

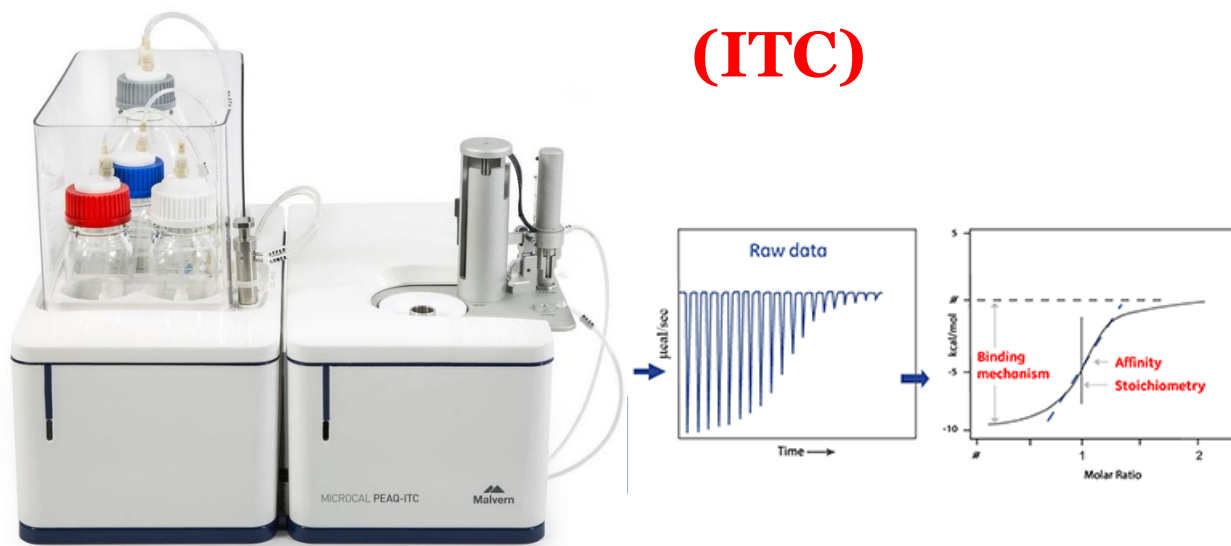
a.a. 2021-2022

# Corso di Chimica delle Macromolecole I

*Prof. R. Urbani*

*Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche*  
rurbani@units.it

## Calorimetria di Titolazione Isoterma (ITC)



# CALORIMETRIA

La calorimetria è una delle poche tecniche che ci permette di determinare, con un unico esperimento, tutti i parametri di associazione molecolare.

Verrà descritta la tecnica di:

## Calorimetria di Titolazione Isoterma (ITC)

La calorimetria di titolazione isoterma (ITC) è una tecnica termodinamica per studiare trasformazioni indotte da un reagente aggiunto al sistema (legante). E' molto usata per reazioni biochimiche.

L'ITC è l'unica tecnica che permette di determinare, con un unico esperimento, tutti i parametri di **binding** molecolare.

Senza la necessità di modificare le molecole mediante marcatura o immobilizzazione, l'ITC misura l'interazione tra le componenti nel loro stato nativo.

Quando il reagente è aggiunto, viene generato o acquisito del calore e la misura di questo calore permette la determinazione accurata della costante di legame (associazione) ( $K_B$ ), della stechiometria della reazione ( $n$ ), dell'entalpia ( $\Delta H$ ) e dell'entropia ( $\Delta S$ ), dando quindi un profilo termodinamico completo del sistema con un singolo esperimento.

Queste informazioni consentono di andare oltre alla sola affinità di legame: disponendo di una rappresentazione completa e dettagliata del profilo termodinamico dell'interazione è infatti possibile approfondire i meccanismi chimico-fisici che governano il fenomeno a livello molecolare.

Questa più profonda comprensione della relazione struttura-proprietà fornisce un valido supporto, per es., in qualsiasi processo decisionale nel design molecolare

## Le applicazioni della ITC

La calorimetria a titolazione isoterma trova applicazione in diversi settori quali, ad esempio, farmaceutico, diagnostico, genetico, nano tecnologico ed enzimatico.

Le informazioni che si possono ottenere grazie alla tecnica ITC sono di estrema importanza nel campo del drug discovery, della proteomica e in tutti quei settori dove risulta fondamentale approfondire affinità e meccanismi di interazione.

Tra le **principali applicazioni** si evidenziano:

- Quantificare l'affinità e la stechiometria di legame
- Caratterizzazione del meccanismo d'azione dell'interazione
- Conferma dell'affinità in studi di pre-formulazione
- Misura delle cinetiche enzimatiche
- **Qualsiasi tipologia di interazione** come ad esempio tra biomolecole e nanomateriali, tra enzima e substrato, metallo e complessante,....ecc..
- .....

