TROMBİN İNHİBİTÖRLERİNİN MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI

MOLECULAR MODELLING STUDIES ON THROMBIN INHIBITORS

ONUR ÜLGEN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

2012

ANKARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....

:Prof Dr. Nurcan KARACAN

Üye (Danışman)

.....

:Prof Dr. Vildan ADAR

Üye

.....

:Prof Dr. Canan ÜNALEROĞLU

Üye

.....

:Prof Dr. Mutlu AYTEMİR

Üye

.....

:Prof. Dr. Leyla AÇIK

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ...../...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma Sevin DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TROMBİN İNHİBİTÖRLERİNİN MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI

ONUR ÜLGEN

ÖZ

Pıhtılaşma, kan dolaşımındaki fibrinojenin pıhtının temeli olan ve çözünmeyen fibrin'e dönüşmesidir. Şimdiye kadar pıhtı oluşumunda rolü olan 13 faktör keşfedilmiştir. Bu faktörlerin tümünün normal çalışması halinde, yaralanan doku sıvısında bulunan tromboplastin, dolaşımdaki protrombini, trombine dönüştürmekte, bu da fibrinojeni etkileyip, fibrin haline gelmesine yol açmaktadır. Fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizleyen enzim Trombindir.

Kanı pıhtılaştıran **Trombin** bir serin proteaz enzimidir ve vücut içinde Trombin'e ne kadar ihtiyaç varsa o kadar üretilir. Damarların çeperinde pıhtı (trombus) oluşmasını ve gelişmesini inhibe eden ilaçlara antikoagülanlar denir. Damar içi pıhtı oluşumu insan hayatında önemli bir risk faktörü oluşturur.

Trombin kanın pıhtılaşmasının son basamağındaki görevi nedeniyle yeni antikoagulan ilaçların geliştirilmesinde temel hedef olmaya devam etmektedir. Direk Trombin inhibitörü (DTI) olarak günümüzde kullanılan antikoagulan ilaçlar divalent: *hirudin*, *lepirudin*, *bivaluridin*, ve monovalent: *argatroban*, *dabigatran'*dır. Tek oral ilaç dabigatran ise havanın nemi ile hemen bozunmaktadır. Diğerlerinin dezavantajları ise oral alınamamaları ve genetik bozukluk nedeniyle antitrombin III eksikliği olan hastalarda kullanılamamasıdır. Bu nedenle günümüzde ilaç şirketlerinin çoğu argatroban temelli oral alınabilen yeni ilaç tasarımları üzerinde çalışmaktadırlar.

Bu çalışmadaki amacımız ***Argatroban*** ve onun çıkış yapısı olan yapılar temel alınarak oral yoldan alınabilen ve de küçük molekül yapısı ve ağırlığına sahip olan bir direkt trombin inhibitörü araştırmaktır.

Bunun için, öncelikle incelediğimiz trombin sistemi için uygun doking programı ve uygun trombin yapısını belirlemek için protein data bankasından alınan trombine ait üç-boyutlu yapı koordinatlarını içeren **1k22**, **1dwc** ve **1dwd** kodlu yapılar kullanılarak Autodock ve Autodock Vina Programları arasında validasyon çalışması

yapılmıştır. Tekli doking validasyon çalışması sonuçlarına göre en küçük RMSD değeri ve en düşük bağlanma enerjisine sahip olan **1dwc** yapısı ve bu sonuçları veren program olarak da **Autodock Vina** programı uygun olarak görülmüştür.

Tekli doking çalışmaları ışığında 1dwc yapısı olan argatroban yapısı ve TAME yapısında ortak olarak gözlemlenen bölümler ZINC data bankasında çizilerek 578 adet yapı içeren bir veri seti hazırlanmıştır. Bu veri seti ve Autodock-Vina programı kullanılarak yapılan sanal ligand taraması(SLT) hesaplama sonuçlarına göre, bu yapılardan 175 molekülün RMSD değeri 2 Å'den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Bu yapılardan en düşük bağlanma enerjisine sahip olan 20 yapı, bize yeni inhibitör tasarlanması konusunda yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Sözcükler: Argatroban, Trombin, 1dwc, Doking, Tekli doking , Çoklu Doking, Sanal ligand taraması

Danışman: Prof. Dr Vildan ADAR, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı

MOLECULAR MODELLING STUDIES ON THROMBIN INHIBITORS

ABSTRACT

Coagulation is the transformation of fibronogen to fibrin which is the basis of clot at blood circulation. Up till now 13 factors playing a role in clot formation have been discovered. In normal operation of all of these factors, the thromboplastine that is located in injured tissue translates the prothrombin which is in circulation to thrombin. This also influences the fibrinogen and leads the fibrinogen to turn into fibrin. The enzyme that catalyzes the conversion of fibrinogen to fibrin is Thrombin.

Thrombin which leads to blood coagulation is a serine protease enzyme and so is produced in the amounts of the body needs. The drugs that inhibit the formation and development of clots on lining of blood vessels are called anticoagulants. Also, intravascular clot formation creates a significant risk factor in human life.

Due to the task of thrombin at the last stage of blood clotting it continues to be the main target in the development of new anticoagulant drugs. Today, the anticoagulant drugs used as direct thrombin inhibitor (DTI) are hirudin, lepirudin, bivaluridin, and monovalent: argatroban, dabigatran. The single oral drug dabigatran is immediately broken down by the effect of the moisture in the air. The disadvantages of other inhibitors are that they can't be taken by orally and due to a genetic disorder they shouldn't be used by the patients who are lack of anti-thrombin III. For this reason, most of today's pharmaceutical companies are working on the design of new drugs that is argatroban-based and so can be taken orally.

The aim of this study is to investigate a direct thrombin inhibitor that has a small molecular structure and weight and can be taken orally on the basis of **Argatroban** and its basic structures.

Firstly appropriate docking program and thrombin structure should be determined that is suitable for our thrombin system. To determine this, validation study was carried out with AutoDock and AutoDock Vina Programs by using **1k22**, **1dwc** and **1dwd** coded structures that consist of the coordinates of three-dimensional structure of thrombin. According to the results of single docking

validation study, **1dwc** structure which has the smallest RMSD value and the lowest binding energy and **AutoDock Vina** Program which gives these results are found to be appropriate.

In the light of the single docking studies, the parts that are commonly seen in TAME structure and Argatroban which is 1dwc structure are drawn by ZINC data bank. A data set was prepared that consists of 578 structures. Due to the calculation results of virtual ligand screening (VLS) that is obtained by using the data set and AutoDock Vina program, it is observed that the RMSD value of 175 molecules is smaller than 2 Å. 20 of these structures have the lowest binding energy and they will shed light to us in the design of new inhibitors on the future studies.

Keywords: Argatroban, Trombin, 1dwc, Doking, Single docking , Multiple docking, Virtual Ligand Screening

Advisor: Prof. Dr Vildan ADAR, Hacettepe University, Department of Chemistry, Organic Chemistry Division

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bana her türlü konuda ilham veren ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten iş hayatımdan dolayı bulunduğum zaman problemine rağmen her zaman bana kendi zamanından önemli bir kısmını ayıran, değerli danışmanım ve sevgili hocam Prof. Dr. Vildan ADAR'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin yazımı süresince esirgemediği yapıcı katkılarından dolayı Sorumlu Uzmanım Sayın Şafak ŞANLI'ya ve Sayın Tayfun OLTULU'ya;

Dostlukları ve sonsuz destekleri için değerli arkadaşlarım Araşt. Gör. Demet BAYKAN, Seçkin FİKİRDEŞİCİ, Senem AVAZ, Doğukan KUTLU'ya;

En zor zamanlarımda yanımda olmayı her zaman başarabilen ve beni her konuda cesaretlendirip bu tez çalışmasını tamamlamamı sağlayan sevgili Araşt. Gör. Nazlı SAYĞAN'a;

Ve son olarak, tüm hayatım boyunca bana olan inançlarını asla kaybetmeyip desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni bu günlere getiren aileme; sevgili annem Nurşen ÜLGEN, babam Osman Yaşar ÜLGEN ve canım kardeşim Okan ÜLGEN'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ONUR ÜLGEN

DİZİN

ÖZ **1**

ABSTRACT **3**

TEŞEKKÜR **5**

DİZİN **6**

ŞEKİLLER DİZİNİ **9**

TABLOLAR DİZİNİ **12**

KISALTMALAR **13**

GİRİŞ **15**

GENEL BİLGİLER **19**

1. PROTEINLER **19**

1.1. Yapı ve Fonksiyonları 19

1.1.1. Proteinlerin Primer Yapısı 19

1.1.2. Proteinlerin Sekonder Yapısı 21

1.1.2.1. α –Sarmal 22

1.1.2.2. -Katlanmış Tabaka 22

1.1.2.3. β-Dönme 23

1.1.3. Proteinlerin Tersiyer Yapısı 24

1.2. ENZİMLER 26

1.2.1. Enzimin Aktif Bölgesinde Etkili Olan İnhibitörler 27

1.2.1.1. Tersinir İnhibitörler 27

1.2.1.2. Rekabetçi İnhibasyon 28

1.2.1.3. Tersinmez İnhibitörler 28

2. KANIN PIHTILAŞMA ADIMLARI **29**

3. ANTKOAGULAN İLAÇLAR ve HEDEF YAPILARI **31**

3.1. HEDEF YAPI: Faktör 10a (Tromboplastin) 33

3.2. HEDEF YAPI: FAKTÖR 2a (Trombin) 34

4. DİREKT TROMBİN İNHİBİTÖRLERİ 36

4.1. İkili-Bağlanan Direkt Trombin İnhibitörleri 37

4.1.1. Hirudin 38
4.1.2. Bivalirudin 39
4.1.3. Lepirudin 40
4.2. Tekli-Bağlanan Direkt Trombin İnhibitörleri 40

4.2.1. Dabigatran 41
4.2.2. Ximelagatran ve Melagatran 42
4.2.3. Argatroban 44

5. Argatroban Üzerine Yapılmış Doking Çalışmaları 46

6. Yapı Temelli İlaç Tasarım Yöntemleri 49

6.1. Protein Veritabanı 49

6.2. Moleküler Docking (Kenetlenme) Yöntemi : 50

6.3. Tarama algoritmaları: 51

6.3.1. Sistematik Metodlar 52
6.3.2. Rastgele Tarama 52
6.3.3. Simülasyon Yöntemleri 52
6.3.4. Skorlama Fonksiyonları 53
6.3.4.1. Kuvvet Alanı Temelli Skorama 53
6.3.4.2. Ampirik skorlama 54
6.3.4.3. Bilgi temelli skorlama 54
6.4. Kullanılan Doking Programları 54

6.4.1. AutoDock 4.0 ve AutoDock Tools 55
6.4.2. AD Vina 56
6.5. Kullanılan Yardımcı Programlar 57

6.5.1. Cygwin 57
6.5.2. Chimera 58
6.5.3. Raccoon 58
6.5.4. Marvin Suite 59

7. MATERYAL VE METOD 62

7.1. Doking Metod Validasyonu 62

7.1.1. Seçilen Trombin-Ligand kompleks yapıları 62

7.1.1.1. Trombin Hedef Yapılarının Hazırlanması 64

7.1.1.2. Ligand Yapılarının Hazırlanması 64

7.1.2. Tekli Doking Hesaplamaları 66

7.1.2.1. Autodock ile Docking Hesaplamaları 70

7.1.2.2. Autodock Vina ile Doking Hesaplamaları 71

7.2. Sanal Ligand Taraması Hesaplamaları 73

7.2.1. ZINC veri tabanı kullanılarak Ligand Veri Setinin Hazırlanması 73

7.2.2. Veri Seti ile Çoklu Doking Hesaplamaları 78

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 80

8.1. Tekli Doking Sonuçları 80

8.1.1. 1k22 Yapısı için Doking Sonuçları 81

8.1.2. 1dwd Yapısı için Doking Sonuçları 83

8.1.3. 1dwc Yapısı için Doking Sonuçları 85

8.2. Sanal Ligand Taraması 87

YORUMLAR VE ÖNERİLER 95

KAYNAKLAR DİZİNİ 97

EKLER DİZİNİ 105

EK 1 105

EK 2 107

EK 3 108

ÖZGEÇMİŞ 109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteinlerin primer yapısı, R^1, R^2 ve R^3= amino asit birimleri.....19

Şekil 1.2. Met-enkefalin. Bu peptid için kısa adlandırma H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH veya YGGFM. 20

Şekil 1.3. Düzlemsel peptid bağı(sadece renkli bağlar bağ dönmesi için izinli) 21

Şekil 1.4. Peptid bağının trans ve cis konformasyonları 21

Şekil 1.5. Proteinlerin molekül-içi hidrojen bağları ve amino asit birimlerin konumunu gösteren α-sarmal yapısı 22

Şekil 1.6. β-Katlanmış tabaka(antiparalel düzenlenme) 23

Şekil 1.7. Antiparalel ve paralel tabakalardaki hidrojen bağları(oklar zincirin C-terminalinin sonunu gösterir). 23

Şekil 1.8. polipeptid zincirinden bir görünüm.....24

Şekil 1.9. İnsan siklin-bağlı kinaz 2(CDK2) ye ait pdb dosyası(1hcl). Silindirler α–sarmal ve oklar β-katlamalı tabaka yapısını gösterir.Pdb dosyası bir protein için üç-boyutlu yapısal bilgileri içerir ve Brookhaven protein veri bankasından indirilebilinir. Herbir protein yapısı bir kod ile verilir; örneğin 1hcl. 25

Şekil 1.10. Molekül-içi etkileşimlerin bir sonucu olarak tersiyer yapının oluşumu 26

Şekil 1.11. Ürün bağlı kaldığında bir enzimin “tıkanması” 27

Şekil 1.12. Rekabetçi inhibisyon gösterimi.....28

Şekil 1.13. Tersinmez inhibitör örneği.....29

Şekil 2.1. İçsel ve dışsal kanamada gözlenen pıhtılaşma adımları 30

Şekil 3.1. Faktör 10a ve Faktör 2a inhibitörleri.....33

Şekil 3.2. İndirekt Faktör 10a inhibitörü Heparinler 34

Şekil 3.3. Direkt Faktör 10a inihibitörü, rivaroxaban.....34

Şekil 4.1. Trombin inhibitörleri 36

Şekil 4.2. Hirudin'in moleküler yapısı 38

Şekil 4.3. Bivalirudin'in moleküler yapısı 39

Şekil 4.4. Lepirudin'in moleküler yapısı.....40

Şekil 4.4. Dabigatran molekülünün yapısı trombin inhibitörü NAPAP yapısına benzer.....41

Şekil 4.5. (a) Dabigatran ve (b) Oral alınan Dabigatran etexilat'ın moleküler yapıları.....41

Şekil 4.6. (a) Öncü ilaç Melagatran ve (b) Ximelagatran 'ın moleküler yapıları 42

Şekil 4.7. NAPAP ve Melagatran bileşiklerinin yapıları 43

Şekil 4.8. Argatroban'ın moleküler yapısı.....44

Şekil 4.9. Argatroban ve NAPAP moleküllerinin çıkış yapısı olan TAME ile fonksiyonel gruparı arasındaki farklılıkları 45

Şekil 4.10. Argatroban yapısının trombin yapısının aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle etkileşimi 46

Şekil 6.1. Protein veritabanının web sayfası görünümü 49

Şekil 6.2. kenetlenme yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı (Sousa vd., 2006).....50

Şekil 6.3. Autodock Program arayüzünün çalışmalar sırasında alınmış bir örneği 56

Şekil 6.4. AD Vina arayüzünün çalışmalar sırasında alınmış bir örneği 57

Şekil 6.5. chimera programında kullandığımız yapı olan trombinin bir görünümü.....58

Şekil 6.6. çalışmamız sırasında kullanılan programdan bir görüntü 59

Şekil 6.7. 1dwc yapısının Marvin Space programında gösterimi 60

Şekil 6.8. z koordinat farkını kapatmak için yapılan optimizasyon aşaması.....61

Şekil 6.9. argatroban ve herhangi bir ZINC veri tabanından alınan yapının Marvin Space programı ile optimizasyon sonrası üst üste gelmiş gösterimi 61

Şekil 7.1. Doking yönteminin validasyonunda kullanılacak olan inhibitörlerin yapıları 63

Şekil 7.2. Chimera ile ayrılan ligand(argatroban) ve trombin yapıları(pdb kod: 1dwc) 64

Şekil 7.3. su molekülleri seçimi.....65

Şekil 7.4. Torsiyon kökü ve torsiyon sayısının ADT üzerinde gösterimi, bu belirtilen torsiyon kökü doking boyunca sabit tutulacaktır. 66

Şekil 7.5. 1dwc referans ligand ve onunla örtüşen 7 numaralı doking sonucunun ve Trombin molekülünün bir arada gösterimi.....66

Şekil 7.6. üç boyutlu Grid kutusunun gösterimi 67

Şekil 7.7. üç boyutlu grid kutusunun koordinatları.....68

Şekil 7.8. 1dwc için hazırlanmış gpf örneği.....69

Şekil 7.9. 1dwc için hazırlanmış dpf örneği.....69

Şekil 7.10. 1dwc yapısı için doking aşamasında kullanılan genetik algoritma değerleri.....71

Şekil 7.11. 1dwc ligandının doking aşaması için hazırlanılan konfigürasyon dosyasından bir görünüm.....72

Şekil 7.12. Cygwin kodları ile dosya çağırma aşaması 73

Şekil 7.13. Cygwin üzerinde doking başlangıcının görünümü 73

Şekil 7.13. görsel tarama için kullanılan ZINC veri tabanı web sayfasından, yapımız olan argatrobanın çiziminden bir görünüm 74

Şekil 7.14. TAME ve argatroban yapılarının ortak bölgelerinin ZINC programı ile veri tabanı oluşturmak için hazırlanması 75

Şekil 7.15. TAME, argatroban ve NAPAP'dan çıkarak ZINC veritababnında çizilecek olan yapının belirlenmesi 76

Şekil 7.16. TAME ve argatroban için ortak olan ayrıca aktif bölge aminoasitleriyle etkileşen bölgeler dâhilinde ZINC veritabanında aranacak aktif kısım 76

Şekil 7.17. ZINC veritabanı ile bulunan 578 adet hit yapının bir kısmı 77

Şekil 7.18. çoklu doking için hazırlanmış olan konfigürasyon dosyası.....78

Şekil 7.19. Cygwin kodları ile çoklu doking için dosya çağırma aşaması 79

Şekil 7.20. Çoklu doking başladığı aşamadan bir görünüm 79

Şekil 8.1. 1k22 yapısının Vina sonuç tablosu.....82

Şekil 8.2. 1k22 referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 7 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri 83

Şekil 8.3. 1dwd yapısının Vina sonuç tablosu 84

Şekil 8.4. 1dwd referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 4 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri 85

Şekil 8.5. 1dwc yapısının Vina sonuç tablosu 86

Şekil 8.6. 1dwd referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 2 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri 87

Şekil 8.7. TAME ve argatroban için ortak olan ayrıca aktif bölge aminoasitleriyle etkileşen bölgeler 88

Şekil 8.8. TAME ve Argatroban'dan çıkarak ZINC veritababnında çizilecek olan yapının belirlenmesi 88

Şekil 8.9. Görsel ligand tarama sonuçları 89

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. İnsanda bulunan 20 amino asit 20

Tablo3.1. univalent inhibitör 32

Tablo 3.2. Trombinin aminoasit dizilimi 35

Tablo 4.1. İkili-bağlanan direkt trombin inhibitörleri: Hirüdin ve türevleri 37

Tablo 5.1. Literatürde bulunan trombin ile yapılmış doking çalışmaları 47

Tablo 7.1. Validasyon testi için seçilen trombin-ligand komplekslerinin pdb kodu ve özellikleri 63

Tablo 7.2. ZINC veri tabanı ile elde edilen bazı yapıların kodları ve moleküler ağırlıkları 77

Tablo 8.1. Tekli doking validasyon çalışması sonuçları (B.E= bağlanma enerjisi; pdb=protein data bank; RMSD=root means square deviation) 80

Tablo 8.2. Görsel ligand taramasında en düşük bağlanma enerjisine sahip ve RMSD değeri 2 Å'den küçük olan yapılar 94

KISALTMALAR

DTI: Direk Trombin İnhibitörleri (Direct Thrombin İnhibitors)

FDA: Birleşik Devletler Besin ve İlaç heyeti

PDB: Protein veritabanı

X-Ray: X-ısınları

RMSD: Roots mean square deviation (Orijinal yapıdan sapmanın karekökü)

3D: Üç Boyutlu

PDB: Protein veritabanı

AD: AutoDock doking programı

ADT: AutoDockTools görsel kullanıcı arayüzü

AD Vina: AutoDock Vina doking programı

AD4: AutoDock4

npts: Grid kutusunda bulunan nokta sayısı

gpf: Grid parametre dosyası

dpf: Doking parametre dosyası

Config: Konfigürasyon dosyası

Script: Bilgisayar alfabesine göre elle girilmiş komutlar

JME: Java molekül düzenleyici

Kcal: Kilo kalori

B.E: Bağlanma enerjisi

Ala: Alanin

Arg: Arginin

Asn: Asparagin

Asp: Aspartik asit

Cys: Sistein

Glu: Glutamik asit

Gln: Glutamin

Gly: Glisin

His: Histidin

Ile: İzolösin

Leu: Lösin

Lys: Lizin

Met: Metionin

Phe: Fenilalanin

Pro: Prolin

Ser: Serin

Thr: Treonin

Trp: Triptofan

Tyr: tirozin

Val: Valin

GİRİŞ

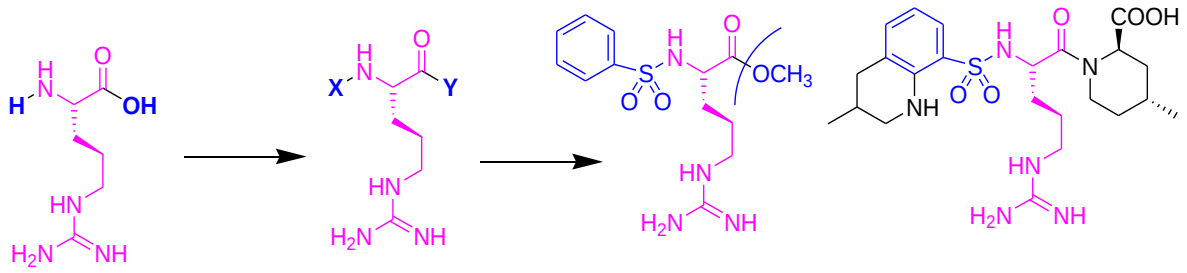
Tromboembolitik hastalıklar nedeniyle hayatını kaybeden veya felç olan insanların sayısında her geçen gün artış olmaktadır. Bu hastalıklar sebebiyle günümüzde ABD' de her yıl altı milyon kişi tromboembolitik olaylardan etkilenmekte ve iki milyon kişi ise ölmektedir (Töbü M. Vd 2006). Vücut içinde trombin gelişimi damar bütünlüğünün bozulması ve/veya damar endotel hücre uyarılması ile pıhtılaşma sistemindeki doku faktörü yolu ve trombositlerin uyarılması ile gelişmektedir. Bu hayati öneme sahip olan damar içi pıhtılaşma konusu literatürde günümüze kadar birçok açıdan çalışmaya temel olmuştur. Ayrıca çözülmüş X-Ray yapılarının sayısal olarak geniş olmasından dolayı yapı temelli ilaç tasarımında önemli bir hedef halinde bulunmaktadır.

Trombin kanı pıhtılaştıran bir proteindir. Genel olarak trombin kan plazmasının içinde dolaşmasına rağmen, geçtiği yerlerdeki kanı pıhtılaştırarak normal akışın durmasına neden olmaz. Trombin, genelde kanda aktif olmayan protrombin halinde mevcuttur. Aktif olmadığı için protrombin, fibrinojeni işleme sokarak pıhtılaşma için gerekli olan fibrin maddesinin oluşmasını sağlamaz. Vücut içi yaralanmalarda ortamda bulunan trombin damar içi pıhtılaşma konusunda önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

Günümüzde, Anti-trombotik ilaçların keşfinde pıhtılaşma adımlarındaki birçok doku faktörü; 2a (trombin), 5a, 8a, 9a, 10a (tromboplastin), yeni ilaçların keşfi için hedef yapı olarak seçilmiştir. Bu faktörler için farklı inhibitörler denenmektedir. Bunlardan Vitamin K antagonistleri, K vitaminin görevini nötrlemekte yani reseptörü inhibe etmektedir. Bu inhibitörlerin yan etkileri ise kullanıldıklarında etkilerinin geç başlaması, bu yüzden acil durumlarda parenteral antikoagülanlar ile kullanılmasının önerilmesidir. Bir diğeri olan Faktör Xa inhibitörlerinin, klinik olarak çalışmaları yapılmaktadır. Deneysel olarak çok fazla çalışmaları bulunmamaktadır, ayrıca etkin hale geçmeleri için bir kofaktör olan antitrombin III gerekmektedir. Fakat antitrombin III genetik bozukluktan dolayı her insan vücudunda sentezlenememesi bu inhibitörlerin kullanımında bir dezavantajdır.

Direk trombin inhibitörleri (DTİ) ise, trombin enzimi hedef yapılı inhibitörlerdir. Plazma proteinleriyle etkileşime girmeyen ve kofaktör antitrombin III gerektirmeyen etkiye sahiptirler. Direkt trombin inhibitörleri, trombine doğrudan bağlanarak fibrinojenin fibrine dönüşüm reaksiyonunun katalizlenmesini inhibe eder.

DTİ'ler arasında bu tez çalışmasının da temelini oluşturan, **Arginin-temelli** inhibitörlerden **Argatroban** enjeksiyon yolu ile alınan bir DTİ inhibitördür. 2-Amino-5-guanidinopentanoik asit olarak ta bilinen arginin molekülü guanidino yapısına sahiptir.

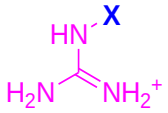


Arginin (2-amino-5-guanidino pentanoik asit)

Arginin-temelli

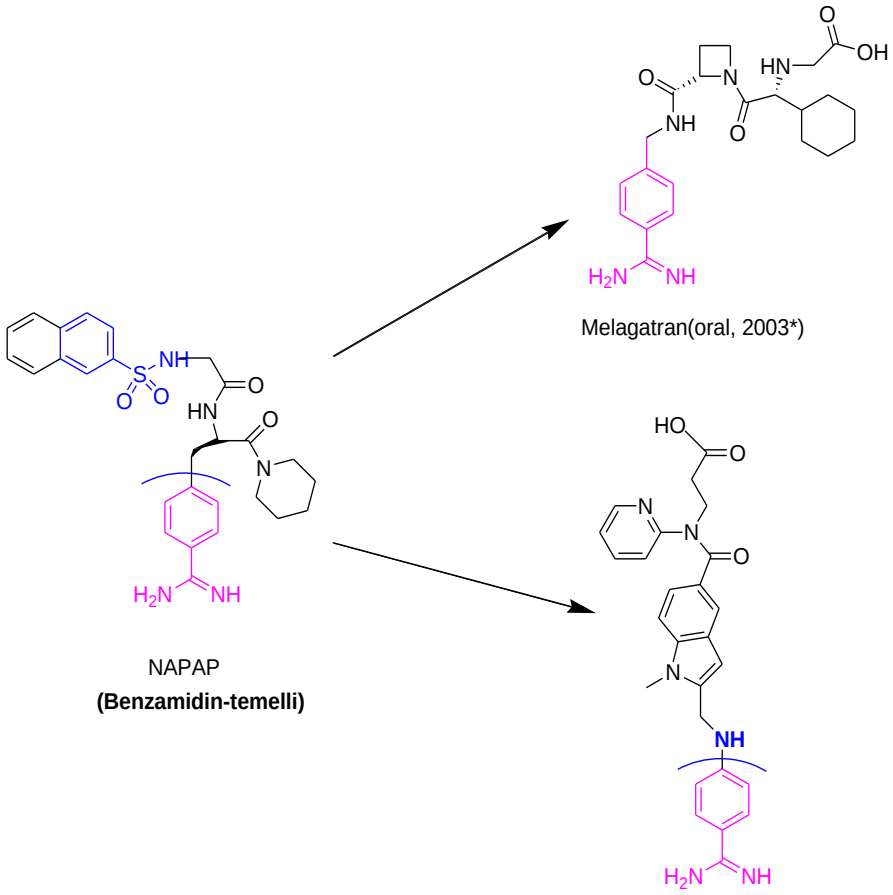
TAME(1965) (öncü bilesik)

Argatroban(1984)



Guanidino

Oral yolla alınabilen tek ilaç **Dabigatran** ve enjeksiyon yolu ile alınan **argatroban** ise benzamidin-temelli inhibitördür. Hem arginin-temelli, hem de benzamidin temelli inhibitörlerdeki ortak olan guanidino yapısıdır.



*2006 da yasak

Guanidino temeli göz önüne alındığında DTİ'leri için hızlı bir sürede elimizdeki ligand serilerinden muhtemel ilaç adaylarını bulmak için günümüzde bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda bu yöntemlerden tekli doking ve görsel ligand taraması kullanılarak uygun ilaç adaylarını keşfetmek hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması 2 aşamadan meydana gelmektedir. İlk aşamada, elimizde X-ışını kristal yapıları bilinen direk trombin inhibitörleri kullanılarak çalışmamızın temelini oluşturacak olan uygun doking programının seçimi için validasyon yapılması amaçlanmıştır. Bu aşamada kullanılacak aday programlar Autodock ve Autodock Vina programlarıdır.

Tezin ikinci aşamada ise uygun bulunan doking programı kullanarak, doking metot validasyonu aşamasında uygun bulunan direk trombin inhibitörü yapısı temel

alınarak görsel ligand taraması gibi ilaç tasarımında daha kısa sürede tahmini ilaç adayları için temel olacak bir yöntem kullanılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, damar içi pıhtılaşmayı engelleme tedavisinde; oral yolla alınabilecek düşük molekül ağırlığına sahip, aktif bölge ile en iyi etkiyi gösterebilecek düşük yan etkiye sahip ilaç aday moleküllerinin tasarlanmasıdır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler hem yeni doking programlarının yazılımı ve geliştirilmesine, hem de yeni bileşiklerin sentezine, ayrıca gelecekte yapılacak yeni çalışmalarda ve bir sonraki aşama olan aktivite testlerine geçilerek uygunluklarının araştırılması konusunda katkıda bulunacaktır.

GENEL BİLGİLER

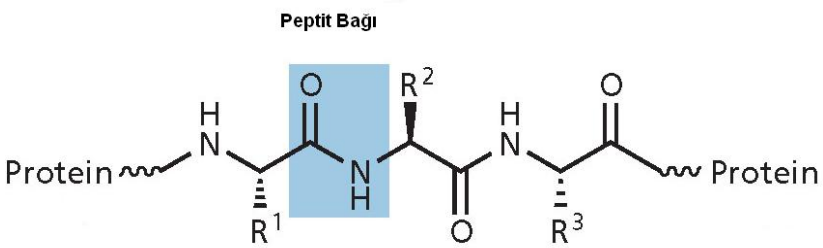
1. PROTEINLER

1.1. Yapı ve Fonksiyonları

Tıpta kullanılan ilaçların büyük çoğunluğunun hedef protein yapısı: reseptör, enzim ve taşıyıcı proteinlerdir. Bu nedenle, proteinler ile ilaç etkileşimini anlamak için protein yapısını anlamak önemlidir. Proteinlerin yapısı primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner olmak üzere dört seviye içerir. (Patrick vd, 1995)

1.1.1. Proteinlerin Primer Yapısı

Primer yapı, proteini peptid bağları ile bağlanarak oluşturan bireysel aminoasitlerin sırasıdır.



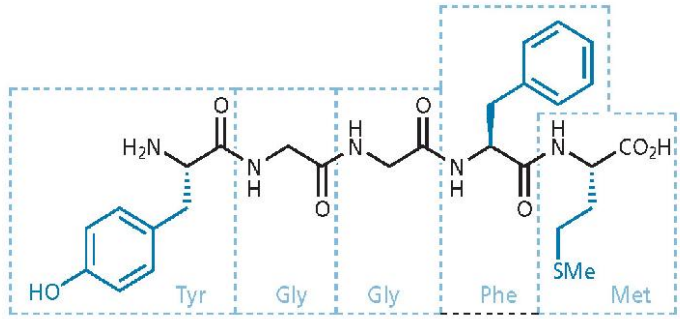
Şekil 1.1. Proteinlerin primer yapısı, R^1, R^2 ve R^3= amino asit birimleri

İnsanlarda bulunan 20 amino asit Tablo 1.1 de üç-harf ve gösterimde en çok kullanılan tek-harf kodu ile listelenmiştir.

