

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ АСПИРИНА С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ МЕТОДАМИ ДОКИНГА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2025 г. В.Б. Лужков\*, #

\*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,  
просп. академика Семёнова, 1, Черноголовка, Московская область, 142432, Россия

#E-mail: vbl@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 09.07.2024 г.

После доработки 06.12.2024 г.

Принята к публикации 11.12.2024 г.

При исследовании взаимодействий биологически активных соединений с белками и прогнозировании распределения биологически активных соединений внутри организма важно учитывать возможность связывания нескольких молекул препарата с биологической мишенью. В настоящей работе проведено детальное вычислительное моделирование термодинамических характеристик последовательного связывания двух молекул нестероидного анестетика аспирина с обладающими различной афинностью известными центрами связывания лекарств 1–3 в сывороточном альбумине человека. Экспериментальная картина связывания аспирина с альбумином являлась неполной. Докинг аниона аспирина  $\text{Ac}^-$  с альбумином показал, что стабильность комплексов по сайтам посадки изменяется как  $1 > 3 > 2$ . Расчеты связывания методом молекулярной динамики дали уточненную картину, которая не содержит комплексов по центру 3. Свободные энергии связывания  $\Delta G_b$  были рассчитаны расширенным методом линейных энергий взаимодействия с дополнительным учетом вклада энтропии лигандов. Результаты показали, что наиболее выгодный путь образования комплексов состоит в связывании  $\text{Ac}^-$  в первый центр Сюдлова с  $\Delta G_{b1} = -8.2 \text{ ккал}\cdot\text{моль}^{-1}$  и далее во второй центр Сюдлова с  $\Delta G_{b2} = -4.5 \text{ ккал}\cdot\text{моль}^{-1}$ . Рассчитанные значения  $\Delta G_b$  согласуются с экспериментальными данными. Стехиометрия комплексов «альбумин– $\text{Ac}^-$ » равна 2. Показано существование отрицательного кооперативного эффекта при связывании двух лигандов  $\text{Ac}^-$ . Использованная вычислительная модель и подходы могут применяться в изучении множественного связывания биологически активных соединений, транспортируемых альбумином.

**Ключевые слова:** комплексы белок–лиганд, константа связывания, сывороточный альбумин, аспирин, молекулярная динамика.

**DOI:** 10.31857/S0006302925010048, **EDN:** LXMWBS

Сывороточный альбумин (СА) является ключевым белком-переносчиком химических соединений в организме человека и животных [1–8]. СА составляет до 60% белков плазмы и участвует в разнообразных физиологических процессах, включая поддержание осмотического давления и распределения жидкости, перенос метаболитов, антиоксидантное действие [1, 8]. СА представляет собой одноцепочечный белок и состоит из трех гомологичных доменов I–III и шести субдоменов, соединенных дисульфидными связями [1, 9]. Структура СА из различных организмов содержит около сотни отрицательно заряженных аминокислот при pH 7.0 и примерно такое же количе-

ство аминокислот с положительным зарядом. Присутствие такого большого количества заряженных групп обуславливает способность этого белка адсорбировать разнородные по строению и электрическому заряду молекулы на своей поверхности [1–6]. В частности, лекарственные соединения связываются по двум центрам Сюдлова (центры 1 и 2) и в дополнительном центре 3 [2, 4–6]. При этом СА способен образовывать комплексы с несколькими лигандами одновременно, действуя как молекулярная губка. Например, СА связывает вплоть до шести анионов жирных кислот [1] или до пяти катионных серонитрозильных комплексов железа [10]. Учет связывания с СА имеет большое значение при рассмотрении задач по адсорбции, распределению, метаболизму и выведению лекарств (ADME-свойства) и биологически активных соединений [2, 8]. Так, в

**Сокращения:** СА – сывороточный альбумин, Ас – аспирин, МД – молекулярная динамика, ЛЭВ – линейная энергия взаимодействия.

случае, когда лекарство слишком прочно связывается с СА, его биодоступность понижается и действие становится менее эффективным.

Детальную информацию по структуре и термодинамике связывания лекарственных соединений с сывороточным альбумином можно получить с помощью молекулярного моделирования. Подобные расчеты методами вычислительной химии, нашли широкое применение в изучении биохимических процессов (см., например, работы [11–13]). В настоящей работе хорошо известный нестероидный анестетик аспирин ( $\text{Ac}^-$ ) выбран как прототипический малый анионный лиганд, который эффективно связывается с СА [1, 6, 9, 14, 15]. Из тушения флуоресценции установлено, что СА человека связывает две молекулы  $\text{Ac}^-$ , были измерены константы их диссоциации [14]. В то же время, кристаллографические исследования показали связывание одной молекулы  $\text{Ac}^-$  в домене II СА [15], либо в доменах II и III [9], а салициловая кислота связывается в доменах I и II [15]. Для разрешения этого противоречия и нахождения центров посадки и стехиометрии связывания  $\text{Ac}^-$  в настоящей работе было проведено молекулярное моделирование строения и термодинамики комплексов СА с анионом аспирина  $\text{Ac}^-$ . В задачи исследования вошло также рассмотрение техники расчета свободных энергий связывания в случае нескольких лигандов и сравнение возможностей методов моделирования разного уровня. В представленной работе проведена автоматизированная стыковка (докинг) лиганда с белком, исследована молекулярная динамика (МД) в воде рассчитанных из докинга комплексов «белок–лиганд» и далее из траекторий МД определены термодинамические характеристики одно- и двухлигандных комплексов СА и  $\text{Ac}^-$ .

