

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

*На правах рукописи*

**Хайбрахманова Диляра Раисовна**

**ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ  
ОРГАНИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С АЛЬБУМИНОМ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, доцент  
Седов Игорь Алексеевич

Казань 2023

**Оглавление**

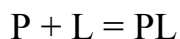
ВВЕДЕНИЕ .....	4
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	10
ГЛАВА 1 СВЯЗЫВАНИЕ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ.....	10
1.1 Сывороточный альбумин .....	10
1.2 Экспериментальные методы определения констант связывания .....	13
1.2.1 Тушение флуоресценции.....	13
1.2.2 Ядерный магнитный резонанс .....	19
1.2.3 Равновесный диализ.....	22
1.2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография .....	24
1.2.5 Изотермическая титрационная калориметрия .....	26
1.2.6 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	27
1.3 Использование вычислительных методов для предсказания констант связывания с альбумином.....	31
1.3.1 Молекулярный докинг .....	32
1.3.2 Молекулярная динамика .....	33
1.3.3 Соотношения структура-свойство для связывания с альбумином .....	36
Основные задачи исследования .....	46
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	48
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1 Объекты исследования .....	48
2.2 Метод дифференциальной сканирующей калориметрии .....	49
2.3 Изучение кинетики фибриллообразования альбумина в присутствии различных лигандов .....	49
2.4 Определение констант связывания серии изучаемых лигандов методом спектрофлуориметрии .....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	53
ГЛАВА 3 КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ АЛЬБУМИНА С ЛИГАНДАМИ .....	53
3.1 Создание базы данных констант связывания альбуминов млекопитающих с лекарственными соединениями .....	53
3.1.1 Источники литературных данных .....	53
3.1.2 Анализ собранных данных .....	56
3.2 Разработка и апробация методики определения констант связывания органических лигандов с альбумином методом ДСК .....	62

3.2.1 Разработка модели.....	62
3.2.2 Связывание напроксена с БСА .....	70
3.2.3 Связывание варфарина с БСА.....	73
3.2.4 Связывание ибупрофена с БСА .....	75
3.2.5 Связывание толбутамида с БСА .....	77
3.2.6 Связывание хлорпропамида с БСА .....	79
3.2.7 Связывание фенилбутазона с БСА.....	80
3.2.8 Связывание мелоксикама с БСА.....	82
3.2.9 Связывание изониазида с БСА .....	84
3.2.10 Связывание ампициллина (натриевой соли) с БСА .....	85
3.3 Константы связывания с замещенными бензойными кислотами .....	86
3.4 Молекулярный докинг .....	93
3.5 Соотношения между структурой и аффинностью к альбумину для широкого круга лигандов .....	110
3.6 Фибриллообразование альбумина в присутствии лигандов с разной аффинностью .....	117
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>132</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>134</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Проблема количественной характеристики связывания различных соединений с альбумином выросла из задач фармакологии. Взаимодействия лекарственных молекул с белками плазмы крови напрямую влияют на их абсорбцию, распределение, метаболизм, выделение и токсичность (ADME-T свойства) [1]. Содержание белков в плазме довольно велико и составляет от 60 до 80 г/л. Среди них наибольшая доля приходится на сывороточный альбумин (60-65%) [2]. Лекарства, которые слабее связываются с плазмой, легче проникают в ткани, чем прочно связывающиеся, однако при этом, как правило, быстрее выводятся из организма. Альбумин выполняет функцию транспорта молекул и ионов [3] и способен связывать соединения различной природы за счет наличия нескольких центров связывания. Глобулины и липопротеины, которые также содержатся в плазме, более селективны к природе связываемых лигандов и могут переносить, например, некоторые молекулы антибиотиков, холестерина, жирные кислоты и липиды. Количественно взаимодействие с плазмой крови в фармакологии обычно характеризуют в процентах связанного с плазмой препарата. Именно эта величина непосредственно влияет на фармакокинетические свойства препарата, например, распределение в организме и период полувыведения. Это влияние особенно значимо, если доля связанной формы превышает 80% [3].

В физической химии для количественного описания прочности комплекса белка с лигандом используют константы устойчивости (связывания, ассоциации)  $K_a$  или нестойкости (диссоциации)  $K_d$ , которые для связывания в эквимольном отношении определяются соответственно формулами (1) и (2):



$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (1)$$

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (2)$$

Эти константы напрямую определяют содержание свободной и связанной форм соединения, поэтому их величины представляют интерес при разработке новых лекарственных соединений. Комплексообразование белка с лигандом также может влиять на взаимодействия белка с другими лигандами и белками, денатурационную и агрегационную устойчивость. Изучение связи между аффинностью лигандов к белку и их влиянием на процессы агрегации, играющие ключевую роль в развитии ряда неизлечимых заболеваний, также представляется важной задачей.

В настоящее время для определения или оценки величин констант связывания с альбумином и прочими белками используется множество экспериментальных и теоретических методов. Все существующие экспериментальные методы имеют высокие погрешности, которые определяются совокупностью сложности взаимодействий в исследуемых системах, проблем с условиями и объектами экспериментов, приборных ограничений и недостатков методик обработки данных. Методы молекулярного моделирования также не могут обеспечить достаточной точности значений констант связывания с альбумином, а методы машинного обучения страдают от недостатка достоверных экспериментальных данных.

Поэтому, несмотря на значительное число работ в данной области, дальнейшее изучение связывания альбумина с органическими соединениями любыми экспериментальными и/или теоретическими методами является актуальной задачей.

**Цель и задачи работы.** Основными целями работы являются совершенствование методов исследования термодинамики взаимодействий низкомолекулярных органических лигандов с сывороточным альбумином в растворе и установление связи между аффинностью лигандов к альбумину и их влиянием на денатурационную и агрегационную устойчивость белка.

Для достижения целей были поставлены следующие задачи:

проанализировать возможности и недостатки существующих методов определения констант связывания низкомолекулярных органических лигандов с белками, в первую очередь с альбумином;

разработать базу данных констант связывания сывороточных альбуминов млекопитающих с различными лигандами, проанализировать сходимость результатов различных методов и исследовательских групп;

разработать и апробировать хорошо воспроизводимые методики определения констант связывания с белками по данным дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофлуориметрии;

проанализировать возможность предсказания аффинности к альбумину методом молекулярного докинга;

проанализировать возможность предсказания констант связывания с альбумином с помощью корреляционных соотношений типа структура-свойство на основе многопараметровых линейных регрессий и методов машинного обучения;

изучить влияние связывания различных лигандов на процесс фибриллообразования альбумина.

**Научная новизна** работы заключается в разработке нового подхода к определению констант связывания с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии, создании базы данных констант связывания с альбуминами млекопитающих, выводе новых соотношений между структурой лигандов и аффинностью к альбумину. Впервые изучен механизм подавления фибриллообразования альбумина в присутствии связывающихся с ним веществ, установлена связь между аффинностью, изменением степени денатурации альбумина и ингибированием фибриллообразования.

**Практическая значимость** работы состоит в разработке новых методик измерения и прогнозирования констант взаимодействия основного транспортного белка сыворотки крови – альбумина – с лигандами произвольной структуры.

Получаемые данные могут быть использованы для оценки доли связанного соединения в плазме крови, что необходимо при разработке новых лекарственных соединений. Эти методы могут быть применены и к определению констант связывания с другими белками, которые являются непосредственными мишенями лекарственных препаратов. Изучение влияния природы и аффинности лигандов на подавление роста фибрилл белков важно для поиска антиамилоидных агентов для терапии неизлечимых в настоящее время нейродегенеративных заболеваний.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

Новые данные о влиянии различных органических лигандов с различной аффинностью на вид термограмм денатурации альбумина, значения температуры и энтальпии денатурации

Новая методика определения констант связывания белков с лигандами с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии

Новые данные о величинах констант связывания с альбумином для ряда анионов замещенных бензойных кислот и закономерностях их изменения в зависимости от природы заместителей в кольце

Новые соотношения типа структура-свойство для констант связывания низкомолекулярных органических соединений с альбумином на основе линейных корреляций с дескрипторами лигандов

Невозможность использования данных, полученных с помощью молекулярного докинга, для предсказания аффинности к альбумину

Зависимости начальной скорости и выхода фибриллообразования альбумина в присутствии лигандов с различными константами связывания и концентрацией от равновесной доли денатурированной формы белка

Ингибирование роста фибрилл альбумина только за счет связывания нативной формы с лигандами

**Методы исследования.** Для решения поставленных задач были использованы экспериментальные методы спектрофлуориметрии, УФ-спектрофотометрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, спектроскопии кругового дихроизма, а также вычислительные подходы: метод молекулярного докинга и различные методы анализа данных и машинного обучения.

**Достоверность результатов** подтверждается использованием современных экспериментальных физико-химических и вычислительных методов исследования, воспроизводимостью полученных экспериментальных и расчетных данных, а также публикацией результатов работы в рецензируемых журналах высокого уровня.

**Личный вклад автора.** Автором выполнена большая часть экспериментальной работы по разработке методик измерения констант связывания методами спектрофлуориметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии; изучению кинетики фибриллообразования альбумина; а также проведена обработка полученных экспериментальных данных, анализ литературы и составление базы данных констант связывания. Автор также принимал участие в обсуждении результатов и написании публикаций.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на XXI, XXII Международных конференциях по химической термодинамике в России (Санкт-Петербург, 2019, Казань, 2022), XIV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, 2017), XIII Международной конференциях «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Суздаль, 2018), XII Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев-2021» (Санкт-Петербург, 2021), а также на научных конференциях Казанского федерального университета (2016 и 2018).

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования изложены в 5 статьях [4–8] в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и



Scopus, а также в 7 тезисах докладов на международных и российских научных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, списка литературы из 194 источников. Работа изложена на 151 странице и содержит 62 рисунка и 4 таблицы.

**Работа выполнена** на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при поддержке грантов РФФИ по проекту № 20-315-90053, РФФИ 23-23-10084, РФФИ 19-73-00209, а также при поддержке программ повышения конкурентоспособности КФУ и Приоритет 2030.

Автор выражает огромную благодарность научному руководителю д.х.н., в.н.с. Седову Игорю Алексеевичу за руководство, помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен доценту Мухаметзянову Тимуру Анваровичу за помощь в освоении экспериментальных методов, м.н.с. Никифоровой Алене Алексеевне за помощь в проведении экспериментов, студенту Ибраеву Илье Юрьевичу за помощь в обработке данных. Также автор выражает признательность всем сотрудникам кафедры физической химии Химического института им. А. М. Бутлерова КФУ.

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## ГЛАВА 1 СВЯЗЫВАНИЕ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

## 1.1 Сывороточный альбумин

Альбумины – семейство глобулярных белков, которые обнаруживаются в плазме крови животных, рыб и птиц, а также в яичном белке, молоке и некоторых растениях (арахис, подсолнечник и т. д. ). Сывороточный альбумин млекопитающих (далее также называемый просто альбумином) представляет наибольший практический интерес как основной белок плазмы крови. Человеческий альбумин содержит 584 аминокислотных остатка и имеет молекулярную массу 66,4 кДа, а его вторичная структура на 67% состоит из  $\alpha$ -спиралей. 34 цистеиновых остатка образуют 17 дисульфидных мостиков, которые стабилизируют нативную конформацию альбумина [9]. Он склонен к образованию димеров [10] и более крупных растворимых агрегатов (тетрамеров и, по некоторым данным, гексамеров [11]).

В структуре альбумина выделяют три близких по структуре домена (I, II, III), в каждом из которых присутствует по 2 субдомена – А и В . В настоящее время считается, что альбумин получился в процессе эволюции путём тримеризации основного домена белка из 190 аминокислот [12]. В субдоменах, в свою очередь, присутствуют центры связывания с разной аффинностью к различным типам лигандов (рисунок 1.1).

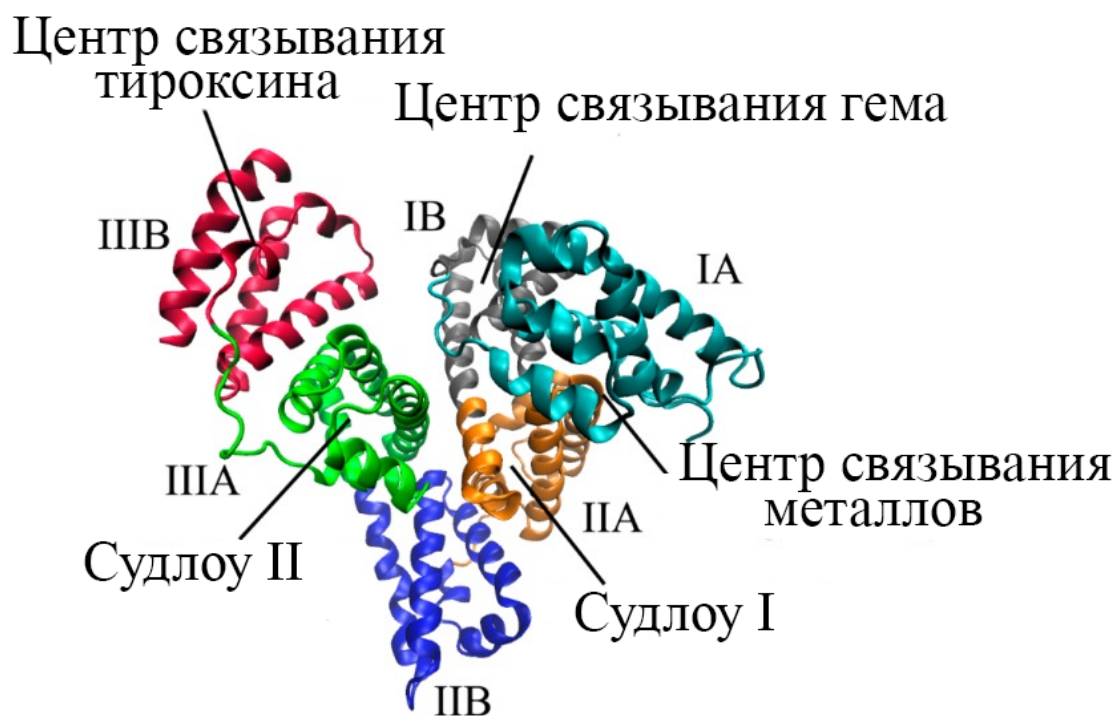


Рисунок 1.1 – Расположение центров связывания в молекуле альбумина.

Для большинства молекул лекарственных препаратов наиболее предпочтительны центры (карманы) связывания с высокой аффинностью в субдоменах IIА и IIIА. Их называют соответственно Судлоу I и Судлоу II в честь первооткрывателя австралийца Джилиана Судлоу. Исследования показали, что центр Судлоу I предпочтителен для больших гетероциклических молекул, например, варфарина, фенитоина, тогда как Судлоу II связывает соединения с карбоксильными группами, например, ибупрофен или диазепам. Однако многие лиганды могут связываться с обоими центрами [13]. Кроме того, связывание возможно и по многим другим центрам, в том числе и на поверхности белка [14]. Так, например, по данным рентгеноструктурного анализа в комплексах альбуминов млекопитающих с 3,5-дииодосалициловой кислотой (5OSW, 4JK4) лиганд располагается как в центрах связывания Судлоу I и Судлоу II, так и в центре связывания гема и прочих центрах. В работе Бойко и соавторов [15] получены близкие значения констант связывания ацетаминофена для двух

центров Судлоу бычьего альбумина, то есть лиганд не имеет предпочтения к одному из центров.

На практике чаще всего изучают связывание с бычьим (БСА) и человеческим (ЧСА) сывороточными альбуминами. Они очень схожи по пространственному строению (рисунок 1.2), а аминокислотная последовательность БСА на 75,6% совпадает с ЧСА. В центре связывания Судлоу II идентичность аминокислотного окружения лиганда составляет 100%, а в Судлоу I – 57%.



Рисунок 1.2 – Сравнение структур БСА (красный) и ЧСА (желтый).

Результаты многих работ говорят о высокой степени скоррелированности значений констант связывания с бычьим и человеческим альбумином, а также альбуминами млекопитающих. Так, для 234 разнородных по структуре органических молекул была получена корреляция [16] логарифмических факторов удерживания для ЧСА ( $\log k_{\text{HSA}}$ ) и БСА ( $\log k_{\text{BSA}}$ ), которые рассчитываются по формулам 1.2.25 и 1.2.26 (см. раздел 1.2.4) и отражают аффинность лигандов к альбумину:

$$\log k_{\text{HSA}} = 1,03(\pm 0,02)\log k_{\text{BSA}} + 0,02(\pm 0,01), \text{ СКО} = 0,16, r^2 = 0,95 \quad (1.1)$$

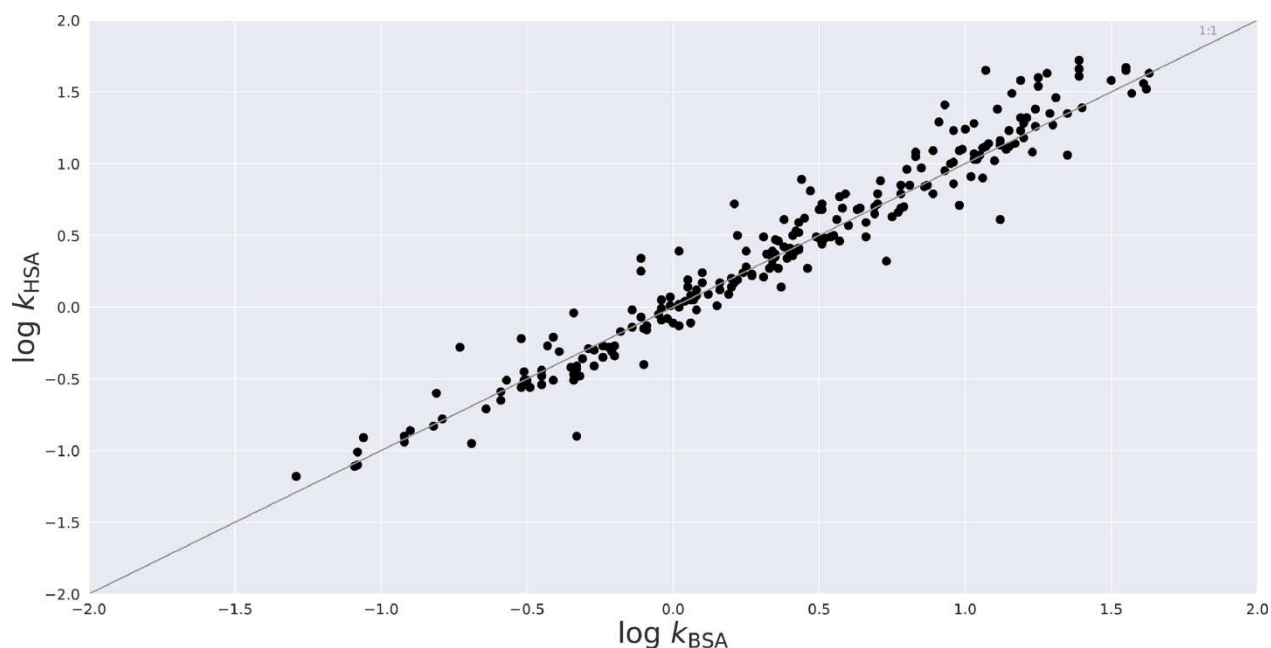


Рисунок 1.3 – Корреляция между логарифмическим фактором удерживания для ЧСА и БСА,  $n=234$ ,  $r^2 = 0,95$  [16].

Таким образом, альбумин представляет из себя белок, который способен связывать различные молекулы по множеству центров с различной аффинностью, что делает экспериментальное определение и теоретический расчет констант связывания сложной задачей.

## 1.2 Экспериментальные методы определения констант связывания

Определение констант связывания белков с лигандами в настоящее время проводят с помощью различных экспериментальных методов. Каждый из методов имеет свои ограничения, и результаты применения различных методов к одной и той же системе часто плохо согласуются между собой. В настоящей главе приведено описание основных методов определения констант связывания и ограничения каждого из них.

### 1.2.1 Тушение флуоресценции

Метод основан на явлении тушения флуоресценции, которое в целом может быть вызвано различными процессами в системе, приводящими к уменьшению интенсивности флуоресценции: комплексообразованием, при котором происходит изменение окружения флуорофора (статическое тушение), и столкновениями возбужденных частиц с невозбужденными (динамическое тушение). В

зависимости от природы флуорофора и тушителя, эти механизмы могут быть задействованы поодиночке или одновременно.

Динамическое тушение связано с физическими процессами, происходящими в системе: передачей энергии от электронно-возбужденной молекулы флуорофора к тушителю в результате случайных столкновений. При статическом тушении между тушителем и флуорофором образуется комплекс, который сам не флуоресцирует (чаще всего) либо флуоресцирует слабее, чем флуорофор. Иногда реализуется смешанный механизм тушения: интенсивность сигнала уменьшается и за счет образования комплекса, и при столкновении возбужденной частицы и тушителя.

Для установления типа тушения обычно исследуют зависимость его интенсивности от температуры. Динамическое тушение сильно зависит от коэффициентов диффузии. При повышении температуры они возрастают, что увеличивает вероятность столкновения частиц друг с другом. В этом случае тушение усиливается. Если же наблюдается ослабление тушения флуоресценции, то можно говорить о статическом механизме. Это объясняется тем, что энтальпия образования комплексов обычно отрицательна, и чем выше температура, тем более неустойчив комплекс. Кроме того, при динамическом тушении бимолекулярная константа тушения ( $k_q$ ), которая пропорциональна коэффициентам диффузии тушителя и флуорофора, не может быть больше, чем примерно  $2 \cdot 10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [L] \quad (1.2.1),$$

где  $\tau_0$  – время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя, которое можно определить в отдельных экспериментах с использованием методик TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), TRES (Time-resolved emission spectroscopy) и SSTD (Single Shot Transient Digitizer).

Белки являются флуорофорами. Наибольший вклад в их сигнал флуоресценции вносят триптофановые остатки, индольное кольцо которых очень

чувствительно к полярности среды и своему окружению. Этот факт используют при изучении таких явлений как белок-лигандное и белок-белковое связывание, агрегация и денатурация белков. Длина волны возбуждения триптофана лежит вблизи 280 нм, а максимум испускания приходится на 340-355 нм. Остаток тирозина также флуоресцирует при той же длине волны возбуждения на длине волны 303 нм, но его вклад в общий сигнал невелик.

Спектр флуоресценции альбумина зависит по большей части от сигнала триптофана [17], так как тирозин в трехмерной структуре белка сильно экранирован, его вклад в общий сигнал невелик. Лиганды могут изменять окружение триптофановых остатков в центрах связывания, экранируя его, вследствие чего сигнал падает. В структуре БСА присутствует два остатка триптофана, один (Trp213) из которых располагается непосредственно в центре связывания Судлоу I, а второй (Trp134) в центре связывания гема на поверхности белка (субдомен IV). В структуре же ЧСА единственный триптофан (Trp214) также располагается в Судлоу I.

По изменению сигнала флуоресценции при изменении концентрации лиганда можно определять параметры связывания. Процесс связывания лигандов с белками может включать в себя множество равновесий с различными константами, однако на практике обработка экспериментальных данных ведется лишь с помощью простейших моделей, как правило, в предположении образования лишь одного типа эквимольных комплексов. Если связывание на самом деле происходит с двумя или несколькими центрами, то при добавлении небольших количеств лиганда, когда образуются в основном комплексы состава 1:1, мы сможем определить сумму констант связывания со всеми центрами. При связывании более чем одной молекулы лиганда с одной молекулой белка или при димеризации/олигомеризации белка мы либо получим сложные уравнения с несколькими неизвестными константами, которые затруднительно точно определить по данным эксперимента, либо будем вынуждены принять весьма произвольные предположения о величинах последовательных констант связывания.

Наиболее распространено уравнение Штерна-Фольмера и его модификации. При выводе этого уравнения предполагается, что выбраны такие длины волн возбуждения и испускания, что регистрируется только сигнал флуоресценции белка, при этом ни комплекс, ни лиганд не флуоресцируют. Величина этого сигнала будет зависеть только от равновесной концентрации свободного белка. Предполагается, что концентрация белка в растворе постоянна, а концентрация лиганда изменяется. Записывая отношение сигнала флуоресценции чистого белка ( $F_0$ ) к флуоресценции содержащего лиганд раствора ( $F$ ) и выразив  $[PL]$  через равновесную концентрацию лиганда и константу связывания  $K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$ , получим уравнение Штерна-Фольмера:

$$[PL] = [P]_0 - [P] = K_a [P][L] \quad (1.2.2)$$

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon} = \frac{[P]_0}{[P]} = \frac{K_a [P][L] + [P]}{[P]} = K_a [L] + 1 \quad (1.2.3)$$

Для определения константы связывания строится график в координатах  $\frac{F_0}{F}([L])$ . Если полученный график линеен, то можно предполагать, что задействован только один тип тушения, и, если это статический механизм, то комплекс не флуоресцирует, а связывание происходит в соотношении 1:1. Тангенс угла наклона прямой равен константе образования комплекса. Если же график загнут в сторону оси абсцисс (вниз), то возможно неполное тушение флуоресценции при образовании комплекса белок-лиганд, например, из-за присутствия нескольких типов флуорофоров в белке. Загнутый вверх график может свидетельствовать о смешанном типе тушения либо о связывании более чем с одной молекулой лиганда [18].

Иногда используют модифицированное уравнение Штерна-Фольмера, при выводе которого допускается возможность неполного тушения флуоресценции в комплексе с лигандом. Доля флуоресценции комплекса от флуоресценции раствора чистого белка обозначается как  $f_a$ .



$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{[P] + [PL]}{f_a[PL]} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a K_a [L]} \quad (1.2.4)$$

Значения свободного члена и коэффициента наклона прямой в координатах  $\frac{F_0}{F_0 - F} \left( \frac{1}{[L]} \right)$  позволяют вычислить константу связывания, а также судить о силе флуоресценции комплекса. При условии, что получающийся комплекс не флуоресцирует, свободный член равен единице. Аналогичное уравнение вида:

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a F_0} + \frac{1}{K_a [L] f_a F_0} \quad (1.2.5)$$

называют уравнением Лайнуивера – Берка. Оно похоже на одноименное уравнение, используемое для анализа кинетических данных для ферментативных реакций. Главным недостатком этих уравнений является то, что небольшие погрешности в определении интенсивности флуоресценции и концентрации приводят к большой погрешности при расчете константы [19].

Если же предположить, что лиганд одновременно связывается по  $n$  независимым центрам связывания в молекуле белка с одной и той же константой  $K_a$ , то можно вывести еще одну распространенную модификацию уравнения Штерна-Фольмера:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [L] \quad (1.2.6)$$

Это уравнение также называют модифицированным уравнением Штерна-Фольмера, либо логарифмическим уравнением Штерна-Фольмера. При его выводе предполагается отсутствие флуоресценции у комплекса. Помимо предположений о стехиометрии связывания и чисто статическом типе тушения флуоресценции, для использования всех вышеприведенных уравнений должно выполняться еще одно допущение – пренебрежимо малая доля связанного с белком лиганда, чтобы за равновесную концентрацию лиганда  $[L]$  можно было принять известную общую концентрацию лиганда в растворе. Это не выполняется при высоких значениях констант связывания и/или низких концентрациях лиганда. В таком случае можно подобрать с помощью численного решения для

заданных условий эксперимента систем уравнений, связывающих концентрации различных форм белка и лиганда, такое значение константы, которое обеспечит наилучшее соответствие наблюдаемым значениям сигнала. Этот подход можно использовать и при наличии в системе множества равновесий [20].

Еще один метод, который иногда используют для анализа спектрофлуориметрических данных, основан на уравнении Скэтчарда. Изначально оно было выведено для метода равновесного диализа (см. раздел 1.2.3) и затем модифицировано для спектрофлуориметрии. Для расчетов по уравнению Скэтчарда также необходимы значения начальной и текущей флуоресценции белка, и равновесная концентрация лиганда:

$$\frac{F_0 - F}{F_0} \cdot \frac{1}{[L]} = \frac{f_a[PL]}{([P] + [PL])[L]} \quad (1.2.7)$$

$$\frac{f_a[PL]}{([P] + [PL])[L]} = f_a K_a \left( 1 - \frac{[PL]}{[P] + [PL]} \right) \quad (1.2.8)$$

$$\frac{F_0 - F}{F_0} \cdot \frac{1}{[L]} = f_a K_a - K_a \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (1.2.9)$$

Тангенс угла наклона прямой, построенной в координатах  $\frac{F_0 - F}{F_0} \cdot \frac{1}{[L]}$   $\left( \frac{F_0 - F}{F_0} \right)$ , даст значение константы связывания с обратным знаком.

Несмотря на широкое распространение, метод тушения флуоресценции подвергаются обоснованной критике в ряде работ [20–23]. Это связано с тем, что для получения достоверных данных о связывании из спектрофлуориметрических экспериментов требуется соблюдение ряда требований к системе и методике, иначе используемые подходы и уравнения приводят к абсолютно бессмысленным результатам. В частности, должна быть правильно выбрана модель взаимодействия, учтена возможность неполного тушения флуоресценции лигандом, изменение концентрации свободной формы лиганда в результате связывания. Также в некоторых случаях уменьшение сигнала флуоресценции может наблюдаться из-за эффектов внутреннего и внешнего фильтра. Добавление лигандов, которые имеют поглощение на длинах волн возбуждения

флуоресценции или эмиссии, приводят к тому, что часть возбуждающего или испускаемого излучения поглощается веществом. Это приводит к изменению сигнала флуоресценции и может быть воспринято как доказательство взаимодействия белка с лигандом, что ошибочно. Например, изменение поглощения при добавлении лиганда на 0,1 приводит к падению сигнала флуоресценции на 10%. Учёт эффекта внутреннего фильтра можно произвести с помощью уравнения:

$$F = F_{испр} \cdot 10^{-\left(\frac{A_{возб}}{2} + \frac{A_{эм}}{2}\right)} \quad (1.2.10) , \text{ где } F - \text{наблюдаемый сигнал, } F_{испр} -$$

исправленный сигнал,  $A_{возб}$  и  $A_{эм}$  – изменение поглощения системы на длинах волн возбуждения и эмиссии при добавлении лиганда. Интенсивность делится на два из-за того, что сигнал флуоресценции считывается в середине кюветы (что верно для большинства приборов). Для частных случаев предлагается использовать более сложные подходы для коррекции сигнала, как описано в работе Гу и др. [24].

### 1.2.2 Ядерный магнитный резонанс

ЯМР-спектроскопия в последнее время стала широко распространённым методом изучения структуры белков и их взаимодействий с различными веществами [25–27]. Её преимуществом является возможность исследования механизма связывания на молекулярном уровне и наблюдения изменений на отдельных участках белковой молекулы. Однако расшифровка спектров белков из-за большого числа перекрывающихся сигналов сложна, кроме того, их чаще всего записывают в водном растворе или с добавлением небольшого количества тяжелой воды, поэтому они могут иметь большие шумы от растворителя. Сложной задачей также оказывается обработка данных для определения констант связывания.

Возможно три основных подхода к изучению связывания низкомолекулярных лигандов: отслеживание сигналов белка, отслеживание сигналов лиганда и отслеживание сигналов обеих молекул.

Для определения константы комплексообразования в соотношении 1:1 может применяться модификация метода Роуз-Драго [28], который изначально был предложен для определения констант связывания по данным спектрофотометрии. Пусть  $\delta_p$  – химический сдвиг интересующего протона свободного белка,  $\delta_{PL}$  – химический сдвиг того же протона в комплексе, а  $\delta$  – наблюдаемый химический сдвиг в состоянии равновесия. Тогда можно записать следующие выражения:

$$\delta = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} \delta_{PL} + \frac{[P]}{[P]+[PL]} \delta_p \quad (1.2.11)$$

$$\frac{[PL]}{[P]+[PL]} + \frac{[P]}{[P]+[PL]} = 1 \quad (1.2.12)$$

$$\delta = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} (\delta_{PL} - \delta_p) + \delta_p \quad (1.2.13)$$

$$[PL] = \frac{[P]_0 (\delta - \delta_p)}{\delta_{PL} - \delta_p} = [P]_0 \left( \frac{\Delta}{\Delta_0} \right) \quad (1.2.14)$$

Где  $\Delta = \delta_p - \delta$ ,  $\Delta_0 = \delta_p - \delta_{PL}$ , а  $\left( \frac{\Delta}{\Delta_0} \right)$  полагается равным доле связанного

белка. Далее запишем выражение для константы связывания:

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{[PL]}{([P]_0 - [PL])([L]_0 - [PL])} = \frac{[P]_0 \left( \frac{\Delta}{\Delta_0} \right)}{[P]_0 [L]_0 - [P]_0 \left( \frac{\Delta}{\Delta_0} \right) ([P]_0 + [L]_0) + [P]_0^2 \left( \frac{\Delta}{\Delta_0} \right)^2} \quad (1.2.15)$$

После преобразования получим выражения:

$$(\Delta_0 - \Delta)K = \frac{\Delta \Delta_0}{\Delta_0 [L]_0 - \Delta [P]_0} \quad (1.2.16)$$

$$\frac{1}{K} = \frac{(\Delta_0 [L]_0 - \Delta [P]_0)(\Delta_0 - \Delta)}{\Delta \Delta_0} \quad (1.2.17)$$

Если  $\Delta_0 [L]_0 \gg \Delta [P]_0$ , то  $\frac{1}{K} \approx \frac{[L]_0 \Delta_0}{\Delta} - [L]_0$  (1.2.18).

Параметры  $K$  и  $\Delta_0$  могут быть найдены графическим способом при построении серии графиков  $1/K$  от различных гипотетических значений  $\Delta_0$  при

разных концентрациях лиганда. Точка пересечения полученных прямых соответствует истинным значениям  $1/K$  и  $\Delta_0$ .

Следует отметить, что отслеживание изменения сигнала белка в случае крупных белков проблематично из-за сложности расшифровки спектров и наложения сигналов. Намного проще отслеживать сигнал лиганда. Одним из наиболее простых методов является определение константы связывания по ширине сигнала протонов лиганда, окружение которых меняется в ходе связывания. Обычно лиганды, являющиеся малыми молекулами, имеют острые и узкие пики. При связывании происходит их уширение и уменьшение высоты из-за более короткого времени релаксации. Для комплекса 1:1 константа диссоциации определяется уравнением (1.2.19):

$$K_d = \left( \frac{\left( \frac{w_b}{w_f} - 1 \right) [P]}{1 - \frac{H_b}{H_f}} - \left( \frac{w_b}{w_f} - 1 \right) [P] \right) \cdot [L] \quad (1.2.19),$$

где  $w_b$  и  $w_f$  – ширина пика лиганда в связанном и свободном виде, а  $H_b$  и  $H_f$  – высота пика лиганда в связанном и свободном виде. Представленное уравнение справедливо только для связывания по одному центру [29].

В последние десятилетия появился ряд новых методик ЯМР, в том числе с использованием двойного резонанса и двумерной спектроскопии. В методиках WaterLOGSY (WL, Water-Ligand Observed by Gradient Spectroscopy) и STD (Saturation Transfer Difference) [30–33] используемый дополнительный частотный генератор настраивают на резонансную частоту определённых протонов: в методе WL на протоны воды, а в STD на протоны молекулы белка. Происходит существенное изменение интенсивности сигналов, обусловленное ядерным эффектом Оверхаузера, который проявляется даже в том случае, если между двумя ядрами нет прямого спин-спинового взаимодействия. При условии, что процесс попадания молекулы в полость белка и выход из нее происходит за достаточно короткое время, можно оценить количество провзаимодействовавшего лиганда. Связанная и несвязанная молекулы дают разные по знаку сигналы

резонанса. Для нахождения константы связывания эксперимент повторяют несколько раз и строят график зависимости интенсивности сигнала от концентрации лиганда, где полученная кривая описывается уравнением:

$$I = \frac{I_{\max}[L]}{K_D + [L]} \quad (1.2.20),$$

где  $[L]$  – концентрация лиганда,  $I_{\max}$  – максимальное изменение сигнала,  $I$  – текущее изменение сигнала в спектре.

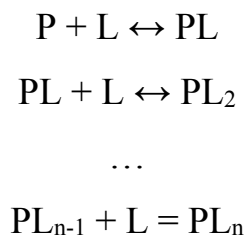
Исследования Филдинга [34] показали, что определяемое методом ЯМР значение константы сильно зависит от условий эксперимента. При повышении концентрации белка мы получаем завышенную константу, что, может происходить из-за того, что лиганд успевает снова попасть в центр связывания. Поэтому необходимо использовать достаточно низкие концентрации ( $\approx 1$  мкМ) и небольшое время смешения ( $\approx 1$  с), однако точность получаемых результатов все равно вызывает сомнения [35].

### 1.2.3 Равновесный диализ

Диализ как метод исследования взаимодействий между веществами используется с очень давнего времени [36, 37]. В настоящее время этот метод продолжают использовать для установления прочности связывания лекарств с плазмой крови [32, 33]. Для определения константы связывания используются ячейки с мембранами, непроницаемыми для молекул белка и проницаемыми для лиганда. По одну сторону мембраны помещается раствор белка, а по другую – раствор лиганда с известной концентрацией. После установления равновесия, что может занять несколько часов из-за малой скорости диффузии через мембрану, определяют изменение концентрации лиганда. Для того, чтобы исключить влияние эффекта Гиббса-Доннана, равновесный диализ обычно проводят либо в изоэлектрической точке белка, либо при высокой ионной силе.

Математическая модель для расчета значений константы связывания и стехиометрии комплекса была предложена в работе Клотца в 1946 году [40]. Он

рассматривал систему со ступенчатым связыванием нескольких молекул лиганда белком.



Каждая  $i$ -ая стадия характеризуется своей константой связывания

$$k_i = \frac{[PL_i]}{[PL_{i-1}][L]} \quad (1.2.21)$$

Пусть  $r$  – отношение количества связанного лиганда к общему количеству белка,  $n$  – максимально возможное соотношение лиганд/белок. Тогда можно записать:

$$r = \frac{k_1[L] + 2k_1k_2[L]^2 + \dots + n(k_1k_2\dots k_n)[L]^n}{1 + k_1[L] + k_1k_2[L]^2 + \dots + (k_1k_2\dots k_n)[L]^n} \quad (1.2.22)$$

Считая, что все центры связывания одинаковы и не влияют друг на друга, из комбинаторных соображений получаем выражение для  $i$ -ой константы:

$$k_i = \frac{n - (i - 1)}{i} K \quad (1.2.23),$$

где  $K$  – константа комплексообразования с каждым центром по отдельности. Выражение выше можно свести к линейной зависимости  $\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{n}$  (1.2.23) [41]. Исходя из этого уравнения, можно построить график,

где по оси ординат отложена величина  $r = \frac{[L]_{\text{связ}}}{[P]_0} = \frac{[L]_0 - [L]}{[P]_0}$  (которая рассчитывается по данным о концентрации лиганда  $[L]$  после связывания, определяемой, например, спектрофотометрически), а по оси абсцисс – величина, обратная  $[L]$ . Это дает возможность найти константу связывания  $K$  и число центров связывания  $n$ .

Позднее Скэтчард [42] записал это уравнение в виде:

$$\frac{r}{[L]} = nK - rK \quad (1.2.24)$$

При использовании уравнения Скэтчарда строится график зависимости  $\frac{r}{[L]}$  от  $r$  и по углу наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, определяются значения  $K$  и  $n$ .

Следует понимать, что реальные константы связывания с различными центрами не могут быть одинаковыми, поэтому уравнение Скэтчарда обычно дает лишь очень приближенные данные о константе и стехиометрии связывания, чаще всего нецелые значения  $n$ , которые округляют до ближайшего целого.

#### 1.2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография применяется не только как метод разделения веществ, но и как физико-химический метод количественной характеристики взаимодействий между элюатом и неподвижной фазой. Высокая производительность, воспроизводимость и возможность полной автоматизации объясняет большой интерес к этому методу.

В ВЭЖХ нередко используют для качественного анализа и хирального разделения веществ, в частности, фармацевтических препаратов и их прекурсоров [43], колонки с иммобилизованными на носитель белками, в частности, ЧСА. Альбумин обычно закрепляют на таких носителях как агароза, полистирол, полиамид [44]. В ряде работ анализировались данные по удерживанию колонками с иммобилизованным ЧСА широкого круга органических соединений [45–47]. Элюентом в экспериментах служит вода с добавлением небольшого количества спирта (чаще всего изопропанола), что наряду с влиянием иммобилизации белка, конечно, несколько изменяет способность лигандов к связыванию с альбумином по сравнению с экспериментами в разбавленных водных растворах [48]. Тем не менее, ожидается, что параметры удерживания в целом коррелируют с константами связывания 1:1, а также с прочностью связывания с плазмой крови. Методом ВЭЖХ можно в кратчайшие сроки получить данные для большого массива веществ.



По данным хроматографии оценивается доля вещества  $w$ , связанного в неподвижной фазе с белком при прохождении через колонку, которая равна доле времени, проведенного исследуемым веществом в неподвижной фазе :

$$w = \frac{t_R - t_M}{t_R} \quad (1.2.25) ,$$

где  $t_R$  – время удерживания вещества,  $t_M$  – мертвое время колонки.

В работе Валько и др. [47] было изучено связывание с иммобилизованным человеческим альбумином и введена с термодинамической точки зрения некорректная величина кажущейся константы связывания в колонке  $\log K_{HSA}$  :

$$\log K_{HSA} = \log \left[ \frac{w}{1,01 - w} \right] \quad (1.2.26) .$$

Аналогичным образом на основе литературных данных о доле связанных лекарственных препаратов в плазме крови человека  $w_{PPB}$  введена константа связывания с альбумином плазмы  $\log K_{PPB}$  :

$$\log K_{PPB} = \log \left[ \frac{w_{PPB}}{1,01 - w_{PPB}} \right] \quad (1.2.27)$$

Число 1,01 выбрано произвольно для того, чтобы при 100 %-ном связывании с плазмой (что часто случается) или неподвижной фазой знаменатель дроби в (1.2.27) не был нулем. Была продемонстрирована линейная корреляция  $\log K_{HSA}$  и  $\log K_{PPB}$ , а также их корреляции с молекулярными дескрипторами. Следует отметить низкую точность и влияние множества факторов на экспериментальные значения доли вещества, связанного с плазмой крови. Построение корреляций между параметрами удерживания на колонках с иммобилизованным альбумином и параметрами связывания с растворенным в воде альбумином представляет большой интерес, но редко встречается в литературе. В работе Вэйнера [49] показано, что наблюдается корреляция между параметром удерживания и константой связывания, полученной методом равновесного диализа.

### 1.2.5 Изотермическая титрационная калориметрия

В процессе связывания можно наблюдать выделение или гораздо реже поглощение тепла. Метод изотермической титрационной калориметрии позволяет определить величину теплового эффекта и по полученным в одном эксперименте данным рассчитать целый ряд параметров связывания, таких как энтальпия, энтропия, энергия Гиббса и константа связывания, а также стехиометрия комплекса.

Изотермический калориметр титрования представляет собой термостат, в который помещены две одинаковые по объему и конструкции ячейки, оснащенные перемешивающими устройствами. В одну ячейку помещается раствор белка, а в другую (ячейку сравнения) – чистая вода или буфер. С помощью автоматического титратора в измерительную ячейку подаются порции раствора лиганда. Величина теплового потока между ячейками непрерывно регистрируется датчиками. Интегрируя эту величину по времени, находят количество выделившегося или поглощенного тепла в результате добавления порции лиганда. Для построения кривой связывания количество теплоты после добавления каждой порции лиганда делят на количество молей лиганда в порции и откладывают эту величину по оси ординат против отношения общего количества добавленного лиганда к количеству белка по оси абсцисс.

Из этого графика можно определить параметры связывания. Для простейшей реакции  $P + L \leftrightarrow PL$  стандартное изменение энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) связано с равновесными концентрациями частиц уравнением:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -RT \ln \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (1.2.28)$$

Значения равновесных концентраций в случае связывания 1:1 можно установить, например, по количеству добавленного лиганда, приводящему к выделению половины от максимального количества теплоты.

Существуют различные модели, учитывающие несколько различных процессов связывания и позволяющие подобрать значения параметров комплексообразования, наилучшим образом соответствующих

экспериментальным данным. Например, для количества выделившейся теплоты при общей концентрации всех форм лиганда  $[L]_{\Sigma}$  в случае связывания белком  $n$  молекул лиганда справедливо уравнение:

$$Q = \frac{n[P]_{\Sigma} \Delta H V_0}{2} \left[ 1 + \frac{[L]_{\Sigma}}{n[P]_{\Sigma}} + \frac{1}{nK[P]_{\Sigma}} - \sqrt{\left( 1 + \frac{[L]_{\Sigma}}{n[P]_{\Sigma}} + \frac{1}{nK[P]_{\Sigma}} \right)^2 - \frac{4[L]_{\Sigma}}{n[P]_{\Sigma}}} \right] \quad (1.2.29)$$

где  $V_0$  – объем ячейки,  $\Delta H$  – энтальпия связывания. Методом наименьших квадратов с его помощью можно определить значения  $\Delta H$ ,  $K$  и  $n$  [50].

