$  farkını bulabiliriz

$$[\Delta G^\circ(\text{pH}7,4) - \Delta G^\circ(\text{pH}5,5)]/RT$$

WT: 0,53 ± 0,3(K<sub>D</sub> değerlerinden ölçülen)

Bu hesaplamalar birkaç mutant üzerinde yapıldı ve bunlardan iki tanesi serbest enerji açısından büyük farklılıklar gösterdi

D110H: 8,3(hesaplanan değer)

D113H: 17(hesaplanan değer)

Bu mutant GCSF molekülleri sentezlenerek GCSF reseptörüne bağlanma kapasiteleri araştırılmıştır . Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

	K <sub>D</sub> (pH7,4) , pM	K <sub>D</sub> (pH5,5)/ K <sub>D</sub> (pH7,4)
WD	270 ± 90	1,7 ± 0,5
D110H	370 ± 450	4,4 ± 0,8
D113H	320 ± 130	6,8 ± 2,4

Bu mutantlar vahşi tip'e nazaran düşük pH değerlerinde daha zayıf bağlandıklarından daha iyi ilaç olma potansiyeline sahiptir(gerçekten de hayvan deneylerinde bu mutantların vahşi tipi nazaran daha uzun yarı ömürleri olduğu görülmüştür). Mutantların serbest enerjileri arasındaki fark deneysel K değerlerinden bulunur .

$$[\Delta G^\circ(\text{pH}7,4) - \Delta G^\circ(\text{pH}5,5)]/RT$$

WT: 0,53 ± 0,3(K<sub>D</sub> değerlerinden ölçüldü)

D110H: 1,50 ± 0,2(K<sub>D</sub> değerlerinden ölçüldü)

D113H: 1,90 ± 0,4(K<sub>D</sub> değerlerinden ölçüldü)