基于几何约束的蛋白质-配体准确结合自由能计算

付浩浩^a 陈湔川^a 张宏^a 邵学广^{*,a,b} 蔡文生^{*,a}

(^a南开大学化学学院分析科学研究中心 天津市生物传感与分子识别重点实验室 天津 300071)

(^b南开大学药物化学生物学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 蛋白质-配体的结合过程伴随着复杂的结构变化,在分子模拟可及的时间尺度内难以完全捕获,这使得准确估计蛋白质-配体的结合自由能十分困难。一种有效的解决途径是采用几何约束减小需要采样的构象空间,再通过后处理方式扣除约束的影响。本文综述了三种几何约束策略——漏斗状约束、球形约束和七自由度约束与自由能计算算法结合准确计算结合自由能的原理和进展,重点概述理论严谨的七自由度约束的最新进展以及与 Alchemy 或重要性采样方法的联用策略,最后,讨论了如何针对不同体系选择合适的计算策略以及蛋白质-配体准确结合自由能计算在药物设计等领域中的挑战和前景,并提出了将上述方法进一步运用于研究更复杂的蛋白质-蛋白质问题的可能性。

关键词 蛋白质-配体; 结合自由能; 分子模拟; 自由能微扰; 重要性采样

Accurate Estimation of Protein-ligand Binding Free Energies Based on Geometric Restraints

Haohao Fu^a Haochuan Chen^a Hong Zhang^a Xueguang Shao^{*,a,b} Wensheng Cai^{*,a}

(^a Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition, Research Center for Analytical Sciences, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(^b State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Tianjin 300071, China)

Abstract Binding free energy is the most crucial physical quantity for describing recognition-association of protein-ligand hybrids. Accurate estimation of protein-ligand binding free energies is of paramount importance in the field of drug design and biological engineering. However, the association process of protein-ligand hybrids is usually coupled with complex conformational changes of molecular objects, which is not amenable to the timescale of classical molecular simulations. This limitation makes it difficult to accurately estimate the protein-ligand binding free energies using classical free-energy calculation strategies. An effective solution is to apply geometric restraints to reduce the configurational space needed to be sampled, so as to boost up the convergence rate of simulations, and then calculate and deduct the contribution of these restraints to the binding free energy by post-processing. In this review, we firstly introduce the recent developments of three geometric restraints, namely, funnel, spherical, and seven-degree-of-freedom restraints, used in accurate binding free-energy calculations, with emphasis on the latest progress of the third one. Specifically, the theoretically rigorous seven-degree-of-freedom restraint describes translational, orientational, rotational, and conformational degrees of freedom by means of a center-of-mass distance, spherical angles, Euler angles and the root-mean-square deviation. Moreover, we demonstrate the theoretical backgrounds and methods of how to achieve accurate protein-ligand binding free-energy estimation by combination of geometric restraints and importance-sampling or alchemical algorithms. In the geometric routes, the degrees of freedom of the relative movement of the protein-ligand complex are addressed in a stepwise fashion by one-dimensional importance-sampling simulations. In the alchemical routes, a special thermodynamics cycle is designed, in which additional simulations are performed to address the contribution of the restraints. A general suggestion for how to choose a suitable strategy for a given molecular assembly based on our experience is provided. Last but not least, we discuss the applications and challenges of using accurate protein-ligand binding free-energy calculation methods in fields such as drug design, and present the possibility of extending these methods for investigating complex protein-protein interaction.

Keywords protein-ligand; binding free energy; molecular dynamics; free-energy perturbation; importance sampling

1 引言

结合自由能(binding free energy)是描述识别-组装

过程最重要的物理量,理论估计结合自由能在许多领域都至关重要^[1-4]。例如在药物设计过程中,常通过分子对接或分子模拟计算数据库中的备选药物与受体蛋白的

* E-mail: xshao@nankai.edu.cn, wscail@nankai.edu.cn, Tel.: 022-23503430

Received October 24, 2020; published November 30, 2020.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22073050, 21773125), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, Nankai University (Nos. 63191743, 63201015), and the China Post-doctoral Science Foundation (No. bs6619012).

项目受国家自然科学基金(Nos. 22073050, 21773125)、南开大学中央高校基本科研业务费专项资金(Nos. 63191743, 63201015)和中国博士后科学基金(No. bs6619012)资助。

结合自由能,并以此作为判据筛选出可能的药物^[5].在蛋白质工程领域,可通过对蛋白质关键氨基酸进行突变,并进行结合自由能计算,观测结合能力的变化,从而指导对蛋白质的改性设计^[6].显而易见,蛋白质-配体结合自由能计算的准确性直接影响其在各领域中的应用前景.“准确”一词有两个方面的含义:一是经典力场或打分函数可以准确地描述微观粒子的相互作用,二是模拟过程完整地捕获了蛋白质-配体结合过程各个自由度的贡献,并准确地描述统计力学行为.其中前者属于力场拟合范畴的问题,近年来发展的极化力场对非键相互作用有着较好的描述^[7-8],该问题在参考文献[7, 9]中已有了详尽的阐述,本综述仅聚焦于后者在近年来的发展与未来的展望.

从统计力学的角度看,蛋白质-配体的标准结合自由能可以通过下式计算:

$$\Delta G_{\text{binding}}^{\circ} = -k_{\text{B}}T \ln K^{\circ} = -k_{\text{B}}T \ln \frac{p_{\text{bound}}}{p_{\text{unbound}}} \quad (1)$$

其中 $\Delta G_{\text{binding}}^{\circ}$ 为标准结合自由能, k_{B} 为玻尔兹曼常数, T 为温度, K° 为标准平衡常数, p_{bound} 和 p_{unbound} 分别为平衡状态下结合态和非结合态出现的概率.然而,直接通过式(1)计算结合自由能在实际中十分困难,因为在可及的分子模拟时间尺度内,很难看到结合态和非结合态间的自发转化^[1].应用重要性采样方法(importance sampling)^[10],如 metadynamics^[11-12]或自适应偏置力(adaptive biasing force, ABF)^[13-14],可以加速蛋白质-配体的结合-分离过程,实现在分子模拟的时间尺度内观察到该过程.然而由于在结合-分离过程中,蛋白质-配体间还伴随着复杂的取向和构象变化,而在现有的计算条件下,重要性采样模拟不可能同时捕获沿平动、转动和构象变化自由度方向上的运动,使得直接使用重要性采样方法计算蛋白质-配体的结合自由能亦十分困难^[15].

