

В. Б. Ларіонов¹, А. С. Акішева², М. Я. Головенко¹,
О. А. Макаренко², І. П. Валіводзь¹, Ж. М. Цапенко¹

Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну

¹Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського
Національної академії наук України, м. Одеса

²Одеський національний інститут ім. І. І. Мечникова

Ключові слова: докінг, пропоксазепам, похідні 1,4-бенздіазепіну, людський сироватковий альбумін, зв'язування

Знання просторової структури комплексів клітинних білків і мембранних рецепторів з лігандами є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів їхнього функціонування. Раціональний пошук і дизайн нових лікарських сполук також потребує структурної інформації щодо взаємодії прототипів ліків з білком-мішенню [1]. Нині методи комп'ютерного молекулярного моделювання є невід'ємною частиною фундаментальних досліджень, вкладених у вивчення молекулярних механізмів функціонування білків, і навіть прикладних проєктів. Метод молекулярного моделювання, метою якого є пошук найдостовірнішої орієнтації та конформації ліганду в центрі зв'язування білка-мішені, становить основну суть так званого молекулярного докінгу. Він дозволяє передбачати просторову структуру комплексу «рецептор-ліганд» і вільну енергію його утворення, виходячи з даних про просторову структуру рецептора. Завдяки цьому визначаються ключові амінокислотні залишки активного центру білка, що дозволяє вивчати структурно-динамічні

основи утворення комплексу «білок-ліганд» на атомному рівні; раціональний дизайн лігандів і/або рецепторів зі заздалегідь заданою селективністю, кінетичними властивостями тощо [2].

Людський сироватковий альбумін (ЛСА) є найпоширенішим білком плазми (36–50 г/л), що синтезується в печінці та має період напіввиведення 19 днів. ЛСА з молекулярною масою 67,5 кДа складається з 585 амінокислот і налічує 17 дисульфідних зв'язків [3]. Транспортування екзогенних та ендогенних сполук тривалий час розглядалось як головна функція сироваткового альбуміну [4]. Згодом були визначені інші важливі функції, такі як антиоксидантні властивості [5], здатність бути депо для оксиду азоту (NO) [6, 7], регуляція рівня глутатіону, активація ядерного фактора каппа в клітинах [8], які, проте, пов'язані з його здатністю зв'язувати низькомолекулярні сполуки [9]. Середній час існування альбуміну в крові становить до 25 діб, проте взаємодія з ушкоджуючими факторами знижує час його циркуляції [10]. Зворотна фіксація низькомолекулярних сполук на поверхні молекули сироваткового альбуміну певним чином стабілізує його структуру, внаслідок чого він більш тривалий час зберігає

свою нативну конформацію, не піддається денатурації. На підставі цього був навіть запропонований тест для скринінгу потенційних протизапальних засобів [11].

На молекулі ЛСА існує декілька первинних сайтів зв'язування. Поряд з такими, що здатні зв'язувати катіони й аніони (за рахунок електростатичних взаємодій), розташовано такі специфічні сайти, як індоліний, саліцилатний, білірубіновий та ібупрофеновий [12], у формуванні яких беруть участь водневі, Ван-дер-Ваальсові, гідрофобні взаємодії завдяки наявності залишків певних амінокислот. Саме тому визначення структури залишків амінокислот для опису взаємодії та передбачення ймовірних процесів конкуренції за місця зв'язування сполук-лігандів є необхідним у процесі створення нових лікарських засобів.

Сполука 7-бром-5-(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он (пропоксазепам), що була створена у Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України, на відміну від відомих похідних 1,4-бенздіазепіну, має переважно анальгетичні [13], а також певною мірою й протизапальні [14] властивості, що припускає периферичні механізми їхньої реалізації. Залученість до таких механізмів сироваткового альбуміну є дуже вірогідною як з огляду на протизапальні/антирадикальні властивості самого альбуміну, так і завдяки наявності високо-специфічних місць зв'язування похідних 1,4-бенздіазепіну (діазепіновий сайт) й, відповідно, стабілізації третинної структури макромолекули.

Мета дослідження – вивчення взаємодій пропоксазепаму та деяких похідних 1,4-бенздіазепіну з ЛСА методом молекулярного докінгу та аналіз складових цих взаємодій.

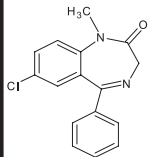
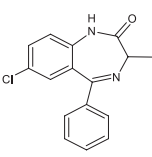
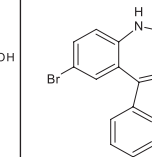
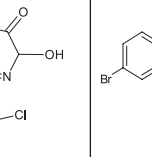
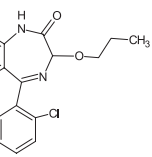
Матеріали та методи. Молекулярний докінг було проведено за допомогою програми iGEMDOCK v 2.1 [15, 16] і використання молекулярної структури ЛСА бази даних біологічних макромолекул (<http://www.rcsb.org/>), які являють собою комплекси ЛСА з діазепамом (2BXF) та ібупрофеном (2BXG). Структури лігандів (діазепам, оксазепам, пропоксазепам, 3-гідроксипропоксазепам, ібупрофен) оптимізовано за величиною внутрішньої енергії у програмі Avogadro (v 1.2.0) та алгоритму молекулярних силових полів Merck (MMFF94, 5000 ітерацій), наведених у форматі *.pdb.