В целом данный метод является точным и высокоинформативным, применим для довольно разбавленных водных растворов белков, а также имеет перспективы развития для работы со сверхмалыми количествами образцов с помощью калориметрических микрочипов. Однако было показано, что изотермическая титрационная калориметрия может иметь ряд ограничений по значениям определяемых констант. Так, Бжелич и соавторы [51] в своем обзоре упоминают, что очень маленькие или очень большие значения констант не могут быть получены с хорошей точностью с помощью стандартных для этого экспериментального метода протоколов. Значения констант связывания должны попадать в диапазон, в котором  $10 < c < 200$ , где  $c$  – параметр Вайсмана, который равен произведению константы связывания на общую концентрацию белка в ячейке. Если значение константы на уровне  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , придется понижать концентрацию рецептора, что приведет к падению чувствительности. Если же величина константы менее, чем  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , то приходится использовать более высокие концентрации белка и лиганда, что может быть ограничено, например, растворимостью, агрегацией или просто недоступностью реагентов. Кроме того, точность данных о константах связывания с несколькими центрами очень низка.

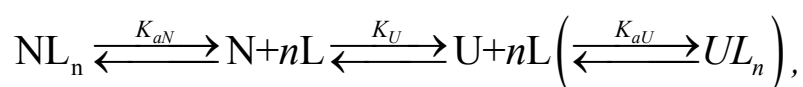
### 1.2.6 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является распространенным методом изучения термостабильности и денатурации белков и других биомолекул [52, 53]. Преимуществами этого метода являются

хорошая воспроизводимость полученных данных, легкость и скорость подготовки и анализа образца, а также относительно небольшое количество образца, необходимого для экспериментов. Использование ДСК-приборов с капиллярными ячейками обеспечивает высокую точность и чувствительность в экспериментах с водными растворами белков.

Стабильность нативной пространственной структуры белка обусловлена присутствием в его структуре водородных связей и дисульфидных мостиков, образованием солевых мостиков между заряженными аминокислотами, внутримолекулярными гидрофобными взаимодействиями боковых цепей. Денатурация молекулы белка приводит к изменению теплоемкости, что проявляется на ДСК-кривых. В зависимости от растворителя, кислотности среды, ионной силы раствора, присутствия и связывания различных веществ стабильность белка может меняться, что отразится на виде кривых ДСК [54].

Взаимодействие между белком и лигандами сопровождается изменением термостабильности белка, которое можно отследить по сдвигу температуры максимума пика на калориметрических кривых. Величина этого сдвига зависит от констант связывания лиганда с нативным, а в некоторых случаях и денатурированным состоянием белка, а также концентраций лиганда и белка. Обычно процесс денатурации вместе с процессом связывания лиганда рассматривают следующим образом:



где N и U – нативная и денатурированная формы белка, L – лиганд,  $K_U$  – константа денатурации,  $K_{aN}$  и  $K_{aU}$  – константы связывания с нативной и денатурированной формой белка (последнее наблюдается редко), соответственно. Если лиганд связывается с нативным состоянием, то термическая стабильность белка увеличивается: на кривой ДСК наблюдается смещение температуры пика денатурации в область более высоких температур. Если же лиганд взаимодействует преимущественно с денатурированным состоянием, температура его денатурации уменьшается [55]. Таким образом, повышение температуры

денатурации белка в присутствии лиганда, приводящее к смещению максимума пика денатурации на кривых ДСК, является надежным качественным признаком связывания лиганда с нативной формой белка [56].

Оценка количественных параметров связывания, то есть константы связывания, стехиометрии и энтальпии, является более сложной задачей. Величины, которые могут быть легко извлечены из экспериментальных кривых ДСК (площадь пика, температура максимума пика, температура начала денатурации), не могут быть выражены в виде простых функций константы связывания. Тем не менее, можно определить константу связывания лиганда с белком по серии кривых ДСК денатурации белка в присутствии различных концентраций лиганда. Это может быть сделано путем численного решения систем уравнений или моделирования этих кривых в предположении различных параметров связывания и поиска значений, ведущих к наилучшему согласию с экспериментом. При этом следует подобрать корректные модели денатурации белка и связывания лигандов.

Брандтс и Лин [57] использовали такой подход для изучения связывания между РНКазой А и цитидин-2'-монофосфатом. При моделировании процессов они ввели четыре допущения: все переходы являются двухстадийными; лиганд связывается преимущественно с нативной формой белка; все значения изменения теплоемкости  $\Delta C_p$  не зависят от температуры; коэффициенты активности равны единице. С помощью подобного подхода метод ДСК может позволить определять значения констант до  $10^{40}$  по шкале молярности, которые недоступны для других методов.

Страуме и др. [58] определили стехиометрию, энтальпию и константу связывания цитидин-2'-монофосфата с РНКазой А по кривым денатурации ДСК в присутствии различных концентраций лигандов. Полученные энтальпия и константа связывания согласуются с результатами экспериментов изотермической титрационной калориметрии. Этот метод авторы назвали «двумерной ДСК».

Ряд работ Прекупас и др. был посвящен изучению связывания альбумина с различными органическими лигандами [59–63]. Однако метод ДСК был

использован лишь для качественного подтверждения связывания лигандов с нативным альбумином. В серии работ Сележ и др. [64–67], моделирование кривых денатурации ДСК использовалось для изучения связывания с бычьим и человеческим сывороточными альбуминами. В частности, были получены константы связывания 8-анилинонафталин-1-сульфоновой кислоты и ангидротетрациклина с двумя центрами связывания ЧСА, и было обнаружено, что они согласуются с результатами изотермической титрационной калориметрии.

Моделирование кривых ДСК является сложной задачей. В частности, точное совпадение модельной и экспериментальной кривых, в особенности для белков, которые имеют несимметричный пик денатурации, не достигается при использовании одностадийной модели денатурации.

Нами была поставлена задача разработки собственного алгоритма для оценки констант связывания по данным ДСК, который позволяет перебирать различные параметры и модели связывания и денатурации белка в рамках одной программы и может быть применен для изучения связывания различных лигандов с альбумином. Метод должен быть валидирован на системах с достоверно определенными константами связывания и затем применен к ранее не изучавшимся лигандам.

Подводя итог, можно отметить, что на сегодняшний день не существует экспериментального метода определения констант связывания с сывороточным альбумином, который бы не имел жестких ограничений по использованию. Данные, полученные методом спектрофлуориметрии, из-за его распространенности вызывают больше всего вопросов, потому что зачастую методики, где не учитываются соответствующие ограничения, слепо копируются из одной научной работы в другую. На наш взгляд, наиболее универсальными являются калориметрические методы, которые дают хорошо воспроизводимые результаты и для которых существует строго физически обоснованная связь между параметрами связывания и наблюдаемым аналитическим сигналом.

### 1.3 Использование вычислительных методов для предсказания констант связывания с альбумином

Интерес к компьютерному моделированию связывания лигандов с белками вызван тем, что он, в отличие от абсолютного большинства экспериментальных методов, позволяет изучить механизм процесса на молекулярном уровне, установить, какие аминокислотные остатки непосредственно взаимодействуют с лигандом и какова структура образующегося комплекса, а в идеале еще и рассчитать энергию его образования. Кроме того, использование вычислительных подходов позволяет быстро провести скрининг соединений в библиотеках из миллионов молекул, получая на выходе набор, обогащенный потенциально активными структурами.

Вычислительные методы, применяемые для разработки лекарственных соединений и предсказания констант связывания, принято разделять на *structure-based* (основанные на данных о структуре белка) и *ligand-based* (основанные на данных об известных лигандах) подходы. Трехмерные структуры белков и их основных центров связывания стали достоверно известны в последние десятилетия с развитием методов рентгеноструктурного анализа, ЯМР и криоэлектронной микроскопии. В *structure-based* подходах используется оценка энергий белок-лигандных комплексов, которая может быть осуществлена с помощью эмпирических оценочных функций в методе молекулярного докинга или более строго на основе данных молекулярно-динамических расчетов.

*Ligand-based* подходы основаны на знаниях о связи между экспериментально определяемыми свойствами и структурой молекул. Для этих подходов не обязательно знать 3D-структуру молекулы мишени. Они основаны на корреляциях, часто называемых количественными соотношениями структура-активность (QSAR), которые могут представлять собой как множественные линейные регрессии, так и любые модели машинного обучения.

### 1.3.1 Молекулярный докинг

Поиск наиболее низкой по энергии структуры комплекса лиганда с белком путем ограниченного перебора возможных структур называется молекулярным докингом. Для расчета энергии взаимодействий между атомами используются либо потенциалы, используемые в методе молекулярной динамики, либо специально оптимизированные оценочные функции. Последние обычно дают лучшие результаты, хотя оказываются во многом лишены физического смысла. Например, в одной из самых популярных программ для докинга Vina нет оценочной функции для электростатических взаимодействий, однако присутствует функция для учёта гидрофобности атомов. Метод молекулярного докинга, в первую очередь, используется для предсказания пространственной структуры комплексов белок–лиганд, однако значения оценочных функций используются и для скрининга лигандов, т.е. их ранжирования по аффинности к рецептору. В связи с этим эти значения часто интерпретируют как оценку свободной энергии Гиббса комплексообразования, хотя сами разработчики алгоритмов докинга предостерегают против такого подхода.

Масип и соавторы [68] выпустили критический обзор использования докинга на примере подбора мишеней для главной протеазы SARS-CoV-2. Авторы проанализировали 61 публикацию, вышедшую к 2022 году по этой теме и пришли к выводу, что предсказанные значения энергии Гиббса связывания лигандов с протеазой никак не коррелируют с экспериментальными значениями  $IC_{50}$ . Более того, используя схожие методики и начальные наборы данных разные авторы получали не сходящиеся между собой результаты. Панцар и др. [69] также критикуют докинг в предсказании аффинностей к белкам, отмечая, что изначально метод был разработан для предсказывания поз лиганда в полости белка. Авторы считают, что требуется значительное развитие метода для того, чтобы получаемые энергии комплексов были близки к реальным.

Методы докинга неоднократно пытались применять и для расчетов констант связывания с альбумином. Например, Вани и др. [70] изучали связывание БСА с помощью тушения флуоресценции и молекулярного докинга и



пришли к выводу, что результаты, полученные двумя методами сходятся между собой. Захра и соавторы [71] изучали связывание с БСА синтезированных ими фенантролиновых комплексов тербия (III) и иттербия (III). Авторы получили константы связывания этих комплексов методом тушения флуоресценции при разных температурах. По данным гибкого докинга они сделали вывод о хорошем его согласии с экспериментом и предпочтительном связывании обоих комплексов с Судлоу I. Эволи и др. [72] изучали связывание ибупрофена по разным центрам связывания ЧСА. Использование метода жесткого молекулярного докинга привело к заключению, что ибупрофен взаимодействует с семью центрами связывания альбумина с энергиями Гиббса в диапазоне от  $-6$  до  $-7,5$  ккал·моль<sup>-1</sup>. Авторы отмечают, что столь небольшие различия в энергиях связывания сопоставимы с погрешностью расчетов и тем более не соотносятся с экспериментальными представлениями о том, что ибупрофен очень селективно связывается с центром связывания Судлоу II.

В работе Лексы и др. [73] докинг был использован для установления предпочтительных центров связывания в ЧСА для различных лигандов, а также для построения QSAR моделей, где вместо константы связывания использовалась оценочная функция докинга. В ряде других работ [74–77] докинг используется лишь для установления структуры комплекса лиганда с альбумином.

### 1.3.2 Молекулярная динамика

Метод молекулярной динамики (МД) основан на численном решении классических уравнений движения частиц в некотором выделенном объеме среды. При этом в системе могут поддерживаться заданные температура и давление. Записываемая траектория системы представляет собой набор координат атомов и их скорости в зависимости от времени. Все частицы, находящиеся в исследуемой ячейке, взаимодействуют друг с другом посредством заданных потенциалов взаимодействия. Их выбор является наиболее важным этапом построения модели.

Изучение динамики белков и их комплексов в явно заданном растворителе традиционно является одним из важнейших направлений использования метода МД, для чего разработаны специализированные наборы потенциалов и расчетные методики. Энергия Гиббса связывания не может быть посчитана напрямую в отдельной симуляции, даже если речь идет о простом процессе взаимодействия двух частиц при заданном взаимном расположении в комплексе. Для ее определения применяют такие методики, как пертурбация свободной энергии (FEP), термодинамическое интегрирование, зонтичная выборка (*umbrella sampling*), метадинамика. Многие из них требуют проведения множества симуляций для каждой изучаемой системы, что многократно увеличивает вычислительные затраты. Точный расчет энергии Гиббса связывания без применения ускоренного сэмпинга требует записи очень длинных траекторий, чтобы система успевала побывать во всех возможных состояниях, различающихся конформацией лиганда и аминокислотных остатков белка, а также их взаимной пространственной ориентацией [78]. Несмотря на активное развитие методов МД, в данный момент они плохо применимы для массового виртуального скрининга потенциальных лекарственных препаратов из-за высоких вычислительных затрат, поэтому для первичной оценки способности к связыванию прибегают к другим методам, чаще всего к молекулярному докингу.

Распространенными упрощенными методами вычисления энергии Гиббса связывания белок-лиганд являются методы MM/PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) [79–81] и MM/GBSA [82–84]. Расчет энергии Гиббса связывания в этих методах осуществляется с помощью термодинамического цикла:

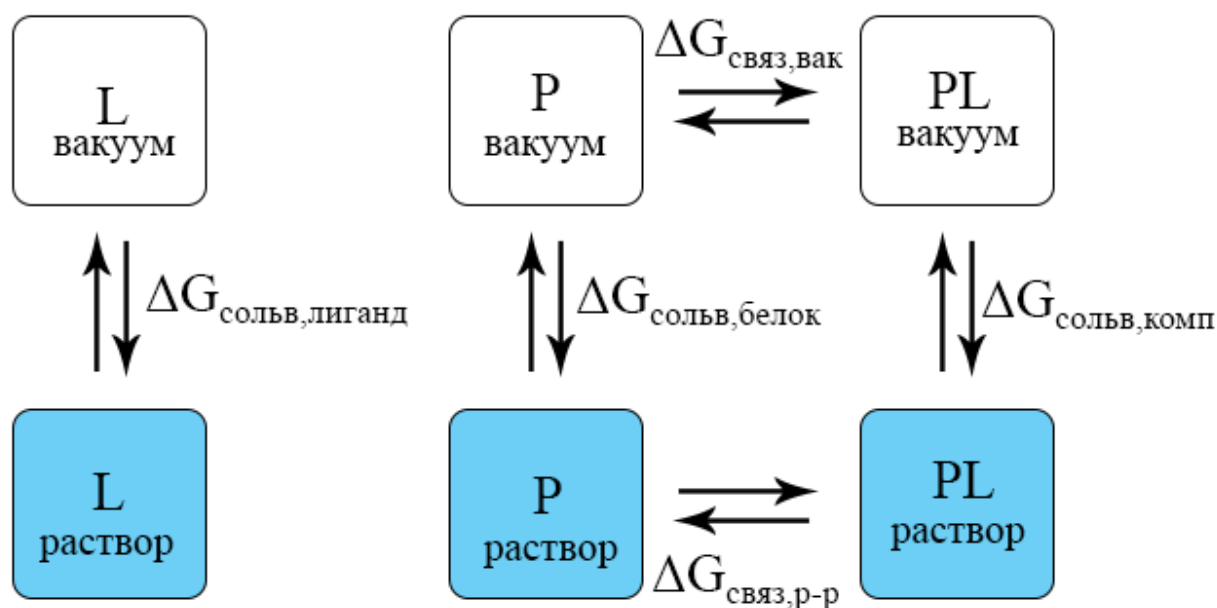


Рисунок 1.4 – Принцип расчета энергии связывания в MM/P(G)BSA.

$$\Delta G_{\text{связ,р-р}} = \Delta G_{\text{связ,вак}} + \Delta G_{\text{сольв,комп}} - (\Delta G_{\text{сольв,лиганд}} + \Delta G_{\text{сольв,белок}}) \quad (1.3.1)$$

Свободные энергии сольватации рассчитываются с помощью уравнения Пуассона-Больцмана (MM/PBSA) или обобщенной формулы Борна (MM/GBSA) с учетом вклада гидрофобных взаимодействий. Энергия Гиббса в вакууме рассчитывается из усредненной энергии взаимодействия белка и лиганда с учетом изменения энтропии, которой иногда пренебрегают, особенно в случае связывания серии лигандов с одним и тем же белком. Средняя энергия взаимодействия может быть получена из результатов моделирования с применением равновесной молекулярной динамики.

Точность методов оставляет желать лучшего. В работе Самюэля Генхедена [85] показано, что для систем, в которых энергия связывания составляла 47-62 кДж/моль, погрешность расчета методом MM/PBSA составляла 11-14 кДж/моль. Тингжун Хоу и соавторы [80] в своем исследовании обнаружили сильную зависимость точности от изучаемой системы: коэффициент корреляции для 18 изученных лигандов варьировался от 0,27 для цитохрома С пероксидазы до 0,92 для авидина.

В работе Фудживары и др. [86] с помощью метода ММ/PBSA были получены энергии связывания жирных кислот с центрами связывания альбумина. Однако воспроизвести экспериментальные энергии связывания не получилось.

Подход ММ/PBSA был также применен Ю и др. [87] для изучения связывания противоракового препарата паклитаксела с ЧСА. Авторы получили значения энергий взаимодействия лиганда с центрами Судлоу I и Судлоу II. Ими было показано, что более низкая энергия в случае с Судлоу I, по-видимому, обуславливается большим количеством водородных связей между лигандом и аминокислотной последовательностью в этом центре. Предпочтительность центра также была показана методом докинга [88], тушения флуоресценции в присутствии маркера центра связывания [80,81]. Стоит отметить, что авторы не сравнивают напрямую рассчитанные и экспериментальные значения константы или энергии связывания.

Работа Римака и др. [91] посвящена изучению связывания кверцетина с ЧСА в присутствии индометацина с применением спектрофлуориметрии, а также методов молекулярного докинга, молекулярной динамики и ММ/GBSA. Все методы подтвердили преимущественное взаимодействие обоих лигандов с центром Судлоу I. Выводы из результатов ММ/GBSA о преимущественном связывании альбумина с салициловой кислотой по Судлоу I также были сделаны в работе Тазикех и др. [92].

Таким образом, отсутствуют достоверные удачные примеры использования методов атомистического моделирования для предсказания констант связывания достаточно широкого круга соединений с альбумином. Отдельные рассуждения о предпочтительности связывания тех или иных соединений или одного соединения с тем или иным центром могут быть случайными совпадениями.

### 1.3.3 Соотношения структура-свойство для связывания с альбумином

Поиск корреляций сродства к альбумину с другими свойствами органических лигандов ведется довольно давно [93–95]. Известны соотношения QSAR (Quantitative structure-activity relationships), связывающие логарифмы

констант связывания с альбумином с различными видами молекулярных дескрипторов, включая фрагментные, топологические, квантово-химические, а также с экспериментально определяемыми физико-химическими свойствами. Эти соотношения чаще всего основываются на множественной линейной регрессии, однако существуют и примеры использования различных моделей машинного обучения [96, 97].

Ранние исследования влияния структуры лигандов на сродство к альбумину содержали качественные выводы без построения корреляций. В работе М. Табачника 1964 г. [98] изучались замещенные производные тироксина. Значения констант связывания были получены методом равновесного диализа с использованием тироксина, меченого  $I^{131}$ . Был сделан вывод, что ключевыми для прочного связывания с альбумином являются фенольная ОН-группа, атомы иода в положении 3' и 5' и дифенильная эфирная группа. Отсутствие в структуре каждого из этих участков снижало константу связывания. Было показано, что связывание ослабляется при замене галогенов в положениях 3', 5' в ряду  $I > Br > Cl$ .

В работе Моригучи [99] были получены значения констант связывания с бычьим сывороточным альбумином для анионов замещенных бензойных кислот методом УФ-спектроскопии. Автор обнаружил линейную корреляцию логарифма константы связывания со значениями  $pK_a$  части кислот. Из корреляции выбивались орто-изомеры, что было объяснено проявлением орто-эффекта. Наличие корреляции автор связал с тем, что карбоксилатная группа анионов кислот взаимодействует с положительно заряженными при физиологическом pH остатками альбумина. Для п-метоксибензойной, м- и п-метилбензойных кислот значения констант оказались выше предсказанных с помощью корреляции, из чего был сделан вывод о том, что прочность связывания определяется не только электростатическими взаимодействиями, но и гидрофобным эффектом.

Определение констант связывания серии анионов п-замещенных ароматических кислот (при pH=7.00) с бычьим и человеческим сывороточными альбуминами с помощью ультрацентрифугирования описано в работе Матсишуты

[100]. На основе полученных данных была предпринята попытка построения корреляции QSAR. С помощью множественной регрессии было получено выражение, которое описывает зависимость константы связывания с альбумином от четырех параметров: константы диссоциации кислоты  $pK_a$ , ван-дер-Ваальсова объема ( $V_w$ ), гидрофобного эффекта ( $V_H$ ) и параметра гидрофобности заместителя  $\pi$ , предложенного в работах Ганша и др. [101]. Показано, что значение константы растет с увеличением гидрофобности молекулы, её объема и с уменьшением  $pK_a$ . Уравнения для связывания с ЧСА имеют вид:

$$\log K = 2,51(\pm 1,21)V_w - 1,53(\pm 0,73)V_H - 0,34(\pm 0,27)pK_a + 3,84(\pm 0,27),$$

$$n = 15, r = 0,909 \quad (1.3.2)$$

$$\log K = 0,64(\pm 0,21)\pi - 0,31(\pm 0,26)pK_a + 5,84(\pm 1,16),$$

$$n = 15, r = 0,894 \quad (1.3.3)$$

а корреляции для связывания с БСА несколько отличаются значениями коэффициентов:

$$\log K = 2,83(\pm 0,99)V_w - 1,63(\pm 0,64)V_H - 0,26(\pm 0,24)pK_a + 3,26(\pm 1,25),$$

$$n = 15, r = 0,934 \quad (1.3.4)$$

$$\log K = 0,69(\pm 0,21)\pi - 0,22(\pm 0,26)pK_a + 5,50(\pm 0,12),$$

$$n = 15, r = 0,906 \quad (1.3.5)$$

На примере производных фенотиазина Сидхер и соавторы [102] анализировали зависимость констант связывания от различных параметров молекулы, таких как  $pK_a$ , коэффициенты распределения  $\log P$  и  $\log D$  ( $P$  – отношение равновесных концентраций недиссоциированных форм вещества в 1-октаноле и воде,  $D$  – отношение равновесных концентраций всех форм вещества в каждой из фаз), молекулярная масса, ван-дер-Ваальсов объем. Экспериментальные значения констант были получены с помощью метода спектрофлуориметрии. Были протестированы корреляции констант с каждым из параметров. Для производных с одним гетероатомом азота в цикле была найдена хорошая корреляция между значениями  $\log K$  и  $\log D$ , однако производное с двумя

гетероатомами в цикле – трифлуоперазин – из этой зависимости выбивалось. Его константа связывания выше, чем предсказываемое моделью значение. Это было объяснено тем, что в молекуле трифлуоперазина протонируются два основных атома азота в кольце, что влияет на значение  $\log D$ , так как этот параметр отражает общую концентрацию всех форм вещества в водном растворе. Корреляция значения константы связывания с ван-дер-Ваальсовым объемом говорит об увеличении прочности связывания с ростом ее гидрофобности.

Большой массив данных с помощью метода ВЭЖХ был получен Колминарейо в 2001 году [103]. Он измерил константы связывания для 95 лекарственных препаратов и их производных. При разработке им модели QSAR 84 молекулы были включены в тренировочный набор, а 10 соединений, имеющих широкий диапазон времен удерживания – в тестовый. С помощью алгоритма GFA (Genetic Function Approximation) были построены две модели. Для поиска одной из них использовалось 53 дескриптора, другой – 12, а полученные модели содержали 5 и 6 дескрипторов соответственно:

$$\log K = 0,020141 + 0,0055367(\text{AM1dip}) + 1,22294(\text{JursRPSA}) - 0,028267(E_{\text{HOMO}} + 7,4076)^2 + 0,14905(\text{ClogP}) + 3,48408(0,18539 - {}^6\chi_{\text{ring}}), r^2 = 0,78 \quad (1.3.6)$$

$$\log K = -0,607873 + 0,06784(\text{HBondDon} - 3)^2 - (9 \cdot 10^{-6})(\text{JursTPSA}) - 0,028261(E_{\text{HOMO}} + 7,4076)^2 + 0,005697(\text{AM1dip})^2 + 0,182595(\text{ClogP}) + 2,33529({}^6\chi_{\text{ring}}), r^2 = 0,83 \quad (1.3.7)$$

Наблюдалось сильное влияние гидрофобности лиганда, о чем говорит большое значение коэффициента перед дескриптором  $\log P$  в полученных уравнениях.

Работа Мао [104] посвящена изучению связывания замещенных аналогов дифлунисала с человеческим сывороточным альбумином с помощью ЯМР-спектроскопии. Главной задачей исследования был поиск заместителей, которые могут быть введены в молекулу дифлунисала для уменьшения константы связывания. Методом ЯМР ранее было установлено, что основной центр связывания подобных препаратов – Судлоу II. Для определения аминокислотных

остатков в центре связывания белка, взаимодействующих с дифлунисалом, был привлечен метод двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии (HSQC). Карбоксильная и гидроксильная группы расположены около гидрофильной части полости и взаимодействуют с Arg410 и Tyr411 за счет электростатических сил и водородных связей. Комплекс также стабилизирован гидрофобными взаимодействиями с ароматическими кольцами, которые ориентированы по неполярным остаткам аминокислот Leu387, Ile 388, Leu407, Leu430, Val 433, Leu453, Val456. Были определены константы связывания дифлунисала и его замещенных структурных аналогов. Аналоги дифлунисала с заменой одного бензольного кольца на различные необъемные группы показали уменьшение константы связывания в 20 раз. Из этого авторы делают вывод о сильном влиянии гидрофобности молекулы на константу связывания. Чем больше гидрофобных участков, например, бензольных колец, содержит молекула лиганда, тем выше значение константы связывания. На следующем шаге проводилась оценка влияния электростатических сил на процесс образования комплекса альбумин-лиганд. Исследовались два соединения, в структуре которых карбоксильная группа была заменена на водород в первом случае и на аминогруппу во втором. Показано снижение константы связывания в 10 и в 100 раз соответственно. Это означает, что электростатическое взаимодействие карбоксильной группы с Arg410 является важным для стабилизации комплексов с альбумином. Замена фтора на водород не привела к значительному изменению константы связывания, однако введение амино- и амидных групп в кольцо снижало константу в 50-250 раз.

Одной из знаковых работ в области изучения связывания альбумина с различными органическими веществами можно назвать работу Клары Валько и соавторов [47]. Она посвящена определению констант связывания различных соединений с иммобилизованным человеческим сывороточным альбумином с помощью ВЭЖХ и поиску их корреляций с коэффициентами распределения октанол-вода  $\log P$  или  $\log D$  и эмпирическими молекулярными дескрипторами Абрахама (молекулярная рефракция ( $E$ ), кислотность ( $A$ ) и основность ( $B$ )).



водородного связывания лиганда, поляризуемость ( $S$ ), молекулярный объем по Мак-Говану ( $V$ ). 52 исследуемых соединения были поделены на несколько групп в зависимости от их заряда при  $pH=7,4$ : положительно заряженные, отрицательно заряженные, нейтральные. Для заряженных соединений значение  $\log D$  оказывается меньше значения  $\log P$  на 3-4 единицы, что связано с плохой растворимостью заряженных форм в *n*-октаноле. Для нейтральных компонентов такого различия в значениях нет. Для каждой из групп были построены графики  $\log K$  ( $\log P$ ) и  $\log K$  ( $\log D$ ). В целом наблюдается корреляция с  $\log P$ , в то время как при сопоставлении с  $\log D$ . константа связывания для заряженных соединений оказывается выше, чем предсказывается корреляцией для нейтральных веществ. Из этого был сделан вывод, что решающую роль в стабилизации комплексов играют гидрофобные взаимодействия. Связывание отрицательно заряженных лигандов обычно прочнее, чем положительно заряженных. Также была получена четырехпараметровая корреляция логарифма константы связывания с молекулярными дескрипторами Абрахама, которая достаточно хорошо описывает константы связывания для 52 молекул лекарственных препаратов:

$$\log K = -1,28 + 0,82(\pm 0,15)E - 0,36(\pm 0,15)S + 0,18(\pm 0,14)A - \\ -1,97(\pm 0,15)V + 1,62(\pm 0,21)V, r^2 = 0,91 \quad (1.3.8)$$

Основанная на данных Колминарейо работа Сю 2004 года [105] посвящена поиску корреляций типа структура-свойство для предсказания константы связывания с человеческим сывороточным альбумином на основе только расчетных дескрипторов с помощью эвристического поиска и метода опорных векторов. Молекулярные дескрипторы для выборки из 84 молекул лекарственных препаратов были рассчитаны в программном обеспечении MOPAC. Построены линейные и нелинейные корреляции константы связывания с этими дескрипторами. Лучшая линейная корреляция была получена с семью дескрипторами: *HDCA-2* – электростатический дескриптор, который зависит от основных (акцептор протона) свойств молекулы, *MSA* – площадь поверхности молекулы, *NO* – количество атомов кислорода, *RNR* – отношение числа колец к

общему числу атомов,  $RNN$  – доля атомов азота,  $BI$  – индекс Балабана, топологический дескриптор, который описывает атомные связи, зависит от разветвленности молекулы и косвенно связан с её гидрофобными взаимодействиями,  $RNCS$  – квантово-химический дескриптор, который зависит от распределения заряда в молекуле. Итоговое уравнение выглядело следующим образом:

$$\log K = -0,401(\pm 0,388)HDCA - 2 + 0,007(\pm 0,001)MSA - \\ -0,149(\pm 0,017)NO + 9,210(\pm 1,395)RNR - 3,945(\pm 0,663)RNN + \\ +0,403(\pm 0,097)BI - 0,045(\pm 0,013)RNCS - 2,513(\pm 0,388), r^2 = 0,86 \quad (1.3.9)$$

Автор также отмечает, что при возрастании параметров гидрофобности возрастает константа связывания, что говорит о большом вкладе в процесс связывания гидрофобных взаимодействий.

Холл, Йоргенсен и Уайтхэд [106] с помощью теоретических методов предложили QSAR модель, которая связывает аффинности к ЧСА с молекулярными дескрипторами QikProp из пакета Schrodinger. Набор данных был взят из работ Валько [47] и Колминарейо [103]. Выборка Валько из 120 молекул была разделена на тестовую и тренировочную выборки в соотношении 3:1. Далее были найдены лучшие модели с варьирующимся от 1 до 7 числом дескрипторов. Окончательная модель имела  $r^2 = 0,68$  на тестовом наборе и содержала в себе 4 дескриптора:

$$\log K = -1,01 + 0,43(\#acid) - 0,26(CIQlogS) - 0,0011(FOSA) + 0,28(QPlogP_{o/w}) \quad (1.3.10)$$

$\#acid$  принимает значение числа карбоксильных групп,  $CIQlogS$  – предсказанная, не зависящая от конформации растворимость,  $FOSA$  – гидрофобная часть поверхности доступной растворителю,  $QPlogP_{o/w}$  – предсказанный коэффициент распределения октанол-вода.

Заметный вклад вносят дескрипторы  $CIQlogS$ ,  $QPlogP_{o/w}$ . Несмотря на это, однопараметровые модели с этими дескрипторами дают точность всего 0,62 и 0,46 соответственно. Использование дескрипторов  $FOSA$  или  $\#acid$  приводит к  $r^2$

$< 0,02$ . Коэффициент перед дескриптором *#acid* является самым большим среди всех, однако авторы отмечают, что сам дескриптор был 0 (нет карбоксильных групп) или 1 (одноосновная кислота). Авторы отмечают, что для многоосновных кислот модель должна использоваться с осторожностью. Корреляция подтверждает общепринятые выводы о том, что альбумин преимущественно связывает гидрофобные молекулы с карбоксильными группами.

В работе Серры и др [107] 2019 года был использован подход QSMARt (quantitative structure and mechanism of action-activity relationship) для предсказания связывания с ЧСА. Данные о связывании были взяты из работы Колминарейо [103]. В качестве признаков для машинного обучения были использованы 5325 молекулярных дескрипторов, сгенерированных в программе DRAGON v.7.0, а также признаки MOA (mechanism of action), которые связаны с биологическим действием лигандов и профилями экспрессии генов. После отбрасывания постоянных и сильно коррелированных между собой признаков ( $>95\%$ ) был получен набор данных, содержащий 24934 признака для каждого из 59 лигандов, который далее был поделен на тестовый (20%) и тренировочный (80%). Для валидации использовалось 10% тренировочного набора. Для получения регрессии был использован метод лассо. В итоге была получена наилучшая модель, которая основана на трех молекулярных дескрипторах и трех признаках MOA:

$$\log K_{HSA} = -0,372 + 0,012 |Mor23i|^{1.25} - 0,042 |N-072|^{1.25} + 0,139 |ALOGP|^{1.25} - \\ -2,980 |MCF7\_ENSG00000112115|^{1.75} - 0,075 |PC3\_ENSG00000197646|^{1.75} \\ - 0,216 |PC3\_ENSG00000276644|^{1.75}, r^2(\text{тест}) = 0,65 \quad (1.3.11)$$

Для лучших моделей на основе только молекулярных дескрипторов и признаков MOA  $r^2$  на тестовой части составляет 0,62 и 0,1 соответственно. Дескриптор Mor23i связан с межатомными расстояниями и потенциалом ионизации. Положительная корреляция с константой связывания говорит о том, что акцепторы электронной пары (кислоты Льюиса), по-видимому, имеют большую аффинность к альбумину. N-072 является дескриптором, который связан с количеством групп вида RCO-N $<$  или  $>$ NX=X, где R – любая группа, связанная

через атом углерода, а X – электроотрицательный атом (кислород, сера, фосфор, галогены, азот). Отрицательная корреляция говорит о том, что наличие описанных выше групп понижает прочность связывания с альбумином. ALOGP представляет собой коэффициент распределения октанол-вода, который рассчитывается по методу Госа-Криппена. Положительный коэффициент при этом дескрипторе, как и результаты многих других работ, говорит о том, что, чем более гидрофобна молекула лиганда, тем прочнее она связывается с альбумином.

В работе Госса [108] с помощью методов анализа равновесного пара и экстракции были получены коэффициенты распределения  $K_{BSA/w}$  между БСА и водой различных по структуре органических молекул при их низких концентрациях, которые пропорциональны константам связывания  $K_{BSA/w} = K_a \cdot [БСА]$  (1.3.12). Логарифмы этих величин хорошо коррелировали ( $r^2 = 0,76$ ) с параметром гидрофобности  $\log P$ . Также авторами была получена многопараметровая корреляция с эмпирическими дескрипторами Абрахама:

$$\begin{aligned} \log K_{BSA/w} = & -0,88(\pm 0,07) + 0,57(\pm 0,07)E - 0,46(\pm 0,06)S + 0,13(\pm 0,07)A - \\ & - 2,01(\pm 0,08)V + 2,01(\pm 0,08)V, \quad (1.3.13) \\ n = & 173, r^2 = 0,88 \end{aligned}$$

Недавняя работа Ульриха и др. [16] посвящена изучению взаимодействия большого набора лигандов с альбумином с использованием колонок ВЭЖХ с иммобилизованными БСА и ЧСА. Для значений  $\log K$  было показано наличие корреляции со сравнительно невысоким коэффициентом с  $\log P$  (рисунок 1.5). Несмотря на большой объем полученных экспериментальных данных, более точных корреляций структура-свойство авторами получено не было.

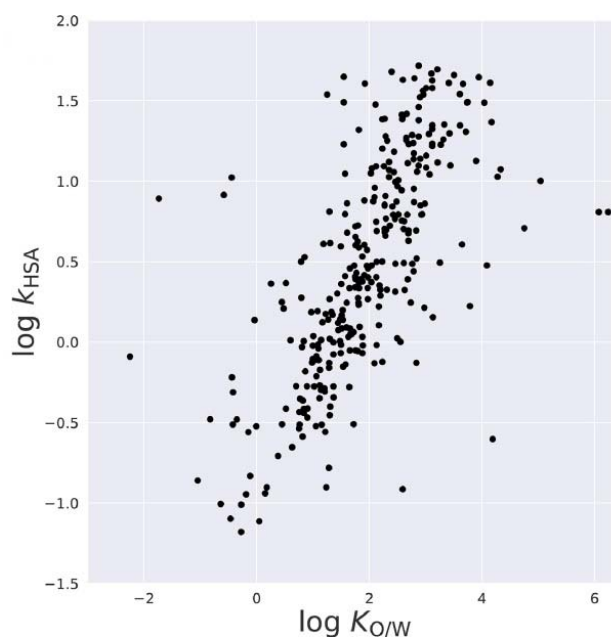


Рисунок 1.5 – Корреляция  $\log k$  с параметром гидрофобности молекул [16].

Можно сделать вывод о том, что, несмотря на значительные погрешности экспериментов, исследователи приходят к единому мнению, что основной вклад в механизм связывания вносят гидрофобные и в меньшей степени электростатические взаимодействия. Сильная зависимость от коэффициента распределения *n*-октанол-вода говорит о неспецифичности связывания альбумина с различными лигандами, что определяет универсальные свойства альбумина как транспортного белка.

Тем не менее, все известные QSAR-модели построены на определенных наборах данных, чаще всего полученных методом ВЭЖХ, и не могут быть напрямую перенесены на другие наборы (в том числе также полученные методом ВЭЖХ из-за отличий условий экспериментов). При этом не существует достаточно больших наборов данных для связывания различных по структуре соединений с альбумином в растворе (а не с иммобилизованной твердой фазой на хроматографической колонке), учитывающих различия в условиях и методах определения констант связывания. Это мешает разработке моделей, способных описывать связывание потенциальных лекарственных соединений с альбумином. В настоящей работе сделан шаг к созданию такой базы данных.

## Основные задачи исследования

На основе проведенного обзора современного состояния изучения связывания низкомолекулярных органических соединений с альбумином становится понятно, что существующие экспериментальные методы имеют высокие погрешности, которые определяются совокупностью сложности взаимодействий в исследуемых системах, проблем с дизайном экспериментов, приборных ограничений и неудачного выбора используемых для обработки данных моделей. Методы молекулярного моделирования также не могут обеспечить достаточной точности значений констант связывания с альбумином, а методы машинного обучения страдают от недостатка достоверных и совместимых между собой экспериментальных данных. Поэтому дальнейшее изучение связывания с альбумином любыми экспериментальными и/или теоретическими методами и совершенствование этих методов является актуальной задачей. Нами были поставлены следующие задачи:

разработка базы данных констант связывания сывороточных альбуминов млекопитающих с различными лигандами в растворе, анализ сходимости результатов, полученных разными авторами и методами;

получение термограмм денатурации бычьего сывороточного альбумина изучение в присутствии серии лигандов с различной аффинностью методом дифференциальной сканирующей калориметрии;

разработка метода оценки констант связывания по данным ДСК, позволяющего использовать различные параметры и модели связывания и денатурации белка и применимого для изучения связывания с альбумином;

валидация метода на системах с достоверно определенными константами связывания и применение к ранее не изучавшимся лигандам;

разработка и апробация хорошо воспроизводимой методики определения констант связывания с альбумином методом спектрофлуориметрии;

анализ возможности предсказания аффинности к альбумину методом молекулярного докинга;

анализ возможности предсказания констант связывания с альбумином с помощью корреляционных соотношений типа структура-свойство на основе многопараметровых линейных регрессий и методов машинного обучения;

установление связи между аффинностью лигандов к альбумину и их влиянию на денатурационную и агрегационную устойчивость белка, в частности, ингибирование роста фибрилл альбумина за счет связывания нативной формы с лигандами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1 Объекты исследования

Бычий сывороточный альбумин (ПанЭко, Москва, Россия, >98%) был использован без предварительной очистки. Он не содержал значительных примесей жирных кислот. Температура денатурации нашего образца совпадала с ранее изученными образцами обезжиренного альбумина [95,96]. Человеческий сывороточный альбумин производства Alfa Aesar был очищен от жирных кислот по методике, описанной в статье [111] с помощью активированного угля. Раствор альбумина с концентрацией  $100 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  был подкислен соляной кислотой до  $\text{pH} = 2$ . В колбу добавлялся активированный уголь такой же массы, как и навеска белка, а затем система помещалась в кристаллизатор со льдом и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке выдерживалась 1 час. После этого смесь центрифугировалась 20 минут на 14500 rpm от частичек угля. Надосадочный раствор, содержащий обезжиренный белок, был отделен, нейтрализован до  $\text{pH} = 7$  и заморожен в чашке Петри. Далее альбумин был отделен от воды с помощью лиофильной сушки. Выход обезжиренного белка по этой методике составил от 60 до 80% от начальной навески. Полученный порошок белка содержит более 98% альбумина, что подтверждается значением коэффициента экстинкции, измеренным с помощью УФ-спектроскопии.

Органические лиганды представляли собой лекарственные соединения различной структуры, а также серию замещенных бензойных кислот. Они были использованы без предварительной очистки и являлись коммерческими продуктами с чистотой не менее 99%.

Было использовано два типа буферных растворов: фосфатный буфер ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 мМ,  $\text{pH}=7,4$  (ЭКРОС)) и трис-буфер (25 мМ,  $\text{pH} = 7,4$ , Trizma Base и Trizma HCl (Sigma Aldrich, USA) (рисунок 2.1) ).

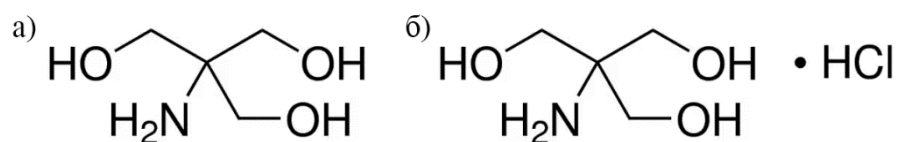




Рисунок 2.1 – Структурные формулы компонентов трис-буфера а) Trizma Base, б) Trizma HCl.

## 2.2 Метод дифференциальной сканирующей калориметрии

ДСК-термограммы денатурации БСА при различных концентрациях лиганда были получены с помощью капиллярного дифференциального сканирующего калориметра NanoDSC фирмы TA Instruments. Все эксперименты проводились в фосфатном буфере.

Измерительная ячейка заполнялась раствором БСА с концентрацией 5 мг·мл<sup>-1</sup> при варьировании отношения лиганд:белок от 0 до 10 или 2 мг·мл<sup>-1</sup> при варьировании отношения от 20 до 100. Ячейка сравнения заполнялась буферным раствором без белка, содержащим ту же концентрацию лиганда, что и раствор в измерительной ячейке. Растворы перед помещением в калориметр дегазировали, чтобы предотвратить образование пузырьков воздуха. В каждом эксперименте раствор белка нагревался от 275 до 373 К с постоянной скоростью 2 К·мин<sup>-1</sup> в капиллярной ячейке калориметра объемом 300 мкл.

Полученные ДСК-термограммы были первично обработаны в программном пакете NanoAnalyze (TA Instruments). Интегрирование пиков денатурации было выполнено с использованием сигмоидальной базовой линии. В каждом эксперименте были определены температура максимума пика денатурации БСА  $T_d$  и калориметрическая энтальпия денатурации  $\Delta_d H$ . Полученные данные затем анализировались с помощью разработанных авторами вычислительных подходов, описанных ниже в разделе “Результаты”.

## 2.3 Изучение кинетики фибриллообразования альбумина в присутствии различных лигандов

Фибриллы БСА готовили путем инкубации 5 мг·мл<sup>-1</sup> раствора альбумина при 65°C в присутствии различных концентраций лигандов (мольное соотношение лиганд:белок  $[L]/[P] = 0, 1, 2, 10$ ) в термостате без перемешивания.

Через определенные промежутки времени из раствора отбирали образцы и охлаждали их до комнатной температуры.

50 мкМ раствор тиофлавина Т (ThT) готовили в 25 мМ трис-буфере при pH 7,4. Образцы инкубированного белка добавляли в кюветы с раствором ThT до конечных концентраций 3 и 10 мкМ белка и ThT соответственно. Кюветы выдерживали 10 минут при 25°C, затем регистрировали спектры флуоресценции на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) в диапазоне длин волн испускания от 460 до 500 нм,  $\lambda_{ex} = 450$  нм. Эксперимент повторялся как минимум 5 раз для каждого из образцов.

Для изучения фибриллообразования также были привлечены методы УФ-видимой спектрофотометрии и спектроскопии кругового дихроизма.

200 мкМ раствор конго красного был приготовлен в трис-буфере с добавлением этанола (10% по объему) для солюбилизации. В кюветы, содержащие 2,06 мл трис-буфера, вносили 0,1 мл образцов инкубируемого белка и 0,24 мл раствора конго красного до конечных концентраций белка и красителя 3 и 20 мкМ соответственно и общего объема 2,4 мл. Полученные образцы выдерживали в темноте в течение 10 мин при 25°C, затем регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 400–600 нм с помощью спектрофотометра Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США).

Спектры кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области в диапазоне длин волн от 204 до 260 нм были зарегистрированы на спектрометре JASCO J-1500 (Токио, Япония). Перед измерениями образцы инкубированного белка разбавляли трис-буфером до концентрации 0,5 мкМ.