# Vantaggi della tecnica ITC

- Tutti i parametri dell'interazione **in un unico esperimento**
- **Tecnica assoluta** basata sulla misura di una proprietà intrinseca del sistema osservato
- Profilo termodinamico **completo** ed esaustivo dell'interazione
- Impiego di molecole nel loro **stato nativo**, nessun marcatore o immobilizzazione
- Compatibilità con soluzioni torbide, colorate e con materiale particolato in sospensione
- Experimental design estremamente **semplificato**
- Nessun limite nel **peso molecolare** degli analiti
- **Tecnica non-distruttiva**
- Abbastanza veloce (0.5 – 2 ore)

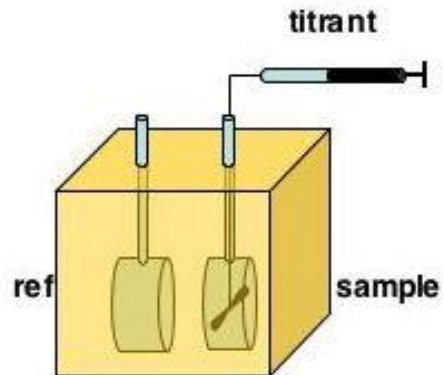
## Svantaggi della tecnica ITC

- Il calore è la **somma** di tutti gli eventuali contributi di più processi
- Richiesta di una **quantità** relativamente grande di campione
- Limitato intervallo misurabile di  $K_a$  (100-10 M<sup>-1</sup>)
- Scarse informazioni cinetiche

In un tipico esperimento ITC una soluzione di “macromolecola” viene titolata con un “ligando” introdotto con una siringa a temperatura costante.

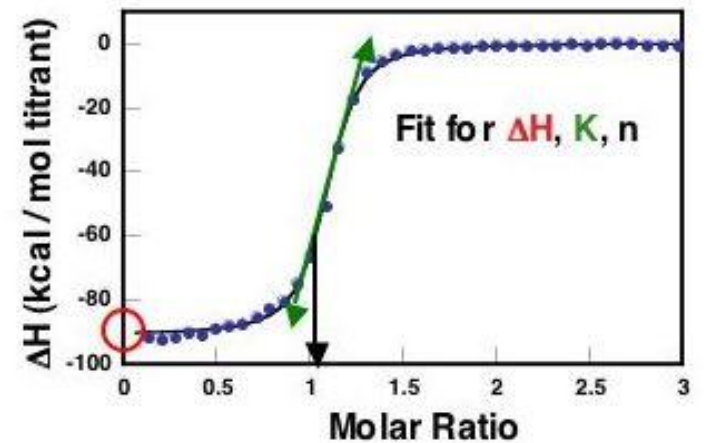
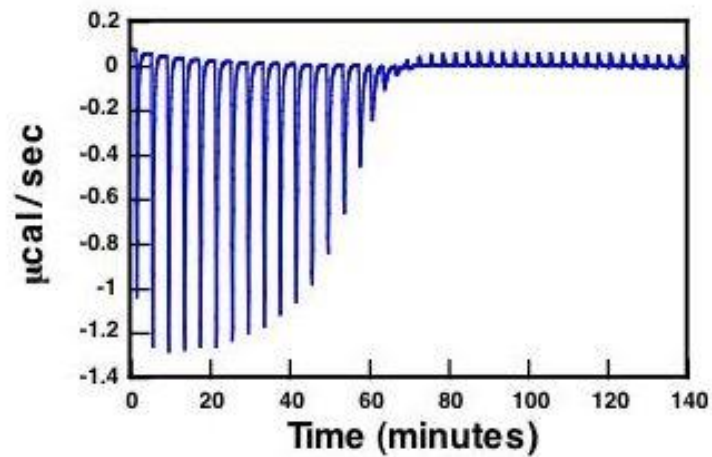
Quando il ligando è iniettato nella cella avviene l'interazione ed il calore svolto o acquistato è proporzionale alla quantità di legame formato.