Параметри докінгу (вільна енергія зв'язку, внесок окремих типів взаємодій) проводили на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій (generations) гнучких конформацій ліганду (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Автоматична детекція центра зв'язування визначена параметрами локалізації референтного ліганду (діазепам або ібупрофен); радіус центра зв'язування збільшено до 10 Å. Для загальної кристалічної структури ЛСА центр зв'язування не визначали для оцінки ймовірності взаємодії з іншими ділянками молекули. Візуалізацію результатів докінгу виконували з використанням ресурсу ezCADD [17, 18].

Результати та їх обговорення. Структури досліджуваних сполук (табл. 1) було попередньо підготовлено в програмі ChemAxon (MarvinSketch 21.7) та в подальшому піддано оптимізації в програмі Avogadro (v 1.2.0) на підставі силових полів MMFF94 для генерування найпридатнішої з енергетичної точки зору конформації для подальшого процесу докінгу.

За результатами докінгу було визначено величини загальної енергії

Структури досліджуваних сполук

Діазепам	Оксазепам	3-Гідрокси-пропoxсазепам	Пропоксазепам	Ібупрофен
				

взаємодії, а також її складових – Ван-дер-Ваальсової взаємодії та водневого зв'язку для пропоксазепаму, 3-гідроксипропоксазепаму, оксазепаму, діазепаму й ібупрофену з двома сайтами зв'язування ЛСА – діазепіновим та ібупрофеновим, референтними для яких виступали відповідні структури (табл. 2).

Взаємодія в кожному з місць зв'язування зумовлена внеском у загальний процес певних амінокислотних залишків, які визначають вид і силу взаємодії. Для їхньої характеристики було ідентифіковано залишки амінокислот, що мають найбільший внесок (сумарно > 50 %) у загальний ефект взаємодії кожної зі сполук. У діазепамовому сайті зв'язування визначено 13 амінокислотних залишків, що сумарно забезпечують від 55 до 65 % загальної взаємодії (табл. 3).

За аналізу ібупрофенового місця зв'язування виявлено 19 амінокислотних залишків, внесок яких становить від 55 до 79 % у загальний процес взаємодії (табл. 4).

В обох випадках переважно взаємодії здійснюються за рахунок слабких Ван-дер-Ваальсових сил, тоді як внесок більш міцного водневого зв'язку не перевищує 15 %.

Візуалізацію розташування окремих лігандів у сайтах зв'язування було здійснено для відповідних референтних сполук і пропоксазепаму (рисунок).

При співставленні даних докінгу було встановлено, що референтні сполуки діазепам та ібупрофен взаємодіють не тільки з власними місцями зв'язування, але й здатні до перехресних взаємодій (рисунок, в, г). Так, ібупрофен у діазепамовому сайті взаємодіє зі залишками амінокислот, що

Таблиця 2

Розрахована енергія взаємодії (загальна, Ван-дер-Ваальсова та водневий зв'язок) досліджуваних структур з людським сироватковим альбуміном у різних сайтах зв'язування

Ліганд	Енергія взаємодії залежно від місця зв'язування, ккал/моль					
	Загальна		Ван-дер-Ваальсова		Водневий	
	I	Д	I	Д	I	Д
3-Гідрокси-пропоксазепам	-6,95	-9,57	-5,96	-8,3	-1,55	-1,27
Діазепам	-7,32	-9,38	-7,09	-8,89	-0,23	-0,49
Ібупрофен	-6,89	-8,05	-6,64	-7,21	-0,25	-0,84
Оксазепам	-7,51	-8,39	-7,09	-7,95	-0,41	-0,44
Пропоксазепам	-7,51	-10,27	-6,05	-9,85	-0,9	-0,43

Примітка. I – сайт зв'язування з ібупрофеном, Д – сайт зв'язування з діазепамом.

Амінокислотні залишки діазепамового сайту, що мають найбільший внесок у зв'язуванні досліджуваних сполук з людським сироватковим альбуміном за рахунок водневих (H) і Ван-дер-Ваальсових (V) типів взаємодії

Сполука	3-Гідрокси-пропоксазепам	Діазепам	Ібупрофен	Оксазепам	Пропоксазепам
Загальна енергія взаємодії	-9,57	-9,38	-8,05	-8,39	-10,27
H-CYS-392	-0,487	-0,238	-0,239	-	-0,176
H-CYS-438	-0,25	-0,25	-0,25	-	-0,25
H-SER-489	-	-	-	-0,25	-
V-PRO-384	-0,106	-0,093	-0,302	-0,404	-0,139
V-LEU-387	-0,196	-0,319	-0,297	-0,468	-0,433
V-ILE-388	-0,636	-0,655	-0,258	-0,569	-0,691
V-ASN-391	-0,856	-1,096	-0,745	-0,957	-1,021
V-PHE-403	-0,463	-0,383	-0,269	-0,091	-0,512
V-VAL-433	-0,762	-0,742	-0,52	-0,281	-0,755
V-GLY-434	-0,366	-0,519	-0,317	-0,121	-0,428
V-GLU-450	-0,388	-0,229	-0,511	-0,21	-0,205
V-LEU-453	-0,547	-0,667	-0,338	-0,679	-0,667
V-ARG-485	-0,512	-0,521	-0,423	-1,258	-0,537

Примітка. Тут і в табл. 4: V – Ван-дер-Ваальсова взаємодія, H – водневий зв'язок.