#### 2.4 Определение констант связывания серии изучаемых лигандов методом спектрофлуориметрии

Измерения проводились с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer фирмы Agilent Technologies. Для дегазации растворов использовалась станция дегазации TA Instruments. Для титрования

применялся микрошприц Hamilton объемом 250 мкл с канюлей. Контроль температуры во время эксперимента осуществлялся с помощью пельтье-термостатируемой приставки. В течение всего эксперимента содержимое кюветы перемешивалось магнитной микромешалкой.

Для проведения эксперимента готовился свежий раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 1 мкМ в фосфатном буфере (рН=7,4, 25 мМ). Навески лигандов растворялись в таком же буфере с последующим разбавлением до концентраций в диапазоне 20-50 мкМ. Все растворы тщательно дегазировались при перемешивании. Раствор белка объемом 2,3 мл заливался в кварцевую кювету и отстаивался в ней в течение 40 минут для адсорбции молекул белка на стенках кюветы. Перед титрованием раствор белка заменялся на свежий и титровался с помощью микрошприца с канюлей при 298 К раствором лиганда. После каждого добавления записывался спектр флуоресценции при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 280$  нм в диапазоне длин волн испускания  $\lambda_{em}=310-370$  нм. Эксперимент с каждым из лигандов повторялся как минимум трижды.

Длина волны возбуждения 280 нм соответствует возбуждению флуоресценции триптофана и в меньшей степени тирозина. Триптофановые остатки располагаются вблизи высокоаффинных центров связывания альбумина Судлоу I и Судлоу II. Максимум испускания приходится на длину волны 347 нм. При добавлении лиганда наблюдается тушение флуоресценции за счет изменения окружения триптофана, что может быть использовано для определения констант связывания. Как в большинстве литературных исследований, так и в настоящей работе для определения констант использовалось уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = K_{sv}[L] + 1 \quad (2.4.1)$$

При этом учитывался тот факт, что при титровании в кювете происходит разбавление раствора белка-флуорофора, поэтому для вычисления константы связывания были использованы не сами величины сигналов флуоресценции в начальный и текущий момент титрования, а отношения этих сигналов к текущей

общей концентрации белка. Тогда уравнение (выше которое) можно записать следующим образом:

$$\frac{\varepsilon_0}{\varepsilon} = K_a[L] + 1 \quad (2.4.2)$$

где  $\varepsilon_0 = \frac{F_0}{[P]_0}$  и  $\varepsilon = \frac{F}{[P]}$ .

Из полученных линейных графиков  $\frac{\varepsilon_0}{\varepsilon}$  ([L]) были определены значения констант связывания, которые равны угловому коэффициенту корреляционной прямой.

При определении констант со значениями выше, чем  $5 \cdot 10^4$ , равновесная концентрация свободного лиганда в ходе титрования не может быть приравнена к общей. В таких случаях для обработки данных была использована специально написанная программа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## ГЛАВА 3 КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ АЛЬБУМИНА С ЛИГАНДАМИ

## 3.1 Создание базы данных констант связывания альбуминов млекопитающих с лекарственными соединениями

В главе 1 настоящей диссертации были описаны некоторые ключевые работы, посвященные связыванию альбуминов млекопитающих с различными лигандами, а также рассмотрены методы, с помощью которых они были получены. Данные о связывании представляют большой интерес для разработки соотношений структура-свойство, способных предсказывать константы связывания не изученных ранее веществ.

## 3.1.1 Источники литературных данных

К настоящему моменту существуют крупные онлайн-базы данных, которые включают в себя литературные значения констант связывания с альбуминами: ChEMBL, PubChem, BindingDB. Данные в этих базах пересекаются, кроме того, отражают лишь результаты части описанных в литературных источниках экспериментов.

Значения констант, полученные различными методами или различными авторами, могут отличаться более чем на три порядка. В качестве примера на рисунке 3.1 приведены значения констант связывания ибупрофена с ЧСА при 310 К из различных литературных источников (33 значения). Поэтому, помимо непосредственно значений констант, нужно анализировать их достоверность, учитывать то, какой метод и условия проведения экспериментов использовались в каждом конкретном случае.

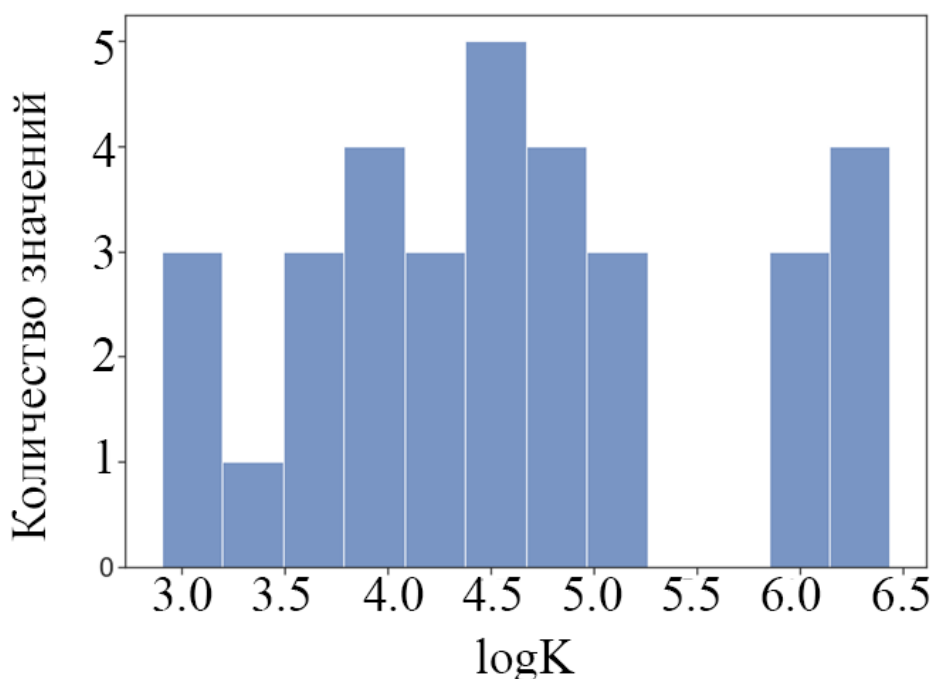


Рисунок 3.1 – Распределение значений десятичных логарифмов констант связывания ибупрофена с ЧСА при 310 К, полученных из литературных данных.

Мы провели поиск в литературе экспериментальных констант связывания различных низкомолекулярных органических соединений, прежде всего клинически одобренных лекарственных препаратов, с альбуминами млекопитающих. В собранной базе каждое литературное значение константы связывания лиганд–альбумин сопровождается следующими сведениями: организм-источник альбумина, название лиганда, SMILES и InChIKey, значение константы связывания ( $K_a$  или  $K_d$ ) в молярной шкале, температура, концентрация альбумина и лиганда, pH буфера и его состав и концентрация, использованный экспериментальный метод, использованная модель расчета константы, DOI или ссылка на исходную статью. Для значений, полученных с использованием моделей связывания с несколькими независимыми центрами, также приводится среднее число центров связывания  $n$ . Если модель предусматривает два разных типа центров связывания, то константы связывания записываются отдельно для каждого конкретного центра вместе со стехиометрией (числом центров)  $n_1$  и  $n_2$ . Значения третьей и последующих констант связывания ненадежны и всегда игнорировались. Для некоторых систем определялись также энтальпии

связывания либо по температурной зависимости константы связывания, либо с помощью прямых калориметрических измерений. Их значения также приведены в соответствующей колонке.

Главным критерием отбора данных было отсутствие каких-либо других белков или лигандов в исследуемой системе. В нашу базу данных не вошли результаты:

- *in vivo* исследований связывания веществ с плазмой крови или любых экспериментов по связыванию с сывороткой крови, выделенной из живых организмов, поскольку они содержат смесь разных белков;
- экспериментов в присутствии любых органических или неорганических (например, ионов щелочных металлов) веществ, отличных от компонентов буфера/среды. В частности, были исключены эксперименты с участием маркеров сайта связывания альбумина. Следует понимать, что обычно используемые маркеры центров Судлоу I/II, такие как ибупрофен, кетопрофен или индометацин, на самом деле способны связываться с несколькими различными частями молекулы альбумина, что подтверждается рентгенографическими исследованиями [112]. Таким образом, возможность селективного вытеснения других соединений этими маркерами из определенных центров связывания сомнительна;
- экспериментов по связыванию альбумина с пептидами и макромолекулами, а также с нековалентно связанными супрамолекулярными ассоциатами.
- ВЭЖХ-экспериментов с использованием колонок с химически связанными белковыми неподвижными фазами, а также измерений с использованием альбумина, иммобилизованного на твердых частицах носителя. В таких экспериментах лиганды взаимодействуют с альбумином на границе раздела фаз, что может влиять на константу связывания в зависимости от свойств носителя и степени заполнения его поверхности;

– экспериментов, в которых константа связывания с альбумином определяется на основе корреляционных или гипотетических соотношений, например, измерение ингибирования лигандами гликирования [113] или ферментативной активности альбумина;

– экспериментов, по результатам которых авторами оригинального исследования не были рассчитаны значения констант связывания/диссоциации в явном виде.

Проведенный нами поиск литературы не был исчерпывающим и изначально фокусировался на наборе из 85 клинически одобренных лекарственных препаратов. Затем мы добавили к нему все данные о связывании альбумина, доступные в онлайн-базах данных ChEMBL и BindingDB. При этом каждый источник данных о связывании с альбумином для этих баз был проанализирован вручную, при этом были отброшены эксперименты, не соответствующие любому из вышеприведенных критериев. Также из оригинальных источников были извлечены детали экспериментов, включенные в нашу таблицу. Эти данные не ограничиваются клиническими препаратами и включают константы связывания лекарственных кандидатов, биологически активных веществ и прочих органических лигандов. Всего в нашей базе данных приведено 1755 значений констант связывания для 324 веществ.

### 3.1.2 Анализ собранных данных

Основные проблемы экспериментальных исследований связывания альбумина были описаны выше в литературном обзоре (глава 1). Все описанные факторы приводят к большой вариации полученных значений для одной и той же системы в разных источниках, что можно увидеть и на примере нашей базы данных.

На рисунке 3.2 показано количество исследований для каждого экспериментального метода.





Рисунок 3.2 – Количество статей, в которых используются различные экспериментальные методы определения констант связывания альбумина с лигандами.

Флуоресцентная спектроскопия и, в частности, измерение тушения флуоресценции альбумина, на сегодняшний день является наиболее популярным методом определения констант связывания. Как уже было указано выше, в этом методе есть множество подводных камней, которые могут привести к ненадежным результатам. Общей проблемой, которую можно встретить во многих работах, является сильная зависимость результатов от длины волны возбуждения или от модели (Штерна-Фольмера, двойной логарифмический график или модель Скэтчарда), которая используется для вычисления констант связывания. Обычно не рекомендуется использовать двойные логарифмические или двойные обратные (модифицированные графики Штерна-Фольмера) графики из-за больших ошибок определения констант [22].

Большинство данных, представленных в литературе, были получены для человеческого (62% работ) и бычьего (32% работ) сывороточных альбуминов, которые легко доступны в продаже. Другие альбумины млекопитающих использовались только в отдельных исследованиях (рисунок 3.3).

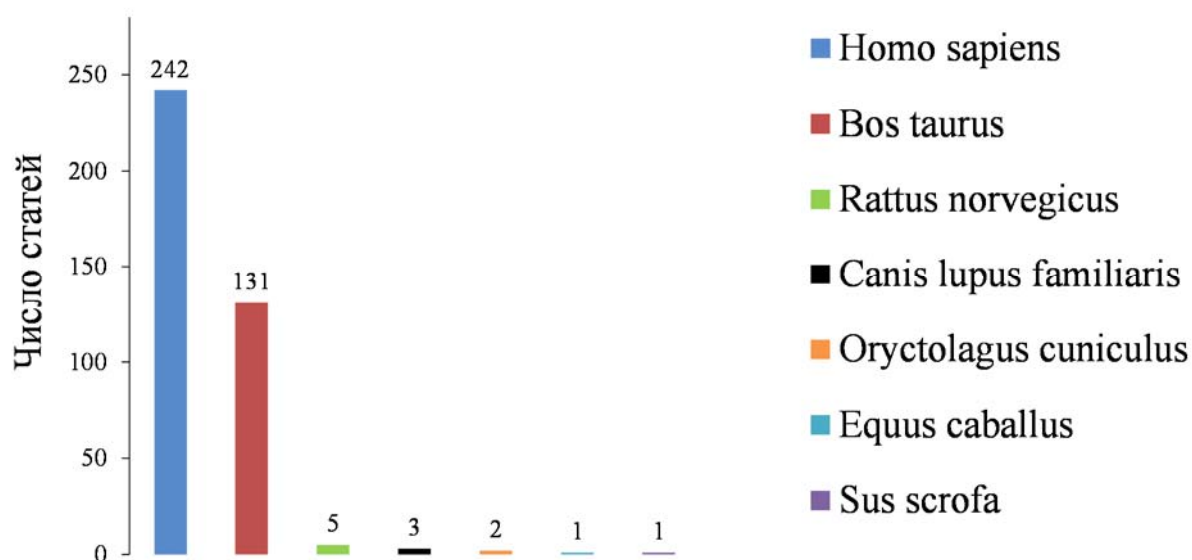


Рисунок 3.3 – Распределение организмов-источников альбумина из литературных исследований связывания с лигандами.

Концентрация альбумина может сильно влиять на значения констант связывания, так как альбумин в растворах образует димеры (и более крупные агрегаты в концентрированных растворах), которые обладают различной способностью к связыванию. Так, Ли и соавторами [114] было показано, что только димер альбумина может селективно связывать некоторые положительно заряженные фталоцианины.

Как видно из рисунка 3.4, в большинстве исследований этой проблемы удастся избежать путем использования низких концентраций альбумина.

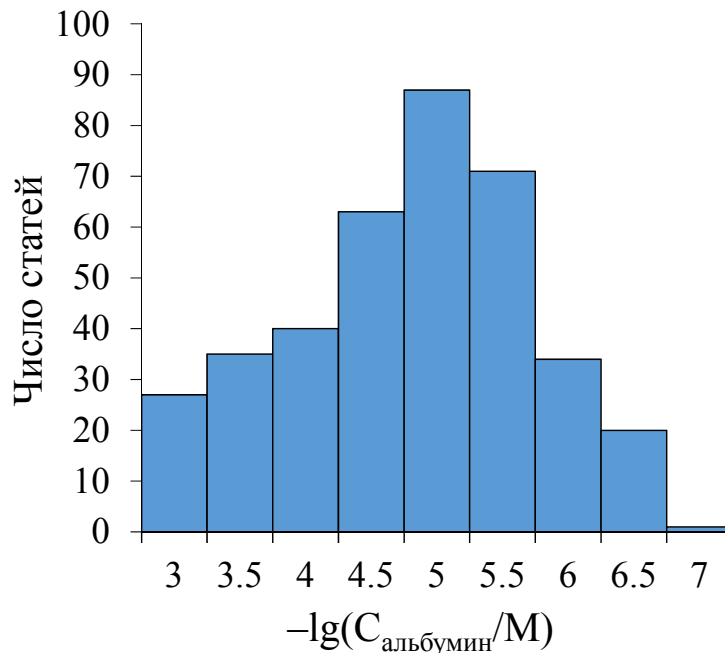


Рисунок 3.4 – Распределение концентраций альбумина в литературных исследованиях связывания альбуминов с лигандами.

В подавляющем большинстве работ использовались фосфатный или трис-буфер (рисунок 3.5) с рН, точно соответствующим рН крови человека (7,40, рисунок 3.6).

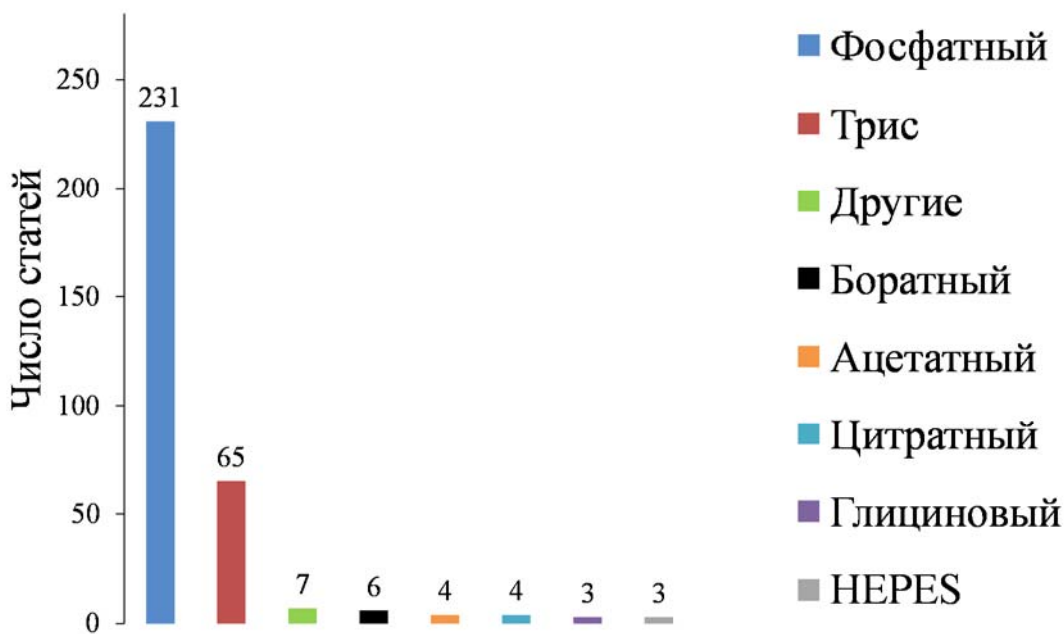


Рисунок 3.5 – Использование различных типов буферов в литературных исследованиях связывания альбуминов с лигандами.

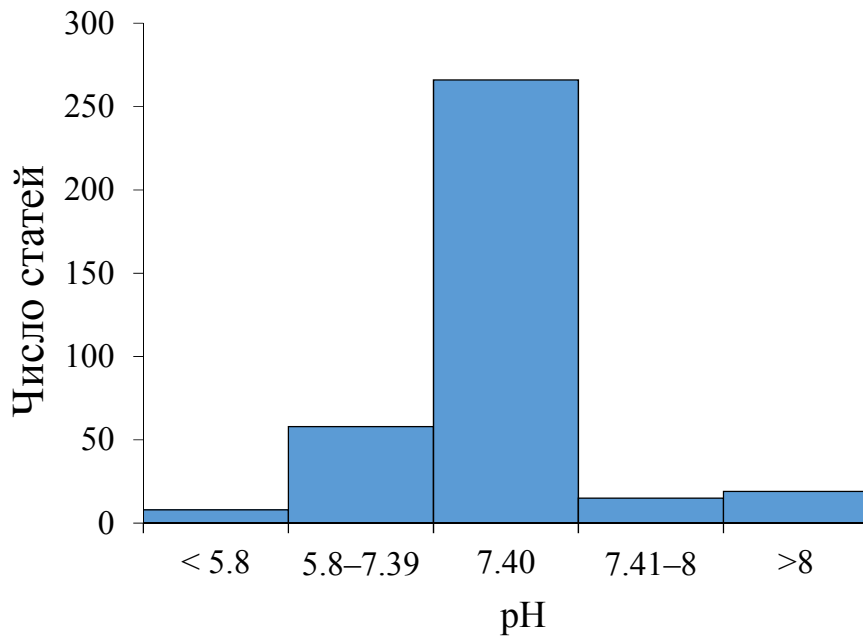


Рисунок 3.6 – Использование различных pH буфера в литературных исследованиях связывания альбуминов с лигандами.

Наиболее распространенными являются концентрации компонентов буферной смеси от 50 до 100 мМ. 100 или 150 мМ NaCl часто добавляют для того, чтобы сделать буфер изотоническим крови. Такие растворы называются фосфатно-солевым буфером (PBS) или фосфатно-буферным физиологическим раствором. В случае использования трис-буфера говорят о трис-буферном физиологическом растворе (TBS). Другие значения pH в диапазоне от 5,8 до 8 также обычно создаются также с использованием фосфатного или трис-буфера с различными соотношениями компонентов. В тех исследованиях, где использовался низкий pH, применялись ацетатный или глицин–солянокислый буферы, в то время как для высоких значений pH использовались карбонатный и боратный буферы. Значение pH может влиять на ионизационное состояние как белка, так и лиганда и, несомненно, влияет на значение константы связывания. Однако исследования этого влияния немногочисленны. Также некоторые буферы, которые содержат органические молекулы, могут взаимодействовать с центрами связывания альбумина, поэтому рекомендуется использование фосфатного буфера.

Еще одним фактором, от которого сильно зависят получаемые результаты, является температура эксперимента. Наибольшее количество измерений было проведено при стандартной температуре 298 К и температуре человеческого тела 310 К (рисунок 3.7).

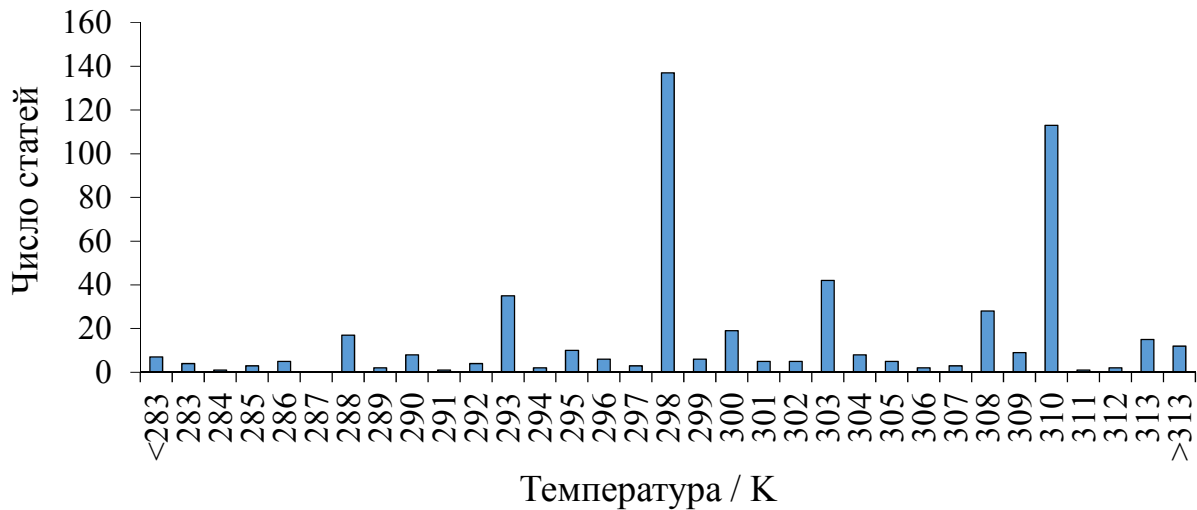


Рисунок 3.7 – Температуры, использованные в литературных исследованиях связывания альбуминов с лигандами.

Довольно часто измеряют константы связывания при нескольких температурах, обычно с интервалом в 5 К. Эти значения могут быть использованы для оценки энтальпии связывания, но точность такой оценки крайне низкая. Всегда следует отдавать предпочтение энтальпиям, измеренным прямым калориметрическим методом.

Несмотря на множество факторов, которые могут влиять на получаемые результаты, существуют системы, для которых независимыми авторами получено достаточное количество значений констант в единообразных условиях. Мы изучили собранные данные по 4 широко изученным лигандам: индометацину, фенилбутазону, кверцетину и варфарину. Из каждого независимого исследования мы брали только одно значение константы и строили гистограммы логарифмов констант связывания. Результаты, представленные на рисунке 3.8, показывают

существование выраженных максимумов распределений. Рекомендуемые значения  $\lg K_a$ , полученные из этих графиков, составляют 5,5 для индометацина, 5,7 для фенилбутазона, 5,3 для кверцетина и 5,2 для варфарина.

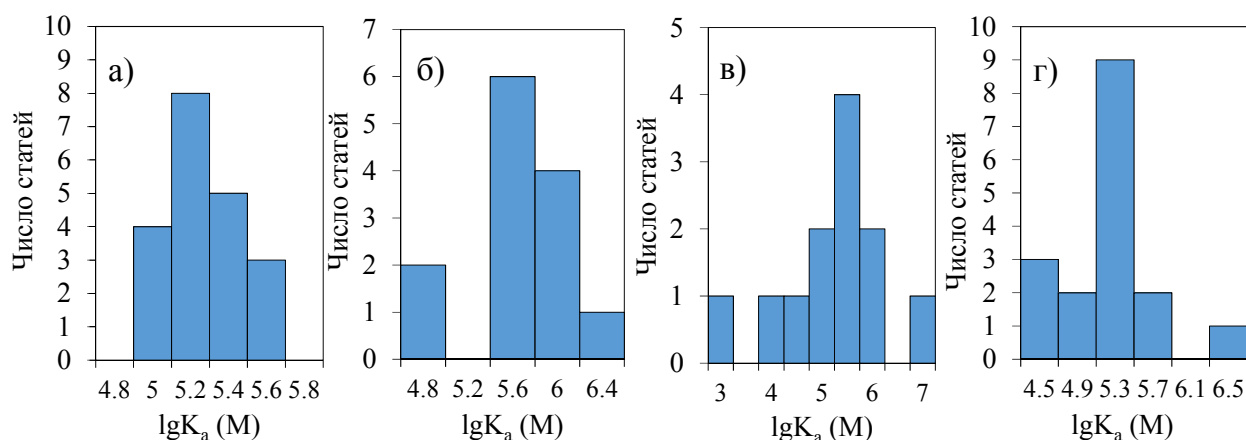


Рисунок 3.8 – Распределение констант связывания для а) варфарин, б) фенилбутазон, в) индометацин, г) кверцетин.

К сожалению, для многих соединений такой анализ не может быть проведен из-за отсутствия достаточного количества данных. Описанная база данных доступна в открытом доступе в репозитории <https://zenodo.org/record/5070430>

Таким образом, нами показано, что существует большая потребность в достоверных и воспроизводимых данных по связыванию с альбумином. Имеющиеся литературные данные должны использоваться с осторожностью, с учетом всех экспериментальных деталей, предпочтительно проводить только анализ серий экспериментов, выполненных в единообразных условиях. Не рекомендуется использование для анализа соотношений структура-свойство ранее опубликованных компиляций данных, например, Краточвила и соавторов [115], которые не учитывают различий в условиях экспериментов.

### 3.2 Разработка и апробация методики определения констант связывания органических лигандов с альбумином методом ДСК

#### 3.2.1 Разработка модели

Для определения термодинамических характеристик взаимодействия белка с лигандами была разработана компьютерная программа, которая позволяла

смоделировать ДСК-кривые с учетом равновесия между денатурированной формой и нативной формами белка, а также произвольного количества равновесий между белком и молекулами лиганда. Все расчеты проводились в предположении, что в ходе сканирования при любой температуре установлены равновесия денатурации-ренатурации и связывания-диссоциации. Это верно для достаточно медленных скоростей сканирования и было подтверждено для исследуемых систем по отсутствию сдвига пика при варьировании скорости сканирования (рисунок 3.9).

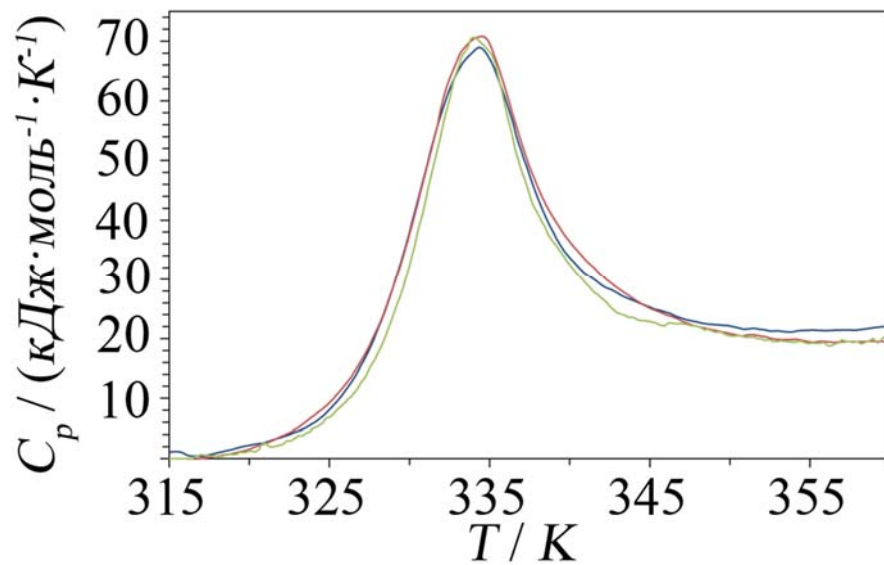


Рисунок 3.9 – ДСК-термограммы денатурации БСА при разных скоростях сканирования ( $2 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$  – синяя линия,  $1 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$  – красная линия,  $0.5 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$  – зеленая линия)

Для описания процесса денатурации в наших расчетах, как и в некоторых предыдущих работах [64, 65], была использована простая одностадийная модель денатурации с двумя состояниями белка, в которой равновесие денатурация-ренатурация описывается константой равновесия  $K_u$ :

$$K_u = \frac{[U]}{[N]} \quad (3.2.1),$$

где  $[U]$  и  $[N]$  – концентрации денатурированной и нативной формы белка, соответственно. Температура  $T_u$ , при которой  $K_u = 1$ , очень близка (но, строго говоря, не равна) к температуре максимума пика денатурации  $T_d$ . Энтальпия денатурации белка  $\Delta_u H(T_u)$  при этой температуре приблизительно равна

калориметрической энтальпии денатурации белка  $\Delta_d H$ , найденной путем интегрирования ДСК-пика денатурации с сигмоидальной базовой линией. Энергия Гиббса денатурации белка  $\Delta_u G(T_u) = 0$ , а энтропия денатурации равна:

$$\Delta_u S(T_u) = \frac{\Delta_u H(T_u)}{T_u} \quad (3.2.2).$$

По данным наших экспериментов, значение энтальпии денатурации БСА в отсутствии лигандов  $\Delta_d H = 620 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ , изменение теплоемкости при денатурации  $\Delta_u C_p = 21 \text{ кДж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}$ . Во всех расчетах мы принимаем, что изменение теплоемкости при денатурации не зависит от температуры. Тогда термодинамические функции денатурации при другой температуре могут быть рассчитаны по формулам:

$$\Delta_u H(T) = \Delta_u H(T_u) + \Delta_u C_p (T - T_u); \quad (3.2.3)$$

$$\Delta_u S(T) = \Delta_u S(T_u) + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_u}; \quad (3.2.4)$$

$$\Delta_u G(T) = \Delta_u H(T) - T \Delta_u S(T), \quad (3.2.5)$$

Из этих уравнений можно определить значение константы равновесия денатурации при любой температуре:

$$K_u(T) = e^{-\frac{\Delta_u G(T)}{RT}} \quad (3.2.6).$$

В самом простом случае лиганд связывается только с нативной формой белка, при этом образуется комплекс состава 1:1. Константа связывания белок-лиганд записывается как  $K = \frac{[NL]}{[N][L]}$  (3.2.7), где  $[NL]$  – концентрация комплекса нативной формы белка с одной молекулой лиганда. Температурная зависимость константы связывания определяется выражением:

$$K(T) = K(T_0) e^{\frac{\Delta_b H}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right)} \quad (3.2.8),$$

где  $K(T_0)$  – константа связывания при температуре  $T_0$ ,  $\Delta_b H$  – энтальпия связывания, которая в рамках простейшей модели предполагается не зависящей от температуры ( $\Delta_b C_p = 0$  при всех температурах). Если же образуются комплексы



с более чем одной молекулой лиганда, то необходимо учитывать последовательные константы связывания  $K_n = \frac{[NL_n]}{[NL_{n-1}][L]}$  (3.2.9) и их температурные зависимости.

Условия материального баланса для случая связывания 1:1 записываются как  $[N]+[NL]+[U]=[P]_0$  и  $[L]+[NL]=[L]_0$  (3.2.10), где  $[P]_0$  и  $[L]_0$  – начальные концентрации белка и лиганда в растворе, соответственно.

Одновременное численное решение всех вышеуказанных уравнений для каждой температуры (нами обычно брался диапазон от 320 до 370 К с шагом 0,1 К) позволяет получить температурные зависимости концентраций каждой формы белка и лиганда. Расчетная ДСК-кривая представляет собой температурную зависимость кажущейся теплоемкости исследуемого раствора на моль белка за вычетом базовой линии – теплоемкости раствора нативной формы белка в присутствии того же количества лиганда – и для случая связывания 1:1 вычисляется по формуле:

$$C_p(T) = \frac{d\left([U] \cdot (\Delta_u H(T_u) + \Delta_u C_p \cdot (T - T_u)) - [L] \cdot \Delta_b H\right)}{[P]_0 dT} \quad (3.2.11).$$

Методика была апробирована на известных из литературы данных, которые подробно обсуждались в главе 1. Например, были смоделированы с помощью разработанной нами программы экспериментальные кривые денатурации рибонуклеазы в присутствии различных концентраций ингибитора из работы Брандтса и Лин [57] (рисунок 3.10).

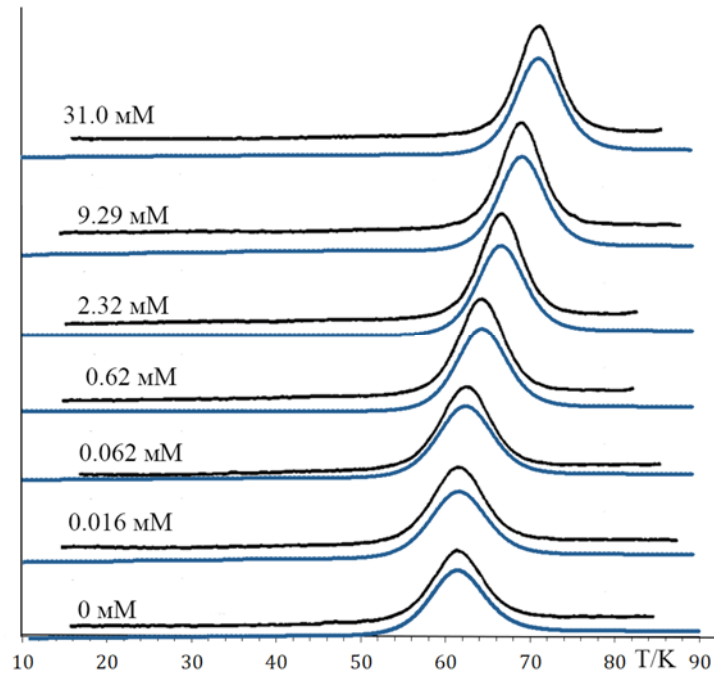


Рисунок 3.10 – Сравнение кривых денатурации рибонуклеазы А в присутствии ингибитора из работы [57] (черный) и смоделированных нами кривых (синий).

Как видно из рисунка, кривые хорошо сходятся. Также нами были воспроизведены модельные кривые, полученные при разных значениях констант связывания белок-лиганд (рисунок 3.11)

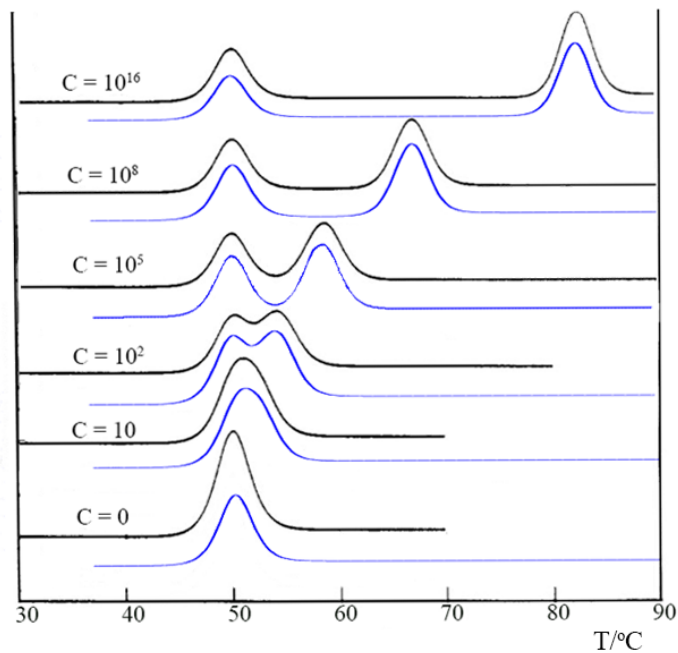


Рисунок 3.11 – Сравнение смоделированных нами (синий) и в работе [57] (черный) кривых денатурации белка при различных значениях констант связывания белок-лиганд и заданных параметрах денатурации.

Нами также были смоделированы с хорошей точностью кривые денатурации ЧСА в присутствии ANS с условиями эксперимента из работы Сележ и соавторов [65] (рисунок 3.12).

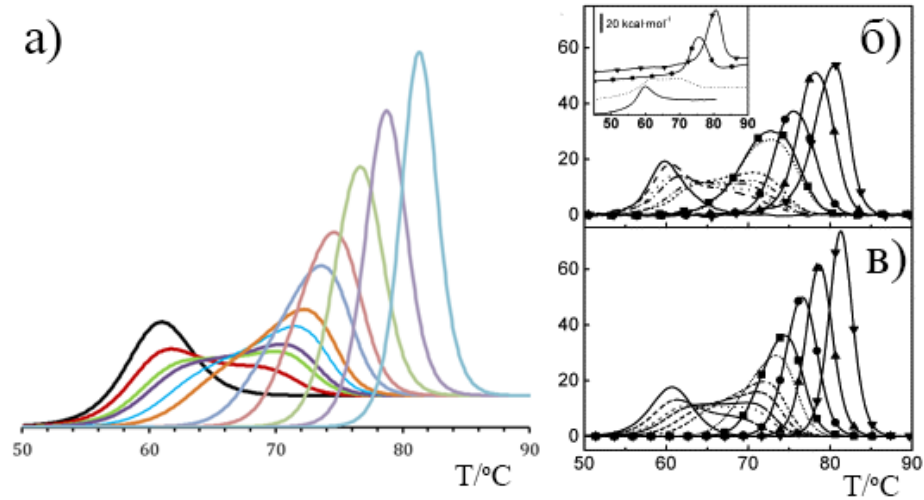


Рисунок 3.12 – Сравнение смоделированных нами кривых денатурации альбумина в присутствии ANS (а) с данными, полученными экспериментально в работе [65] (б), а также со смоделированными кривыми из той же работы (в).

Далее было проведено сравнение полученных нами экспериментальных и смоделированных нами ДСК-кривых в присутствии исследуемых лекарственных препаратов (рисунок 3.13). Экспериментальные пики ДСК шире и ниже, чем смоделированные, что может говорить о сложном механизме денатурации альбумина. Тем не менее, с экспериментальными данными для исследуемых систем с известными значениями констант и энтальпий связывания при небольших избытках лиганда хорошо согласуются (см. следующий раздел) две важнейшие величины: температура максимума пика  $T_d$  и калориметрическая энтальпия денатурации (площадь пика).

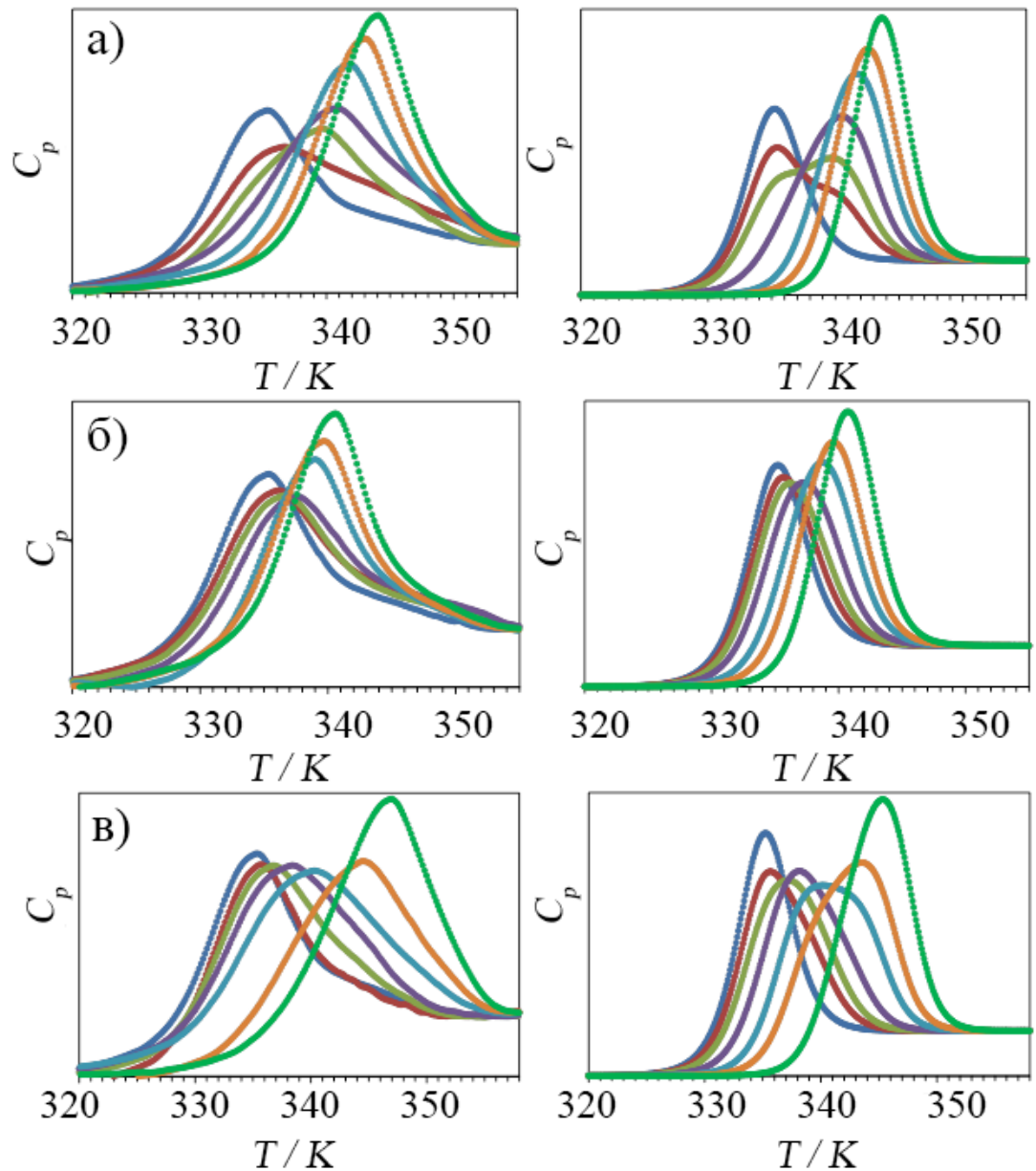


Рисунок 3.13 – Экспериментальные (слева) и предсказанные (справа) калориметрические профили денатурации БСА в присутствии а) напроксена, б) варфарина, в) ибупрофена при различных значениях  $[L]_0/[P]_0$ : 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5.

В описанной выше модели мы предполагали, что белок находится исключительно в мономерной форме. Это справедливо, судя по тому, что температура максимума пика денатурации не зависит от концентрации белка ни для чистого белка, ни в присутствии любых количеств лигандов. В присутствии большого избытка лиганда преобладающей формой белка является комплекс  $NL_n$

в случае мономерного белка и  $N_x L_n$  – в случае  $x$ -мерного агрегата белка. При температуре денатурации имеет место следующее равновесие:

$$N_x L_n = xD + nL, \quad K_d = \frac{[D]^x [L]^n}{[N_x L_n]} \quad (3.2.12)$$

При температуре максимума пика денатурации примерно половина от общего количества белка денатурирована, поэтому  $[D] = x[N_x L_n] = \frac{[P]_0}{2}$  (3.2.13) и  $[L] \approx [L]_0$  из-за большого избытка белка. Таким образом,

$$K_d(T_d) = \frac{x[P]_0^{x-1} [L]_0^n}{2^{x-1}} \quad (3.2.14).$$

Если  $x = 1$ , то температура денатурации не зависит от  $[P]_0$ . Если  $x = 2$ , то 10-кратное увеличение концентрации белка сместит пик денатурации до температуры, в которой  $K_d$  в 10 раз выше, что означает сдвиг как минимум на 1–2 К. В то же время в наших экспериментах увеличение концентрации альбумина с 2 мг·мл<sup>-1</sup> до 10 мг·мл<sup>-1</sup> в присутствии постоянных концентраций ибупрофена и напроксена привело к изменению температуры пика денатурации менее, чем на 0,3 К. Таким образом, образованием белковых агрегатов в изученных системах можно пренебречь, и можно утверждать, что оба лекарственных препарата связываются преимущественно с мономерами БСА.

Уравнение (3.2.14) также можно преобразовать, чтобы определить максимальное количество молекул лиганда, которые белок может связать. Если  $[L]_0$  изменяется при постоянной  $[P]_0$ , то, рассматривая производную обеих частей уравнения по обратной температуре, получаем:

$$\frac{d \ln K_d}{d(1/T_d)} = -\frac{\Delta_d H}{R} = n \frac{d \ln [L]_0}{d(1/T_d)} \quad (3.2.15),$$

$$n = -\frac{\Delta_d H}{R \frac{d \ln [L]_0}{d(1/T_d)}} \quad (3.2.16).$$

Если построить график зависимости  $\ln [L]_0$  от  $1/T_d$ , то отношение экспериментальной энтальпии денатурации альбумина к угловому коэффициенту

линейной корреляции между  $\ln[L]_0$  и  $1/T_d$  при большом избытке лиганда (больших значениях  $[L]_0$ ) позволяет определить значение  $n$ .