另一种标准结合自由能计算的思路为使用 Alchemy 类方法,如自由能微扰(free-energy perturbation, FEP)^[16]和热力学积分(thermodynamics integration, TI)^[17],通过在体系中“消失”或“生成”一部分原子,收集模拟过程中体系的内能变化,进一步计算“消失”或“生长”过程对应的自由能变化.在实际应用中,常通过设计热力学循环,进行多次 alchemy 计算,得到目标结合自由能,如图 1 所示,可以通过计算 ΔG_1 和 ΔG_2 间接得到 $\Delta G_{\text{binding}}$.该方法的难点在于计算 ΔG_2 的

图 1 用 Alchemy 方法计算蛋白质-配体结合自由能的传统策略.“:”表示结合态

Figure 1 The classical strategy of protein-ligand binding free-energy calculations using alchemical algorithms. “:” represents the binding state

过程中,随着配体的逐渐“消失”,配体相对于蛋白质会出现复杂的平动、转动和构象变化等过程.而在分子模拟的时间尺度内难以捕获这些过程,从而阻碍 Alchemy 类方法计算的收敛性.

为解决重要性采样或 Alchemy 算法在计算蛋白质-配体结合自由能过程中的收敛性难题,可以采用几何约束减少需要采样的构象空间,并通过后处理准确地扣除约束对计算结果的影响.近年来陆续提出了漏斗状(funnel)约束^[18-19],球状(spherical)约束^[20],六/七自由度(six/seven degree of freedom)约束^[21-23]等.这些约束分别成功地与伞状采样(umbrella sampling, US)^[24-25]、metadynamics^[11-12]、自适应偏置力^[13-14]、自由能微扰^[16]、热力学积分^[17]等重要性采样或 alchemy 算法联用,准确计算了大量蛋白质-配体的结合自由能^[26-30].

本综述首先从原理、特点、实现、应用范围和发展上对近年来提出的几何约束方式和后处理策略,以及将这些约束与重要性采样或 alchemy 算法联用的方法进行了综述,然后重点阐述了理论严谨的七自由度约束与自适应偏置力和自由能微扰算法联用的策略,最后对准确进行蛋白质-配体结合自由能计算的方法在未来的发展方向进行了总结和展望.

2 漏斗状约束和球形约束与重要性采样方法联用计算结合自由能

2.1 漏斗状约束与 funnel-metadynamics

在重要性采样模拟过程中,如果选用蛋白质-配体的质心距离作为集合变量(collective variables, 或 order parameters),在配体远离蛋白质的过程中,配体会相对于蛋白质发生公转,导致当配体再次靠近蛋白质时,无法寻找到正确的结合位点.为解决该问题, Parrinello 课题组提出了漏斗状约束^[18-19](图 2A),该约束避免了配体的公转,保证配体在靠近蛋白质的过程中能够正确地寻找到结合位点,从而使得重要性采样算法可以可逆地探索蛋白质-配体的结合-解离过程.漏斗状约束的贡献可

图 2 (A)漏斗状约束和(B)球形约束示意图.浅红色区域为允许小分子自由运动的区域.若小分子质心位于浅红色区域外,则会受到指向浅红色区域的边界约束力

Figure 2 (A) Funnel and (B) spherical restraints used in binding free-energy calculations. Region for free move of the ligand is shown in red. The ligand will be pushed back by the restraint if it moves outside the red region.

通过式(2)计算

$$\Delta G_{\text{restraint}} = k_B T \ln(\pi R^2 C^\circ) \quad (2)$$

其中 $\Delta G_{\text{restraint}}$ 为约束对结合自由能的贡献, R 为圆柱体半径, $C^\circ = 1000/1661 \text{ nm}^{-3}$ 为标准浓度。

原理上来说, 漏斗状约束可以与任意重要性采样方法联用, 但由于该约束与 metadynamics 为同一课题组所提出, 所以常与 metadynamics 联用, 称为 funnel-metadynamics^[18-19]。Funnel-metadynamics 计算中需要纳入配体质心与结合位点的距离作为集合变量之一, 此外也可以根据需要加入球面角、配体骨架二面角等其他重要自由度, 通过 metadynamics 计算得到一维或多维自由能曲面。在一维情况下, 通过下式计算结合自由能:

$$\Delta G_{\text{binding}} = -k_B T \ln \left[\frac{\int_{\text{bound}} d\xi e^{-\frac{w(\xi)}{k_B T}}}{\int_{\text{unbound}} d\xi e^{-\frac{w(\xi)}{k_B T}}} \right] \quad (3)$$

其中 ξ 为使用的集合变量, 即距离, $w(\xi)$ 为自由能曲线。需要注意的是由式(3)计算得到的结合自由能需要扣除式(2)中的约束项贡献并利用式(4)进行标准态校正。

$$\Delta G_{\text{binding}} = -k_B T \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G_{\text{binding}}^\circ = -k_B T \ln K_{\text{eq}}^\circ = -k_B T \ln(K_{\text{eq}} C^\circ) \quad (4)$$

其中 K_{eq}° 为标准平衡常数。

Funnel-metadynamics 的优点为几何约束意义明确、使用简单、消耗计算资源少, 对蛋白质-小分子配体的结合自由能计算有着较好的效果。在 Plumed 自由能计算模块^[31]中有 funnel-metadynamics 的直接实现, 由于几何约束形式简单, 在 Colvars^[32]、SSAGES^[33]等自由能计算模块中也有较为简便的方式直接使用。因此, Funnel-metadynamics 可以无障碍地被大多数现有的分子模拟软件所支持。为进一步简化 funnel-metadynamics 的使用, 促进准确结合自由能计算在更多领域的应用, Raniolo 等人为设计了简化 funnel-metadynamics 输入文件步骤的软件, 并在 Nature Protocols 上发表了准确结合自由能计算的详细教程^[19]。目前 funnel-metadynamics 已发展成为研究膜蛋白, 特别是 G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCRs)与配体相互作用最为常见的方法^[34]。