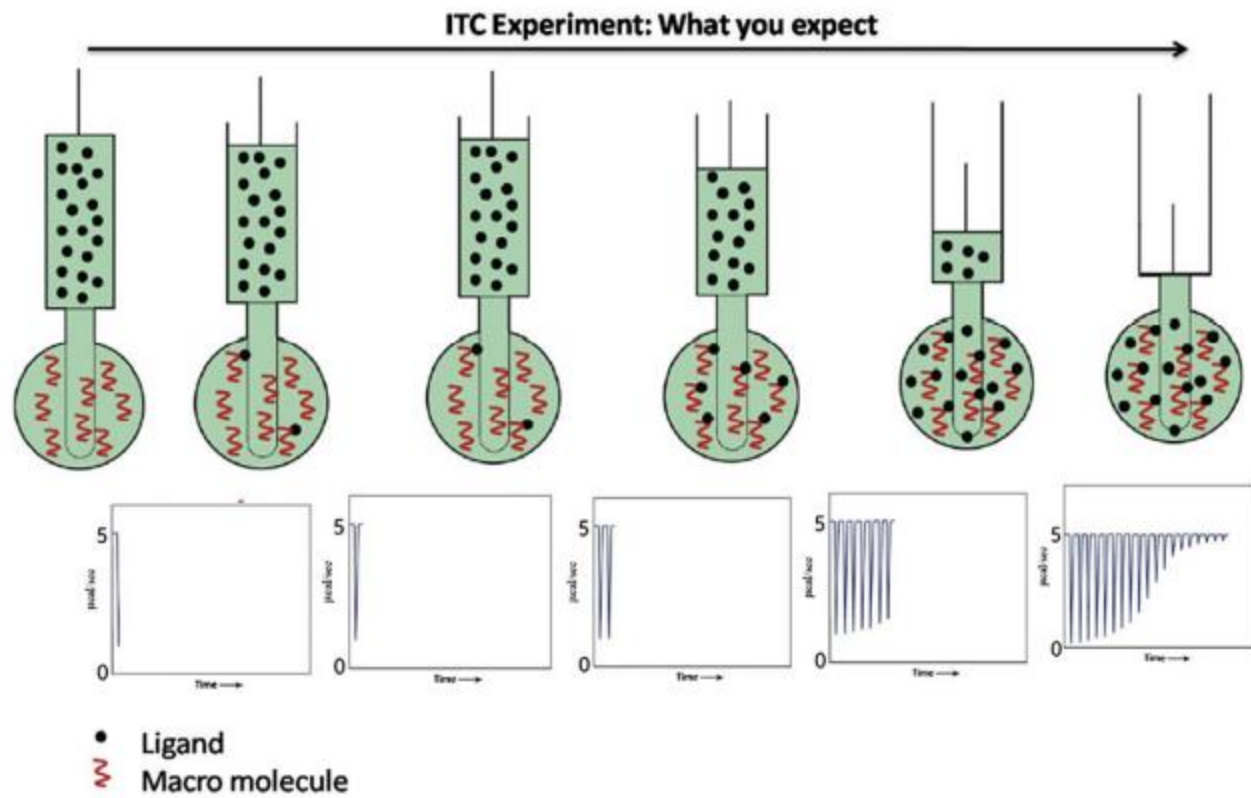
Quando la macromolecola nella cella è saturata dal ligando il segnale termico diminuisce fino al valore del calore di diluizione.