Для связывания 1:1 можно также определить константу связывания упрощенным методом. Выбирается температура  $T_{1/2}$ , при которой площадь под ДСК-кривой до этой температуры окажется равной площади после этой температуры. Доля денатурированной формы белка при этой температуре составляет около 50%:

$$\frac{[U]}{[P]_0} = 0,5 \quad (3.2.17)$$

Из уравнения (3.2.1)  $[U] = K_u[N]$ . Тогда

$$\frac{K_u[N]}{[P]_0} = 0,5 \quad (3.2.18)$$

$$[N] = \frac{[P]_0}{2K_u} \quad (3.2.19)$$

$$[NL] = \frac{[P]_0}{2} - \frac{[P]_0}{2K_u} \quad (3.2.20)$$

$$[L] = [L]_0 - [NL] \quad (3.2.21)$$

$$K = \frac{[NL]}{[N][L]} = \frac{K_u - 1}{[L]_0 - \frac{[P]_0}{2} + \frac{[P]_0}{2K_u}} \quad (3.2.22)$$

Зная температурную зависимость  $K_u(T)$ , можно определить величину  $K$  при температуре  $T_{1/2}$ , а затем, если известна энтальпия связывания, рассчитать ее значения и при других температурах.

Рассмотрим результаты изучения связывания отдельных лигандов с БСА.

### 3.2.2 Связывание напроксена с БСА

Результаты измерений методом изотермической титрационной калориметрии указывают на образование комплекса напроксен-БСА 1:1 с очень большой константой ( $K_a = 1,5 \cdot 10^7$  [105],  $K_a = 2,86 \cdot 10^7$  [117],  $K_a = 3,68 \cdot 10^7$  [107] при

298 К). В крови человека доля связанного с плазмой напроксена достигает 99,7% [119]. Процесс связывания сопровождается большим тепловым эффектом:  $\Delta_b H = -59$  кДж·моль<sup>-1</sup>, что говорит о быстром уменьшении константы связывания с ростом температуры. Тем не менее, при температуре денатурации БСА (335 К) она составляет  $1,1 \cdot 10^6$ , что тоже соответствует прочному связыванию.

При добавлении эквимольного количества напроксена в ДСК-экспериментах наблюдается резкое повышение температуры денатурации и энтальпии (рисунок 3.14). Значения  $T_d$  и  $\Delta_d H$ , полученные путем численного моделирования кривых ДСК с использованием модели связывания 1:1 с  $K = 1,5 \cdot 10^7$  и  $\Delta_b H = -59$  кДж·моль<sup>-1</sup>, согласуются с экспериментальными данными при  $[L]_0/[P]_0 \leq 2$ . Отклонение при более высоких концентрациях напроксена может быть вызвано связыванием со вторым и последующими центрами связывания с небольшими константами связывания и энтальпиями, которые невозможно измерить с помощью ИТК. Рассмотрение модели последовательного связывания с 2 центрами (с  $K_1 = 1,0 \cdot 10^7$ , что находится в пределах экспериментальной погрешности измерения метода ИТК и  $K_2 = 1,0 \cdot 10^4$ ) хорошо согласуются с экспериментальными ДСК данными до  $[L]_0/[P]_0 = 5$ . Дальнейшее увеличение энтальпии и температуры денатурации по сравнению с модельными кривыми вызвано связыванием с дополнительными низкоаффинными центрами при  $[L]_0/[P]_0 > 5$ .

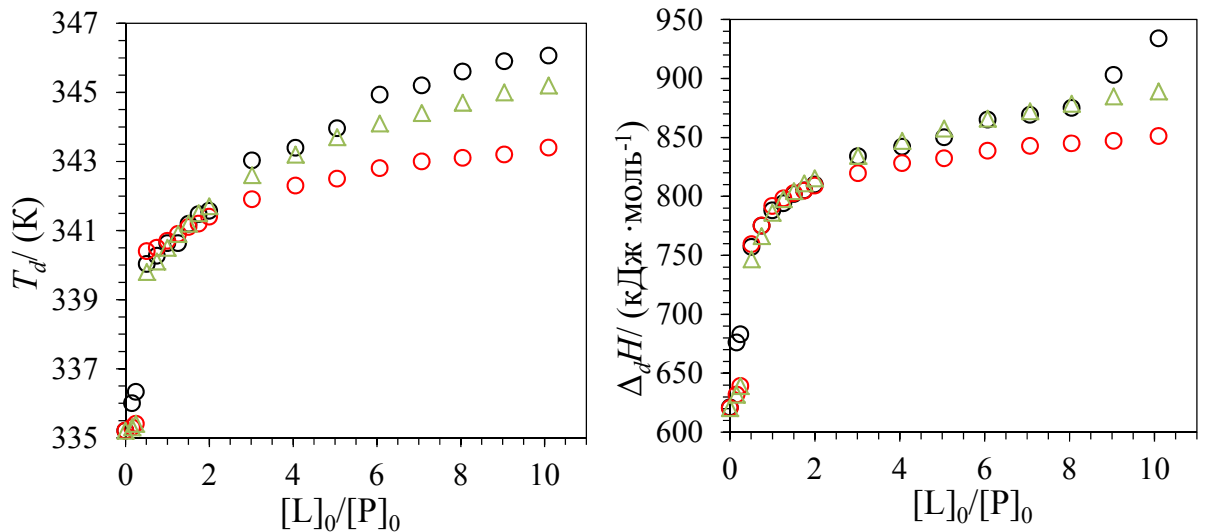


Рисунок 3.14 – Зависимость температуры максимума пика денатурации БСА  $T_d$  и calorиметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации напроксена.  $[P]_0 = 5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  при  $[L]_0/[P]_0 \leq 10$  и  $2 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  при  $[L]_0/[P]_0 > 10$ . Незакрашенные черные кружки соответствуют экспериментальным данным; незакрашенные красные кружки – предсказанным значениям, которые основаны на модели связывания 1:1 и экспериментальных данных, полученных методом изотермической титрационной calorиметрии; незакрашенные зеленые треугольники – предсказанным значениям, которые основаны на модели связывания 2:1.

Наклон графика  $\ln[L]_0$  против  $1/T$  (рисунок 3.15) при большом избытке лиганда соответствует связыванию 4,6 молекул напроксена на молекулу БСА согласно уравнению (3.2.16). Для сравнения, в экспериментах по фронтальному анализу/капиллярному электрофорезу наблюдалось связывание с 4 низкоаффинными центрами [116].



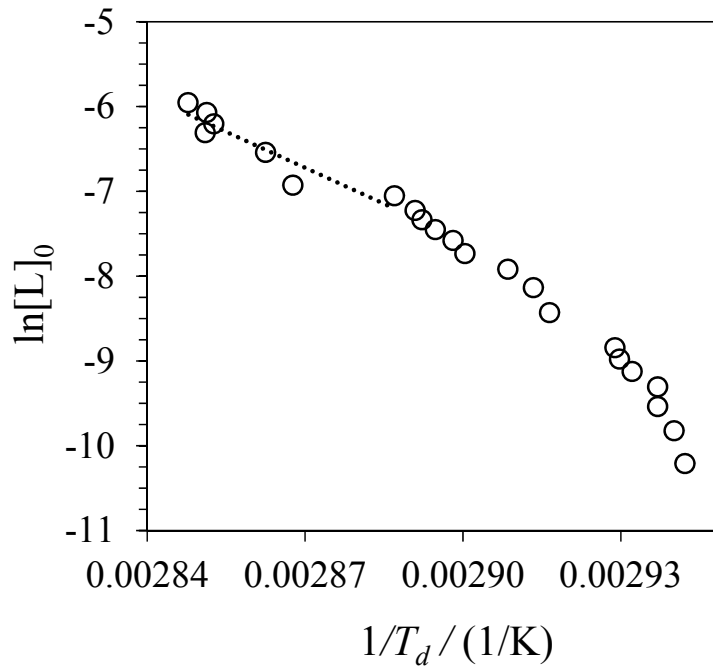


Рисунок 3.15 – Зависимость  $\ln[L]_0$  от  $1/T_d$  для денатурации БСА в присутствии напроксена.

### 3.2.3 Связывание варфарина с БСА

Доля варфарина, связанного с плазмой, в крови человека составляет 99% [108]. Данные изотермической титрационной калориметрии по взаимодействию БСА с варфарином указывают на связывание 2 молекул варфарина с наблюдаемой константой связывания при 298 К  $K_a = 1,2 \cdot 10^5$  [110] или  $K_a = 4,76 \cdot 10^4$  [117]. Так как в молекуле альбумина есть два высокоаффинных центра связывания и каждый из них связывает одну молекулу лиганда, то следует использовать модель с последовательным связыванием с двумя константами  $K_1$  и  $K_2$ , которые не равны между собой. Даже если центры полностью идентичны и независимы, то константы должны отличаться минимум в 4 раза. По литературным данным варфарин довольно специфично связывается по центру Судлоу I [122, 123] и отношение  $K_1/K_2$  может быть намного больше 4. Однако у нас нет достоверных данных о первой и второй константах связывания по отдельности. Мы использовали значения из экспериментов, проведенных с помощью методов фронтального анализа и капиллярного электрофореза:  $K_1 = 1,08 \cdot 10^5$  (что близко к

результату ИТК),  $K_2 = 2,28 \cdot 10^4$  ( $K_1 \cdot K_2^{-1} = 4,7$ ) и  $\Delta_b H = -18$  кДж·моль<sup>-1</sup>. На рисунке 3.16 показано сравнение предсказанных и экспериментальных значений  $T_d$  и  $\Delta_d H$  при различных концентрациях варфарина.

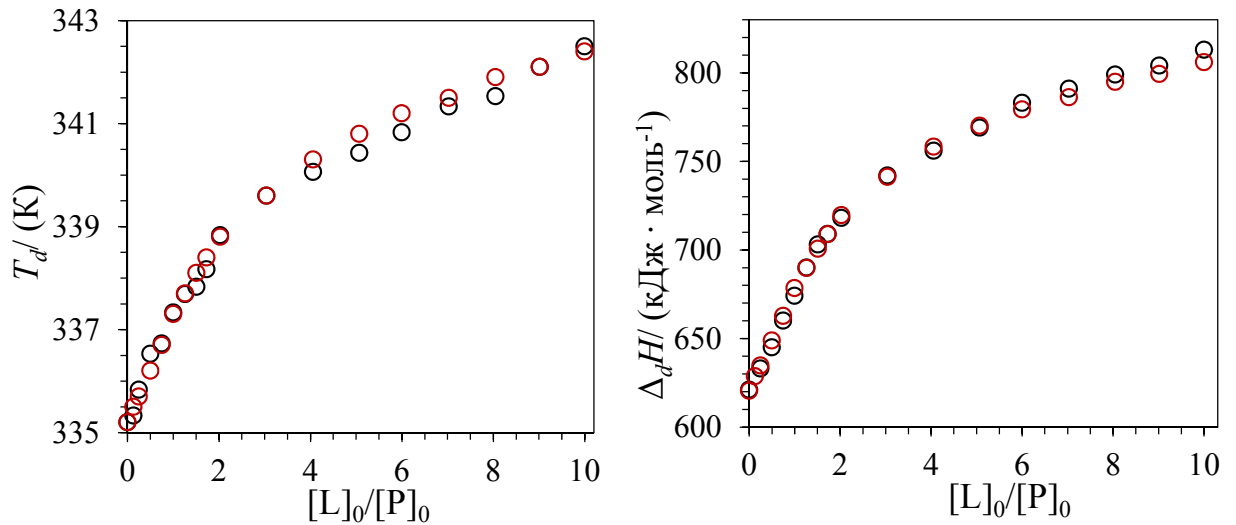


Рисунок 3.16 – Зависимость температуры максимума пика денатурации БСА  $T_d$  и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации варфарина.  $[P]_0 = 5$  мг·мл<sup>-1</sup> при  $[L]_0/[P]_0 \leq 10$  и 2 мг·мл<sup>-1</sup> при  $[L]_0/[P]_0 > 10$ . Незакрашенные черные кружки соответствуют экспериментальным данным, незакрашенные красные кружки – значения, предсказанные моделью.

Предсказанные значения  $T_d$  и  $\Delta_d H$  хорошо согласуются с экспериментальными данными до 10-кратного избытка варфарина. Вероятно, что никакие дополнительные молекулы варфарина не связываются с низкоаффинными центрами альбумина в этом диапазоне концентраций, что подтверждается исследованиями системы варфарин-БСА с использованием других экспериментальных методов [124]. График зависимости  $\ln[L]_0$  от  $1/T_d$  (рисунок 3.17) при большом избытке варфарина имеет наклон, соответствующий связыванию 2,8 молекул варфарина на молекулу БСА.

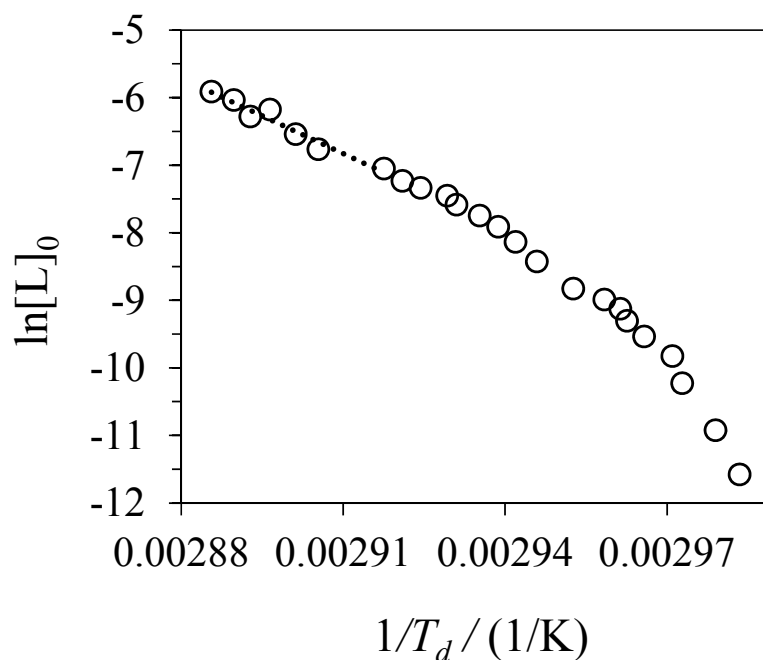


Рисунок 3.17 – Зависимость  $\ln[L]_0$  от  $1/T_d$  для денатурации БСА в присутствии варфарина.

### 3.2.4 Связывание ибупрофена с БСА

Ибупрофен прочно связывается с альбумином, хотя и слабее, чем напроксен. Доля ибупрофена, связанного с плазмой, в крови человека составляет 99,5% [120]. В предыдущих исследованиях методом ИТК было показано, что БСА прочно связывается с одной молекулой ибупрофена ( $K_a = 8 \cdot 10^5$  при 298 К,  $K_a = 3,03 \cdot 10^5$  при 298 К [117]). Несколько дополнительных молекул ибупрофена связываются с низкоаффинными центрами БСА с более низкими константами связывания, что можно наблюдать в экспериментах, проведенных методами капиллярного электрофореза и равновесного диализа (7 молекул с  $K = 1,6 \cdot 10^4$  при 298 К [116] или 8 молекул с  $K = 1,36 \cdot 10^4$  при 298 К [115]).

ДСК-кривая денатурации БСА в присутствии ибупрофена может быть описана с использованием модели связывания 1:1 со значением  $K = 8 \cdot 10^5$  при 298К и калориметрической энтальпией связывания  $\Delta_b H = -27$  кДж·моль<sup>-1</sup>. Пересчет константы приводит к  $K = 2,4 \cdot 10^5$  при температуре денатурации БСА (335 К).

На рисунке 3.18 представлены зависимости температуры максимума пика денатурации  $T_d$  и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации ибупрофена. Экспериментальные данные (незакрашенные черные кружки) неплохо согласуются с предсказанными значениями (незакрашенные красные кружки) при  $[L]_0/[P]_0 < 2$ . Кривая имеет точку перегиба при  $[L]_0/[P]_0$  между 1 и 2, что можно объяснить кооперативным связыванием нескольких молекул ибупрофена с низкоаффинными центрами после насыщения центра с высоким сродством. Рассмотрение второй стадии связывания с 2 молекулами ибупрофена одновременно с использованием константы равновесия  $K_2 = \frac{[NL_3]}{[NL][L]^2} = 4 \cdot 10^8$  в нашей модели приводит к гораздо лучшему согласию с экспериментальными данными (предсказанные значения показаны зелеными треугольниками на рисунке 3.18). При  $[L]_0/[P]_0 > 5$  дополнительные молекулы ибупрофена связываются с БСА, что приводит к дальнейшему увеличению  $\Delta_d H$  и  $T_d$  и отклонениям от значений, предсказанных моделью связывания 3:1.

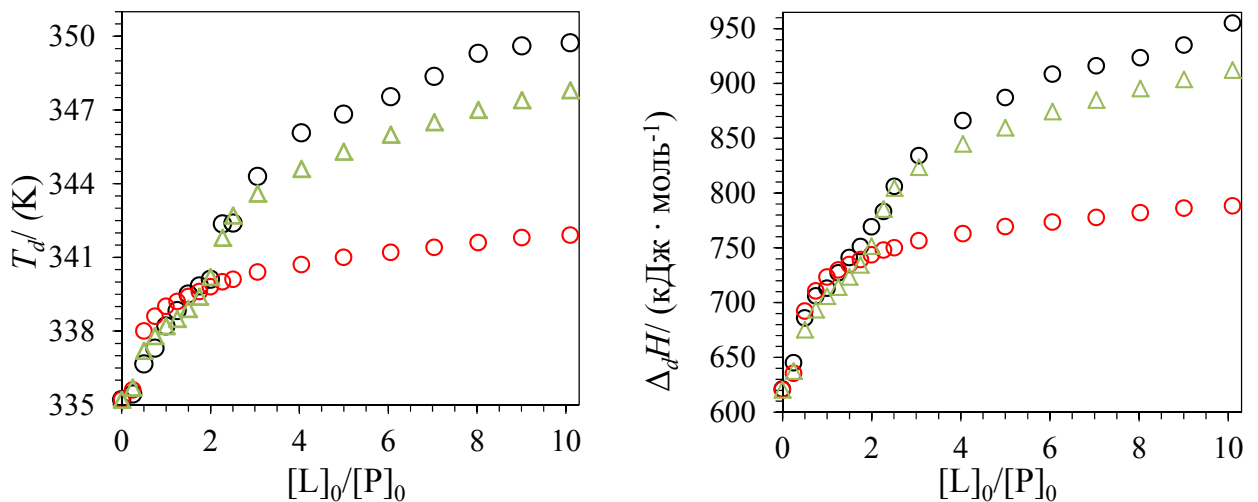


Рисунок 3.18 – Зависимость температуры максимума пика денатурации БСА  $T_d$  и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации ибупрофена.  $[P]_0 = 5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  при  $[L]_0/[P]_0 \leq 10$  и  $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  при  $[L]_0/[P]_0 > 10$ . Незакрашенные черные кружки соответствуют экспериментальным данным; незакрашенные красные кружки – предсказанным значениям, основанной на модели связывания 1:1 и экспериментальных данных, полученные методом ИТК; зеленые треугольники – предсказанным данным модели 3:1.

Наклон графика  $\ln[L]_0$  против  $T^{-1}$  при большом избытке лиганда указывает на связывание 5,2 молекул ибупрофена.

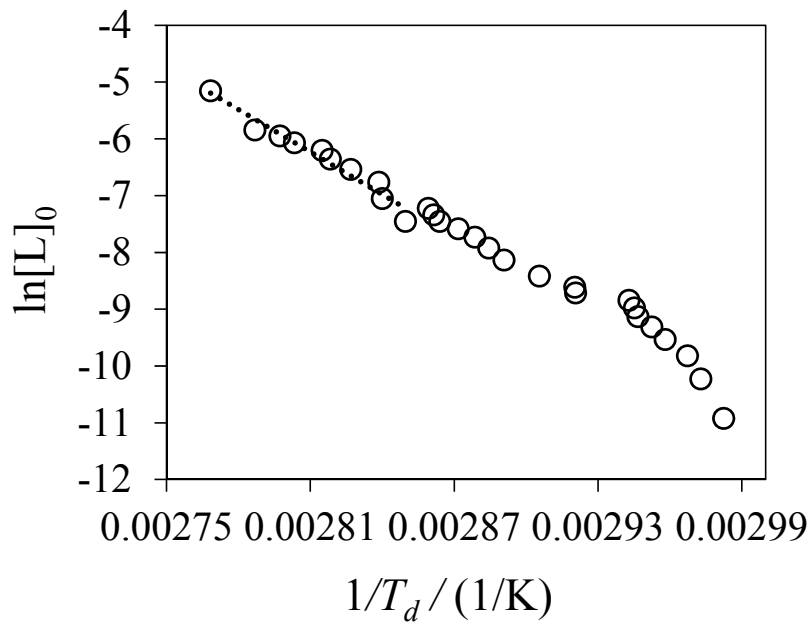


Рисунок 3.19 – Зависимость  $\ln[L]_0$  от  $1/T_d$  для денатурации БСА в присутствии ибупрофена.

### 3.2.5 Связывание толбутамида с БСА

Толбутамид применяется для лечения сахарного диабета 2 типа и связывается с плазмой на 98 % [119]. Якоби и др. [126] использовали метод ИТК и получили данные, что толбутамид взаимодействует с 3 независимыми центрами связывания ЧСА с константой  $K_a = 4,8 \cdot 10^4$  и энтальпией  $-6$  кДж·моль $^{-1}$  при 310 К. Танака и др. [127] изучили связывание толбутамида с ЧСА с помощью равновесного диализа и также обнаружили  $n = 3$  центра связывания с константой связывания  $K_a = 1,76 \cdot 10^4$  при 313 К и  $\Delta H_b = -11,6$  кДж·моль $^{-1}$ . Взаимодействия толбутамида с ЧСА при 310 К были изучены Джозефом и соавторами [128] с использованием фронтальной аффинной хроматографии. Было обнаружено, что константы связывания составляют  $K_1 = 8,7 \cdot 10^4$  и  $K_2 = 8 \cdot 10^3$ . Шкудларек и др. изучали связывание толбутамида как с ЧСА [129], так и с БСА [130] с помощью спектрофлуориметрии. Константы связывания в соотношении 1:1 с ЧСА при 309

К, измеренные на разных длинах волн возбуждения, были разными:  $K_a = 1,94 \cdot 10^4$  и  $K_a = 2,84 \cdot 10^4$ . Для БСА разница была большей: измеренные константы составляли  $K_a = 1,64 \cdot 10^4$  и  $K_a = 7,88 \cdot 10^4$ . Энтальпия связывания с БСА, определенная по температурной зависимости констант связывания, составляет всего лишь  $-0,3$  кДж·моль<sup>-1</sup>.

Результаты моделирования расчетных концентрационных зависимостей  $T_d$  и значений, извлеченных из экспериментальных кривых ДСК, приведены на рисунке 3.20 вместе с исходными термограммами при нескольких концентрациях лиганда. Наилучшее описание данных ДСК было достигнуто с помощью модели с двумя константами связывания  $K_1 = 5,3 \cdot 10^4$  и  $K_2 = 1,1 \cdot 10^4$  при 335,2 К. Используя энтальпию связывания  $\Delta H_b = -6$  кДж·моль<sup>-1</sup> [127], можно получить значения  $K_1 = 6,3 \cdot 10^4$ ,  $K_2 = 1,3 \cdot 10^4$  при 310 К и  $K_1 = 6,9 \cdot 10^4$ ,  $K_2 = 1,4 \cdot 10^4$  при 298 К. Использование модели с 3 идентичными центрами связывания привело к худшему согласию с наблюдаемыми температурами пиков денатурации. Полученные результаты близки к значениям Джозефа и др. [128].

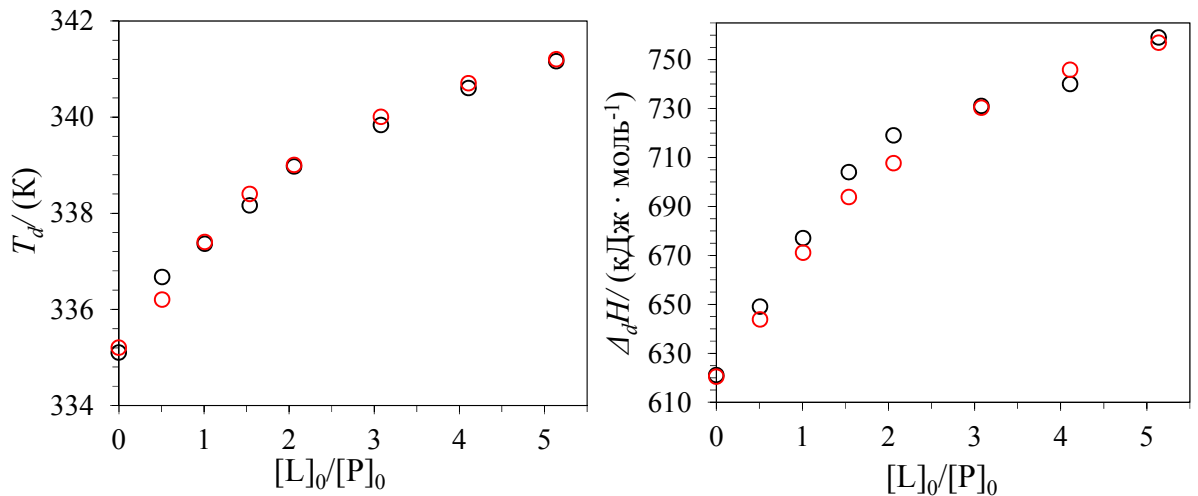


Рисунок 3.20 – Зависимости температуры максимума пика  $T_d$  денатурации БСА ( $[P]_0 = 5$  мг·мл<sup>-1</sup>) и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации толбутамида. Незакрашенные черные кружки соответствуют экспериментальным данным, незакрашенные красные кружки – значениям из лучшей расчетной модели.

### 3.2.6 Связывание хлорпропамида с БСА

Как и толбутамид, хлорпропамид применяется при лечении сахарного диабета 2 типа. 90-99% препарата связывается с белками плазмы крови [47, 119, 131]. Браун и Крукс [132] экспериментально получили  $K_1 = 4,67 \cdot 10^4$ ,  $n_1 = 1,94$  и  $K_2 = 4,14 \cdot 10^2$ ,  $n_2 = 8,93$  для связывания с БСА при 310 К с помощью равновесного диализа. Сингх и Митра [133] спектрофлуориметрически получили значения констант связывания в комплексах 1:1 для хлорпропамида с ЧСА и БСА. Удивительно, но по их данным константа связывания с БСА увеличивается с  $K_a = 3,2 \cdot 10^3$  при 298 К до  $K_a = 5,2 \cdot 10^3$  при 313 К, что означает положительную энтальпию связывания ( $7,45 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ). Тао и др. [134] получили значения констант связывания хлорпропамида с ЧСА с помощью аффинной хроматографии с использованием моделей с одним и двумя центрами связывания. В модели с одним центром значение константы оказалось равным  $K_a = 3,5 \cdot 10^4$ , в то время как в модели с двумя центрами:  $K_1 = 6,2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$  и  $K_2 = 5,7 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}$  при 310 К.

Лучшее сходство модельных кривых с экспериментальными данными ДСК (рисунок 3.21) наблюдается при использовании модели с двумя константами связывания, равными  $K_1 = 5,5 \cdot 10^4$  и  $K_2 = 5,0 \cdot 10^3$  при 334,4 К. Первая константа связывания близка к таковой для толбутамида, а вторая несколько меньше. При том же значении  $\Delta H = -6 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ , что и для толбутамида, получаем  $K_1 = 6,5 \cdot 10^4$ ,  $K_2 = 5,9 \cdot 10^3$  при 310 К и  $K_1 = 7,2 \cdot 10^4$ ,  $K_2 = 6,5 \cdot 10^3$  при 298 К.

Наши результаты хорошо согласуются с данными Тао и др., но не с результатами исследования методом спектрофлуориметрии [134].

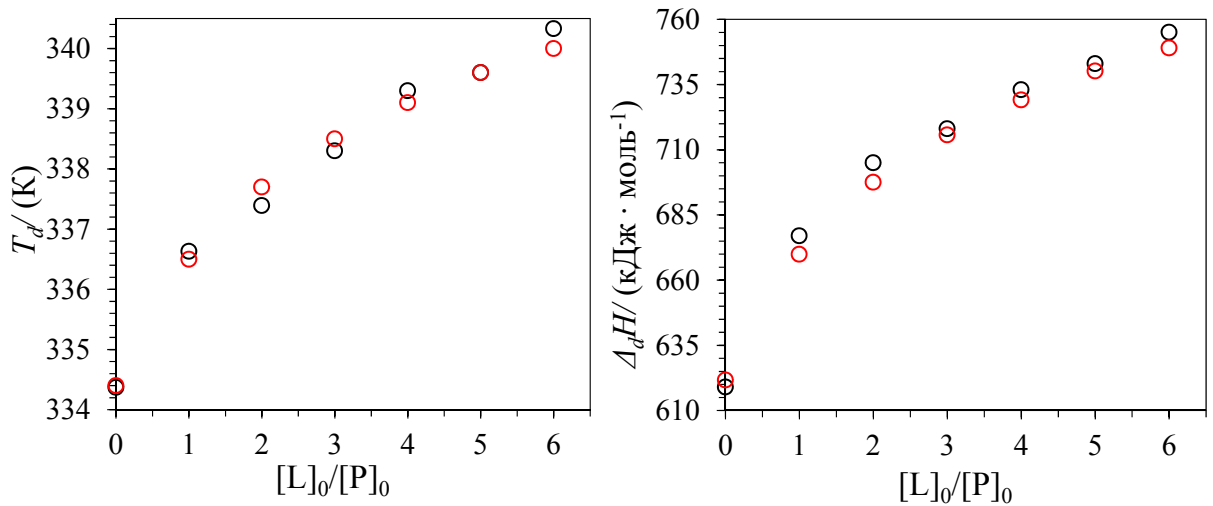


Рисунок 3.21 – Зависимости температуры максимума пика  $T_d$  денатурации БСА ( $[P]_0 = 5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации хлорпропамида. Незакрашенные черные кружки соответствуют экспериментальным данным, незакрашенные красные кружки – значения из лучшей расчетной модели.

### 3.2.7 Связывание фенилбутазона с БСА

Фенилбутазон – нестероидный противовоспалительный препарат с высоким сродством к белкам плазмы (связывается на 95-96 % [135]). Чигнел и др. [136] изучили связывание фенилбутазона с альбумином из плазмы человека и животных с помощью равновесного диализа при 310 К и обнаружили, что одна молекула фенилбутазона связывается с различными альбуминами с константой  $K_1 = 7 \cdot 10^4$  до  $1 \cdot 10^6$  и дополнительные две молекулы с константой  $K_2 = 7 \cdot 10^3$  до  $3 \cdot 10^4$ . Элбари и др. [137] изучали связывание фенилбутазона с ЧСА с помощью равновесного диализа при различных значениях pH. При pH 7,4 константа связывания с высокоаффинными центрами составляла  $K_1 = 5,06 \cdot 10^5$  при связывании с  $n_1 = 1,25$ , в то время как дополнительные молекулы связывались с низкоаффинными центрами с  $K_2 = 5,63 \cdot 10^3$  и  $n_2 = 8,1$ . Температура эксперимента не упоминалась. Куиджано и др. [138] провели равновесный диализ фенилбутазона с ЧСА при 277 К и наблюдали связывание одной молекулы фенилбутазона с  $K_1 = 7,5 \cdot 10^4$  и еще двух молекул с  $K_2 = 2,5 \cdot 10^3$ . Танака и др. [127]



описали результаты равновесного диализа системы фенилбутазона–БСА с использованием уравнения Скэтчарда с  $n = 3$  (три идентичных центра связывания) и  $K_a = 1,06 \cdot 10^4$  при 313 К, при этом энтальпия связывания составляет  $-20,8$  кДж·моль<sup>-1</sup>. Исследование Русевой и др. [139] с помощью спектроскопии кругового дихроизма связывания фенилбутазона с ЧСА привело к получению констант по графикам Скэтчарда для двух центров связывания  $K_1 = 7,82 \cdot 10^5$  с  $n_1 = 1,4$  и  $K_2 = 9,18 \cdot 10^4$  с  $n_2 = 4,1$ . Изотермической титрационной калориметрией при 310 К в работе Аки и др [140] было показано связывание фенилбутазона с ЧСА в соотношении 1:1 с  $K_a = 4,22 \cdot 10^5$  и энтальпией связывания  $-24,8$  кДж·моль<sup>-1</sup>. В исследовании Мацязека-Юрчика спектрофлуориметрически показало связывание с двумя центрами в молекуле БСА с параметрами связывания  $K_1 = 3,57 \cdot 10^4$ ,  $n_1 = 0,95$  и  $K_2 = 6 \cdot 10^2$ ,  $n_2 = 2,66$  при 310 К [141]. Для молекулы ЧСА полученные параметры связывания составили  $K_1 = 4,3 \cdot 10^5$ ,  $n_1 = 0,45$  и  $K_2 = 2,9 \cdot 10^3$ ,  $n_2 = 1,83$ . Однако наблюдалась сильная зависимость полученных констант от длины волны возбуждения [142]. Очевидно, что результаты разных исследований противоречат друг другу.

Зависимости  $T_d$  и  $\Delta_d H$  от  $[L]_0/[P]_0$  из экспериментов ДСК (рисунок 3.22) могут быть удовлетворительно описаны моделью с двумя независимыми центрами с одинаковыми константами связывания  $K_a$ , что эквивалентно последовательным константам связывания, отличающимся в четыре раза ( $K_1 = 4K_2$ ). Наилучший результат моделирования был достигнут при  $K_1 = 3,2 \cdot 10^5$  и  $K_2 = 8 \cdot 10^4$  при  $T_u = 334,4$  К. При энтальпии связывания  $\Delta H_b = -24,8$  кДж·моль<sup>-1</sup> [140] это приводит к  $K_1 = 6,5 \cdot 10^5$ ,  $K_2 = 1,6 \cdot 10^5$  при 310 К и  $K_1 = 9,5 \cdot 10^5$ ,  $K_2 = 2,4 \cdot 10^5$  при 298 К. Первая константа связывания, полученная в наших экспериментах, близка к той, которая была получена в калориметрических экспериментах [140], однако нами было показано существование двух центров связывания с одинаковым средством.

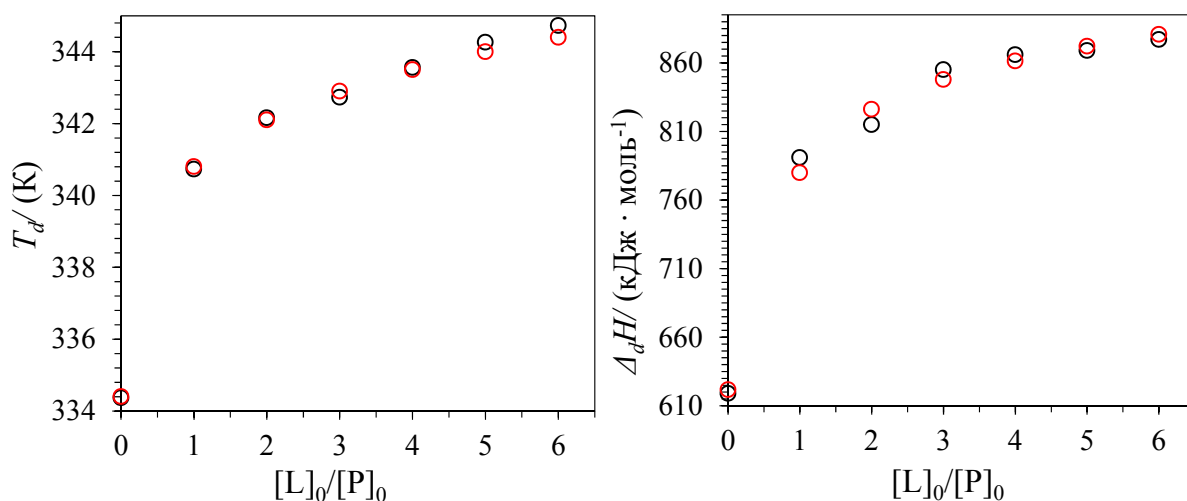


Рисунок 3.22 – Зависимости температуры максимума пика  $T_d$  денатурации БСА ( $[P]_0 = 5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации фенилбутазона. Голубые кружки соответствуют экспериментальным данным, красные треугольники – значения из лучшей расчетной модели.

### 3.2.8 Связывание мелоксикама с БСА

Мелоксикам – еще один нестероидный противовоспалительный препарат с высокой аффинностью к белкам плазмы (около 99 % [143]). Флуоресцентная спектроскопия была использована для определения константы его связывания с ЧСА в работе Тринда-Лемеш и др. [144]. Полученные данные соответствовали  $K_a = 7,83 \cdot 10^4$  и  $1,05 \cdot 10^5$  для связывания 1:1 в двух экспериментах с различными длинами волн возбуждения при 310 К.

Более подробно охарактеризовано связывание с альбумином структурного аналога мелоксикама – пироксикама. Константы связывания пироксикама с высокоаффинными центрами связывания ЧСА, определенные с помощью аффинной хроматографии, составляют  $K_1 = 4,42 \cdot 10^5$  или  $K_I = 1,05 \cdot 10^6$  при 307 К [145], а значения, полученные при исследовании методом гель-фильтрации, составили  $K_I = 1,95 \cdot 10^5$  или  $K_I = 3,3 \cdot 10^5$  ( $n_1 \approx 1$ ) в зависимости от концентрации белка [146]. Исследование связывания пироксикама с БСА равновесным диализом [147] показало, что есть два типа центров связывания с константами  $K_1 = 2,89 \cdot 10^5$  и  $K_2 = 5,6 \cdot 10^4$  при 309 К. Энтальпия связывания, найденная из температурной

зависимости этих констант, составила  $-35,2 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ . В том же эксперименте с ЧСА были получены близкие значения констант ( $K_1 = 3,16\cdot 10^5$  и  $K_2 = 7,9\cdot 10^4$ ) [147]. Недавнее исследование связывания пироксикама с БСА при 298 К [61] с использованием спектрофлуориметрии показало, что пироксикам связывается с двумя центрами с одинаковыми константами связывания, равными  $K_a = 2,94\cdot 10^5$ . Энтальпия связывания с высокоаффинными центрами из калориметрических экспериментов, приведенных в той же работе, составляет  $-22,5 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ .

Результаты наших ДСК экспериментов в присутствии мелоксикама (рисунок 3.23) лучше всего описывались моделью с двумя эквивалентными центрами связывания ( $K_1 = 4K_2$ ):  $K_1 = 6,4\cdot 10^4$  и  $K_2 = 1,6\cdot 10^4$  при  $T_u = 334,4 \text{ К}$ . Принимая энтальпию связывания равной  $-22,5 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ , мы получаем  $K_1 = 1,2\cdot 10^5$ ,  $K_2 = 3,0\cdot 10^4$  при 310 К и  $K_1 = 1,7\cdot 10^5$ ,  $K_2 = 4,3\cdot 10^4$  при 298 К.

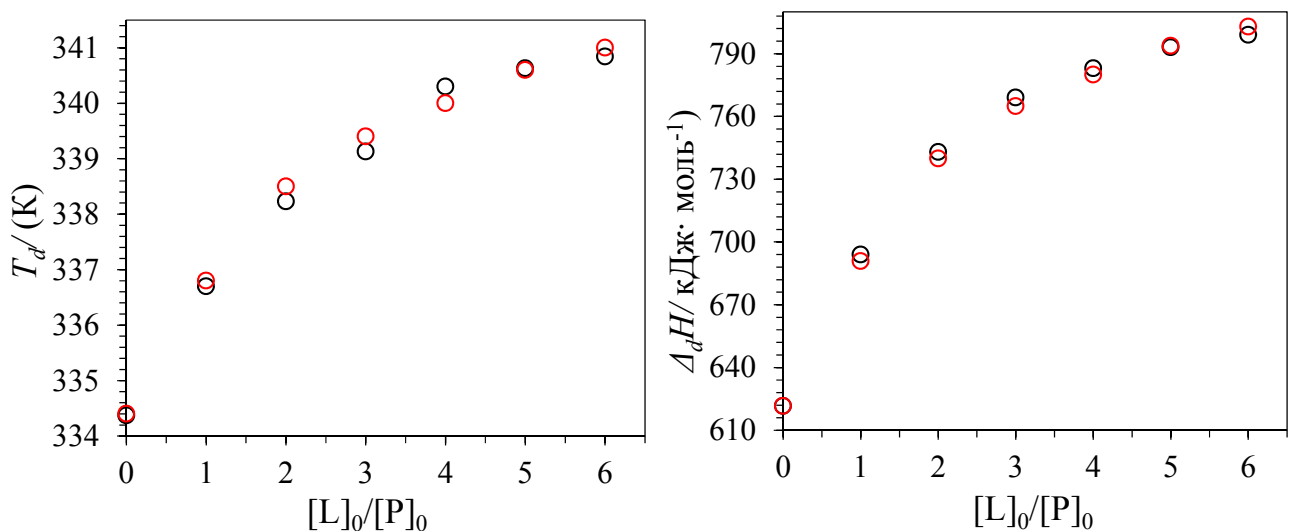


Рисунок 3.23 – Зависимости температуры максимума пика  $T_d$  денатурации БСА ( $[P]_0 = 5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и калориметрической энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  от концентрации мелоксикама. Голубые кружки соответствуют экспериментальным данным, красные треугольники – значения из лучшей расчетной модели.

Наши результаты показывают, что мелоксикам связывается с двумя центрами связывания альбумина с одинаковой константой. Результат, полученный Тринда-Лемеш и др. [144], близок к нашему значению первой константы связывания.

## 3.2.9 Связывание изониазида с БСА

Предыдущие исследования показали слабое связывание альбумина с изониазидом. Считается, что в крови человека доля изониазида, связанного с плазмой, составляет около 10% [119], в других экспериментах были получены значения от 0 до 30% [148]. Эксперименты *in vitro* с раствором, содержащим 4 мг·л<sup>-1</sup> изониазида и 30 г·л<sup>-1</sup> ЧСА, показали, что доля связанного препарата составляет 20%. В спектрофлуориметрических исследованиях было установлено, что значение кажущейся константы связывания изониазида с ЧСА составляет 2500 при 293 К [149], а для связывания изониазида с БСА 3000 при 300 К [150], в то время как наш эксперимент с использованием спектрофлуориметрического титрования  $K_a \approx 1000 \text{ M}^{-1}$ .

Как выяснилось, изониазид почти не влияет на ДСК-кривую (рисунок 3.24) денатурации БСА при любом рассмотренном соотношении лиганд/белок (1:1, 2:1, 10:1), что свидетельствует об очень низкой константе связывания. При моделировании кривой ДСК можно предсказать сдвиг максимума денатурации на 0,6 К для БСА в растворе, содержащем 10-кратный избыток лиганда с  $K_a = 1000$  и  $\Delta_b H = 10 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ .

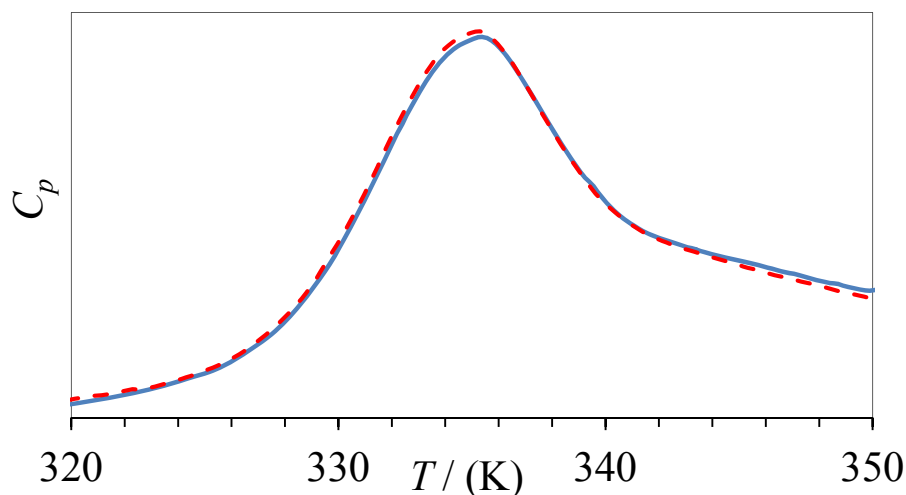


Рисунок 3.24 – Экспериментальные калориметрические профили денатурации БСА в отсутствии (голубая сплошная линия,  $[P]_0 = 5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) и в присутствии изониазида (красная пунктирная линия,  $[P]_0 = 5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ,  $[L]_0/[P]_0 = 2:1$ ).

### 3.2.10 Связывание ампициллина (натриевой соли) с БСА

Известно, что ампициллин слабо связывается с белками плазмы (20 % [120]). В спектрофлуориметрических экспериментах он практически не гасит флуоресценцию альбумина [151]. В исследовании с помощью метода ИТК взаимодействия БСА с ампициллином [152], наблюдались очень низкие тепловые эффекты при добавлении препарата. Установлено, что константы связывания имеют порядок  $10^3$ .