Funnel-metadynamics 的主要缺点为没有针对配体的取向和构象变化进行描述。如果配体分子较大或者柔性较强, 其取向和构象变化会阻碍 metadynamics 模拟过程中对最优结合模式的采样, 从而影响自由能计算的收敛。此外, 如果配体存在不止一个结合位点的话, funnel-metadynamics 也很难对配体在其他结合位点上的结构进行采样。

2.2 球形约束与重要性采样方法结合

为解决配体存在多个结合位点的问题, Parrinello 课题组提出了用球形约束^[20]代替漏斗状约束, 如图 2B 所

示。球形约束对结合自由能的贡献如式(5)所示。

$$\Delta G_{\text{restraint}} = k_B T \ln \left[C^\circ \left(\frac{4}{3} \pi R^3 - V_{\text{protein}} \right) \right] \quad (5)$$

其中 V_{protein} 为蛋白质所占球体内部的体积。

通过结合球形约束和重要性采样算法, 如 metadynamics 和自适应偏置力, 使用球面坐标 (r, θ, φ) 作为集合变量进行多维自由能计算可以寻找到配体与蛋白质的多个结合位点, 通过对三维自由能曲面积分, 可以得到准确的结合自由能, 如下式所示,

$$\Delta G_{\text{binding}} = -k_B T \ln \left[\frac{\int_{\text{bound}} dr d\theta d\varphi e^{-\frac{w(r, \theta, \varphi)}{k_B T}}}{\int_{\text{unbound}} dr d\theta d\varphi e^{-\frac{w(r, \theta, \varphi)}{k_B T}}} \right] \quad (6)$$

经过式(4)和式(5)的校正即可得到标准结合自由能。

球形约束解决了漏斗状约束难以对多个结合位点进行采样的问题, 并且几何约束形式更加简单, 在几乎所有的分子动力学软件中均得到支持。但是球形约束依然没有解决复杂配体在结合-解离过程中可能存在取向和构象变化的问题, 因此对于复杂或柔性较大的配体, 自由能计算依旧会存在收敛困难, 导致计算结果不够准确。

3 六/七自由度约束及在自由能计算中的应用

3.1 六/七自由度约束

如果将蛋白质和配体均视为刚体的话, 则采用球面坐标 (r, θ, φ) 可以完备地描述蛋白质和配体的相对位置, 采用配体相对于蛋白质的欧拉角 (θ, ϕ, ψ) 可以完备地描述配体的相对取向。因此, 通过向这六个自由度施加合理的约束, 可以大大减少模拟中所需要采样的构象空间, 从而加速模拟的收敛。

使用六自由度约束的首要问题是如何定义这六个自由度。Karplus 课题组提出可以在蛋白质和配体中分别选择 3 个原子团作为参考点, 利用这 6 个参考点定义 2 个球面角和 3 个欧拉角^[21], 如图 3 所示。这种方法假定蛋白质和配体内的 3 个原子团自身的相对位置不变, 即蛋白质和配体均为刚体, 在配体柔性较大的情况下该条件很难满足。为此, Roux 课题组进一步将配体结构相对于结合态的均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)变化也加入约束中^[22,35], 即七自由度约束。采用参考原子团定义蛋白质-配体相对运动的自由度实现简单, 可以直接被各主流分子动力学软件所支持。由于物理意义明确, 理论严谨, 六/七自由度约束已逐渐发展成为计算蛋白质-配体结合自由能事实上的标准约束方式^[36,37]。

3.2 七自由度约束与重要性采样方法相结合准确计算结合自由能

Chipot 课题组通过将蛋白质-配体的相对运动过程中涉及到的七个自由度分解, 通过分步策略^[38], 采用重

图3 基于参考原子团定义的六自由度($r, \theta, \phi, \theta, \phi, \psi$)示意图。图中黑色虚线表示距离, 紫色箭头表示角度, 红色箭头表示二面角
Figure 3 Atom-group-based definition of the six degrees of freedom ($r, \theta, \phi, \theta, \phi, \psi$). The black dot line, red arrows and purple arrows represent the distance, angles and dihedral angles, respectively.

要性采样算法分别沿每个自由度进行采样。原理如式(7)所示, 蛋白质-配体的标准结合常数可分解为多个项相乘:

$$\begin{aligned}
 K_{\text{eq}} &= \frac{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta U}}{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta U}} \\
 &= \frac{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta U}}{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c)}} \\
 &\times \frac{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c)}}{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o)}} \\
 &\times \frac{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o)}}{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o+u_a)}} \\
 &\times \frac{\int_{\text{site}} d\mathbf{1} \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o+u_a)}}{\int_{\text{bulk}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o)}} \\
 &\times \frac{\int_{\text{bulk}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c+u_o)}}{\int_{\text{bulk}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c)}} \\
 &\times \frac{\int_{\text{bulk}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U+u_c)}}{\int_{\text{bulk}} d\mathbf{1} \delta(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_1^*) \int d\mathbf{x} e^{-\beta(U)}} \\
 &= \exp \left[-\beta \left(\begin{aligned} &\Delta G_c^{\text{site}} + \Delta G_o^{\text{site}} + \Delta G_a^{\text{site}} \\ &-\frac{1}{\beta} \ln(S^* I^* C^*) \\ &+\Delta G_o^{\text{bulk}} + \Delta G_c^{\text{bulk}} \end{aligned} \right) \right] \quad (7)
 \end{aligned}$$

其中 $\mathbf{1}$ 代表配体, $\mathbf{x}_1$ 为配体的质心, $\mathbf{x}_1^*$ 为体系中远离结合位点的一个任意点, U 为势能, $u_o = u_\theta + u_\phi + u_\psi$,

是配体的取向约束, $u_a = u_\theta + u_\phi$, 为相对位置约束, ΔG_c 、 ΔG_o 和 ΔG_a 分别为构象、取向和相对位置约束的贡献。在实际计算中, 通过分步策略, 每一次模拟沿描述一个自由度的集合变量 ξ 进行重要性采样计算, 而已经计算过的自由度则约束在最优位置, 详细的计算步骤如表1所示。

表1 采用七自由度约束结合重要性采样算法准确计算蛋白质-配体标准结合自由能的步骤

Table 1 Detailed process of the accurate protein-ligand binding free-energy calculation strategy using the combination of the seven-degree-of-freedom restraints and an importance-sampling algorithm