## МЕТОДЫ РАСЧЕТА

Исходная трехмерная структура СА организма человека была взята из координат атомов тройной системы «СА– $\text{Ac}^-$ –миристиновая кислота<sub>4</sub>» (2i2z.pdb) [15]. В структуре 2i2z.pdb приводятся координаты комплекса ацетилированного СА с салициловой кислотой (см. ниже рис. 4а). В данной работе ацетилированный остаток лизина ALY199 в 2i2z.pdb структуре белка был заменен на исходную аминокислоту K199 путем удаления атомов ацетильной группы и сохранением пространственных положений оставленных атомов лизина. Также из комплекса были удалены лиганда – салициловая и миристиновые кислоты. Протонируемые аминокислоты рассмотрены согласно их заряженным состояниям при pH 7, гистидины рассмотрены в нейтральном состоянии. В связи с низким р<sub>Ка</sub> ~3.5 карбоксильной группы

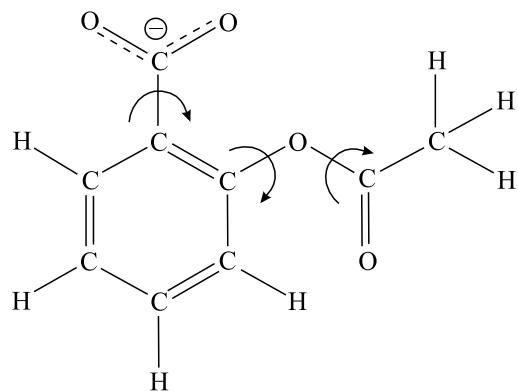


Рис. 1. Строение  $\text{Ac}^-$  (о-ацетилсалициловая кислота).

аспирин рассматривался в анионной форме  $\text{Ac}^-$ . Стыковку  $\text{Ac}^-$  с СА проводили по программам Dock6.9 [16, 17] и Chimera [18]. Структура белка была частично оптимизирована за 100 шагов для снятия напряжений и удаления плотных межатомных контактов. При оптимизации использовали силовое поле Amber ff14SB и обобщенную модель Борна для воды [19, 20]. Докинг проводили для гибкой структуры лиганда с учетом вращений по трем химическим связям в  $\text{Ac}^-$  (рис. 1) и с реоптимизацией геометрии  $\text{Ac}^-$  в центре связывания. Энергии неполярных и электростатических взаимодействий пробного атома с белком рассчитывали по сетке с шагом 0.25 Å в прямоугольном ящике с приблизительными размерами 97.6 × 71.8 × 100.0 Å, покрывающем все пространство белка. Диэлектрическая постоянная убывала от расстояния как  $4r$  в расчете электростатических взаимодействий «белок–лиганд».

Для аниона  $\text{Ac}^-$  в воде проведена полная оптимизация геометрии методом теории функционала плотности на уровне B3LYP/6-31+G(d,p) и с использованием модели поляризуемой непрерывной среды PCM–SMD [21]. В докинге и МД использовали потенциал-зависимые заряды (RESP) лиганда, рассчитанные на уровне HF/6-31G(d) [19, 20]. Квантово-химические расчеты проведены по программе Gaussian 09.

Молекулярная динамика комплексов «белок–лиганд» в воде была рассчитана при  $T = 300$  К для модельной системы со сферическими граничными условиями [22], общий вид которой приведен на рис. 2. Сферическая модель позволяет использовать меньшее число молекул воды по сравнению с моделью периодических прямоугольных ящиков. Радиус водной сферы составил ~60 Å, что соответствует полному покрытию СА водой с толщиной водной оболочки более 10 Å. Для нейтрализации полного электрического заряда системы из СА с одной и двумя молекулами  $\text{Ac}^-$

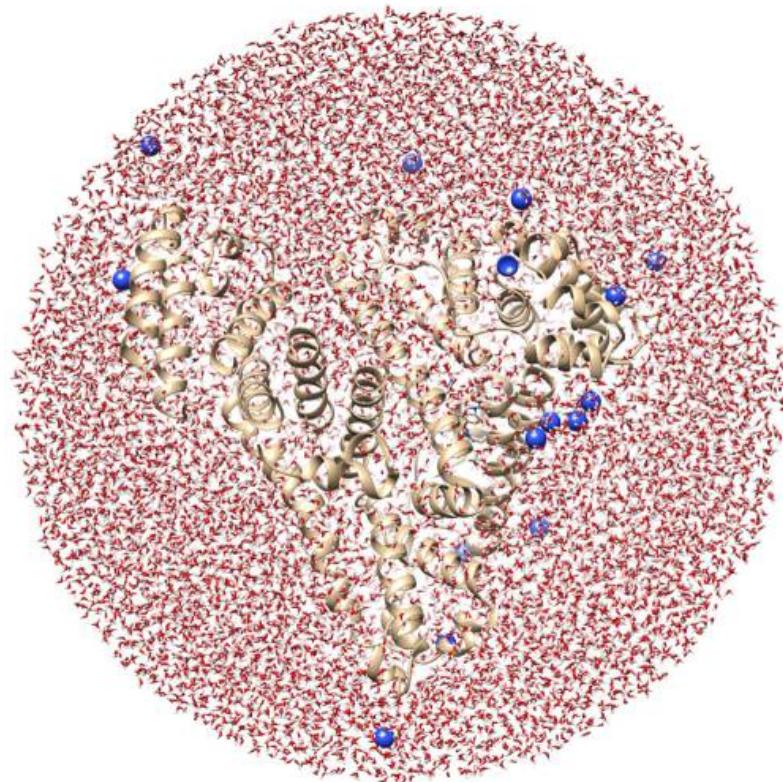


Рис. 2. Сферическая модель комплексов сывороточного альбумина с молекулами аспирина.