беруть участь і в утворенні зв'язків з іншими тестовими сполуками (табл. 3), тоді як ібупрофеновий сайт є більш специфічним і демонструє лише однакові амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні, крім ібупрофену, переважно лише діазепаму та оксазепаму (табл. 4).

Місце фіксації похідних 1,4-бенздіазепіну зазвичай визначається як сайт II [19], є описаним і завдяки здатності з високою специфічністю зв'язувати деякі індолі сполуки та похідні бенздіазепіну ідентифікується як діазепамовий сайт. Оскільки пропоксазепам за своєю структурою відноситься до похідних 1,4-бенздіазепіну, то очікуваним є його більша спорідненість саме до цього сайту. Це зумовило вибір як цієї структури для досліджень молекулярного докінгу, так і референтної сполуки – діазепаму, для якого відома величи-

на константи зв'язування з ЛСА – $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [20].

Специфічність фармакологічного спектра дії пропоксазепаму, ймовірно, зумовлена присутністю в його структурі алкоксильного радикала, але в організмі одним з його метаболітів є дезалкілований 3-гідроксипропоксазепам, який також має аналгетичний ефект. Саме тому ця структура (табл. 1) також була піддана аналізу, як і відомий метаболіт діазепаму з гідроксигрупою в положенні «3» – оксазепам. До того ж, зазначені 3-гідрокси похідні відрізняються наявністю замісників галогенів (броду та хлору), які змінюють розмір молекули та її здатність до поляризації та, відповідно, утворення Ван-дер-Ваальсових взаємодій. З іншого боку, відомо, що ібупрофен є одним з нестероїдних протизапальних засобів, для якого описана здатність захисної дії ЛСА від теплової денату-

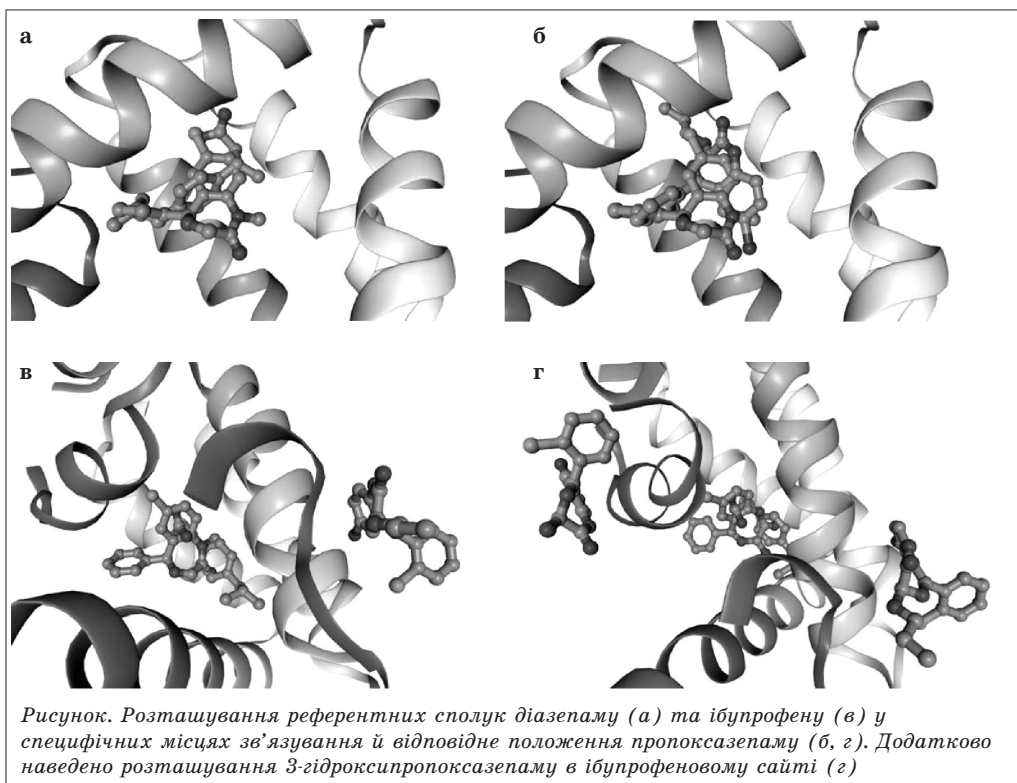
Амінокислотні залишки ібупрофенового сайту, що мають найбільший внесок у зв'язування досліджуваних сполук з людським сироватковим альбуміном за рахунок водневих (H) і Ван-дер-Ваальсових (V) типів взаємодії