步骤	对应项	集合变量	约束	体系
1	ΔG_c^{site}	RMSD	-	蛋白质-配体
2	$\Delta G_\theta^{\text{site}}$	θ	RMSD	蛋白质-配体
3	$\Delta G_\phi^{\text{site}}$	ϕ	RMSD, θ	蛋白质-配体
4	$\Delta G_\psi^{\text{site}}$	ψ	RMSD, θ, ϕ	蛋白质-配体
5	$\Delta G_\theta^{\text{site}}$	θ	RMSD, θ, ϕ, ψ	蛋白质-配体
6	$\Delta G_\phi^{\text{site}}$	ϕ	RMSD, $\theta, \phi, \psi, \theta$	蛋白质-配体
7	$-\frac{1}{\beta} \ln(S^* I^* C^*)$	r	RMSD, $\theta, \phi, \psi, \theta, \phi$	蛋白质-配体
8	ΔG_c^{bulk}	RMSD	-	配体
9	ΔG_o^{bulk}	-	-	解析计算

相比于漏斗约束和球形约束, 采用七自由度策略结合重要性采样算法进行结合自由能计算对蛋白质-配体间的相对运动、相对取向变化和构象变化均进行了充分描述。而且在每个计算步骤中只用显式捕获一个自由度的采样, 之前计算过的其他自由度将被约束在最优的位置, 从而避免了同时考虑多个自由度的多维自由能计算, 保证了所需采样空间较小、采样充分、结果精确。这些约束的贡献(即各个自由度空间的贡献)通过后处理进行综合、严谨的扣除。因此七自由度策略结合重要性采样收敛速度快, 计算资源消耗少, 适用于复杂体系。需要注意的是如果复合物的结合-解离过程存在七自由度以外的缓慢自由度时, 应添加额外的计算以捕获体系在该自由度上的运动。七自由度策略中仅用 RMSD, 角度和距离等简单几何量定义蛋白质-配体间的自由度, 在常用的自由能计算模块, 即 Plumed^[31], Colvars^[32]和 SSAGES^[33]中均有实现, 因此被几乎所有的主流分子动力学引擎所支持。

七自由度约束, 以及上文提到的漏斗状约束和球形约束结合重要性采样算法在结合自由能计算中最主要的缺点为这些算法仅适用于配体结合在蛋白表面的复合物, 而对于配体深埋在蛋白质内部的复合物, 由于结合-解离的过程过于复杂, 用重要性采样算法难以直接进行模拟。此外, 七自由度约束策略结合重要性采样算法的另一个缺点为需要人为定义欧拉角和球面角, 这要求对蛋白质的结构有一定的预先了解, 使用起来较为复杂, 且分步策略执行繁琐, 对于非专业人士的可操作性较差。

3.3 六/七自由度约束与 alchemy 方法联用计算结合自由能

重要性采样算法不适用于结合位点在蛋白质内部的蛋白质-配体结合自由能计算. 由于 alchemy 方法直接“消失”或“生成”原子, 无需经历有物理意义的路径, 所以对于这种情况, 可以采用 alchemy 方法进行计算. Karplus 课题组提出了采用六自由度结合 alchemy 方法计算蛋白质-配体标准结合自由能的策略, 所采用的热力学循环如图 4 所示^[39].

图 4 六/七自由度约束与 alchemy 方法联合计算蛋白质-配体结合自由能的热力学循环图

Figure 4 Thermodynamic cycle of the protein-ligand binding free-energy calculation using the combination of the six-/seven-degree-of-free restraints and an alchemical algorithm

图 4 中 ΔG_{bound} 和 $\Delta G_{\text{unbound}}$ 直接由 alchemy 方法计算得到, $\Delta G_{\text{restraint},0}$ 可以通过下式计算得到:

$$\Delta G_{\text{restraint},0} = -k_B T \ln \left[\frac{8\pi^2 V \sqrt{(K_r K_\theta K_\phi K_\psi)}}{r_0^3 \sin \theta_0 \sin \phi_0 \times (2\pi k_B T)^3} \right] \quad (8)$$

其中 K 为约束力常数, 下标 0 代表初始位置. $\Delta G_{\text{restraint,bound}}$ 则需要通过 alchemy 方法进一步计算, 即通过逐渐地“消失”或“生长”约束, 计算两个态之间的自由能变化. 该策略在计算刚性小分子配体的结合自由能时有非常好的效果. 由于没有纳入 RMSD 自由度, 这使得该方法在面对柔性较大的配体时存在收敛问题.

Gumbart 等^[38]针对该问题提出了一个完整的框架予以解决, 即按照表 4 的步骤, 通过 alchemy 方法计算 ΔG_{bound} 、 $\Delta G_{\text{unbound}}$ 、 $\Delta G_{\text{restraint},0}$ 和 $\Delta G_{\text{restraint,bound}}$. 在该策略中, 可以同时向体系中“消失”或“生长”全部的七个自由度, 即 (RMSD, r , θ , ϕ , θ , ϕ , ψ), 从而极大程度上减少 alchemy 计算过程中需要采样的构象空间, 加快收敛速度, 同时约束的影响又全部通过 alchemy 方法严谨地计算得到. 该方法的步骤如表 2 所示.

与重要性采样相比, alchemy 算法收敛较慢, 因此在同等条件下, 选择重要性采样算法一般会得到略微更好的结果^[38]. Deng 等^[27]对两种策略的对比也印证了这一点. 然而, 由于使用重要性采样算法需要配体的

表 2 采用七自由度约束结合 alchemy 算法准确计算蛋白质-配体标准结合自由能的步骤

Table 2 Detailed process of the accurate protein-ligand binding free-energy calculation strategy using the combination of the seven-degree-of-freedom restraints and an alchemical algorithm

步骤	对应项	消失/生长部分	体系
1	ΔG_{bound}	配体	蛋白质-配体
2	$\Delta G_{\text{unbound}}$	配体	配体
3	$\Delta G_{\text{restraint,bound}}$	七自由度约束	蛋白质-配体
4	$\Delta G_{\text{restraint},0}(\text{RMSD 贡献})$	RMSD 约束	配体
5	$\Delta G_{\text{restraint},0}(\text{RMSD 贡献以外部分})$	无	解析计算(式 8)

结合位点在蛋白质表面, 限制较大, 基于约束的 alchemy 方法和图 4 中的热力学循环已逐渐成为计算蛋白质-配体结合自由能的标准策略^[36]. 基于该策略的一个重要发展方向为准确结合自由能计算的“流程化”和“工业化”, 从而促进准确结合自由能计算在药物设计领域的广泛应用. 为此, Sherman 和 York 课题组在 Amber 20 软件中面向药物设计的需求实现了结合自由能计算的标准流程^[37]. 由 Chodera 课题组开发的 YANK 模块在简化操作流程的同时, 结合了大量前沿的增强采样方法, 为工业上所需的高通量筛选提供了可能性^[40].