в использованную в МД модель были добавлены 16 и 17 атомов  $\text{Na}^+$  соответственно. Потенциальные энергии белка и лиганда рассчитывали с помощью силового поля OPLS-AA [23], для молекул  $\text{H}_2\text{O}$  был взят потенциал TIP3P. На атомы белка были наложены малые сдерживающие позиционные потенциалы 0.5 ккал·моль $^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$  для предотвращения флюктуаций структуры с большой амплитудой. Радиусы отсечения взаимодействий  $r_c$  между реперными атомами заряженных групп в подсистемах «вода–вода» и «вода–белок» составил 10 Å, для подсистемы «белок–белок» – 60 Å, для  $\text{Ac}^-$  учитывались все взаимодействия с окружением. Шаг МД в расчете микроскопической модели составлял 2 фс, температурная константа в термостате Беренсена равнялась 0.1 пс. Применили постепенный разогрев системы от 10 К до 300 К на начальном участке в 0.3 нс. Длина траекторий МД для достижения равновесия составляла 20–40 нс.

Свободные энергии связывания  $\Delta G_b$  были рассчитаны расширенным методом линейных энергий взаимодействия (ЛЭВ) с дополнительным учетом изменений внутренней энергии и энтропии лиганда. В исходном методе ЛЭВ  $\Delta G_b$  определяют из масштабированных разностей средних неполярных  $\langle U_{\text{L-s}}^{\text{vdw}} \rangle$  и электростатических  $\langle U_{\text{L-s}}^{\text{el}} \rangle$  энергий взаимодействия лиганда (L) с окружением (s) в связанном и несвязанном состояниях [24–26]. В качестве окружения выступает белок и вода (Pw) для связанного лиганда либо чистая вода (w) для несвязанного состояния. Метод ЛЭВ нашел широкое применение в расчетах свободных энергий связывания различных систем (см., например, работы [25–28]). Использованная в настоящей работе формула для  $\Delta G_b$  дополнительно содержит масштабированные разности электростатического  $\langle U_{\text{L}}^{\text{el}} \rangle$  и неполярного  $\langle U_{\text{L}}^{\text{vdw}} \rangle$  вкладов во внутреннюю энергию лиганда в комплексе PL и в водном растворе [29] и энтропийный вклад [30]:

$$\Delta G_b = \alpha(\langle U_{\text{L-s}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{Pw}} + \langle U_{\text{L}}^{\text{np}} \rangle_{\text{Pw}} - \langle U_{\text{L-s}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{w}} - \langle U_{\text{L}}^{\text{np}} \rangle_{\text{w}}) + \beta(\langle U_{\text{L-s}}^{\text{el}} \rangle_{\text{Pw}} + \langle U_{\text{L}}^{\text{el}} \rangle_{\text{Pw}} - \langle U_{\text{L-s}}^{\text{el}} \rangle_{\text{w}} - \langle U_{\text{L}}^{\text{el}} \rangle_{\text{w}}) - T\Delta S + \gamma. \quad (1)$$

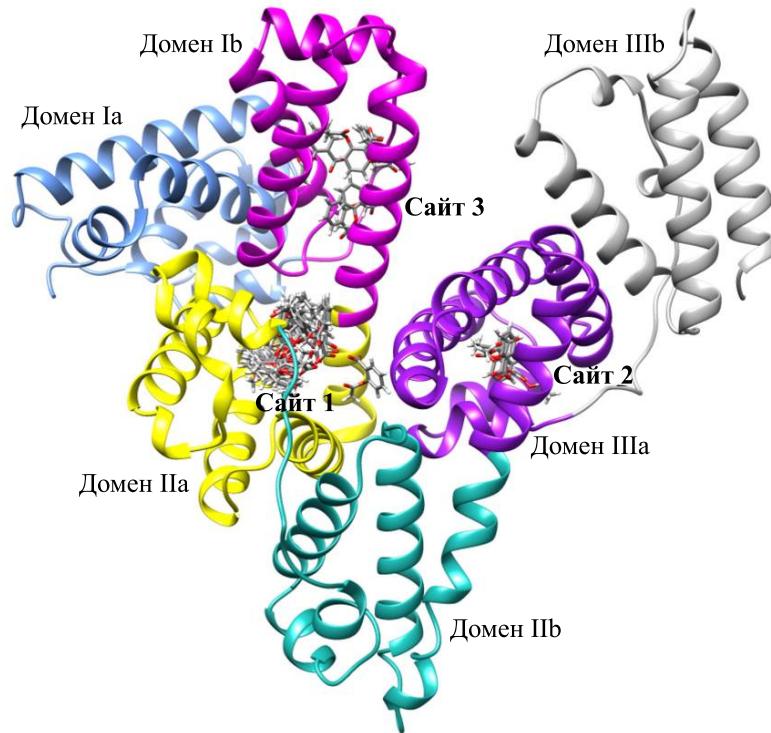


Рис. 3. Набор положений  $\text{Ac}^-$  в СА из докинга при  $r_c$  20 и 99 Å.

Вклад внутренней энергии дает оценку напряжений в структуре L при образовании комплекса «белок–лиганд». В неполярную внутреннюю энергию лиганда включены лишь несвязанные взаимодействия. Для масштабирующих коэффициентов использованы значения  $\alpha = 0.18$  и  $\beta = 0.50$  [24].