İnsan vücudunda sentezlenen		Besinlerde bulunan	
Alanin	Ala (A)	Histidin	His (H)
Arjinin	Arg (R)	Izolösin	Ile (I)
Asparajin	Asn (N)	Lösin	Leu (L)
Aspartik asit	Asp (D)	Lizin	Lys (K)
Sistein	Cys (C)	Metiyonin	Met (M)
Glutamik asit	Glu (E)	Fenilalanin	Phe (F)
Glutamin	Gln (Q)	Treonin	Thr (T)
Glisin	Gly (G)	Triptofan	Trp (W)
Prolin	Pro (P)	Valin	Val (V)
Serin	Ser (S)		
Tirozin	Tyr (Y)		

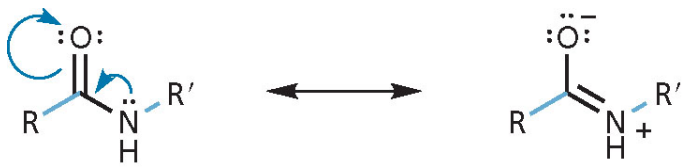
Tablo 1.1. İnsanda bulunan 20 amino asit

Amino asit yapıları Ek 1 de gösterilmiştir. **Metenfakalin'** in (vücudumuzun kendi ağrı kesicilerinden biri) primer yapısı Şekil 1.2. de gösterilmiştir.



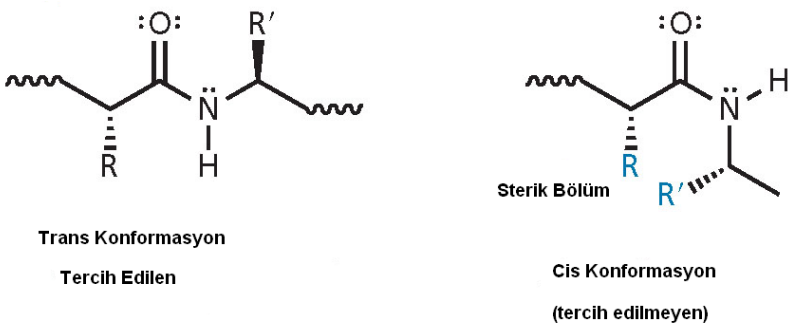
Şekil 1.2. Met-enkefalin. Bu peptid için kısa adlandırma H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH veya YGGFM.

Proteinlerdeki peptid bağı Şekil 1.3. de gösterilen rezonans yapısı sonucu olarak düzlemseldir. Bu peptid bağına dönmeyi engelleyen önemli bir çift bağ karakteri sağlar.



Şekil 1.3. Düzlemsel peptid bağı(sadece renkli bağlar bağ dönmesi için izinli)

Sonuç olarak, protein ana zincirindeki bağ dönmesi, her bir peptid bağının her iki yanındaki bağlar için mümkündür. Bu proteinin tersiyer yapısı için önemli bir sonuçtur. Şekil 1.4.'de peptid bağı için iki olası konformasyon vardır.



Şekil 1.4. Peptid bağının *trans* ve *cis* konformasyonları

Trans konformasyon, proteinlerde normal olarak var olandır, çünkü cis konformasyon birimler arasında sterik etkiye neden olur. Buna rağmen, cis konformasyon prolin birimi içeren peptid bağları için mümkündür.

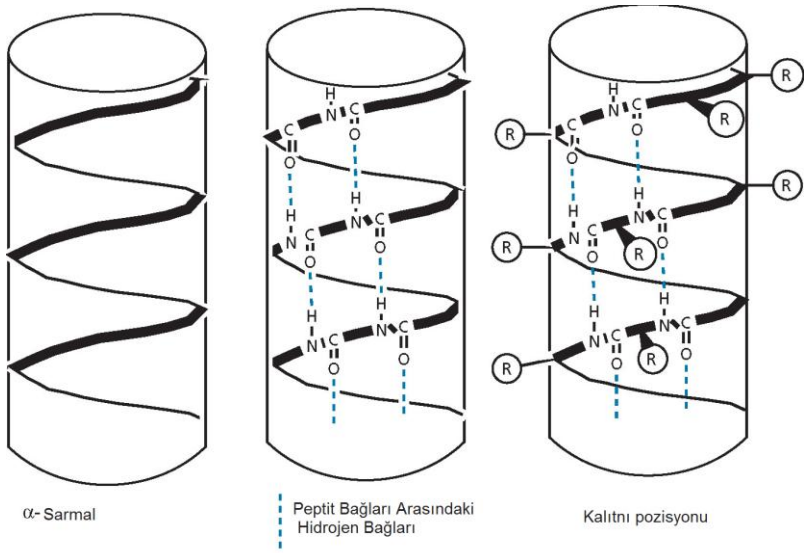
1.1.2. Proteinlerin Sekonder Yapısı

Proteinlerin sekonder yapısı protein zincirinin sahip olduğu düzenlemiş yapı bölgelerini içerir. Yün, ipek gibi yapısal proteinlerde, ikincil yapılar geniştir ve bu

proteinlerin tüm özellik ve şekillerini tanımlar. Bununla birlikte, diğer proteinlerin çoğunda ikincil yapıların bölgeleri vardır.

1.1.2.1. α –Sarmal

α-Sarmal protein zincirinin kıvrılması sonucu oluşur. Ana zinciri oluşturan peptid bağları arasında hidrojen bağı oluşabilir. Bu hidrojen bağları, Şekil 1.5 te görüldüğü gibi sarmalın ekseni boyuncadır.



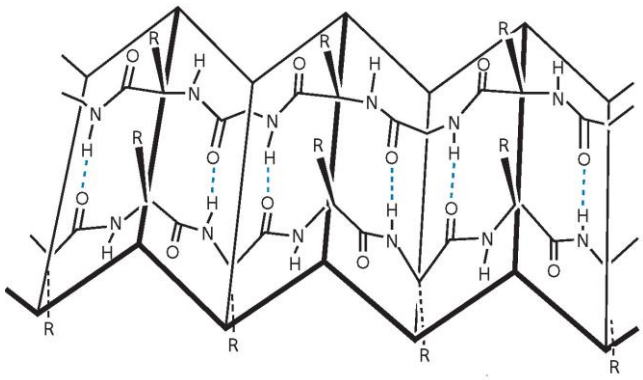
Şekil 1.5. Proteinlerin molekül-içi hidrojen bağları ve amino asit birimlerin konumunu gösteren α-sarmal yapısı

Amino asit bileşenlerinin birimleri sarmalın etrafında dik açıyla dolanır, böylece sterik etkiler minimize edilir ve yapının daha kararlı olması sağlanır. Sarmalların diğer en az gözlenen çeşidi, ideal α-burgu yapısından daha gergin olan proteinlerdeki 3(10)-sarmal ve en sıkışık ve en nadir gözlenen π-sarmaldır.

1.1.2.2. β-Katlanmış Tabaka

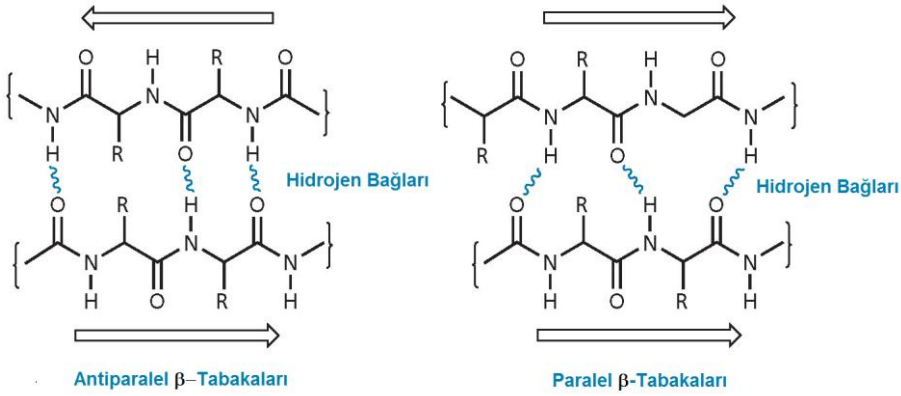
β-Katlanmış tabaka, Şekil 1.6. da görüldüğü gibi protein zincir tabakalarının birinin diğerinin üstünde yer alması sonucu oluşur. Yapı, peptid zincirleri arasındaki

hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Birimler sterik etkiyi önlemek için tabakalara göre dik açıda yerleşir.



Şekil 1.6. β-Katlanmış tabaka (antiparalel düzenlenme)

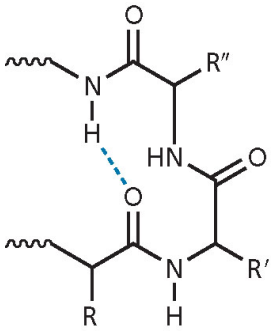
Şekil 1.7 ’de β tabakalardaki zincirler zıt yönde (anti-paralel) veya aynı yöndedir.



Şekil 1.7. Antiparalel ve paralel tabakalardaki hidrojen bağları(oklar zincirin C-terminalinin sonunu gösterir).

1.1.2.3. β-Dönme

β-dönme polipeptid zincirinin aniden dönmesine ve zıt yönde gitmesine izin verir. Bu proteinin daha sıkı küresel bir şekil almasında önemlidir. Dönmenin üçüncü peptid ve birinci peptid arasındaki hidrojen bağı etkileşimi dönmeyi kararlı kılar. Polipeptid zincirinin yönündeki daha az ani değişiklikler yapıdaki daha az düzenli, fakat sabit ve iyi şekilde büyük düğümler oluşturur.



Şekil 1.8. polipeptid zincirinden bir görünüm

1.1.3. Proteinlerin Tersiyer Yapısı

Tersiyer yapılar bir proteinin üç boyutlu yapısıdır. Yapısal proteinler şekilsel olarak oldukça düzenlidir, buna karşın enzim ve reseptör gibi küresel proteinler daha karışık yapılara katlanır. Enzimlerin ve reseptörlerin tersiyer yapısı onların fonksiyonları ve aynı zamanda ilaçlar ile etkileşimi için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, tersiyer yapıyı kontrol eden kuvvetleri anlamak önemlidir.

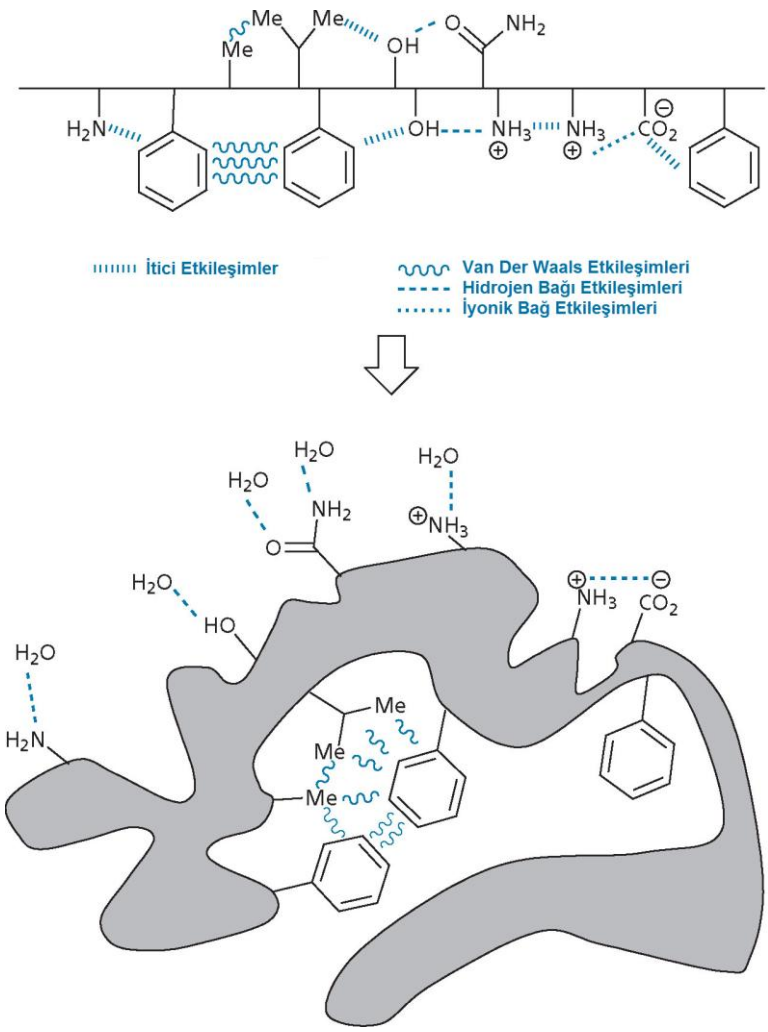
Küresel proteinler genelikle proteinden proteine değişen düzenli ikincil yapı bölgeleri içerir. Örneğin, Şekil 1.9.'da **siklin-bağlı kinaz 2**(fosforlama reaksiyonunu katalizleyen bir protein) çeşitli α–sarmal ve β-Katlamalı tabakalar içerirken, sindirim enzimi **kimotripsin** çok az ikincil yapıya sahiptir. Yine de her iki siklin-bağlı kinaz 2 ve kimotripsin protein zincirleri bir kompleks oluşturmak için katlanır.

Şekil 1.9. İnsan siklin-bağlı kinaz 2(CDK2) ye ait pdb dosyası(1hcl). Silindirler α–sarmal ve oklar β-katlamalı tabaka yapısını gösterir. Pdb dosyası bir protein için üç-boyutlu yapısal bilgileri içerir ve Brookhaven protein veri bankasından indirilebilinir. Herbir protein yapısı bir kod ile verilir; örneğin 1hcl.

İlk bakışta, siklin-bağlı kinaz 2 nin üç boyutlu yapısı kedi saldırdıktan sonraki ip yumağı gibidir. Aslında, gözlenen yapı proteinin primer yapısıyla belirlenen ve proteinin her bir molekülünü içeren çok düzenli bir şekildir. Gerçekte, doğal oluşan proteinleri laboratuarda, doğal oluşan proteindeki fonksiyonu ve üç-boyutlu yapıyı otomatik olarak alacak şekilde sentezlemek mümkündür. HIV-1 proteaz enzimi bir örnektir.

Bu bir problem olarak ortaya çıkar. Niçin amino asit zinciri kesin üç-boyutlu bir yapı oluşturmalıdır? İlk bakışta, anlamsız görünür. Eğer masada ipi uzatırsak, düzgün kompleks bir yapıyı kendi kendine katlanamaz.

Proteinin sadece uzun bir ip olmadığında yatar. O zincir hem peptid bağlarını hem de aynı zamanda amino asit birimlerine sahip-zincir boyunca farklı kimyasal fonksiyonel gruplar içerir. Böylece, protein en uygun şekil veya konformasyonu bulana kadar-tersiyer yapı, istenmeyen etkileşimleri minimize ve tercih edilenleri maksimize edecek şekilde bükülecek ve dönecektir.



Şekil 1.10. Molekül-içi etkileşimlerin bir sonucu olarak tersiyer yapının oluşumu

Disülfit bağlarının dışında, tersiyer yapıdaki bağ etkileşimleri kısım 1.4 de tanımlandığı gibidir. Sonrakiler farklı moleküller arasında oluşmasına karşın proteinin tersiyer yapısını kontrol eden bağlar aynı molekül içinde oluşur ve bunlara **molekül-içi bağlar** denir. Yine, kısım 1.3 de tanımlanan prensipler aynıdır

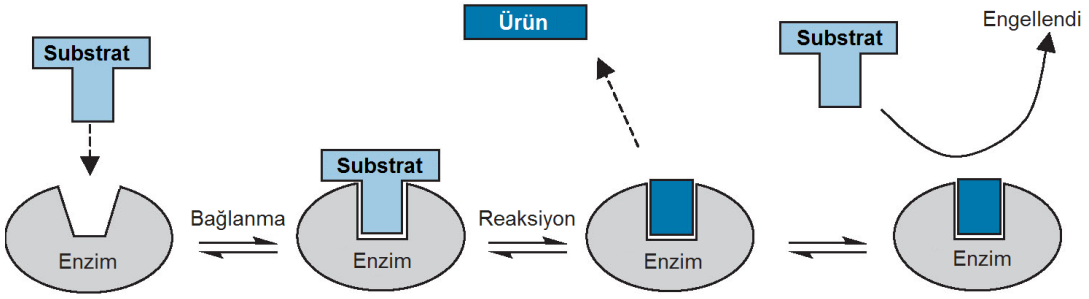
1.2. ENZİMLER

Enzimler vücudumuzun katalizörüdür-kendilerini tüketmeksizin bir kimyasal reaksiyonunun hızını arttırır. Onlarsız, hücre kimyasal reaksiyonları değil yavaş, hatta hiç olmaz. Önemli ilaçların çoğu enzim inhibitörü olarak davranır. Diğer bir deyişle, onlar özel bir reaksiyon için katalizör olan enzimleri durdurur veya engeller.

1.2.1. Enzimin Aktif Bölgesinde Etkili Olan İnhibitörler

1.2.1.1. Tersinir İnhibitörler

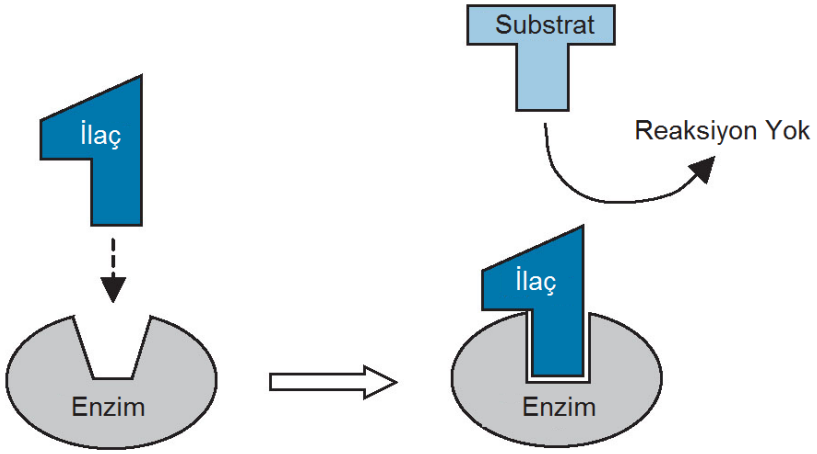
Substratı aktif bölgede tutan etkileşimler yoksa substratın reaksiyona girmesi için herhangi bir şansı olmadan önce içeri ve dışarı sürüklenecektir. Bu nedenle, ne kadar çok bağlanma etkileşimleri varsa, substrat o kadar güçlü bağlanacak ve o kadar iyi reaksiyona girme şansı olacaktır.



Şekil 1.11. Ürün bağlı kaldığında bir enzimin "tıkanması"

Reaksiyonun olması için substratı aktif bölgede yeterince güçlü tutacak ama ayrılarak ürünün oluşmasına izin verecek kadar da zayıf olmalıdır. Bu bağlanma dengesi eğer ilaç kimyacıları özel bir enzimi inhibe etmeye veya tamamen durdurmaya isterlerse bu büyük bir avantaja dönüşebilir. Aktif bölgeye daha iyi güçlü bağlanma ile oturan doğal substrata veya ürüne benzeyen bir molekül tasarlanabilir. Aktif bölge içinde olduğunda herhangi bir reaksiyon olmayabilir ama orada olduğu sürede, doğal substratın ulaşmasını engeller ve enzimatik reaksiyonu durdurur.

1.2.1.2. Rekabetçi İnhibasyon



Şekil 1.12. Rekabetçi inhibisyon gösterimi

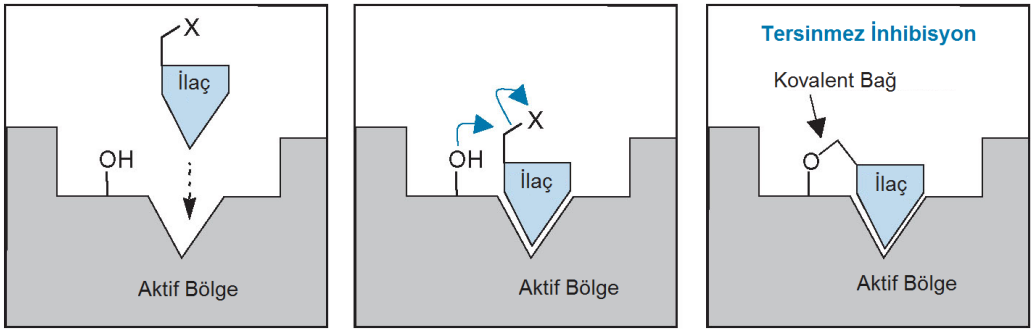
Rekabetçi inhibitörler moleküller arası bağlar ile aktif bölgeye bağlanır ve böylece bağlanmanın tersinir olması bağlanmamış ilaç ve bağlı ilaç arasında oluşan dengeye izin verir- bir çeşit "yoyo" etkisi gibidir, ilaç aktif bölgeye bağlanır, salınır ve tekrar bağlanır. Bu ilacın tersinir bağlanması sonucu oluşan inhibasyon demektir. Eğer substratın konsantrasyonu arttırılırsa, aktif bölge için ilaç ile birlikte daha etkin yarışır, ve böylece ilaç tarafından inhibasyon daha az etkili olur.

Rekabetçi inhibitör olarak davranan çok sayıda faydalı ilaçlar vardır. Örneğin, **sulfonamitler** bu şekilde bir bakteri enzimini inhibe eden antibakteriyel madde olarak davranır. Kan basıncını kontrol etmek için kullanılan çoğu diüretikler ve bazı antidepresanlar rekabetçi inhibitörlerdir.

1.2.1.3. Tersinmez İnhibitörler

Bazı enzim inhibitörleri aktif bölgeye tersinmez bağlanır ve enzimi sürekli olarak bloke ederler. En etkili tersinmez inhibitörler bir kovalent bağ oluşturmak için aktif bölge içindeki amino asit ile reaksiyon verenlerdir. **Serin** ve **sistein** gibi nükleofilik grup taşıyan amino asitler (sırasıyla OH ve SH) çeşitli enzimlerin aktif bölgesinde vardır ve genelde enzim reaksiyonunun mekanizmasına katılırlar. Aktif

bölgeye yerleşecek bir elektrofilik ilaç tasarlanmasıyla, bu nükleofilik grupları alkillemek mümkündür ve böylece aktif bölge sürekli olarak tıkanır.



Şekil 1.13. Tersinmez inhibitör örneği

2. KANIN PIHTILAŞMA ADIMLARI

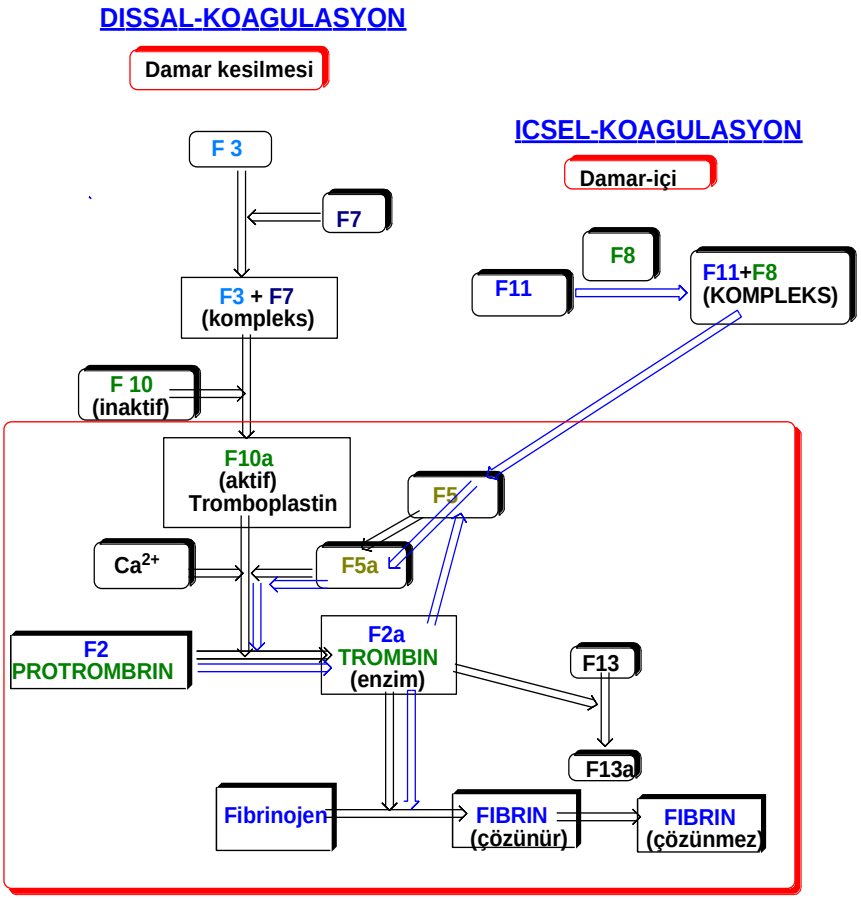
Pıhtılaşma sistemi oldukça düzenlidir ve normal koşullarda trombin oluşumu azdır. Ancak, yaralı-kısımda var olan trombinin miktarı hızla artınca, dışsal-koagulasyon sistemi uyarılır. Ya da damar içinde biraz fazla trombin varsa içsel-koagulasyon başlar.

Dıştan yaralanmalarda yaralanmış dokudan kana "*doku faktörü*" nün salınmasıyla dışsal-*koagulasyon yolu* başlamış olur. Şekil 2.1.'de verilen pıhtılaşma aşamalarına göre doku faktörü (yani faktör III, trombokinaz, pıhtı doku faktörü veya CD142) *pıhtı hücrelerinde* (trombosit veya platelet), *endotel altındaki doku* ve akvuyarlarda (lökositler) bulunan bir proteindir ve enzim öncüsü olan madde protrombinden trombinin başlatılması için gereklidir.

Kan damarları yaralandığında (fiziksel veya plak oluşumu ile), bazı hücreler "doku faktörü 3" salgılar ve bu hasarlı damarların iç zarının yüzeyini kaplar. Doku faktörü (F3) *sitoksin reseptör II* ailesindendir ve faktör 7 (F7) için bir hücre yüzey reseptörüdür.

Bu salgılanan F3, F7 ile kompleks oluşturarak, pıhtılaşma(koagulasyon) basamaklarını aktive eder. Bu kompleks, inaktif-faktör 10'u aktif faktör-10a (tromoboplastin)'a dönüştürür. Faktör-10a ve Faktör 5a ve Ca^{2+} kompleksi,

protrombini (F-2) *trombine* (F-2a) dönüştürür. Trombin ise fibrinojenin fibrine dönüşme reaksiyonunu katalizleyerek, kanda pıhtı oluşmasına neden olur. Trombin ayrıca, kanın pıhtılaşması için gerekli olan öncü-maddelerin yani prokoagulant- 5 ve 8'i de aktive eder.



Şekil 2.1. İçsel ve dışsal kanamada gözlenen pıhtılaşma adımları

İçsel yaralanmalarda; eğer ortamda biraz fazla trombin varsa, *koagulasyon-sisteminin-içsel yolu* ile daha fazla trombin üretilmesi ile başlar. Faktör-11 ve Faktör-8 bir araya gelerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks; faktör 5'i aktive ederek trombin oluşumunu arttırır. Ayrıca, oluşan trombin dışsal-koagulasyonu faktör 5'i aktive ederek başlatır.

3. ANTİKOAGULAN İLAÇLAR ve HEDEF YAPILARI

Günümüzde, Anti-trombotik ilaçların keşfinde pıhtılaşma adımlarındaki birçok doku faktörü 2a (trombin), 5a, 8a, 9a, 10a (tromboplastin) yeni ilaçların keşfi için hedef yapı olarak seçilmiştir. (Patrick vd, 1995) Günümüzde kullanılan antikoagulan ilaçlar, hedef yapıları ve kullanım şekilleri Tablo 1'de verilmiştir. Vitamin K antagonisti olarak bilinen ilaçlar, aslında VKOR (Vitamin K Epoksit Reduktaz) enzim inhibitörleridir. Bu ilaçlar pıhtılaşma faktörleri ile etkileşmez, sadece onların aktif formlarının oluşumunu sağlar.

Bu tabloda da göreceğimiz gibi faktör II, VII, IX, X 'u inhibe eden vitamin K antagonistleri, K vitamininin olağan yıkımını bozmaktadır. K vitamini, bir pıhtılaşma enzimi olan gama karboksilazın yardımcı etkenidir. Kısaca K vitaminin görevini nötrlemekte yani reseptörü inhibe etmektedir. Bu inhibitörlerin yan etkileri ise kullanıldıklarında etkilerinin geç başlaması, bu yüzden acil durumlarda parenteral antikoagülanlar ile kullanılmasının önerilmesidir. Bu nedenle burada daha fazla yer verilmeyecektir.

Faktör Xa inhibitörleri, klinik olarak çalışmaları yapılmaktadır. Deneysel olarak çok faza çalışmaları bulunmamaktadır, ayrıca etkin hale geçmeleri için bir kofaktör olan anti trombin III gerekmektedir. Fakat antitrombin III genetik bozukluktan dolayı her insan vücudunda sentezlenememesi bu inhibitörlerin kullanımında bir dezavantajdır.

Direk trombin inhibitörleri (DTI) ise, doğrudan trombine bağlanır. Plazma proteinleriyle etkileşime girmeyen ve kofaktör antitrombin III gerektirmeyen etkiye sahiptirler.

HEDEF YAPILAR	İLAÇLAR (İĞNE)	İLAÇLAR (Tablet)
Faktör 10a (Tromboplastin)	**HEPARİN TÜREVLERİ** **Düşük-molekül-ağırlık-heparin**[1] *Bemiparin, Certoparin* *Dalteparin, Enoxaparin* *Nadroparin, Parnaparin* *Reviparin, Tinzaparin* **Oligasakkaritler** *Fondaparinux, Idraparinux* **Heparinoid**[1] *Danaparoid, Sulodexide* *Dermatan sulfate*	**Ksabanlar**[2] *Rivaroxaban(2008)*
VKOR enzimi[3] **(Vitamin K Epoksit Reduktaz)**		**Kumarinler** *Acenocoumarol* *Coumatetralyl* *Dicoumarol* *Ethylbiscoumacetate* *Phenprocoumon* Warfarin **1,3-İndandionlar** *Clorindione* *Diphenadione* *Phenindione*
Faktör 2a (Trombin)	**Hirüdin ve türleri** *Hirüdin(doğal, sülük)* *Bivalirudin(sentetik)(1998)* **Rekombinant-Hirudinler** *Lepirudin(1998)* *Desirudin(2003)* **Küçük molekül** *Argatroban(2002)** *Melagatran(çekildi)*[4]	**Küçük molekül** *Dabigatran(2010)*[5, *] *Ximelagatran(çekildi)*[4]

Tablo3.1. *univalent inhibitör

[1] Antitrombin-III gerekir, indirekt [2] Antitrombin-III gerekmez, direkt

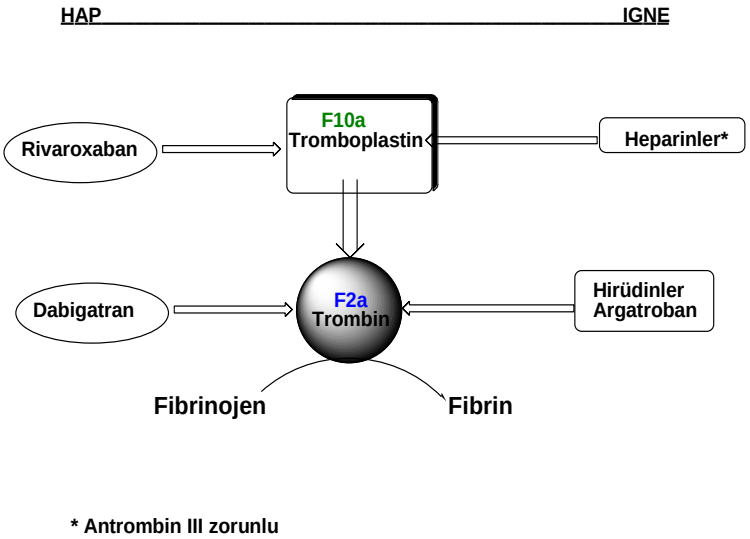
[3] VKOR(Vitamin K epoksit reduktaz) enzimi yerine Vitamin K antagonisti olarak yanlış adlandırılmıştır. Bu enzim, Vitamin K epoksitini Vitamin K'ya dönüştürür. **Vitamin K**

ise faktör-2, 7, 9, ve 10 ‘ların pıhtılaşma basamağında yer alan aktif formlarının oluşmasını sağlar.

4 2006 da piyasadan çekildi, ximelagatran, melagatranın öncü bileşiğidir

[5] Avustralya, Avrupa ve Amerika’da Pradaxa, Kanada’da Pradax ve Prazaxa, havanın neminden bozulur, şişe kapağı açıldıktan sonra 4 ay içinde kullanılmalı.

Günümüzde kullanılan ve doğrudan pıhtılaşma faktörleri; Faktör 10a veya Faktör 2a üzerinde etkili olan ilaçlar Şekil 3.1’de verilmiştir (ayrıca Tablo 3.1). Ağızdan “tablet” olarak alınan iki ilaç vardır; rivaroxaban ve dabigatran. Enjekte edilen ilaçlar üç türdür; heparin türevleri, hirüdin türevleri ve **argatroban**.