3.4 约束-拉开-释放策略

除表 1 和表 2 中介绍的基于重要性采样和 alchemy 算法的策略以外, Dill 课题组和 Gilson 课题组分别提出了约束-释放(confine-and-release)^[41]和约束-拉开-释放(attach-pull-release)^[42-43]策略. 在约束-拉开-释放策略当中, 蛋白质和配体的解离过程被分解为 3 个可逆步骤:

- 用 alchemy 算法向配体施加 (RMSD, θ , ϕ , θ , ϕ , ψ) 约束, 方法同表 2 中步骤(3);
- 用重要性采样算法, 以 r 为集合变量分离蛋白质-配体复合物, 方法同表 1 中步骤(7);
- 用 alchemy 算法释放配体的约束, 方法同表 2 中步骤(4)和(5).

可见约束-拉开-释放策略的本质为结合基于重要性采样算法和基于 alchemy 的策略. 与只使用 alchemy 的策略(表 2)相比, 将计算 ΔG_{bound} 和 $\Delta G_{\text{unbound}}$ 的步骤一步完成, 节省了计算资源. 不过该方法无法应用于配体结合位点位于蛋白质内部的体系. 针对该问题, Cruz 等人提出首先确定蛋白质中阻碍直线分离蛋白质-配体复合物的原子团, 即“障碍物”基团. 在步骤 b, 即分离蛋白质-配体之前, 采用 alchemy 方法“消失”掉障碍物基团, 从而保证分离步骤的顺利进行, 并计算该过程的自由能变化. 在步骤 b 之后采用 alchemy 方法重新“生长”回这些基团^[44]. 不过该解决方案势必会使得步骤更加复杂化, 与 3.2 和 3.3 节中阐述的步骤相比是否还有优势亟待考究.

3.5 基于质心向量和最优旋转的七自由度约束

采用七自由度方法结合重要性采样或者 alchemy 方法是一种理论严谨且实际高效的蛋白质-配体结合自由能计算策略。然而,七自由度约束依赖在蛋白质和配体中选择的参考基团,需要用户对蛋白质和配体的结构有提前的了解,且参考基团的选择有可能对结果产生影响。另外使用欧拉角表示配体的自转,在某些情况下会发生“万向锁”现象,导致欧拉角失效。为解决该问题,本课题组提出了基于质心向量和最优旋转的七自由度约束^[23],并将其应用到蛋白质-配体结合自由能计算当中。

蛋白质和配体的相对位置,即球面角,可以由连接蛋白质-配体质心的单位向量 $\mathbf{d}_{\text{unit}} = (x, y, z)$ 计算得到:

$$\begin{cases} \theta = \arccos(z) \\ \varphi = \text{atan2}(y, x) \end{cases} \quad (9)$$

为描述配体的相对旋转,即欧拉角,首先需计算由当前状态到初始状态的最优旋转四元数 (q_0, q_1, q_2, q_3) ,这一步骤与计算 RMSD 过程中求解最优旋转步骤相同^[45]。欧拉角可以通过四元数计算而得:

$$\begin{cases} \theta = \arcsin[2(q_0q_2 - q_3q_1)] \\ \phi = \text{atan2}[2(q_0q_1 + q_2q_3), 1 - 2(q_1^2 + q_2^2)] \\ \psi = \text{atan2}[2(q_0q_3 + q_1q_2), 1 - 2(q_2^2 + q_3^2)] \end{cases} \quad (10)$$

式(9)中所定义的质心向量由蛋白质和配体的质心计算而得,式(10)中所定义的欧拉角由拟合所有配体原子的最优旋转而得。因此,使用由式(9)和式(10)所定义的变量,仅需指定属于蛋白质和配体的原子,无需额外定义参考原子团,使得结合自由能计算更加便捷,且具有更好的可重复性。更重要的是,由式(10)所定义的欧拉角在结合态时, $(\theta, \phi, \psi) = (0, 0, 0)$, 由于发生万向锁时 $\theta = \pm 90^\circ$, 所以采用式(10)的定义可以最大限度的避免万向锁事件的发生。

采用上述约束同样可以利用表 1 和表 2 中所示的策略与重要性采样算法或 alchemy 算法结合,从而实现标准结合自由能计算,相关算法已在 Colvars 自由能计算模块中实现(目前被 Gromacs、Lammps 和 NAMD 所支持)。由于使用式(9)和式(10)仅需用户分别指定属于蛋白质和配体的原子,因此采用式(9)和式(10)描述的约束,表 1 和表 2 所示的策略的过程可以实现自动化。基于此,本课题组开发了 Binding free energy estimator(BFEE)结合自由能计算插件^[46],该插件仅需用户给出蛋白质-配体复合物的结构,即可自动生成计算所需的所有输入文件,待用户进行计算后,该插件可以自动进行后处理,直接计算出结合自由能,从而避免了使用六/七自由度约束过程繁琐的操作步骤。

4 无需约束的近似结合自由能计算方法

进行蛋白质-配体的准确结合自由能计算复杂且昂

贵。在许多情况下并不需要得到十分准确的结合自由能,仅需定性比较结构类似的配体与蛋白质作用能力的相对强弱。分子对接方法采用完全经验的打分函数和全局搜索算法,可以极其快速的定性判断结合能力强弱。蒋华良、罗成、郑明月、来鲁华、朱维良、王任小等课题组在该方向上进行了大量工作^[47-51]。在需要半定量的场合,采用基于终点(end-point)模拟的方法可以十分便捷地给出近似的结合能力。目前最为常用的基于终点模拟的方法为 MM-G(P)BSA 方法,侯廷军和张增辉课题组在近期的综述中对该方法进行了详细的介绍^[52]。另外,近年提出的 CL-FEP 方法^[53]将中心极限定理与自由能微扰算法相结合,使自由能微扰公式适用于终点模拟,是一种非常有潜力的近似结合自由能计算方法。