Сполука	3-Гідрокси-пропксазепам	Діазепам	Ібупрофен	Оксазепам	Пропксазепам
Загальна енергія взаємодії	-6,95	-7,32	-6,89	-7,51	-7,51
H-ARG-218	–	–	–	–	-1,05
H-ASN-391	–	-0,23	–	-0,41	–
H-TYR-411	–	–	-0,25	–	–
H-ASP-451	–	–	–	–	-0,5
H-ASN-483	-0,9	–	–	–	–
V-LEU-387	–	-0,47	-0,05	-0,48	–
V-ASN-391	–	-0,59	-0,58	-0,63	–
V-PHE-403	–	-0,21	-0,49	-0,28	–
V-LEU-407	–	-0,45	-0,14	-0,41	–
V-ARG-410	–	-0,95	-0,33	-1,08	–
V-TYR-411	–	-0,64	-0,5	-0,45	–
V-LEU-430	–	-0,37	-0,75	-0,54	–
V-PRO-447	–	–	–	–	-0,78
V-CYS-448	–	–	–	–	-1,1
V-ASP-451	–	–	–	–	-0,45
V-TYR-452	–	–	–	–	-0,49
V-LEU-453	–	-0,59	-0,68	-0,79	–
V-SER-480	-0,42	–	–	–	–
V-ASN-483	-0,95	–	–	–	–
V-ARG-485	–	-0,44	-0,18	-0,37	–
V-PRO-486	-0,49	-0,06	–	-0,06	–
V-CYS-487	-0,95	-0,01	–	-0,01	–
V-SER-489	–	-0,55	-0,04	-0,49	–

рації та специфічний сайт зв'язування з константою $K_d = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ [21].

У класичному варіанті молекулярного докінгу завдання алгоритму конформаційного пошуку зводиться до перебору конформаційного простору комплексу за рахунок варіювання торсіонних кутів ліганду та його переміщення як цілого відносно нерухомої структури білка-мішені. Сучасні алгоритми конформаційного

пошуку в переважній більшості випадків знаходять конформації, близькі до експериментальних, за порівняно короткий час. Рентгеноструктурний аналіз кристалічного зразка пропксазепаму та його розшифрування за допомогою програми Platon показав [22] наявність двох компонентів, що утворюються за кристалізації. Сполука має хіральний центр при атомі C8 і кристалізується



в центросиметричній просторовій групі, формуючи, таким чином, кристали рацемату. У незалежній частині елементарного осередку виявлено дві молекули (А і Б) з різними конформаціями як молекули, так і хірального центру (молекула А з R-конфігурацією та молекула Б з S-конфігурацією).

У кристалі молекули А і Б, чергуючись, утворюють ланцюжки вздовж кристалографічного напрямку за рахунок міжмолекулярних водневих зв'язків N1a-H...N2b' H...N 2.24 Å NH...N 162°, N1b-H...N2a' (x-1, y, z) H...N 2.22 NH...N 173°.

Конформаційна рухливість ліганду при створенні комплексу, як правило, зумовлює процес його зв'язування. Тому в наших дослідженнях було враховано експериментальну конформацію пропоксазепаму, але параметри докінгу розраховувалися також на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій можливих гнучких конформацій ліганду, біля

300 станів у кожній генерації. Оціночні функції (ОФ) показують, яка з орієнтацій ліганду в сайті зв'язування рецептора найправдоподібніша або, якщо порівнюються кілька різних лігандів, – який з них має найбільшу спорідненість до білка-мішені. У нашому випадку було використано діазепам та ібупрофен як позитивний контроль. Зазвичай енергію зв'язування ліганду з рецептором розкладають на окремі незалежні терми, що відбивають різні фізичні взаємодії. Лінійна комбінація цих термів і є ОФ. Усі ОФ, що застосовуються в сучасних алгоритмах докінгу, можна умовно поділити на три типи: 1) засновані на силових полях, 2) емпіричні; 3) статистичні [23]. Оцінка енергії взаємодії рецептор-ліганд на основі силового поля здається найприроднішим підходом, оскільки терми силового поля безпосередньо відповідають тим чи іншим взаємодіям, що визначають молекулярне розпізнавання.

За величинами розрахованої загальної енергії зв'язування (табл. 2) референтні сполуки мають різні показники. Незважаючи на той факт, що вони демонструють перехресну спорідненість до сайтів зв'язування, діазепам з більшою ймовірністю здатний взаємодіяти з власним сайтом, про що свідчить значно більша величина від'ємної енергії взаємодії (табл. 2). Навпаки, ібупрофен (на підставі розрахованої енергії) здатний взаємодіяти з обома сайтами (– 8,05 ккал/моль та – 6,89 ккал/моль для діазепамового та ібупрофенового сайтів відповідно), що ймовірно зумовлює його досить високе значення константи дисоціації. Досліджувані сполуки більш схильні до взаємодії з бенздіазепіновим місцем зв'язування (табл. 2), при цьому енергія зв'язування пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) є найбільшою серед досліджуваних структур і навіть перевищує цей показник для референтної сполуки. Привертає до себе увагу те, що 3-гідроксипропоксазепам (– 9,57 ккал/моль) має співставну з діазепамом (– 9,38 ккал/моль) енергію зв'язку, тоді як близький за структурою до діазепаму оксазепам дещо нижчу (– 8,39 ккал/моль). Внесок водневих зв'язків у загальну взаємодію 3-гідроксипропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування є досить високим (– 1,27 ккал/моль і – 1,55 ккал/моль), що опосередковується не лише за рахунок гідроксигрупи в положенні 3 (для оксазепаму відповідні значення енергії водневого зв'язку складають – 0,44 ккал/моль і – 0,41 ккал/моль для діазепінового та ібупрофенового сайтів), але й внаслідок наявності атомів галогенів (бromу та хлору), що здатні утворювати Ван-дер-Ваальсові зв'язки та