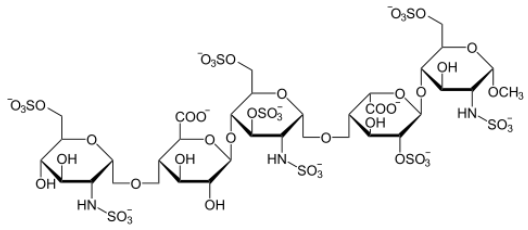


Şekil 3.1. Faktör 10a ve Faktör 2a inhibitörleri

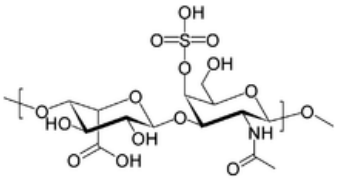
3.1. HEDEF YAPI: Faktör 10a (Tromboplastin)

Faktör 10a inhibitörü olarak kullanılan ve düşük-molekül-ağırlıklı-heparinler (LMWH), oligasakkaritler ve heparonoidler olarak sınflandırılan ilaçlar heparinler türevleridir ve glikozaminoglikan yapısı bulunur. Ortalama molekül ağırlığı 15 kDA olan türüne fraksiyonlanmamış-heparin *(UFH),* 4.5 kDA olana ise düşük- molekül-ağrılıklı-heparin (*LMWH*) denir.

Heparinler, antitrombin fonksiyonunu katalizleyerek, Faktör 10a ile dolaylı yoldan etkileşir. Trombindeki *ikincil-yer2*'e heparinin bağlanmasının ardından, bir heparin-trombin-antitrombin kompleksi oluşur. Heparinler, yani *heparin+antirombin* kompleksi, fibrin-bağlı-trombine karşı çok etkili değildir (Schwienhorst A. Cell. Mol. Life Sci. 2006). İlk düşük-molekül ağırlıklı ilaç Fondaparinux sentetik bir pentasakkarit Faktör 10a inhibitörüdür (Şekil 3.2). Düşük-molekül-ağırlıklı-heparinler (LMWH) plazma proteinine daha az bağlanır ve istenmeyen yan etkiler daha azdır.



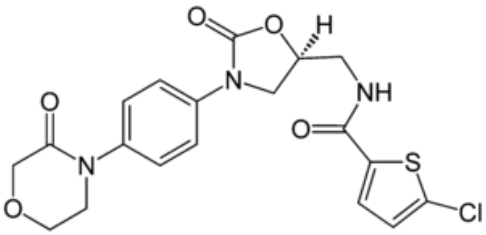
fondaparinux



Dermatan

Şekil 3.2. İndirekt Faktör 10a inhibitörü Heparinler

Ksabanlar, antitrombin-3 gerekmeksizin doğrudan Faktör 10a ile etkileşen ve oral alınan inhibitörlerdir. İlk ve 2008 yılında onay alan ilk ilaç **Rivaroxaban**'dır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Direkt Faktör 10a inihibitörü, rivaroxaban

3.2. HEDEF YAPI: FAKTÖR 2a (Trombin)

Kandaki çözünen fibrinojenin fibrin liflerine dönüşmesini sağlayan bir serin proteaz enzimidir. 1982 yılında fibrinojen ve fibrin tanımlamaları yapıldığında Alexander Schmidt fibrinojeni fibrine dönüştüren bir enzimin varlığı hipotezini öne sürmüştür.

Trombin yapısal olarak birbirine kovalent olarak tekli disülfit bağı ile bağlanmış iki zincirden meydana gelmiştir. Bunlardan büyük olan B zinciri 259 aminoasit içerir ve molekül ağırlığı 31,000; küçük olan A zinciri ise 36 aminoasit içerir ve molekül ağırlığı 6,000'dir. 1990'ların başlarında Wolfram Bode trombinin ilk X-ray yapısını ortaya çıkarmıştır. (Bode, W, 1992).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
ILE 16	VAL 17	GLU 18	GLY 19	SER 20	ASP 21	ALA 22	GLU 23	ILE 24	GLY 25	MET 26	SER 27	PRO 28	TRP 29	**GLN 30**	VAL 31	**MET 32**	**LEU 33**	**PHE 34**	**ARG 35**	**LYS 36**	**SER 36A**	**PRO 37**	**GLN 38**	**GLU 39**
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
LEU 40	LEU 41	CYS 42	GLY 43	ALA 44	SER 45	LEU 46	ILE 47	SER 48	ASP 49	ARG 50	TRP 51	VAL 52	LEU 53	THR 54	ALA 55	ALA 56	**HIS 57**	CYS 58	LEU 59	LEU 60	**TYR 60A**	**PRO 60B**	**PRO 60C**	**TRP 60D**
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ASP 60E	LYS 60F	ASN 60G	PHE 60H	THR 60I	GLU 60J	ASN 62	ASP 63	LEU 64	**LEU 65**	VAL 66	**ARG 67**	**ILE 68**	**GLY 69**	**LYS 70**	**HIS 71**	**SER 72**	**ARG 73**	**THR 74**	**ARG 75**	**TYR 76**	**GLU 77**	**ARG 77A**	**ASN 78**	**ILE 79**
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
GLU 80	**LYS 81**	**ILE 82**	SER 83	MET 84	LEU 85	GLU 86	LYS 87	ILE 88	TYR 89	ILE 90	HIS 91	PRO 92	**ARG 93**	TYR 94	ASN 95	**TRP 96**	**ARG 97**	**GLU 97A**	**ASN 98**	**LEU 99**	ASP 100	**ARG 101**	**ASP 102**	ILE 103
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
ALA 104	LEU 105	MET 106	LYS 107	LEU 108	**LYS 109**	**LYS 110**	PRO 111	VAL 112	ALA 113	PHE 114	SER 115	ASP 116	TYR 117	ILE 118	HIS 119	PRO 120	VAL 121	CYS 122	LEU 123	PRO 124	ASP 125	**ARG 126**	GLU 127	THR 128
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ALA 129	ALA 129A	SER 129B	LEU 129C	LEU 130	GLN 131	ALA 132	GLY 133	TYR 134	LYS 135	GLY 136	ARG 137	VAL 138	THR 139	GLY 140	TRP 141	GLY 142	ASN 143	LEU 144	LYS 145	GLU 146	THR 147	TRP 148	THR 149	ALA 149A
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
ASN 149B	VAL 149C	GLY 149D	**LYS 149E**	GLY 150	GLN 151	PRO 152	SER 153	VAL 154	LEU 155	GLN 156	VAL 157	VAL 158	ASN 159	LEU 160	PRO 161	ILE 162	VAL 163	GLU 164	**ARG 165**	PRO 166	VAL 167	CYS 168	**LYS 169**	ASP 170
176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
SER 171	THR 172	**ARG 173**	ILE 174	ARG 175	ILE 176	THR 177	ASP 178	ASN 179	MET 180	PHE 181	CYS 182	ALA 183	GLY 184	TYR 184A	LYS 185	PRO 186	ASP 186A	GLU 186B	GLY 186C	LYS 186D	ARG 187	GLY 188	**ASP 189**	**ALA 190**
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
CYS 191	GLU 192	**GLY 193**	ASP 194	**SER 195**	**GLY 196**	GLY 197	PRO 198	PHE 199	VAL 200	MET 201	LYS 202	SER 203	PRO 204	PHE 204A	ASN 204B	ASN 205	ARG 206	TRP 207	TYR 208	GLN 209	MET 210	GLY 211	ILE 212	VAL 213
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
SER 214	TRP 215	GLY 216	GLU	GLY 219	CYS 220	ASP 220A	ARG 221	ASP 222	GLY 223	LYS 224	TYR 225	**GLY 226**	PHE 227	TYR 228	THR 229	HIS 230	VAL 231	PHE 232	**ARG 233**	LEU 234	**LYS 235**	**LYS 236**	TRP 237	ILE 238
251	252	253	254	255	256	257	258	259																
GLN 239	**LYS 240**	VAL 241	ILE 242	ASP 243	GLN 244	PHE 245	GLY 246	GLU 247																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
THR 1H	PHE 1G	GLY 1F	SER 1E	GLY 1D	GLU 1C	ALA 1B	ASP 1A	CYS 1	GLY 2	LEU 3	ARG 4	PRO 5	LEU 6	PHE 7	GLU 8	LYS 9	LYS 10	SER 11	LEU 12	GLU 13	ASP 14	LYS 14A	THR 14B	GLU 14C
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36														
ARG 14D	GLU 14E	LEU 14F	LEU 14G	GLU 14H	SER 14I	TYR 14J	ILE 14K	ASP 14L	GLY 14M	ARG														

Tablo 3.2. Trombinin aminoasit dizilimi

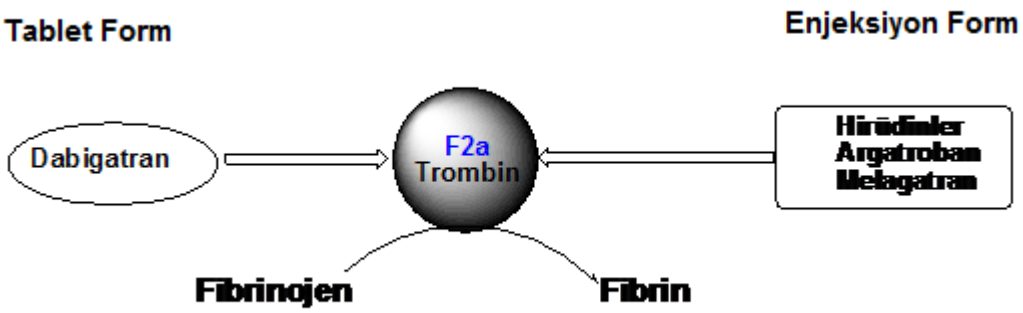
Tablo3.2.'de trombine ait olan dizilimde pembe renkli kısım dizilime ait sayıları, kırmızı ile belirlenen kısım aktif bölge aminoasitlerini, mavi ile belirlenen kısım heparin bağlanma bölgesi yani ikincil yer aminoasitlerini, yeşil ile belirlenen kısım ise fibrinojen bağlanma bölgesinde yani birincil yerde yer alan aminasitleri göstermektedir. Heparin bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitler; Gln 30, Leu 40, Leu 65, Ile 82, Lys 109, Lys 110 ve Lys 149E. Fibrinojen bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitler ise sırasıyla; Arg93, Arg101, Arg126, Arg165, Lys169, Arg173, Arg233, Lys235, Lys236 ve Lys240' dır. (Hall et,al.,1997).

Aktif bölgede yer alan aminoasitler ise sırasıyla; His 57, Tyr 60A, Trp 60D, Trp 96, Leu 99, Asp 102, Asp 189, Ala190, Gly 193, Ser 195, Gly 196 ve Gly 226 aminoasitlerinin bulunduğu kısımdan oluşmaktadır (Hall et,al.,1997).

Faktör 2a inhibitörleri veya Trombin inhibitörleri (TI), doğrudan trombini inhibe eden inhibitörlerdir. İkili-bağlanan TI'lar trombinin aktif bölgesini ve ikincil-yer yani heparin bağlanma bölgesini aynı anda bloke ederken, tekli-bağlanan DTI'lar sadece aktif bölgesini bloke ederler. İkili-bağlanan DTI'lar hirüdin, bivalirudin v.s iken, tekli-bağlanan DTI'lar melagatran (ön ilacı Ximelagatran), dabigatran ve argatroban'dır.

4. DİREKT TROMBİN İNHİBİTÖRLERİ

Direkt Trombin inhibitörleri (DTI) trombine doğrudan bağlanan ve onun substratları ile etkileşimini bloke eden yeni bir antikoagulan sınıfıdır (Nisio, M.D., N. Egl. Med. 2005).



Şekil 4.1. Trombin inhibitörleri

Trombin pıhtılaşma prosesinin merkezidir: çözünür fibrinojeni fibrine dönüştürür, daha fazla trombin oluşumu için faktör 5, 7 ve 9'u aktive eder, pıhtılaşmaya yardımcı olan trombositleri uyarır. Pıhtılaşma adımlarını düzenleyen vücudun ürettiği doğal antikoagulanlar, *faktör yolu inhibitörü*, *protein C* ve *protein S* sistemi, *antitrombin*'dir.

Trombini inhibe eden ilaçlar trombinin hareketini üç şekilde bloke ederler: *aktif bölge* ve iki tane *ikincil bağlanma yeri*. Aktif bölgeye komşu olan *ikincil-yer 1* fibrin gibi substratların yerleştiği yerdir. *İkincil-yer 2* ise heparin-bağlayan kısımdır.

4.1. İkili-Bağlanan Direkt Trombin İnhibitörleri

Doğal hirüdin ve rekombinant hirüdinler (lepirudin ve desirudin) trombine tersinmez olarak bağlanır. Benzer şekilde sentetik bir hirüdin olan bivalirudin aktif bölge ve ikincil yer1' e bağlanır, bağlandıktan sonra trombin tarafından parçalanır ve böylece trombinin aktif-bölge işlevleri onarılır. Bu nedenle, hirüdinlerin tersine sadece trombinin inhibasyonu geçici oluşur.

İkili-bağlanan inhibitörler, doğal hirüdin, rekombinant hirüdinler (lepirudin ve desirudin) ve sentetik hirolog (bivalirudin) dir. Sentetik hirolog bivalirudin, insanfibrinopeptid A'nın bağlanma bölgesindeki dPhe-Pro-Arg sırasını taklit eder.

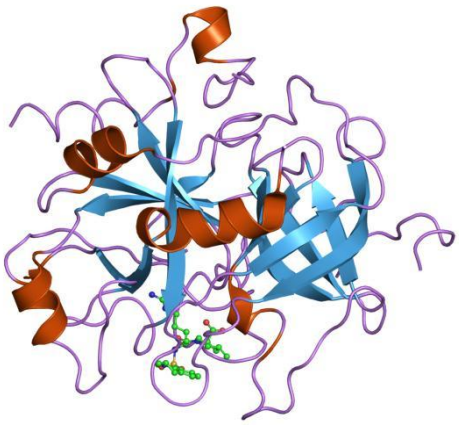
İlaçlar	Özellikleri (amino asit sırası, formulü, molekül ağırlığı)[1]	Onay tarihi
Lepirudin	LT* VVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGNKCILGSDGEKNQCV TGEGTPKPQSHNDGDFEEIPEEYLQ $C_{287}H_{446}N_{80}O_{111}S_6$ M.A=6985.47154 g/mol	1993
Desirudin*	LT* VVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGNKCILGSDGEKNQCV TGEGTPKPQSHNDGDFEEIPEEYLQ $C_{287}H_{440}N_{80}O_{110}S_6$ M.A=6963.4245 g/mol	2003
Bivalirudin	D-Phe-DPRPGGGGNGDPEEIPEEYL $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$ M.A= 2180.28532g/mol	1998

* Desirudin için LT mutasyonu [1] (a) (Schwienhorst vd.2006)

Tablo 4.1. İkili-bağlanan direkt trombin inhibitörleri: Hirüdin ve türevleri

Trombin yapısına iki aktif bölgesinden bağlanan inhibitörlerdir. Bunlar Hirüdin, lepirudin, desirudin gibi ilaçlardır. Bu ilaçların hiçbiri oral yolla alınamayacak kadar büyük yapılardır. Damar içine enjekte edilirler. Bunlar;

4.1.1. Hirudin



Şekil 4.2. Hirudin'in moleküler yapısı

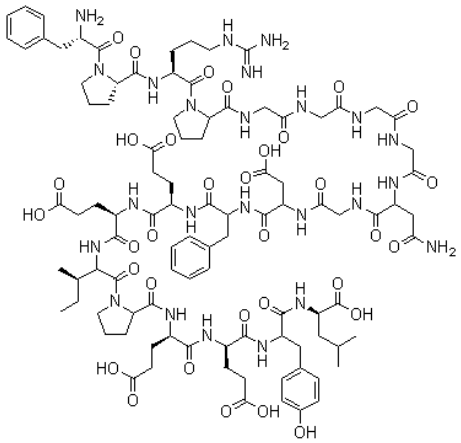
"Hirudo medicinalis" isimli bir çeşit sülükten doğal antikoagülan yapısınının rekombinant yani fonksiyonel değişimlerle elde edilmesiyle üretilen direk trombin inhibitörüdür. İlk kez John Berry Haycraft 1884 yılında kanın pıhtılaşması ile ilgili makalesinde bir sülükten tamamen saflaştıramasa da güçlü bir antikoagülan keşfetmişti.

Tıbbi sülüğün antikoagulan özelliği belirlendi ve hirüdin olarak adlandırıldı. Hirüdin, 1950'lere kadar tam olarak saflaştırılamamış, saf hirüdin türlerinin izolasyonu 1955 yılında Markwardt ve arkadaşları tarafından yapıldı ve primer yapısı belirlendi (Marwwardt F, Z. Physiol. Chem.1967)

Hirüdin geninin izolasyonu ve klonlanmasıyla büyük-skala rekombinant hirüdinlerin üretimi yapıldı. Doğal hirüdinlerin yapısında sülfatlanmış tirosin grubu olan 65-66 amino asit içerirken, rekombinant formlarında tirosin-63 deki sülfat grubu yoktur ve bu nedenle trombine daha az sıkı bağlanır.

Molekül formülü $C_{66}H_{93}N_{13}O_{25}$, moleküler ağırlığı ise 1468,52'dir. Bu aminoasitler N-terminalinden 3 disülfit bağıyla bağlıdır. Doğal yollarla çok miktarda elde etmek zor olduğu için rekombinant biyoteknolojik yöntemlerle elde edilmektedir. Avantajı trombine bağlanma sırasında antitrombin III kofaktörüne ihtiyaç duymaz.

4.1.2. Bivalirudin



D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu

Şekil 4.3. Bivalirudin'in moleküler yapısı

20 aminoasitlik bir molekül olup, kimyasal yapısı $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$ ve molekül ağırlığı 2180.29 'dur. Hirudin benzeri afinite ve özgüllüğünde olan kısımları yanında, aktif peptid dizileri de içeren çift fonksiyonlu antitrombin etkili bir peptiddir. Kanda bulunan diğer yapılara bağlanmaz sadece trombinle etkileşir. Ayrıca trombine bağlanma sırasında antitrombin III kofaktörüne ihtiyaç duymaz. Medicines Co (MDCO) şirketi tarafından Angiomax ismi ile üretilmiştir. Hastane ortamında kan inceltici olarak adlandırılan bir antikoagülandır. Henüz bivalirudin piyasada mevcut değildir. Yarılanma ömrü çok kısa olduğu için kullanım konusunda sorun yaratmaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda hastalarda stabil angina pektoris yani kalp spazmı gözlenmiştir.

4.1.3. Lepirudin

Şekil 4.4. Lepirudin'in moleküler yapısı

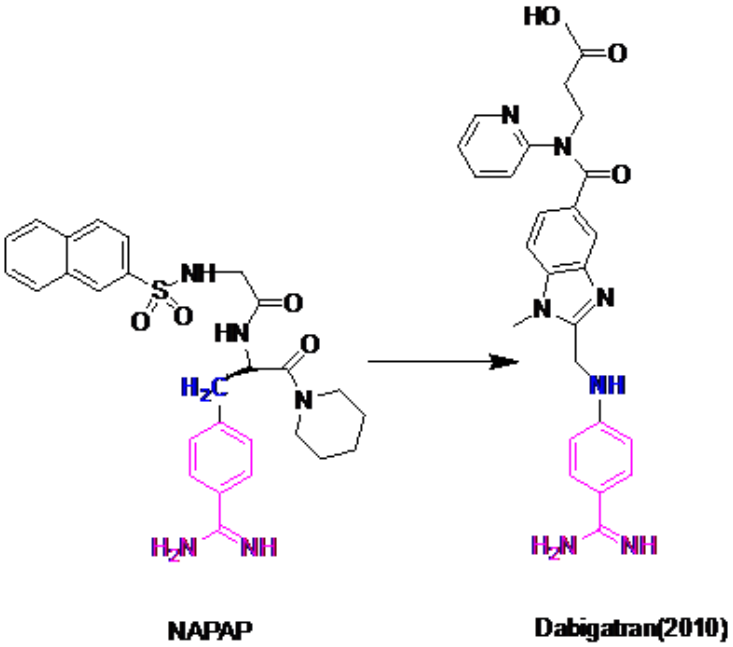
Lepirudin, Hirudin'in N-terminainin ucunda bulunan lösin yerine izolösin bulunan ve 63 numaralı aminoasit olan tirozinde sülfat grubu bulunmayan maya hücrelerinden elde edilen bir yapıdır. Formülü $C_{287}H_{440}N_{80}O_{110}S_6$, molekül ağırlığı 6963,43'tür. Berlex Labs firmasına ait Refludan markası ile piyasaya çıkmıştır. En çok gözlenen yan etkisi deride oluşan alerjik reaksiyonlardır.

4.2. Tekli-Bağlanan Direkt Trombin İnhibitörleri

Trombinin sadece aktif bölgesi ile etkileşen ilaçlar Argatroban ve dabigatran'dır. Oral yoldan alınan tek ilaç 2010 yılında onaylanan dabigatran'dır. Diğer ilaç ximelagatran ise 2006 yılında piyasadan geri çekilmiştir. Enjeksiyon yolu ile alınan Argatroban ise 2002 yılında onaylanmıştır.

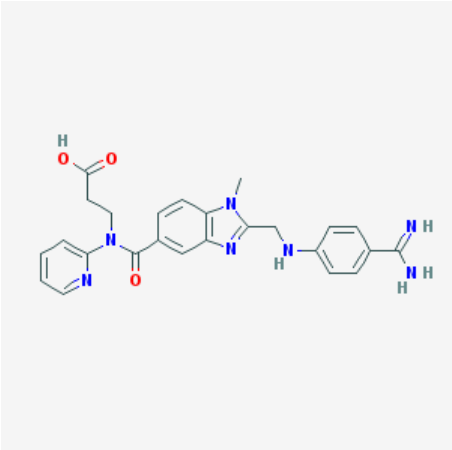
Bunlar ayrıca trombin-aracılı-trombositlerin aktivasyonunun azaltılmasıyla, antitrombosit etkiye de sahiptir. DTI'lar plazma proteine bağlanmadığı için bu maddeler damıtılmamış-heparin'den daha iyi sonuç verir ve düşük-molekül-ağırlıklı-heparinlerden daha etkilidir çünkü onlar fibrin-bağlı –trombini inhibe ederler.

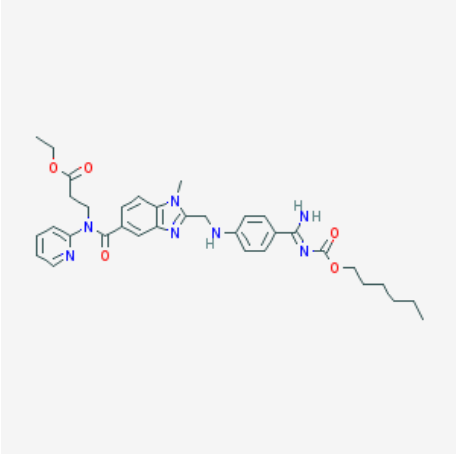
4.2.1. Dabigatran



Şekil 4.4. Dabigatran molekülünün yapısı trombin inhibitörü NAPAP yapısına benzer

Dabigatran molekülüne etil ester ve hekziloksikarbonil karbamid eklenmesiyle oral alınan bir öncü ilaç olan dabigatran eteksilat elde edilmiştir. Bu yapılar Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

(a) 

(b) 

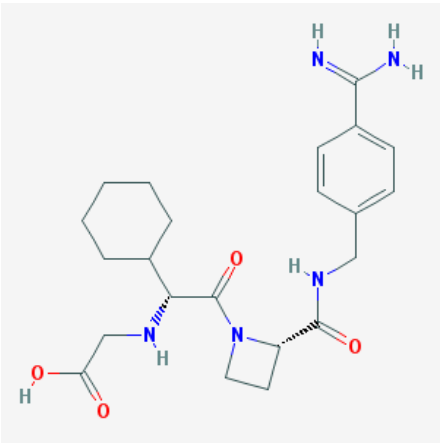
Şekil 4.5. (a) Dabigatran ve (b) Oral alınan Dabigatran etexilat'ın moleküler yapıları

Boehringer ingelheim firmasının Avustralya, Avrupa ve Amerika'da Pradaxa, Kanada'da Pradax ve Japonya'da Prazaxa marka isimleriyle üretilen ürünüdür.

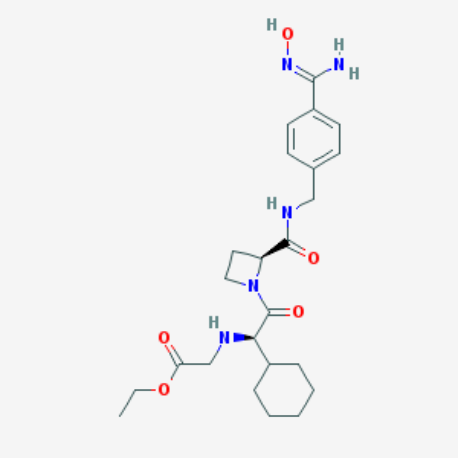
Kimyasal formülü $C_{34}H_{41}N_7O_5$, molekül ağırlığı ise 627.73'tür. Ximelagatran gibi oral yolla alınan öncü ilaç formu olan Dabigatran etexilate yapısı vücut içinde dabigatrana dönüşmektedir. 1960'lardan bu yana warfarin tromboembolik hastalığı olan hastaların tedavisi için düzenli kullanımda oral antikoagülan ilaç olmuştur. Rivaroxaban (Faktör 10 inhibitörü) ve dabigatran etexilate (Faktör 2a/trombin inhibitörü) - Elektif diz veya kalça protezi olan hastalarda venöz tromboz önlenmesi için Kasım 2008 yılında Therapeutic Goods Administration iki yeni oral antikoagülan ilaçlar onayladı.

Dabigatranın dezavantajı hava ile temasında bozunduğu için şişe kapağı açıldıktan sonra 4 ay içerisinde kullanılmalıdır. Bu durumundan dolayı ilaçları piyasadan çekilmiştir.

4.2.2. Ximelagatran ve Melagatran



(a)

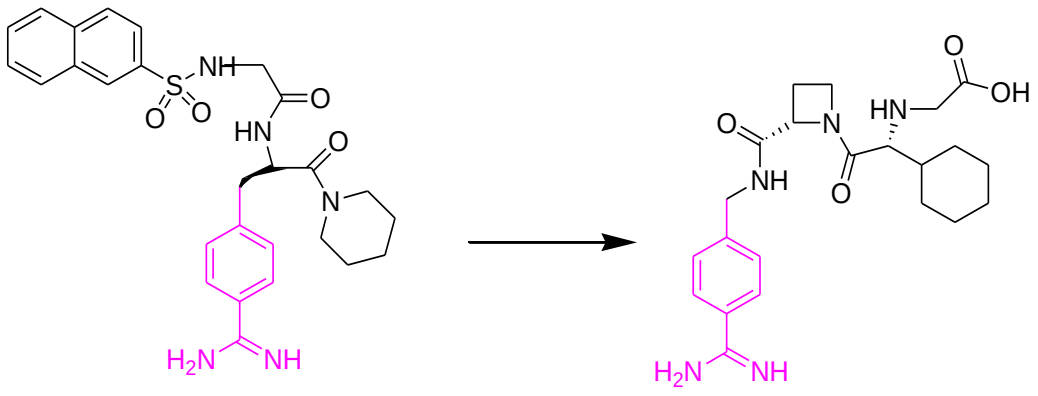


(b)

Şekil 4.6. (a) Öncü ilaç Melagatran ve (b) Ximelagatran 'ın moleküler yapıları

AstraZeneca şirketi tarafından Exanta ismi ile üretilen melagatran, molekül formülü $C_{24}H_{35}N_5O_5$ olan ve molekül ağırlığı 473.58 olan bir yapıdır. Tromboembolinin (toplardamarda kan pıhtılaşması) tedavi ve önlenmesinde alternatif bir seçenek olma potansiyeline sahiptir. (Gustafsson 2001).

Melagatran bileşiğinin çıkış yapısı NAPAP'tır. Şekil 4.7'de NAPAP ayrıca tek oral ilaç olan dabigatran içinde öncü bileşik olmuştur



NAPAP

Melagatran

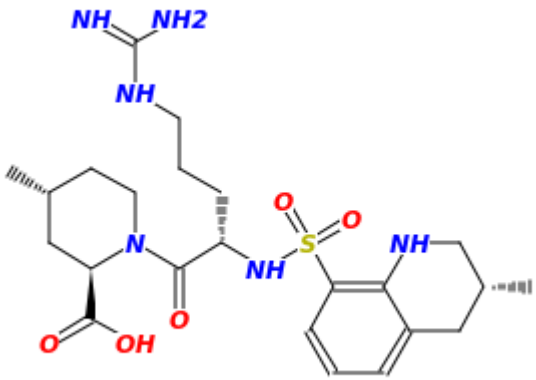
Şekil 4.7. NAPAP ve Melagatran bileşiklerinin yapıları

Ximelagatran; melagatran'ın biyolojik aktif formudur. Ximelagatran bir prodrug yani ön ilaçtır, yapısında bulunan etil ve hiddroksil grupları vücut içine girdiğinde hidrojenle yer değiştirerek melagatrana dönüşmektedir. Hızla absorbe edilebilmektedir. Ximelagatran direk trombin inhibitörlerinden ilk olarak oral yolla alınanıdır.

Klinik uygulamada melagatran tromboembolinin yani toplardamarda kan pıhtılaşmasının önlenmesi ve tedavisinde umut veren bir seçenek gibi görünse de etkinlik ve güvenirliliğin kesin olarak belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. (Bredberg, 1999).

Uzun süreli kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalarda seçilmiş hasta gruplarında ximelagatran ile görülen karaciğer enzim yüksekliği oranı yüksek kabul edilmektedir. Bu nedenle bazı Avrupa ülkeleri yalnızca kısa süreli kullanımını onaylamıştır. Food and Drug Administration (FDA) komitesi çalışmaları ve diğer veriler çerçevesinde hepatotoksisite isimli bir çeşit karaciğer rahatsızlığı ile ilgili şüpheleri dikkate alarak ximelagatranın riskinin yararından daha ön planda olduğu düşüncesiyle ilacın Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımına izin vermemiştir. Şubat 2006'da, üretici firma ilacın hepatotoksik yan etkileri nedeniyle ximelagatranı piyasadan geri çekmiş ve ilacın kullanımına ilişkin gelişmeleri durdurduğunu açıklamıştır.

4.2.3. Argatroban

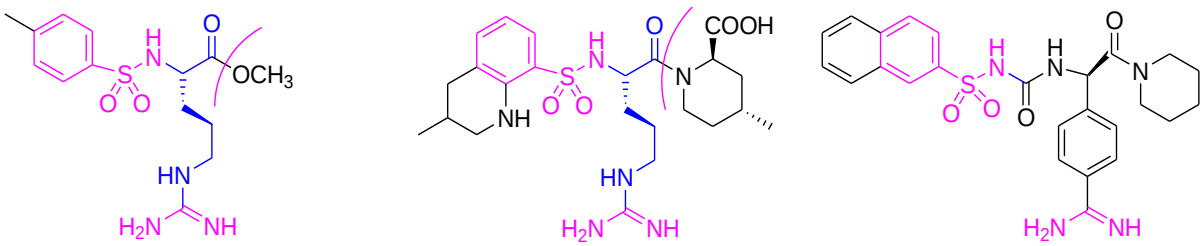


Şekil 4.8. Argatroban'ın moleküler yapısı

GlaxoSmithKline şirketi tarafından üretilen argatroban, tersinir, kovalent bağlanmayan, sentetik, aktif direk etkili L-arginin türevi bir antitrombindir. IUPAC ismi 1 - [5 - [(aminoiminomethyl)amino] - 1 - oxo - 2 - [[(1,2,3,4-tetrahydro-3-methyl -8- quinolinyl)sulfonyl]amino]pentyl]- 4 - methyl - 2 - piperidinecarboxylic acid, monohydrate'dır. Moleküler formülü ise $C_{23}H_{36}N_6O_5S$, moleküler ağırlığı ise 508,64'dür. Rasemik olarak bulunmaktadır.

2002 yılında FDA lisansını almış trombin inhibitörü (Di Nisio M, Middeldorp 2005), antikoagülan karaciğerde metabolize olduğundan takip edilebilir. (GSK 2009). Çok fazla bazik substitüentlerden dolayı oral aktif bir yapıya sahip değildir. Enjeksiyon yolu ile alınır. Amerika'da faz III çalışmaları yapılmaktadır. Pfizer argatroban molekülünü oral olarak kullanılması için modifiye etti ve faz II çalışmaları yapılıyor. Heparinin yol açtığı yan etkileri engellemek için de kullanılmaktadır.

Argatroban 2002 yılında onaylanmış ilk sentetik direkt trombin ilacıdır. Japonya'da Novastan adı altında satılmaktadır. Argatroban öncü bileşik TAME (N-α-tosilarginin metil ester) ve NAPAP'dan yola çıkarak sentezlenmiştir. Çünkü TAME grupları zayıf kalıyordu. 1984 yılında, Mitsubishi grubu sülfonil grubunu optimize etti, TAME deki ester grubu amide dönüştürüldü (Kikumoto R, Biochemistry 1984). Oral yoldan alınabilecek yeni bileşiklerin sentezi üzerine çalışmalar birçok ilaç firması tarafından yapılmaktadır.