Энтропийный вклад  $T\Delta S$  включает слагаемые от потери поступательной ( $T\Delta S_{\text{trans}}$ ) и вращательной ( $T\Delta S_{\text{rot}}$ ) энтропии лиганда:

$$T\Delta S = T\Delta S_{\text{trans}} + T\Delta S_{\text{rot}}, \quad (2)$$

$$T\Delta S_{\text{trans}} = R\bar{V}\ln(V_{\text{site}}/V_0), \quad (3)$$

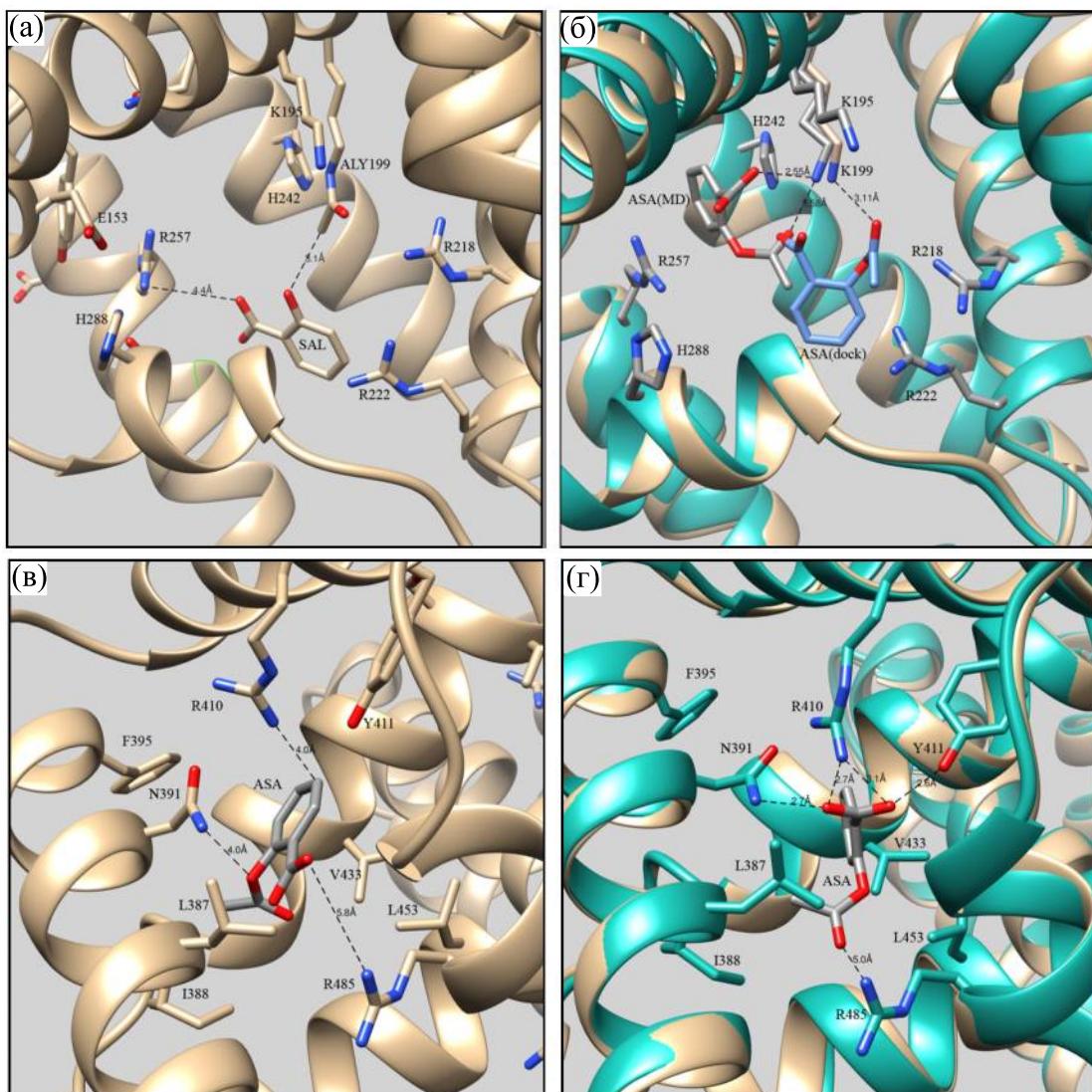
$$T\Delta S_{\text{rot}} = R\bar{V}\ln(S_{\text{orient}}/S_{\text{sph}}). \quad (4)$$

Вклад  $T\Delta S_{\text{trans}}$  рассчитывался для перехода из стандартного 1М-состояния в растворе (с объемом  $V_0 = 1660 \text{ \AA}^3$  на одну молекулу L) в центр связывания в PL с эффективным объемом  $V_{\text{site}}$ . Объем  $V_{\text{site}}$  оценивали из среднеквадратичного отклонения центра масс L от его среднего положения в кармане связывания. Вклад вращательной энтропии  $T\Delta S_{\text{rot}}$  оценивали из отношения площади  $S_{\text{orient}}$ , очерчиваемой вектором ориентации L на поверхности единичной сферы в комплексе PL, к площади этой сферы  $S_{\text{sph}} = 4\pi$ . Значения  $V_{\text{site}}$  и  $S_{\text{orient}}$  рассчитывали численно из координат вдоль траектории МД. Энергии и координаты лигандов

для расчета свободных энергий связывания собирали с шагом 10 и 20 фс на конечных 10 нс участках равновесных траекторий. Ошибку расчета  $\Delta G_b$  оценивали по разности средних значений на соседних 5 нс участках траекторий МД. Расчеты МД проведены по программе Q5 [25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Три основных известных центра связывания жирных кислот и лекарственных соединений разнесены по трем доменам СА [2, 4–6] (рис. 3). Сайт 1 расположен в субдомене IIa. Широкий вход в этот центр расположен между боковыми цепями E153, K195, R218, R222, H288, E292 и частично заслонен субдоменом IIIa (рис. 3). Полость сайта 1 содержит полярные аминокислотные остатки Q196, K199, H242, R257. Объем незанятого лигандом сайта 1 позволяет включать до 18 молекул воды по данным МД из этой работы. Сайт 2 расположен в субдомене IIIa (рис. 3). Вход в него ограничен боковыми цепями аминокислот L387, Q390, R410, K414, Ser489 и не закрыт другими субдоменами. Важную роль в связывании лигандов в сайте 2 играет остаток Тир411. Внутренний объем сайта 2 позволяет включать до 12 молекул воды. Сайт 3 расположен в домене Ib и формируется заряженными боковыми группами аминокислот R114, R117, E183, R186, K190 в своем внешнем контуре. Внутреннее пространство