певним чином «фіксувати» молекулу 3-гідроксипропоксазепаму в більш вигідному з енергетичної точки зору положенні. Результати таблиці 2 свідчать також про те, що Ван-дер-Ваальсові зв'язки є пріоритетними у взаємодії зазначених сполук з сайтами ЛСА завдяки присутності у молекулах груп, здатних до поляризації (галогени) та π - π взаємодій (ароматичні структури).

Відповідно до рівняння:

$$\Delta G = -RT \ln K_p$$

величина енергії зв'язування діазепаму, яка розрахована на підставі величини константи рівноваги ($K_p = 1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), складає – 6,92 ккал/моль, що є дещо нижчою за відповідні розраховані значення. Разом з тим, відповідне розраховане значення для ібупрофену складає – 8,59 ккал/моль, що є дуже близьким до отриманого в процесі докінгу. Загалом, на підставі даних референтних сполук можна визнати, що розраховані в процесі молекулярного докінгу характеристики зв'язування відповідають реальному, але з частковим завищенням даних для діазепамового сайту.

Найбільшу участь у процесах зв'язування сполук беруть залишки амінокислот, що формують Ван-дер-Ваальсові зв'язки в діазепамовому та ібупрофеновому сайтах (табл. 3, 4). Водневий зв'язок має місце виключно за участю трьох амінокислотних залишків (цистеїн 392 і 438, серін 489) у діазепамовому сайті та 5 залишків у ібупрофеновому (аргінін 218, аспарагін 391 і 483, тирозин 411 та аспарагін 451). В ібупрофеновому сайті кожна зі сполук взаємодіє з окремим залишком (виключенням є аспарагін 931, з яким взаємодіють діазепам та оксазепам). Зазначене дозволяє зробити висновок, що водневий зв'язок не є основним за умов

взаємодії з ібупрофеновим сайтом, а виявлені амінокислотні залишки, що утворюють водневий зв'язок, є індивідуальними для кожної сполуки. Навпаки, у діазепамовому сайті залишки цистеїну з порівняною ефективністю здатні утворювати зв'язки з усіма досліджуваними структурами, крім оксазепаму (табл. 3). До того ж, у діазепамовому сайті всі сполуки взаємодіють з амінокислотами за рахунок Ван-дер-Ваальсових сил, навіть аспарагін ASN-391. Вочевидь ароматичні фрагменти досліджуваних структур орієнтуються в порожнині таким чином, що енергетично вигідним стає утворення слабких зв'язків з більшою кількістю амінокислотних залишків. Висока полярність залишку аспарагіну підтверджує зазначене (табл. 3). Навпаки, той самий залишок у ібупрофеновому сайті бере участь в утворенні зв'язків лише з ібупрофеном, діазепамом та оксазепамом (табл. 4), а енергія цих взаємодій є нижчою порівняно з аналогічними показниками діазепамового сайту (табл. 3).

Ван-дер-Ваальсові взаємодії є найбільшими, що реалізуються в обох з розглянутих сайтів. Переважно це відбувається за участю гідрофобних лейцину (LEU-387 і LEU-430), ізoleyцину (ILE-388), валіну (VAL-433), фенілаланіну (PHE-403) і тирозину (TYR-411), які також здатні до π - π взаємодії з ароматичними фрагментами молекул (табл. 3, 4). Привертає увагу той факт, що пропоксазепам, який має високе значення вільної енергії зв'язку як у діазепамовому (10,27), так і в ібупрофеновому (7,51 ккал/моль) сайтах, в останньому взаємодіє з окремо розташованими більш полярними амінокислотними залишками (PRO-447, CYS-448, ASP-451, TYR-452). Суттєвою відзнакою пропоксазепаму від інших вико-

ристаних у дослідженні структур бензодіазепінів є наявність у положенні «3» алкоксигрупи, яка є не тільки дуже гідрофобною, але й рухомою, що може створювати труднощі при зв'язуванні в ділянці молекули ЛСА, що зв'язує ібупрофен, тому пропоксазепаму, імовірно, вигідніше з енергетичної точки зору використовувати інше місце зв'язування.