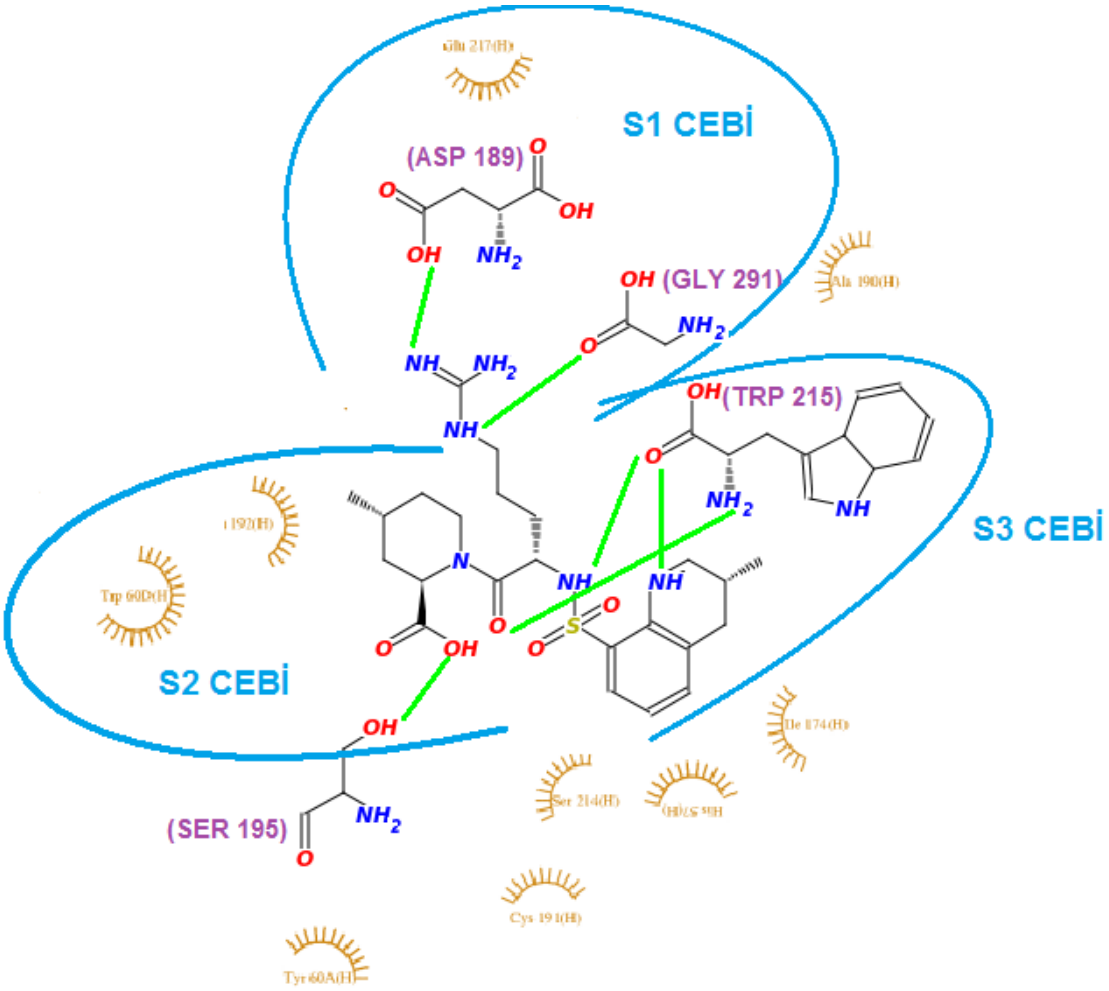
Şekil 4.9. Argatroban ve NAPAP moleküllerinin çıkış yapısı olan TAME ile fonksiyonel grupları arasındaki farklılıkları

Bunlara örnek verecek olursak, Behringwerke, NAPAP'ın toksisitesini düşürmek için karboksilik grup eklemelerine rağmen oral olarak zayıf bir yapı elde ettiler.

Biraz önce de bahsettiğim gibi Pfizer araştırmasında oral aktif hale getirmek için argatroban yapısından yola çıkarak tetrahidrokinolin grubu ve amidinofenilalanin grupları ekleyerek oral olarak bioaktif bir yapı elde ettiler şu an faz II çalışmaları sürüyor.

LG kimyasallar, yapılarını çok daha az bazik hale getirmek için benzamidrazon grubu ekleyerek oral yoldan aktif bir yapı elde ettiler. Şu an köpekler üzerinde yaptıkları çalışmalarda oral olarak alınan yapının yarılanma ömrü 182 dakika olduğu biliniyor. Novartis, yapının lipofilik özelliğini kullanmak için, siklohekzil, fenil, naftil, isopropil gruplar ile optimize ediyor. (Srivastava vd. 2005).

Şekil 4.10'da gösterilen Argatroban ligandının trombinin aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Yapı Şekil 4.10'da gösterilen argatroban yapısının aynısıdır. Yeşil ile gösterilen bağlar aktif bölge aminoasitleri ile argatroban ligandı arasındaki hidrojen bağdır. Argatroban yapısındaki azid grubu ASP 189 aminoasiti ile, aromatik gruba bağlı pridin grubu ise GLY 216 aminoasiti ile yine azid grubundaki bir azo bölümü GLY 219 ile etkileşimdedir. Aktif bölgede Argatroban ligandı 3 cep olarak gösterilmektedir. Bu cepler hakkında bilgiye "7.2.1. ZINC veri tabanı kullanılarak ligand veri setinin hazırlanması" konusunda tekrar değinilecektir.



Şekil 4.10. Argatroban yapısının trombin yapısının aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle etkileşimi

5. Argatroban Üzerine Yapılmış Doking Çalışmaları

Trombin üzerine literatürde bulunan doking çalışmaları aşağıda Tablo 5.1' de verilmiştir. Bu listelenen çalışmalar incelenen programların doğru doking yapabilme başarısını ölçmektedir. Tablo 5.1'de kullanılan pdb kodları, kullanılan doking programları ve bu programlar ile yapılan doking işlemlerinde izlenilen karşılaştırma yöntemleri verilmiştir.

1996 yılında Rarey vd. tarafından DOCK programı kullanılarak 11 adet pdb kodundan 2 tanesi trombine ait olan (1dwc, 1dwd) yapıların ligand ve resptör arasındaki rmsd değerleri karşılaştırılarak doking yapılmış. Bu çalışma sonucunda trombine ait olan ve çalışmamızda kullanılan 1dwc yapısında önemli bir noktaya

dikkat çekmişlerdir. Doğru sonuç elde edebilmek için reseptörde bulunan GLY219 aminoasitinin doking işleminde esnek amino asit olarak alınması gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Pdb kod	**Kullanılan docking programları**	**Kriterler**	**Referans**
100, (1) 1dwd	DOCK, FRED, FLEXX, QXP, SLIDE, SURFLEX, GOLD, GLIDE	Programlar arası doking süresi karşılaştırması	Kellenberger vd. 2004
51, (4) 1dwc, 1dwd, 1ppc, 1pph	DOCK 4.0	Ligand ile reseptör arasındaki mesafe (RMSD)	Ewin vd. 2001
19, (2) **1dwc, 1dwd**, 5tim, 1ldm, 2phh, 3ptb, 1ulb, 3tpl, 4tsl, 4dfr, 1stp, 6rsa, 1rnt, 1tmn, 4tln, 3cpa, 2ctc, 4phv, 121p	DOCK	2 A limitte en iyi pozun RMSD'si	Rarey vd. 1996
229, (2) 1dwc, 1dwd	ROSETTA	2 A limitte en iyi pozun RMSD'si	Meiler vd. 2006
20, (1) 1dwc	Autodock 4	Verimlilik endeksi (EI)	Hetenyi vd. 2007
26, (1) 1dwc	GOLD, Autodock 4, Glide v4.5	Verimlilik endeksi (EI)	Hetenyi C vd. 2009

Tablo 5.1. Literatürde bulunan trombin ile yapılmış doking çalışmaları

2001 yılında Ewing vd. tarafından DOCK 4.0 programı kullanılarak, trombin pdb kodları 1dwc, 1dwd, 1ppc ve 1pph kullanılarak doking işleminde reseptör yapının esnekliği değiştirilerek farklı stratejiler kullanarak en iyi sonuçları elde etmeye çalışmışlardır. Esneklikleri değiştirilen elde edilen 51 adet yapının doking

sonuçlarında 15 tanesi düşük RMSD değeri vermiştir. Bunların arasından 7 tanesi ise 2 A değer aralığı içerisinde bulunmuştur.

2004 yılında Kellenberger vd. tarafından yapılan sekiz farklı doking programının (DOCK, FRED, FLEXX, QXP, SLIDE, SURFLEX, GOLD, GLIDE) doking süresi bakımından karşılaştırılmasında ligand ile reseptör yapı olan trombinin birbiriyle yüksek afinitesi ve düşük RMSD değerleri sayesinde bu çalışmada kullanılan yapılardan biri olmuştur. Trombinin pdb kodu 1dwd olan argatroban bu çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda sekiz programdan üçü olan GOLD, GLIDE ve SURFLEX programlarının diğerlerine göre daha iyi doking sonuçları verdiği tespit edilmiştir.

2006 Yılında Meiler vd. tarafından yapılan çalışmada, 229 molekülün ROSETTA adlı doking programı kullanılarak rmsd değerlerine göre yapıların doking program karşılaştırması yapılmış, trombin için pdb kodları 1dwc ve 1dwd olan yapılar kullanılmıştır. Bu yapılardan bu programlarla %70'inde hesaplama tamamlanmış, 2A değerinin altında 14 sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlara bakılacak olursa gelecekte yapılan araştırmalarda bu programın da doking için kullanışlı bir program olacağını ileri sürmüştür.

2007 yılında Hetenyi vd. Autodock 4 programı kullanarak 20 adet pdb koduna ait yapı ile doking yapmıştır, bunlardan trombin için kullandığı yapı 1dwc'dir. Bu çalışmada verimlilik endeksi (EI) katsayısı ile sonuçlar karşılaştırılmış ve bu sonuçlardan Autodock programının daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

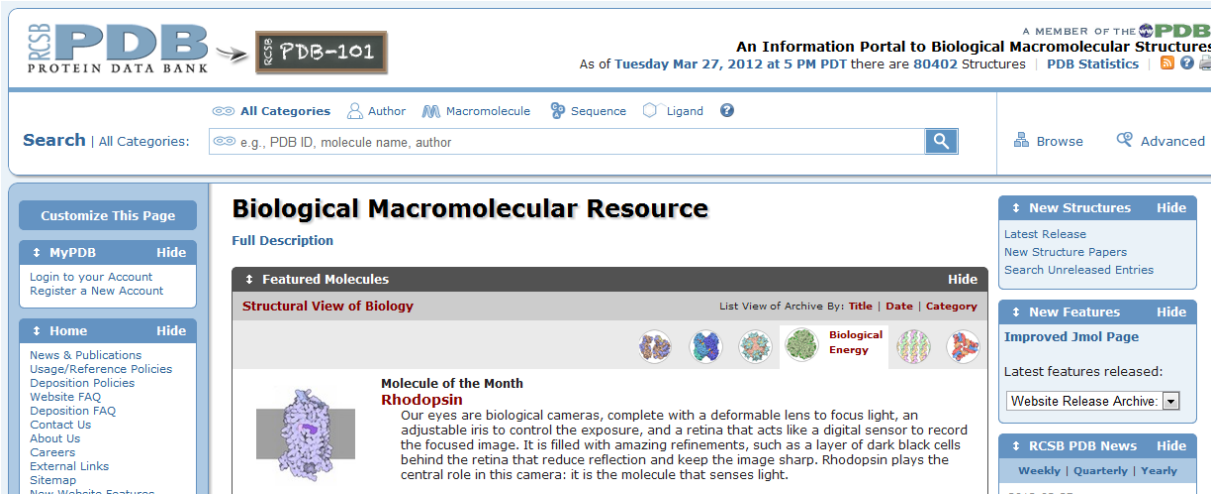
2009 yılında Garcia-Sosa vd. tarafından yapılan bir diğer çalışmada protein data bankasından aınan ve de FDA onayına sahip, içlerinde trombin yapısı 1dwc'nin de bulunduğu 26 ligand-reseptör yapılarını GOLD, Autodock 4, Glide v4.5 programları kullanılarak verimlilik endeksi (EI) katsayısı ile sonuçlar hesaplanmış. EI hesaplamasında baş faktör olarak Gibbs serbest enerji sonuçları kullanılmıştır. 1dwc için elde edilen sonuçlara baktığımızda Autodock ile GOLD programlarının daha düşük Gibbs serbest enerji değeri verdiği gözlemlenmiştir.

6. Yapı Temelli İlaç Tasarım Yöntemleri

6.1. Protein Veritabanı

RCSB protein veri tabanı (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Prtoein Databank), biyolojik makro moleküllerin 3 boyutlu yapı bilgilerini işleyen ve dağıtan arşiv niteliğinde çok önemli bir kaynaktır (Berman vd., 2000). Arşivinde bulundurduğu 3 boyutlu yapılardan bazıları X-Ray, bir kısmı da NMR yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Protein veritabanında bulunan bir X-Ray yapısının çözünürlüğü (resolution) o yapı için ne kadar veri biriktirildiğinin bir göstergesidir. X-Ray çözünürlüğü Ǻ birimi ile ifade edilmekte ve sayı değeri ile gösterilmektedir. Sayı değeri düşük ise X-Ray çözünürlüğü yüksek olmaktadır. (Lesk vd., 2001).



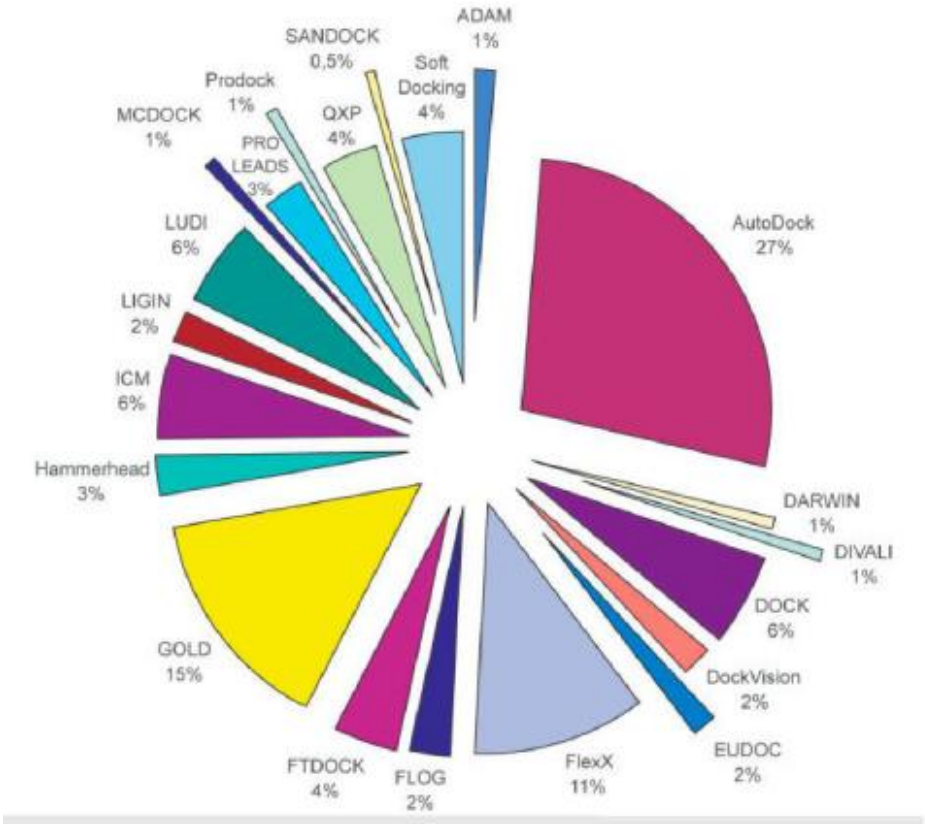
Şekil 6.1. Protein veritabanının web sayfası görünümü

Protein veritabanında yer alan yapılar bir dosya formatında saklanmaktadır. Bu dosya formatı, pdb dosya formatı olarak adlandırılmaktadır. Pdb dosyası, makromolekülün atomik koordinatlarını, birincil ve ikincil yapı bilgilerini, kristalografik yapı faktörlerini ve NMR yapısal bilgilerini içermektedir. Protein veritabanında bulunan bu yapılar, PDB kodu olarak adlandırılmaktadır. İlki rakam olmak üzere, 4 karakterli isimlerle simgelenmektedirler.

6.2. Moleküler Docking (Kenetlenme) Yöntemi

Doking işlemi tahmin edilen protein aktif bölgesine ligand yapısının bağlanma konformasyonunu ve bağlanma sırasındaki yönlenmenin tahminini içermektedir. Bir diğer deyişle Docking işlemi ligand ile protein arasındaki bağlanma sırasındaki etkileşimleri ve hareketleri inceleyen bir programdır. Kenetlenme işlemi için 3 boyutlu yapısı bilinen ligand ve proteinlere ihtiyaç duyulur. Kenetlenme programı kısaca 3 boyutlu yapılardan yola çıkarak ligandı proteinin hedeflenen bölgesine yerleştirir ve bu yerleşim esnasında meydana gelen enerji terimlerini sıralar.

Kenetlenme çalışmasının doğru yapısal modelleme ve aktivitenin doğru tahmini olmak üzere iki hedefi vardır. Günümüzde kenetlenme çalışmaları için birçok program mevcuttur. Bu programlar birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar bir kenetlenme pozu belirlemede kullandıkları algoritma ve skorlama fonksiyonlarının farklılığından ileri gelmektedir. Aşağıdaki şekil literatürde yer alan kenetlenme programlarını ve atıf sayılarını göstermektedir.



Şekil 6.2. Doking (kenetlenme) yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı (Sousa vd., 2006)

Kenetlenme programlarında ligand ve hedef protein yapılarının esnekliği konusu gerçekleştirilmesi zor ve önemli konulardır. Kenetlenme terminolojisinde esneklik, ele alınan kimyasal yapının tüm konformasyonlarını içeren hesaplamalar yapmak demektir.

Günümüzde kullanılan kenetlenme programlarının birçoğu ligand yapısını esnek olarak ele almaktadır. Protein yapısını ise esnek olmayan bir yapı olarak değerlendirmektedir. Bu farklılık proteinin tüm konformasyonlarının teker teker incelenmesinin ve bu konformasyonların her biri için kenetlenme hesaplamasının uzun zaman alıcı bir işlem olmasıdır.

6.3. Tarama algoritmaları

Doking işlemi için başlangıç ligandın hedeflenen molekül olan reseptörün bağlanma bölgesine algoritması ile pozlanmasıyla başlar. Burada poz, ligand molekülün aktif bölgedeki tahmin edilen konformasyonu ve yönlenmesi olarak alınmıştır. Bağlanma bölgesine en iyi uyacak olacak olan konformasyonun belirlenebilmesi için serbestlik derecelerinin belirlenmesi ve örneklenmesi yüksek doğrulukta yapılmalıdır. Bu işlem aynı zamanda yüzlerce bileşiğin tahmininde kullanılacak kadar da hızlı olmalıdır.

Doking programının algoritması ligandı hedeflenen bölgeye esnekliği ile hesaplanarak yerleştirilmesi dikkat edilerek hesaplamalar yapmaktır. Ligand yapının esnekliği doking algoritmalarında üç temel kategoride gerçekleştirilir:

- Sistematik metotlar (artan yapı, konformasyonel tarama)
- Rastgele veya olasılıklı metotlar (Monte Carlo, genetik algoritmalar)
- Simülasyon yöntemleri (moleküler dinamik, enerji optimizasyonu)

6.3.1. Sistematik Metodlar

Bu metotta ligand aktif bölgeye genellikle artan yapıda yerleştirilir. Bir molekülde tüm serbestlik derecelerini bulmaya çalışır. Artan yapıda yerleştirme, önceden bölümlerin ayrılmış bir ligandın bölümlerini hedef bölgeye doking yapılması ve bu bölümlerin hidrojen bağı ile bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Sistematik tarama için başka bir yöntem de önceden hazırlanmış konformasyon veri tabanlarının kullanılmasıdır.

Bu yaklaşımda, veri tabanında bulunan konformasyonlar önceden hesaplandığı için doking prosedürü ligand yapının esnemez bir şekilde hedef bölgeye yerleştirmesiyle indirgenmiş olur.

6.3.2. Rastgele Tarama

Ligandın yapısa konformasyonunda değişiklikler yapar ve değişiklikler sonucu önceden tanımlanmış bir olasılık fonksiyonuyla değerlendirilir. Sıklıkla kullanılan iki rastgele metot Monte Carlo tarama ve genetik algortimadır. Genetik algoritma AutoDock programı tarafından kullanılmaktadır.

6.3.3. Simülasyon Yöntemleri

İçerisinde moleküler dinamik en popüler simülasyon yaklaşımıdır. Ancak moleküler dinamik simülasyon metodu uygun bir simülasyon periyodunda yüksek enerji bariyerini çoğunlukla geçemediğinden ligandı enerji yüzeyinin yalnızca lokal minimumlarına yerleştirebilir. Moleküler dinamik metodunun aksine, enerji minimizasyonu sonucunda ancak lokal minimumlara ulaşılabildiğinden bu metot genelde Monte Carlo ile birlikte kullanılır (Trosset vd. 1998).

Protein esnekliği ligand esnekliğine göre daha az geliştirilmiş olmakla birlikte, en azından proteinin bir kısmını esnek olarak modellemede kullanılan çeşitli yaklaşımlar vardır (Carlson vd. 2000). Bu yöntemler de moleküler dinamik ve Monte Carlo simülasyonları ve rotamer veri tabanlarını kullanır. Amino asit yan zincirlerinin rotamer veri tabanlarını kullanma teorisinin altında yatan fikir proteini deneysel olarak elde edilmiş ve tercih edilen yan zincir konformasyonlarına göre modellemedir

(Leach,1994). Proteini esnek kabul etmede diğer bir yaklaşım da proteinin birden fazla farklı konformasyonunun ayrı ayrı esnemez halde doking hedefi olarak alınmasıdır (Kitchen vd, 2004).

6.3.4. Skorlama Fonksiyonları

Skorlama, bir ligandın pozlama ve sıralamasını içerir. Pozlama skor fonksiyonu ligand ile aktif bölge arasındaki uyumluluğu gösterir. Sıralama skor fonksiyonu ise bağlanma enerjileri tahmininin içerir. Hedef yapı ve ligand arasındaki etkileşimleri tahmin etmede algoritmalar skorlama fonksiyonlarından faydalanır. İlk geliştirilen skorlama fonksiyonları moleküllerin bağlanma modunu değerlendirirken yaklaşık şekil ve elektrostatik tamamlayıcıları içerir. Bu basit skorlama fonksiyonları, özellikle doking simülasyonunun ilk basamaklarında hala sıklıkla kullanılmaktadır.

Daha kompleks skorlama fonksiyonları daha detaylı elekstrostatik ve van der Waals etkileşimlerini içerir (Klebe vd., 2002).

3 farklı skorlama fonksiyonu;

- Kuvvet alanı temelli
- Ampirik
- Bilgi temelli

6.3.4.1. Kuvvet Alanı Temelli Skorama

Kuvvet alanlarında toplam enerjiyi ifade etmek için, hedef molekül-ligand etkileşimi ve ligand iç enerjisi gibi iki enerji kavramı kullanılır. Kuvvet alanı, sistemin enerjisin farklı moleküler mekanik terimlerinin toplamı şeklinde ifade eden bir matematiksel fonksiyondur. Ligand ve hedef yapı etkileşimleri genelde van der Waals ve elektrostatik enerji terimlerini içerir. Van der Waals enerji terimi Lennard Jones potansiyel fonksiyonuyla verilir. Kuvvet alanı skor fonksiyonları farklı kuvvet alanı

parametrelerine dayanır. Buna bir örnek olarak, AutoDock, AMBER kuvvet anını kullanır.

6.3.4.2. Ampirik skorlama

Ampirik skorlama fonksiyonları ilk olarak Böhm tarafından önerilmiştir (Böhm, 1994). Bağlanma enerjisi gibi deneysel parametreleri yeniden türetmek için tasarlanmıştır. Ampirik skorlama fonksiyonlarının temeli bağlanma enerjilerinin değerlendirilmesi için bireysel düzeltilmemiş terimlerin toplamından yaklaşım yapılabileceği fikrine dayanır. Bireysel terimler, deneysel olarak belirlenmiş bağlanma enerjileri ile X-ray yapısal bilgilerinin regresyon analizinden elde edilir.

6.3.4.3. Bilgi temelli skorlama

Bilgi temelli skorlamada atom tipi etkileşimler moleküler çevreye göre tanımlanır. Bu yüzden genel olarak, bilgi temelli skorlama fonksiyonları, ampirik metodlarla birlikte, modellemesi zor bağlanma etkilerini dolaylı yoldan anlamaya çalışır.

Tahmin edilen doking pozlarının doğru bir şekilde sıralanması doking meselesinin en önemli yönlerinden biridir. Bağlanma konformasyonları doğru tahmin edilmiş olsa bile, doğru pozlar yanlış olanlardan ayrılamadığı ve “gerçek” ligandlar tanımlanamadığı sürece hesaplama başarılı kabul edilemez. Bu sebeple güvenilir skorlama fonksiyonunun doking çalışmasında kullanılması temel önem taşır.

6.4. Kullanılan Doking Programları

Trombin üzerinde yaptığımız çalışmamızda Autodock 4.0 programı ve Autodock Vina programları kullanılmıştır.

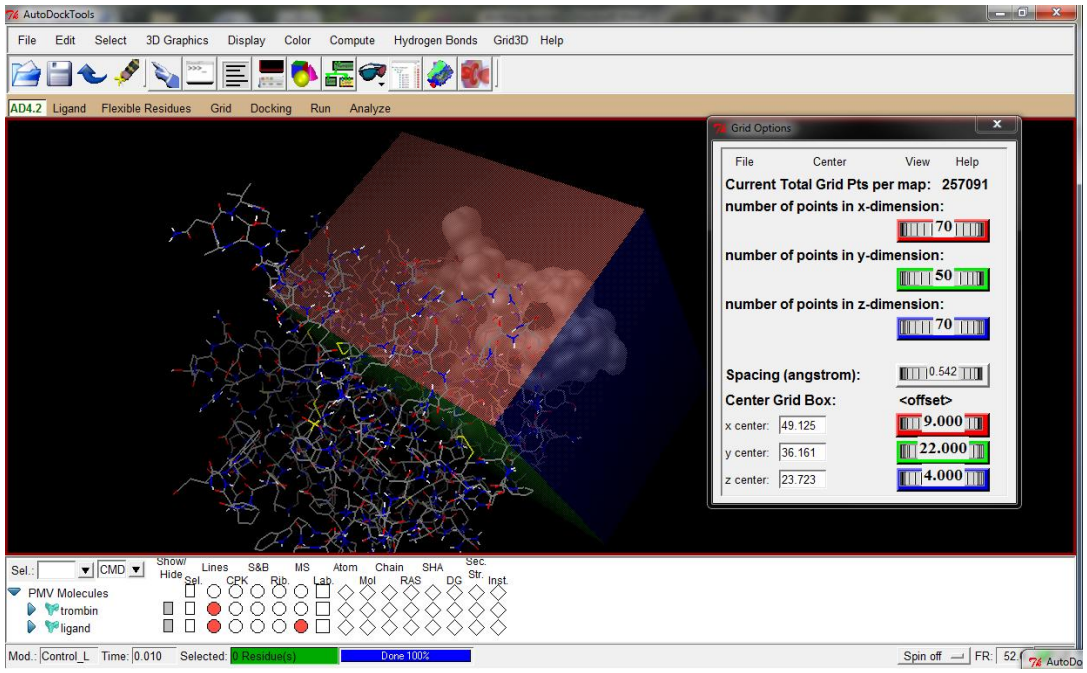
6.4.1. AutoDock 4.0 ve AutoDock Tools

Autodock 4 programı, 1998 yılında Morris ve ekibi tarafından geliştirilmiş bir kenetlenme programıdır (Morris vd., 1998). Atom temelli bir kenetlenme metodudur. AutoDock, algoritma olarak genetik bir algortima kullanmaktadır. Genetik algoritmalar molekülün yeni oluşturulan bir konformasyonu hakkındaki enerji ve geometri bilgilerini oluşturulmakta ve bir sonraki konformasyona aktararak en uygun konformasyonların elde etmektedir.

AutoDock ile kenetlenme hesaplamaları, AutoGrid hesaplaması gerektirmektedir. AutoGrid ile öncelikle hedef molekül karelere bölünmekte 3 boyutlu bir sisteme (grid) yerleştirilmektedir. Daha sonra hedef moleküldeki tüm atom tipleri için afinite haritaları oluşturulmaktadır. Bu harita bilgileriyle AutoDock programı artık hedef proteini tanıyacaktır.

AutoDock programı proteinle ligand arasındaki bağlanma enerjisini hesaplamada serbest enerji kuvvet alanı değeri olan Ki değerini kullanır. Bu kuvvet alanı Ki değerleri bilinen çok sayıda protein-inhibitör kompleksi ile parametize edilmiştir. Enerji değeri tahmini için hedef yapıların atomik afinite potansiyellerinin bir ön hesaplaması AutoGrid programı ile gerçekleştirilir. Bu hesaplamada, protein yapısı karelere bölünmüş 3 boyutlu bir sisteme (grid) yerleştirilir ve hedef moleküldeki her atom için bir afinite grid değeri hesaplanır.

AutoDockTools, AutoDock kullanıcılarına daha rahat kullanım sağlamak için grafik ara yüzü sunar. Bu sayede özellikle grid kutusu belirlenirken kullanıcının daha rahat bir şekilde hesaplanacak alanı belirlemesine yardımcı olur.



Şekil 6.3. Autodock Program arayüzünün çalışmalar sırasında alınmış bir örneği

6.4.2. AD Vina

AD Vina, 2010 yılında geliştirilmiş AutoDock'a göre iki kat daha hızlı kenetlenme yapabilen bir kenetlenme programıdır. AD Vina'nın algoritması birçok yerel ve global optimizasyon yaklaşımının bir kombinasyonudur (Trott vd., 2009). Program temel olarak Linux platformu için tasarlanmıştır ve programda grafiksel kullanıcı ara yüzü bulunmamaktadır. Bu nedenle kenetlenme prosedürünün parametrizasyonunu karmaşık hale gelmektedir.

Programı Windows ortamında çalıştırabilmek için Cygwin isimli bir simülatör program gerekmektedir. Bu program hakkındaki bilgiler "kullanılan yardımcı programlar" bölümünde verilmiştir.

Bunun yanı sıra, AD Vina ile kenetlenme hesaplaması için bir konfigurasyon dosyası hazırlanmalıdır. Bu konfigurasyon dosyası, ligand ve hedef molekül bilgileri ile birlikte, AutoDock hesaplaması için hazırlanan grid parametre dosyasından alınan

ve kenetlenme yapılacak alanı merkezin Kartezyen koordinatları ve kenetlenme bölgesinin genişliği şeklinde tanımlayan parametreler içermektedir.

```
receptor = protein.pdbqt

ligand = 1k22.pdbqt



center_x = 35.262

center_y = 19.958

center_z = -2.287



size_x = 65

size_y = 60

size_z = 60

num_modes = 10
```

Şekil 6.4. AD Vina arayüzünün çalışmalar sırasında alınmış bir örneği

6.5. Kullanılan Yardımcı Programlar

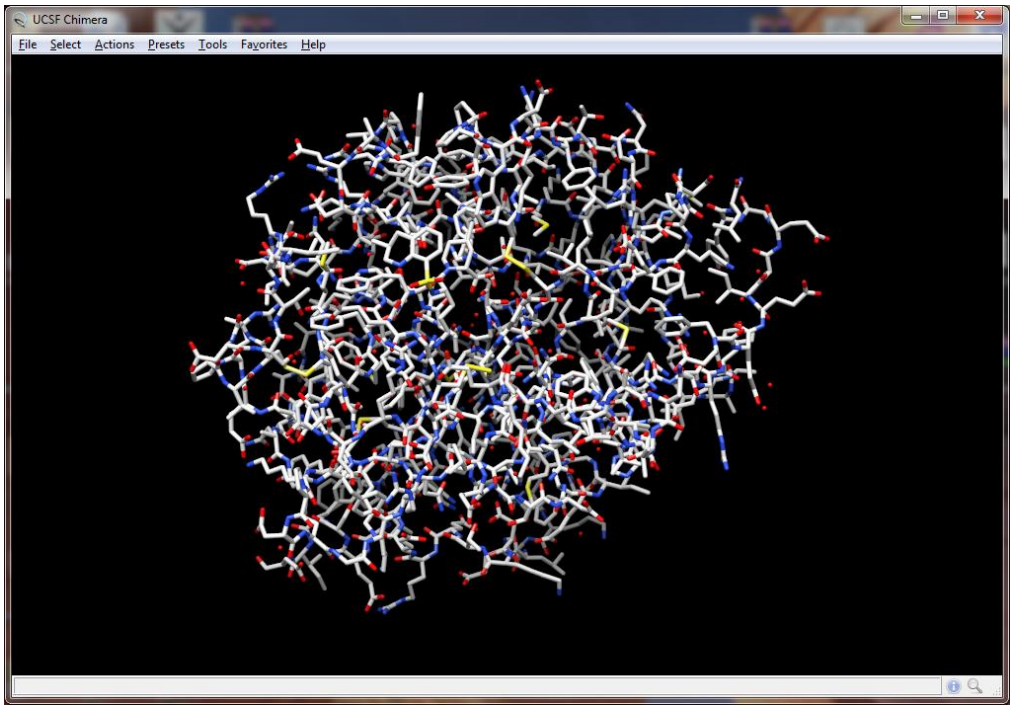
6.5.1. Cygwin

Microsoft Windows işletim sistemi üzerinde çalışan bir UNIX simülatörüdür ve ana amacı UNIX, Linux, BSD veya benzeri POSIX tabanlı sistemlerde yer alan yazılımların Windows işletim sisteminde çalışmasını sağlamaktır. Bash ise işletim sistemi için bir kabuk ya da başka bir deyişle komut dili yorumlayıcısıdır (Delorie, Noer, 1998).