5 蛋白质-配体准确结合自由能计算方法的应用

蛋白质-配体结合自由能计算已经在药物设计、分子机器设计、超分子化学等领域得到了广泛的应用。其中,Biggin 课题组证明采用基于约束的自由能计算方法,在力场正确的条件下,计算结果可以达到化学精度($< 4.184 \text{ kJ/mol}$)^[54]。罗海彬课题组通过将六自由度约束和 alchemy 方法联用,从候选小分子中筛选出了 15 种可能与新冠病毒主蛋白作用的药物^[55]。Jorgensen 课题组通过计算蛋白质-配体的标准结合自由能,比较了不同力场和电荷策略在描述蛋白质-配体化合物中的表现^[56]。Chipot 课题组首次将计算蛋白质-配体准确结合自由能的思路拓展到蛋白质-蛋白质领域,计算了 barnase-barstar 复合物的准确结合自由能^[57]。Rizzi, Mobley 和 Chodera 课题组详尽地讨论了不同策略和软件在解决“SAMPL6 主客体结合预测挑战”上的表现^[58]。

本课题组采用基于七自由度约束和重要性采样策略,研究了纺锤菌素和 DNA 的结合能力(图 5),将准确结合自由能计算方法拓展到了任意主体-客体体系^[59]。探究了碗烯和茈在结合蛋白质能力上的差异,阐明了具有立体结构的碗烯在和蛋白质作用上的优势^[60]。由于诸多研究证明了蛋白质-配体准确结合自由能计算策略的可靠性,本课题组将蛋白质-配体标准结合自由能作为一个考察参数引入力场拟合步骤当中,并通过计算蛋白质-配体结合自由能,验证拟合的力场参数的可靠性^[61]。

鉴于准确性是蛋白质-配体结合自由能计算中最为重要、核心的问题,本文总结了部分近年的蛋白质-配体结合自由能计算与实验值对比工作,结果进一步验证了基于约束的蛋白质-配体结合自由能计算的可靠性(表 3)。

表3 基于约束的蛋白质-配体结合自由能计算与实验值的对比

Table 3 Comparison between calculated and experimental binding free energies

作者	使用策略	小分子配体个数	计算误差/(kJ·mol ⁻¹)	文献
Aldeghi 等	alchemy	11	MAE=2.5	[54]
Boyce 等	alchemy	13	RMSE=7.5	[29]
Li 等	alchemy	100	RMSE=2.59~6.44	[30]
Laury 等	alchemy	14	MAE=5.02	[62]
Xie 等	alchemy	141	RMSE=6.65	[63]
Deng 等	alchemy/重要性采样	3	AE=6.7~18 (alchemy), 6.3~14 (重要性采样)	[27]
Fu 等	重要性采样	3(十肽)	AE<1.7	[23]

图5 采用基于最优旋转的七自由度约束结合 WTM-eABF 方法计算 DNA-纺锤菌素的结合自由能

Figure 5 DNA-netropsin binding free-energy calculation by the combination of the optimal-rotation-based seven-degree-of-freedom restraints and the WTM-eABF algorithm

6 总结与展望

6.1 总结

蛋白质-配体问题由于其重要性,许多年来广受关注.本文综述了近年来在采用分子模拟准确计算蛋白质-配体结合自由能领域的进展,并对具体的方法和策略进行了简要的介绍.在实践中,一个关键的问题是如何选择对当前研究的体系最为合适的结合自由能计算方法,由于自然界中蛋白质-配体复合物的结构千变万化,所以大多数情况下都需要具体问题具体分析,本文仅根据本课题组在蛋白质-配体结合自由能计算上的经验,提出一个基本的建议(表4).

6.2 展望

大量应用实例证明,对于小分子配体,现有算法已经可以准确估计蛋白质-配体标准结合自由能.然而准确结合自由能计算仍需较长的时间才能达到收敛,导致消耗的计算资源较大,严重阻碍了该方法在实际中的应用.解决该办法的可能途径是开发新型的高效算法加快采样效率,降低计算量.近年来提出的哈密顿副本交换模拟-自由能微扰(Hamiltonian-replica exchange molecular dynamics-FEP, H-REMD-FEP)^[64],副本交换溶质退

表4 蛋白质-配体结合自由能计算方法选择建议

Table 4 Suggestion of strategies for protein-ligand binding free-energy estimation

场景	建议	说明
基于数据库的药物筛选	分子对接	效率最高
结构相似配体结合能力的定性对比	MM-G(P)BSA	效率高,使用简单
刚性小分子、结合位点在蛋白质表面	漏斗状约束或球状约束结合重要性采样方法	效率较高,使用简单,无需考虑小分子结构变化
刚性小分子、结合位点在蛋白质内部	基于六自由度约束的 Alchemy 方法	无法使用重要性采样方法,使用六自由度约束可以简单地解析计算约束贡献
柔性配体、结合位点在蛋白质表面	基于七自由度的重要性采样方法	同等条件下重要性采样算法收敛较快,需要采用七自由度策略捕获柔性配体结构变化
柔性配体、结合位点在蛋白质内部	基于七自由度约束的 Alchemy 方法	其他策略均不适合时最为“安全”的策略

火-自由能微扰(replica exchange with solute scaling, REST2-FEP)^[65], 高斯算法加速自由能微扰(Gaussian algorithm-enhanced FEP, GAFEP)^[66], 温度积分采样-metadynamics (integrated tempering sampling-metadynamics, ITS-metadynamics)^[67], well-tempered metadynamics-扩展自适应偏置力(WTM-eABF)^[68-69]等算法均是在该方向上的尝试,其中由本课题组提出的 WTM-eABF 方法已经被集成至前述的 BFEE 插件中,可以自动化进行使用.