Візуалізацію результатів докінгу було продемонстровано на прикладі просторового розташування молекул ібупрофену та пропоксазепаму відносно молекули референтної сполуки в кожному з обраних сайтів (рисунок). За результатами аналізу було встановлено, що діазепам може розташовуватись щонайменше в двох положеннях, тому було обрано таке його розташування, що відповідає положенню в кристалічному зразку комплексу ЛСА з діазепамом. Слід зазначити, що ібупрофен з діазепамом розташовані в діазепамовому сайті таким чином, що їхні ароматичні фрагменти (π -електрони системи бензенових кілець) знаходяться в майже однаковому положенні (рисунок, а). У діазепамовому сайті пропоксазепам (рисунок, б) хоча й розташований у тій самій порожнині, але в іншому положенні, ніж діазепам, оскільки більш вигідним є розташування гнучкого алкоксильного радикала пропоксазепаму в частині порожнини, де звичайно знаходиться атом хлору діазепаму. Навпаки, полярний кисень карбонільної групи гетерокільця діазепаму більш схильний до полярних взаємодій, а розміщення в цьому положенні атома бромуму зумовлює його схильність до поляризації та диполь-дипольної взаємодії.

Навіть в ібупрофеновому сайті місця зв'язування ібупрофену та діазепаму розташовані в майже однаковому положенні (рисунок, в), тоді як

пропоксазепам вочевидь взаємодіє з іншим сайтом, але зі спільними амінокислотними залишками, як зазначалось (табл. 4). Показовим є також й те, що близький за структурою до пропоксазепаму 3-гідроксипропоксазепам має зовсім інше місце зв'язування на протилежній ділянці ібупрофенового сайту (рисунок, г).

Загалом діазепамовий сайт є більш специфічним, оскільки всі структури, як виявилось у процесі докінгу, локалізувались у подібних положеннях (ілюстрацію візуалізації не наведено) та використовували для взаємодії всі визначені найвигідніші енергетично амінокислотні залишки (табл. 3). На відміну від цього, ібупрофеновий сайт є менш специфічним, залучає меншу кількість амінокислотних залишків для реалізації взаємодії з лігандами та в цілому демонструє меншу загальну енергію зв'язку. Виходячи з порівняльних характеристик докінгу сполук у діазепамовому та ібупрофеновому сайтах, можна зробити висновок, що взаємодія похідних 1,4-бенздіазепіну (зокрема, пропоксазепаму) з ЛСА є більш ефективною, тому що вони мають не тільки більшу енергію взаємодії, але й здатні зв'язуватись у декількох альтернативних місцях, тому кінцевий результат – стабілізація молекули ЛСА – може

бути більш виразним. Поясненням цьому є той факт, що в тесті теплової денатурації зазначені сполуки демонструють більший ефект (нижчі значення IC_{50}), ніж ібупрофен [24].

Висновки

1. За результатами молекулярного докінгу до діазепамового та ібупрофенового сайтів зв'язування ЛСА з референтними сполуками – діазепамом та ібупрофеном – було встановлено, що вони демонструють перехресну спорідненість до сайтів зв'язування, хоча діазепам демонструє більше значення енергії взаємодії (– 9,38 ккал/моль) з власним сайтом, ніж з ібупрофеновим (– 7,32 ккал/моль).
2. Енергія зв'язування з діазепамовим сайтом для пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) є найбільшою серед досліджуваних структур і навіть перевищує цей показник для діазепаму, а його положення відрізняється утворенням зв'язків з атомом бромом (положення «7») на відміну від діазепаму, який взаємодіє через кисень карбонільної групи гетерокільця. В ібупрофеновому місці зв'язування пропоксазепам вочевидь взаємодіє з іншим сайтом, але зі спільними амінокислотними залишками.

1. Pinzi L., Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (18). P. 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>. PMID: 31487867. PMCID: PMC6769923.
2. Consensus Analyses in Molecular Docking Studies Applied to Medicinal Chemistry. M. Dos Santos Maia, G. C. Soares Rodrigues, A. B. Silva Cavalcanti et al. *Mini Rev. Med. Chem.* 2020. V. 20 (14). P. 1322–1340. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200204121129>. PMID: 32013847.
3. Kragh-Hansen U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish medical bulletin.* 1990. V. 37 (1). P. 57–84.
4. Пшенкина Н. Н. Структура альбумина и транспорт лекарств. *Медицинский академический журнал.* 2011. Т. 11, № 3. С. 3–15. <https://doi.org/10.17816/MAJ1133-15>.
5. Specific antioxidant properties of human serum albumin. M. Taverna, A. L. Marie, J. P. Mira, B. Guidet. *Ann. Intensive Care.* 2013. V. 3 (1). P. 4. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-4>. PMID: 23414610. PMCID: PMC3577569.
6. Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99 (9). P. 5913–5918. <https://doi.org/10.1073/pnas.092048999>. PMID: 11983891. PMCID: PMC122876.
7. Human serum albumin: from bench to bedside. G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza et al. *Mol. Aspects Med.* 2012. V. 33 (3). P. 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.

8. Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation. A. M. Cantin, B. Paquette, M. Richter, P. Larivée. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. V. 162 (4 Pt 1). P. 1539–1546. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9910106>. PMID: 11029374.
9. Oettl K., Stauber R. E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.* 2007. V. 151 (5). P. 580–590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>. PMID: 17471184. PMCID: PMC2013999.
10. Клигуненко Е. Н., Жозуля О. А. Человеческий сывороточный альбумин (прошлое и будущее). *Медицина неотложных состояний*. 2017. № 5 (84). С. 26–31.
11. Inhibition of heat-induced denaturation of albumin by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): pharmacological implications. L. Saso, G. Valentini, M. L. Casini et al. *Arch. Pharm. Res.* 2001. V. 24 (2). P. 150–158. <https://doi.org/10.1007/BF02976483>. PMID: 11339635.
12. Peters Jr T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic press, 1995. 432 p. ISBN 0-12-552110-3.
13. Evidence for the involvement of the GABA-ergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats. M. Golovenko, A. Reder, S. Andronati, V. Larionov. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2019. V. 13 (3). P. 99–105.
14. Antiinflammatory effects of propoxazepam on different models of inflammation. N. Y. Golovenko, T. A. Kabanova, S. A. Andronati et al. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2020. V. 5 (2). P. 105–112. <https://doi.org/http://doi.org/10.11603/ijmmr.2413-6077.2019.2.10900>.
15. Yang J.-M., Chen C.-C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2004. V. 55. P. 288–304.
16. Consensus Scoring Criteria for Improving Enrichment in Virtual Screening. J.-M. Yang, Y.-F. Chen, T.-W. Shen et al. *J. Chem. Inf. Model.* 2005. V. 45 (4). P. 1134–1146.
17. ezCADD: A Rapid 2D/3D Visualization-Enabled Web Modeling Environment for Democratizing Computer-Aided Drug Design. A. Tao, Y. Huang, Y. Shinohara et al. *Journal of chemical information and modeling*. 2019. V. 59 (1). P. 18–24. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00633>.
18. <http://dxulab.pharmacy.isu.edu/curry/ezCADD/main.html>.
19. Fehske K. J., Müller W. E., Wollert U. The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.* 1981. V. 30, № 7. P. 687–692.
20. Binding of δ 9-tetrahydrocannabinol and diazepam to human serum albumin. G. Fanali, Y. Cao, P. Ascenzi et al. *IUBMB Life*. 2011. V. 63 (6). P. 446–451. <https://doi.org/10.1002/iub.466>.
21. Multiple binding modes of ibuprofen in human serum albumin identified by absolute binding free energy calculations. S. Evoli, D. L. Mobley, R. Guzzi, B. Rizzuti. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*. 2016. V. 18 (47). P. 32358–32368. <https://doi.org/10.1039/c6cp05680f>.
22. Larionov V. B., Golovenko M. Ya., Reder A. S. Propoxazepam conformation and its orientation in the GABAA-receptor binding site. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 1 (54). С. 10–17.
23. Tuccinardi T. Docking-based virtual screening: recent developments. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2009. V. 12 (3). P. 303–314. <https://doi.org/10.2174/138620709787581666>. PMID: 19275536.
24. Інгибування термінодукованої денатурації білкового сироваткового альбуміну пропоксазепамом та її фармакологічні наслідки. В. Б. Ларіонов, В. С. Акішева, М. Я. Головенко та ін. *Доп. НАН України*. 2022. 3. С. 96–103.

**В. Б. Ларіонов, А. С. Акішева, М. Я. Головенко, О. А. Макаренко,
І. П. Валіводзь, Ж. М. Цапенко**

Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну

Мета дослідження – вивчення взаємодій пропоксазепаму та деяких похідних 1,4-бенздіазепіну з людським сироватковим альбуміном методом молекулярного докінгу та аналіз складових цих взаємодій.

Молекулярний докінг було проведено за допомогою програми iGEMDOCK v2.1, структури альбуміну (з діазепамом (2BXF) та ібупрофеном (2BXG)) отримані з бази даних біологічних макромолекул (<http://www.rcsb.org/>). Структури лігандів (діазепам, оксазепам, пропоксазепам, 3-гідроксипропоксазепам, ібупрофен) оптимізовано за величиною внутрішньої енергії в програмі Avogadro (v 1.2.0) і наведено у форматі *.pdb. Візуалізацію результатів докінгу виконано з використанням ресурсу ezCADD.

Сполуки демонструють перехресну спорідненість до сайтів зв'язування, але більш схильні до взаємодії з бенздіазепіновим місцем зв'язування, при цьому енергія зв'язування пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) є найбільшою серед досліджуваних структур і навіть перевищує цей показник для діазепаму. Розраховані в процесі молекулярного докінгу характеристики зв'язування відповідають реальним, але з частковим завищенням даних для діазепамового сайту.

За результатами молекулярно докінгу до діазепамового та ібупрофенового сайтів зв'язування людського сироваткового альбуміну з референтними сполуками – діазепамом та ібупрофеном – було встановлено, що сполуки демонструють перехресну спорідненість до сайтів зв'язування, хоча

діазепам демонструє більше значення енергії взаємодії (– 9,38 ккал/моль) з власним сайтом, ніж з ібупрофеновим (– 7,32 ккал/моль).

Енергія зв'язування з діазепамовим сайтом для пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) є найбільшою серед досліджуваних структур і навіть перевищує цей показник для діазепаму, а його положення відрізняється утворенням зв'язків з атомом брома (положення «7») на відміну від діазепаму, який взаємодіє через кисень карбонільної групи гетерокольця. В ібупрофеновому місці зв'язування пропоксазепам явно взаємодіє з іншим сайтом, але зі спільними амінокислотними залишками.