Autodock programlarının her ikisi de Cygwin yazılım tabanı kullanılarak Linux harici kullanımı sağlanılmıştır. Cygwin komut sistemi, http://cygwin.com/install.html sitesinden alınmıştır.

6.5.2. Chimera

Chimera, “UCSF Computer Graphics Laboratory” tarafından yapılmış bir moleküler görüntüleme ve modelleme programıdır. Bu program görsel bilgi kaynağı ve biyohesaplama bilgilerini ulusal sağlık örgütü tarafından geliştirmektedir. Bu çalışmada protein veri bankasından elde edilen birleşik halde bulunan ligand ve protein yapılarını ayırmakta ve doking için hazırlamada kullanılmıştır.

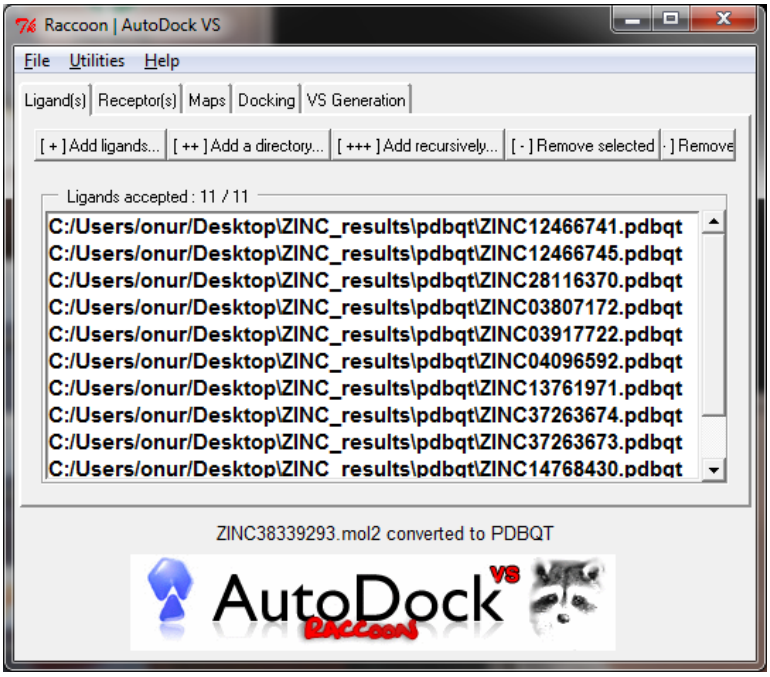


Şekil 6.5. chimera programında kullandığımız yapı olan trombinin bir görünümü

6.5.3. Raccoon

Autodock 4.0 programının ortak yazılım ile kullandığı ve yine Autodock programlarının yaratıcısı olan “The Scripps Research Institute” tarafından yapılmış

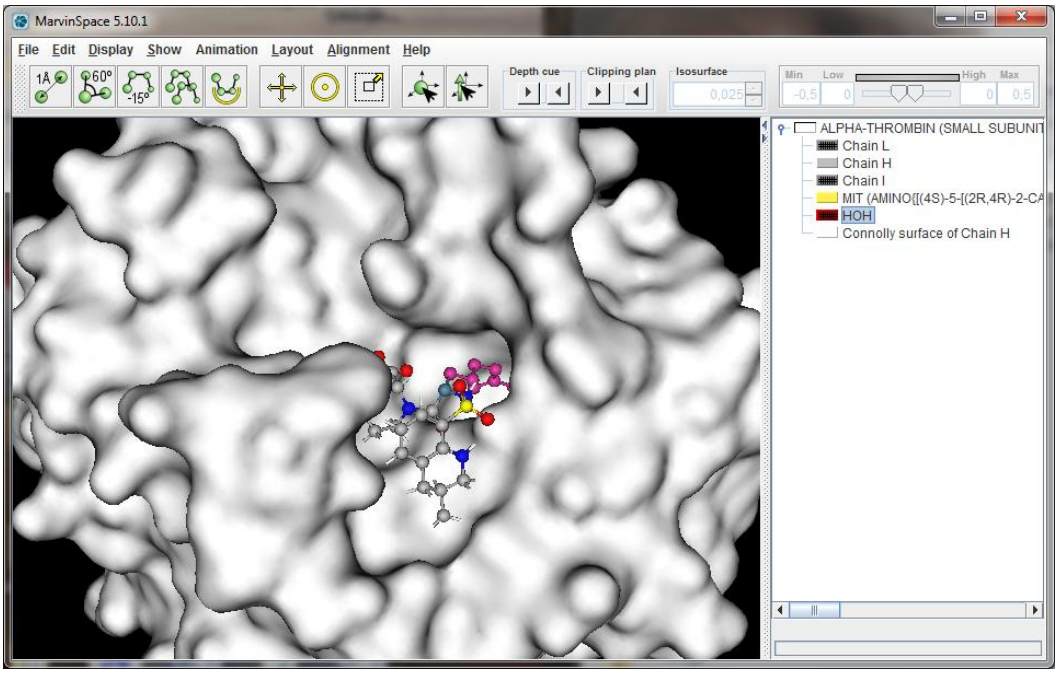
olan bir programdır. Başlıca görevi MOL2 formatında olan çoklu yapıları birbirinden ayırıp her birinin ayrı ayrı PDBQT formatında kayıt edip doking öncesi hazırlığını sağlamaktır. Bu çalışmada Raccoon programı ile sanal ligand tarama için ZINC veri tabanından elde ettiğimiz sonuçları birbirinden ayırıp her birinin ayrı ayrı doking prosedürü için hazırlanmasını sağlamaktır.



Şekil 6.6. çalışmamız sırasında kullanılan programdan bir görüntü

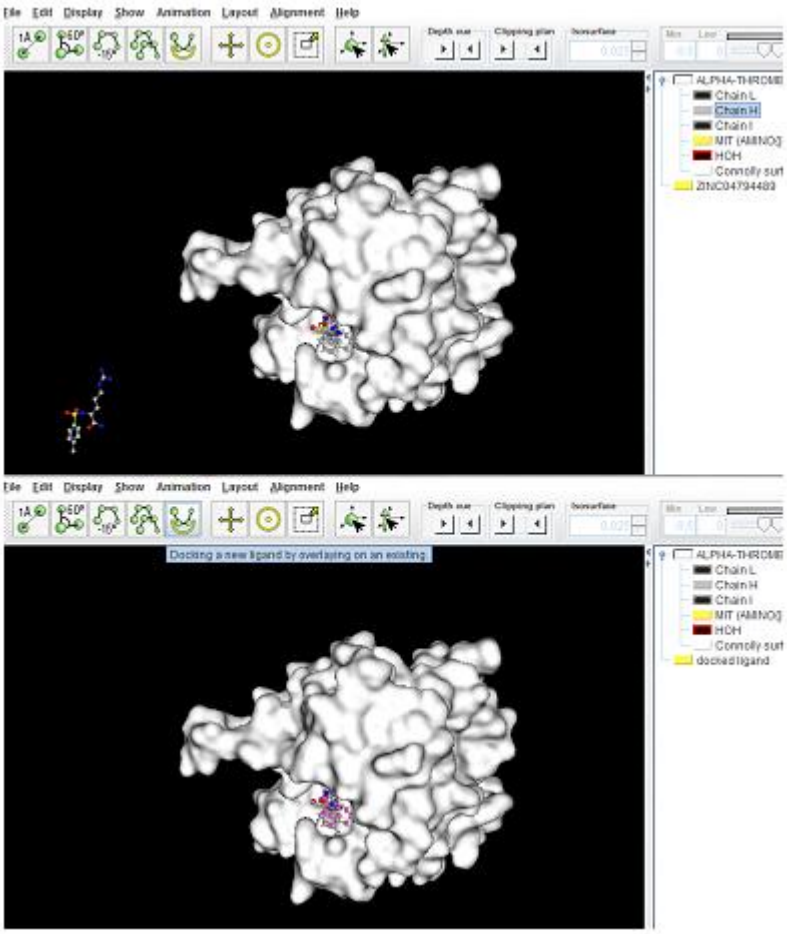
6.5.4. Marvin Suite

Marvin suite programı, içerisinde sketch, space ve view olmak üzere üç farklı program tabanı bulunduran bir sistemdir. Şekil 6.7'de Marvin Space programında 1dwc yapısında bulunan trombin yapısı ve bu yapının aktif bölgesinde yer alan MIT ligandı olan argatroban görülmektedir.

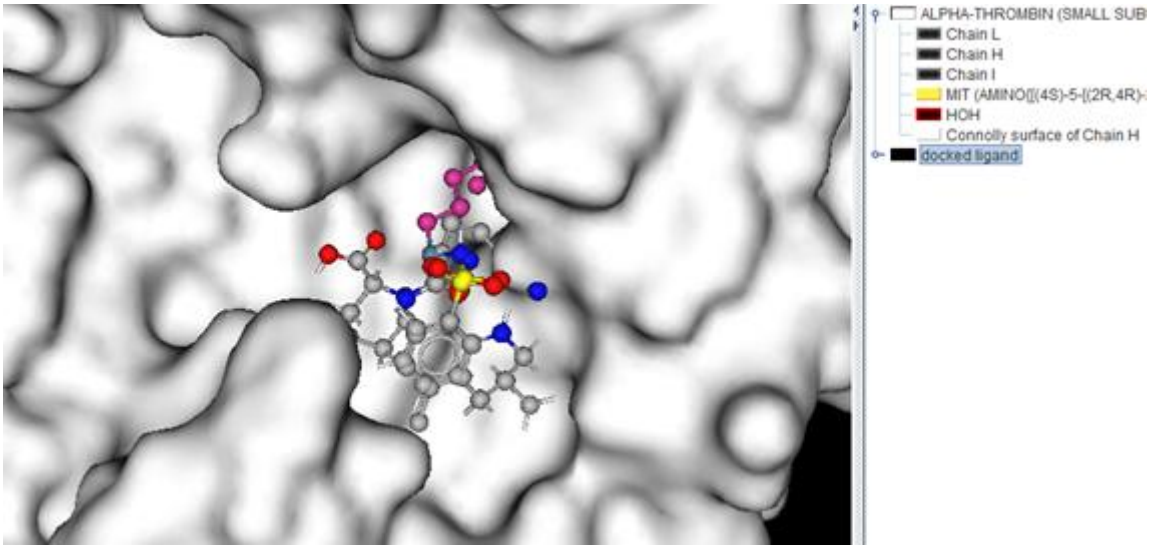


Şekil 6.7. 1dwc yapısının Marvin Space programında gösterimi

Görsel ligand taraması sonucu elde edilen yapılar ile reseptör yapı olan trombinin z koordinatı arasında farklılık gözlenmiştir. Bu program sayesinde ZINC veri tabanından elde ettiğimiz yapıları trombin aktif bölgesinde yer alan MIT yapısı yani argatrobanı refere alarak optimize olduğunda z koordinat farkı da ortadan kalkmıştır. Şekil 6.8 ’de aşamalar, Şekil 6.9 ‘da ise argatroban ile ZINC veri tabanından elde edilmiş örnek bir yapının üst üste getirilmiş hali gösterilmektedir.



Şekil 6.8. z koordinat farkını kapatmak için yapılan optimizasyon aşaması



Şekil 6.9. argatroban ve herhangi bir ZINC veri tabanından alınan yapının Marvin Space programı ile optimizasyon sonrası üst üste gelmiş gösterimi

7. MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışması 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Autodock ve Autodock Vina kullanarak görsel ligand taraması için uygun doking programının ve trombinin uygun kristal yapısının araştırılması
2. ZINC veri tabanı kullanılarak hazırlanan veri seti için sanal ligand taraması yapılarak olası öncü ilaç adaylarının belirlenmesi

7.1. Doking Metod Validasyonu

Doking metodunun validasyonu, protein veri bankasında bulunan 3 farklı trombin-ligand kompleksi ve 2 farklı doking programı (Autodock ve Autodock Vina) kullanılarak yapılmıştır. 2 farklı doking yöntemi ile 3 farklı protein için yeniden doking işlemi gerçekleştirilerek, deneysel x-ray konformasyonu ile hesaplanan konformasyon karşılaştırılmıştır.

Hesaplama sonuçlarının analizi, deneysel değer (x-ray) ile hesaplanan değer arasındaki sapmayı gösteren RMSD değeri karşılaştırılarak yapılmıştır. RMSD değeri ne kadar düşükse, seçilen yöntem o kadar iyi demektir.

7.1.1. Seçilen Trombin-Ligand kompleks yapıları

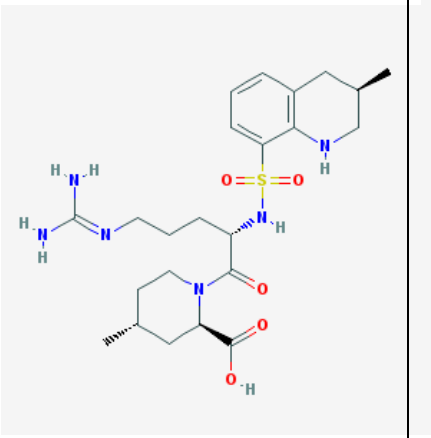
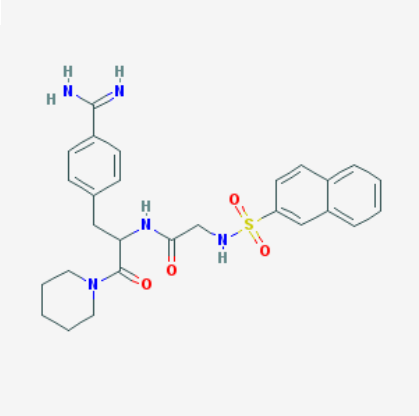
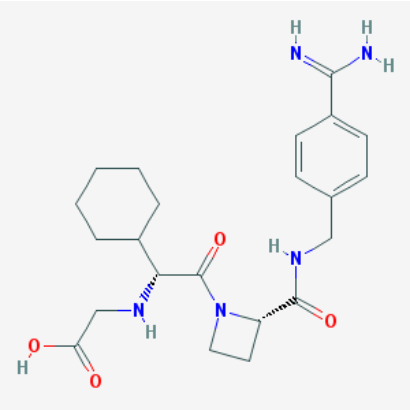
Metod validasyonu, protein data bankasından elde edilen 3 adet trombin-inhibitör kompleksi olan yapı kullanılarak yapılmıştır. Protein Data bankasında bulunan 86 trombin-inhibitör kompleks yapısı içinden bu 3 yapıyı belirlemedeki en önemli etkenler; öncelikle bu yapılara ait olan ligandların çözünürlüklerinin yüksek olması ve de literatür araştırması yapıldığında yeni ilaç yapıları elde etmek için en çok kullanılan yapılar olmasından kaynaklanmaktadır.

Seçilen X-ray yapılarıyla ilgili detaylar tablo 7.1 ’de ve inhibitör moleküllerinin yapıları şekil 7.1’de verilmiştir. Tablo 7.1.’de R; rezolüsyon, yani X-Ray çözünürlük değeri anlamına gelmektedir. Kullanılan yapılardan **NAPAP**; α-(2-Naftilsulfonilglisil)-

4(D,L)-amidino fenylalanin piperidid asetat ‘ın kısaltılmışıdır. Yapı bakımından **Argatroban**’a benzerlik göstermektedir.

Ligand ismi	**Pdb kodu**	**R(Å)**	**Aminoasit Sayısı**		**Ligand kodu**	**Keşif yılı**
			A	**B**		
Argatroban	1dwc	3.00	258	29	MIT	1991 (Banner vd. 1991)
Melagatran	1k22	1.93	251	29	429.51	2001 (Dullweber vd. 2001)
NAPAP	1dwd	3.00	258	29	521.63	1991 (Banner vd. 1991)

Tablo 7.1. Validasyon testi için seçilen trombin-ligand komplekslerinin pdb kodu ve özellikleri

Argatroban	NAPAP	Melagatran
		

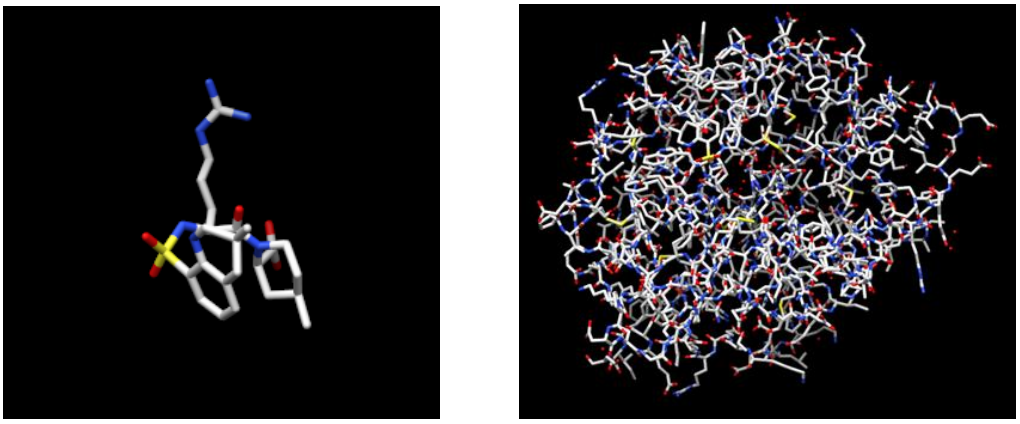
Şekil 7.1. Doking yönteminin validasyonunda kullanılacak olan inhibitörlerin yapıları

7.1.1.1. Trombin Hedef Yapılarının Hazırlanması

Trombin dosyalarını AutoDock ve Vina programlarına hazırlamak için öncelikle kristal suları silinen hedef yapılar pdb2pqr sağlayıcısından (Baker vd., 2007) yararlanılarak .**pqr** formatına dönüştürülmüştür. Bu format hedef molekül için girilen pH değerine göre (burada fizyolojik pH olan 7.4) uygun torsiyon açılarını ve protonlanma basmaklarını içerir. Daha sonrasında yine AutoDock Tools ile **.pqr** dosyaları **.pdb** formatına dönüştürülmüş, bu dönüşüm esnasında hedef yapılar için AutoDock ve Vina doking'e uygun AD4 atom tipleri ve Kollman yükleri eklenmiştir

Doking çalışmasına başlamadan önce hedef yapı ile ligandın birbirinden ayrılması için UCSF Chimera programı ile her yapı için ayrı ayrı ligand ve hedef yapı olan trombin molekülü birbirinden ayrılmış ve her biri tekrar "**.pdb**" formatında kaydedilmiştir.

Şekil 7.2 'de argatroban yapısı olan 1dwc için ligand ve trombin yapılarının ayrılmış hali gösterilmiştir.



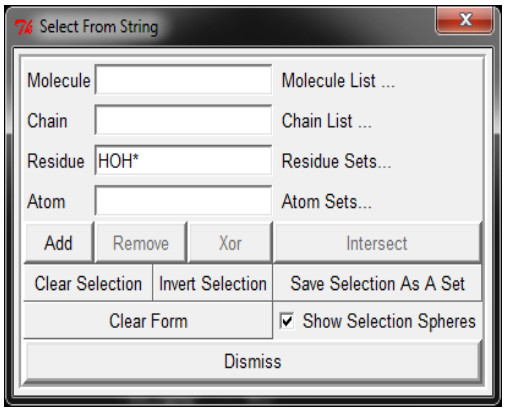
Şekil 7.2. Chimera ile ayrılan ligand(argatroban) ve trombin yapıları(pdb kod: 1dwc)

7.1.1.2. Ligand Yapılarının Hazırlanması

Chimera programı ile ayrılan ligand yapıları sırasıyla doking yapılacak olan ligand girdi dosyaları Chimera programında bulunan "DockPrep" bölümünde hidrojenler eklenerek ve yapılar optimize edilerek; ANTECHAMBER AM1-BCC

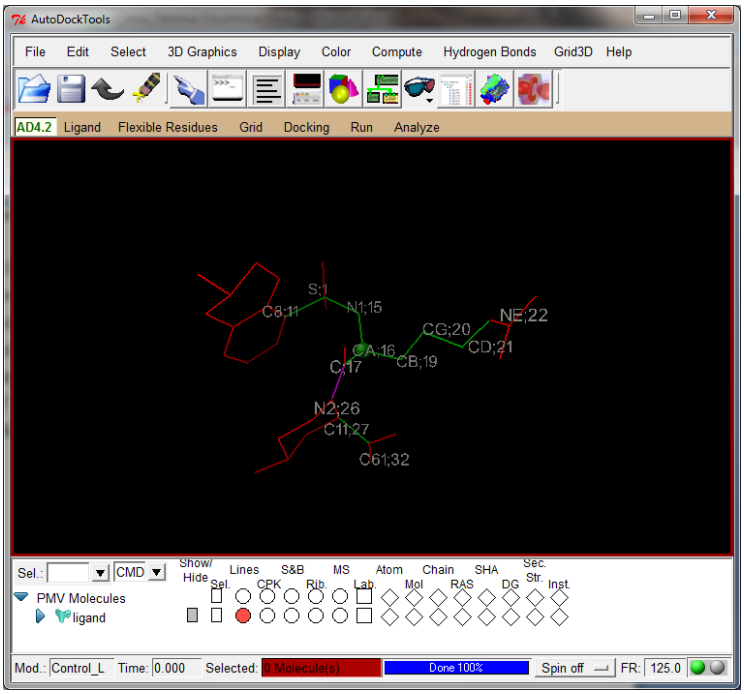
metodu (Wang vd., 2006) ile ligand yapıları üzerindeki kısmi (partial) yükler belirlenmiştir.

Chimera programı ile ayrılan yapılardan ligandlar AutoDock ve Vina doking için girdi dosyaları AutoDock'un grafiksel kullanıcı ara yüzü olan AutoDockTools (ADT) kullanılarak etrafında bulunan su molekülleri uzaklaştırılır. Bunu yapmak için ADT programında "select from string" bölümünden kalıntı uzaklaştırma bölümünden su molekülü için HOH* kodu yazılır, seçilen tüm su molekülleri atılır. Su molekülleri uzaklaştırıldıktan sonra eksik olan Hidrojen atomları da yine ADT programı ile eklenir.



Şekil 7.3. su molekülleri seçimi

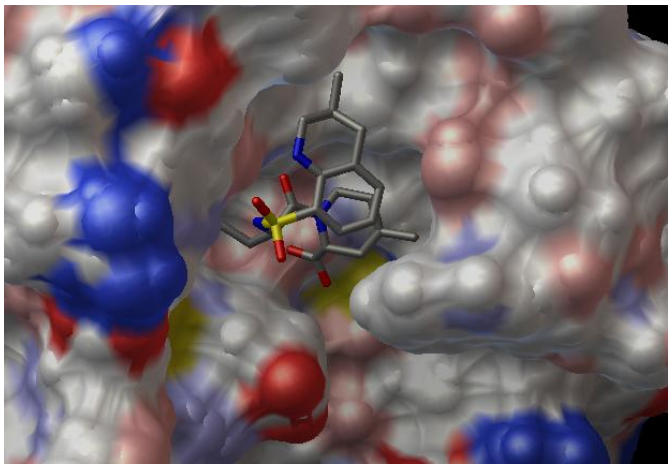
Ligand hazırlıkları için ADT ile torsiyon kökleri ve ligand moleküldeki torsiyon sayısı belirlenmiştir. Daha sonrasında ligand yapılarına AutoDock ve Vina doking girdi dosyalarının gerektirdiği gibi AD4 atom tipleri ve Kollman yükleri (Kollman, Singh, 1984) tanımlanmıştır. Elde edilen ligand molekülleri **".pdbqt"** formatında kaydedilmiş ve böylece AutoDock4 ve AutoDock Vina için ligand hazırlık prosedürü tamamlanmıştır.



Şekil 7.4. Torsiyon kökü ve torsiyon sayısının ADT üzerinde gösterimi, bu belirtilen torsiyon kökü doking boyunca sabit tutulacaktır.

7.1.2. Tekli Doking Hesaplamaları

Doking hazırlığı için öncelikle trombin.pdqt adı ile kaydetmiş olduğumuz yapımız ADT programında seçilir. Ardından ligand yapılarından birisi olan “argatroban.pdqt” adı ile kaydettiğimiz ligand çağırılır.

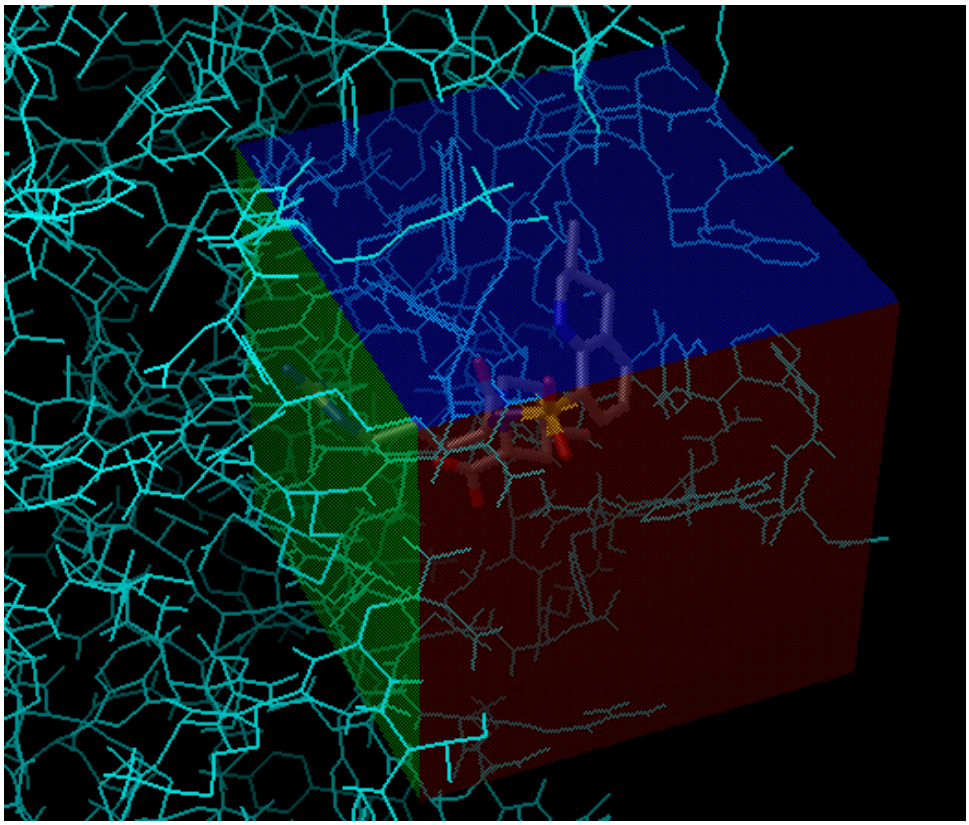


Şekil 7.5. 1dwc referans ligand ve onunla örtüşen 7 numaralı doking sonucunun ve Trombin molekülünün bir arada gösterimi

Bu iki yapı bir arada açıldığında doking sırasında aktif bölge ve ligandın hesaplamaları sanal plazma ortamında yapması için oluşturulmuş olan grid kutusu adı verilen kutu açılır. Bu kutunun koordinatları ligandı ve trombinin aktif bölgesini bir arada tutacak biçimde belirlenir. Kutu koordinatlarını belirlemenin amacı doking hesaplamasının bu kutu içerisinde bulunan yapılar arasındaki etkileşimlere göre bakılarak yapılmasından kaynaklanmaktadır.

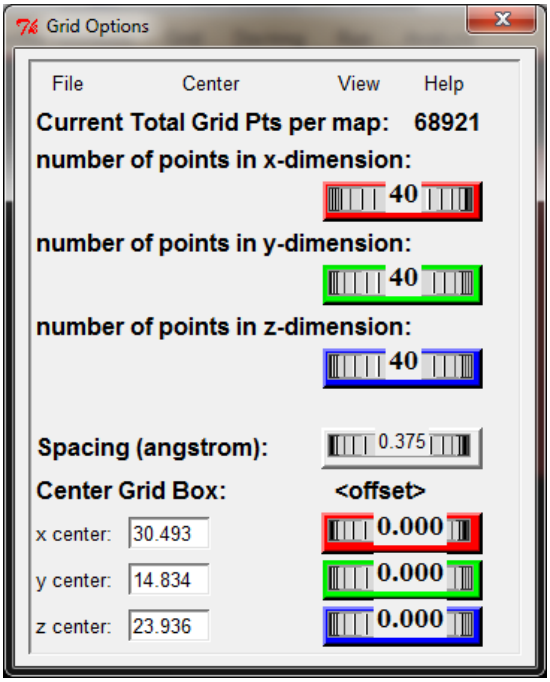
Bu çalışmada belirlenen grid kutusu değerleri şekil 7.7'de verilmiştir. Doking bölgesini tanımlamak için hedef moleküller üzerinde grid kutusunda nokta sayısı 40 40 40 (x, y ve z Kartezyen koordinatlarında), bu noktalar arasındaki boşluklar (grid aralama) 0.375 Å olarak belirlenmiştir.

Bu değerlere göre grid kutusu protein ile ligand arasında karakteristik bağlanma olasılıklarının hesaplandığı bölgedir. Bu bölgede en düşük enerji en yüksek afinite olan bağlanmalar gözlemlenecektir.



Şekil 7.6. üç boyutlu Grid kutusunun gösterimi

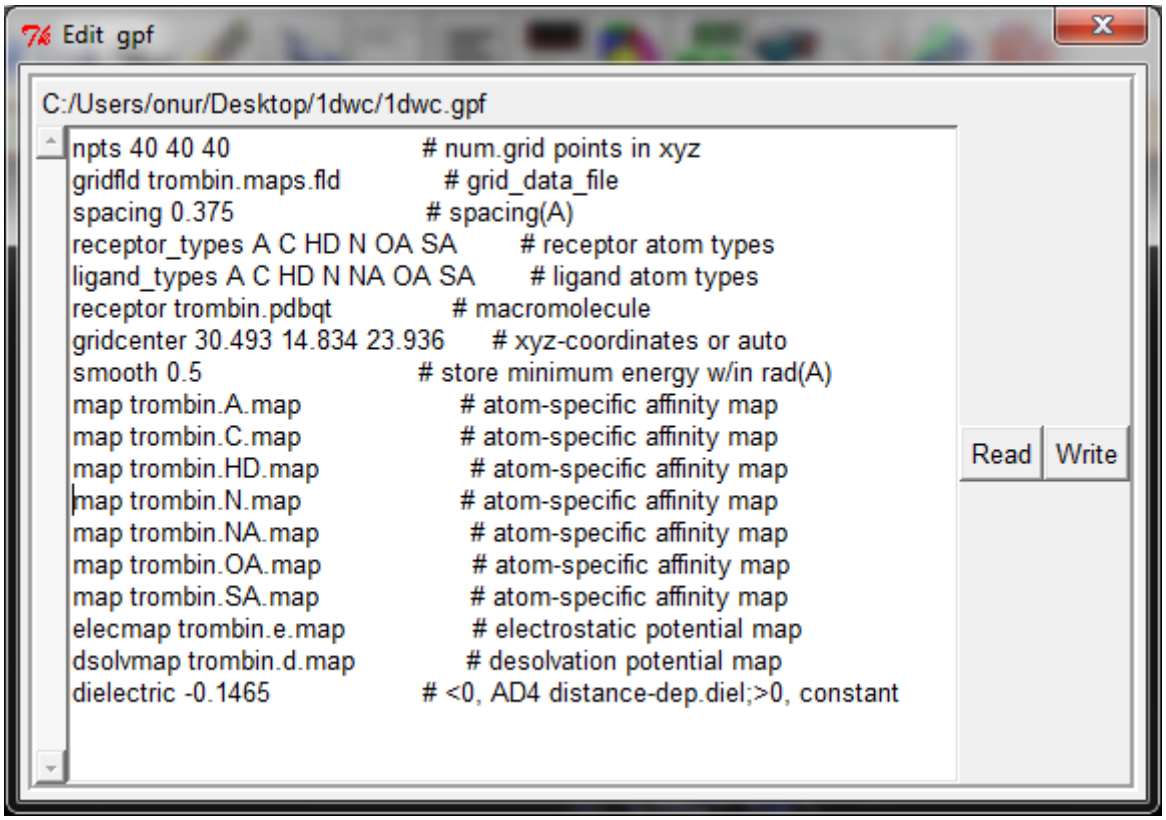
Grid kutusu her yapı için referans molekül üzerine hedeflenmiştir. Grid parametre dosyaları **“.gpf”** formatında kaydedilmiştir. Tüm hedef moleküller için aynı grid parametreleri kullanılmıştır.