Кривые ДСК при соотношении лиганд/белок 1:1 и 2:1 не показывают сдвига температуры пика денатурации относительно чистого белка (рисунок 3.25). При большом избытке ампициллина  $[L]_0/[P]_0 = 72$  наблюдается сдвиг на 2,5 К. Это соответствует константе связывания  $K_a = 8 \cdot 10^2$  при 335 К и согласуется с литературными данными.

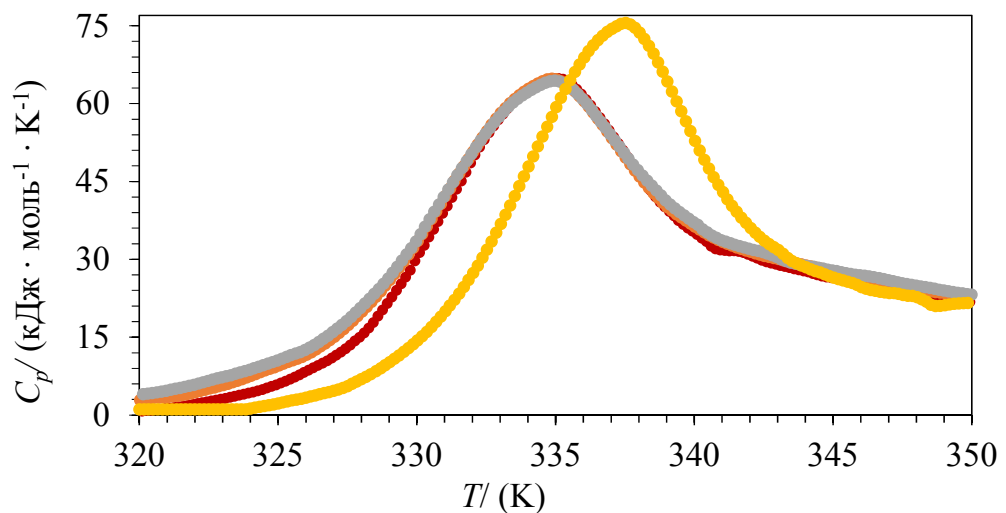


Рисунок 3.25 – Экспериментальные калориметрические профили денатурации БСА в присутствии ампициллина при различных значениях  $[L]_0/[P]_0$ : 0, 1, 2, 72.

Таким образом, был разработан подход для определения констант связывания по данным дифференциальной сканирующей калориметрии. Этот метод позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты. Его оптимально использовать совместно с методом изотермической титрационной калориметрии, который позволяет достаточно точно определять значение энтальпии связывания белков с лигандами, но может давать значительную погрешность по константе

связывания и практически непригоден для определения второй константы связывания. Данные об энтальпии связывания при этом позволяют привести значение константы связывания вблизи температуры денатурации белка, которое определяется из результатов ДСК по зависимости температуры максимума пика от концентрации лиганда, к комнатной температуре. Это дает возможность получать более точные и хорошо воспроизводимые величины констант связывания при 298 К.

### 3.3 Константы связывания с замещенными бензойными кислотами

Для построения соотношений структура-свойство требуются наборы данных, полученных единообразным методом с учетом ограничений выбранной методики. Широко используемый спектрофлуориметрический метод, основанный на явлении статического тушения флуоресценции, страдает от множества недостатков, описанных выше. Нами была предпринята попытка выработать воспроизводимую методику определения констант связывания с альбумином в единообразных условиях с помощью спектрофлуориметрии для дальнейшего анализа и построения корреляционных соотношений. Подробное описание этой методики приведено в разделе 2.4. Ее важными особенностями являются:

- 1) добавление лиганда в раствор белка небольшими порциями вместо традиционного приготовления серии образцов с различными концентрациями лиганда. Это позволяет избежать колебания сигнала флуоресценции от образца к образцу, не связанного с комплексообразованием, которое наблюдается даже в случае приготовления в разных кюветах нескольких растворов белка с одинаковой концентрацией;

- 2) предварительное выдерживание раствора белка в кювете для его адсорбции на стенках;

- 3) использование низких концентраций белка для предотвращения димеризации;

- 4) определение константы связывания с учетом отличия равновесной концентрации свободного лиганда от общей, что достигается путем минимизации

среднеквадратичного отклонения расчетных и измеренных значений  $\frac{\varepsilon_0}{\varepsilon}$  (рисунок 3.26).

#### Input experimental details

```
fluorescenceObserved = {100000, 92362, 87655, 81648, 78948, 75518} (*Observed fluorescence intensities*);
volume0 = 2.3*^-3 (*Initial volume of protein solution, L*);
proteinConc0 = 1.06*^-6 (*Concentration of protein solution, M*);
ligandConc0 = 4.6*^-5 (*Concentration of titrant (ligand solution), M*);
volumeInjected = 0.01*^-3 (*Volume of titrant added per step (injection), L*);
```

#### Run calculation

```
Clear[concentrations, fluorescenceRatioPredicted];
numberInjections = Length[fluorescenceObserved] - 1 (*Number of steps*);
concentrationsTotal = Table[{proteinConc0*volume0/(volume0+volumeInjected*n), ligandConc0*volumeInjected*n/(volume0+volumeInjected*n)},
  {n, 0, numberInjections}];
fluorescenceRatioObserved = (fluorescenceObserved[[1]]/concentrationsTotal[[1, 1]])/(fluorescenceObserved/concentrationsTotal[[All, 1]])
(*Observed apparent fluorescence ratios*);
concentrations[K_] :=
  Flatten[
    Table[
      {Values[Solve[concentrationsTotal[[n, 1]] == proteinConc*(1+K*ligandConc) && concentrationsTotal[[n, 2]] == ligandConc*(1+proteinConc*K) &&
        proteinConc >= 0 && ligandConc >= 0 && K >= 0, {proteinConc, ligandConc}, Reals]], {n, 1, numberInjections+1}}, 2];
epsilon = 0 (*Residual fluorescence of complex relatively to the free protein*);
fluorescenceRatioPredicted[K_] :=
  concentrationsTotal[[All, 1]]/(concentrations[K][[All, 1]]+epsilon*K*concentrations[K][[All, 1]]*concentrations[K][[All, 2]])
(*Calculated apparent fluorescence ratio as function of K*);
Quiet[Ka = FindArgMin[Norm[fluorescenceRatioPredicted[x]-fluorescenceRatioObserved], x, WorkingPrecision->20][[1]]]
(*Fitted binding constant*);
Print["Fitted binding constant Ka = ", Ka]
expCurve = Transpose[{concentrationsTotal[[All, 2]], fluorescenceRatioObserved}]; (*Experimental Stern-Volmer plot*)
Quiet[fittedCurve = Transpose[{concentrationsTotal[[All, 2]], fluorescenceRatioPredicted[Ka]}]; (*Fitted Stern-Volmer plot*)
ListPlot[{expCurve, fittedCurve}, PlotLegends->{"Experimental", "Fitted"}]
Print["Linear Stern-Volmer fit is:"]
Normal[LinearModelFit[expCurve, x, x]] (*Returns fitted linear Stern-Volmer equation including apparent (incorrect) binding constant value*)
Quit[]
```

Fitted binding constant Ka = 424433.38369546730401

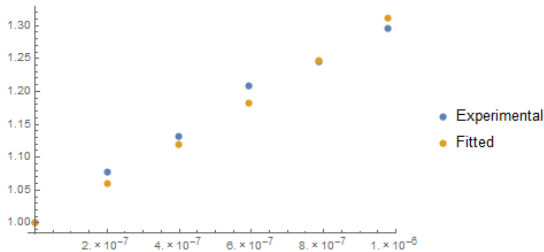


Рисунок 3.26 – Код программы в Mathematica (<https://github.com/sedovigor/fluorescence>), написанной для определения константы связывания с учетом отличия равновесной концентрации свободного лиганда от общей (с примером вывода).

Для апробации нашей методики было изучено связывание серии замещенных бензойных кислот с БСА. В таблице 3.1 приведены полученные нами значения для всех исследованных систем. Константы связывания исследуемых соединений с БСА оказались не очень большими, и доля связанной формы лиганда в ходе титрования не превышает 10%. Поэтому разница между

определяемыми по обычному уравнению Штерна-Фольмера и подобранными с помощью нашего алгоритма значениями  $K_a$  невелика: для наибольшей кажущейся константы  $7,6 \cdot 10^4$  (4-нитробензойная кислота) скорректированное значение равно  $8,1 \cdot 10^4$ , однако для более прочно связывающихся лигандов они могут отличаться на порядок.

Таблица 3.1 – Полученные методом спектрофлуориметрии константы связывания БСА с серией замещенных бензойных кислот.

Лиганд	$K \cdot 10^{-4}, M^{-1}$	Лиганд	$K \cdot 10^{-4}, M^{-1}$
Бензойная кислота	$1,9 \pm 0,1$	3-хлорбензойная кислота	$5,8 \pm 0,3$
2-гидроксибензойная кислота	$4,0 \pm 0,2$	4-хлорбензойная кислота	$5,1 \pm 0,1$
3-гидроксибензойная кислота	$1,9 \pm 0,1$	2-бромбензойная кислота	$2,3 \pm 0,2$
4- гидроксибензойная кислота	$1,0 \pm 0,1$	3-бромбензойная кислота	$3,5 \pm 0,3$
2,4-дигидроксибензойная	$3,1 \pm 0,2$	4-бромбензойная кислота	$5,4 \pm 0,2$
2-нитробензойная кислота	$2,1 \pm 0,2$	2-иодбензойная кислота	$3,3 \pm 0,3$
3- нитробензойная кислота	$7,8 \pm 0,3$	3-иодбензойная кислота	$5,1 \pm 0,2$
4- нитробензойная кислота	$8,1 \pm 0,2$	4-иодбензойная кислота	$4,1 \pm 0,3$
2,4-динитробензойная	$6,5 \pm 0,2$	2-цианбензойная кислота	$2,6 \pm 0,1$
2-аминобензойная кислота	$2,3 \pm 0,2$	3-цианбензойная кислота	$3,9 \pm 0,2$
3-аминобензойная кислота	$1,4 \pm 0,2$	4-цианбензойная кислота	$6,4 \pm 0,2$
2-аминобензойная кислота	$3,3 \pm 0,2$	4-метилбензойная кислота	$1,4 \pm 0,1$

Для некоторых из исследованных бензойных кислот константы связывания были ранее измерены разными авторами с использованием различных методов и описаны в литературе [153–156]. Наличие некоторых тенденций, например, уменьшение значений  $K_a$  в ряду 2-гидрокси > 3-гидрокси > 4-гидроксибензойной кислот, наблюдаемая в настоящей работе и в двух предыдущих исследованиях [154, 156], дает свидетельство согласованности результатов.

Полученные значения констант были использованы для построения эмпирических корреляций, которые описывают зависимость сродства к альбумину от строения молекулы. Мы не обнаружили хорошей корреляции констант связывания для всего набора 24 замещенных бензойных кислот ни с одним отдельным физико-химическим параметром или дескриптором лиганда.



Однако значения  $\log K_a$  для подмножества м- и п-монозамещенных кислот коррелируют с константами Гаммета  $\sigma$  заместителей:

$$\log K_a = 0,79\sigma + 4,34 \quad (3.3.1)$$

$$\text{СКО} = 0,13, n = 15, r^2 = 0,8257$$

Эта корреляция показана на рисунке 3.27:

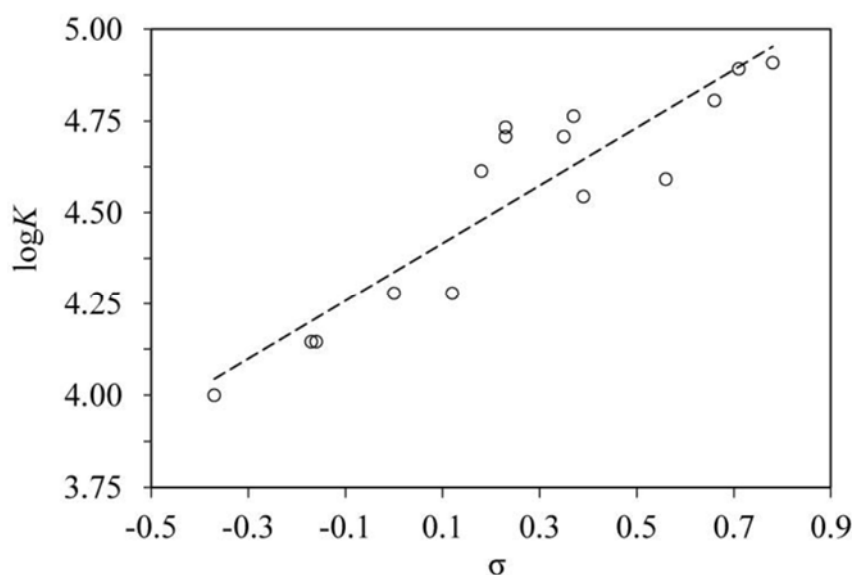


Рисунок 3.27 – Корреляция  $\log K_a = 0,79\sigma + 4,34$

На взаимодействие с участием о-замещенных бензойных кислот сильно влияют стерические эффекты заместителей. Их поведение в любом физическом или химическом процессе нельзя интерпретировать в терминах констант Гаммета, которые не определены как для о-заместителей, так и для дизамещенных производных [157].

Константы Гаммета описывают электронодонорную или акцепторную способность заместителя по сравнению с атомом водорода. Показано, что константы равновесия и скорости различных химических процессов с участием замещенных производных бензойных кислот и других ароматических соединений коррелируют с этими константами [158]. Применение этого подхода к связыванию белок-лиганд весьма ограничено. Ранее было показано, что константы связывания п-замещенных бензамидинов с трипсином имеют

некоторую корреляцию с константами Гаммета заместителей [159]. Энтальпии и энтропии связывания п-замещенных ацетанилидов с БСА показали аналогичную корреляцию [160].

Второй использованный нами подход основан на QSAR-моделировании, в котором используются регрессии с рассчитанными теоретически дескрипторами. В описанных выше работах Колминарейо и др. [103] и Сю [105] значения  $r^2$  для лучших моделей составили 0,83 ( $n=84$ ) (шесть параметров) и 0,86 ( $n=84$ ) (семь параметров) соответственно.

Мы рассмотрели линейные модели QSAR с двумя наборами дескрипторов. Один из них был сгенерирован с помощью программного обеспечения PaDEL-Descriptor [161] и включал 1410 дескрипторов 2D, 1D и 0D. Другой набор был сгенерирован программой eDragon [162] и включал более 1600 дескрипторов 3D, 2D, 1D и 0D. Отсеивались дескрипторы, имеющие одинаковое значение для всех лигандов и строго взаимокоррелированные дескрипторы. После такого отбора осталось 874 дескриптора в первом наборе и 1159 дескрипторов во втором наборе.

В первом наборе мы изначально рассмотрели все возможные регрессии с двумя разными дескрипторами (381 501 комбинация). Максимальный достигнутый коэффициент корреляции составил  $r^2 = 0,739$ :

$$\log K = 3,501BCUTw-11 + 1,324MATS3c - 37,295 \quad (3.3.2)$$

$$СКО = 0,124, n = 24, r^2 = 0,739$$

Первые 40 корреляций с наивысшей оценкой включали дескриптор *BCUTw-11*. Далее были рассмотрены все возможные регрессии с тремя дескрипторами, одним из которых всегда был *BCUTw-11*. Лучший из них имел  $r^2 = 0,851$  и задается уравнением 3.4.3 (рисунок 3.28):

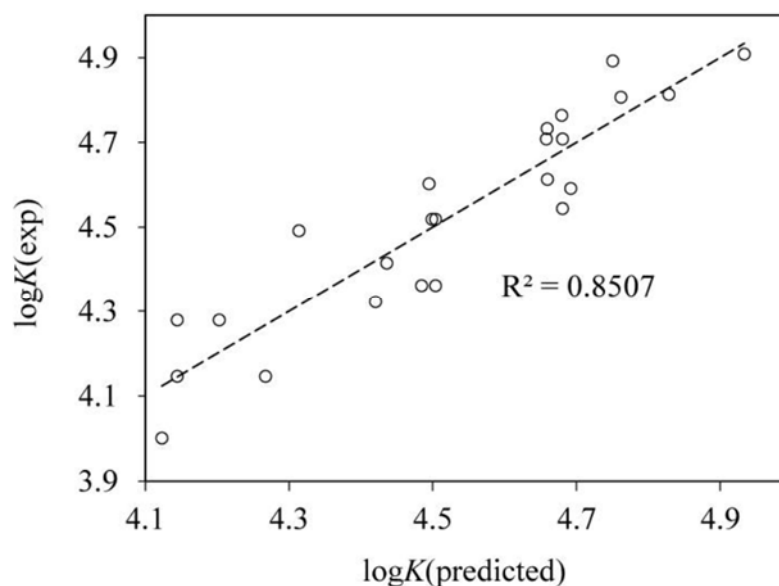


Рисунок 3.28 – Корреляция с BCUTw-11.

$$\log K_a = 3.601\text{BCUTw-11} + 0.0458\text{MPC7} - 0.5258\text{SP-4} - 37.706 \quad (3.3.3)$$

$$\text{СКО} = 0,094, n = 24, r^2 = 0,851.$$

Дополнительно был проведен поиск корреляций с тремя разными дескрипторами с использованием генетического алгоритма. Лучших корреляций не обнаружено. Использование четырех дескрипторов приводит к дальнейшему повышению качества корреляций (до  $r^2 = 0,914$  для следующей корреляции):

$$\log K_a = 3,476\text{BCUTw-11} - 4,748\text{AATSC8c} - 1,435\text{GATS3c} - 5,809 \times \\ \times \text{SpMin1\_Bhs} - 25,099 \quad (3.3.4)$$

$$\text{СКО} = 0,071, n = 24, r^2 = 0,914$$

Важность дескриптора BCUTw-11 определяется алгоритмом его вычисления. Этот дескриптор является взвешенной версией матрицы Бёрдена [163], которая учитывает связность, заряд и поляризуемость атомов в молекуле [164]. Он включает в себя информацию об электронной плотности в бензольном кольце. Несмотря на то, что BCUTw-11 для м- и п-монозамещенных бензойных кислот не имеет строгой корреляции с константой Гаммета заместителей, ее значения в целом ниже в присутствии электронодонорных и выше в присутствии электроноакцепторных групп. Некоторые другие применения дескрипторов

семейства BCUT для описания белок-лигандных взаимодействий были продемонстрированы ранее [165–167].

Со вторым набором дескрипторов мы также провели исчерпывающий поиск двухпараметрических линейных регрессий (671 061 комбинация). Первые 36 корреляций с наибольшими значениями  $r^2$  включали дескрипторы HATS7v или HATS7u. Наилучшая корреляция (рисунок 3.29) определяется следующим образом:

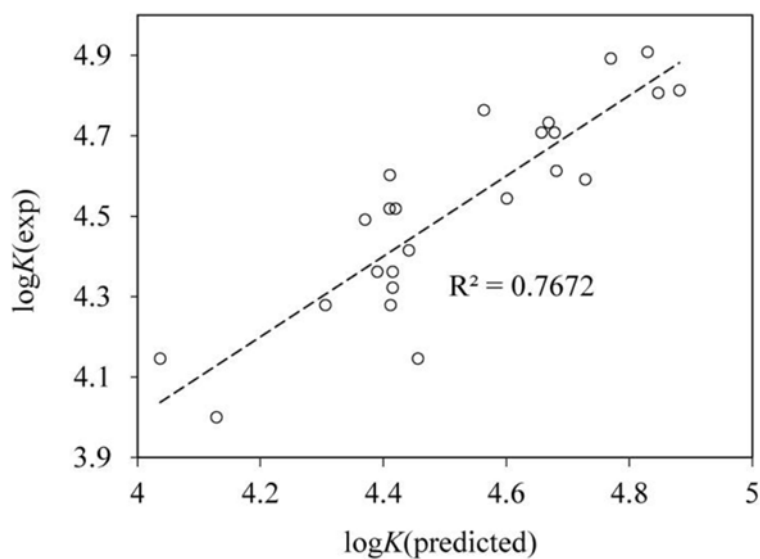


Рисунок 3.29 – Корреляция с семейством дескрипторов HATS7.

$$\log K = -10,274 \text{ HATS7v} + 0,26 \text{ DP13} + 4,415 \quad (3.3.5)$$

$$\text{СКО} = 0,117, n = 24, r^2 = 0,767$$

Лучшая трехпараметровая модель с HATS7v:

$$\log K = -9,095 \text{ HATS7v} + 0,202 \text{ Mor06e} + 0,307 \text{ DP14} + 4,781 \quad (3.3.6)$$

$$\text{СКО} = 0,1, n = 24, r^2 = 0,829$$

Дескрипторы семейства HATS7 являются GETAWAY (Geometry, Topology, Atom-Weights Assembly) дескрипторами, которые рассчитываются с применением молекулярной топологии исходя из 3D-структуры молекулы с

учетом различных параметров атомов (атомная масса, поляризуемость, радиус ван-дер-Ваальса и др.)

### 3.4 Молекулярный докинг

Метод молекулярного докинга показал свою эффективность для предсказания так называемых поз лигандов в белковых рецепторах, то есть их взаимного расположения и конформации лиганда [168–171]. При этом значения энергий Гиббса белок-лигандных взаимодействий, полученные на основе оценочных функций докинга, плохо коррелируют с экспериментальными данными [169, 172, 173]. Несмотря на это, метод докинга широко используется для виртуального скрининга потенциально активных по отношению к заданному рецептору лигандов. Существует большое число работ, в которых экспериментальные константы и энергии Гиббса связывания с альбумином сопоставляются с результатами докинга [70, 71, 174–176]. Ниже мы проводим детальный критический анализ работоспособности такого подхода.

На первом этапе мы рассмотрели возможность прогнозирования поз лигандов в центрах связывания альбумина с помощью докинга. Для этого был применен один из наиболее простых подходов – жесткий докинг с использованием оценочной функции Autodock Vina (версия 1.2). Из базы данных PDB были отобраны все структуры, содержащие низкомолекулярные органические лиганды, связанные с человеческим сывороточным альбумином. При этом из рассмотрения были исключены алифатические кислоты, которые способны связываться со множеством центров в молекуле альбумина и обладают гибкой структурой, а также очень крупные молекулы, которые не помещаются в центрах связывания. Из оставшихся 97 структур были отобраны содержащие лиганд хотя бы в одном из центров Судлоу. Лиганды были извлечены из экспериментальных структур и приведены к ионизационному состоянию при pH 7. Для докинга использовалась структура ЧСА с PDB ID 4Z69, изначально содержащая молекулу диклофенака в центре Судлоу I и пентадекановой кислоты в центре Судлоу II. Перед докингом из структуры были удалены все лиганды и

прочие молекулы, а состояние ионизируемых остатков приведено к pH 7. Докинг проводился по отдельности для каждого из двух центров, представляемых в виде кубов с длинами сторон 15 Å, значение параметра exhaustiveness=64. Среди 10 поз с наивысшей оценкой, выдаваемых Autodock Vina, осуществлялся поиск обладающей наименьшим среднеквадратичным отклонением RMSD положений тяжелых (кроме водорода) атомов лиганда от экспериментальной структуры. Для этого в экспериментальной структуре комплекса и структуре 4Z69 сначала путем минимизации среднеквадратичного отклонения совмещались альфа-атомы углерода в аминокислотах доменов белка (IIA или III), содержащих соответствующие центры связывания. Затем в “выравненных” структурах сравнивалось положение лигандов. Расчет RMSD проводился с учетом наличия симметричных тяжелых атомов в некоторых лигандах с помощью функции CalcRMS пакета RDKit. В таблицах 3.2 и 3.3 приведены значения RMSD таких поз для каждой из рассмотренных экспериментальных структур. Среднее значение RMSD 2,6–2,8 Å для набора структурно разнородных лигандов позволяет говорить о достаточно высокой точности предсказания поз, однако следует понимать, что мы целенаправленно выбирали одну из 10 поз с наименьшим RMSD. Для сравнения, пространственное разрешение рентгеноструктурного анализа белков в среднем по базе PDB составляет 2 Å.

Таблица 3.2 – Среднеквадратичное отклонение (RMSD) положений тяжелых атомов лиганда в центре связывания Судлоу I в лучших позах докинга от экспериментальной структуры.

PDB ID	Лиганд	RMSD, Å
1BKE	2,3,5-triodobenzoate	1,47
1E7C	2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane	1,31
1H9Z	R-warfarin	2,43
1HA2	S-warfarin	2,05
1HK1	3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine	4,56
2BX8	azapropazone	4,20
2BXA	3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate	1,56
2BXB	4-butyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-phenylpyrazolidine-3,5-dione	2,17
2BXC	4-butyl-1,2-diphenyl-pyrazolidine-3,5-dione	2,15

2BXD	R-warfarin	1,85
2BXE	5-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-benzoate	1,01
2BXH	3-sulfooxy-1h-indole	3,18
2BXL	2-hydroxy-3,5-diiodo-benzoate	1,46
2BXN	3-[5-[(3-carboxy-2,4,6-triiodo-phenyl)carbamoyle]pentanoylamino]-	6,42
2BXO	4-butyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-phenylpyrazolidine-3,5-dione	2,17
2BXP	4-butyl-1,2-diphenyl-pyrazolidine-3,5-dione	1,36
2I30	2-hydroxybenzoate	2,40
2XSI	dansyl-L-glutamate	2,57
2XVU	dansyl-L-asparagine	3,91
2XVW	dansyl-L-arginine	4,74
2XW0	dansyl-L-phenylalanine	5,21
2YDF	iophenoxate	0,95
3B9M	salicylate	2,00
3LU6	[(1R,2R)-2-[(5-fluoro-1H-indol-2-yl)carbonylamino]-2,3-dihydro-1H-	5,24
3LU7	4-[(1R,2R)-2-[(5-fluoro-1H-indol-2-yl)carbonylamino]-2,3-dihydro-	5,63
3TDL	11-([5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl]sulfonylamino)undecanoate	3,50
3UIV	(3S,5S,7S)-tricyclo[3.3.1.1~3,7~]decan-1-amine	1,36
4IW1	beta-D-fructofuranose	2,33
4IW2	alpha-D-glucopyranose	1,39
4Z69	diclofenac	0,71
6EZQ	12-[(4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-7-yl)amino]dodecanoate	4,67
6R7S	2-hydroxy-(5-([4-(2-pyridinylamino)sulfonyl]phenyl)azo)benzoate	6,39
7D6J	[3,5-bis(bromanyl)-4-oxidanyl-phenyl]-(2-ethyl-1-benzofuran-3-	3,75
7OV5	6-nitronaphtho[1,2-e][1,3]benzodioxole-5-carboxylate	0,82
8A9Q	R-warfarin	2,50
Среднее значение		2,84

Таблица 3.3 – Среднеквадратичное отклонение (RMSD) положений тяжелых атомов лиганда в центре связывания Судлоу II в лучших позах докинга от экспериментальной структуры.

PDB ID	Лиганд	RMSD, Å
1E7A	2,6-bis(1-methylethyl)phenol	1,06
1E7B	2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane	2,59
2BXA	3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoate	4,99
2BXE	5-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-benzoate	2,00
2BXF	7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2h-1,4-benzodiazepin-2-one	3,81
2BXG	ibuprofen	2,04
2BXH	3-sulfooxy-1H-indole	1,42

2XVQ	dansyl-L-sarcosine	1,64
2XVU	dansyl-L-asparagine	2,74
2XW0	dansyl-L-phenylalanine	3,97
2XW1	dansyl-L-norvaline	2,90
2YDF	iophenoxate	1,98
5YOQ	4-phenyl-butanoate	2,46
5Z0B	L-tryptophan	2,02
6EZQ	12-[(4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-7-yl)amino]dodecanoate	3,44
6QIP	2-(N-morpholino)-ethanesulfonate	3,37
7D6J	[3,5-bis(bromanyl)-4-oxidanyl-phenyl]-(2-ethyl-1-benzofuran-3-	1,62
Среднее значение		2,59

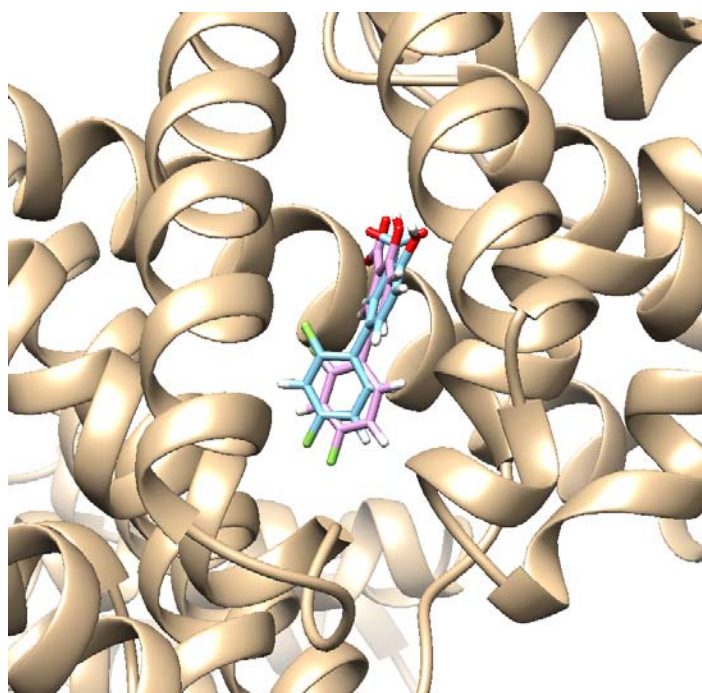


Рисунок 3.30 – Экспериментальное (PDB ID 2BXE, сиреневые связи) и предсказанное по результатам докинга в Autodock Vina (голубые связи) положение лиганда (5-(2,4-дифторфенил)-2-гидроксибензоата) в центре связывания Судлоу I.



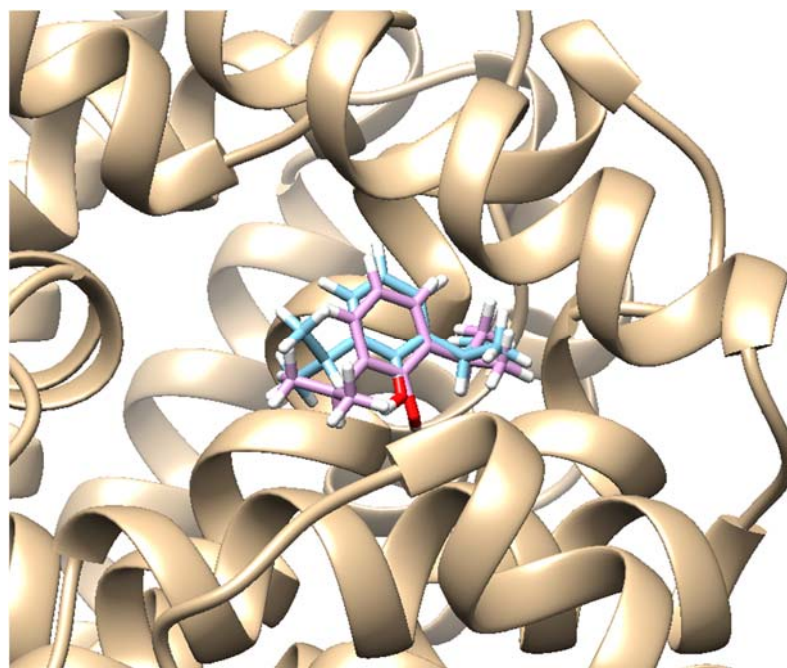


Рисунок 3.31 – Экспериментальное (PDB ID 1E7A, сиреневые связи) и предсказанное по результатам докинга в Autodock Vina (голубые связи) положение лиганда (2,6-бис-(1-метилэтил)фенола) в центре связывания Судлоу II.

Затем мы рассмотрели возможность предсказания энергии Гиббса связывания с альбумином. В первую очередь следует отметить несостоятельность таких расчетов при использовании жесткого докинга. Мы сравнили результаты, полученные при жестком докинге в Autodock Vina для серии анионов замещенных бензойных кислот на основе двух различных исходных экспериментальных структур бычьего альбумина: комплекса с 3,5-дидиодосалициловой кислотой 4JK4 и кристаллизованной апо-формы 3V03. Процедура докинга проводилась аналогично описанной выше, но размер области поиска был сокращен до куба со стороной  $10\text{\AA}$  с центром в точке, соответствующей центру бензольного кольца лиганда, связанного с центром Судлоу I либо Судлоу II в структуре 4JK4. Это необходимо, чтобы исключить возможность попадания маленьких лигандов за пределы центров связывания.

Нами были сравнены первые по рангу позы одних и тех же лигандов при докинге к 4JK4 и 3V03. Существенные отличия в пространственном расположении боковых цепей аминокислотных остатков в этих двух структурах

приводят к тому, что алгоритм докинга зачастую считает минимальными по энергии совершенно разные позы лиганда (Рисунок 3.32). Значения RMSD тяжелых атомов в среднем для 24 рассмотренных анионов кислот составило 3,15 и 3,93 Å соответственно для центров связывания Судлоу I и Судлоу II. Это приводит к контактам одних и тех же атомов с разными боковыми цепями в двух структурах и, естественно, значительным отличиям величины выдаваемой программой величины скоринговой функции, которую некоторые авторы интерпретируют как коррелирующую с энергией Гиббса связывания [177, 178]. Более того, даже сдвиг одного атома на 1 Å может в некоторых случаях существенно изменить значение, выдаваемое программой, например, при потере водородной связи [179]. На рисунке 3.33 показано отсутствие корреляции между значениями скоринговой функции для первых по рангу поз анионов замещенных бензойных кислот при докинге к 4JK4 и 3V03.

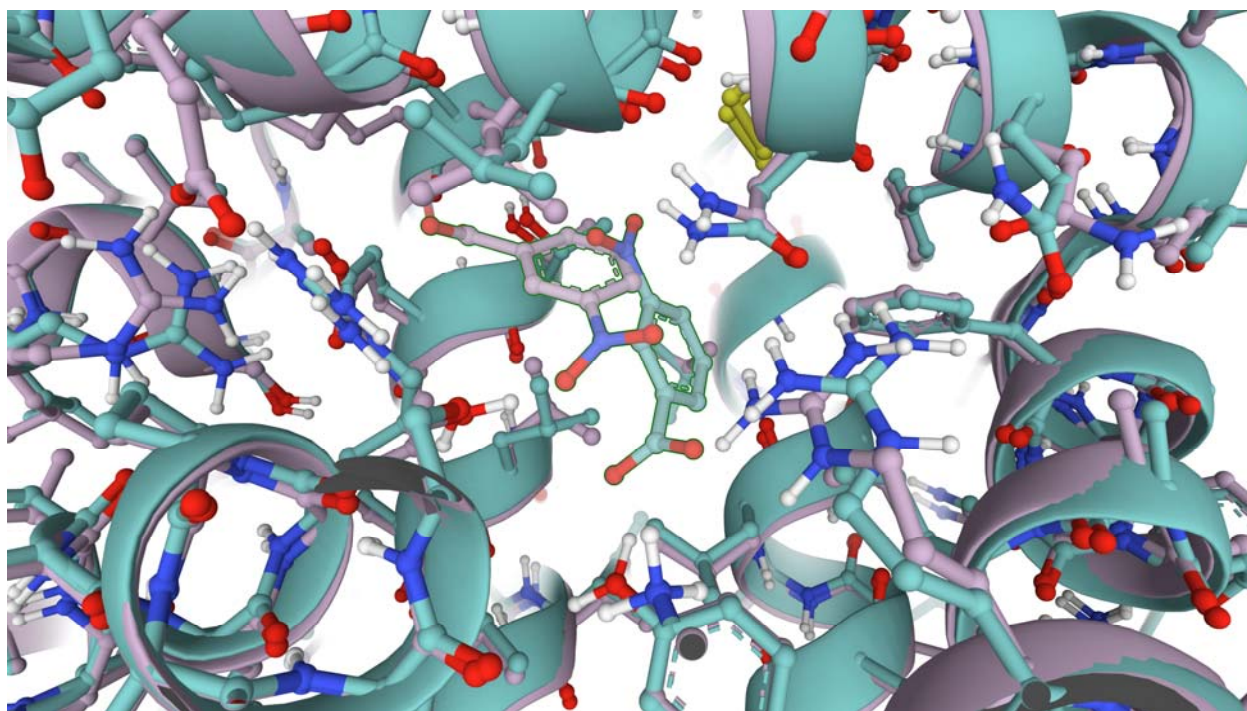


Рисунок 3.32 – Различия пространственного расположения боковых цепей аминокислотных остатков в центре Судлоу I и предсказанных с помощью Autodock Vina поз лиганда (м-нитробензойной кислоты) для двух экспериментальных структур БСА с PDB ID 4JK4 и 3V03.

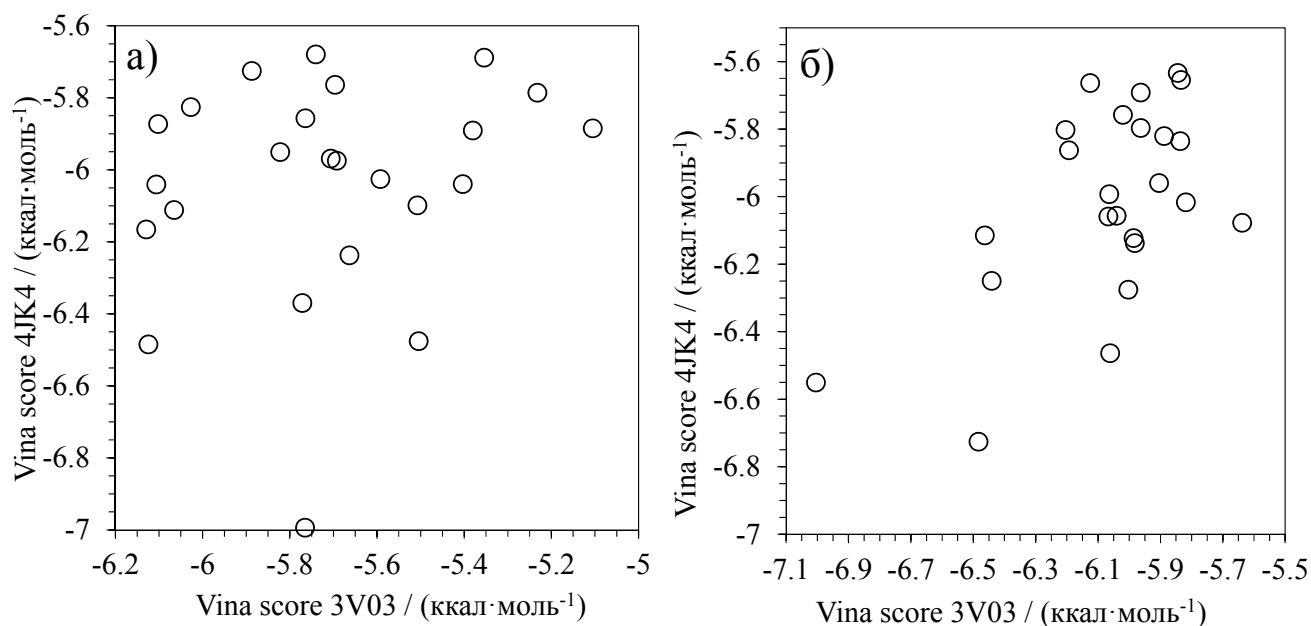


Рисунок 3.33 – Сопоставление значений скоринговой функции для первых по рангу поз анионов замещенных бензойных кислот при жестком докинге в Autodock Vina к 4JK4 и 3V03: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

Затем нами был проведен докинг тех же лигандов к тем же структурам БСА в Autodock Vina с учетом гибкости боковых цепей, содержащих атомы в радиусе 5 Å от центра области поиска. Было выставлено очень высокое значение параметра глубины конформационного поиска  $exhaustiveness=256$ . Хотя это в некоторых случаях позволяет получить хорошее совпадение поз боковых цепей и лиганда для двух структур (Рисунок 3.34), между значениями скоринговой функции для одних и тех же лигандов по-прежнему отсутствует значимая корреляция (Рисунок 3.35), что в том числе связано с отличиями в расположении неподвижных атомов главной цепи белка в двух структурах. При таком результате уже нет смысла искать корреляцию расчетных значений с экспериментальными данными, впрочем, отметим, что ее не наблюдалось ни для одной из структур и центров.

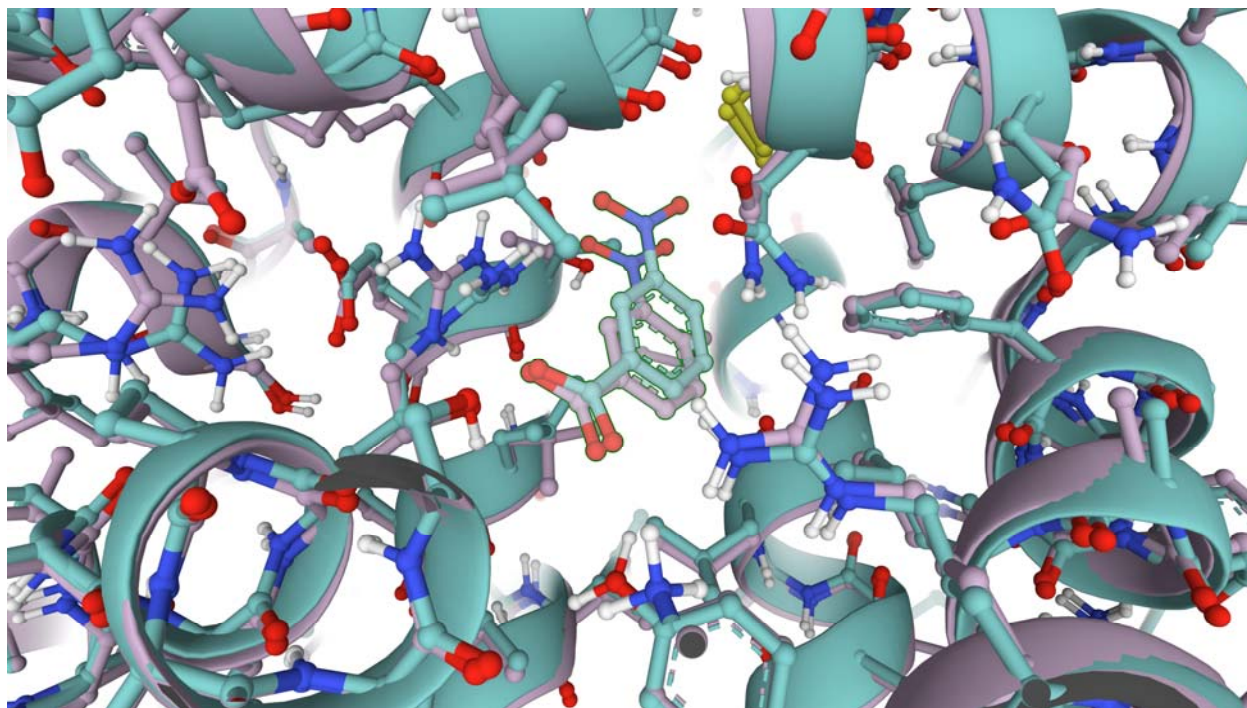


Рисунок 3.34 – Различия предсказанных с помощью Autodock Vina с использованием гибкого докинга пространственного расположения боковых цепей аминокислотных остатков в центре Судлоу I и поз лиганда (м-нитробензойной кислоты) для двух экспериментальных структур БСА с PDB ID 4JK4 и 3V03.

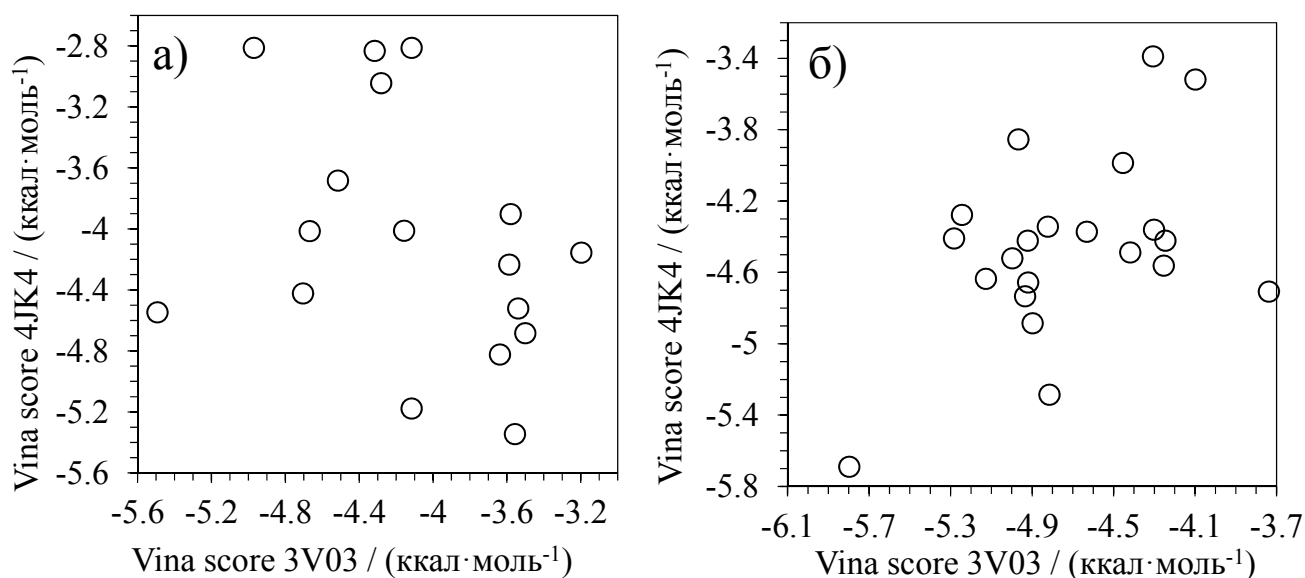


Рисунок 3.35 – Сопоставление значений скоринговой функции для первых по рангу поз анионов замещенных бензойных кислот при гибком докинге в Autodock Vina к 4JK4 и 3V03: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

Учитывая то, что полученные результаты могут быть связаны с недостатками алгоритма Autodock Vina, мы провели докинг тех же лигандов в те же структуры альбумина с помощью программы Glide из пакета Schrodinger. Значения RMSD тяжелых атомов в среднем для 24 рассмотренных анионов кислот составили 1,83 и 3,45 Å соответственно для центров связывания Судлоу I и Судлоу II. При этом величины скоринговой функции не коррелировали между собой для обоих центров (Рисунок 3.36).