Ключові слова: докінг, пропоксазепам, похідні 1,4-бездіазепіну, людський сироватковий альбумін, зв'язування

V. B. Lariionov, A. S. Akisheva, N. Ya. Golovenko, O. A. Makarenko, I. P. Valivodz', Zh. N. Tsapenko

Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим і ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну

Цель исследования – изучение взаимодействий пропоксазепаму и некоторых производных 1,4-бензодиазепина с человеческим сывороточным альбумином методом молекулярного докинга и анализ составляющих этих взаимодействий.

Молекулярный докинг был проведен с помощью программы iGEMDOCK v 2.1, структуры альбумина (с диазепамом (2BXF) и ибупрофеном (2BXG)) получены из базы данных биологических макромолекул (<http://www.rcsb.org/>). Структуры лигандов (диазепам, оксазепам, пропоксазепам, 3-гидроксипропоксазепам, ибупрофен) оптимизированы по величине внутренней энергии в программе Avogadro (v 1.2.0) и представлены в формате *.pdb. Визуализация результатов докинга осуществлена с использованием ресурса ezCADD.

Соединения демонстрируют перекрестное родство к сайтам связывания, но более склонны к взаимодействию с бензодиазепиновым местом связывания, при этом энергия связывания пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) является наибольшей среди исследуемых структур и даже превышает этот показатель для диазепаму. Рассчитанные в процессе молекулярного докинга характеристики связывания соответствуют реальным, но с частичным завышением данных для диазепамового сайта.

По результатам молекулярного докинга к диазепамовому и ибупрофеновому сайтам связывания сывороточного человеческого альбумина с референтными соединениями – диазепамом и ибупрофеном было установлено, что соединения демонстрируют перекрестное родство к сайтам связывания, хотя диазепам демонстрирует большее значение энергии взаимодействия (– 9,38 ккал/моль) с собственным сайтом, чем с ибупрофеновым (– 7,32 ккал/моль).

Енергія зв'язування з діазепамовим сайтом для пропоксазепаму (– 10,27 ккал/моль) є найбільшою серед вивчених структур і навіть перевищує цей показник для діазепаму, а його положення відрізняється утворенням зв'язків з атомом брома (положення «7») в отличие от диазепаму, взаємодіючого через кисень карбонільної групи гетерокольця. В ібупрофеновому місці зв'язування пропоксазепам явно взаємодіє з другим сайтом, але з общими амінокислотними залишками.

Ключевые слова: докинг, пропоксазепам, производные 1,4-бензодиазепина, человеческий сывороточный альбумин, связывание

V. B. Larionov, A. S. Akisheva, M. Ya. Golovenko, O. A. Makarenko, I. P. Valivodz', Zh. M. Tsapenko

Docking analysis of the interaction of propoxazepam with diazepam and ibuprofen binding sites of human serum albumin

The aim of the study – to research the interactions of propoxazepam and some 1,4-benzodiazepine derivatives with human serum albumin by molecular docking and analysis of the components of these interactions.

Molecular docking was carried out using the iGEMDOCK v 2.1 program, albumin structures (with diazepam (2BXF) and ibuprofen (2BXG)) were obtained from a database of biological macromolecules (<http://www.rcsb.org/>). Structures of ligands (diazepam, oxazepam, propoxazepam, 3-hydroxypropoxazepam, ibuprofen) were optimized for internal energy in Avogadro (v 1.2.0) and presented in *.pdb format. Visualization of docking results was carried out using the ezCADD resource.

The compounds show cross-affinity for binding sites, but are more prone to interact with the benzodiazepine binding site, while the binding energy of propoxazepam (– 10.27 kcal/mol) is the highest among the studied structures and even exceeds this indicator for diazepam. The binding characteristics calculated in the process of molecular docking correspond to the real ones, but with a partial overestimation of the data for the diazepam site.

According to the results of molecular docking to the diazepam and ibuprofen binding sites of human serum albumin with the reference compounds – diazepam and ibuprofen, it was found that the compounds show

cross-relatedness to the binding sites, although diazepam shows a higher interaction energy (– 9.38 kcal/mol) with its own site than with ibuprofen's (– 7.32 kcal/mol).

The energy of binding to the diazepam site for propoxazepam (– 10.27 kcal/mol) is the highest among the studied structures and even exceeds this indicator for diazepam, and its position differs in the formation of bonds with the bromine atom (position «7»), in contrast to diazepam, which interacts through the oxygen of the carbonyl group of the hetero ring. At the ibuprofen binding site, propoxazepam clearly interacts with a different site, but with common amino acid residues.

Key words: docking, propoxazepam, 1.4-benzodiazepine derivatives, human serum albumin, binding

ORCID ID авторів:

Ларіонов В. Б. (ORCID ID 0000-0003-2678-4264).

Надійшла: 24 січня 2022 р.

Прийнята до друку: 16 лютого 2022 р.

Контактна особа: Ларіонов Віталій Борисович, доктор біологічних наук, фізико-хімічна лабораторія, відділ медичної хімії, Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАНУ, буд. 86, вул. Люстдорфська дорога, м. Одеса, 65080. Тел.: + 38 0 67 766 18 63. Електронна пошта: vitaliy.larionov@gmail.com