# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 2'-{[(*E*)-АНДРОСТ-5-ЕН-17-ИЛИДЕН]-МЕТИЛ}ОКСАЗОЛИНОВ С АНДРОГЕНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

К.А. Щербаков'\*, Д.С. Щербинин<sup>2</sup>, В.А. Костин<sup>1</sup>, В.А. Золотцев<sup>1</sup>, А.Ю. Мишарин<sup>1</sup>, А.В. Веселовский<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121 Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8; \*эл. почта: kirill.soff@gmail.com

<sup>2</sup>Центр системной биомедицины и биотехнологий, Сколковский институт науки и технологий, Москва

<sup>3</sup>Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Московская область, Черноголовка

Методами молекулярного моделирования оценена способность новых азотсодержащих стероидных производных  $2' \{ [(E)-андрост-5-ен-17-илиден]-метил \}$ оксазолинов взаимодействовать с андрогенным рецептором. Исследованы 6 оксазолиновых производных 17(20)E-прегна-5,17(20)-диена, различающихся структурой гетероцикла. Показано, что все соединения способны связываться с андрогенным рецептором только в случае, когда из структуры рецептора была удалена 12 спираль. Это позволяет предполагать, что данные лиганды должны проявлять антагонистические свойства. Результаты докинга и молекулярной динамики с оценкой энергии связывания лигандов позволили предположить, что два из исследованных соединений могут быть эффективными антагонистами андрогенного рецептора.

Ключевые слова: рак простаты; андрогеновый рецептор; производные [17(20)*E*]-прегнена; докинг; молекулярная динамика; метод MM-GBSA

DOI: 10.18097/BMCRM00008

### введение

Возникновение и развитие рака предстательной железы (РПЖ) связано с резким повышением уровня андрогенов в простате и гиперактивностью андрогенового рецептора (AR). Современная стратегия терапии РПЖ основана на ингибировании синтеза андрогенных гормонов или подавлении активности AR [1]. В настоящее время в мире широко проводится поиск новых ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза андрогенов (в первую очередь ингибиторов стероид-17α-гидроксилазы-17,20-лиазы, СҮР17А1) [1-5] и антагонистов AR [6, 7].

Экспериментальные и клинические исследования известных ингибиторов СҮР17А1 17-(3-пиридил)андрост-5-ен-3β-ола (абиратерона, допущенного лля использования в качестве лекарства против РПЖ [8], а также 17-(1Н-бензимидазол-1-ил)андрост-5-ен-3β-ола (галетерона, находящегося на третьей стадии клинических испытаний [9, 10]), показали, что вышеуказанные соединения имеют сродство и к другим клеточным мишеням, в частности к AR, вызывая его инактивацию и/или ускоряя его протеосомную деградацию [9, 11, 12].

Синтезированные ранее азотсодержащие производные [17(20)E]-прегнена [13] ингибировали каталитическую активность СҮР17А1 не менее эффективно, чем абиратерон [14, 15], и подавляли рост клеток карциномы простаты линий LNCaP и PC с активностью, сравнимой с таковой для галетерона [15, 16]. Принимая во внимание структурное сходство оксазолиновых производных [17(20)E]-прегнена с абиратероном и галетероном, исследование сродства этих соединений к AR, несомненно, представляет интерес.

Целью данной работы является изучение взаимодействия 6 синтезированных ранее

оксазолиновых производных [17(20)Е]-прегна-5,17(20)-диена 1-6 с лиганд-связывающим доменом AR методами *in silico*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали шесть оксазолиновых производных стероидов, синтезированных в Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича [17] (рис. 1). Все соединения были синтезированы в виде Е-изомеров. Однако, было показано, что при взаимодействии с кислыми группами белков данные соединения способны изомеризоваться в Z-конфигурацию [14], в связи с чем эти соединения в работе использовались также и в виде Z-изомеров.

Модели соединений 1–6, были созданы в пакете НурегСhem 7.5. Первоначальную оптимизацию структур производили посредством молекулярной механики с использованием силового поля AMBER в пакете HyperChem 7.5 [18]. На втором этапе оптимизацию осуществляли в пакете MOPAC2012 [19] с применением полуэмпирической параметризации PM7.

Оптимизированные модели лигандов использовали в последующей процедуре молекулярного докинга в программе VinaAutodock [20]. Подготовка лигандов к докингу происходила в пакете AutoDock Tools [21]. В ходе этой процедуры рассчитаны частичные атомные заряды с использованием метода Гастайгера-Хюккеля, определены вращающиеся и невращающиеся связи.