如何将准确结合自由能计算拓展到更复杂的情况,如蛋白质-蛋白质结合自由能计算是当前亟需解决的另一个难题.由于蛋白质分子较大,对其的“消失”或“生长”不满足“微扰”条件,所以不能使用 alchemy 方法进行计算.另外,由于蛋白自身的结构远比小分子配体复杂,使用约束结合重要性采样方法时需要考虑更多自由度. Chipot 课题组在计算 barnase-barstar 复合物的结合自由能时,考虑了14个自由度,导致计算过程极其复杂和繁琐^[57].一种可能的解决途径是提出新型的几何约束方式,更加有效地表示蛋白-蛋白间的相对运动模式^[70].另一种可能的途径是仅聚焦于对最优自由能路径的探索,在得到最优自由能路径之后进一步计算结合自由能,该策略的一个显著优势是可以得到沿反应路径的能垒,从而可以同时分析蛋白质-配体的结合效率.实现该策略的核心是选择一个好的路径采样算法. Roux 课题组利用群轨迹弦方法(strings with swarm of trajectory)^[71]寻找了 barnase-barstar 复合物结合-解离的最低自由能路径,并利用该路径作为集合变量计算了准确结合自由能^[72].但是该方法依旧需要大量计算资源.通过结合图论中的路径搜索算法和重要性采样算法^[69],实现多维重要性采样计算过程中的实时(on-the-fly)路径寻找^[73]是高效寻找最优自由能路径的一个可能方法.

作者简介

付浩浩, 本科和博士均毕业于南开大学化学系。现为南开大学博士后、助理研究员。研究方向为增强采样算法开发、蛋白质-配体准确结合自由能计算策略研究和复杂体系中高度耦合的运动研究。

邵学广, 南开大学教授, 博士生导师, 1992 年获中国科学技术大学中日联合培养博士学位。2002 年获教育部第三届高校青年教师奖, 2003 年获国家自然科学基金委杰出青年基金。主要从事化学计量学及近红外光谱分析方面的研究工作。建立了小波变换和免疫算法用于复杂信号解析和在线处理的新方法以及一系列用于近红外光谱信号处理和建模的化学计量学方法。

蔡文生, 南开大学教授, 博士生导师。1994 年获中国科学技术大学博士学位。主要从事分子模拟与理论化学计算领域的研究工作, 包括优化算法、自由能计算方法、分子模拟及理论化学计算在蛋白质-配体、药物载体、分子机器中的应用研究。

References

- [1] Chipot, C. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2014**, 4, 71.
- [2] Siebenmorgen, T.; Zacharias, M. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2019**, 10, e1448.
- [3] de Ruiter, A.; Oostenbrink, C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, 61, 207.
- [4] Xu, J.; Wei, Y.; Wu, Z.; Yi, Z. *Acta Chim. Sinica* **2018**, 76, 408 (in Chinese). (徐婕, 魏雨晨, 伍智蔚, 易忠胜, 化学学报, **2018**, 76, 408.)
- [5] Cournia, Z.; Allen, B. K.; Beuming, T.; Pearlman, D. A.; Radak, B. K.; Sherman, W. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, 60, 4153.
- [6] Langan, R. A.; Boyken, S. E.; Ng, A. H.; Samson, J. A.; Dods, G.; Westbrook, A. M.; Nguyen, T. H.; Lajoie, M. J.; Chen, Z.; Berger, S.; Mulligan, V. K.; Dueber, J. E.; Novak, W. R. P.; El-Samad, H.; Baker, D. *Nature* **2019**, 572, 205.
- [7] Lemkul, J. A.; Huang, J.; Roux, B.; MacKerell, A. D. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 4983.
- [8] Fan, Q.; Liang, H.; Xu, X.; Lv, S.; Liang, Z.; Yang, Y. *Acta Chim. Sinica* **2020**, 78, 547 (in Chinese). (范勤, 梁洪涛, 许贤祺, 吕松泰, 梁尊, 杨洋, 化学学报, **2020**, 78, 547.)
- [9] Nerenberg, P. S.; Head-Gordon, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, 49, 129.
- [10] Chipot, C.; Pohorille, A. *Free Energy Calculations*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [11] Barducci, A.; Bonomi, M.; Parrinello, M. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, 1, 826.
- [12] Laio, A.; Parrinello, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 12562.
- [13] Fu, H.; Shao, X.; Cai, W.; Chipot, C. *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 3254.
- [14] Fu, H.; Shao, X.; Chipot, C.; Cai, W. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, 12, 3506.
- [15] Chodera, J. D.; Mobley, D. L. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, 42, 121.
- [16] Zwanzig, R. W. *J. Chem. Phys.* **1954**, 22, 1420.
- [17] Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1935**, 3, 300.
- [18] Limongelli, V.; Bonomi, M.; Parrinello, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, 110, 6358.
- [19] Raniolo, S.; Limongelli, V. *Nat. Protoc.* **2020**, 15, 2837.
- [20] Capelli, R.; Carloni, P.; Parrinello, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, 10, 3495.
- [21] Boresch, S.; Tettinger, F.; Leitgeb, M.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 9535.
- [22] Woo, H.-J.; Roux, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 6825.
- [23] Fu, H.; Cai, W.; Hénin, J.; Roux, B.; Chipot, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, 13, 5173.
- [24] Torrie, G. M.; Valleau, J. P. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 187.
- [25] Kästner, J. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, 1, 932.
- [26] Zong, Z.; Li, Q.; Hong, Z.; Fu, H.; Cai, W.; Chipot, C.; Jiang, H.; Zhang, D.; Chen, S.; Shao, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 14451.
- [27] Deng, N.; Cui, D.; Zhang, B. W.; Xia, J.; Cruz, J.; Levy, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20, 17081.
- [28] Aldeghi, M.; Heifetz, A.; Bodkin, M. J.; Knapp, S.; Biggin, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 946.
- [29] Boyce, S. E.; Mobley, D. L.; Rocklin, G. J.; Graves, A. P.; Dill, K. A.; Shoichet, B. K. *J. Mol. Biol.* **2009**, 394, 747.
- [30] Li, Z.; Huang, Y.; Wu, Y.; Chen, J.; Wu, D.; Zhan, C. G.; Luo, H. B. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 2099.
- [31] Tribello, G. A.; Bonomi, M.; Branduardi, D.; Camilloni, C.; Bussi, G. *Comput. Phys. Commun.* **2014**, 185, 604.
- [32] Fiorin, G.; Klein, M. L.; Hénin, J. *Mol. Phys.* **2013**, 111, 3345.
- [33] Sidky, H.; Colón, Y. J.; Helfferich, J.; Sikora, B. J.; Bezik, C.; Chu, W.; Giberti, F.; Guo, A. Z.; Jiang, X.; Lequieu, J.; Li, J.; Moller, J.; Quevillon, M. J.; Rahimi, M.; Ramezani-Dakhel, H.; Rathee, V. S.; Reid, D. R.; Sevgen, E.; Thapar, V.; Webb, M. A.; Whitmer, J. K.; de Pablo, J. J. *J. Chem. Phys.* **2018**, 148, 44104.
- [34] Ibrahim, P.; Clark, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, 55, 129.
- [35] Wang, J.; Deng, Y.; Roux, B. *Biophys. J.* **2006**, 91, 2798.
- [36] de Ruiter, A.; Oostenbrink, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 547.
- [37] Lee, T.-S.; Allen, B. K.; Giese, T. J.; Guo, Z.; Li, P.; Lin, C.; McGee, T. D.; Pearlman, D. A.; Radak, B. K.; Tao, Y.; Tsai, H.-C.; Xu, H.; Sherman, W.; York, D. M. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, 60, 5595.
- [38] Gumbart, J. C.; Roux, B.; Chipot, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 794.
- [39] Karplus, M.; Kuriyan, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 6679.
- [40] Rizzi, A.; Grinaway, P. B.; Parton, D. L.; Shirts, M. R.; Wang, K.; Eastman, P.; Friedrichs, M.; Pande, V. S.; Branson, K.; Mobley, D. L.; Chodera, J. D. "YANK: A GPU-accelerated platform for alchemical free energy calculations," can be found under getyank.org, **2020**.
- [41] Mobley, D. L.; Chodera, J. D.; Dill, K. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, 3, 1231.
- [42] Henriksen, N. M.; Fenley, A. T.; Gilson, M. K. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11, 4377.
- [43] Heinzelmann, G.; Henriksen, N. M.; Gilson, M. K. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, 13, 3260.
- [44] Cruz, J.; Wickstrom, L.; Yang, D.; Gallicchio, E.; Deng, N. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, 16, 2803.