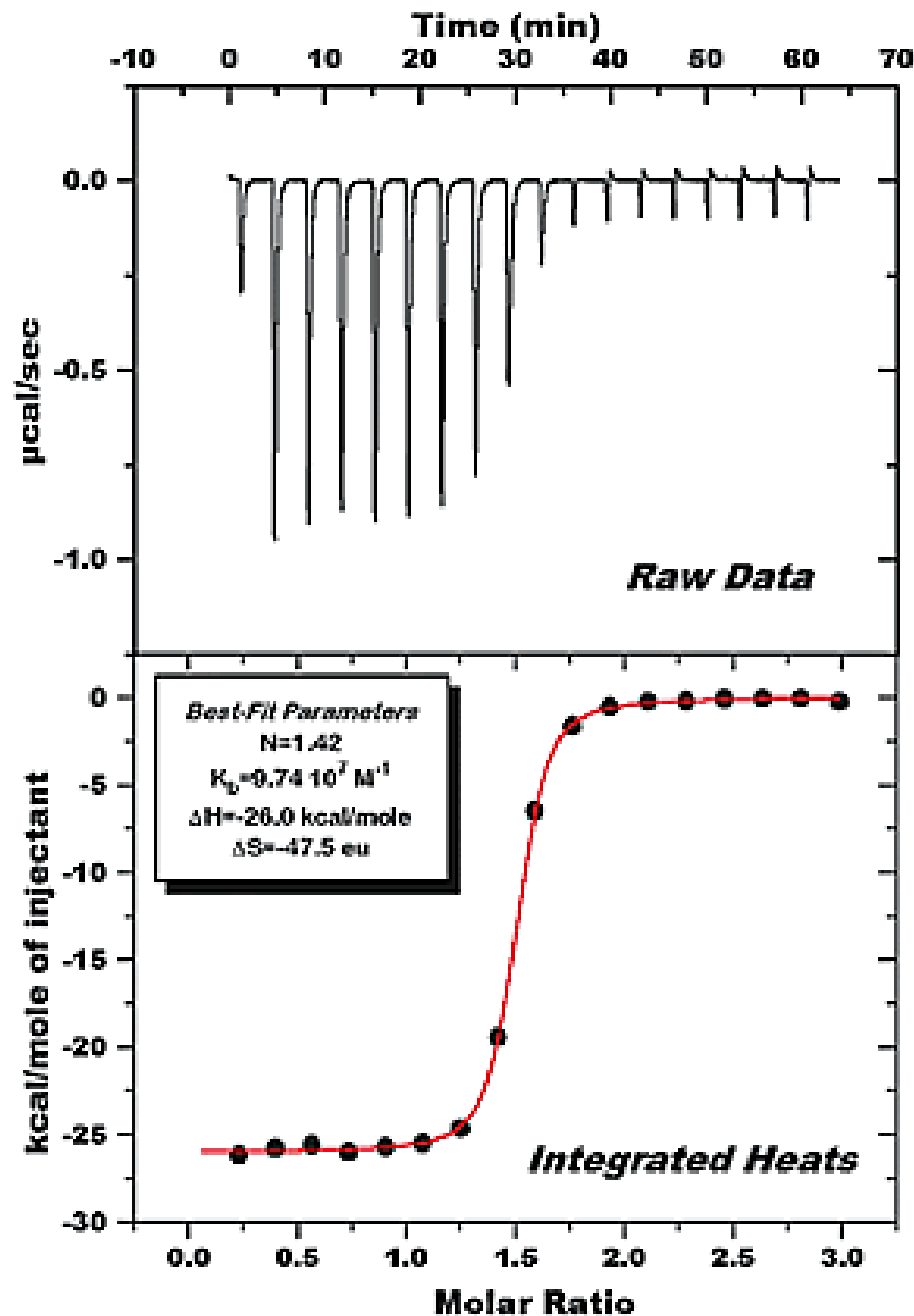
Data reflect sum of all heat taken up or evolved

Heat of binding  
Heat of folding  
Heat of mixing/dilution  
Heat from mechanical stirring





**Figure 9.4** Pictorial representation showing the stepwise progress of ITC experiment result.



## Esempio: titolazione di una proteina

Nell'esperimento in figura aliquote di ligando sono state aggiunte alla proteina.

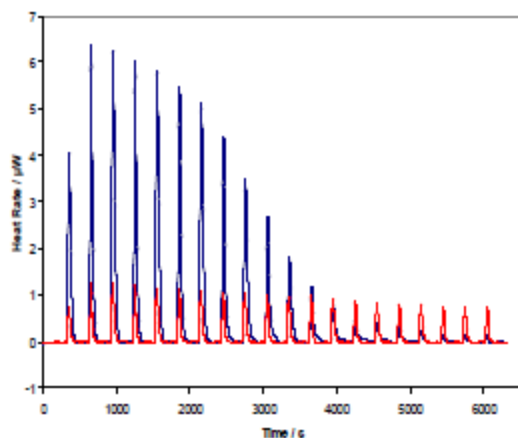
L'area relativa al segnale di ogni aggiunta (in alto) è proporzionale al calore totale rilasciato per ogni aggiunta.

Quando il **calore integrato** viene riportato in funzione del **rapporto molare tra ligando e macromolecola**, viene ottenuta l'isoterma di legame (in basso).

La curva interpolata (in rosso) permette di ottenere i migliori parametri termodinamici (stechiometria, costante di legame e entalpia del processo).

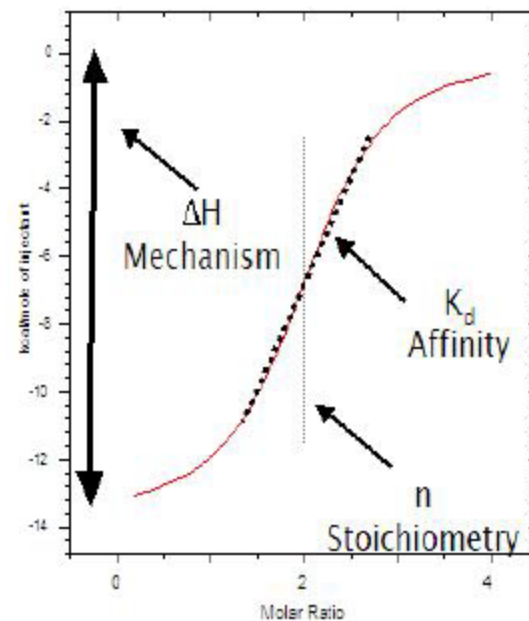
# Isothermal Titration Calorimetry

## Typical ITC Data



### ITC Strength:

- Direct measure of Enthalpy,  $\Delta H$
- Determine Binding affinity,  $K_a$
- Determine Stoichiometry,  $n$
- Determine Entropy,  $\Delta S$



La determinazione precisa della concentrazione di macromolecola e di substrato è importante.