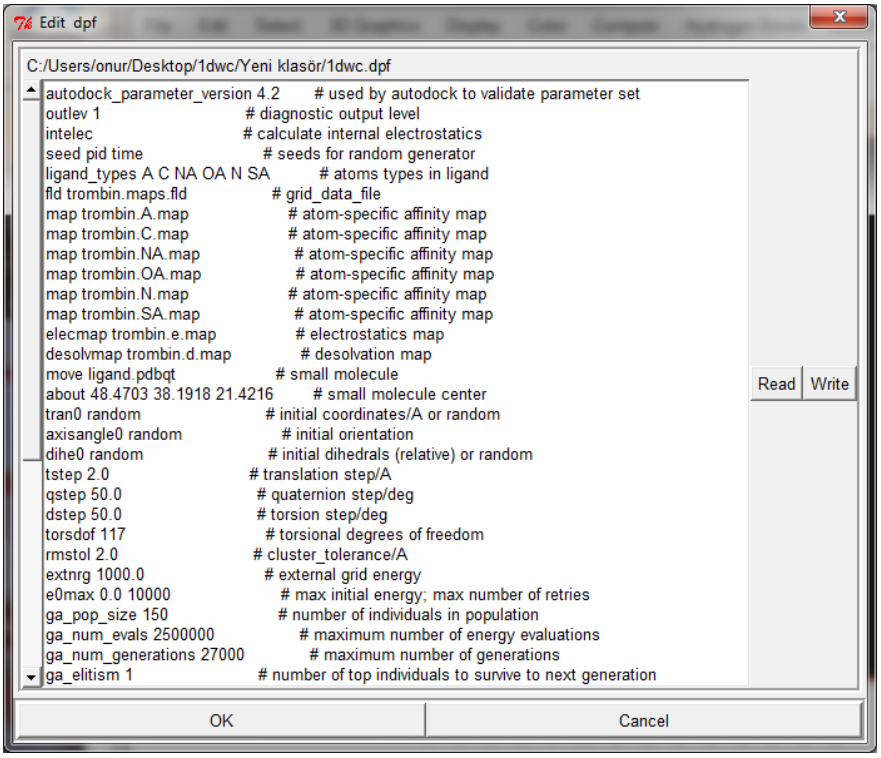
Şekil 7.7. üç boyutlu grid kutusunun koordinatları

AutoGrid tarafından oluşturulan hedef yapıdaki her atoma özel afinite haritaları (grid haritaları) AutoDock doking için doking parametre dosyasında girdi olarak kullanılmıştır. AutoDock doking için gerekli diğer tüm dosyalar gibi doking parametre dosyası da “.dpf” formatında AutoDockTools kullanılarak hazırlanmıştır.

Doking parametre dosyası gerçekleştirilecek doking çalışmasıyla ilgili tüm detayları içeren bir dosyadır. Kullanılacak doking algortiması ve ligand ve hedef moleküller gibi birçok bilgi bu dosyada bulunur. Şekil 7.8’de tekli doking için kullanılan yapılardan birisi olan 1dwc için hazırlanmış grid parametreleri bulunmaktadır. AutoDock ile yapılan doking çalışmalarının tümünde grid kutusu ve dpf parametreleri sabit tutulmuştur. Aynı zamanda her molekül için kendi dpf’ inden elde edilen doking merkezi koordinatları ve grid kutusu büyüklük değerleri Vina konfigürasyon dosyaları için girdi olarak kullanılmıştır.



Şekil 7.8. 1dwc için hazırlanmış gpf örneği



Şekil 7.9. 1dwc için hazırlanmış dpf örneği

7.1.2.1. Autodock ile Docking Hesaplamaları

Autodock ile doking için önceden .pdbqt formatı ile kaydedilen ligandlar ve trombin yapısı Autodock arayüzü olan Autodock Tools programı ile açılır ve buradan grid için hazırlanmış olan .gpf formatındaki grid parametre bilgilerini içeren dosya aracılığı ile doking için kullanılacak grid hesaplaması yapılır. Bu hesaplama sonucunda elde edilen veriler doking hesaplamasının temelini oluşturan .dpf formatındaki dosya ile doking aşamasına geçilir. Doking aşamasının başlaması için doking sırasında kullanılacak algoritma seçimidir. Tekli doking karşılaştırması için Autodock programında genetik algoritma seçilmiştir.

Genetik algoritma, doking aşamasında ligand ve trombin yapısının doğal ortamını taklit etmesini sağlayan ve bu ortamın içerisinde yapıları gerçek ortamında da birbirleriyle oluşturacakları etkileşimleri belirleyen algoritmadır. Şekil 7.10'da 1dwc yapısı ve trombin yapısının doking aşaması öncesinde kullanılan genetik algoritma değerleri gösterilmektedir.

Tüm doking parametreleri girildikten sonra AutoDock doking hesaplamasına başlanmıştır. Eğer doking ve grid hesaplamaları Autodock Tools formatında başlatılamıyor ise Cygwin komut dosyası ile bu hesaplamalar yapılır. Grid hesaplaması (AutoGrid) için;

$ autogrid4 –p grid.gpf –l grid.glg &

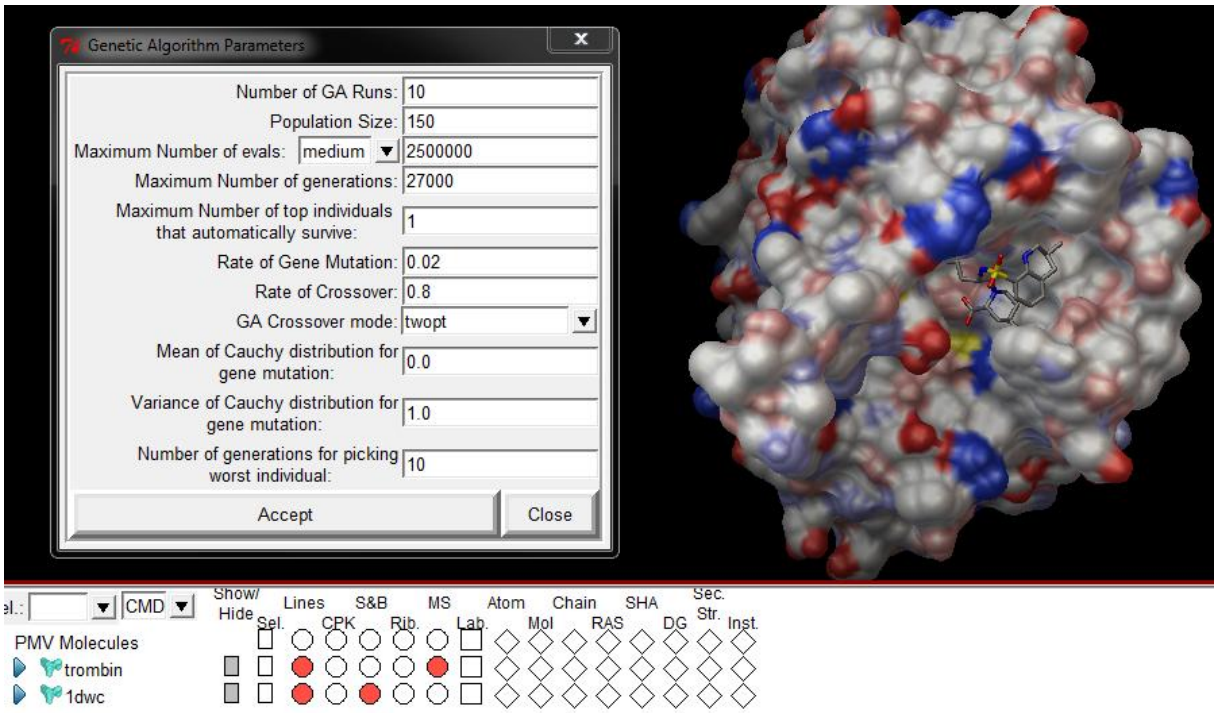
Eğer Autogrid aşamasını adım adım izlemek için Autogrid devam ederken;

$ tail –f grid.glg

Komutunu yazıldığında aşamalar görülmüş olunur. Doking hesaplamasını Cygwin üzerinden yapmak için ise;

$ autodock4 –p dock.dpf –l dock.dlg &

Kodunu kullanmaktadır. (Huey R. Vd. 2008). AutoDock doking için doking parametreleri veri setindeki tüm hedef yapılar ve ligandlar için sabit tutulmuştur.

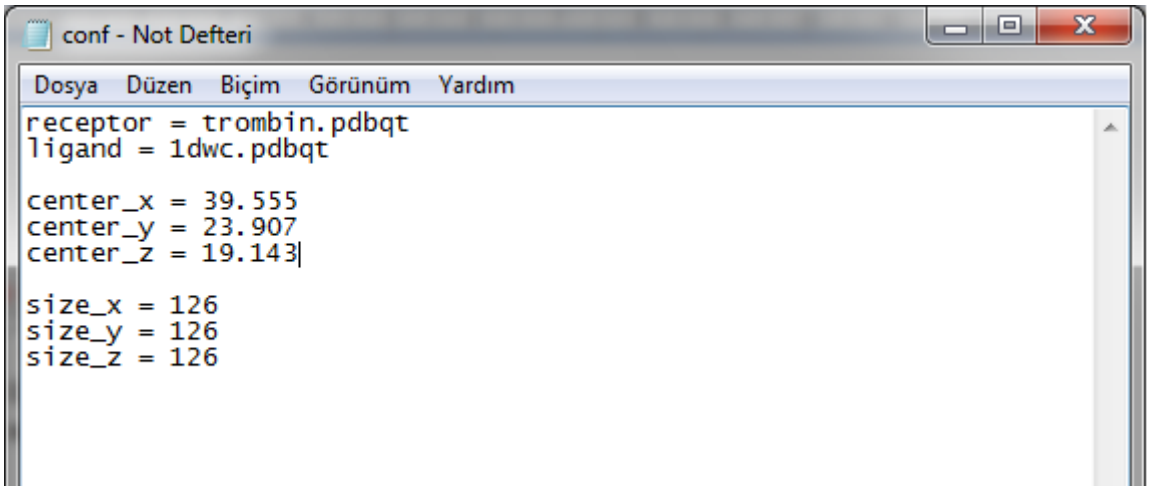


Şekil 7.10. 1dwc yapısı için doking aşamasında kullanılan genetik algoritma değerleri

7.1.2.2. Autodock Vina ile Doking Hesaplamaları

Autodock Vina ile doking hazırlık aşaması Autodock programıyla benzerlik göstermektedir. Autodock Tools üzerinde hazırlanmış olan ligand ve trombinin **.pdbqt** formatındaki halleri ve Autodock ile karşılaştırmak için grid haritasında alınan değerler her yapı için kendi içlerinde aynı tutulmuştur.

Grid haritasından elde edilen kartezyen koordinatları doking için hazırlanan ve .txt formatında bulunan **"conf"** adında, içerisinde doking işlemine girecek ligand ve makro molekülün dosya adı ve formatının yazıldığı, grid harita Kartezyen koordinatlarını ve grid kutusunun boyut değerlerinin bulunduğu dosya vina hesaplamaları için tek girdi dosyasıdır. Bu dosyanın 1dwc doking aşamasında hazırlanan örneği Şekil 7.11' de bulunmaktadır.



Şekil 7.11. 1dwc ligandının doking aşaması için hazırlanılan konfigürasyon dosyasından bir görünüm

Autodock Vina ile doking aşamasında, Autodock programında bulunan Autodock Tools gibi bir ara yüz bulunmadığı için hesaplamalar “kullanılan yardımcı programlar” konu başlığında da değinilmiş olan Cygwin programı ile gerçekleşmiştir.

AutoDock’da olduğu gibi Vina doking için de tüm hedef moleküller esnemez kabul edilmiş, doking parametreleri veri setindeki tüm hedef yapılar ve ligandlar için sabit tutulmuştur. Autodock Vina doking aşamasının Cygwin üzerinden hesaplaması Şekil 7.13’te gösterilmiştir.

Doking aşaması başlamadan önce vina programının çalışmasını sağlayan The Scripps Research Institute tarafından hazırlanmış olan vina.exe dosyası Cygwin üzerinden çağırılır bunu yapmak için önce doking aşamasında kullanılacak olan conf.txt dosyasının bulunduğu klasör çağırılır. Bunu çağırmak için “cd” kısaltması yani “change directory” komutu kullanılır. Bu komut ile dosya seçimi Şekil 7.12’de gösterilmiştir. Doking için kullanılan başlatma kodu aşağıda ve başlatmak için seçilen klasörün belirlenmesi ise Şekil 7.13’te gösterildiği gibidir.

$ "\Program Files\ The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --conf.txt --log log.txt

```
C:\Users\onur>cd Desktop

C:\Users\onur\Desktop>cd Multipledocking

C:\Users\onur\Desktop\multipledocking>
```

Şekil 7.12. Cygwin kodları ile dosya çağırma aşaması

```
C:\Documents and Settings\onur\Desktop\1dwc>"\Program Files\The Scripps Research
 Institute\Vina\vina.exe" --config conf.txt --log log.txt
#################################################################
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:          #
#                                                               #
# O. Trott, A. J. Olson,                                        #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking    #
# with a new scoring function, efficient optimization and       #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)  #
# 455-461                                                       #
#                                                               #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                         #
#                                                               #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.      #
#################################################################

WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Output will be ligand_out.pdbqt
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1169582584
Performing search ...
0%   10   20   30   40   50   60   70   80   90   100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*
```

Şekil 7.13. Cygwin üzerinde doking başlangıcının görünümü

7.2. Sanal Ligand Taraması Hesaplamaları

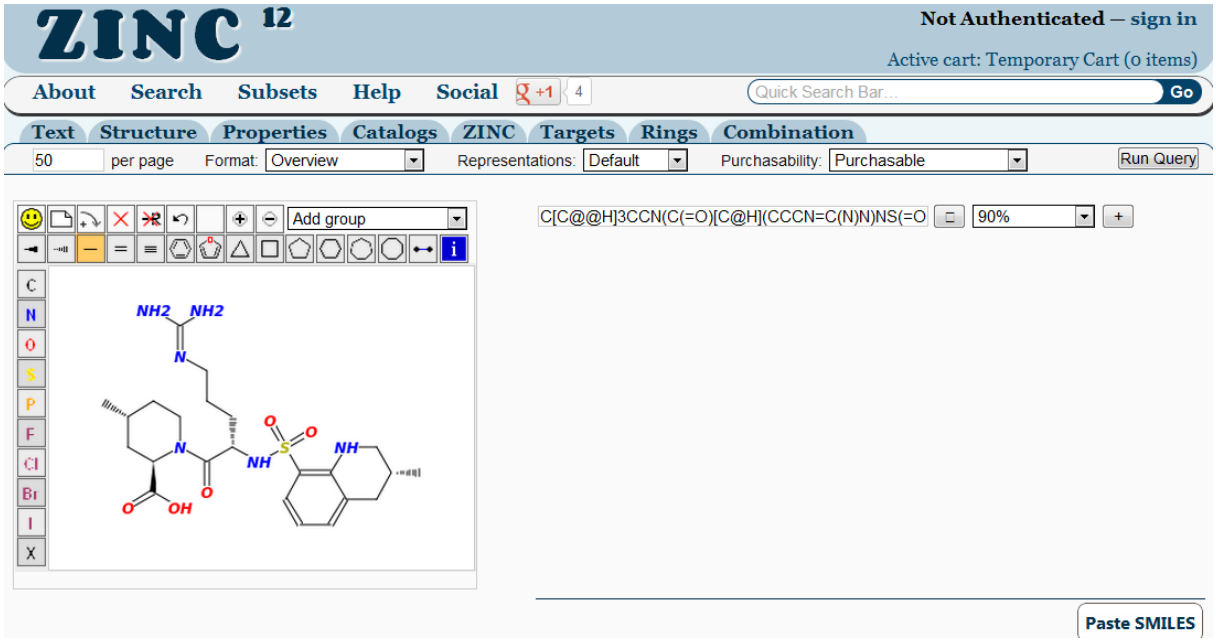
7.2.1. ZINC veri tabanı kullanılarak Ligand Veri Setinin Hazırlanması

Görsel ligand taramasını gerçekleştirebilmek için öncelikle moleküllerin 3 boyutlu yapıları ZINC veri tabanından (Irwin vd., 2005) indirilmiştir. Veri tabanından moleküllerin ekstrakte edilebilmesi yani ayrılması için birçok arama seçeneği mevcuttur. Bunlardan ilki moleküllerin fizikokimyasal özeliklerine göre arama yapmaktır.

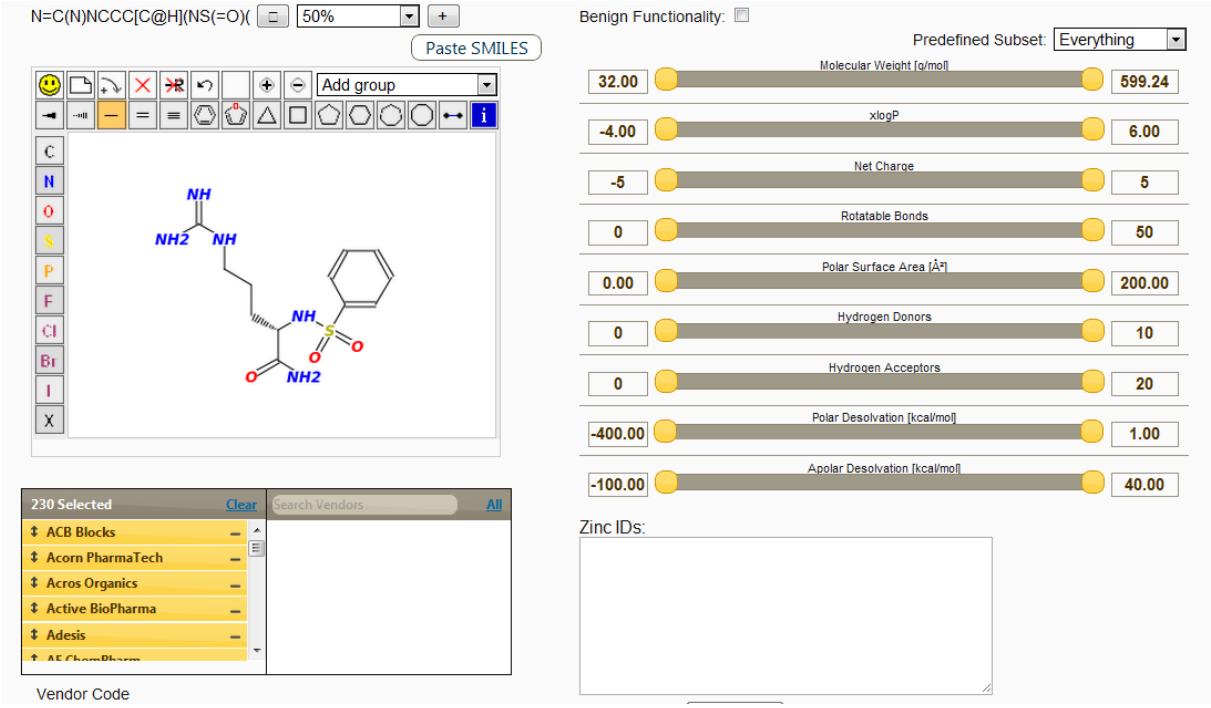
İstenilen özellikler Şekil 7.13 ‘te görülen ZINC veri tabanın web sayfasında (http://zinc.docking.org/) girilerek arama yapılabilir. Başka bir arama yöntemi de istenilen moleküllerin ortak bir özelliği olan bir kimyasal grubu çizmek ve bu grubu içeren molekülleri ayırmaktadır. Molekülün şeklinin çizimi Şekil 7.13 ‘ün sol kısmında yapılır.

ZINC veri tabanına ait bulunan tüm moleküller 8 haneli bir sayı ile kodlanır. Veri tabanı içerisinde bu kodlar kullanılarak belli bir molekülü veya bu moleküle yapıca benzer molekülleri ayırmak etmek de mümkündür. Bu işlem ise Şekil Şekil 7.13 ’ün ZINC kodları girilen bölüm olan ZINC ID kısmından yapılmaktadır.

ZINC veri tabanında tarama yaparken önemli olan bir ölçüt de sağlayıcılarının seçilmesidir. Veri tabanı kullanıcısının özel bir sağlayıcı veya tüm sağlayıcıları seçerek arama yapması mümkündür. Sağlayıcı şeçimi ise Şekil 7.14 ’ün sol alt kısmında yer alan “Vendor” seçeneğinden yapılır. Burada 230 sağlayıcının hepsi seçilmiştir.

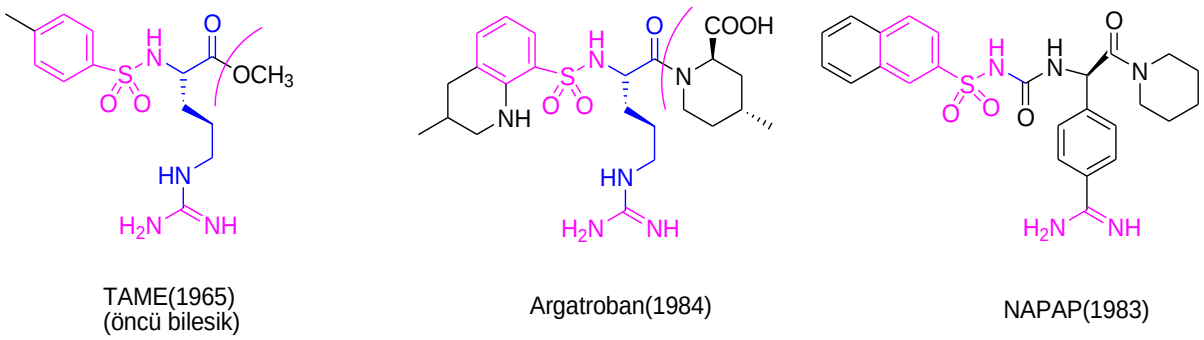


Şekil 7.13. görsel tarama için kullanılan ZINC veri tabanı web sayfasından, yapımız olan argatrobanın çiziminden bir görünüm

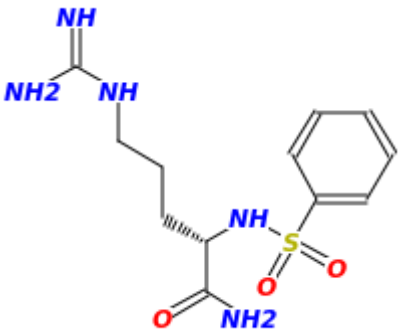


Şekil 7.14. TAME ve argatroban yapılarının ortak bölgelerinin ZINC programı ile veri tabanı oluşturmak için hazırlanması

Bu çalışmada, trombin inhibitörü olan argatroban ve argatrobanın çıkış yapısı olan TAME yapılarının ortak bölgeleri ve trombin ile etkileşim gösterdiği bölümleri ZINC veri tabanında çizilerek elde edilmiştir. Şekil 7.15 ‘te TAME, argatroban ve NAPAP yapıları ve bunlarda bulunan ortak bölgeler gösterilmiş, Şekil 7.16 ’da ise görsel ligand tarama için kullanılacak yapı gösterilmektedir. Bu yapı, web sayfasında bulunan JME moleküler editör üzerine çizilmiş ve arama tüm sağlayıcılar üzerinden (vendors kısmında “all” seçilerek) gerçekleştirilmiştir. Arama sonucunda ise tüm sağlayıcılardan toplam 578 adet hedef bileşiği elde edilmiştir. Arama sonuçlarının bir kısmı Şekil 7.17 ’de görülmektedir.



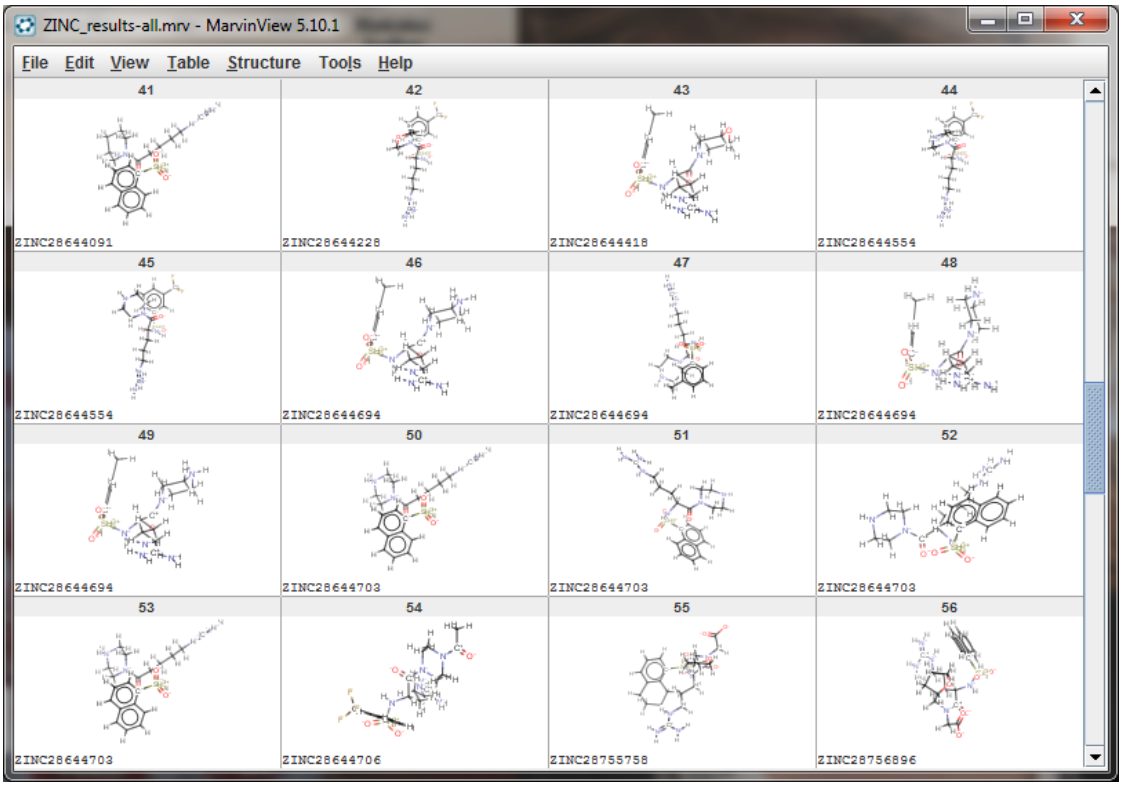
Şekil 7.15. TAME, argatroban ve NAPAP'dan çıkarak ZINC veritababnında çizilecek olan yapının belirlenmesi



Şekil 7.16. TAME ve argatroban için ortak olan ayrıca aktif bölge aminoasitleriyle etkileşen bölgeler dâhilinde ZINC veritabanında aranacak aktif kısım

Elde edilen yapılar MOL2 formatı ile indirilmiştir. ZINC veri tabanından alınan bu yapılar tek bir form halinde indiriliyor. Bu yapıları ayırmak için Autodock programını yürüten Python formatında Raccoon programı ile ayrılmıştır. Bu program ile yapılan ayırma aşaması şekil 6.6 'de gösterilmektedir. Görsel tarama sonucunda elde ettiğimiz yapıların bir kısmının özellikleri Tablo 7.2 'de verilmiştir.

ZINC veri tabanından elde ettiğimiz ligandlar, trombin molekülü ile doking hazırlığı yapılırken z ekseninde farklı koordinatlarda bulundukları gözlemlenmiştir. Bu problemi gidermek için kişisel araştırmalarım sonucu bulduğum Marvin programı ile trombine uygun koordinatlarda bulunan ligand ile ZINC veritabanından elde ettiğimiz her bir ligand aynı koordinata getirilmiştir. Bu program hakkında bilgiler "kullanılan yardımcı programlar bölümünde" verilmiştir.



Şekil 7.17. ZINC veritabanı ile bulunan 578 adet hit yapının bir kısmı

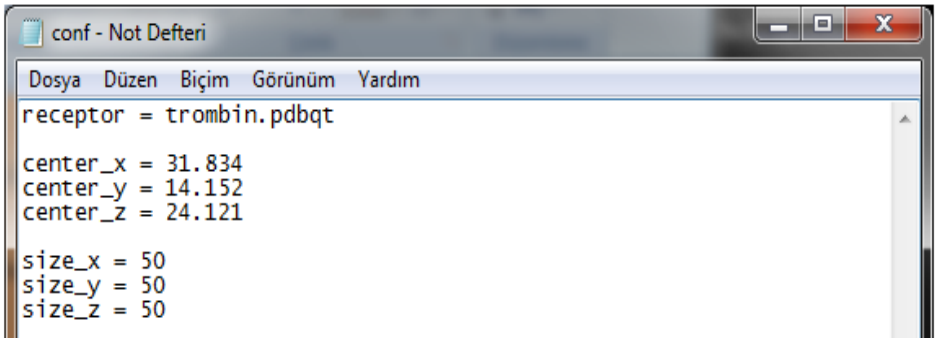
No	ZINC_ID	Molecular Weight	No	ZINC_ID	Molecular Weight
1	ZINC13761971	508.645	16	ZINC20582016	435.59
2	ZINC03917722	508.645	17	ZINC21535816	449.617
3	ZINC04096592	508.645	18	ZINC21535818	449.617
4	ZINC37263673	508.645	19	ZINC20582020	435.59
5	ZINC14768430	508.645	20	ZINC09611432	483.634
6	ZINC03807172	508.645	21	ZINC09611434	483.634
7	ZINC37263674	508.645	22	ZINC09611433	483.634
8	ZINC38339293	508.645	23	ZINC09611435	483.634
9	ZINC12466741	508.645	24	ZINC20582012	435.59
10	ZINC12466745	508.645	25	ZINC20582009	435.59
11	ZINC28116370	508.645	26	ZINC21535804	449.617
12	ZINC08828477	435.59	27	ZINC15731425	463.644
13	ZINC08828476	435.59	28	ZINC21535802	449.617
14	ZINC21367841	421.563	29	ZINC15731424	463.644
15	ZINC21367847	421.563	30	ZINC21887968	421.563

Tablo 7.2. ZINC veri tabanı ile elde edilen bazı yapıların kodları ve moleküler ağırlıkları

7.2.2. Veri Seti ile Çoklu Doking Hesaplamaları

Tekli doking hesaplamaları sonuçlarına göre elde edilen veriler ışığında çoklu doking için kullanacağımız program olan Autodock Vina (tekli doking sonuçları Sonuçlar ve Tartışma bölümünde verilmiştir) için çoklu doking hazırlık aşaması tekli doking ile bazı bölümlerde benzerlik göstermektedir. Autodock Tools önyüzü kullanılarak trombin ve görsel ligand taramasından elde edilen veri setinde bulunan yapıların hepsi, ayrıca veri setinden elde edilen yapıların hepsini içeren grid kutusu aralığı, hazırlanış bakımından benzerlik göstermektedir.

Bu hazırlıklar dışında farklılıklar Cygwin programında doking için kullanılacak olan konfigürasyon dosyasında başlamaktadır. Şekil 7.18' de de görüldüğü üzere, reseptör kısmında trombin yapısı tanımlı görülmektedir ama ligand kısmında yapılar bir adet olmadığı için buraya yazılmamaktadır.



Şekil 7.18. çoklu doking için hazırlanmış olan konfigürasyon dosyası

Doking aşaması başlamadan önce vina programının çalışmasını sağlayan The Scripps Research Institute tarafından hazırlanmış olan vina.exe dosyası Cygwin üzerinden çağırılır. Bu komut ile dosya seçimi Şekil 7.19'de gösterilmiştir. Çoklu doking için kullanılan başlatma kodu Tablo 7.3'de verilmiştir. Kodlar yazıldıktan sonra çoklu doking işlemi Şekil 7.20 'de gösterildiği şekilde başlatılmıştır.

```
C:\Users\onur>cd Desktop
C:\Users\onur\Desktop>cd Multipledocking
C:\Users\onur\Desktop\multipledocking>
```

Şekil 7.19. Cygwin kodları ile çoklu doking için dosya çağırma aşaması

```
$ for f in ligand_*.pdbqt; do

b=`basename $f .pdbqt`;

echo Processing ligand $b;

mkdir -p $b;

"C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config conf.txt

 --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt;

done;
```

Tablo 7.3. Çoklu doking başlatmak için kullanılan kodlar

```
/cygdrive/c/Documents and settings/onur/desktop/multipledocking

onur@onur-Bilgisayar /cygdrive/c/Documents and settings/onur/desktop/multipledoc
$ for f in ligand_*.pdbqt; do     b=`basename $f .pdbqt`;     echo Processing li
conf.txt --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt; done
Processing ligand ligand_1
#################################################################
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:          #
#                                                               #
# O. Trott, A. J. Olson,                                        #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking    #
# with a new scoring function, efficient optimization and       #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)  #
# 455-461                                                       #
#                                                               #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                         #
#                                                               #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.      #
#################################################################

WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ...
```

Şekil 7.20. Çoklu doking başladığı aşamadan bir görünüm

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

8.1. Tekli Doking Sonuçları

Çalışmanın bu kısmında amacımız uygun ligand ve uygun protein yapısının seçimi için kullanılacak olan programın doğruluğunu 3 direk trombin-inhibitör kompleksi için test etmektir.Kullanılan 3 direk trombin inhibitörü de 2 farklı doking programı olan Autodock ve Autodock Vina ile kendi hedef molekül bağlanma bölgelerine doking yapılmıştır. Bu iki program için karşılaştırma kriteri olarak ligandların bağlanma bölgesine doking yapılmasından sonra elde edilen RMSD değerleri karşılaştırılmıştır. Her iki doking programında da doking hazırlık aşaması ve kullanılan grid değerleri validasyonda farklılık yaratmaması için sabit tutulmuştur. Tablo 8.1 ‘de elde edilen tüm tekli doking sonuçları verilmiştir.