В качестве мишени для докинга была выбрана структура лиганд-связывающего домена человеческого андрогенового рецептора в комплексе с синтетическим агонистом EM-5744 (код PDB 2PNU) [22]. Выбор структуры был обусловлен тем, что, несмотря на агонистические свойства EM-5744, данный лиганд имеет стероидный скелет и обладает массивным заместителем в 19 положении.

© © © 2018 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (СС BY-SA 4.0) (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).



Рисунок 1. Оксазолиновые производные 17(20)Е-прегна-5,17(20)-диена, использовавшиеся в работе.

Докинг производили направленно в место связывания природных лигандов в лиганд-связывающий домен рецептора. Область поиска была ограничена решёткой с длиной грани в 20 Å. Решётка была отцентрирована по природному лиганду EM-5744. За правильное расположение лиганда принимали конформации, для которых среднеквадратичное отклонение (RMSD) не превышало 1.5 Å по сравнению со стероидным скелетом EM-5744.

Анализ результатов докинга осуществлялся при помощи программы LigPlot+ [23]. Оптимизацию положения лигандов проводили методом моделирования молекулярной динамики.

Расчёты молекулярной динамики (МД) проводили при помощи пакета программ AMBER 9.0 [24] в явно заданном растворителе (TIP3P) с использованием периодических граничных условий. Параметризацию атомов белка проводили с применением силового поля amber99-SB, лигандов – силового поля GAFF. Для нейтрализации системы использовали ионы Cl-. На первом этапе проводили последовательную минимизацию системы в вакууме и в растворителе на протяжении 25000 шагов с применением метода градиентного спуска. На следующем этапе были последовательно произведены нагрев системы до 300 К и повышение давления с применением NVT и NPT ансамблей. Молекулярную динамику проводили на траектории 15 нс с шагом 2 фс. электростатических взаимодействий Расчёт проводили с применением метода PME (Particle Mesh Ewald) на расстоянии до 8.0 Å. Поддержание заданных параметров температуры и давления осуществляли с применением термостата Ланжевена и баростата Берендсена.

Анализ траекторий МД проводили при помощи пакета VMD [25].

Энергию связывания лигандов с белком рассчитывали методом MM-GBSA [26]. Расчёт энергии проводили на временном отрезке 9-15 нс на основе мгновенных состояний системы. Электростатический вклад в энергию связывания рассчитывали с использованием Generalized Born метода.

Все вычисления были произведены на вычислительном сервере ИБМХ (HP ProLiant G8, AMD Opteron 6176 SE \*2, (48 threads), 64GB RAM,  $\times$ 8 2.5" SAS/SATA с применением ускорителей Nvidia Tesla).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально докинг соединений 1-6 в Z-и Е-конформациях был проведён в полноразмерную модель лиганд-связывающего домена AR. Однако, решений докинга ни для одного соединения получено не было. В связи с этим было предположено, что поскольку для докинга была использована структура AR в комплексе с агонистом, то расположение в ней спирали Н12 (закрывающей вход в место связывания) может препятствовать корректному размещению лигандов в лиганд-связывающем кармане. Считается, что при связывании агониста в лиганд-связывающем домене спираль Н12 закрывает вход в место связывания и участвует в формировании места связывания для активаторного пептида, тогда как антагонисты препятствуют правильному расположению этой спирали, в результате активаторный пептид не может связаться с рецептором [27]. Для проверки предположения эта спираль была удалена. Ранее подобный приём был использован в ряде работ [28, 29]. Повторный докинг всех соединений в лиганд-связывающий домен с отсутствующей спиралью H12 позволил получить решения докинга для всех соединений. Все позы были получены только для соединений **1–6** в Z-конформациях.

Положение стероидных ядер у исследуемых молекул хорошо совпадало с положением молекулы ЕМ-5744 из кристаллической структуры (рис. 2).

На рисунке 3 представлены контакты соединения 2, определённые с помощью программы LigPlot+.

Оценка стабильности полученных комплексов соединений 1-6 с лиганд-связывающим доменом AR была проведена методом молекулярной динамики (рис. 4).