La quantità di calore svolto per aggiunta del ligando è:

$$Q = \frac{V_o \Delta H_b [M_t] K_a [L]}{(1 + K_a [L])}$$

$V_o$  = volume della soluzione in cella

$\Delta H_b$  = entalpia per mole di ligando

$[M_t]$  = concentrazione totale di macromolecola

$K_a$  = costante di legame

$[L]$  = concentrazione di ligando libero

L'equazione è ricavata in questo modo:

$$K_a = \frac{[M_b]}{[M_f][L_f]} \quad Q = (\text{moli } M_b)\Delta H \quad \text{moli } M_b = [M_b]V_o$$

$$Q = [M_b]V_o \Delta H \quad [M_b] = K_a [M_f][L_f]$$

$$Q = V_o \Delta H K_a [L_f][M_f] \quad [M_f] = [M_t] - [M_b]$$

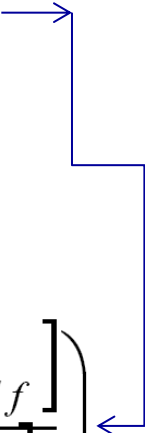
$$Q = V_o \Delta H K_a [L_f]([M_t] - [M_b])$$

$$K_a = \frac{[M_b]}{([M_t] - [M_b])[L_f]} \Rightarrow K_a [M_t][L_f] - K_a [M_b][L_f] = [M_b]$$

$$K_a[M_t][L_f] = [M_b](1 + K_a[L_f])$$

$$[M_b] = \frac{K_a[M_t][L_f]}{1 + K_a[L_f]}$$


$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f]([M_t] - [M_b])$$

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f] \left( [M_t] - \frac{K_a[M_t][L_f]}{1 + K_a[L_f]} \right)$$


$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f][M_t] \left( \frac{1 + K_a[L_f] - K_a[L_f]}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f][M_t] \left( \frac{1}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

## Importante:

Le equazioni sono ricavate in accordo con un modello di interazione.

Nel caso precedente: un unico sito di interazione per macromolecola.

Se più ligandi si legano alla macromolecola bisogna modificare l'equazione del Q inserendo la stechiometria con un modello di siti uguali ed indipendenti.

Se i siti sono  $n$  per ogni macromolecola:

$$Q = n \left( \text{moli } M_b \right) \Delta H \quad Q = V_o [M_t] n \Delta H K_a [L_f]$$

$$Q = n V_0 \Delta H K_a [L_f] [M_t] \left( \frac{1}{1 + K_a [L_f]} \right)$$

Per ottenere  $n$ ,  $K_a$  e  $\Delta H_b$ , l'equazione generale:

$$Q = nV_o[M_t]\Delta HK_a[L_f]\left(\frac{1}{1 + K_a[L_f]}\right)$$

viene espansa in termini di **concentrazione totale** di ligando  **$[L_t]$** :

$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n[M_b]$$

Per passare dalla prima alla seconda espressione:

$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n [M_b]$$

$$[M_b] = \frac{K_a [M_t] [L_f]}{1 + K_a [L_f]}$$

$$[M_b] = \frac{K_a [M_t] ([L_t] - n [M_b])}{1 + K_a ([L_t] - n [M_b])}$$

Da questa ultima espressione si ottiene una quadratica che risolta dà i valori di  $[M_b]$  (uno solo dei due ha senso fisico) che introdotti nella prima espressione danno il valore di  $[L_f]$  che può essere introdotto nell'espressione generale.

Le radici dell'espressione quadratica per  $[M_b]$ :

$$[M_b] = \frac{-(1 + K_a[L_t] + nK_a[M_t]) \pm \sqrt{(1 + K_a[L_t] + nK_a[M_t])^2 - 4nK_a^2[M_t][L_t]}}{-2nK_a}$$

Solo una delle due soluzioni avrà un valore positivo per  $[M_b]$ .

Essendo:

$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n[M_b]$$

Sostituendo nell'equazione di Q:

$$Q = nV_o[M_t]\Delta HK_a[L_f] \left( \frac{1}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

$$Q = \frac{n[M_t]\Delta H V_o}{2 \left\{ 1 + [L_t]/(n[M_t]) + 1/(nK_a[M_t]) - \left[ \left( 1 + [L_t]/(n[M_t]) + 1/(nK_a[M_t]) \right)^2 - 4[L_t]/(n[M_t]) \right]^{1/2} \right\}}$$

I parametri sono ottenuti con un metodo di fitting non-lineare come il Marquardt

Quali sono le migliori condizioni per ottenere accurati valori di  $K$ ,  $n$  e  $\Delta H$ ?