			Autodock Vina		**Autodock 4.0**	
	Pdb kodu	**Rezolüsyon (Å)**	**B.E. (kcal/mol)**	**RMSD (Å)**	**B.E. (kcal/mol)**	**RMSD (Å)**
Argatroban	1dwc	3.00	-8.9	1.414	-5.3	2.065
Melagatran	1k22	1.93	-7.0	2.830	-6.3	3.842
NAPAP	1dwd	3.00	-8.7	2.703	-6.6	4.831

Tablo 8.1. Tekli doking validasyon çalışması sonuçları (B.E= bağlanma enerjisi; pdb=protein data bank; RMSD=root means square deviation)

Tabloda verilen B.E, bağlanma enerjisi; $\Delta G= -R\ T\ \ln Ki$ bağıntısından türetilmiştir. Burada; R=1.986 cal $K^{-1}mol^{-1}$, ve T=298.15 K olarak alınmıştır.

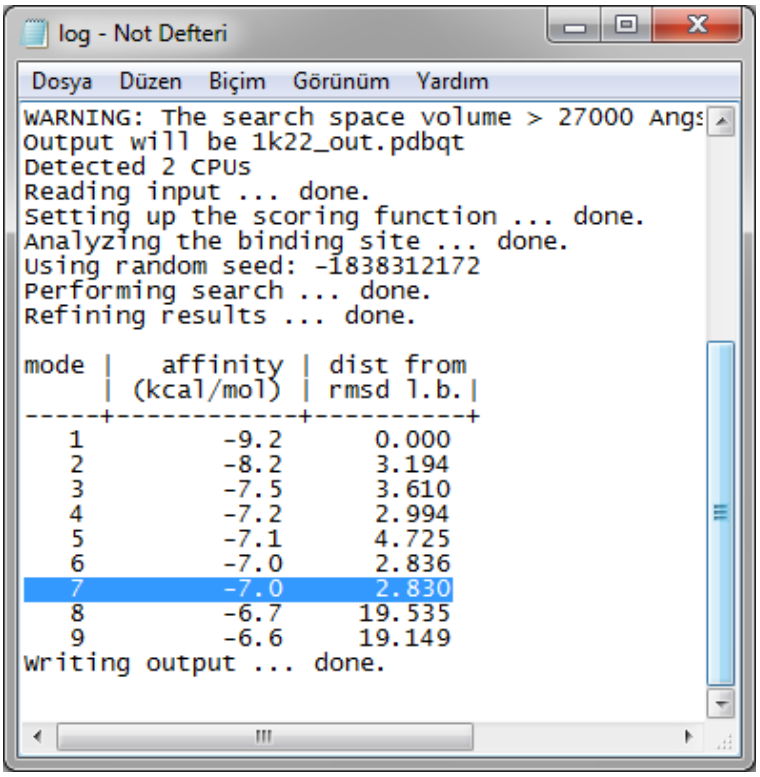
Elde edilen doking sonuçları RMSD değeri 2 Å ‘den küçük olduğunda doğru olarak belirtilmiştir. RMSD değeri, ligand yapısının belirlenmiş olan konformasyonundan ortalama karekök sapmasıdır. Bir başka deyişle ligandın etkileşime girdiği aktif bölgeden sapması anlamına gelmektedir ve Doking sonuçları için kullanılan en önemli kriterdir. RMSD değerlerinden sonra bakılan kriter ise bağlanma enerjisidir. Öncelik sırasının böyle olmasının nedeni yapı aktif bölge dışında başka bir yer ile de düşük bağlanma enerjisi verebilir, bu yüzden önce aktif bölgeye olan yakınlığına, sonra da aktif bölgede yaptığı bağlanmanın enerjisine bakılır.

Validasyon için kullandığımız ligandlardan çıkan RMSD sonuçlarına göre Autodock Vina programı Autodock 4.0’a göre daha çok miktarda doğru doking sonucu vermiştir.

Tahmin edilen en iyi pozun (en düşük RMSD"li poz) diğer pozlar içerisindeki sıralaması, doking programının sıralama fonksiyonunun bir güvenilirlik göstergesi olarak ele alınabilir. Buna göre, **Autodock Vina** doking programı ligandın bağlanma modunu tahmin etmede en başarılı program olarak bulunmuştur.

8.1.1. 1k22 Yapısı için Doking Sonuçları

Autodock Vina programı ile her yapı için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Bu 9 konformasyon içinden en küçük RMSD değeri o yapıya ait en iyi pozisyonu göstermektedir. Şekil 8.1’de 1k22 pdb koduna sahip olan **melagatran** yapısı için Vina ile yapılan doking sonuçlarına baktığımızda işaretlenmiş olan RMSD değeri 2.830 Å dür.

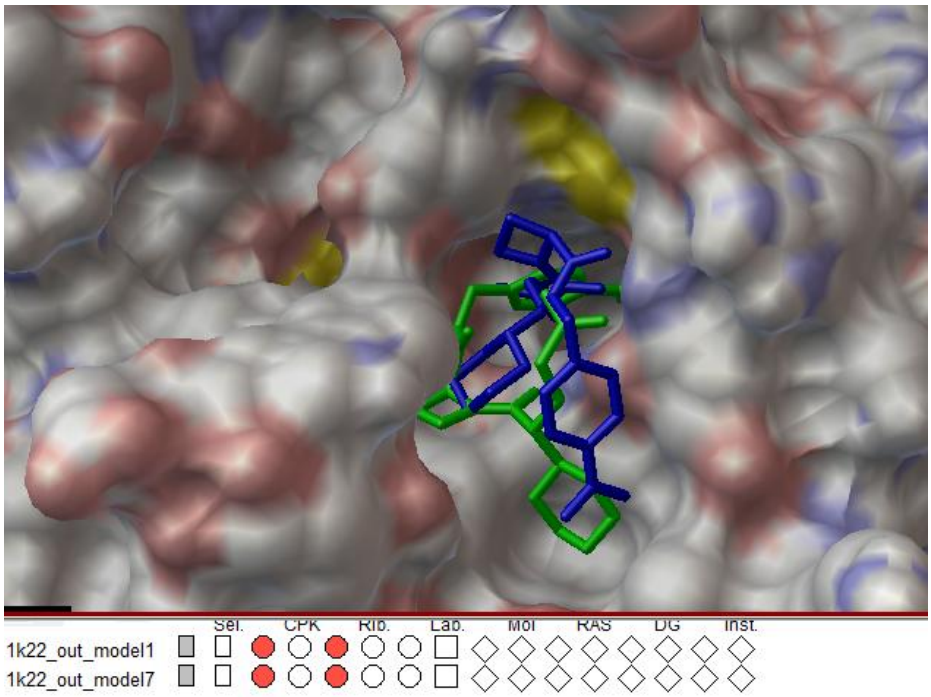


```
log - Not Defteri
Dosya  Düzen  Biçim  Görünüm  Yardım
WARNING: The search space volume > 27000 Angs
Output will be 1k22_out.pdbqt
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1838312172
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |   affinity | dist from
     | (kcal/mol) | rmsd l.b.|
-----+------------+----------+
   1         -9.2      0.000
   2         -8.2      3.194
   3         -7.5      3.610
   4         -7.2      2.994
   5         -7.1      4.725
   6         -7.0      2.836
   7         -7.0      2.830
   8         -6.7     19.535
   9         -6.6     19.149
Writing output ... done.
```

Şekil 8.1. 1k22 yapısının Vina sonuç tablosu

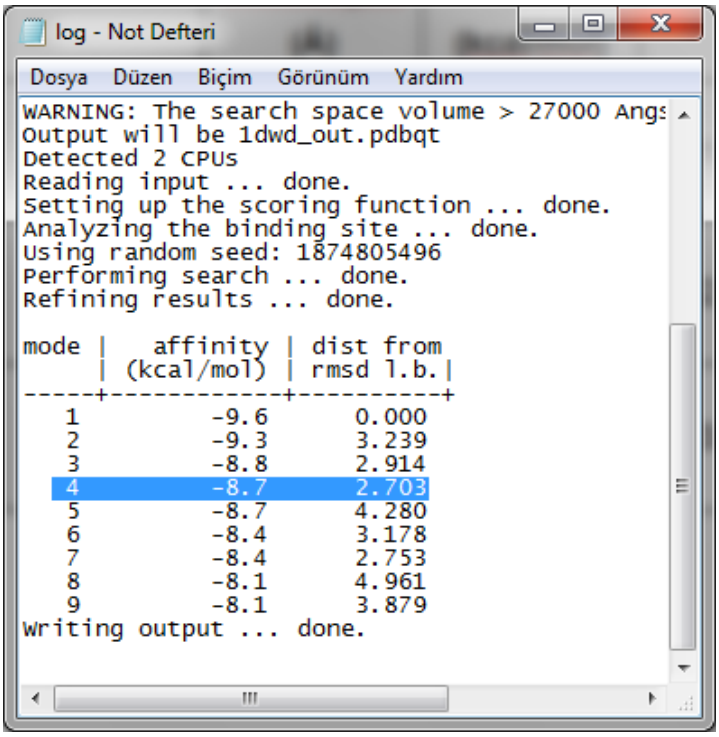
Yukarıda verilen bilgiler ışığında Şekil 8.2.'de en iyi pozisyon ile referans yapının üst üste gösterilmiş hali bulunmaktadır. Bu değerler ışığında 1k22 yapısı sanal ligand tarama için referans seçilemeyeceğini göstermektedir.



Şekil 8.2. 1k22 referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 7 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri

8.1.2. 1dwd Yapısı için Doking Sonuçları

1dwd pdb koduna sahip olan **NAPAP** yapısı için Vina ile yapılan doking sonuçlarına baktığımızda işaretlenmiş olan RMSD değeri 2.703 Å dür. Şekil 8.3'de bu yapıya ait doking sonuçları görülmektedir.

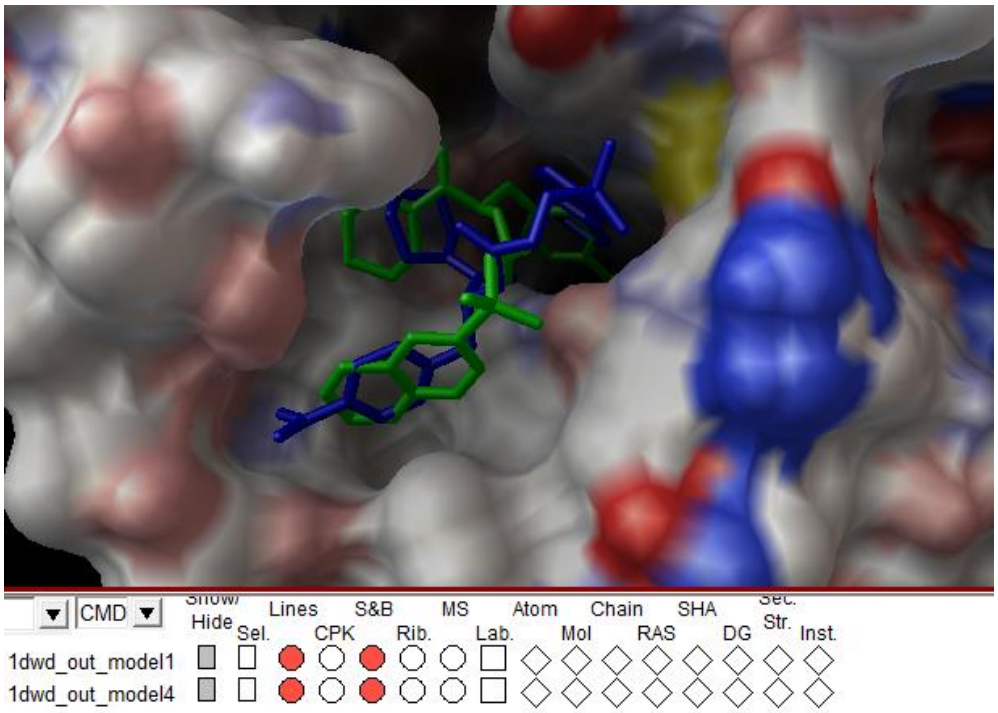


```
log - Not Defteri
Dosya  Düzen  Biçim  Görünüm  Yardım
WARNING: The search space volume > 27000 Angs
Output will be 1dwd_out.pdbqt
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1874805496
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |   affinity | dist from
     | (kcal/mol) | rmsd l.b.|
-----+------------+----------+
   1         -9.6      0.000
   2         -9.3      3.239
   3         -8.8      2.914
   4         -8.7      2.703
   5         -8.7      4.280
   6         -8.4      3.178
   7         -8.4      2.753
   8         -8.1      4.961
   9         -8.1      3.879
Writing output ... done.
```

Şekil 8.3. 1dwd yapısının Vina sonuç tablosu

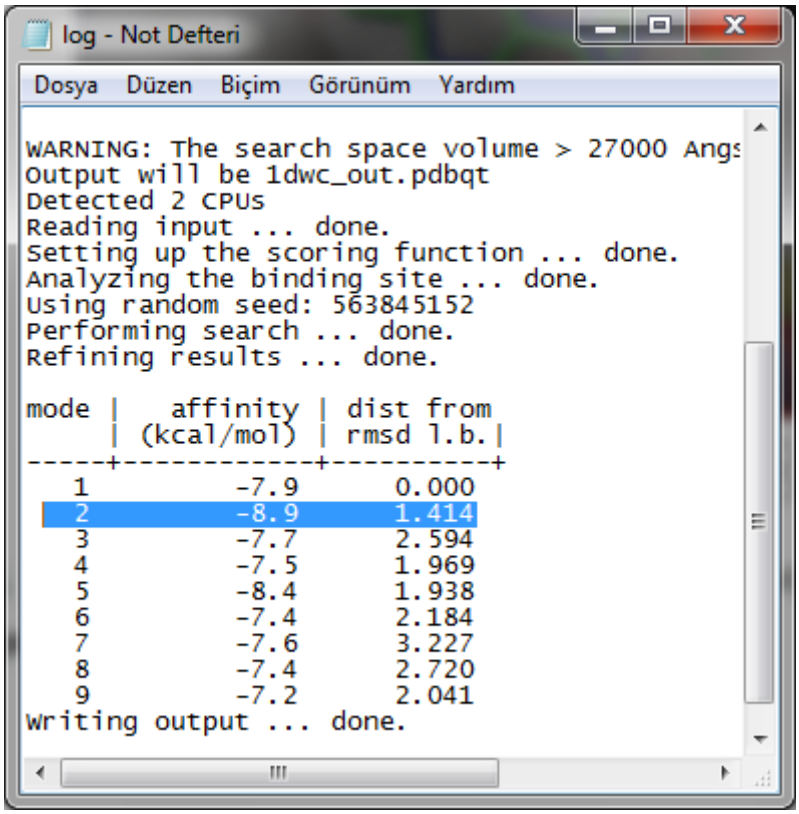
Yukarıda verilen bilgiler ışığında Şekil 8.4.'te en iyi pozisyon ile referans yapının üst üste gösterilmiş hali bulunmaktadır. Bu değerler ışığında 1dwd yapısının da sanal ligand tarama için referans seçilemeyeceğini göstermektedir.



Şekil 8.4. 1dwd referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 4 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri

8.1.3. 1dwc Yapısı için Doking Sonuçları

1dwc pdb koduna sahip olan **Argatroban** yapısı için Vina ile yapılan doking sonuçlarına baktığımızda işaretlenmiş olan RMSD değeri 2.703 Å dür. Şekil 8.5'te bu yapıya ait doking sonuçları görülmektedir.



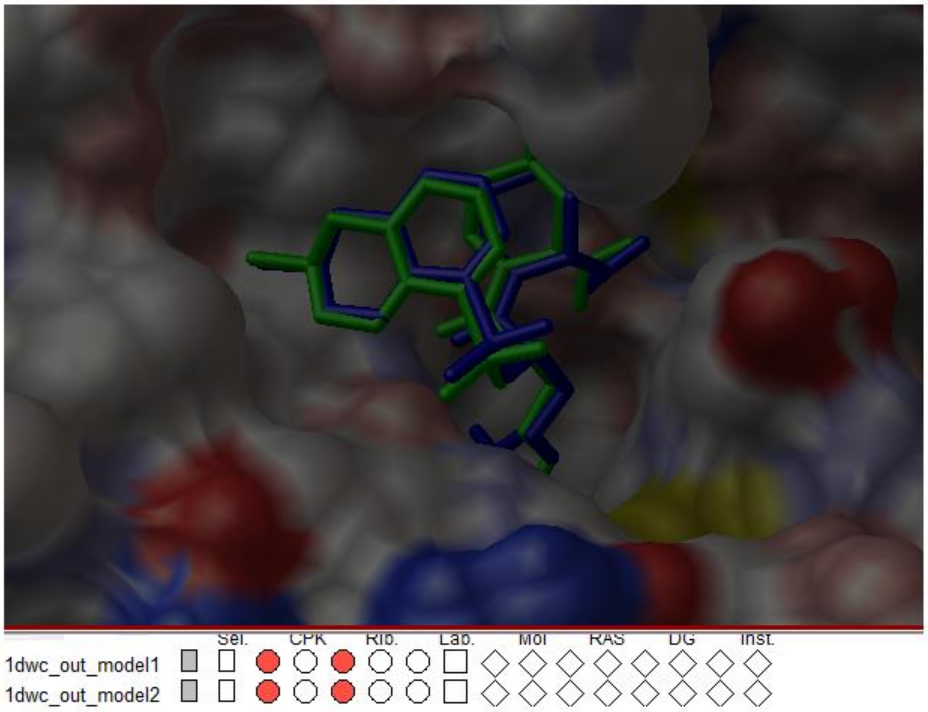
```
log - Not Defteri
Dosya  Düzen  Biçim  Görünüm  Yardım

WARNING: The search space volume > 27000 Angs
Output will be 1dwc_out.pdbqt
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 563845152
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |   affinity | dist from
     | (kcal/mol) | rmsd l.b.|
-----+------------+----------+
   1         -7.9      0.000
   2         -8.9      1.414
   3         -7.7      2.594
   4         -7.5      1.969
   5         -8.4      1.938
   6         -7.4      2.184
   7         -7.6      3.227
   8         -7.4      2.720
   9         -7.2      2.041
Writing output ... done.
```

Şekil 8.5. 1dwc yapısının Vina sonuç tablosu

Yukarıda verilen bilgiler ışığında Şekil 8.6.'da en iyi pozisyon ile referans yapının üst üste gösterilmiş hali bulunmaktadır. Görüldüğü üzere 1dwc'ye ait yapının üst üste getirilmiş formunda referans ile uyum yakalanmıştır. Bu değerler ışığında 1dwc yapısının da sanal ligand tarama için referans olduğu belirlenmiştir.

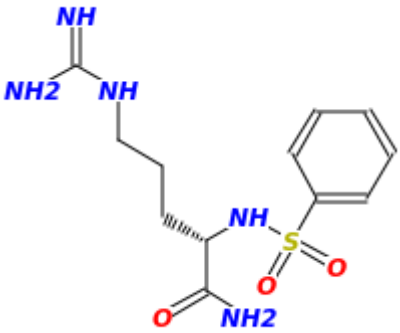


Şekil 8.6. 1dwd referans (yeşil) ve en iyi skorlu yapı (mavi) olan 2 numaralı modelin aktif bölgedeki görünümleri

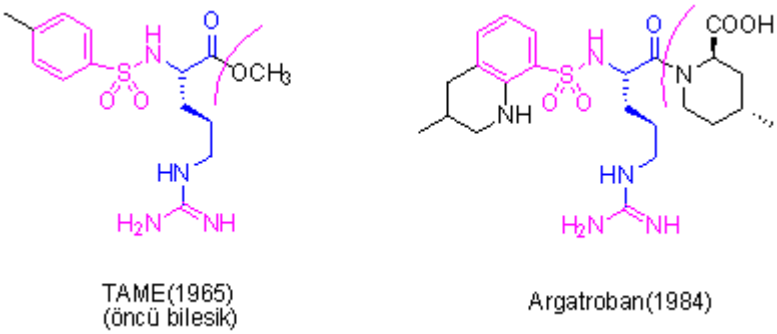
Tablo 8.1.'den hatırlanacağı üzere tüm doking sonuçlarına göre her iki programla yapılan doking sonuçlarında RMSD değerleriyle en iyi sonuç veren yapı Argatroban olmuştur. Bu duruma göre çoklu doking için uygun temeli oluşturacak yapı olarak **Argatroban** seçilmiştir.

8.2. Sanal Ligand Taraması

Tekli doking validasyonu ile belirlenen program Autodock Vina programı ile 1dwc pdb koduna sahip olan yapı olan Argatroban ve Argatrobanın çıkış molekülü olan TAME temel alınarak hazırlanan ayrıca aktif bölge aminoasitleriyle etkileşen bölgeler yapı temelinin görsel ligand taraması işlemi yapılmıştır. Şekil 8.7'de bu yapı ile Şekil 8.8'de TAME ve Argatrobanın benzerlik gösteren bölümleri verilmiştir.



Şekil 8.7. TAME ve argatroban için ortak olan ayrıca aktif bölge aminoasitleriyle etkileşen bölgeler

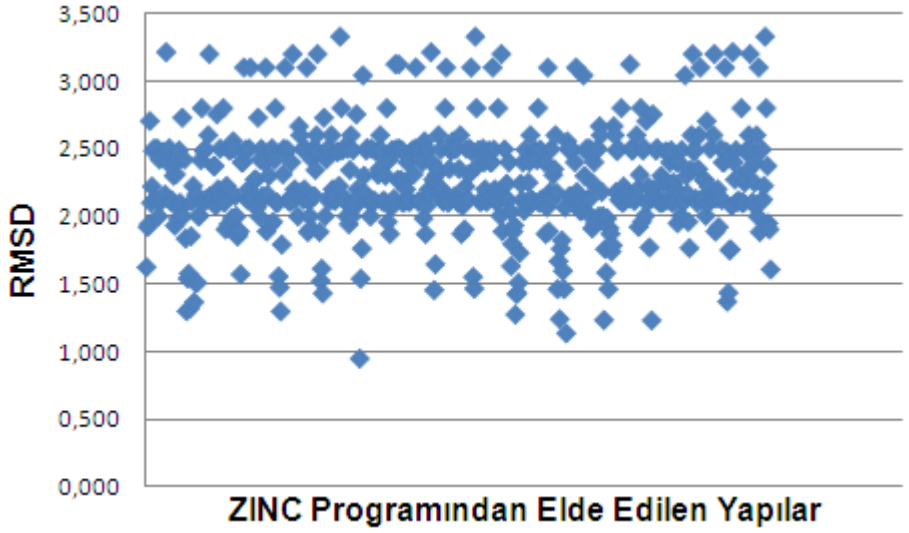


Şekil 8.8. TAME ve Argatroban'dan çıkarak ZINC veritababnında çizilecek olan yapının belirlenmesi

Tüm doking çalışmaları Bölüm 7.2.2'de de anlatıldığı gibi otomatik hale getirilmiş ve tüm çalışma cygwin üzerinden bütün hesaplamaları ardı ardına devam ederek çoklu doking biçiminde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, her bir ligand için 9 adet bağlanma modu elde edilmiş, bu bağlanma modlarından (doking konformasyonu) en düşük RMSD değeri veren konformasyon, o ligand için doking sonucu olarak kabul edilmiştir. Böylece elde edilen yüzlerce sonuç, her bir ligand için 1 adet doking sonucu olacak şekilde indirgenmiştir.

Bu indirgeme sonrasında 578 adet yapıdan RMSD değeri (doking merkezi adı ile belirlenen noktadan sapma) 2 Å'den küçük olan toplam 175 adet sonuç elde edilmiştir. Doking sonuçlarının 2 Å'den küçük olması o ligandın hedef proteine program tarafından doğru doking yapıldığını gösterdiğine önceden değinilmişti. Buna

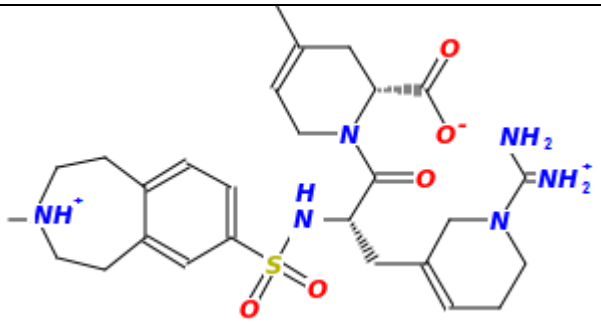
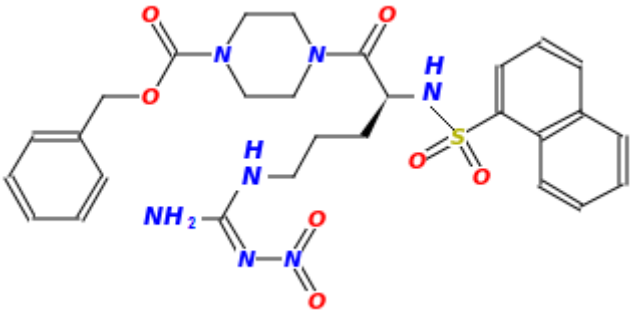
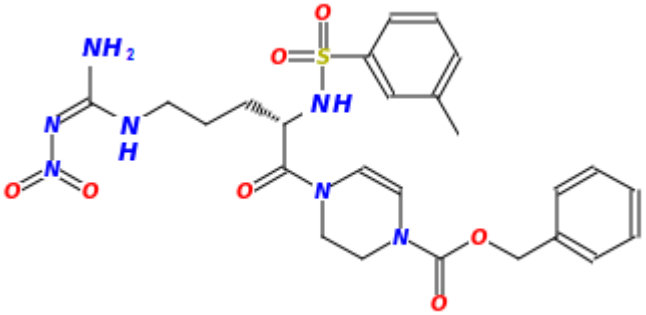
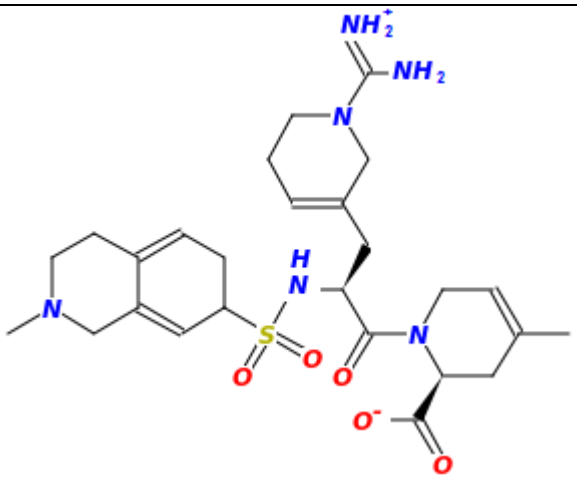
göre, elde edilen doking sonuçlarının **30,28 %'i** 2 Å'den küçük sonuç vermiş ve hedef proteinle yüksek etkileşim göstermiştir. Bu değer trombin inhibitör adayları ile trombin yapısının birbirleri arasındaki etkileşiminin yüksek olduğunu göstermektedir. Görsel ligand taraması sonuçlarının grafiksel görünümü Şekil 8.9'da verilmiştir.

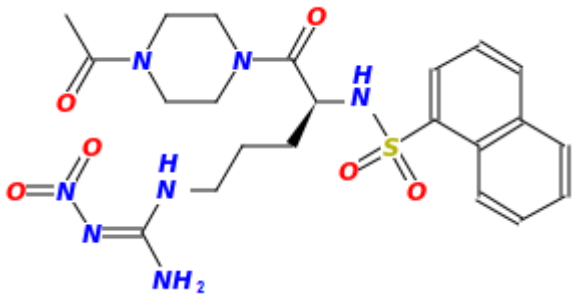
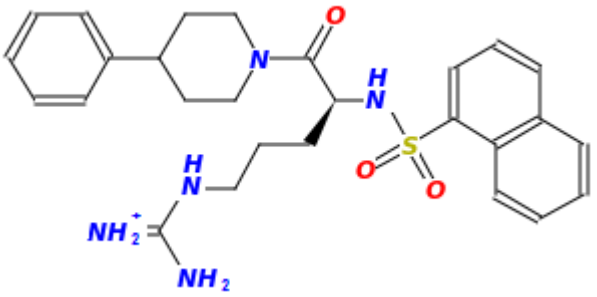
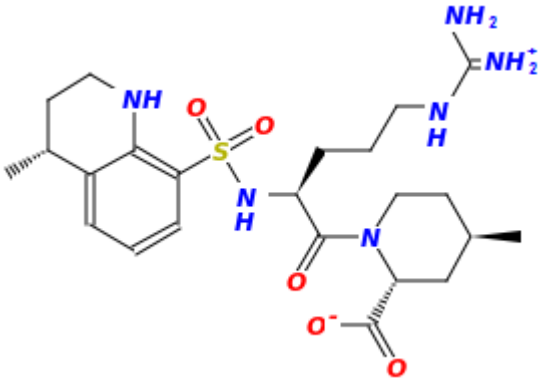
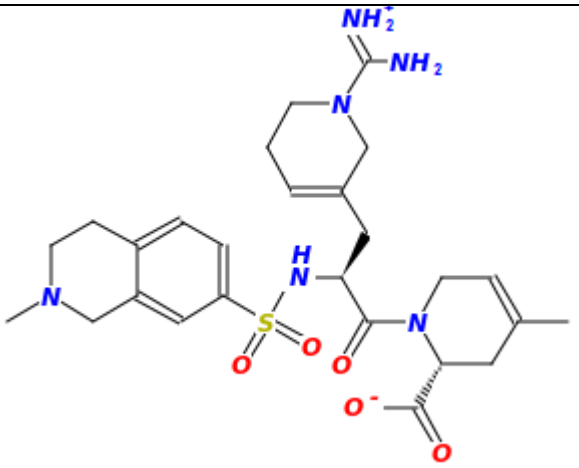


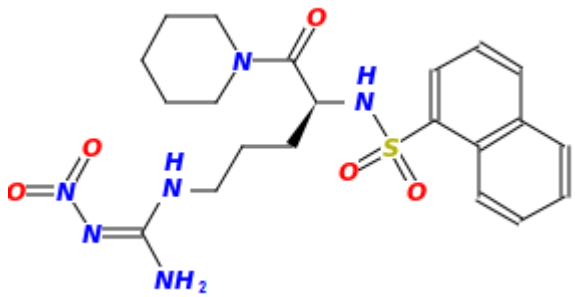
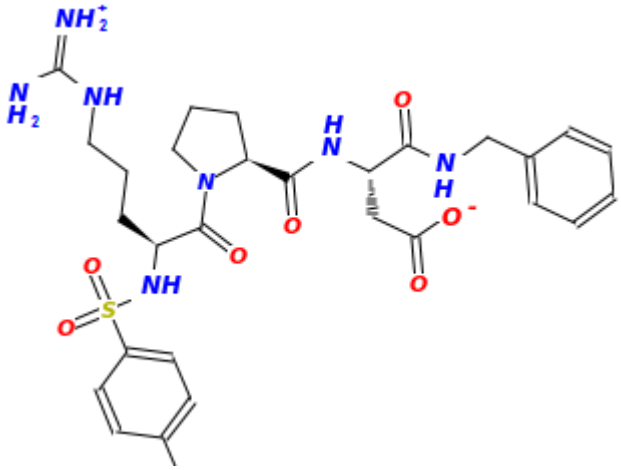
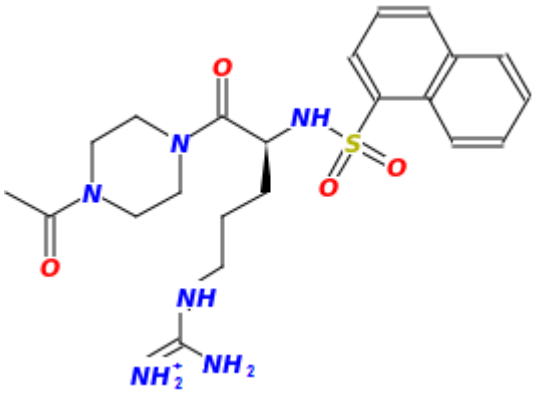
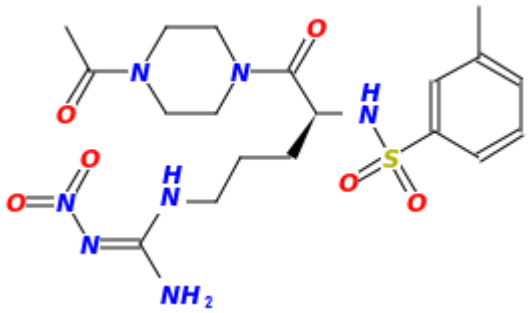
Şekil 8.9. Görsel ligand tarama sonuçları

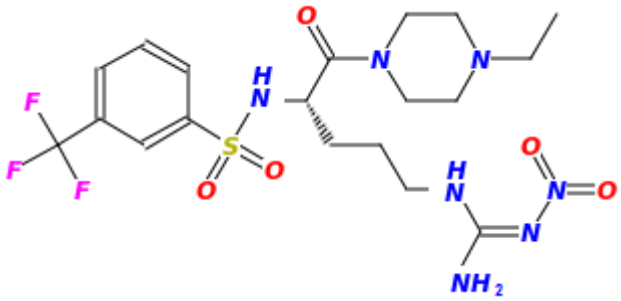
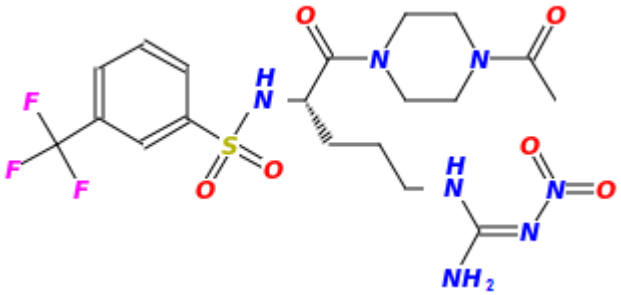
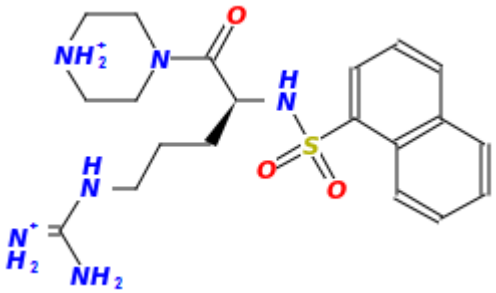
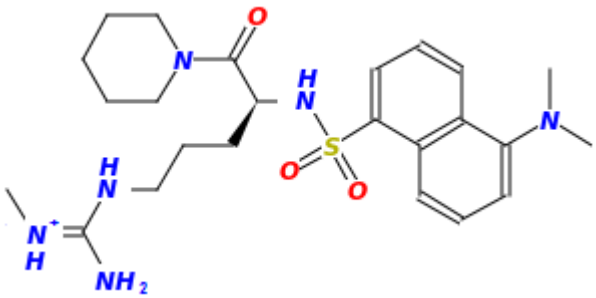
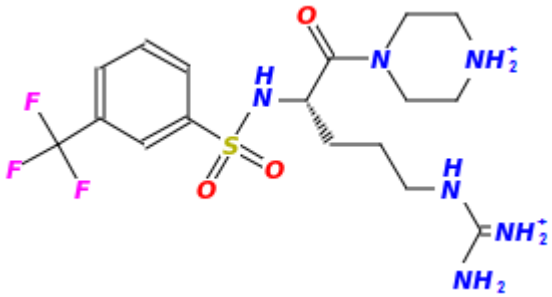
RMSD değerlerine göre sıralanmış olan ve 2 Å'den küçük olan bu 175 adet yapıyı bağlanma afinitesine göre sıraladığımızda direk trombin inhibitörleri için en uygun olan yapılar bulunmuş olacaktır. Bu sıralama sonucunda en düşük bağlanma afinitesine sahip olan ilk 20 yapının Tablo 8.2'de ZINC kodları, bağlanma afinite değerleri, RMSD değerleri ve kimyasal yapıları verilmiştir.