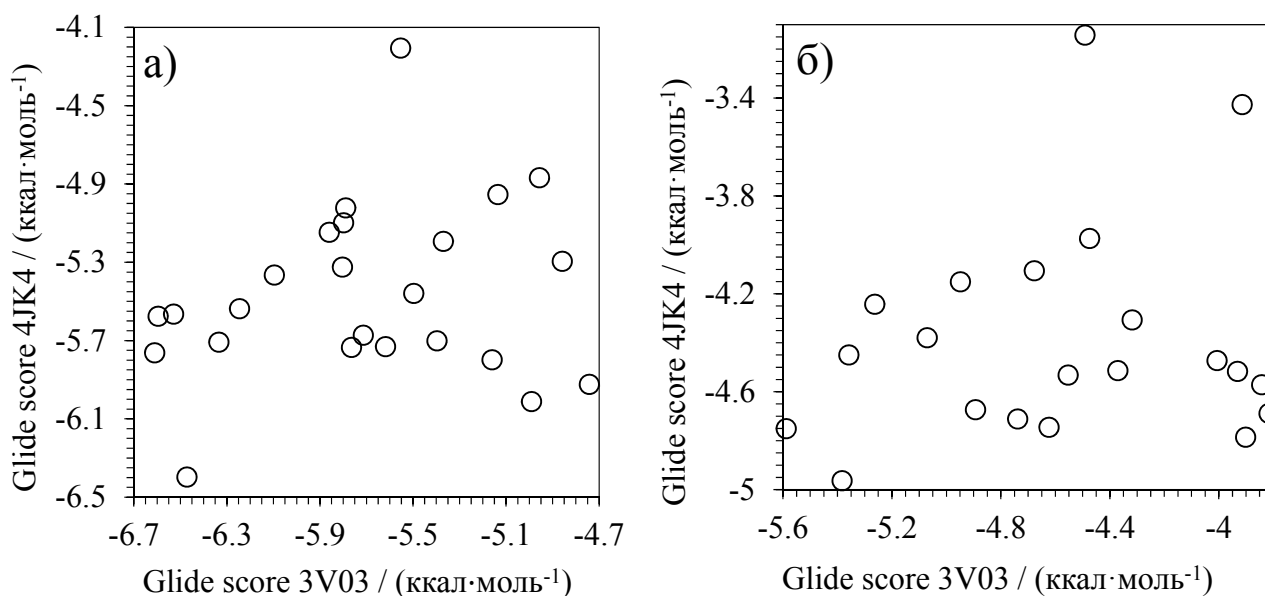


Рисунок 3.36 – Сопоставление значений скоринговой функции для первых по рангу поз анионов замещенных бензойных кислот при жестком докинге в Schrodinger Glide к 4JK4 и 3V03: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

Полученные позы были использованы в качестве входных структур для расчета энергии Гиббса связывания методом MM/GBSA с использованием силового поля OPLS3e и модели сольватации VSGB. Алгоритм, используемый программой Schrodinger Prime, проводит минимизацию энергии комплекса, рецептора и лиганда, при этом аминокислотные остатки, содержащие атомы в радиусе 5 Å от лиганда, рассматривались как подвижные. Для лигандов в Судлоу I была получена статистически значимая ( $r^2 = 0,7522$ ) корреляция между энергией Гиббса связывания для структур 4JK4 и 3V03 (Рисунок 3.37а). Для лигандов в Судлоу II такой корреляции не наблюдалось ( $r^2 = 0,1581$ , Рисунок 3.37б), по-видимому, из-за более существенного расхождения в исходных координатах лигандов, которое сохраняется после минимизации.

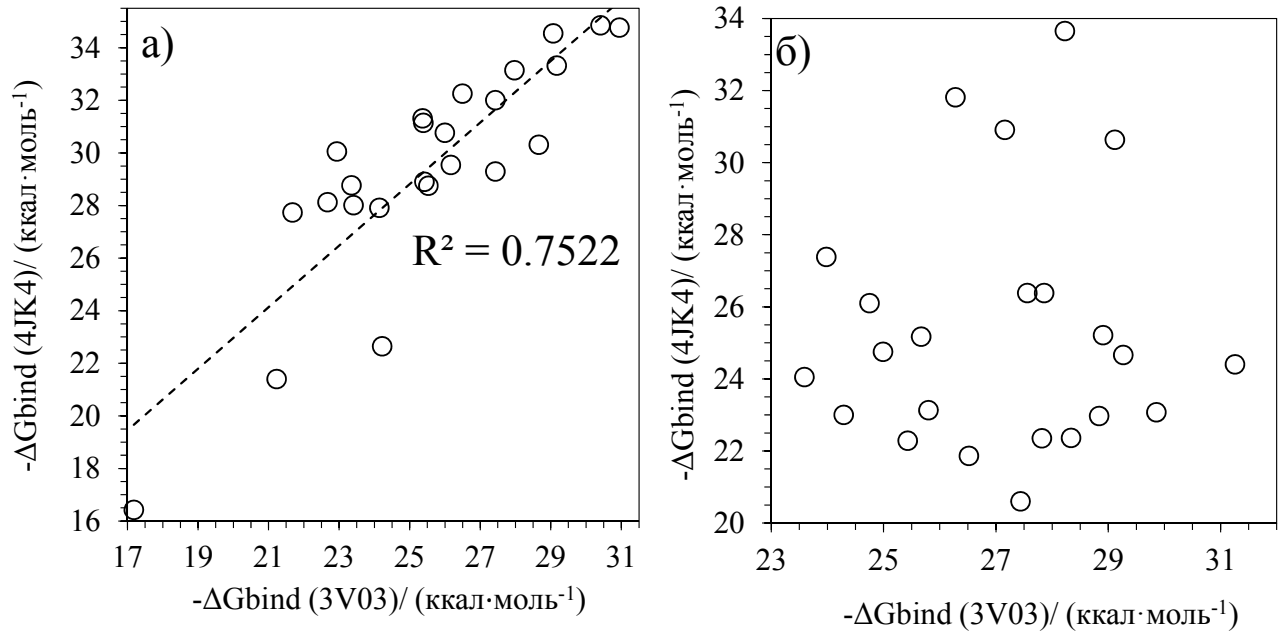


Рисунок 3.37 – Сопоставление результатов расчета энергии Гиббса связывания анионов замещенных бензойных кислот методом ММ/GBSA с использованием структур альбумина 4JK4 и 3V03: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

Попытка сопоставить результаты вышеупомянутого расчета методом ММ/GBSA с экспериментальными данными, определенными нами методом спектрофлуориметрии, показывает отсутствие корреляции ( $r^2 = 0,0887$  и  $r^2 = 0,2437$  для центра Судлоу I и Судлоу II соответственно, Рисунок 3.38).

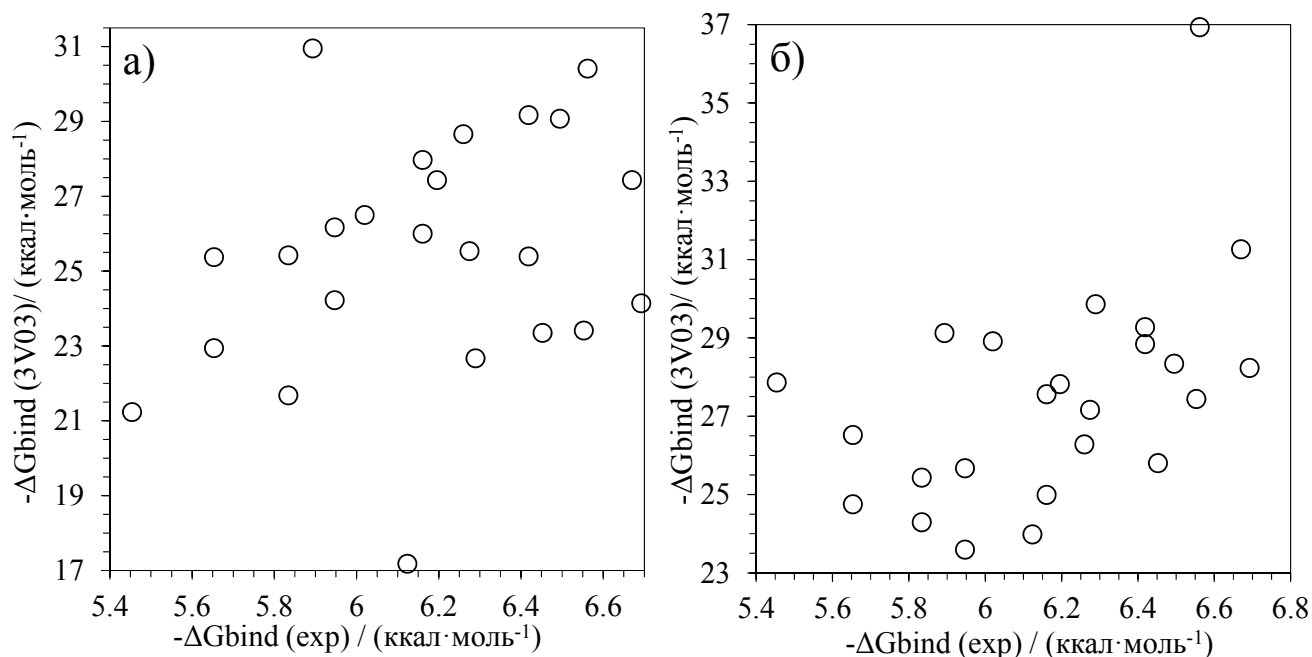


Рисунок 3.37 – Сопоставление результатов расчета энергии Гиббса связывания анионов замещенных бензойных кислот методом MM/GBSA с использованием структуры альбумина 3V03 с экспериментальными данными: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

Совершенно ясно, что ожидать получения сколь-нибудь достоверных результатов можно только при учете изменений конформации боковых цепей в окружении лиганда. Кроме того, лиганды в центрах связывания, а равно и боковые цепи, зачастую конформационно подвижны, что требует, в частности, расчетов методом MM/GBSA не исходя из одной минимизированной структуры, а на основе молекулярно-динамических траекторий. Поскольку более крупные молекулы могут взаимодействовать с большим числом атомов белка и быть менее подвижны в комплексах, мы также попробовали рассчитать с помощью метода MM/GBSA, а также гибкого докинга в Autodock Vina (*exhaustiveness*=256) аффинности для набора лекарственных соединений, связывание которых на колонке с иммобилизованным ЧСА изучено методом ВЭЖХ в работе Валько и др. [47]. Этот набор также интересен своей структурной неоднородностью и большим разбросом значений констант связывания по сравнению с серией бензойных кислот (Рисунок 3.39).



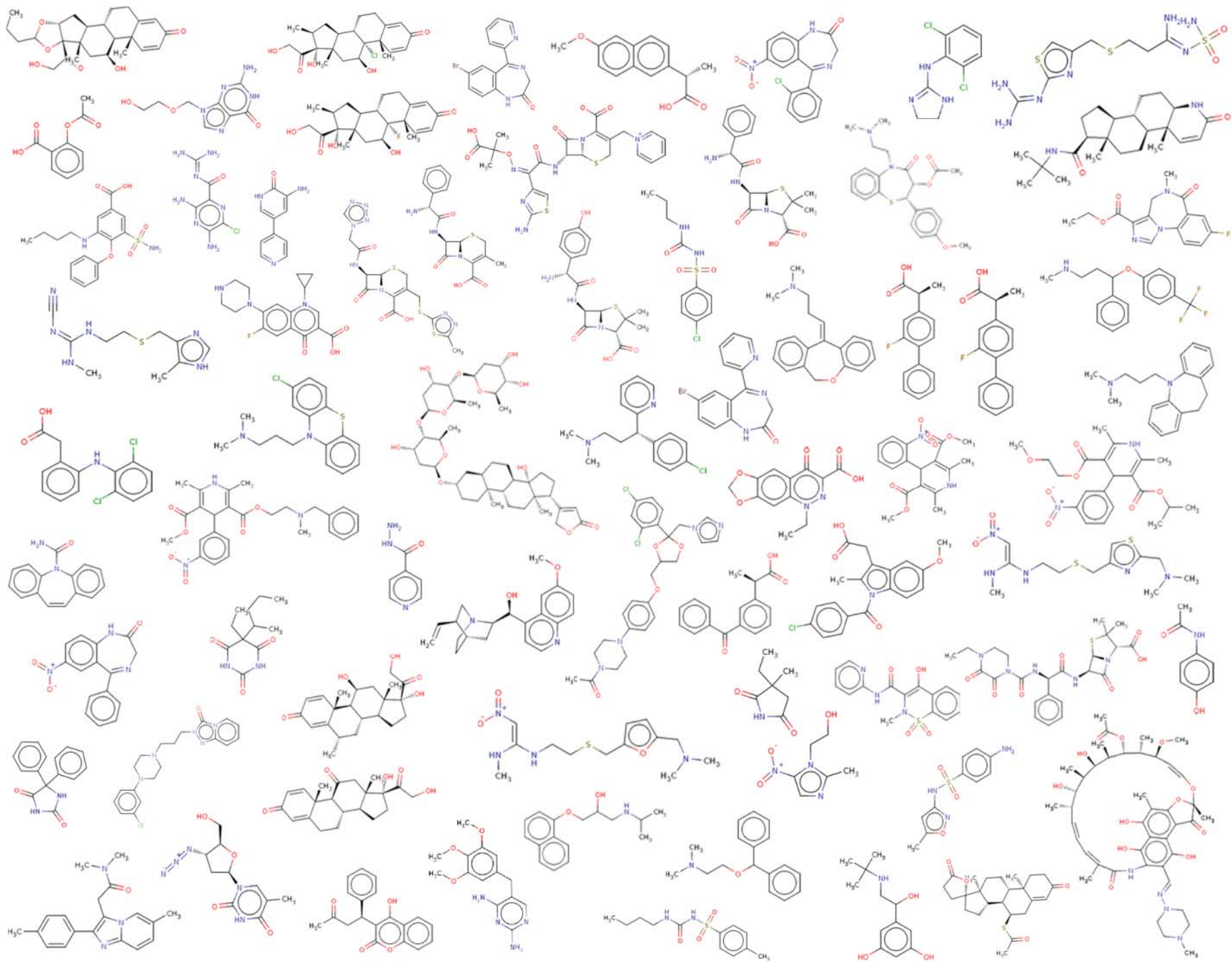


Рисунок 3.39 – Структуры лекарственных соединений, изученных в работе Валько [47].

Для расчетов использовалась структура ЧСА с PDB ID 4Z69. Сопоставление значений  $\log K$  с результатами расчетов приведены на рисунках 3.40 и 3.41. При использовании метода MM/GBSA значение  $r^2 = 0,1514$  для центра Судлоу I и  $0,1565$  для центра Судлоу II. Для скоринговой функции Autodock Vina  $r^2 = 0,0241$  для Судлоу I и  $0,0256$  для Судлоу II. Поскольку разные лекарства могут связываться с разными центрами, мы также рассмотрели двойную линейную регрессию  $\log K$  против результатов расчета для обоих центров, которая привела к величинам  $r^2 = 0,1903$  для MM/GBSA и  $0,026$  для скоринговой функции Autodock Vina, то есть фактическому отсутствию корреляции.

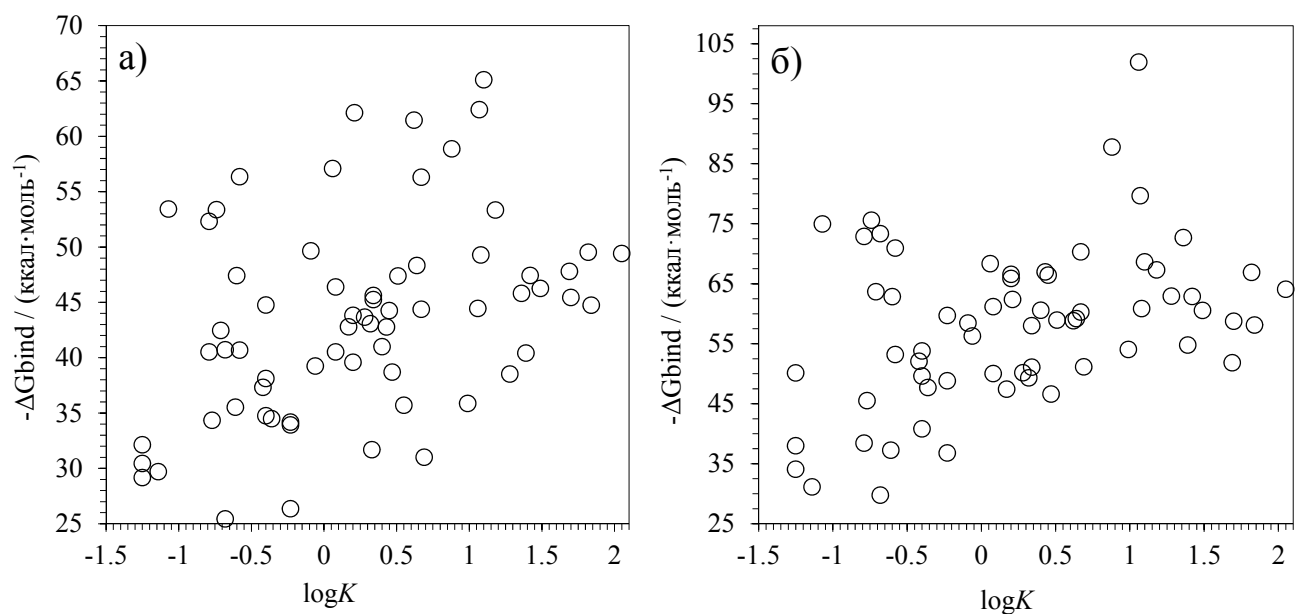


Рисунок 3.40 – Сопоставление результатов расчета энергии Гиббса связывания различных лекарственных соединений [47] методом MM/GBSA с использованием структуры ЧСА 4Z69: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

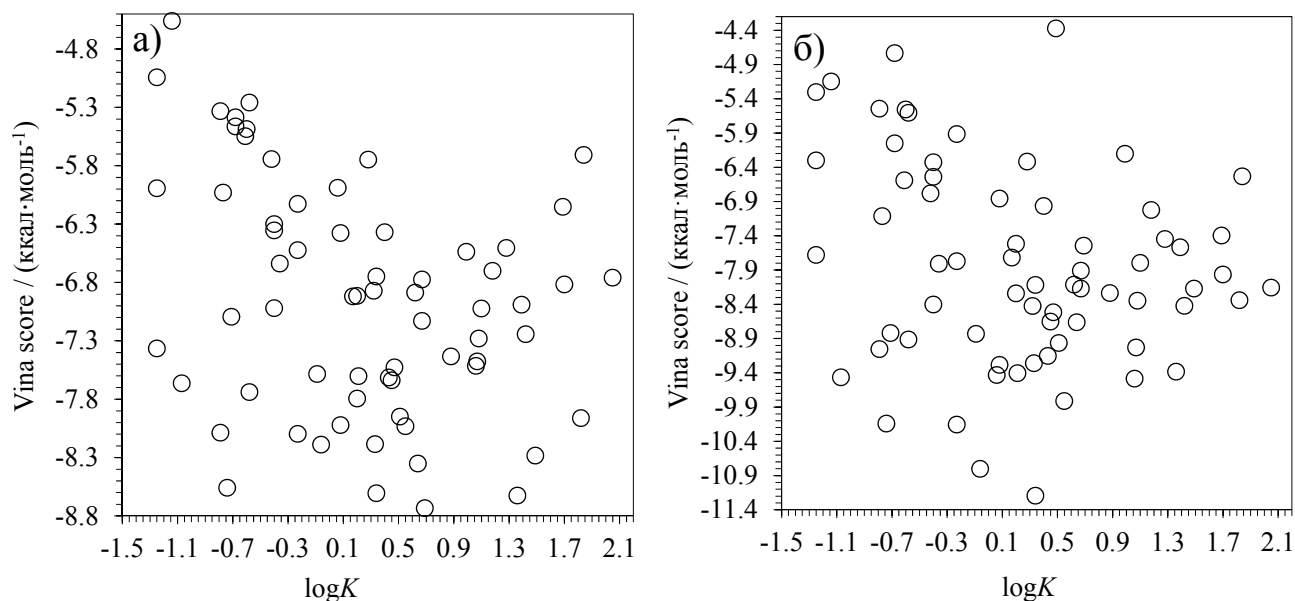


Рисунок 3.41 – Сопоставление значений скоринговой функции для первых по рангу поз различных лекарственных соединений [47] при гибком докинге в Autodock Vina к 4JK4 и 3V03: а) для центра Судлоу I, б) для центра Судлоу II.

На основании литературных данных вещества из выборки были выделены две группы лигандов, для которых предполагается соответственно преимущественное связывание с Судлоу I и с Судлоу II. Для веществ из этих групп в отдельности также не наблюдалось корреляции  $\log K$  с свободной энергией из Glide+MM/GBSA (рисунок 3.42) или оценочной функцией докинга в Autodock Vina (рисунок 3.43)

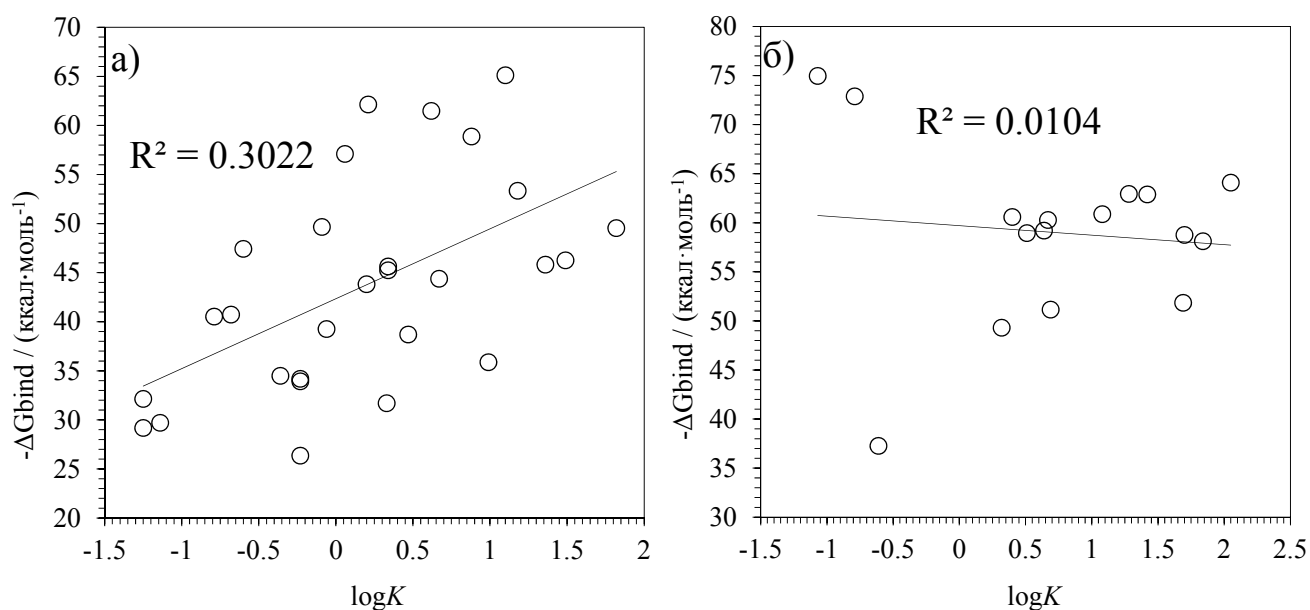


Рисунок 3.42 – Сопоставление экспериментального значения  $\log K$  с энергиями связывания Glide+MM/GBSA для соответствующих центров: а) Судлоу I, б) Судлоу II.

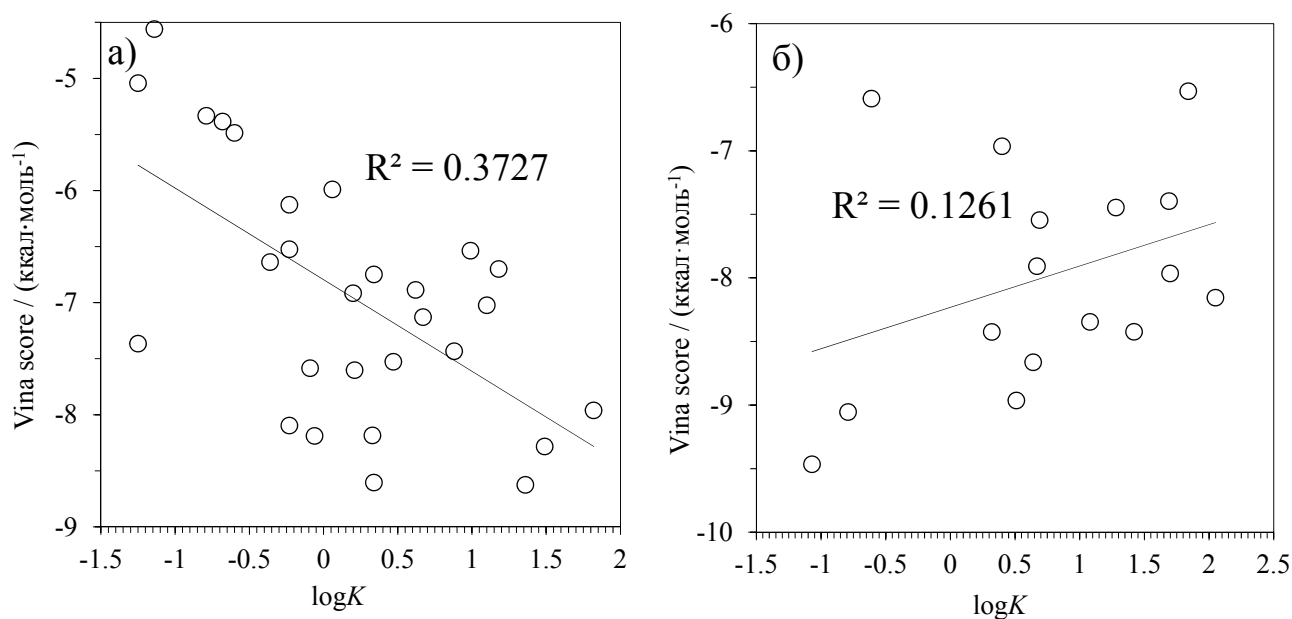


Рисунок 3.43 – Сопоставление экспериментального значения  $\log K$  оценочной функцией докинга в Autodock Vina для соответствующих центров: а) Судлоу I, б) Судлоу II.

Видно, что и для отдельных центров нет корреляции между экспериментальными значениями и результатами докинга.

Проблемы прогнозирования энергий Гиббса связывания характерны не только для альбумина, но и любых других белковых рецепторов и лигандов. При этом можно добиться существенно более высокой точности расчетов, используя более пригодные для этих целей и значительно более ресурсоемкие методы, учитывающие конформационную подвижность молекул и основанные на пертурбации свободной энергии (FEP), зонтичной выборке или метадинамике. Однако у альбумина есть одна важная особенность, которая делает использование любых подходов к прогнозированию аффинности лигандов, основанных на методах молекулярного моделирования, с нашей точки зрения, практически бесперспективным, по меньшей мере на современном этапе их развития. Это наличие множества неспецифичных центров связывания. Так, рассмотренная нами структура 4JK4 содержит, помимо двух молекул в центрах Судлоу, еще две молекулы 3,5-дииодосалициловой кислоты в других центрах связывания. Минор и др. [112] говорят о 10 центрах связывания нестероидных противовоспалительных препаратов альбумином по рентгеноструктурным данным. Следует отметить, что не все центры, способные связывать молекулу в растворе, будут продолжать удерживать их при кристаллизации белка. Поэтому нельзя исключать, что дополнительный вклад в наблюдаемые константы связывания будет вносить взаимодействие со слабоаффинными центрами на поверхности белка. Вычислительные методы, таким образом, должны точно рассчитывать константы связывания со всеми потенциальными центрами, причем для их усреднения по всем центрам даже в серии структурных аналогов придется рассчитывать не относительные, а абсолютные значения констант. Все это накладывается на уже описанные нами выше проблемы обработки экспериментальных данных для определения константы связывания 1:1.

Этого недостатка лишены методы, основанные на корреляционных соотношениях известных энергий связывания с параметрами лигандов, или в общем случае методы машинного обучения на основе имеющихся экспериментальных данных. Для таких методов в целом неважно, каков механизм

взаимодействий лигандов с альбумином, а важен лишь размер и представительность обучающего набора.

### 3.5 Соотношения между структурой и аффинностью к альбумину для широкого круга лигандов

На основе вышеизложенного ясно, что полученные с использованием разных методов и методик константы связывания содержат систематические погрешности, не позволяющие напрямую сравнивать их между собой. Тем не менее, результаты двух методов для одного и того же набора веществ с большой вероятностью имеют высокую степень корреляции. Поэтому целесообразно сначала разработать модель, описывающую наиболее крупный и содержащий структурно разнородные молекулы набор полученных единообразным путем данных, а затем пытаться применять и/или подстраивать эту модель к другим наборам данных.

К настоящему моменту самый большой и одновременно охватывающий множество возможных функциональных групп органических соединений набор данных по связыванию с альбумином (ЧСА) получен методом ВЭЖХ в работе Ульриха и др. [16]. При этом он не был описан с помощью QSAR-модели. Мы попробовали построить такие модели для данного набора как на основе классических множественных линейных регрессий, так и некоторых методов машинного обучения.

Набор изначально содержал значения  $\log K$  для 320 различных соединений. Из него было исключено значение для тетрадецилбензола, которое показывает огромное отклонение от значений для алкилбензолов и тренда зависимости от  $\log P$  и, видимо является экспериментальной ошибкой или артефактом метода. Прежде всего, мы попробовали построить корреляции с теми же дескрипторами, которые были использованы в предыдущих исследованиях связывания с альбумином. При этом набор использовался целиком без деления на тренировочную и тестовую части. Достаточно хорошая корреляция наблюдается

при попытке построить аналог классических уравнений LSER с эмпирическими дескрипторами Абрахама:

$$\log K = 1,669V - 1,796B + 0,149A - 0,386S + 0,636E - 0,734 \quad (3.5.1)$$

$$r^2 = 0,73, \text{СКО} = 0,357, n = 221$$

Однако эти дескрипторы определены лишь для ограниченного круга соединений, в основном с небольшим количеством функциональных групп, поэтому даже из анализируемого набора пришлось отбросить около трети соединений. Попытка же перейти к полностью расчетным аналогам дескрипторов Абрахама приводит к ухудшению корреляции:

$$\log K = 1,418V - 1,653B + 0,025A + 0,074S + 0,329E - 0,727 \quad (3.5.2)$$

$$r^2 = 0,54, \text{СКО} = 0,463, n = 311$$

Затем мы предприняли попытку построить корреляцию с 4 дескрипторами QikProp из пакета Schrodinger, использованными Йоргенсенем и др. [106] для описания набора данных Валько и др. [47]:

$$\log K = 0,242\#acid - 0,001FOSA + 0,264QPlogPo / w - 0,268CIQPlogS - 0,470 \quad (3.5.3)$$

$$r^2 = 0,53, \text{СКО} = 0,467, n = 312$$

Несколько лучшая корреляция наблюдается при замене двух дескрипторов на другие из того же набора QikProp (QPlogPoct – энергия Гиббса сольватации в октанолe и FISA – площадь гидрофильной поверхности молекулы):

$$\log K = 0,006FISA - 0,066QPlogPoct + 0,406QPlogPo / w - 0,260CIQPlogS - 0,704 \quad (3.5.4)$$

$$r^2 = 0,58, \text{СКО} = 0,444, n = 312$$

Тем не менее, качество предсказания остается средним. Мы также попробовали использовать дескрипторы из программы eDragon [162]. После отсева дескрипторов с низкой вариативностью и взаимокоррелированных дескрипторов осталось 675 дескрипторов. При отборе 4–6 дескрипторов с помощью генетического алгоритма с разбиением на тренировочный и тестовый наборы и кросс-валидацией удавалось достичь значений  $r^2$  на тестовом наборе,

включающем 30% исходных данных, не выше 0,6. При этом в число отобранных всегда входил дескриптор AlogP. Корреляции с большим числом дескрипторов не давали лучшего коэффициента корреляции на тестовом наборе.

Сходные результаты дало использование набора дескрипторов PaDEL, в котором после отсева осталось 570 дескрипторов. В этом случае значения  $r^2$  на тестовом наборе также не превышали 0,6, а оптимальное число дескрипторов составляло 5–7 (в число которых всегда входил CrippenlogP). Добавление к этому набору пула дескрипторов QikProp не привело к существенному изменению ситуации. Преимуществом дескрипторов PaDEL является возможность расчета с помощью находящейся в свободном доступе программы [161]. Нами была выбрана модель с 5 дескрипторами, которая на полном наборе данных дала следующее уравнение регрессии:

$$\begin{aligned} \log K = & 0,00779AATS2v + 0,115QGATS7m + 0,179CrippenLogP - 0,0484SaaCH + \\ & + 0,283XLogP - 2,137 \quad (3.5.5) \\ r^2 = & 0,61, \text{CKO} = 0,428, n = 308 \end{aligned}$$

Проведенный анализ позволяет заключить, что от линейных регрессий с расчетными дескрипторами сложно ожидать существенно большей точности описания данного набора. Это может быть связано с более сложными видами зависимости константы связывания с альбумином от индивидуальных параметров веществ. Мы проверили возможность описания таких зависимостей с помощью различных методов машинного обучения. Попытка использования регрессий на основе алгоритмов случайного леса и опорных векторов не привела к значительно более точному описанию набора. При использовании метода случайного леса с числом деревьев 50–100 и числе дескрипторов 5–7 достигается значение  $r^2$  в диапазоне 0,5–0,6 на тестовом наборе, а дальнейшее увеличение числа дескрипторов не приводит к увеличению точности корреляции. Регрессии на опорных векторах приводили к еще меньшей точности предсказания.

Очень плохие результаты дала попытка использования различных типов молекулярных фингерпринтов в методах случайного леса и градиентного



бустинга деревьев решений, значения  $r^2$  на тестовом наборе при этом не превосходили 0,4.

Наконец, использование нейронных сетей также не дало возможности построить более точные модели, чем остальные методы. При построении нейросетевых моделей в качестве входных данных использовались 4 различных способа представления молекул:

- 1) молекулярные фингерпринты Моргана радиуса 2 длиной 2048;
- 2) вектора из масштабированных дескрипторов PaDEL или QikProp со значением каждого дескриптора от 0 до 1;
- 3) тензорные представления SMILES как предложений, полученные их посимвольным разбиением на токены и преобразованием в матрицу методом one-hot encoding.
- 4) "Трансформерная кодировка" молекул [180].

С помощью пакета TensorFlow была построена нейронная сеть из двух скрытых плотных слоев со 128 нейронами с активационной функцией ReLU и исключением 10% нейронов для предотвращения переобучения. Тренировочный и тестовый набор составляли 70 и 30% исходных данных соответственно. Это приводило к значениям  $r^2$  на тестовом наборе не выше 0,5–0,6 при использовании векторов дескрипторов и гораздо более низким с другими способами представления.

Таким образом, все методы машинного обучения извлекают из входных данных о молекулах примерно одинаковое количество информации и, вероятно, опираются на одни и те же скрытые закономерности изменения константы связывания с альбумином в зависимости от структурных характеристик молекулы, из которых наиболее очевидна корреляция с  $\log P$ . Поскольку линейные корреляции с дескрипторами являются наиболее простыми, наглядными и легко воспроизводимыми другими исследователями, мы выбрали для дальнейшего

использования уравнения 3.5.4 и 3.5.5. Эти уравнения затем были применены для предсказания значений констант связывания с альбумином различных соединений и сравнения результатов с другими наборами данных. Так как во всех случаях при получении этих данных отличались экспериментальные условия и во многих случаях – тип приводимых физических величин, то мы всегда искали хорошие линейные корреляции, а не точное совпадение расчетных и экспериментальных значений.

На рисунке 3.44 приведены корреляции рассчитанных с помощью уравнений 3.5.4 и 3.5.5 и экспериментальных значений  $\log K$  для набора экспериментальных значений Валько и др [47] ( $N=120$ ). Их качество соответствует качеству описания этими уравнениями данных Ульриха и др.

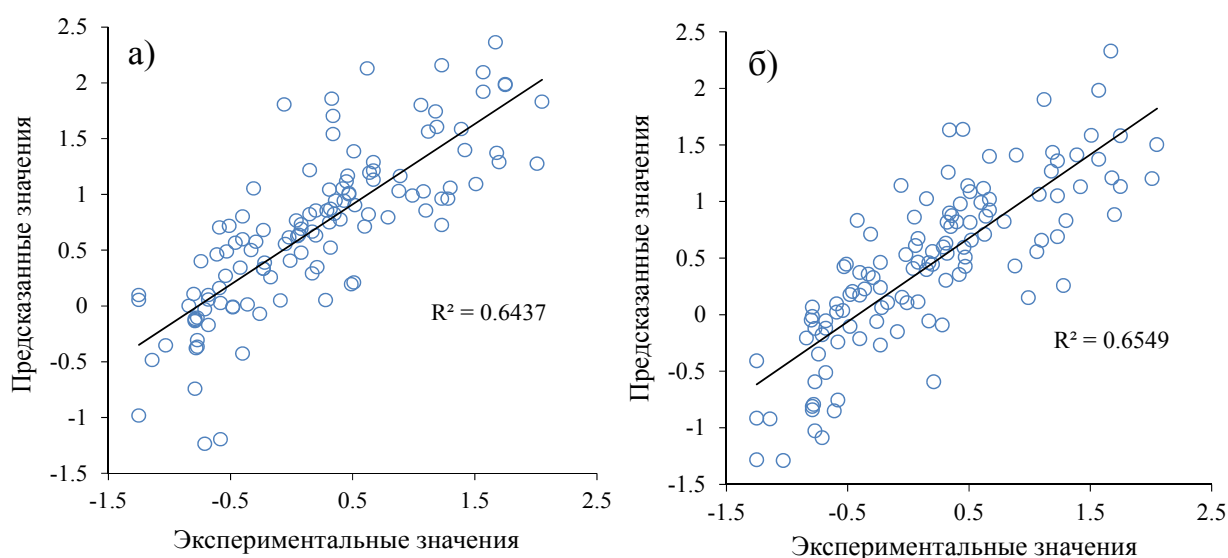


Рисунок 3.44 – Корреляция рассчитанных с помощью уравнений а) 3.5.4 и б) 3.5.5 и экспериментальных значений  $\log K$  из работы Валько и др. [47].

С набором бензойных кислот, константы связывания для которых были получены в этой работе, использование уравнения 3.5.4 приводит к лучшей корреляции ( $r^2 = 0,497$ ), чем уравнения 3.5.5 (рисунок 3.45). Следует учитывать, что разброс значений констант связывания бензойных кислот составляет всего 1 порядок, или 1 единицу в шкале  $\log K$ , в то время как у набора Валько – 4 единицы  $\log K$ .

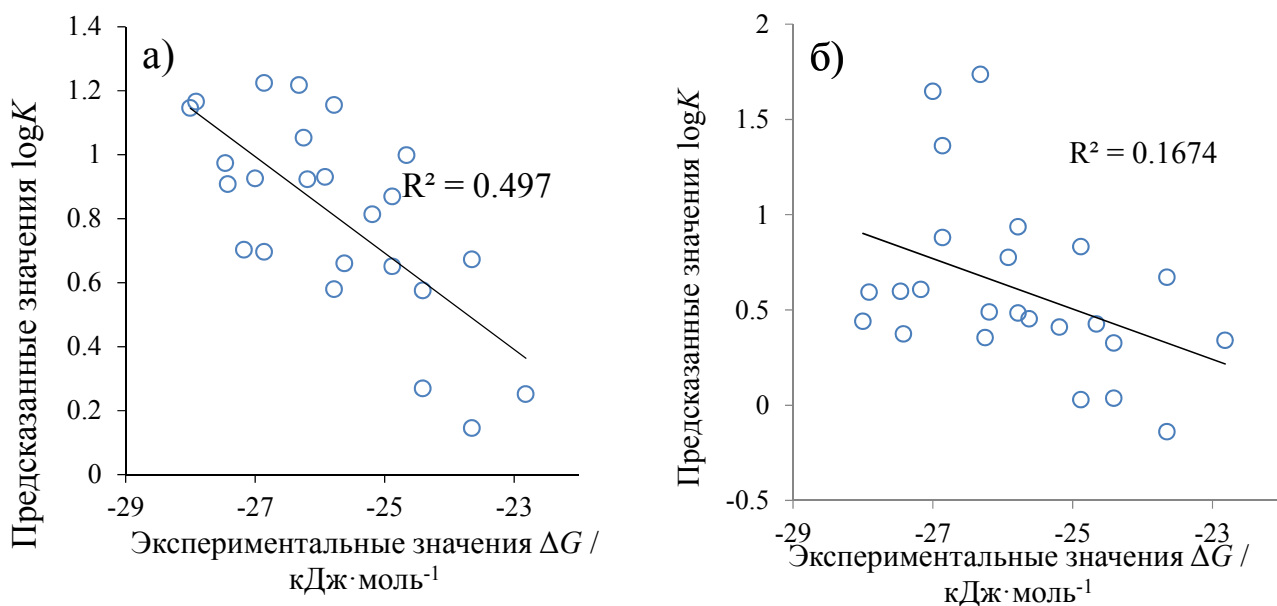


Рисунок 3.45 – Корреляция рассчитанных с помощью уравнений а) 3.5.4 и б) 3.5.5 значений  $\log K$  и экспериментальных значений энергии Гиббса связывания анионов замещенных бензойных кислот с альбумином в кДж/моль, полученных методом спектрофлуориметрии при 298 К в этой работе.

Также расчетные значения  $\log K$  были сопоставлены с большими наборами экспериментальных данных по связыванию с плазмой крови из работ Ингла и др. [181] (рисунок 3.46) и Томы и др. [182] (рисунок 3.47). Наблюдались выраженные корреляции, хотя и с низкими значениями  $r^2$ , в том числе из-за наличия ряда сильно выпадающих значений.

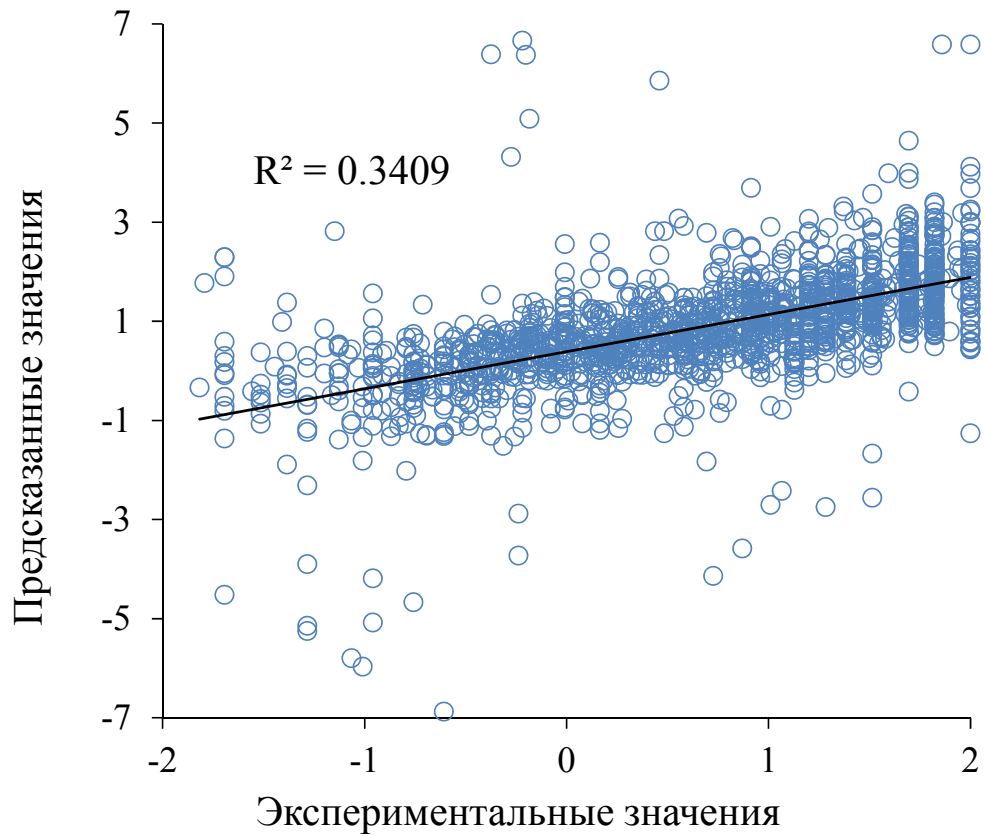


Рисунок 3.46 – Корреляция рассчитанных с помощью уравнения 3.5.5 значений  $\log K$  и экспериментальных значений  $\log K$  для связывания с плазмой крови человека из работы Ингла и др. [181] ( $N = 1594$ ).