Per una buona determinazione, l'esperimento ITC deve essere condotto in condizioni alle quali:

- la variazione di calore è misurabile per ogni iniezione
- per successive iniezioni venga prodotto un termogramma curvo sigmoidale.

La prima condizione è ovvia, nel senso che si deve avere un sufficiente scambio di calore che sia misurabile.

Per la seconda condizione, la curvatura del termogramma è funzione della concentrazione di polimero  $[M_t]$  e della costante di equilibrio  $K_a$ .

Si utilizza il **parametro di Brandt**,  $c$  definito come  $c = K_a [M_t] n = [M_t] n / K_d$

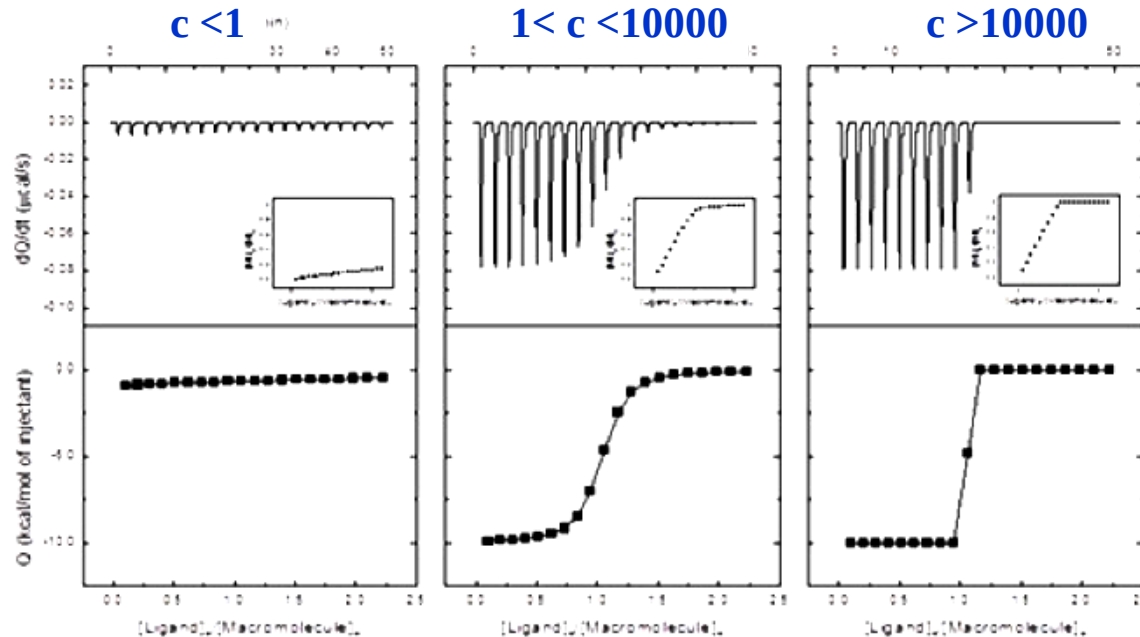
Per una determinazione accurata dei parametri di equilibrio è consigliato lavorare con  $c = 1 \div 10,000$ .

Valori piccoli di  $c$  ( $<1$ ) portano ad una zona di sigmoideale molto allargata (quasi lineare) dove è difficile valutare il punto di equivalenza (solo  $K_a$ ).

I valori di  $c$  e  $\Delta H$  determinano la forma dell'isoterma di *binding*

Valori grandi di  $c$  ( $>10000$ ) portano a pochi punti sperimentali nella zona di equivalenza (solo  $n$  e  $\Delta H$ )