Анализ значений среднеквадратичных отклонений атомов аминокислотных остатков (RMSD) показал, что структуры всех исследуемых комплексов оставались стабильны (рис. 4А). Значения RMSD выходили на "плато" после 2 нс и в среднем составляли около 2 Å. Анализ RMSD для самих лигандов в комплексе с AR на траектории МД показал, что наиболее устойчивыми оставались положения соединений 1, 2, 4 и 6 (рис. 4Б). Их отклонение от первоначального положения составляло 2-3 Å. Наибольшее отклонение наблюдалось для соединения 3. Сначала величина RMSD для него возрастала до 6 Å, потом постепенно снизилась и в дальнейшем колебалась в районе 3-4 Å. То есть этот комплекс был наименее устойчив в ходе динамики. Визуальная оценка изменения положений лигандов в ходе МД выявила, что наибольшему смещению относительно начальных позиций подверглись лиганды 3 и 5, что отражается в высоком значении их RMSD.

Оценка способности соединений 1–6 образовывать водородные связи с белком в ходе молекулярной динамики показала, что у большинства лигандов водородная связь с белком присутствовала на протяжении не более 20% от общего времени динамики. Лишь соединение 5 образовывало водороднуюсвязь на протяжении 53% времени.

На основе траекторий молекулярной динамики были рассчитаны значения энергий связывания соединений 1-6 с лиганд-связывающим доменом AR



Рисунок 2. Наложение структур соединения 2 (малиновые палочки) и EM-5744 (синие палочки) в месте связывания AR.



**Рисунок 3.** Двухмерная развёрстка, демонстрирующая основные контакты соединения **2** с белком. Красными полукругами, обозначены остатки, вступающие с лигандом в гидрофобные взаимодействия. Зелёным пунктиром показана H-связь.

методом MM-GBSA (таблица). Расчёт энергий проводился на участке траектории 9-15 нс, когда значения RMSD систем уже вышли на плато. Наибольшей энергией связывания характеризуются соединения 5 (-57.9 ккал/моль) и 6 (-57.1 ккал/моль).

Докинг производных 17(20)Е-прегна-5,17(20)-диена (соединения 1-6) в AR удался лишь в мишень, в которой отсутствует спираль Н12. Заместители у атома С17 при этом располагались в месте, которое занимает H12-спираль AR при его связывании с агонистами. Это может указывать, что данные соединения при связывании с AR должны препятствовать связыванию этой спирали с основной глобулой домена и таким образом проявлять антагонистические свойства. Все варианты докинга были получены для соединений в Z-конформации, что предполагает, что, как и в случае с взаимодействием этих соединений с цитохромом Р450 17А1 [14], предварительно должна произойти кислотная изомеризация этих соединений.

Результаты докинга показали, что все соединения могут разместиться в месте связывания таким образом, что их гидроксильная группа при C3-атоме стероидного кольца образует H-связь с Arg752 белка,





**Рисунок 4.** Значения RMSD для комплексов AR с лигандами 1–6 в процессе молекулярной динамики. А – величина RMSD для белка; Б – для лигандов.

Лиганд	Продолжительность присутствия Н-связи (в % от общего времени МД)	$\Delta G^{0}_{bind}$ (ккал/моль)
1	21	-52,7
2	20	-50,3
3	19	-55,7
4	17	-51,5
5	53	-57,9
6	13	-57,1

Таблиц	a. C	Среднее	количество	H-	связей и	значения	свободных	энергий	связывания	лигандов	1-(	i c A	٩R

что также характерно для других стероидных лигандов ядерных рецепторов. Все описанные соединения в ходе МД сохраняют указанную выше водородную связь. Эта водородная связь, за исключением соединения 5, присутствовала только 20% времени. Для соединения 5 эта величина составляла 50%.

Ранее эти соединения были исследованы на способность ингибировать активность цитохрома Р450 17А1, и было показано, что часть из них обладает низкой ингибиторной способностью [30]. Так, соединение 5 было на порядок менее активно, чем абиратерон (лекарство, в основном действующее на цитохром Р450 17А1), а соединение 6 было абсолютно неактивно. Таким образом, проведённые исследования показали, что некоторые азотсодержащие производные [17(20)*E*]-прегнена способны связываться с AR, причём соединения **5** и **6** являются вероятными антагонистами AR и могут быть рекомендованы для экспериментальной проверки на антиандрогенное действие.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vasaitis, T.S., Bruno, R.D., & Njar V.C.O. (2011) CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 125. 24-30. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.005

2. Baston, E., Leroux, F.R. (2007) Inhibitors of Steroidal Cytochrome P450 Enzymes as Targets for Drug Development. Recent Pat. Anti-Cancer Drug. Disc., 2, 31-58. DOI: 10.2174/157489207779561453