**Рис. 4.** Связывание  $\text{Ac}^-$  с CA в сайте 1: (а) – экспериментальная структура комплекса салициловой кислоты (SAL) с ацетилированным в положении 199 CA; (б) – структуры комплекса CA– $\text{Ac}^-$  из докинга и МД, лиганд CA (ASA) из докинга (поза 2) дан синим цветом, ASA и боковые группы аминокислот из МД даны серым цветом. Связывание в сайте 2: (в) – структура комплекса CA– $\text{Ac}^-$  из докинга, (г) – структура комплекса CA– $\text{Ac}^-$  из МД. Для докинга построена структура мутанта ALY199K из 2i2z.pdb. Атомы Н не показаны.

сайта 3 включает ароматические группы Y138, H146, F157, Y161. Этот объемный сайт ранее был известен как место посадки жирных кислот FA1 [2, 5] и был позднее выделен как отдельный центр связывания лекарств (см., например, работу [5]).

**Стыковка аспирина с сывороточным альбумином.** Проведенный докинг для случая связывания одной молекулы  $\text{Ac}^-$  со свободной от лигандов формой белка показал, что  $\text{Ac}^-$  попадает только в указанные центры связывания и ни в какие другие места на поверхности CA (рис. 3). На качественном уровне такая картина связывания сохраняется при двух разных значениях радиуса отсечения взаимодействий  $r_c$  в комплексе «белок–

лиганд». В сайте 1 наиболее выгодные из докинга положения  $\text{Ac}^-$  соответствуют координации атомов О из  $-\text{COO}^-$  и  $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$  групп по  $-\text{NH}_3^+$  группе K199 (рис. 4б). При этом фенильный цикл в  $\text{Ac}^-$  сдвигается относительно положения салициловой кислоты в экспериментальной структуре 2i2z.pdb. Две приведенные в табл. 1 позы из сайта 1 различаются перестановкой положений  $-\text{COO}^-$  и  $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$  групп относительно ароматического кольца лиганда. В сайте 2  $\text{Ac}^-$  координируется атомами О с N391 и R485 (рис. 4в). В сайте 3  $\text{Ac}^-$  помещается между

Таблица 1. Энергетические характеристики комплексов «белок–лиганд» из докинга

Сайт	$G_{PL}^{el}$	$G_{PL}^{grid}$	$\Delta G_{PL}^{GBSA,el}$	$\Delta G_{PL}^{GBSA,sa}$	$\Delta G_b^{GBSA}$
1 (поза 1)	−17.7	−36.8	13.0	−3.9	−27.7
1 (поза 2)	−18.8	−35.6	5.7	−3.7	−33.6
2	−8.6	−35.1	50.0	−3.7	11.2
3	−12.5	−34.4	13.7	−3.7	−24.4

Примечание.  $G_{PL}^{grid}$  – свободная энергия взаимодействия P и L из расчета по сетке методом силового поля,  $G_{PL}^{grid}$  равна сумме вкладов электростатических ( $G_{PL}^{el}$ ) и ван-дер-ваальсовых ( $G_{PL}^{vdw}$ ) взаимодействий.  $\Delta G_{PL}^{GBSA,el}$  и  $\Delta G_{PL}^{GBSA,sa}$  – электростатический и неполярный вклады в свободную энергию сольватации, полученные из разности этих энергий для P, L и PL. Свободная энергия образования комплекса в воде ( $\Delta G_b^{GBSA}$ ) равна сумме вкладов:  $\Delta G_b^{GBSA} = \Delta G_{PL}^{grid} + \Delta G_{PL}^{GBSA,el} + \Delta G_{PL}^{GBSA,sa}$ . Радиус отсечения взаимодействий  $r_c = 20 \text{ \AA}$ . Размерность энергетических характеристик – ккал·моль<sup>−1</sup>.

параллельными фенильными кольцами остатков Y138 и Y161. Энергии взаимодействий «белок–лиганд» (без учета влияния воды) изменяются для низших по энергии комплексов в указанных центрах как  $−36.8(1) < −35.1(2) < −34.4(3)$  ккал·моль<sup>−1</sup> (табл. 1). Наибольшее число позиций лиганда и наиболее низкие энергии получены в сайте 1. Связывание в сайте 2 более выгодно, чем в сайте 3 за счет вклада ван-дер-ваальсовых взаимодействий между CA и Ac<sup>−</sup>. Однако при дополнительном учете влияния растворителя комплексы по сайту 2 имеют менее выгодную энергию связывания. В результате, свободные энергии комплексов CA–Ac<sup>−</sup> в воде снижаются в порядке  $−33.6(1) < −24.4(3) < 11.2(2)$  ккал·моль<sup>−1</sup> (табл. 1).