$$c = K_a [M_t] n$$



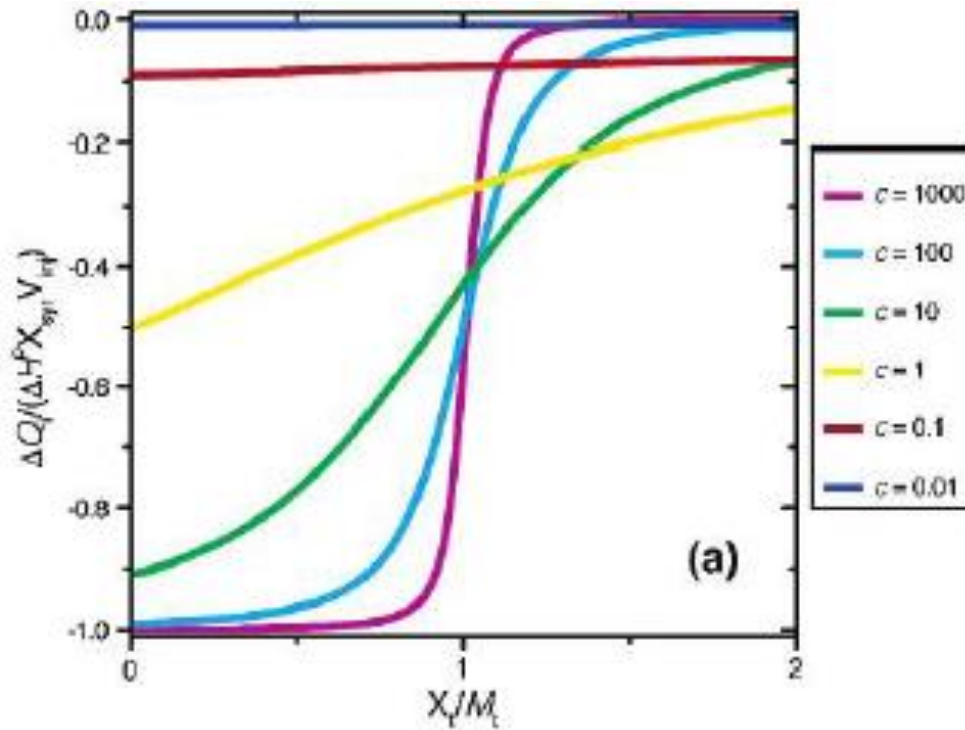
**Figure 3.** Calorimetric titrations at different  $c$  values: (left)  $c = 0.1$ ,  $K_a = 10^4 M^{-1}$ ; (middle)  $c = 100$ ,  $K_a = 10^7 M^{-1}$ ; (right)  $c = 100000$ ,  $K_a = 10^{10} M^{-1}$ . In all three cases:  $\Delta H = -10$  kcal/mol,  $[M]_0 = 10$  pM,  $[L]_0 = 100$  pM,  $V_0 = 0.2$  mL, and  $v = 2$  pL. Insets show the molar fraction of the macromolecule-ligand complex (macromolecule saturation) as the titration progresses.

In generale, per i polimeri con diversi siti di legame identici non interagenti:

$$c = nK_a[M]_t$$

Per valori di  $c$  superiori a circa **10**, la curva è chiaramente sigmoidale con una pendenza intorno al punto finale della titolazione che tende verso la verticale man mano che  $c$  si avvicina all'infinito.

La curva è ottimale nella cosiddetta "finestra sperimentale" di valori di  $c$  di **10-500**, mentre il processo di fitting non è fattibile per i casi in cui  $c < 10$ .



$$\frac{dQ}{d[L_t]} = \Delta H^\circ V_0 \left[ \frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R + r)^2 - 4X_R}} \right]$$

con

$$\frac{1}{r} = c = K_a[M]_t = \frac{[M]_t}{K_d}$$

$$X_R = \frac{[L_t]}{[M_t]}$$

Il parametro  $c$  è importante nell'analisi degli esperimenti ITC perché influenza:

- La forma delle curve di titolazione
- Le moli equivalenti del titolante necessari per saturare i siti di legame
- L'accuratezza dei parametri di *binding*  $n, K, \Delta H$

Esperimenti con reazioni che hanno una costante di equilibrio molto grande ( $K > 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) devono essere fatti **a basse concentrazioni di macromolecole** per produrre la necessaria curvatura nel termogramma ma **a concentrazioni abbastanza alte da produrre un calore misurabile**.

L'inverso è vero per i complessi deboli ( $K < 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) in quanto qui il problema è raggiungere concentrazioni di macromolecole dove la curvatura sia appropriata e dove i calori non siano troppo grandi per essere misurati accuratamente.

## **Analisi dei dati termodinamici**

1. Scelta del modello di binding: singolo sito, **n** siti identici, 2 siti indipendenti, binding sequenziale.
2. Fitting non-lineare dei dati, in cui la variabile dipendente (calore) viene definito in funzione di variabili indipendenti quali le moli del titolante ed altri parametri del modello (costanti di equilibrio ed equazioni di bilancio di massa)

La regressione non lineare con le equazioni del modello ci danno i migliori valori di  **$K$ ,  $n$  e  $\Delta H$** .

Il modello ci aiuta a comprendere la chimica, la biologia e la fisica del sistema considerato.