3. Bruno, R.D., Njar, V.C.O. (2007). Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development. Bioorgan. Med. Chem., 15, 5047-5060. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.05.046

4. de Bono, J.S., Logothetis, C.J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., Chu, L., Chi, K.N., Jones, R.J., Goodman, O.B. Jr., Saad, F., StaVurth, J.N., Mainwaring, P., Harland, S., Flaig, T.W., Hutson, T.E., Cheng, T., Patterson, H., Hainsworth, J.D., Ryan, C.J., Sternberg, C.N., Ellard, S.L., Flechon, A., Saleh, M., Scholz, M., Efstathiou, E., Zivi, A., Bianchini, D., Loriot, Y., ChieVo, N., Kheoh, T., Haqq, C.M., Scher, H.I., & COU-AA-301 Investigators (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. N. Engl. J. Med., 364, 1995-2005. DOI: 10.1056/NEJMoa1014618

5. Vasaitis, T., Belosay, A., Schayowitz, A., Khandelwal, A., Chopra, P., Gediya, L.K., Guo, Z., Fang, H.B., Njar, V.C., & Brodie, A.M. (2008) Androgen receptor inactivation contributes to antitumor efficacy of 17{alpha}-hydroxylase/17,20-lyase inhibitor 3beta-hydroxy-17-(1H-benzimidazole-1-yl) androsta-5,16-diene in prostate cancer. Mol. Cancer Ther., 7, 2348-2357. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0230

6. Gao, W., Bohl, C.E., & Dalton, J.T. (2005) Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. Chem. Rev., 105, 3352-702. DOI: 10.1021/cr020456u

7. Tindall, D., Mohler, J. (eds) (2009) Androgen Action in Prostate Cancer. Dordrecht, Heidelberg, London, New York.- Springer.

8. Thakur, A., Roy, A., Ghosh, A., Chhabra, M., & Banerjee, S. (2018) Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. Biomed Pharmacother., 101, 211-218. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.067

9. Njar, V.C., Brodie, A.M. (2015). Discovery and development of Galeterone (TOK-001 or VN/124-1) for the treatment of all stages of prostate cancer. J. Med. Chem., 58, 2077-2087. DOI: 10.1021/jm501239f

10. Bastos, D.A., & Antonarakis, E.S. (2016). Galeterone for the treatment of advanced prostate cancer: the evidence to date. Drug Des Devel Ther., 10, 2289-2297. DOI: 10.2147/DDDT.S93941

11. Crona, D.J., Milowsky, M.I., & Whang, Y.E. (2015). Androgen receptor targeting drugs in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance. Clin. Pharmacol. Ther., 98(6), 582-589. DOI: 10.1002/cpt.256

12. Yin, L., & Hu, Q. (2014) CYP17 inhibitors - abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents. Nat. Rev. Urol., 11(1), 32-42. DOI: 10.1038/nrurol.2013.274

13. Stulov S.V., & Misharin A.Yu. (2012) Synthesis of steroids with nitrogen-containing substituents in ring D. Chemistry of heterocyclic compounds, 1536-1582.

14. Kuzikov, A.V., Dugin, N.O., Stulov, S.V., Shcherbinin, D.S., Zharkova, M.S., Tkachev, Y.V., Timofeev, V.P., Veselovsky, A.V., Shumyantseva, V.V., & Misharin, A.Y. (2014) Novel oxazolinyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene as  $17\alpha$ -hydroxylase/17,20lyase (CYP17A1) inhibitors. Steroids., 88, 66-71. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.06.014 15. Kostin, V.A., Zolottsev, V.A., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V., Veselovsky, A.V., Stulov, S.V., Novikov, R.A., Timofeev, V.P., & Misharin, A.Y. (2016) Oxazolinyl derivatives of [17(20)*E*]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity. Steroids, 115, 114-122. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.06.002

16. Zolottsev, V.A., Tkachev, Y.V., Latysheva, A.S., Kostin, V.A., Novikov, R.A., Timofeev, V.P., Morozevich, G.E., Kuzikov, A.V., Shumyantseva, V.V., & Misharin, A.Y. (2018). Comparison of [17(20)E]-21-Norpregnene oxazolinyl and benzoxazolyl derivatives as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells growth. Steroids, 129, 24-34. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.11.009