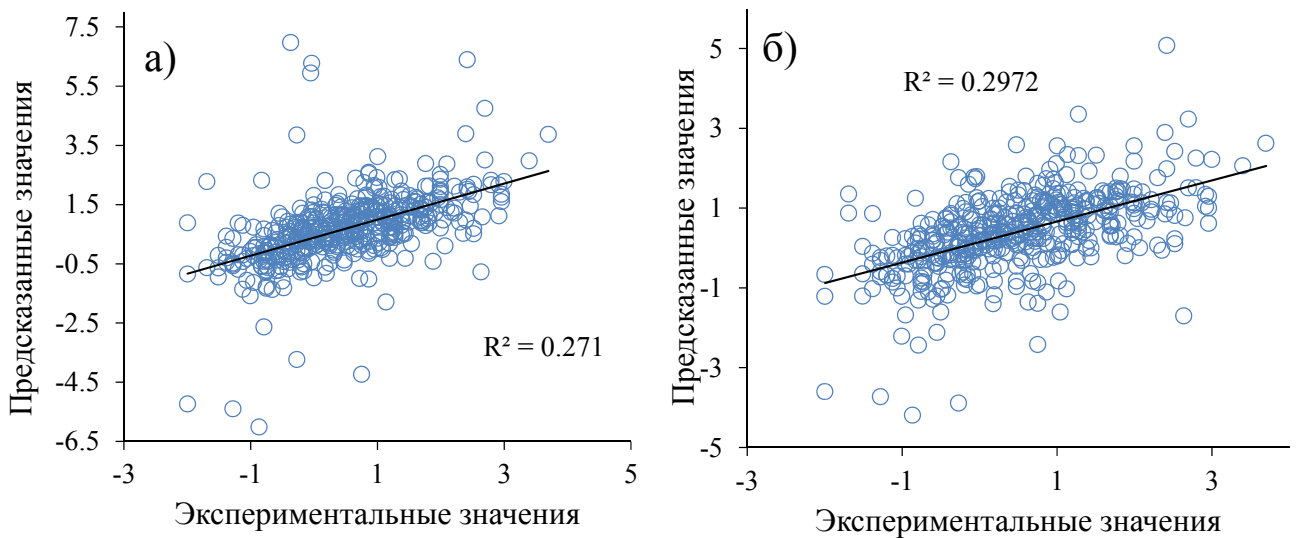


Рисунок 3.47 – Корреляция рассчитанных с помощью уравнений а) 3.5.4 и б) 3.5.5 значений  $\log K$  и экспериментальных значений  $\log K$  для связывания с плазмой крови человека из работы Тома и др. [182] ( $N = 464$ ).

### 3.6 Фибриллообразование альбумина в присутствии лигандов с разной аффинностью

Амилоидные фибриллы – агрегаты белков, которые представляют собой сшитые антипараллельно между собой  $\beta$ -листы. Процесс фибриллообразования включает в себя такие стадии, как нуклеация, рост фибрилл, фрагментация, деполимеризация. Кинетические кривые фибриллообразования чаще всего имеют иметь сигмоидный вид с периодом индукции, связанным с медленным процессом нуклеации [4]. В некоторых случаях и, в частности, для альбуминов периода индукции не наблюдается.

Альбумин при нейтральных или кислых значениях рН и повышенной температуре может быстро образовывать фибриллы. Ранее было показано, что некоторые молекулы, которые связываются с альбумином [183–187], могут подавлять процесс фибриллообразования, однако до сих пор не было объяснено, почему одни вещества подавляли рост фибрилл сильнее, а другие слабее.

Для изучения этого процесса нами были получены кинетические кривые фибриллообразования БСА в присутствии красителя тиофлавина Т (ThT), который селективно связывается с фибриллами, методом спектрофлуориметрии. Были построены графики зависимости интенсивности эмиссии флуоресценции на длине волны 485 нм от времени инкубации альбумина, которые отражают кинетику фибриллообразования. Получен ряд кривых для различных концентраций альбумина (рисунок 3.48).

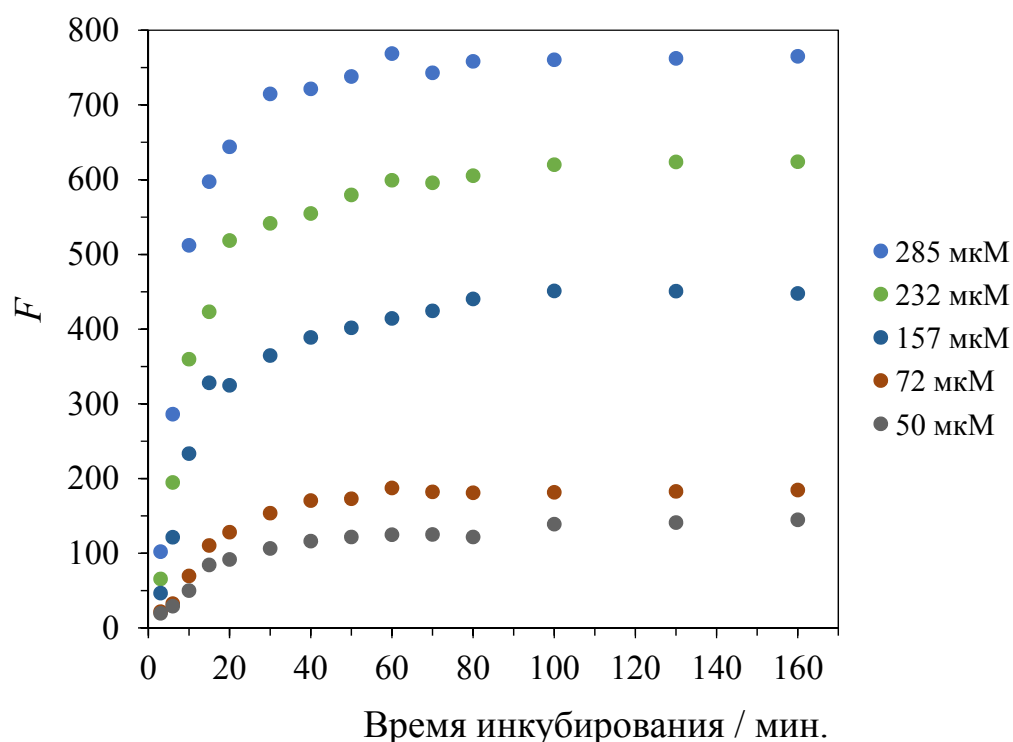


Рисунок 3.48 – Кинетические кривые фибриллообразования БСА при различных концентрациях.

Видно, что во всех случаях рост фибрилл начинается сразу и даже для самого разбавленного раствора не наблюдается заметного периода индукции, что говорит о том, что некоторое количество зародышей уже присутствуют в растворе. При этом начальная скорость роста фибрилл пропорциональна концентрации белка, а значит, эту стадию можно описать кинетикой первого порядка по альбумину (рисунок 3.49):

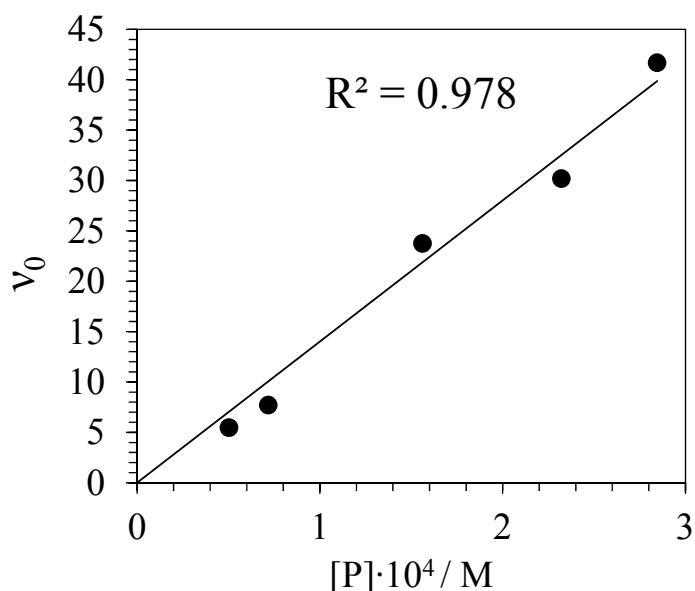


Рисунок 3.49 – График зависимости начальной скорости фибриллообразования от концентрации белка.

Затем были получены кинетические кривые для образования фибрилл альбумина в присутствии изучаемых лигандов (рисунок 3.50). Увеличение интенсивности сигнала красителя доказывает образование фибрилл во всех изучаемых образцах. Рост сигнала флуоресценции начинается также без заметного периода индукции. При этом скорость и выход фибриллообразования значительно снижаются только в случае ибупрофена, напроксена и варфарина – веществ, для которых ранее нами была показана высокая аффинность к альбумину. Степень подавления фибриллообразования зависит от концентрации высокоаффинных веществ. Ранитидин и изониазид, обладающие низкими константами связывания, мало влияют на исследуемый процесс.

Обсуждаемые системы также были изучены методами УФ-спектрофотометрии и спектроскопии кругового дихроизма. Стандартной методикой для обнаружения амилоидов в образцах методом спектрофотометрии является использование красителя конго красного, который при взаимодействии с фибриллами увеличивает интенсивность поглощения и сдвигает максимум поглощения от 490 нм к 512 нм. Как можно видеть на рисунке 3.51, спектры конго красного в смеси с инкубированным белком действительно отличаются от

спектров чистого красителя, что доказывает образование амилоидных фибрилл. В присутствии же напроксена, ибупрофена и варфарина спектры приближены к чистому красителю, что показывает подавление роста.

На спектрах кругового дихроизма (рисунок 3.52) наблюдается типичный для  $\beta$ -листов пик, при этом сигнал в области  $\alpha$ -спиралей уменьшается, что говорит об изменениях во вторичной структуре. В присутствии же напроксена, ибупрофена и варфарина видно, что происходит стабилизация спиралей и предотвращается их переход в  $\beta$ -слои, которые характерны для амилоидов.

Как можно заметить, фибриллообразование активно подавляется только в случае ибупрофена, напроксена и варфарина – веществ, для которых ранее нами было показана высокая аффинность к альбумину. Ранитидин и изониазид же имеют очень низкие константы связывания. Кроме того, сила подавления зависит от концентрации высокоаффинных веществ.



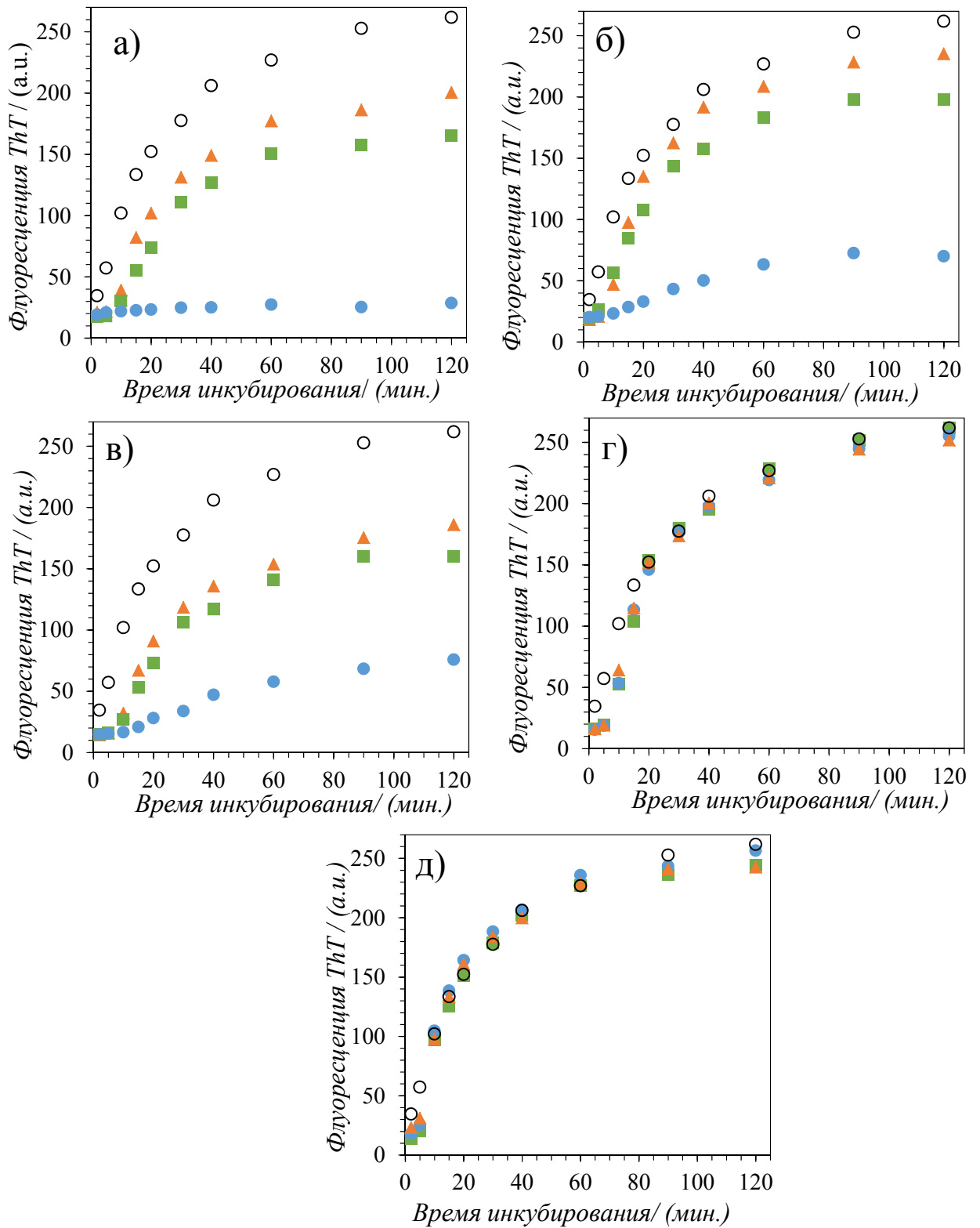


Рисунок 3.50 – Кинетические кривые инкубирования альбумина в присутствии изучаемых веществ: а) ибупрофена, б) варфарина, в) напроксена, г) изониазида, д) ранитидина. Черные круги – чистый БСА, оранжевые треугольники – 1:1, зеленые квадраты – 2:1, синие круги – 10:1.

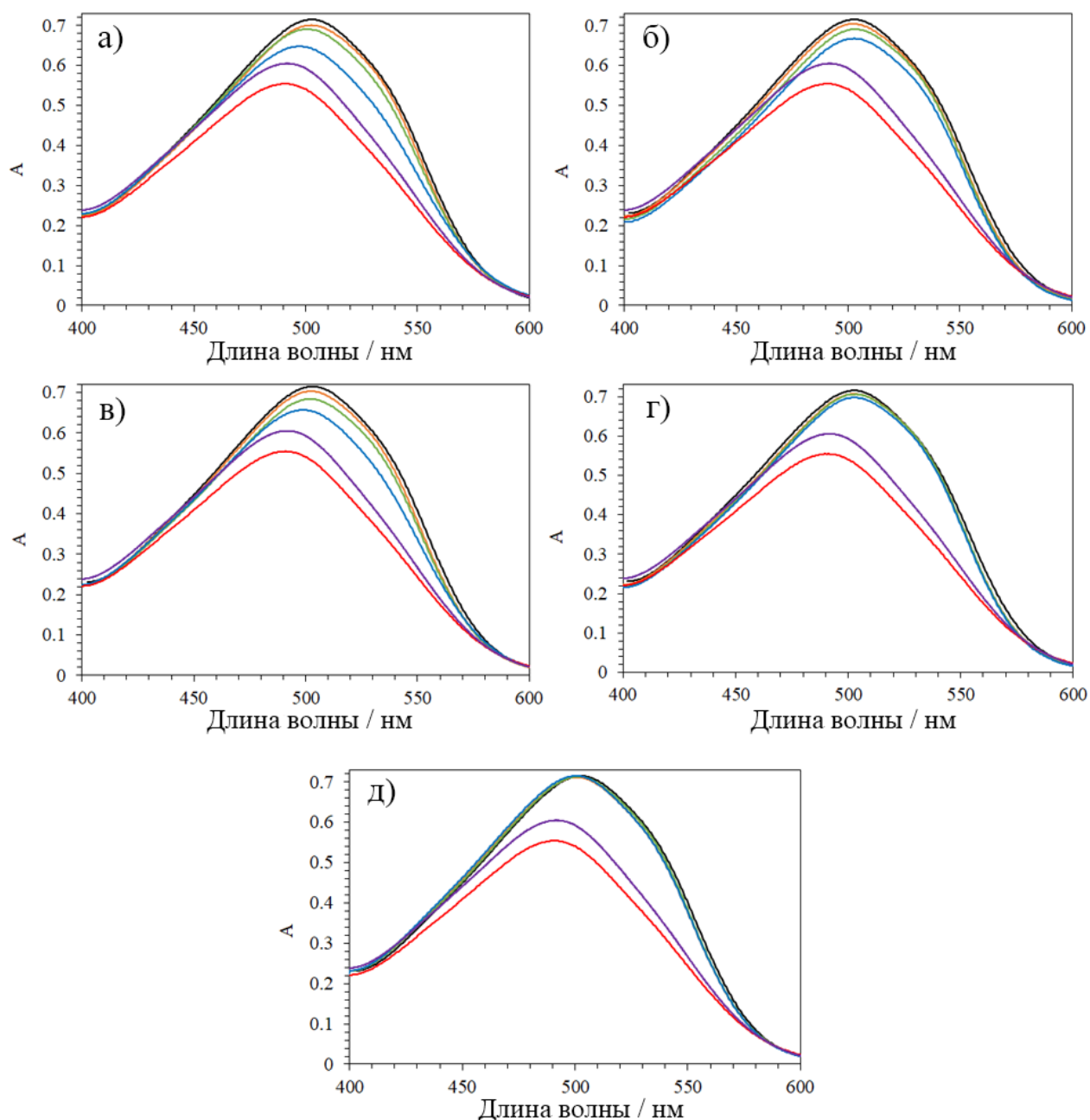


Рисунок 3.51 – Спектры поглощения конго красного: красный – чистый конго красный, фиолетовый – конго красный с нативным БСА, черный – конго красный с инкубированным БСА, оранжевый – конго красный с инкубированным БСА в присутствии лиганда в соотношении 1:1, зеленый – конго красный с инкубированным БСА в присутствии лиганда в соотношении 2:1, синий – конго красный с инкубированным БСА в присутствии лиганда в соотношении 10:1; а) ибупрофен, б) варфарин, в) напроксен, г) изониазид, д) ранитидин.

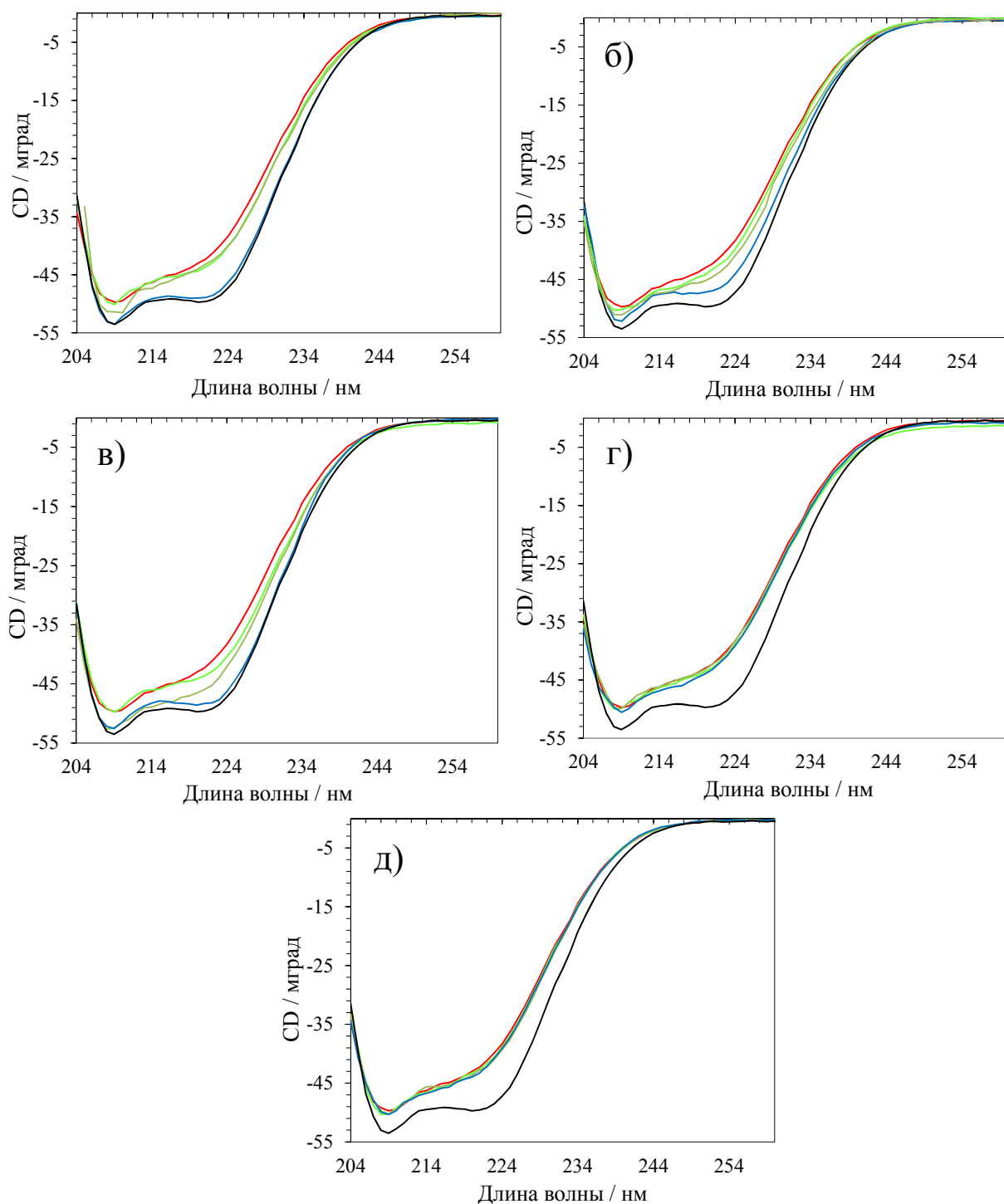


Рисунок 3.52 – Спектры КД для инкубированного альбумина и его смеси с лигандами: красный – чистый инкубированный альбумин, черный – чистый нативный БСА, зеленый – инкубированный БСА в присутствии лиганда в соотношении 1:1, серый – инкубированный БСА в присутствии лиганда в соотношении 2:1, синий – инкубированный БСА в присутствии лиганда в соотношении 10:1; а) ибупрофен, б) варфарин, в) напроксен, г) изониазид, д) ранитидин.

Как правило, белки с упорядоченной структурой, к которым относятся и альбумин, образуют фибриллы в денатурирующих условиях, что указывает на то, что в этом процессе участвует частично или полностью развернутая форма белкового мономера.

Эта форма (U) находится в термодинамическом равновесии с нативным мономерным белком (N). В общем случае можно сказать, что в денатурирующих условиях существует несколько равновесных форм белка и только одна из них участвует в формировании фибрилл. Обозначим долю этой формы через  $\alpha$ . Для

простейшего случая  $\alpha = \frac{[U]}{[U]+[N]}$  (3.6.1). Значение  $\alpha$  может быть определено из

кривых денатурации для некоторой данной температуры  $T$ . Для получения ее значения требуется найти общую площадь пика денатурации, а также проинтегрировать пик до температуры  $T$ . Доля денатурированной формы будет

определяться отношением площадей:  $\alpha = \frac{[U]}{[U]+[N]} = \frac{\Delta H_T}{\Delta H_{общая}}$  (3.6.2).

Из кривых денатурации чистого БСА и в присутствии лекарств были рассчитаны доли денатурированных форм при температуре 65°C (таблица 3.4)

Таблица 3.4 – Данные термограмм денатурации БСА.

Лиганд	[L]/[P]	$\Delta H_{\text{общая}},$ кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta H_{65},$ кДж·моль <sup>-1</sup>	T, °C	$\alpha_{65}$
Чистый БСА	-	620	455	62,05	0,73
Варфарин	1	638	345	64,18	0,54
	2	714	321	65,68	0,45
	10	878	142	69,35	0,16
Ибупрофен	1	729	367	65,2	0,50
	2	740	277	67,1	0,37
	10	961	15	76,74	0,02
Напроксен	1	758	255	67,5	0,34
	2	798	203	68,58	0,25
	10	935	43	72,98	0,05
Ранитидин	1	587	407	62,24	0,69
	2	676	496	61,85	0,73
	10	688	486	62,18	0,71
Изониазид	1	620	448	62,05	0,72
	2	621	439	61,98	0,71
	10	624	441	62,07	0,71

Как видно из таблицы 3.4, в случае высокоаффинных веществ температура денатурации белка растет (что было показано и на термограммах), соответственно доля денатурированной формы убывает с ростом концентрации вещества. В присутствии изониазид и ранитидина не наблюдается значимой разницы в доле денатурированной формы. Эти наблюдения соотносятся с полученным результатом: ибупрофен, напроксен, варфарин подавляют фибриллообразование альбумина, так как снижают содержание денатурированной формы при инкубации белка. Наблюдается корреляция ( $r^2=0,915$ ) начальной скорости фибриллообразования  $v_0$  при 65 °C доли денатурированной формы альбумина  $\alpha$  при 65°C в присутствии различных концентраций различных лигандов (рисунок 3.53).

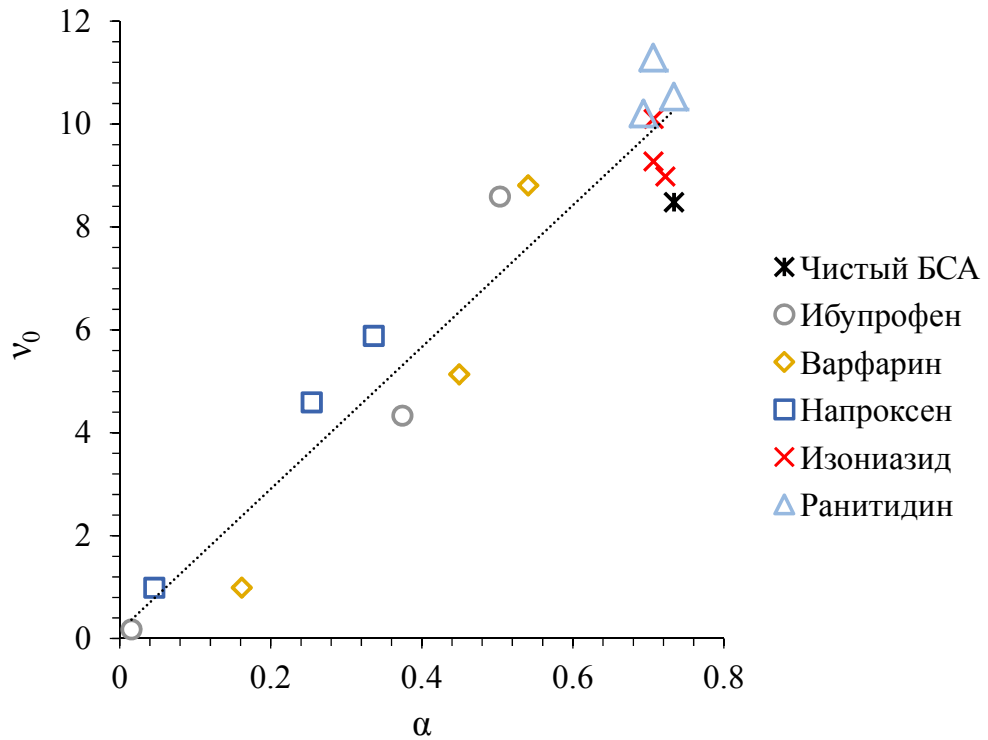


Рисунок 3.53 – Зависимость начальной скорости от доли денатурированной формы при 65°C.

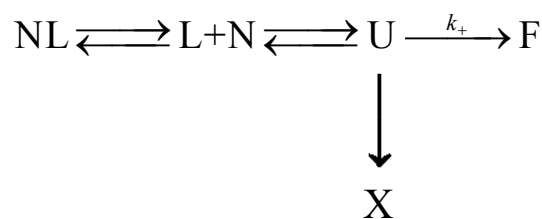
Из вышеприведенных данных можно сделать вывод, что фибриллы образуются из развернутой (U) формы альбумина (или какой-то особой, частично развернутой формы, находящейся с ним в равновесии). Развернутая форма находится в равновесии с нативной формой (N). Связывание нативной формы с лигандами (L) уменьшает долю денатурированной формы, которую теперь можно

записать как  $\alpha = \frac{[U]}{[U] + [N] + [NL]}$  (3.6.3). Развернутая форма может участвовать в

процессе роста фибрилл F (с константой скорости  $k_+$ ) и становиться их частью.

Одновременно могут образовываться и другие типы агрегатов и ассоциатов (X).

Это можно проиллюстрировать диаграммой:



Начальная скорость фибриллообразования при  $t = 0$  определяется выражением:

$$v_0 = 2k_+[Nuc][U]=k[U]=k\alpha[P] \quad (3.6.4)$$

где  $[Nuc]$  — концентрация зародышей фибрилл,  $k_+$  — константа скорости роста фибрилл,  $k = 2k_+[Nuc]$  — эффективная константа скорости фибриллообразования и общая концентрация белка  $[P]=[U]+[N]+[NL]+[F]+[X]$  ( $[F] = [X] = 0$  при  $t = 0$ , таким образом,  $[U] = \alpha [P]$ ).

Через определенное время (около 120 минут) достигается равновесное превращение альбумина в фибриллы, которые можно рассматривать как отдельную фазу и записать условие равновесия  $[U] = K_F$ . Обратный процесс диссоциации фибрилл протекает крайне медленно [192, 193]. Таким образом, фибриллы могут сосуществовать с другими типами медленно диссоциирующих агрегатов (обозначаемых  $X$ ), а соотношение концентраций разных типов агрегатов будет определяться соотношением скоростей их первоначального образования. Предположим, что в нашем случае  $\frac{[X]}{[F]} = K_X$  — постоянная для всех

экспериментов. Отсюда мы получаем:

$$[P]=[U]+[N]+[NL]+[F]+[X]=\frac{[U]}{\alpha}+[F]+[X]=\frac{K_F}{\alpha}+[F](1+K_X) \quad (3.6.5)$$

$$[F]=\frac{[P]-\frac{K_F}{\alpha}}{1+K_X}=\frac{\alpha[P]-K_F}{\alpha(1+K_X)} \quad (3.6.6)$$

Это означает, что равновесная концентрация фибрилл  $[F]$  и пропорциональная ей интенсивность флуоресценции ThT должна гиперболически расти с увеличением  $\alpha$ . На рисунке 3.54 показана интенсивность флуоресценции ThT  $F_\infty$  комплекса ThT с БСА после 160 мин. инкубации при 65°C в присутствии различных лигандов или в их отсутствии. На графике показана корреляция между этими двумя величинами, что свидетельствует в поддержку предложенной модели.

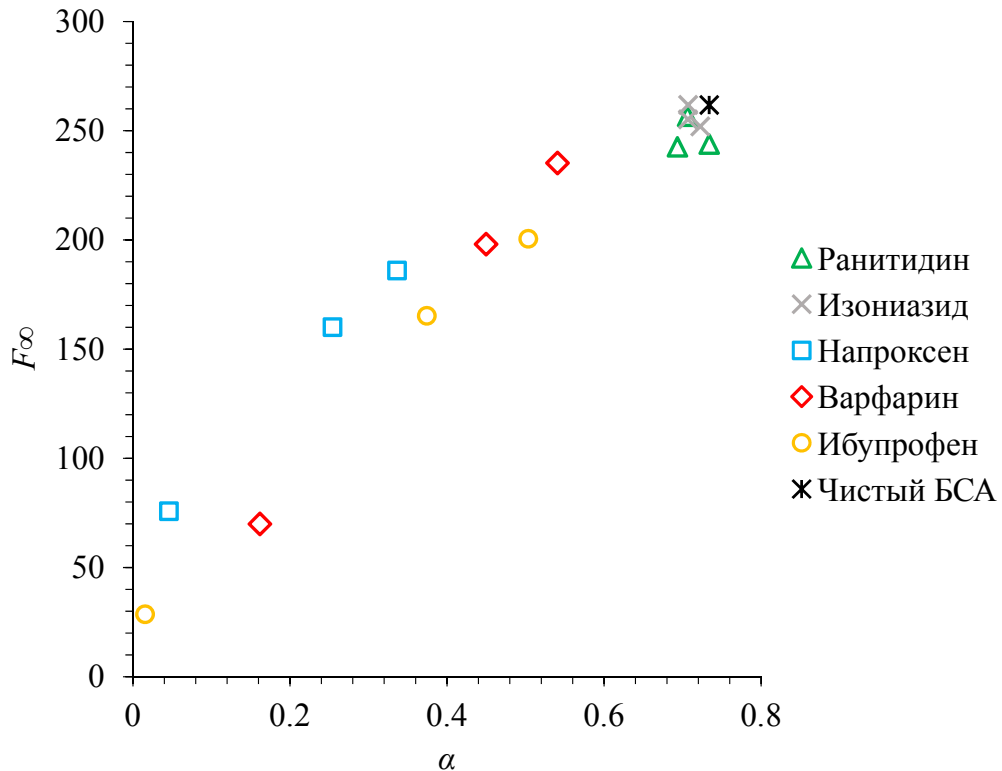


Рисунок 3.54 – График зависимости конечной флуоресценции от доли денатурированной формы в экспериментах при 65°C.

Доля развернутой формы белка увеличивается с повышением температуры. БСА находится в полностью денатурированной форме при 85°C даже в присутствии 10-кратного избытка лигандов. Интересно сравнить равновесное превращение альбумина в фибриллы при различных температурах (70, 75 и 85 °C) после 120 минут инкубации с избытком 10:1 ибупрофена, варфарина и напроксена. Результирующие концентрации фибрилл, измеренные по интенсивности флуоресценции ThT  $F_{\infty}$ , представлены на рисунке 3.55 в зависимости от доли денатурированного белка при соответствующих температурах, определенных по данным ДСК. (Конечные интенсивности флуоресценции  $F_{\infty}$  в опытах при 85 °C были очень близки независимо от присутствия лигандов,  $\alpha \approx 1$ .) Несмотря на то, что константы  $K_F$  и  $K_X$  могут зависеть от температуры, можно увидеть общую зависимость между



концентрацией фибрилл, измеренной по интенсивности флуоресценции ThT, и значением  $\alpha$ .

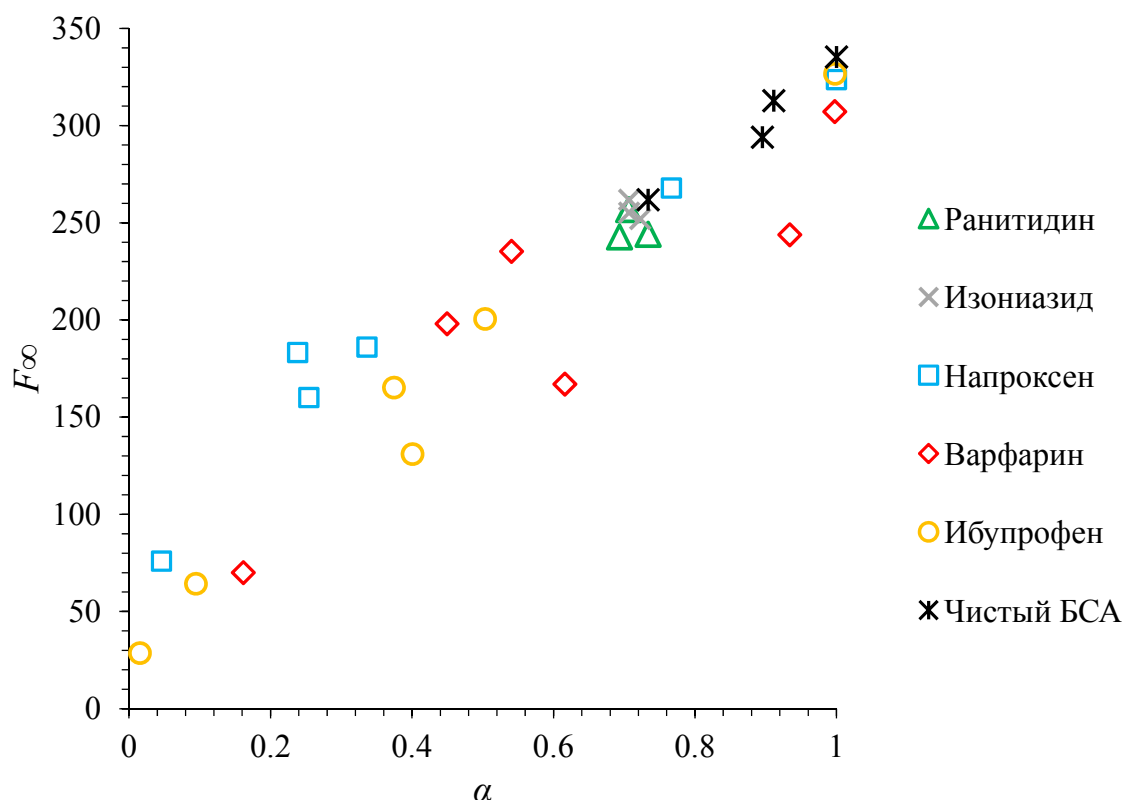


Рисунок 3.55 – Зависимость интенсивности флуоресценции ThT  $F_{\infty}$  в присутствии БСА, инкубированного в течение 120 минут при различных температурах от 65 до 85°C в присутствии или отсутствии лигандов, от доли развернутого белка  $\alpha$  при соответствующей температуре и концентрации лигандов, определенной из ДСК-кривых.

Аналогичные эксперименты были проведены для ЧСА. Результаты получились схожими с БСА. На рисунке 3.56 на график зависимости конечной флуоресценции от доли денатурированной формы БСА (красные квадраты) помещены точки для ЧСА с лигандами и в их отсутствии:

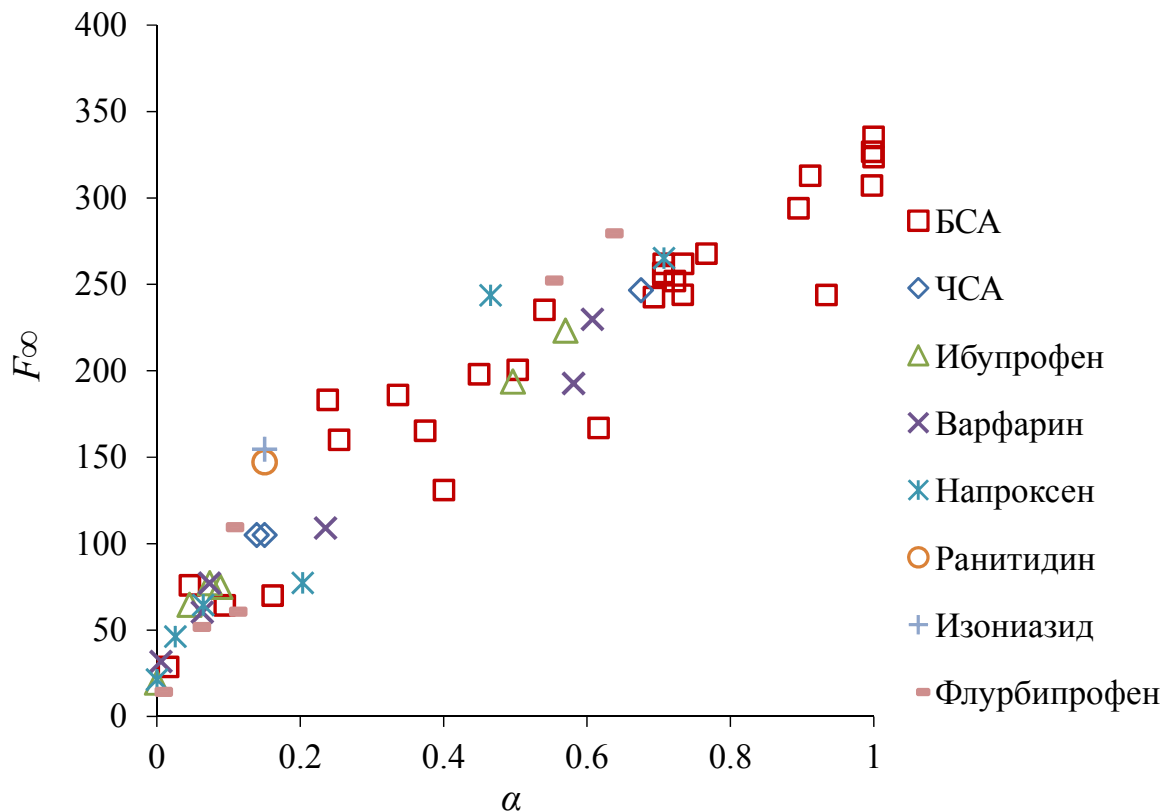


Рисунок 3.56 – Зависимость интенсивности флуоресценции ThT  $F_{\infty}$  в присутствии БСА (в присутствии или отсутствии лигандов, красные квадраты) и ЧСА (без лигандов – синие ромбы, в присутствии лигандов – см. легенду), инкубированного при различных температурах, от доли развернутого белка  $\alpha$  при соответствующей температуре и концентрации лигандов, определенной из экспериментов ДСК.

Исследуемые лиганды, по-видимому, не оказывают заметного влияния на скорости роста или зародышеобразования фибрилл, однако некоторые из них могут подавлять образование амилоидных фибрилл в определенном диапазоне температур. Это достигается за счет связывания лигандов с нативной формой БСА и уменьшением количества всех остальных форм белка, находящихся с ней в равновесии, в том числе и фибрилл. Таким образом, эти лиганды можно назвать термодинамическими ингибиторами фибриллообразования [194].

При соотношении белок-лиганд 1:1 ингибирующая активность снижается в ряду  $\text{напроксен} > \text{ибупрофен} > \text{варфарин}$ , что соответствует порядку уменьшения

первой константы связывания лиганд-БСА. Однако большой избыток ибупрофена приводит к большей термостабилизации нативного БСА, чем такое же количество варфарина и напроксена, вероятно, из-за связывания ибупрофена с несколькими сайтами связывания [7]. Слабое связывание ранитидина и изониазида не позволяет им подавлять образование фибрилл.

Таким образом, снижение выхода фибрилл может быть достигнуто за счет более сильного связывания лиганда с белком, большего числа молекул лиганда, способных связываться с различными участками в молекуле белка, и более высокой концентрации лиганда. В присутствии молярного избытка лигандов 10:1 концентрация фибрилл БСА, образующихся после инкубации, снижалась на 71–89 % в случае ибупрофена (константа связывания  $K_a = 8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), варфарина ( $K_a = 1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) и напроксена ( $K_a = 1,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), но оставалась той же в случае изониазида ( $K_a = 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) и ранитидина ( $K_a = 1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).

Стабилизация нативной структуры белка за счет прочного связывания лиганда является общим способом снижения скорости образования и выхода фибрилл любого структурированного белка. Если лиганд не может связываться с фибриллами или другими белковыми агрегатами, то только доля связанной с лигандом нативной формы белка будет определять его влияние на фибриллообразование [5]. Кроме того, наши результаты показывают, что термограммы белка, получаемые с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии, могут быть использованы для выбора оптимальных условий получения амилоидных фибрилл и изучения механизма фибриллообразования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены термограммы денатурации бычьего сывороточного альбумина в присутствии ряда органических лигандов с различной аффинностью, изучены зависимости температуры и энтальпии денатурации от концентрации лигандов. На основании этих данных и созданной нами программы для моделирования термограмм разработан новый метод определения констант связывания белков с лигандами с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии.
2. С помощью метода спектрофлуориметрии определены величины констант связывания бычьего сывороточного альбумина с анионами различных замещенных бензойных кислот. Получены корреляции этих величин с константами Гаммета заместителей и расчетными дескрипторами, на основании которых показано, что различия в аффинности этих анионов определяются преимущественно электростатическими взаимодействиями с аминокислотными остатками.
3. Показана невозможность использования данных, полученных с помощью молекулярного докинга, для предсказания констант связывания с альбумином.
4. Создана база данных, содержащая 1755 значений констант связывания для 324 низкомолекулярных органических лигандов с сывороточными альбуминами млекопитающих в растворе с указанием условий их определения. Продемонстрирована сильная зависимость этих величин от метода и условий эксперимента.
5. Разработаны новые соотношения типа структура-свойство для констант связывания разнообразных по структуре низкомолекулярных органических соединений с альбумином на основе линейных корреляций с дескрипторами лигандов из наборов PaDEL и DRAGON.
6. Получены кинетические кривые фибриллообразования альбумина в присутствии лигандов с различными константами связывания и концентрацией.