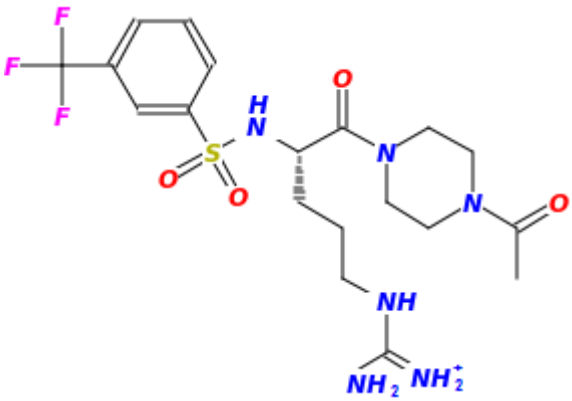
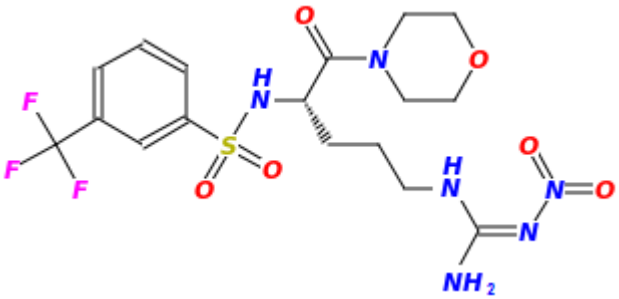
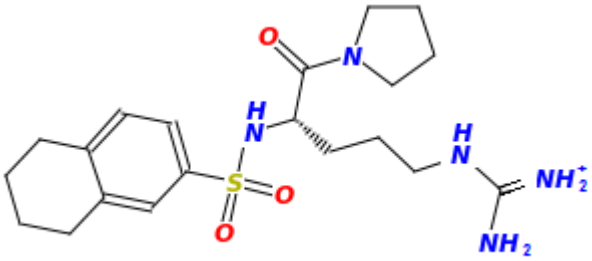
Burada yer alan yapılara baktığımızda yapı temeli olarak belirlediğimiz fonksiyonel sülfonil grubuna bağlanmış olan naftil grubunun veya aynı sülfonil grubuna bağlı triflorometilbenzen grubunun ve başka bir yapıda hepta halkalı amin yapısının bulunduğu yapıların daha düşük bağlanma afinitesi ve küçük RMSD değerleri verdiğini görüyoruz.

ZINC Kodu	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	RMSD (Å)	Kimyasal Yapısı
ZINC03831727	-10,0	1,921	
ZINC60093866	-9,3	1,607	
ZINC60093851	-9,2	1,949	
ZINC59940687	-9,1	1,749	

ZINC35260697	-8,9	1,462	
ZINC27980097	-8,9	1,889	
ZINC38339293	-8,8	1,231	
ZINC40763893	-8,8	1,959	

ZINC35260691	-8,5	1,234	
ZINC28890531	-8,5	1,240	
ZINC28643105	-8,5	1,556	
ZINC35260707	-8,5	1,770	

ZINC35260695	-8,4	1,583	
ZINC60093855	-8,4	1,904	
ZINC28644703	-8,3	1,434	
ZINC29570774	-8,3	1,462	
ZINC28644554	-8,3	1,466	

ZINC28644706	-8,3	1,730	
ZINC35260702	-8,3	1,870	
ZINC27885340	-8,3	2,000	

Tablo 8.2. Görsel ligand taramasında en düşük bağlanma enerjisine sahip ve RMSD değeri 2 Å'den küçük olan yapılar

YORUMLAR VE ÖNERİLER

Bu çalısma, ilk asamasında, X-ısını yapısı bilinen 3 farklı (**1k22,1dwd ve 1dwc**) **direk trombin inhibitörü** enzim-ligand kompleksinin Autodock 4.0 ve Autodock Vina programlarının validasyonu ve seçilen program ile birlikte bu ligandların arasından görsel ligand tarama içi temel oluşturacak yapıyı seçmek için yapılan literatürdeki ilk çalışmadır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçları şu şekilde özetleyebiliriz;

TEKLİ DOKİNG ÇALIŞMASI (VALİDASYON) SONUCUNDA;

1. Autodock Vina programının, üç farklı pdb kodu kullanılarak yapılan validasyonunda direk trombin inhibitörleri için düşük RMSD değerleri verdiği için en iyi sonuç veren program olduğu tespit edilmiş ve çalışmanın devamında bu yöntem seçilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

2. Autodock Vina programı, Autodock 4.0 programına göre her yapı için ayrı ayrı bağlanma enerjileri değerlendirildiğinde hepsinde en düşük bağlanma enerjilerini veren program olduğu tespit edilmiştir.

3. Hazırlamış olduğumuz veri seti ve literatür taraması verileri ve direk trombin inhibitörleri hakkında yapılan araştırmalar yeni çalışmalarda hem zamandan tasarrufa hem de doğru yöntem ve uygun yapı ile iyi bir başlangıç adımı atılmasına yardımcı olacaktır.

4. Yapıların sonuçlarına tek tek bakılacak olursa, **1k22 melagatran-trombin** kompleksi için elde edilen RMSD değeri 2.830 Å , bağlanma enerjisi ise -7.0 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında bu kompleks referans olarak seçilmemiştir.

5. 1dwd NAPAP-trombin kompleksi için elde edilen RMSD değeri 2.703 Å , bağlanma enerjisi ise -8.7 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında bu kompleks referans olarak seçilmemiştir.

6. 1dwc Argatroban-trombin kompleksi için elde edilen RMSD değeri 1.414 Å bağlanma enerjisi ise -8.9 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında bu yapının referans olarak seçilmesinin uygun olduğu görülmektedir.

SANAL LİGAND TARAMASI SONUCUNDA;

1. ZINC veri bankası kullanılarak Argatroban temel alınarak hazırlanan 578 adet bileşik içeren veri setine Autodock Vina programı ile sanal ligand taraması sonucunda elde edilen yapıların doking sonuçlarından 175 adet sonucun RMSD değeri 2 Å'den küçük olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre doking sonuçlarının 30.28 %'si 2 Å'den küçük sonuç vermesi seçilen temel yapı üzerinden elde ettiğimiz veri tabanımızın hedef proteinle yüksek bağlanma özelliğini göstermektedir.

2. Autodock Vina ile sanal ligand taraması sonucunda elde edilen yapıların çoklu doking sonuçlarında 2 Å'den küçük olanların bağlanma afinitesine sıralama yapıldığında en düşük afinite değerlerine sahip ve 2 Å'den küçük olan RMSD değerine sahip ilk 20 bileşik belirlenmiştir.

Sonuç olarak bulunan bu potansiyel direk trombin inhibitör bileşikler bizlere gelecekte yapılacak yeni çalışmalarda ve bir sonraki aşama olan aktivite testlerine geçilerek uygunluklarının araştırılması ve oral yolla alınabilen, yan etkisi düşük, yüksek seçiciliğe sahip bir ilaç tasarımı için umut olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Arcasoy SM, Kreit JW. Thrombolytic therapy of pulmonary embolism: a comprehensive review of current evidence. Chest 115:1695-1707, 1999.

Aygün D. Serebrovasküler hastalıklar. Progres. 3(1); 3-11;2002

Baker N. A., Dolinsky T. J., Czodrowski P., Li H., Nielsen E. J., Jensen J. H., Klebe G., PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations, 2007, Nucleic Acids Research, 35 (Web Server issue): W522–W525

Baker WF JR, Bick RL. Deep vein thrombosis: diagnosis and management. Med Clin North Am 78:685-712, 1994.

Banner D.W., P.Hadváry. Crystallographic analysis at 3.0-A resolution of the binding to human thrombin of four active site-directed inhibitors. J Biol Chem 266:20085-20093 (1991)

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002) *Biochemistry.* W. H. Freeman and CompanyISBN 0-7167-4955-6.

Berman M., Westbrook J. , Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Wissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E, 2000, the Protein Databank, *Nucleic Acid Research*, 28, 235-242

Bredberg U, Eriksson UG, Taure K, Johansson L, Frison L. Gustafsson D. Effects of melagatran, a novel direct thrombin inhibitor, in healthy volunteers, following intravenous, subcutaneous and oral administration. Blood 1999; 94(Suppl): 28a.

Bode, W.; Turk, D.; Karshikov, A. The refined 1.9-A X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. Protein Sci., 1992, 1, 426.

Bode, W. The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. J. Thromb. Haemost., 2005, 3, 2379.

Böhm, H. J, The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, Journal of Computer- Aided Molecular Design, 8, 243-256, 1994.

Carlson H. A:, McCammon J. A, Accommodating Protein Flexibility in Computational Drug Design, Journal of Molecular Pharmacology, 57, 213-218 2000.

Columbus Investigators, The. Low-molecular-weight heparin in the treatment of patients with venous thromboembolism. N Engl J Med 337:657-62, 1997.

Di Nisio M, Middeldorp S, Buller HR. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med* 2005;353:1028-40. PMID 16148288

Delorie D: J., Noer G., Cygwin API Reference, Copyright Red Hat, Inc. 1998,

Dhillon S. Argatroban: A Review of its Use in the Management of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Am J Cardiovasc Drugs* 2009; 9 (4): 261-82. Link text

Dullweber F., M.T.Stubbs, D.Musil, J.Stürzebecher, G.Klebe. Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J Mol Biol* 313:593-614 (2001)

Ewing T, Makinoa S, Skillmana G, and Kuntz D, DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases, Journal of Computer-Aided Molecular Design, 15: 411–428, 2001.

Fihn SD, Callahan CM, Martin DC, et al. The risk for and severity of bleeding compliations in elderly patients treated with warfarin. Ann Intern Med 124:970- 97, 1996.

Gerlach AT, Pickworth KK, Seth SK, et al. Enoxaparin and bleeding compliations: a

review in patients with and without renal insufficiency. Pharmacotherapy 20:771-75, 2000.

Gingsberg JS. Management of venous thromboembolism. N Engl J Med 335:1816-28, 1996.

Graham Patrick, An *Introduction to Medicinal Chemistry* 4e - Oxford University Press, 1995, (çeviri Vildan Adar,2012)

Gustafsson D, Nystrom J, Carlsson S, Bredberg U, Eriksson U, Gyzander E, et al. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. Thromb Res 2001; 101: 171-81.

Hall, S. W., Gibbsb, C. S. and Leunga L. L. K., 1997, Strategies for development of novel antithrombotics: modulating thrombin's procoagulant and anticoagulant properties, CMLS, Cell. mol. life sci., 53, 731–736.

Harrison L, McGinnis J, Crowther M, et al. Assessment of out patient of deep- vein thrombosis with low-molecular-weight heparin. Arch Intern Med 158:2001-03, 1998.

Hyers TM, Agnelli G, Hull RD, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. Chest 114(4 Suppl):61-78, 1998.

Hyers TM. Venous thromboembolism. Am J Respir Crit Care Med 59:1-14, 1999.

Hetenyi C, Maran U, Garcia-Sosa A. and Karelson M, Structure-based calculation of drug efficiency indices, Bionformatics, Vol. 23 no. 20 pages 2678–2685, 2007.

Hetenyi C, Garcia-Sosa A, Maran U, Drug Efficiency Indices for Improvement of Molecular Docking Scoring Functions, Wiley InterScience DOI 10.1002/jcc.21306, 2009.

Holdgate, GA (2001). "Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics". BioTechniques ***31*** *(1): 164–6, 168, 170 passim.* PMID 11464510*.*

Hsu, JT; Wang, HC; Chen, GW; Shih, SR (2006). "Antiviral drug discovery targeting to viral proteases". Current pharmaceutical design ***12*** *(11): 1301–14.*doi*:*10.2174/138161206776361110*.* PMID 16611117*.*

Huey R., Morris G. M., Using AutoDock 4 with AutoDockTools: A Tutorial, The Sc ripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory,2008

Hull RD, Raskob GE, Brant RF, et al. Low-molecular-weight heparin vs heparin in the treatment of patients with pulmonary enbolism. N Engl J Med 337:663-69, 1997.

Hursting MJ, Lewis BE, Macfarlane DE. (2005). "Transitioning from argatroban to warfarin therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia.". *Clin Appl Thromb Hemost* **11** (3): 27987. doi:10.1177/107602960501100306. PMID 16015413.

Hyers TM, Agnell G, Hull RD, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. Chest 114(4 Suppl):561-578, 1998.

Irwin H. Segel, Enzyme Kinetics : Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Wiley–Interscience; New edition (1993), ISBN 0-471-30309-7.

Irwin J. J., Shoichet B. K, ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening, Journal of Chem. Inf. Model., 45, 177-182, 2005.

Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Sekizinci basım. Cilt I, sayfa 588.

Kellenberger E, Rodrigo J, Muller P, and Rognan D, Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 57:225–242 (2004).

Kenakin T. 2006, A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods, 2nd Edition Elsevier, San Diego

Kikumoto R, Tamao Y, Tezuka T, Tonomura S, Hara H, Ninomiya K, Hijikata A, Okamoto S. Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-4-methyl-1-{[N2-(1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinyl)sulfonyl]-Larginal}-2-piperidinecarboxylic acid. Biochemistry; 23:85–90. 1984.

Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, Nature Reviews Drug Discovery 3, 935-949, 2004.

Klebe G., Gohlke H, Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors, Angewandte Chemie International Edition, Volume 41, Issue 15, pages 2644–2676, 2002.

Leach A. R, Ligand Docking to Proteins with Discrete Side-chain Flexibility, Journal of Molecular Biology, 235, 345-356, 1994.

Leatherbarrow, RJ (1990). "Using linear and non-linear regression to fit biochemical data". Trends in biochemical sciences ***15*** *(12): 455–8.* doi:10.1016/0968-0004(90)90295-M. PMID 2077683.

Lesk M. A, Introduction to Protein Architechture, Oxford University pres, New York, 27, 39, 304, 2001.

Lew W, Chen X, Kim CU (2000). "Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor". Curr. Med. Chem. ***7*** *(6): 663–72.* PMID 10702632.

Marwwardt F,“Unterscughung über den mechanismus der blutgerinnungshemmenden wirkung des hirudins.” Naunnyn Schimşdebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmak. 229, 389-399(1956).(b) Markwardt F, and Walsmann P “Reindarstellung und analyse des thrombininhibitors hirudin” Z. Physiol. Chem. 348, 1381-1386, 1967.

Meiler J, Baker D, ROSETTALIGAND: Protein–Small Molecule Docking with Full Side-Chain Flexibility, PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 65:538–548 (2006).

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., 1998, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, J. Comp. Chem., 19, 1639-1662

Nisio, M.D., Middeldorp S., Büller R.B.,” Direct Thrombin İnhibitors” N. Egl. Med 353(10), 1028-1040, 2005.

Özkan D., Pıhtılaşma s. 5-6, 1998

Rarey M, Kramer B, Lengauer T and Klebe G, A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm, J. Mol. Biol. 261, 470–489 (1996).

Selim, MA, John, WK: Thrombolytic therapy of pulmonary embolism. Chest, 115:1695-1707, 1999

*Shapiro, R; Vallee, BL (1991). Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor. Biochemistry **30** (8):224655.doi: 10.1021/bi00222a030. PMID 1998683.*

Schwienhorst A., “Direct thrombin inhibitors – a survey of recent developments” Cellular and Molecular Life Sciences Volume 63, Number 23, 2773-2791,(b) http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=16129703, 2006,

Sixth ACCP Consensus Conferance on Antithrombotic Therapy. Chest 2001;119

Sousa, S.F., Fernandes, P.A. & Ramos, M.J., Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges, Proteins, 65,15-26, 2006.

Sumner, James B. Biographical Memoirs / National Academy of Sciences 31. 1926.

Srivastava S, Goswami LN, Dikshit DK., Progress in the design of low molecular weight thrombin inhibitors. Med Res Rev. Jan;25(1):66-92. 2005.

Trott O., Olson A. J., 2009, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, Journal of Computational Chemistry, 31, 2, 455-461

Trosset J. Y, Scheraga H. A, Reaching the global minimum in docking simulations: A Monte Carlo energy minimization approach using Bezier splines, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95(14), 8011-8015 1998.

Töbü M. Antikoagülan Tedavi, ilk basamak kursu, 81-82, 2006,

Valentin, KA, Hull, RD: Treatment of acute pulmonary embolism. Up To Date Disc, :7(3),1999.

Wells PS, Ginsberg JS, Anderson DA, et al. Use of a clinical model for safe management of patients with suspected pulmonary embolism. Ann Intern Med 129:997-1005, 1998.

İnternet Kaynakları

http://evrimgercegi.blogcu.com/Indirgenemez+Komplekslilik,2012

http://www.kalbimiz.de/kan/kanin-pihtilasmasi.html, 2012

http://tr.wikipedia.org/wiki/Trombosit, 2012.

http://www.soylenasil.com/bilim/kan_pihtipr.htm, 2012.

http://www20.uludag.edu.tr/~ilkin/trombositler_dosyalar/frame.htm, 2012

http://us.gsk.com/products/assets/us_argatroban.pdf,2012.

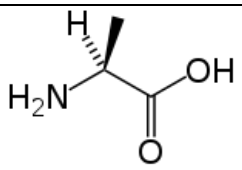
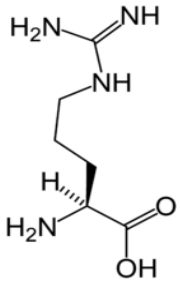
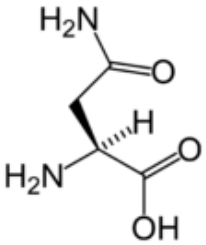
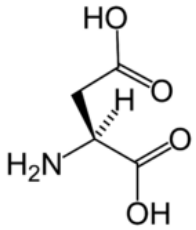
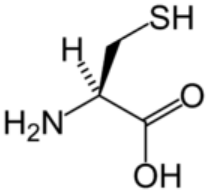
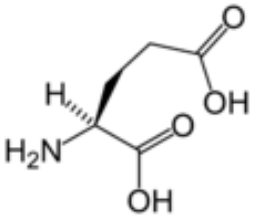
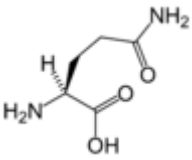
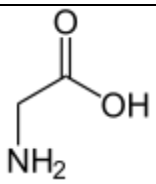
Pıhtılaşma Mekanizması, http://www.alvimedica.com.tr/alvimedica-saglik-kulubu/kanin-yapisi-ve-gorevleri/pihtilasma-mekanizmasi.html , 2012.

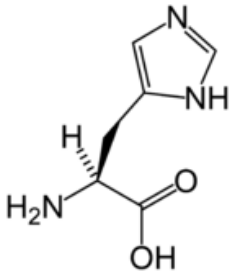
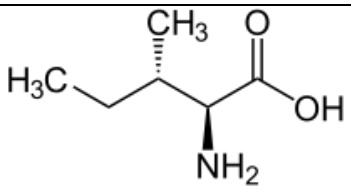
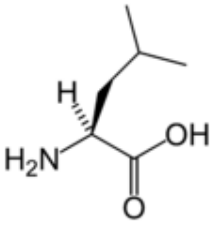
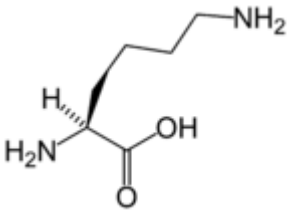
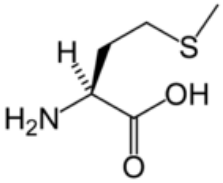
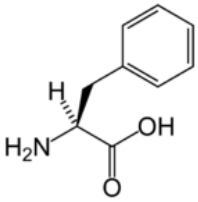
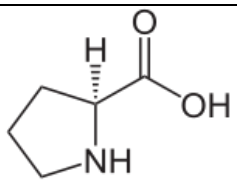
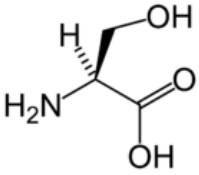
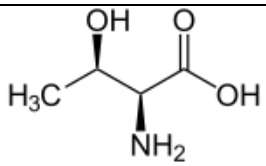
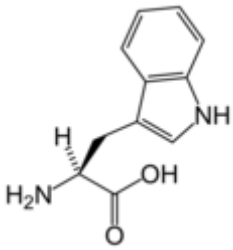
Peptide Bond Formation, http://www.wisconline.com/objects/ViewObject.aspx?ID=BIC007,2012

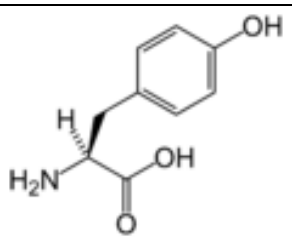
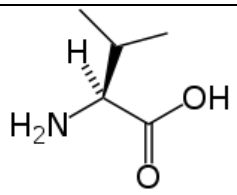
EKLER DİZİNİ

EK 1

Aminoasit Yapıları

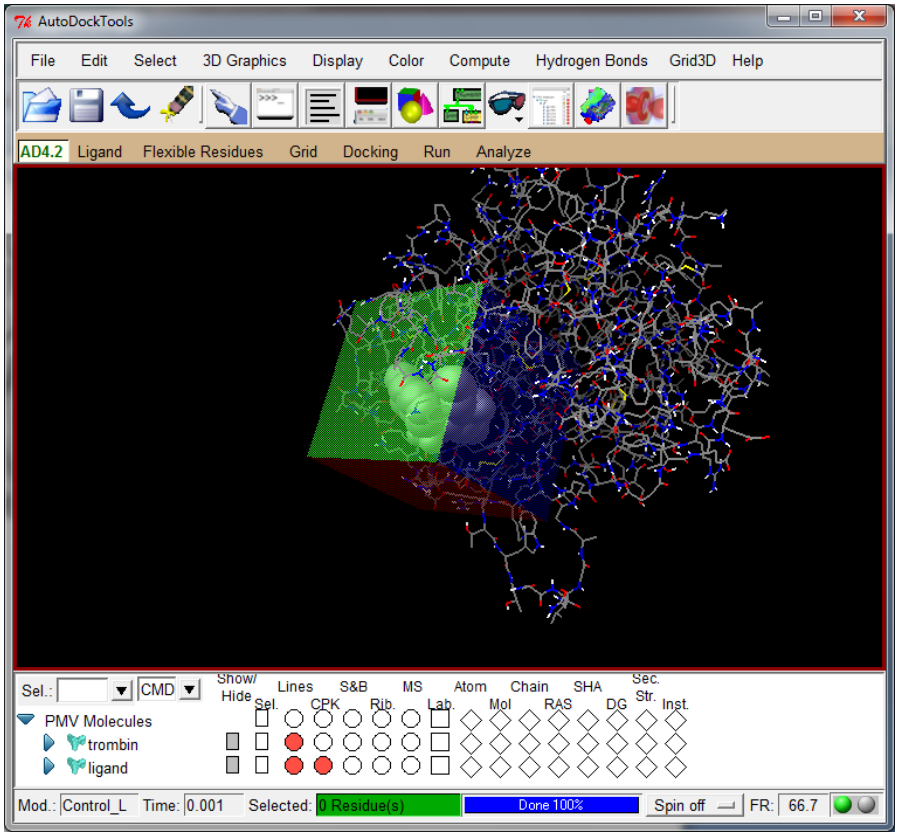
 **Alanin**	 **Arginin**
 **Asparajin**	 **Aspartik Asit**
 **Sistein**	 **Glütamik Asit**
 **Glütamin**	 **Glisin**

 **Histidin**	 **İzolösin**
 **Lösin**	 **Lizin**
 **Metiyonin**	 **Fenilalanin**
 **Prolin**	 **Serin**
 **Treonin**	 **Triptofan**

 **Tirozin**	 **Valin**

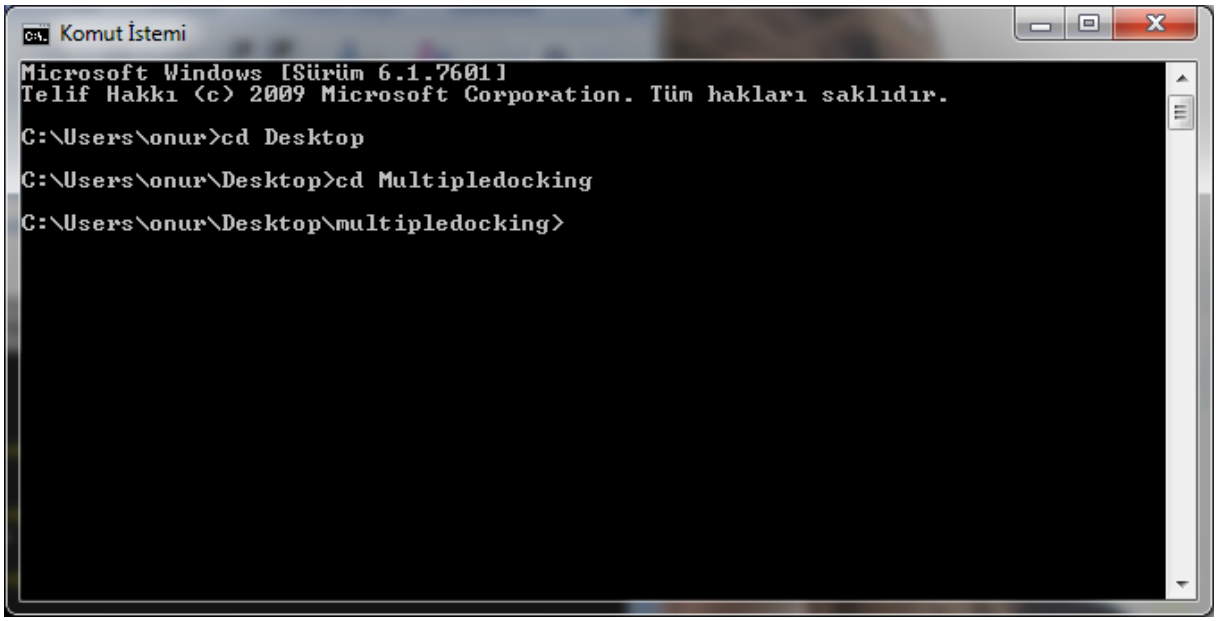
EK 2

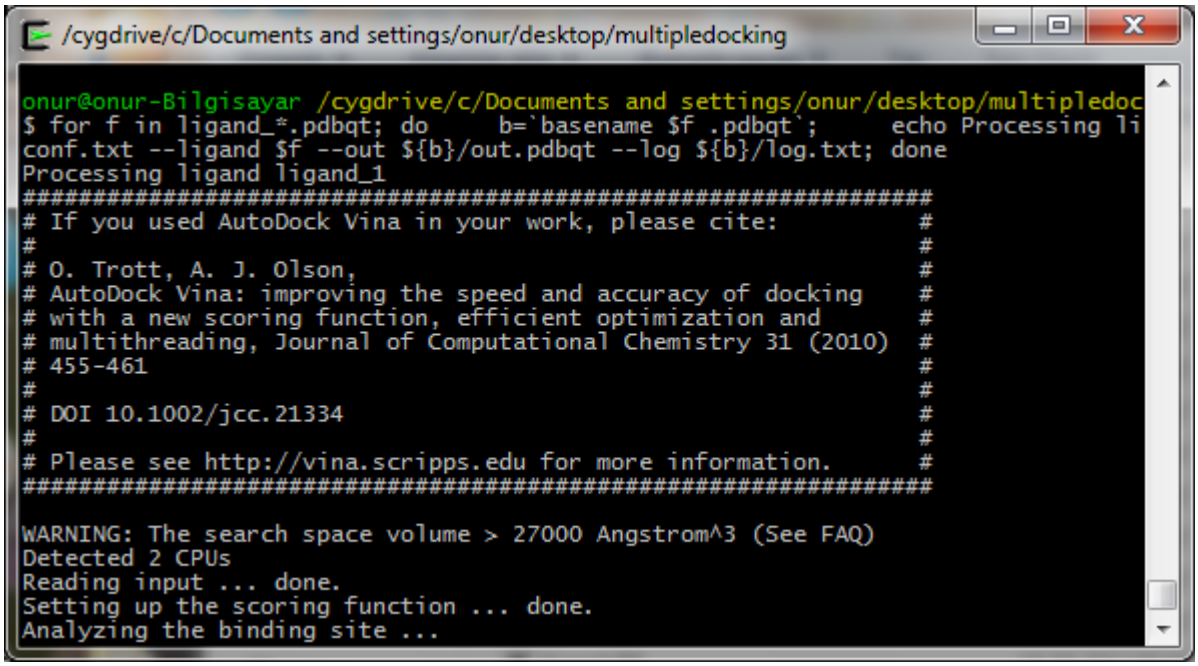
Autodock için Grid kutusu hazırlığı



EK 3

Görsel ligand taramasında doking işlemini otomatik hale getirebilmek için cygwin platformunda yazılan script





ÖZGEÇMİŞ

GENEL

AD SOYAD: Onur ÜLGEN	**Doğum Tarihi:** 13.11.1984
ADRES: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 06532 Beytepe/Ankara	
E-POSTA: onurulgen84@gmail.com	

EĞİTİM

TARİH	DERECE	OKUL	BÖLÜM
2009-2012	MSc.	Hacettepe Üniversitesi	Organik Kimya
2003-2008	BSc.	Hacettepe Üniversitesi	Kimya
1998-2002	Lise	Sokullu Mehmet Paşa Lisesi	

SUNUM

- Sözlü Sunum: HIV Fusion Inhibitors (Lisans Düzeyi, 2008)