**«All models are wrong, but some are useful»**

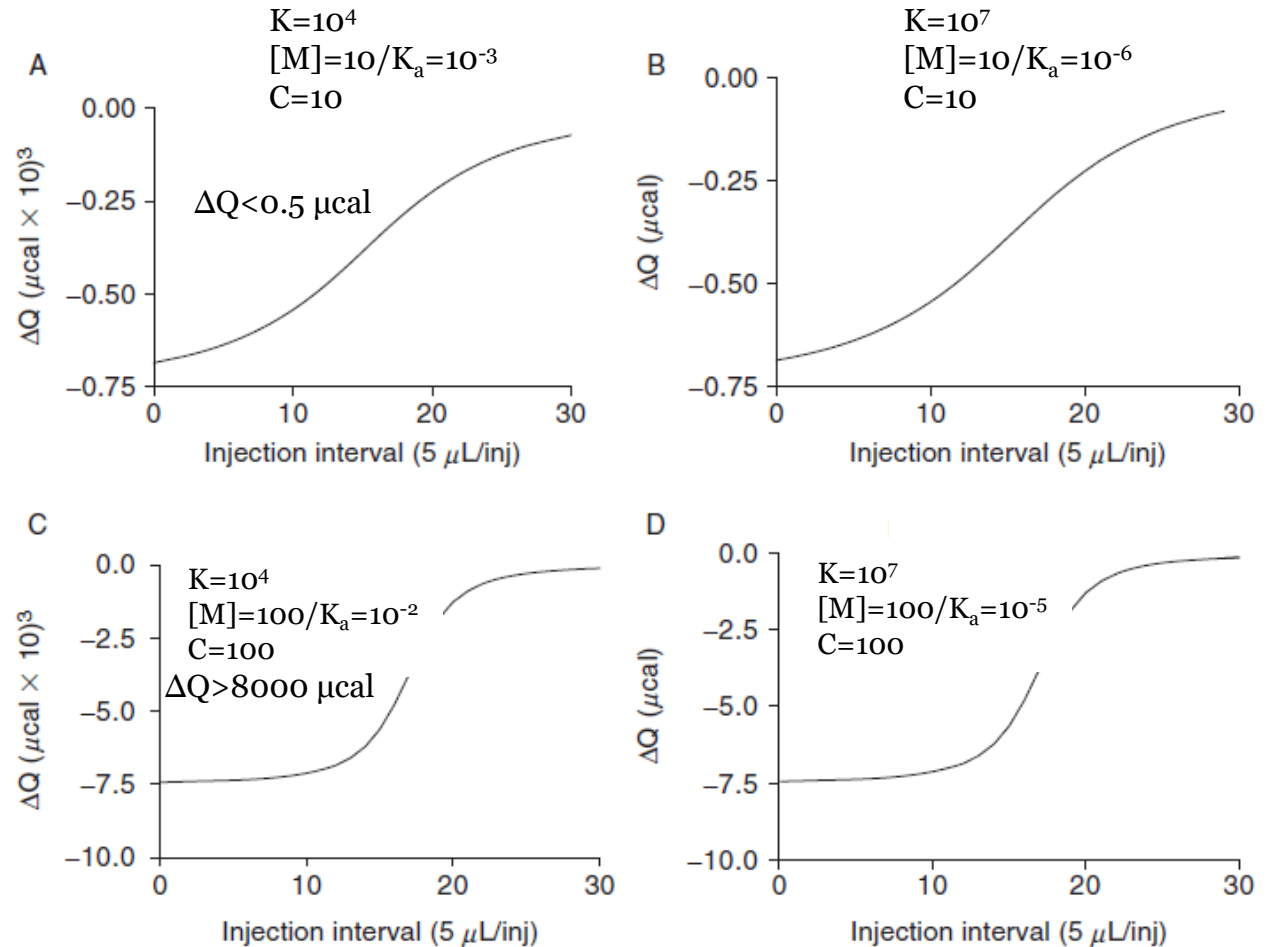
## Conclusione:

L'ITC è una tecnica potente per la caratterizzazione delle interazioni tra polimero e ligando e del meccanismo di interazione tra le specie con determinazione di:

- Relazione struttura-proprietà di polimeri
- Caratterizzazione del target farmacologico/biotecnologico
- Produzione ed ottimizzazione di nuovi farmaci
- Affinità e complessazione
- Costanti nell'interazione enzima-substrato
- ecc....



$$c = K_a [M_t]$$



**Fig. 4** Four plots demonstrating the relationship between curvature and experimental concentrations. The two top panels (A and B) are simulated with a “ $c$ ” parameter of 10, and the two bottom panels are simulated with a “ $c$ ” parameter of 100. Panels A and C represent a system with a fairly low  $K$  value of  $1 \times 10^4$ , while panels B and D represent a system with a more robust  $K$  value of  $1 \times 10^7$ .