Продемонстрированы зависимости начальной скорости и выхода фибриллообразования от равновесной доли денатурированной формы белка, определяющейся величинами констант связывания с альбумином.

7. Впервые показано, что ингибирование роста фибрилл альбумина происходит только за счет связывания нативной формы белка с лигандами, которое приводит к смещению равновесия между нативной и денатурированной формами.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты, а именно новые методики определения констант связывания, могут быть использованы для изучения различных белков с широким спектром лигандов. Новые корреляционные соотношения структура-свойство могут быть применены для разработки новых лекарств с заданной аффинностью к альбумину, прогнозирования доли связанного лиганда в плазме крови. Результаты, полученные в ходе изучения фибриллообразования альбумина, могут быть использованы при исследовании механизмов агрегации других глобулярных белков, а также антиамилоидной активности различных молекул.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhong, H.A. ADMET Properties: Overview and Current Topics / H.A. Zhong // Drug Design: Principles and Applications / ed. A. Grover. – Singapore: Springer Singapore, 2017. – ADMET Properties. – P. 113-133.
2. Busher, J.T. Serum Albumin and Globulin / J.T. Busher // Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations / ред. H.K. Walker, W.D. Hall, J.W. Hurst. – Boston: Butterworths, 1990.
3. Scheife, R.T. Protein Binding: What Does it Mean? / R.T. Scheife // DICP. – 1989. – V. 23. – № 7-8. – P. S27-S31.
4. Sedov, I. Molecular Mechanisms of Inhibition of Protein Amyloid Fibril Formation: Evidence and Perspectives Based on Kinetic Models / I. Sedov, D. Khaibrakhmanova // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – № 21. – P. 13428.
5. Khaibrakhmanova, D. Effect of ligands with different affinity on albumin fibril formation / D. Khaibrakhmanova, A. Nikiforova, Z. Li, I. Sedov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – V. 204. – P. 709-717.
6. Khaibrakhmanova, D. Binding constants of drug-albumin complexes from DSC measurements / D. Khaibrakhmanova, A. Nikiforova, I. Sedov // Thermochemica Acta. – 2021. – V. 699. – P. 178930.
7. Sedov, I. Evaluation of the binding properties of drugs to albumin from DSC thermograms / I. Sedov, A. Nikiforova, D. Khaibrakhmanova // International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – V. 583. – P. 119362.
8. Khaibrakhmanova, D. Binding Constants of Substituted Benzoic Acids with Bovine Serum Albumin / D. Khaibrakhmanova, A. Nikiforova, I. Sedov // Pharmaceutics. – 2020. – V. 13. – № 2. – P. 30.
9. Paris, G. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: Evidence from protein simulated unfolding / G. Paris, S. Kraszewski, C. Ramseyer, M. Enescu // Biopolymers. – 2012. – V. 97. – № 11. – P. 889-898.
10. Chubarov, A. Reversible Dimerization of Human Serum Albumin / A. Chubarov, A. Spitsyna, O. Krumkacheva, D. Mitin, D. Suvorov, V. Tormyshev, M. Fedin, M.K. Bowman, E. Bagryanskaya // Molecules. – 2020. – V. 26. – № 1. – P. 108.
11. Komatsu, T. Albumin Clusters: Structurally Defined Protein Tetramer and Oxygen Carrier Including Thirty-Two Iron(II) Porphyrins / T. Komatsu, Y. Oguro, A. Nakagawa, E. Tsuchida // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – № 6. – P. 3397-3403.

12. Dockal, M. The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin / M. Dockal, D.C. Carter, F. Rüker // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – № 41. – P. 29303-29310.
13. Yang, F. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin / F. Yang, Y. Zhang, H. Liang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – V. 15. – № 3. – P. 3580-3595.
14. Brodersen, R. Independent binding of ligands to human serum albumin / R. Brodersen, T. Sjödin, I. Sjöholm // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – T. 252. – № 14. – C. 5067-5072.
15. Bojko, B. Investigations of acetaminophen binding to bovine serum albumin in the presence of fatty acid: Fluorescence and <sup>1</sup>H NMR studies / B. Bojko, A. Sułkowska, M. Maciążek-Jurczyk, J. Równicka, W.W. Sułkowski // *Journal of Molecular Structure*. – 2009. – V. 924-926. – P. 332-337.
16. Ulrich, N. Rapid determination of serum albumin partition coefficients using affinity chromatography / N. Ulrich, A. Böhme // *Environmental Advances*. – 2022. – V. 9. – P. 100284.
17. Лакович, Д. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д. Лакович. – Москва: Мир, 1986. – 496 с.
18. Wei, X.L. Which model based on fluorescence quenching is suitable to study the interaction between trans-resveratrol and BSA? / X.L. Wei, J.B. Xiao, Y. Wang, Y. Bai // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2010. – V. 75. – № 1. – P. 299-304.
19. Dowd, J.E. A comparison of estimates of michaelis-menten kinetic constants from various linear transformations / J.E. Dowd, D.S. Riggs // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1965. – T. 240. – C. 863-869.
20. Gamov, G.A. Processing of the spectrofluorimetric data using the graphical methods and the maximum likelihood approach / G.A. Gamov // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – V. 249. – P. 119334.
21. Bakar, K.A. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity / K.A. Bakar, S.R. Feroz // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – V. 223. – P. 117337.
22. Van De Weert, M. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology / M. Van De Weert, L. Stella // *Journal of Molecular Structure*. – 2011. – V. 998. – № 1-3. – P. 144-150.
23. Van De Weert, M. Fluorescence Quenching to Study Protein-ligand Binding: Common Errors / M. Van De Weert // *Journal of Fluorescence*. – 2010. – V. 20. – № 2. – P. 625-629.

24. Gu, Q. Improvement of Inner Filter Effect Correction Based on Determination of Effective Geometric Parameters Using a Conventional Fluorimeter / Q. Gu, J.E. Kenny // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81. – № 1. – P. 420-426.
25. Purslow, J.A. NMR Methods for Structural Characterization of Protein-Protein Complexes / J.A. Purslow, B. Khatiwada, M.J. Bayro, V. Venditti // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – T. 7. – C. 9.
26. Hu, Y. NMR-Based Methods for Protein Analysis / Y. Hu, K. Cheng, L. He, X. Zhang, B. Jiang, L. Jiang, C. Li, G. Wang, Y. Yang, M. Liu // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93. – № 4. – P. 1866-1879.
27. Huang, E.Y. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1916 is an Acetyl-CoA Binding Protein / E.Y. Huang, B.X.C. Kwai, R.P. Bhusal, G. Bashiri, I.K.H. Leung // *ChemBioChem*. – 2023. – V. 24. – № 14. – P. e202300162.
28. Wachter, H.N. Use of the Rose-Drago method for evaluation of complex formation constants / H.N. Wachter, V. Fried // *Journal of Chemical Education*. – 1974. – V. 51. – № 12. – P. 798.
29. Maity, S. NMR Methods to Characterize Protein-Ligand Interactions / S. Maity, R.K. Gundampati, T.K. Suresh Kumar // *Natural Product Communications*. – 2019. – V. 14. – № 5. – P. 1934578X1984929.
30. Viegas, A. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding / A. Viegas, J. Manso, F.L. Nobrega, E.J. Cabrita // *Journal of Chemical Education*. – 2011. – V. 88. – № 7. – P. 990-994.
31. Cala, O. NMR-based analysis of protein–ligand interactions / O. Cala, F. Guillièrè, I. Krimm // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – V. 406. – № 4. – P. 943-956.
32. Yang, H. Interaction of lafutidine in binding to human serum albumin in gastric ulcer therapy: STD-NMR, WaterLOGSY-NMR, NMR relaxation times, Tr-NOESY, molecule docking, and spectroscopic studies / H. Yang, Y. Huang, J. He, S. Li, B. Tang, H. Li // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – V. 606. – P. 81-89.
33. Yang, H. Domain-specific interactions between MLN8237 and human serum albumin estimated by STD and WaterLOGSY NMR, ITC, spectroscopic, and docking techniques / H. Yang, J. Liu, Y. Huang, R. Gao, B. Tang, S. Li, J. He, H. Li // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 45514.
34. Fielding, L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants / L. Fielding // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2003. – T. 3. – № 1. – C. 39-53.



35. Huang, R. Protein-ligand binding affinity determination by the waterLOGSY method: An optimised approach considering ligand rebinding / R. Huang, A. Bonnichon, T.D.W. Claridge, I.K.H. Leung // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – C. 43727.
36. Silhavy, T.J. On the significance of the retention of ligand by protein. / T.J. Silhavy, S. Szmelcman, W. Boos, M. Schwartz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1975. – V. 72. – № 6. – P. 2120-2124.
37. Pinger, C.W. A Printed Equilibrium Dialysis Device with Integrated Membranes for Improved Binding Affinity Measurements / C.W. Pinger, A.A. Heller, D.M. Spence // *Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 89. – № 14. – P. 7302-7306.
38. Gwilt, P.R. Plasma protein binding and distribution characteristics of drugs as indices of their hemodialyzability / P.R. Gwilt, D. Perrier // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 1978. – V. 24. – № 2. – P. 154-161.
39. Pacifici, G.M. Methods of Determining Plasma and Tissue Binding of Drugs: Pharmacokinetic Consequences / G.M. Pacifici, A. Viani // *Clinical Pharmacokinetics*. – 1992. – V. 23. – № 6. – P. 449-468.
40. Klotz, I.M. The Binding of Organic Ions by Proteins / I.M. Klotz, F.M. Walker, R.B. Pivan // *Journal of the American Chemical Society*. – 1946. – V. 68. – № 8. – P. 1486-1490.
41. Karush, F. Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin<sup>1</sup> / F. Karush // *Journal of the American Chemical Society*. – 1950. – V. 72. – № 6. – P. 2705-2713.
42. Scatchard, G. Physical Chemistry of Protein Solutions. VII. The Binding of Some Small Anions to Serum Albumin<sup>1</sup> / G. Scatchard, J.S. Coleman, A.L. Shen // *Journal of the American Chemical Society*. – 1957. – V. 79. – № 1. – P. 12-20.
43. Loun, B. Chiral separation mechanisms in protein-based HPLC columns. 1. Thermodynamic studies of (R)- and (S)-warfarin binding to immobilized human serum albumin / B. Loun, D.S. Hage // *Analytical Chemistry*. – 1994. – T. 66. – № 21. – C. 3814-3822.
44. Usmanov, Sh.R. Preparation of immobilized albumin and its properties / Sh.R. Usmanov, I.T. Yakubov, M.M. Rakhimov // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1998. – V. 34. – № 4. – P. 496-498.
45. Bertucci, C. Modulation of chromatographic performances of HSA-based HPLC column by reversible binding of lithocholic acid / C. Bertucci, V. Andrisano, R. Gotti, V. Cavrini // *Chromatographia*. – 2001. – V. 53. – № 9-10. – P. 515-518.
46. Li, Y.-F. Rapid Screening of Drug-Protein Binding Using High-Performance Affinity Chromatography with Columns Containing Immobilized Human Serum

Albumin / Y.-F. Li, X.-Q. Zhang, W.-Y. Hu, Z. Li, P.-X. Liu, Z.-Q. Zhang // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2013. – V. 2013. – P. 1-7.

47. Valko, K. Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity / K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham, D.P. Reynolds // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2003. – V. 92. – № 11. – P. 2236-2248.

48. Lagercrantz, C. Comparative studies of the binding of some ligands to human serum albumin non-covalently attached to immobilized Cibacron Blue, or covalently immobilized on Sepharose, by column affinity chromatography / C. Lagercrantz, T. Larsson // *Biochemical Journal*. – 1983. – V. 213. – № 2. – P. 387-390.

49. Kim, H.S. Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC) / H.S. Kim, I.W. Wainer // *Journal of Chromatography B*. – 2008. – V. 870. – № 1. – P. 22-26.

50. Protein-ligand interactions: methods and applications : *Methods in molecular biology*. Protein-ligand interactions / eds. M.A. Williams, T. Daviter. – New York: Humana Press ; Springer, 2013. – 1008. – 530 p.

51. Bjelić, S. A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry / S. Bjelić, I. Jelesarov // *Journal of Molecular Recognition*. – 2008. – V. 21. – № 5. – P. 289-312.

52. Johnson, C.M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability / C.M. Johnson // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2013. – V. 531. – № 1-2. – P. 100-109.

53. Prenner, E. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions / E. Prenner, M. Chiu // *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. – 2011. – V. 3. – № 1. – P. 39.

54. Cimperman, P. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands / P. Cimperman, L. Baranauskienė, S. Jachimovičiūtė, J. Jachno, J. Torresan, V. Michailovienė, J. Matulienė, J. Sereikaitė, V. Bumelis, D. Matulis // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 95. – № 7. – P. 3222-3231.

55. Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin / U. Kragh-Hansen. – 1981. – T. 33. – № 1. – C. 17-53.

56. Schön, A. Ligand binding analysis and screening by chemical denaturation shift / A. Schön, R.K. Brown, B.M. Hutchins, E. Freire // *Analytical Biochemistry*. – 2013. – V. 443. – № 1. – P. 52-57.

57. Brandts, J.F. Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry / J.F. Brandts, L.N. Lin // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – № 29. – P. 6927-6940.
58. Straume, M. Two-dimensional differential scanning calorimetry: Simultaneous resolution of intrinsic protein structural energetics and ligand binding interactions by global linkage analysis / M. Straume, E. Freire // *Analytical Biochemistry*. – 1992. – V. 203. – № 2. – P. 259-268.
59. Precupas, A. Calorimetric, spectroscopic and computational investigation of morin binding effect on bovine serum albumin stability / A. Precupas, R. Sandu, A.V.F. Neculae, A. Neacsu, V.T. Popa // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – V. 333. – P. 115953.
60. Precupas, A. Quercetin Influence on Thermal Denaturation of Bovine Serum Albumin / A. Precupas, R. Sandu, V.T. Popa // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – V. 120. – № 35. – P. 9362-9375.
61. Aricov, L. Interaction of piroxicam with bovine serum albumin investigated by spectroscopic, calorimetric and computational molecular methods / L. Aricov, D.G. Angelescu, A. Băran, A.R. Leontieș, V.T. Popa, A. Precupaș, R. Sandu, G. Stîngă, D.-F. Anghel // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2020. – V. 38. – № 9. – P. 2659-2671.
62. Precupas, A. Complex interaction of caffeic acid with bovine serum albumin: calorimetric, spectroscopic and molecular docking evidence / A. Precupas, R. Sandu, A.R. Leonties, D.-F. Anghel, V.T. Popa // *New Journal of Chemistry*. – 2017. – V. 41. – № 24. – P. 15003-15015.
63. Precupas, A. Gallic acid influence on bovine serum albumin thermal stability / A. Precupas, A.R. Leonties, A. Neacsu, R. Sandu, V.T. Popa // *New Journal of Chemistry*. – 2019. – V. 43. – № 9. – P. 3891-3898.
64. Burgos, M.I. Binding of the Highly Toxic Tetracycline Derivative, Anhydrotetracycline, to Bovine Serum Albumin / M.I. Burgos, R.A. Fernández, M.S. Celej, L.I. Rossi, G.D. Fidelio, S.A. Dassie // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. – 2011. – V. 34. – № 8. – P. 1301-1306.
65. Celej, M.S. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins / M.S. Celej, S.A. Dassie, M. González, M.L. Bianconi, G.D. Fidelio // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – V. 350. – № 2. – P. 277-284.
66. Celej, M.S. Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS–albumin interaction / M.S. Celej, S.A. Dassie, E. Freire, M.L. Bianconi, G.D. Fidelio // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2005. – V. 1750. – № 2. – P. 122-133.

67. Dassie, S.A. Protein Unfolding Coupled to Ligand Binding: Differential Scanning Calorimetry Simulation Approach / S.A. Dassie, M.S. Celej, G.D. Fidelio // *Journal of Chemical Education*. – 2005. – V. 82. – № 1. – P. 85.
68. Macip, G. Haste makes waste: A critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for SARS-CoV-2 main protease (M<sup>pro</sup>) inhibition / G. Macip, P. Garcia-Segura, J. Mestres-Truyol, B. Saldivar-Espinoza, M.J. Ojeda-Montes, A. Gimeno, A. Cereto-Massagué, S. Garcia-Vallvé, G. Pujadas // *Medicinal Research Reviews*. – 2022. – V. 42. – № 2. – P. 744-769.
69. Pantsar, T. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction / T. Pantsar, A. Poso // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 8. – P. 1899.
70. Wani, T.A. Study of binding interaction of rivaroxaban with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking approach / T.A. Wani, H. AlRabiah, A.H. Bakheit, M.A. Kalam, S. Zargar // *Chemistry Central Journal*. – 2017. – V. 11. – № 1. – P. 134.
71. ArameshBoroujeni, Z. Computational and Experimental Study on the Interaction of Terbium(III) and Ytterbium(III) Complexes Containing 1,10-phenanthroline with Bovine Serum Albumin / Z. ArameshBoroujeni, S. Jahani // *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*. – 2020. – № Online First.
72. Evoli, S. 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. – *Biochemistry*, 2016.
73. Lexa, K.W. A Structure-Based Model for Predicting Serum Albumin Binding / K.W. Lexa, E. Dolgih, M.P. Jacobson // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e93323.
74. Arabpour Shiraz, Z. Molecular docking and spectroscopic study of bovine serum albumin interaction with new anticancer Pt complex with isopentyl dithiocarbamate ligand / Z. Arabpour Shiraz, N. Sohrabi, M. Eslami Moghadam, M. Oftadeh // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2023. – P. 1-21.
75. Salim, M.M. Multi-spectroscopic and molecular docking studies for binding interaction between fluvoxamine and human serum albumin / M.M. Salim, M.E. El Sharkasy, F. Belal, M. Walash // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – V. 252. – P. 119495.
76. Zhang, J. Probing the Interaction between Human Serum Albumin and 9-Hydroxyphenanthrene: A Spectroscopic and Molecular Docking Study / J. Zhang, X. Gao, J. Huang, H. Wang // *ACS Omega*. – 2020. – V. 5. – № 27. – P. 16833-16840.
77. Narwane, M. Synthesis, characterization, cytotoxicity evaluation, and molecular docking with DNA, bovine serum albumin, and SARS-Cov-2 of copper complexes

bearing *tris*-(2-pyridyl)pyrazolyl borate ligand / M. Narwane, D.P. Dorairaj, G. Roymahapatra, Y. Chang, Y. Chu, S. Hsu, R. Karvembu, S.C.N. Hsu // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2023. – V. 37. – № 6. – P. e7081.

78. Dar, A.M. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges / A.M. Dar, S. Mir // *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. – 2017. – T. 08. – № 02.

79. Wang, C. Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method / C. Wang, D. Greene, L. Xiao, R. Qi, R. Luo // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2018. – T. 4. – C. 87.

80. Hou, T. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations / T. Hou, J. Wang, Y. Li, W. Wang // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2011. – V. 51. – № 1. – P. 69-82.

81. Weis, A. Ligand Affinities Predicted with the MM/PBSA Method: Dependence on the Simulation Method and the Force Field / A. Weis, K. Katebzadeh, P. Söderhjelm, I. Nilsson, U. Ryde // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – V. 49. – № 22. – P. 6596-6606.

82. Mulakala, C. Could MM-GBSA be accurate enough for calculation of absolute protein/ligand binding free energies? / C. Mulakala, V.N. Viswanadhan // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2013. – V. 46. – P. 41-51.

83. Taylor, M. MM/GBSA prediction of relative binding affinities of carbonic anhydrase inhibitors: effect of atomic charges and comparison with Autodock4Zn / M. Taylor, J. Ho // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2023. – V. 37. – № 4. – P. 167-182.

84. Weng, G. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 9. Prediction reliability of binding affinities and binding poses for protein-peptide complexes / G. Weng, E. Wang, F. Chen, H. Sun, Z. Wang, T. Hou // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – V. 21. – № 19. – P. 10135-10145.

85. Genheden, S. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities / S. Genheden, U. Ryde // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2015. – V. 10. – № 5. – P. 449-461.

86. Fujiwara, S. Identification of High Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin by MM-PBSA Method / S. Fujiwara, T. Amisaki // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 94. – № 1. – P. 95-103.

87. Yu, H. The binding affinity of human serum albumin and paclitaxel through MMPBSA based on docked complex / H. Yu, D. Li, F. Xu, Q. Pan, P. Chai, B. Liu, C. Chen // *Molecular Simulation*. – 2016. – V. 42. – № 17. – P. 1460-1467.

88. Paal, K. Paclitaxel binding to human serum albumin—Automated docking studies / K. Paal, A. Shkarupin, L. Beckford // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – V. 15. – № 3. – P. 1323-1329.
89. Trynda-Lemiesz, L. Paclitaxel–HSA interaction. Binding sites on HSA molecule / L. Trynda-Lemiesz // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2004. – V. 12. – № 12. – P. 3269-3275.
90. Hess, M. Paclitaxel-albumin interaction in view of molecular engineering of polymer-drug conjugates / M. Hess, B.-W. Jo, S. Wunderlich // *Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – V. 81. – № 3. – P. 439-450.
91. Rimac, H. Indomethacin Increases Quercetin Affinity for Human Serum Albumin: A Combined Experimental and Computational Study and Its Broader Implications / H. Rimac, T. Tandarić, R. Vianello, M. Bojić // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – № 16. – P. 5740.
92. Karami, L. Molecular Dynamics Simulation and Free Energy Studies on the Interaction of Salicylic Acid with Human Serum Albumin (HSA) / L. Karami, E. Tazikeh-Lemeski, A.A. Saboury // *Physical Chemistry Research*. – 2017. – T. 5. – № 3.
93. Beaudry, F. Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model / F. Beaudry, M. Coutu, N.K. Brown // *Biomedical Chromatography*. – 1999. – V. 13. – № 6. – P. 401-406.
94. Colmenarejo, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin / G. Colmenarejo // *Medicinal Research Reviews*. – 2003. – V. 23. – № 3. – P. 275-301.
95. Hall, L.M. Modeling Drug Albumin Binding Affinity with E-State Topological Structure Representation / L.M. Hall, L.H. Hall, L.B. Kier // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2003. – V. 43. – № 6. – P. 2120-2128.
96. Guo, Z. Machine learning methods for protein-protein binding affinity prediction in protein design / Z. Guo, R. Yamaguchi // *Frontiers in Bioinformatics*. – 2022. – T. 2. – C. 1065703.
97. Zsila, F. Evaluation of drug–human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking / F. Zsila, Z. Bikadi, D. Malik, P. Hari, I. Pechan, A. Berces, E. Hazai // *Bioinformatics*. – 2011. – V. 27. – № 13. – P. 1806-1813.
98. Tabachnick, M. Thyroxine-protein interactions / M. Tabachnick, N.A. Giorgio // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1964. – V. 105. – № 3. – P. 563-569.

99. Moriguchi, I. Protein Bindings. II. Binding of Aromatic Carboxylic Acids to Bovine Serum Albumin / I. Moriguchi // CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN. – 1968. – V. 16. – № 4. – P. 597-600.
100. Matsushita, Y. Comparison of binding characteristics of human and bovine serum albumins with benzoates over a wide range of concentration. / Y. Matsushita, Y. KIJIMA (née SHIMIZU), I. Moriguchi // CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN. – 1987. – V. 35. – № 6. – P. 2589-2593.
101. Hansch, C. Aromatic substituent constants for structure-activity correlations / C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani, E.J. Lien // Journal of Medicinal Chemistry. – 1973. – V. 16. – № 11. – P. 1207-1216.
102. Seedher, N. Correlation between physico-chemical properties and protein binding of phenothiazine derivatives / N. Seedher, M. Kanojia. – 2000. – T. 62. – № 6. – C. 441-446.
103. Colmenarejo, G. Cheminformatic Models To Predict Binding Affinities to Human Serum Albumin / G. Colmenarejo, A. Alvarez-Pedraglio, J.-L. Lavandera // Journal of Medicinal Chemistry. – 2001. – V. 44. – № 25. – P. 4370-4378.
104. Mao, H. Rational Design of Diflunisal Analogues with Reduced Affinity for Human Serum Albumin / H. Mao, P.J. Hajduk, R. Craig, R. Bell, T. Borre, S.W. Fesik // Journal of the American Chemical Society. – 2001. – V. 123. – № 43. – P. 10429-10435.
105. Xue, C.X. QSAR Models for the Prediction of Binding Affinities to Human Serum Albumin Using the Heuristic Method and a Support Vector Machine / C.X. Xue, R.S. Zhang, H.X. Liu, X.J. Yao, M.C. Liu, Z.D. Hu, B.T. Fan // Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 2004. – V. 44. – № 5. – P. 1693-1700.
106. Hall, M.L. Automated Ligand- and Structure-Based Protocol for *in Silico* Prediction of Human Serum Albumin Binding / M.L. Hall, W.L. Jorgensen, L. Whitehead // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2013. – V. 53. – № 4. – P. 907-922.
107. Serra, A. An integrated quantitative structure and mechanism of action-activity relationship model of human serum albumin binding / A. Serra, S. Önlü, P. Coretto, D. Greco // Journal of Cheminformatics. – 2019. – V. 11. – № 1. – P. 38.
108. Endo, S. Serum Albumin Binding of Structurally Diverse Neutral Organic Compounds: Data and Models / S. Endo, K.-U. Goss // Chemical Research in Toxicology. – 2011. – V. 24. – № 12. – P. 2293-2301.
109. Yamasaki, M. Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength / M. Yamasaki, H. Yano, K. Aoki //

International Journal of Biological Macromolecules. – 1990. – V. 12. – № 4. – P. 263-268.

110. Michnik, A. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin / A. Michnik, K. Michalik, A. Kluczevska, Z. Drzazga // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2006. – V. 84. – № 1. – P. 113-117.

111. Chen, R.F. Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment / R.F. Chen // Journal of Biological Chemistry. – 1967. – V. 242. – № 2. – P. 173-181.

112. Czub, M.P. Albumin-Based Transport of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Mammalian Blood Plasma / M.P. Czub, K.B. Handing, B.S. Venkataramany, D.R. Cooper, I.G. Shabalin, W. Minor // Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – V. 63. – № 13. – P. 6847-6862.

113. Anguizola, J. Review: Glycation of human serum albumin / J. Anguizola, R. Matsuda, O.S. Barnaby, K.S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D.S. Hage // Clinica Chimica Acta. – 2013. – V. 425. – P. 64-76.

114. Li, X. Water-Soluble Phthalocyanines Selectively Bind to Albumin Dimers: A Green Approach Toward Enhancing Tumor-Targeted Photodynamic Therapy / X. Li, K. Jeong, Y. Lee, T. Guo, D. Lee, J. Park, N. Kwon, J.-H. Na, S.K. Hong, S.-S. Cha, J.-D. Huang, S. Choi, S. Kim, J. Yoon // Theranostics. – 2019. – V. 9. – № 22. – P. 6412-6423.

115. Kratochwil, N.A. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach / N.A. Kratochwil, W. Huber, F. Müller, M. Kansy, P.R. Gerber // Biochemical Pharmacology. – 2002. – V. 64. – № 9. – P. 1355-1374.

116. Ràfols, C. Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE) / C. Ràfols, S. Zarza, E. Bosch // Talanta. – 2014. – V. 130. – P. 241-250.

117. Fielding, L. Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems / L. Fielding, S. Rutherford, D. Fletcher // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2005. – V. 43. – № 6. – P. 463-470.

118. Banerjee, T. Binding of Naproxen and Amitriptyline to Bovine Serum Albumin: Biophysical Aspects / T. Banerjee, S.K. Singh, N. Kishore // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – V. 110. – № 47. – P. 24147-24156.

119. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics / ред. L.L. Brunton, R. Hilal-Dandan, B.C. Knollmann, L.S. Goodman, A. Gilman, A.G. Gilman. – New York Chicago San Francisco: McGraw Hill Education, 2018. – 1419 c.



120. Brunton, L.L. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics / L.L. Brunton, B.S. Knollmann, R. Hilal-Dandan. – New York: McGraw Hill Medical, 2018.
121. Ràfols, C. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE) / C. Ràfols, S. Amézqueta, E. Fuguet, E. Bosch // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – V. 150. – P. 452-459.
122. Petitpas, I. Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin / I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – № 25. – P. 22804-22809.
123. Moser, A.C. Stability of warfarin solutions for drug-protein binding measurements: Spectroscopic and chromatographic studies / A.C. Moser, C. Kingsbury, D.S. Hage // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. – V. 41. – № 4. – P. 1101-1109.
124. Ràfols, C. Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE) / C. Ràfols, S. Zarza, E. Bosch // Talanta. – 2014. – V. 130. – P. 241-250.
125. Kosa, T. [No title found] / T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri // Pharmaceutical Research. – 1997. – T. 14. – № 11. – C. 1607-1612.
126. Jakoby, M.G. Localization of Tolbutamide Binding Sites on Human Serum Albumin Using Titration Calorimetry and Heteronuclear 2-D NMR / M.G. Jakoby, D.F. Covey, D.P. Cistola // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – № 27. – P. 8780-8787.
127. Tanaka, M. Interaction Between Drugs and WaterSoluble Polymers. Part IX. Binding Position of Tolbutamide to Human Serum Albumin. / M. Tanaka, Y. Asahi, S. Masuda, K. Minagawa // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1998. – V. 46. – № 5. – P. 817-821.
128. Joseph, K.S. Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography / K.S. Joseph, D.S. Hage // Journal of Chromatography B. – 2010. – V. 878. – № 19. – P. 1590-1598.
129. Szkudlarek, A. In Vitro Investigation of the Interaction of Tolbutamide and Losartan with Human Serum Albumin in Hyperglycemia States / A. Szkudlarek, D. Pentak, A. Ploch, J. Pożycka, M. Maciążek-Jurczyk // Molecules. – 2017. – V. 22. – № 12. – P. 2249.

130. Szkudlarek, A. Effect of Temperature on Tolbutamide Binding to Glycated Serum Albumin / A. Szkudlarek, D. Pentak, A. Ploch, J. Pożycka, M. Maciążek-Jurczyk // *Molecules*. – 2017. – V. 22. – № 4. – P. 569.
131. Thiessen, J.J. Plasma Protein Binding of Diazepam and Tolbutamide in Chronic Alcoholics / J.J. Thiessen, E.M. Sellers, P. Denbeigh, L. Dolman // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 1976. – V. 16. – № 7. – P. 345-351.
132. Brown, K.F. Displacement of tolbutamide, glibenclamide and chlorpropamide from serum albumin by anionic drugs / K.F. Brown, M.J. Crooks // *Biochemical Pharmacology*. – 1976. – V. 25. – № 10. – P. 1175-1178.
133. Singh, I.R. Interaction of chlorpropamide with serum albumin: Effect on advanced glycated end (AGE) product fluorescence / I.R. Singh, S. Mitra // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – V. 206. – P. 569-577.
134. Tao, P. Chromatographic studies of chlorpropamide interactions with normal and glycated human serum albumin based on affinity microcolumns / P. Tao, Z. Li, R. Matsuda, D.S. Hage // *Journal of Chromatography B*. – 2018. – V. 1097-1098. – P. 64-73.
135. Mussche, M.M. Plasma protein binding of phenylbutazone during recovery from acute renal failure / M.M. Mussche, F.M. Belpaire, M.G. Bogaert // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 1975. – V. 9. – № 1. – P. 69-71.
136. Chignell, C.F. Species Differences in the Binding of Phenylbutazone to Plasma Albumin / C.F. Chignell, D.K. Starkweather // *Pharmacology*. – 1971. – V. 5. – № 4. – P. 235-244.
137. Elbary, A.A. Effect of Albumin Conformation on the Binding of Phenylbutazone and Oxyphenbutazone to Human Serum Albumin / A.A. Elbary, J.J. Vallner, C.W. Whitworth // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1982. – V. 71. – № 2. – P. 241-244.
138. Quijano, R. Phenylbutazone Plasma Binding: Effects of Salicylic Acid, Indomethacin, and Dicloxacillin / R. Quijano, B. Kongyingoes, A. Thithapandha // *Experimental Biology and Medicine*. – 1979. – V. 162. – № 3. – P. 442-444.
139. Russeva, V. Binding of Phenylbutazone to Human Serum Albumin / V. Russeva, D. Mihailova // *Arzneimittelforschung*. – 2011. – V. 49. – № 03. – P. 255-258.
140. Aki, H. Thermodynamic Characterization of Drug Binding to Human Serum Albumin by Isothermal Titration Microcalorimetry / H. Aki, M. Yamamoto // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1994. – V. 83. – № 12. – P. 1712-1716.
141. Maciążek-Jurczyk, M. Phenylbutazone and ketoprofen binding to serum albumin. Fluorescence study / M. Maciążek-Jurczyk // *Pharmacological Reports*. – 2014. – V. 66. – № 5. – P. 727-731.

142. Sułkowska, A. Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy: A spectroscopic study / A. Sułkowska, M. Maciążek-Jurczyk, B. Bojko, J. Równicka, I. Zubik-Skupień, E. Temba, D. Pentak, W.W. Sułkowski // *Journal of Molecular Structure*. – 2008. – V. 881. – № 1-3. – P. 97-106.
143. Williams, B.S. *Nonopioid Analgesics* / B.S. Williams // *Essentials of Pain Medicine*. – Elsevier, 2018. – P. 457-468.e2.
144. Trynda-Lemiesz, L. Effects of glycation on meloxicam binding to human serum albumin / L. Trynda-Lemiesz, K. Wiglusz // *Journal of Molecular Structure*. – 2011. – V. 995. – № 1-3. – P. 35-40.
145. Russeva, V. Protein Binding of Piroxicam Studied by Means of Affinity Chromatography and Circular Dichroism / V. Russeva, Z. Zhivkova, K. Prodanova, R. Rakovska // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2010. – V. 51. – № 1. – P. 49-52.
146. (PDF) Binding of piroxicam to human serum albumin [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/281746013\\_Binding\\_of\\_piroxicam\\_to\\_human\\_serum\\_albumin](https://www.researchgate.net/publication/281746013_Binding_of_piroxicam_to_human_serum_albumin).
147. Oyekan, A.O. The energetics of the interaction of piroxicam with plasma albumin / A.O. Oyekan, W.O.A. Thomas // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2011. – V. 36. – № 12. – P. 831-834.
148. Alghamdi, W.A. Protein Binding of First-Line Antituberculosis Drugs / W.A. Alghamdi, M.H. Al-Shaer, C.A. Peloquin // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2018. – V. 62. – № 7. – P. e00641-18, /aac/62/7/e00641-18.atom.
149. Ascenzi, P. Isoniazid and rifampicin inhibit allosterically heme binding to albumin and peroxynitrite isomerization by heme–albumin / P. Ascenzi, A. Bolli, A. di Masi, G.R. Tundo, G. Fanali, M. Coletta, M. Fasano // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2011. – V. 16. – № 1. – P. 97-108.
150. Markarian, S.A. Study on the interaction between isoniazid and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy: the effect of dimethylsulfoxide / S.A. Markarian, M.G. Aznauryan // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – V. 39. – № 7. – P. 7559-7567.
151. Parikh, H.H. [No title found] / H.H. Parikh, K. McElwain, V. Balasubramanian, W. Leung, D. Wong, M.E. Morris, M. Ramanathan // *Pharmaceutical Research*. – 2000. – T. 17. – № 5. – C. 632-637.
152. Kandeel, M. Thermodynamics and molecular bases of the interaction of ampicillin and streptomycin at their binding sites of bovine serum albumin / M. Kandeel, R. Nakashima, Y. Kitamura, M. Balaha, M. Abdelaziz, Y. Kitade // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2013. – V. 112. – № 2. – P. 945-952.

153. Matsushita, Y. Comparison of binding characteristics of human and bovine serum albumins with benzoates over a wide range of concentration. / Y. Matsushita, Y. Kijima (Née Shimizu), I. Moriguchi // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1987. – V. 35. – № 6. – P. 2589-2593.
154. Moriguchi, I. Protein Bindings. II. Binding of Aromatic Carboxylic Acids to Bovine Serum Albumin / I. Moriguchi // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1968. – V. 16. – № 4. – P. 597-600.
155. Zhang, Y. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity / Y. Zhang, S. Wu, Y. Qin, J. Liu, J. Liu, Q. Wang, F. Ren, H. Zhang // *Food Chemistry*. – 2018. – V. 240. – P. 1072-1080.
156. Yuan, S. Structure-affinity relationship of the binding of phenolic acids and their derivatives to bovine serum albumin / S. Yuan, Y. Zhang, J. Liu, Y. Zhao, L. Tan, J. Liu, Q. Wang, H. Zhang // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 278. – P. 77-83.
157. Hansch, Corwin. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters / Corwin. Hansch, A. Leo, R.W. Taft // *Chemical Reviews*. – 1991. – V. 91. – № 2. – P. 165-195.
158. Lewis, M. The use of hammett constants to understand the non-covalent binding of aromatics / M. Lewis, C. Bagwill, L.K.E. Hardebeck, S. Wireduaah // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2012. – V. 1. – № 1. – P. e201204004.
159. Talhout, R. Thermodynamic analysis of binding of *p*-substituted benzamidines to trypsin: Thermodynamics of binding of benzamidines to trypsin / R. Talhout, J.B.F.N. Engberts // *European Journal of Biochemistry*. – 2001. – V. 268. – № 6. – P. 1554-1560.
160. Dearden, J.C. Physico-chemical studies of analgesics. The protein-binding of some *p*-substituted acetanilides / J.C. Dearden, E. Tomlinson // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2011. – V. 22. – № Supplement\_1. – P. 53S-59S.
161. Yap, C.W. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints / C.W. Yap // *Journal of Computational Chemistry*. – 2011. – V. 32. – № 7. – P. 1466-1474.
162. Tetko, I.V. Virtual Computational Chemistry Laboratory – Design and Description / I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V.A. Palyulin, E.V. Radchenko, N.S. Zefirov, A.S. Makarenko, V.Yu. Tanchuk, V.V. Prokopenko // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2005. – V. 19. – № 6. – P. 453-463.
163. Burden, F.R. Molecular identification number for substructure searches / F.R. Burden // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 1989. – V. 29. – № 3. – P. 225-227.

164. Pearlman, R.S. Metric Validation and the Receptor-Relevant Subspace Concept / R.S. Pearlman, K.M. Smith // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 1999. – V. 39. – № 1. – P. 28-35.
165. González, M.P. BCUT descriptors to predicting affinity toward A3 adenosine receptors / M.P. González, C. Terán, M. Teijeira, P. Besada, M.J. González-Moa // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – V. 15. – № 15. – P. 3491-3495.
166. Pirard, B. Classification of Kinase Inhibitors Using BCUT Descriptors / B. Pirard, S.D. Pickett // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2000. – V. 40. – № 6. – P. 1431-1440.
167. Hao, M. A classification study of human  $\beta$  3-adrenergic receptor agonists using BCUT descriptors / M. Hao, Y. Li, Y. Wang, S. Zhang // *Molecular Diversity*. – 2011. – V. 15. – № 4. – P. 877-887.
168. Ramírez, D. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? / D. Ramírez, J. Caballero // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 5. – P. 1038.
169. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions / G.L. Warren [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – V. 49. – № 20. – P. 5912-5931.
170. Peng, S.-M. Improving the accuracy of pose prediction in molecular docking via structural filtering and conformational clustering / S.-M. Peng, Y. Zhou, N. Huang // *Chinese Chemical Letters*. – 2013. – V. 24. – № 11. – P. 1001-1004.
171. Gao, C. Knowledge-Based Strategy to Improve Ligand Pose Prediction Accuracy for Lead Optimization / C. Gao, N. Thorsteinson, I. Watson, J. Wang, M. Vieth // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2015. – V. 55. – № 7. – P. 1460-1468.
172. Park, M.-S. Estimating binding affinities by docking/scoring methods using variable protonation states / M.-S. Park, C. Gao, H.A. Stern // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2011. – V. 79. – № 1. – P. 304-314.
173. Xu, W. Comparing sixteen scoring functions for predicting biological activities of ligands for protein targets / W. Xu, A.J. Lucke, D.P. Fairlie // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2015. – V. 57. – P. 76-88.
174. Wani, T.A. Study of Interactions of an Anticancer Drug Neratinib With Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Approach / T.A. Wani, A.H. Bakheit, M.A. Abounassif, S. Zargar // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – T. 6. – C. 47.
175. Almhizia, A.A. Spectroscopic and molecular docking studies reveal binding characteristics of nazartinib (EGF816) to human serum albumin / A.A. Almhizia, H.

AlRabiah, A.H. Bakheit, E.S.G. Hassan, R.N. Herqash, A.S. Abdelhameed // Royal Society Open Science. – 2020. – V. 7. – № 1. – P. 191595.

176. Bratty, M.A. Spectroscopic and molecular docking studies for characterizing binding mechanism and conformational changes of human serum albumin upon interaction with Telmisartan / M.A. Bratty // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2020. – V. 28. – № 6. – P. 729-736.

177. Owoloye, A.J. Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as PfHT1 inhibitors / A.J. Owoloye, F.C. Ligali, O.A. Enejoh, A.Z. Musa, O. Aina, E.T. Idowu, K.M. Oyebola // PLOS ONE. – 2022. – V. 17. – № 8. – P. e0268269.

178. Al-Khafaji, K. Using integrated computational approaches to identify safe and rapid treatment for SARS-CoV-2 / K. Al-Khafaji, D. AL-Duhaidahawi, T. Taskin Tok // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2020. – P. 1-9.

179. Trott, O. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A.J. Olson // Journal of Computational Chemistry. – 2009. – P. NA-NA.

180. Morris, P. Predicting Binding from Screening Assays with Transformer Network Embeddings / P. Morris, R. St. Clair, W.E. Hahn, E. Barenholtz // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2020. – V. 60. – № 9. – P. 4191-4199.

181. Ingle, B.L. Informing the Human Plasma Protein Binding of Environmental Chemicals by Machine Learning in the Pharmaceutical Space: Applicability Domain and Limits of Predictability / B.L. Ingle, B.C. Veber, J.W. Nichols, R. Tornero-Velez // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2016. – V. 56. – № 11. – P. 2243-2252.

182. Toma, C. QSAR Development for Plasma Protein Binding: Influence of the Ionization State / C. Toma, D. Gadaleta, A. Roncaglioni, A. Toropov, A. Toropova, M. Marzo, E. Benfenati // Pharmaceutical Research. – 2019. – V. 36. – № 2. – P. 28.

183. Mukhija, A. Prevention and Disintegration of Human Serum Albumin Fibrils under Physiological Conditions: Biophysical Aspects / A. Mukhija, N. Kishore // The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – V. 122. – № 43. – P. 9896-9906.

184. Rifai, A. Anti-aggregation effect of Ascorbic Acid and Quercetin on aggregated Bovine Serum Albumin Induced by Dithiothreitol: Comparison of Turbidity and Soluble Protein Fraction Methods / A. Rifai, M. Asy'ari, A.L.N. Aminin // Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi. – 2020. – T. 23. – № 4. – C. 129-134.

185. Siddiqi, M.K. Attenuation of amyloid fibrillation in presence of Warfarin: A biophysical investigation / M.K. Siddiqi, P. Alam, S.K. Chaturvedi, S. Nusrat, Y.E.

Shahein, R.H. Khan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 95. – P. 713-718.

186. Furkan, M. An antibiotic (sulfamethoxazole) stabilizes polypeptide (human serum albumin) even under extreme condition (elevated temperature) / M. Furkan, M.K. Siddiqi, A.N. Khan, R.H. Khan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 135. – P. 337-343.

187. Ajmal, M.R. Fibrillogenesis of human serum albumin in the presence of levodopa – spectroscopic, calorimetric and microscopic studies / M.R. Ajmal, T.I. Chandel, P. Alam, N. Zaidi, M. Zaman, S. Nusrat, M.V. Khan, M.K. Siddiqi, Y.E. Shahein, M.H. Mahmoud, G. Badr, R.H. Khan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 94. – P. 301-308.

188. Uversky, V.N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V.N. Uversky, A.L. Fink // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2004. – V. 1698. – № 2. – P. 131-153.

189. Uversky, V. Amyloidogenesis of Natively Unfolded Proteins / V. Uversky // Current Alzheimer Research. – 2008. – V. 5. – № 3. – P. 260-287.

190. Uversky, V.N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V.N. Uversky, A.L. Fink // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2004. – V. 1698. – № 2. – P. 131-153.

191. Uversky, V. Amyloidogenesis of Natively Unfolded Proteins / V. Uversky // Current Alzheimer Research. – 2008. – V. 5. – № 3. – P. 260-287.

192. Michel, D. Modeling generic aspects of ideal fibril formation / D. Michel // The Journal of Chemical Physics. – 2016. – V. 144. – № 3. – P. 035101.

193. Shah, B.R. Pressure-Accelerated Dissociation of Amyloid Fibrils in Wild-Type Hen Lysozyme / B.R. Shah, A. Maeno, H. Matsuo, H. Tachibana, K. Akasaka // Biophysical Journal. – 2012. – V. 102. – № 1. – P. 121-126.

194. Martins, P.M. True and apparent inhibition of amyloid fibril formation / P.M. Martins // Prion. – 2013. – V. 7. – № 2. – P. 136-139.