**Молекулярная динамика комплексов аспирина с сывороточным альбумином.** МД-расчеты комплексов CA–Ac<sup>−</sup> в воде показали заметные изменения их равновесных структур по сравнению со стартовыми структурами из докинга. Для наиболее выгодной по энергии из МД структуры комплекса 1, получаемой из позы 2 (рис. 4б), Ac<sup>−</sup> остается в объемном центре 1 в ходе достижения равновесия, но центр фенильной группы перемещается вглубь от входа на  $\sim 7 \text{ \AA}$  с сохранением координации карбоксильной и ацетильной групп с  $-\text{NH}_3^+$  группой K199 (рис. 4б). Такое перемещение указывает на то, что в растворе предреакционный комплекс в реакции ацетилирования может отличаться по структуре от комплекса, полученного из докинга, и от экспериментальной структуры продукта реакции, показанной на рис. 4а.

Положение Ac<sup>−</sup> в сайте 2 также значительно меняется в ходе МД относительно исходной структуры за счет поворота лиганда и изменения расположения его полярных групп (рис. 4в,г). После достижения равновесия  $-\text{COO}^-$  группа Ac<sup>−</sup> координируется с N391, R410 и Y411, а группа  $-\text{OC}(\text{=O})\text{CH}_3$  направлена в сторону R485 (рис. 4г). Наибольшие изменения картины связывания наблюдались для сайта 3. Для трех разных стартовых структур комплекса по сайту 3, полученных из докинга, расчет МД показал перемещение лиганда из сайта в водное пространство между доменами Ib и IIIa, т. е. специфическое связывание Ac<sup>−</sup> с сайтом 3 теряется в ходе МД.

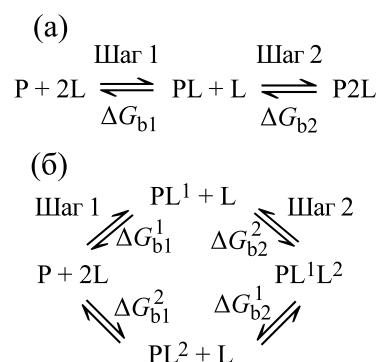


Схема 1 показывает (а) общую последовательность присоединения двух лигандов к белку без

Таблица 2. Свободные энергии связывания «белок–лиганд» из молекулярной динамики

Сайт	$\langle U_{\text{L-P}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{pw}}$	$\langle U_{\text{L-w}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{pw}}$	$\langle U_{\text{L-P}}^{\text{el}} \rangle_{\text{pw}}$	$\langle U_{\text{L-w}}^{\text{el}} \rangle_{\text{pw}}$	$\langle U_{\text{L}}^{\text{np}} \rangle_{\text{pw}}$	$\langle U_{\text{L}}^{\text{el}} \rangle_{\text{pw}}$	$T\Delta S_{\text{trans}}$	$T\Delta S_{\text{rot}}$	$\Delta G_{\text{b}}$
1 (2 <sup>W</sup> )	−14.8	3.1	−146.9	−126.7	23.4	−3.1	−4.3	−2.7	−8.2 ± 0.5
2 (1 <sup>W</sup> )	−18.4	3.6	−167.7	−95.7	21.9	−10.1	−6.2	−3.3	−4.8 ± 0.5
1 (2 <sup>L</sup> )	−14.6	2.9	−145.1	−126.4	23.4	−3.2	−4.9	−2.9	−6.3 ± 0.5
2 (1 <sup>L</sup> )	−18.7	4.3	−157.9	−104.3	22.1	−10.4	−6.1	−3.2	−4.5 ± 0.5

Примечание. Обозначения вкладов даны в разделе «Методы». В уравнении (1) коэффициент  $\gamma = 13.4$ . Размерность энергетических характеристик – ккал·моль<sup>−1</sup>. В столбце «Сайт» в скобках указана заселенность второго сопряженного сайта водой при связывании первого лиганда либо лигандом при связывании второго лиганда (схема 1б).

указания центра связывания и (б) картину детального равновесия при различении центров связывания. Представленные на схеме 1 шаги не учитывают образование ацетилированного по K199 альбумина, рассматриваемого в работах [1, 15], поскольку ацетилирование происходит не при всех экспериментальных условиях [14]. Экспериментальные измерения связывания  $\text{Ac}^-$  с СА дают эффективные константы связывания для двух последовательных шагов присоединения лиганда [14] по схеме 1а. Соответствующие значения свободных энергий, полученные методом Скэтчарда, равны  $\Delta G_{\text{b}1} = -5.8$  ккал·моль<sup>−1</sup> и  $\Delta G_{\text{b}2} = -4.5$  ккал·моль<sup>−1</sup> [14]. Вследствие неточности процедуры экстраполяции погрешность экспериментальных значений  $\Delta G_{\text{b}1}$  и  $\Delta G_{\text{b}2}$  в этом случае может составлять до 1.5 ккал·моль<sup>−1</sup>. Молекулярное моделирование позволяет определить свободные энергии и константы связывания для схемы детального равновесия, различающей возможные пути присоединения лиганда (схема 1б). Вклады в  $\Delta G_{\text{b}}$  были получены из траекторий МД комплексов СА–( $\text{Ac}^-$ )<sup>1</sup>, СА–( $\text{Ac}^-$ )<sup>2</sup>, СА–2( $\text{Ac}^-$ )<sup>1,2</sup> по сайтам 1 и 2 расширенным методом ЛЭВ. Калибровка значения  $\gamma$  проведена на основе экспериментального значения  $\Delta G_{\text{b}2}$ . Рассчитанные значения  $\Delta G_{\text{b}}$  на первом шаге в сайты 1 и 2 составили  $\Delta G_{\text{b}1}^1 = -8.2$  и  $\Delta G_{\text{b}1}^2 = -4.8$  ккал·моль<sup>−1</sup>, на втором шаге  $-\Delta G_{\text{b}2}^1 = -6.3$  и  $\Delta G_{\text{b}2}^2 = -4.5$  ккал·моль<sup>−1</sup> (табл. 2). Связывание первого лиганда в сайте 1 выгоднее, чем в сайте 2, на 3.4 ккал·моль<sup>−1</sup>. Энергии ван-дер-ваальсовых и полярных взаимодействий лиганда с белком и внутренняя энергия лиганда имеют более низкие значения в сайте 2, чем в сайте 1. Однако вклады энергий взаимодействия с водой и энтропийные

вклады делают в конечном итоге связывание  $\text{Ac}^-$  по сайту 1 более выгодным (табл. 2).