17. Stulov, S.V., Mankevich, O.V., Novikov, R.A., Tkachev, Y.V., Timofeev, V.P., Dugin, N.O., Pozdnev, V.F., Fedyushkina, I.V., Scherbinin, D.S., Veselovsky, A.V., & Misharin, A.Yu. (2013) Synthesis and molecular modeling of (4'R)- and (4'S)- 4'-substituted 2'-{[(*E*)-androst-5-en-17-ylidene]-methyl}oxazolines. Steroids, 78, 521-527. DOI: 10.1016/j.steroids.2013.02.014

18. HyperChem(TM) Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA

19. James Stewart. MOPAC Home Page. Stewart Computational Chemistry, 2012.

20. Trott, O., & Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem., 31(2), 455-461.

21. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., & Olson, A.J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem., 30(16), 2785-2791. DOI: 10.1002/jcc.21256

22. Cantin, L., Faucher, F., Couture, J.F., de Jesus-Tran, K.P., Legrand, P., Ciobanu, .LC., Frechette, Y., Labrecque, R., Singh, S.M., Labrie, F., & Breton. R. (2007) Structural characterization of the human androgen receptor ligand-binding domain complexed with EM5744, a rationally designed steroidal ligand bearing a bulky chain directed toward helix 12. J. Biol. Chem., 282(42), 30910-30919. DOI: 10.1074/jbc.M705524200

23. Laskowski, R.A., & Swindells, M.B. (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. J. Chem. Inf. Model., 51, 2778-2786. DOI: 10.1021/ci200227u

24. Salomon-Ferrer, R., Case, D.A., & Walker, R.C. (2013) An overview of the Amber biomolecular simulation package. Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci., 3(2), 198-210. DOI: 10.1002/wcms.1121

25. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graph., 14(1), 33-38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5

26. Genheden, S., & Ryde, U. (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. Expert Opin. Drug Discov., 10(5), 449-461. DOI: 10.1517/17460441.2015.1032936

27. Davey, R.A., & Grossmann, M. (2016) Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. Clin. Biochem. Rev., 37(1), 3-15.

28. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., & Klein, M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys., 79(2), 926-935. DOI: 10.1063/1.445869

29. Wang, Y., Han, R., Zhang, H., Liu, H., Li, J., Liu, H., & Gramatica, P. (2017) Combined Ligand/Structure-Based Virtual

Screening and Molecular Dynamics Simulations of Steroidal Androgen Receptor Antagonists. Biomed. Res. Int., 3572394. DOI: 10.1155/2017/3572394

30. Stulov, S.V., Dugin, N.O., Zharkova, M.S., Shcherbinin, D.S., Kuzikov, A.V., Shumantseva, V.V., Misharin, A.Yu., & Veselovsky, A.V. (2015) Interaction of Novel Oxazoline

Derivatives of 17(20) E-pregna-5,17(20)-Diene with Cytochrome P450 17 A1. Biochemistry (Moscow) Suppl Ser B: Biomedical Chemistry, 9(2), 114-120. DOI: 10.1134/S1990750815020134

> Поступила: 16. 03. 2018. Принята к публикации: 21. 03. 2018.

# INVESTIGATION *IN SILICO* THE INTERACTION OF OXAZOLINYL DERIVATIVES OF [17(20)*E*]-21-NORPREGNENE WITH ANDROGEN RECEPTOR

### K.A. Shcherbakov<sup>1</sup>\*, D.S. Shcherbinin<sup>2</sup>, V.A. Kostin<sup>1</sup>, V.A. Zolottsev<sup>1</sup>, A.Yu. Misharin<sup>1</sup>, A.V. Veselovsky<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: kirill.soff@gmail.com

<sup>2</sup>Center for Data-Intensive Biomedicine and Biotechnology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia <sup>3</sup>Institute of Physiologically Active Compounds, Moscow region, Chernogolovka, Russia

The ability of novel oxazolinyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene to interact with the androgen receptor (AR) was investigated using molecular modelling methods. Six new derivatives differed in oxazolinyl radicals in 17 position were used. It was shown that all compounds were able to docked in the ligand-binding domain of AR only when the AR helix-12 was removed. It is suggested that these compounds have antagonistic properties. Results of docking and simulation of molecular dynamics with estimation of binding energy allow to predict that two compounds can be effective AR antagonists.

Key words: prostate cancer; androgen receptor; derivatives of pregna-5,17(20)-diene; docking; molecular dynamics; MM-GBSA method