- [45] Coutsiias, E. A.; Seok, C.; Dill, K. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1849.
- [46] Fu, H.; Gumbart, J. C.; Chen, H.; Shao, X.; Cai, W.; Chipot, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58*, 556.
- [47] Xing, J.; Lu, W.; Liu, R.; Wang, Y.; Xie, Y.; Zhang, H.; Shi, Z.; Jiang, H.; Liu, Y. C.; Chen, K.; Jiang, H.; Luo, C.; Zheng, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 1677.
- [48] Wang, Y.; Li, L.; Zhang, B.; Xing, J.; Chen, S.; Wan, W.; Song, Y.; Jiang, H.; Jiang, H.; Luo, C.; Zheng, M. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2026.
- [49] Zhang, X.; Li, X.; Wang, R. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1033.
- [50] Pei, J.; Wang, Q.; Liu, Z.; Li, Q.; Yang, K.; Lai, L. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *62*, 934.
- [51] Liu, Y.; Xu, Z.; Yang, Z.; Chen, K.; Zhu, W. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 5015.
- [52] Wang, E.; Sun, H.; Wang, J.; Wang, Z.; Liu, H.; Zhang, J. Z. H.; Hou, T. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 9478.
- [53] Ruiz-Blanco, Y. B.; Sanchez-Garcia, E. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 1396.
- [54] Aldeghi, M.; Heifetz, A.; Bodkin, M. J.; Knapp, S.; Biggin, P. C. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 207.
- [55] Li, Z.; Li, X.; Huang, Y.-Y.; Wu, Y.; Liu, R.; Zhou, L.; Lin, Y.; Wu, D.; Zhang, L.; Liu, H.; Xu, X.; Yu, K.; Zhang, Y.; Cui, J.; Zhan, C. G.; Wang, X.; Luo, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 27381.
- [56] Qian, Y.; Cabeza de Vaca, I.; Vilseck, J. Z.; Cole, D. J.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 8675.
- [57] Gumbart, J. C.; Roux, B.; Chipot, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3789.
- [58] Rizzi, A.; Jensen, T.; Slochow, D. R.; Aldeghi, M.; Gapsys, V.; Ntekoumes, D.; Bosisio, S.; Papadourakis, M.; Henriksen, N. M.; de Groot, B. L.; Cournia, Z.; Dickson, A.; Michel, J.; Gilson, M. K.; Shirts, M. R.; Mobley, D. L.; Chodera, J. D. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2020**, *34*, 601.
- [59] Zhang, H.; Gattuso, H.; Dumont, E.; Cai, W.; Monari, A.; Chipot, C.; Dehez, F. *Molecules* **2018**, *23*, 228.
- [60] Du, S.; Wang, H.; Yang, Y.; Feng, X.; Shao, X.; Chipot, C.; Cai, W. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 922.
- [61] Liu, H.; Fu, H.; Shao, X.; Cai, W.; Chipot, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 6397.
- [62] Laury, M. L.; Wang, Z.; Gordon, A. S.; Ponder, J. W. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2018**, *32*, 1087.
- [63] Xie, B.; Nguyen, T. H.; Minh, D. D. L. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 2930.
- [64] Jiang, W.; Roux, B. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2559.
- [65] Jo, S.; Jiang, W. *Comput. Phys. Commun.* **2015**, *197*, 304.
- [66] Miao, Y.; Feher, V. A.; McCammon, J. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3584.
- [67] Yang, Y. I.; Niu, H.; Parrinello, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 6426.
- [68] Fu, H.; Zhang, H.; Chen, H.; Shao, X.; Chipot, C.; Cai, W. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 4738.
- [69] Fu, H.; Chen, H.; Wang, X.; Chai, H.; Shao, X.; Cai, W.; Chipot, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 5366.
- [70] Perthold, J. W.; Oostenbrink, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 5697.
- [71] Pan, A. C.; Sezer, D.; Roux, B. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3432.
- [72] Suh, D.; Jo, S.; Jiang, W.; Chipot, C.; Roux, B. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 5829.
- [73] Brotzakis, Z. F.; Limongelli, V.; Parrinello, M. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 743.

(Cheng, B.)