Первый путь на схеме 1б предполагает связывание  $\text{Ac}^-$  по сайту 1 и затем по сайту 2. Второй путь использует обратную последовательность центров посадки. Таким образом, наиболее вероятен путь, включающий посадку первого лиганда в сайт 1, а второго лиганда в сайт 2. Стхиометрия комплексов «белок–лиганд» в этом случае равна 2. В общем случае оба пути приводят к общей конечной точке и дают одинаковые изменения полной свободной энергии (см. обозначения в табл. 2):

$$\Delta G_{\text{b}1}(2^W) + \Delta G_{\text{b}2}(1^L) = \Delta G_{\text{b}1}(1^W) + \Delta G_{\text{b}2}(2^L). \quad (5)$$

В проведенных расчетах суммарные  $\Delta G_{\text{b}}$  по двум разным путям связывания различаются на 1.5 ккал·моль<sup>−1</sup>, что согласуется с совокупными ошибками измерения и расчетов.

Связывание второго аниона  $\text{Ac}^-$  с СА менее выгодно на 1.9 ккал·моль<sup>−1</sup> по первому сайту и на 0.3 ккал·моль<sup>−1</sup> по второму. Сдвиг свободных энергий  $\Delta\Delta G_{\text{b}1,\text{b}2}$  между связыванием первого и второго лиганда в одинаковом сайте в положительную сторону указывает на отрицательный кооперативный эффект связывания. При нулевом расхождении свободных энергии на шагах 1 и 2 значение рассчитанного кооперативного эффекта будет одинаковым для обоих сайтов:

$$\Delta\Delta G_{\text{b}1,\text{b}2} = \Delta G_{\text{b}1}(2^W) - \Delta G_{\text{b}2}(2^L) = \Delta G_{\text{b}1}(1^W) + \Delta G_{\text{b}2}(1^L). \quad (6)$$

Следует отметить, что из-за неэквивалентности центров связывания величина кооперативного эффекта, рассчитываемая по формуле (6), не равна разности экспериментальных значений свободных энергий на шаге 1 и 2 (см. схему 1а).

## ВЫВОДЫ

Проведенный докинг показал, что для аниона аспирина  $\text{Ac}^-$  допустима посадка в три центра связывания биологически активных соединений в СА. Последующие МД-расчеты комплексов «белок–лиганд» показали, что устойчивыми являются только комплексы по центрам связывания 1 и 2 Сюдлова, расположенным в субдоменах II и III. Расширенным методом ЛЭВ из траекторий МД получены свободные энергии для схемы детального равновесия при связывании лигандов по двум неэквивалентным центрам в белке. Предпочтительный путь связывания состоит в попадании первого лиганда в сайт 1, а второго лиганда в сайт 2. Равновесная структура предреакционного комплекса в сайте 1 отличается от структуры продуктов ацетилирования СА из кристаллографических данных 2i2z.pdb [15]. Относительные значения  $\Delta G_b$  согласуются с экспериментальными данными. Стхиометрия комплексов «белок–лиганд» равна 2. Показано существование отрицательного кооперативного эффекта при связывании двух молекул  $\text{Ac}^-$ .

Из проведенных исследований следует, что МД-расчеты дают достоверное описание структурных и термодинамических характеристик множественного связывания аспирина с альбумином, в то время как докинг единичного лиганда в этом случае дает общую картину возможных мест связывания на качественном уровне. Полученные подходы и результаты могут быть расширены на другие биологически активные соединения. В частности, значительный интерес представляет изучение множественного связывания с СА синтезируемых в ФИЦ ПХФиМХ РАН перспективных биологически активных соединений из класса серонитрозильных комплексов железа [10].

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (тема № 124020500019-2).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peters T. Jr. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications* (Academic Press, 1995).
- Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., and Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, **353**, 38–52 (2005). DOI: 10.1016/j.jmb.2005.07.075
- Curry S. Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 342–357 (2009).
- Yamasaki K., Chuang V. T. G., Maruyama T., and Otagiri M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1830**, 5435–5443 (2013). DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005
- Zsila F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. *Mol. Pharmaceut.*, **10**, 1668–1682 (2013). DOI: 10.1021/mp400027q
- Czub M. P., Handing K. B., Venkataramany B. S., Cooper D. R., Shabalin I. G., and Minor W. Albumin-based transport of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mammalian blood plasma. *J. Med. Chem.*, **63**, 6847–6862 (2020). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00225
- Spada A., Emami J., Tuszyński J. A., and Lavasanifar A. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Mol. Pharmaceut.*, **18**, 1862–1894 (2021). DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046
- Ribeiro A. G., Alves J. E. F., Soares J. C. S., dos Santos K. L., Jacob I. T. T., da Silva Ferreira C. J., dos Santos J. C., de Azevedo R. D. S., Almeida S. M. V., and de Lima M. C. A. Albumin roles in developing anticancer compounds. *Med. Chem. Res.*, **30**, 1469–1495 (2021). DOI: 10.1007/s00044-021-02748-z
- He X. M. and Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358**, 209–215 (1992).
- Pokidova O. V., Lughkov V. B., Emelyanova N. S., Krapivin V. B., Kotelnikov A. I., Sanina N. A., and Aldoshin S. M. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands. *Dalton Trans.*, **49**, 12674–12685 (2020). DOI: 10.1039/d0dt02452j
- Durrant J. D. and McCammon J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *DMC Biol.*, **9**, 71 (2011). DOI: 10.1186/1741-7007-9-71
- Лужков В. Б. Молекулярное моделирование и расчеты свободных энергий связывания белков и биологически активных соединений. *Усп. химии*, **86** (3), 211–230 (2017). DOI: 10.1070/RCR4610
- York D. M. Modern alchemical free energy methods for drug discovery explained. *ACS Phys. Chem. Au.*, **3**, 478–491 (2023). DOI: 10.1021/acsphyschemau.3c00033
- Bojko B., Sulkowska A., Maciazek M., Rownicka J., Njau F., and Sulkowski W. W. Changes of serum albumin affinity for aspirin induced by fatty acid. *J. Biol. Macromol.*, **42**, 314–323 (2008). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.11.002
- Yang F., Bian C., Zhu L., Zhao G., Huang Z., and Huang M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J. Struct. Biol.*, **157**, 348–355 (2007). DOI: 10.1016/j.jsb.2006.08.015

16. Brozell S. R., Mukherjee S., Baliaus T. E., Roe D. R., Case D. A., and Rizzo R. C. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26**, 749–773 (2012). DOI: 10.1007/s10822-012-9565-y
17. Allen W. J., Baliaus T. E., Mukherjee S., Brozell S. R., Moustakas D. T., Lang P. T., Case D. A., Kuntz I. D., and Rizzo R. C. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J. Comput. Chem.*, **36**, 1132–1156 (2015). DOI: 10.1002/jcc.23905
18. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., and Ferrin T. E. UCSF chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612 (2004). DOI: 10.1002/jcc.20084
19. Case D. A., Cheatham T., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M. Jr., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., and Woods R. The amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*, **26**, 1668–1688 (2005). DOI: 10.1002/jcc.20290
20. Maier J. A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., and Simmerling C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696–3713 (2015). DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255
21. Marenich V., Cramer C. J., and Truhlar D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 6378–6396 (2009). DOI: 10.1021/jp810292n
22. King G. and Warshel A. A surface constrained all-atom solvent model for effective simulations of polar solutions. *J. Chem. Phys.*, **91**, 3647–3661 (1989).
23. Kaminski G. A., Friesner R. A., Tirado-Rives J., and Jorgensen W. L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 6474–6487 (2001). DOI: 10.1021/jp003919d
24. Åqvist J., Medina C., and Samuelson J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.*, **7**, 385–391 (1994).
25. Marelius J., Kolmodin K., Feierberg I., and Åqvist J. Q. A molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. *J. Mol. Graph. Modelling*, **16**, 213–225 (1998).
26. Åqvist J., Luzhkov V., and Brandsdal B. Ligand binding affinities from MD simulations. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 358–365 (2002). DOI: 10.1021/ar010014p
27. Almlöf M., Andér M., and Åqvist J. Energetics of codon-anticodon recognition on the small ribosomal subunit. *Biochemistry*, **46**, 200–209 (2007). DOI: 10.1021/bi061713i
28. Luzhkov V., Decroly E., Canard B., Selisko B., and Åqvist J. Evaluation of adamantane derivatives as inhibitors of dengue virus mRNA cap methyltransferase by docking and molecular dynamics simulations. *Mol. Inf.*, **32**, 155–164 (2013). DOI: 10.1002/minf.201200107
29. Stjernschantz E., Marelius J., Medina C., Jacobsson M., Vermeulen N. P. E., and Oostenbrink C. Are automated molecular dynamics simulations and binding free energy calculations realistic tools in lead optimization? An evaluation of the linear interaction energy (LIE) method. *J. Chem. Inf. Model.*, **46**, 1972–1983 (2006). DOI: 10.1021/ci0601214
30. Singh N. and Warshel A. A comprehensive examination of the contributions to the binding entropy of protein–ligand complexes. *Proteins*, **78**, 1724–1735 (2010). DOI: 10.1002/prot.22689

## Computational Study of Polyligand Complexes of Aspirin with Human Serum Albumin Using Docking and Molecular Dynamics Methods

V. B. Luzhkov\*

\*Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

An important feature of biochemical reactions of molecules is the possibility of binding of several ligands to a biomolecular target. This effect should be taken into account in the analysis of protein–ligand interactions and in the estimates of drug distribution in the living systems. This work describes molecular simulations of successive parallel steps of binding of two aspirin (As) molecules at the known binding sites 1–3 of human serum albumin with differing affinity. The experimental data on multiple binding of aspirin to albumin is inconclusive. Docking of aspirin anion  $\text{As}^-$  to albumin predicts that stability of the complexes at the binding sites changes as  $1 > 3 > 2$ . Molecular dynamics simulations have further shown that the complexes at site 3 are unstable. The free energies of ligand binding  $\Delta G_b$  have been calculated using extended linear interaction energies method with additional contributions of the entropy of ligand binding. The results have shown that the most probable reaction path corresponds to binding of  $\text{As}^-$  at site 1 with  $\Delta G_{b1} = -8.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  and after that to site 2 with  $\Delta G_{b2} = -4.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ . The calculated values of  $\Delta G_b$  agree with the known experimental data. The stoichiometry of the albumin– $\text{As}^-$  complexes is 2. Negative cooperative effect is found for binding of two  $\text{As}^-$  molecules with albumin. The used molecular model and computational approaches can be further employed in the studies of binding of different medicinal molecules that are transported by serum albumin.

**Keywords:** protein–ligand complexes, binding constant, serum albumin, aspirin, molecular dynamics