

表面プラズモン共鳴装置を用いたフラグメントスクリーニング

三浦隆昭

Fragment Screening Using Surface Plasmon Resonance Optical Biosensor Technology

Takaaki MIURA

*Discovery Platform Technology Department, Research Division, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.,
200 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247-8530, Japan*

(Received September 1, 2009)

A surface plasmon resonance (SPR) optical biosensor is a label-free biophysical device which can detect molecular interaction in real time. SPR is an emerging technology for fragment screening, the first step in fragment-based drug discovery. Low levels of protein consumption and the ability to detect interactions with K_d as low as mM make this technology particularly attractive. Inherently small SPR responses due to fragment binding had been an issue but, owing to well-established experimental protocols, such responses have become readily detectable. Medium-throughput instruments are now on the market from several manufacturers that enable complete screening of a library with several thousand compounds within a few days. In fragment screening, test compounds are injected at a high concentration because of the low affinity expected for small molecules, making it likely that many false positives arise from non-specific binding to an unrelated part of the target protein. Such false positives have to be eliminated by a well-designed assay cascade so as to select true hits which can then be subjected to X-ray crystallization to obtain detailed structural information. SPR-based direct binding assays have to be developed with a sufficient binding capacity and good reproducibility with a Z' -factor larger than 0.6. In selecting hit candidates from fragment primary screens, the shape of sensorgrams, binding stoichiometry and response level to reference proteins when available must be carefully evaluated. The selected compounds from primary screening need to be further examined in terms of dose-dependence and binding competition against tight binding reference compounds to ensure that they bind to the designated site of the target protein.

Key words—surface plasmon resonance; fragment screening; promiscuous binder

1. はじめに—表面プラズモン共鳴とは

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 装置は、分子間相互作用を感度高く、かつリアルタイムで観測することができる装置で、医薬・バイオ・食品など幅広い分野で利用されている。SPR とは、金属表面を伝播するプラズマ波と光波の共鳴により生じる物理現象を指す。¹⁾ 金属中では自由電子が不規則に運動することにより電荷密度の集団的振動が起きるがこれはプラズマ波と呼ばれ、特に金属表面でのプラズマ波は表面プラズモンと呼ばれる。SPR では、この表面プラズモンに光波を共鳴させるために、普通に伝播する光より遅い光と

してエヴァネッセント波を利用している。実際のセンサーでは、センサー表面のガラスと緩衝液の間に存在する金膜に偏光を照射しエヴァネッセント波を生じさせ、SPR を観測している。SPR の起こる偏光の入射角は、金膜表面近傍の溶液の屈折率に相関しており、また屈折率の変化は溶液の質量変化に関係するため、金膜表面に固定化された分子に対する試料溶液中の分子の結合を共鳴角の変化としてとらえることができる。通常、センサーチップ上 1 ng/mm² の質量変化は、結合レスポンス 1000 RU (response unit) として表される。SPR では、相互作用する分子のうち、一方の分子を固定化する必要がある (固定化される分子をリガンド、他方をアナライトと呼ぶ) が、分子を標識することなく、また、リアルタイムで分子間相互作用を観察できるという点に特長を持つ優れた分析法である。リガンドは「固定化」されるが、実際には、代表的な SPR 装置

中外製薬株式会社研究本部創薬基盤技術研究部 (〒247-8530 神奈川県鎌倉市梶原 200)

e-mail: miuratka@chugai-pharm.co.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S29 で発表したものを中心に記述したものである。

である Biacore のセンサーチップを例にとると親水性の高い糖鎖からなるハイドロジェルの中に運動性を十分保った状態でアンカリングされているというイメージに近いことがいくつかの系で証明されている。²⁾

従来、SPR 装置を用いた低分子-タンパク質分子間相互作用解析は、感度上の問題から実施が難しかったが、近年測定プロトコールが確立されたことから、³⁾ 多くの応用例が報告されるようになった。⁴⁾ 本稿では、こうした SPR 装置を用いた低分子-タンパク質相互作用解析のうち、特にフラグメントスクリーニングへの応用について実際の側面を中心に記述した。

2. FBDD における SPR の役割

Fragment-based drug discovery (FBDD) とは、フラグメントと呼ばれる分子量 150–300 程度の小さな化合物をスクリーニング（特にフラグメントスクリーニングと呼ばれる）にかけて、標的タンパク質に対して親和性は低いが特異的に結合するフラグメントを見出し、それらフラグメントヒットを出発点として、構造化学的な情報を最大限に利用しながら、親和性が高く物理化学的な性質のよいリード化合物を創製する方法である (Fig. 1).⁵⁾ 出発点となる化合物をスクリーニングからみつけて、合成化学的に活性の高い化合物を探索するという点で全体的な流れは HTS と重なる部分が多い。しかしながら、HTS ではヒット化合物が既に IC₅₀ で数百 nM–数 μM の生物活性を有しているのに対し、フラグメントヒットは分子量が小さく、相互作用点が限られるため、通常、解離定数 (K_d) で数 mM–数 μM 程度の弱い結合親和性しか有しない点が大きく異なっている。したがって、生物学的アッセイを用いてフラグメントスクリーニングを行う場合には、弱い阻害活性を検出するために高濃度でフラグメントを添加してアッセイを行う必要があり、その結果アッセイシステムそのものが高濃度の試料により影響を受けることが問題になる。そこで、フラグメントスクリーニングには、弱い分子間相互作用も感度よく検出し、確実に結合フラグメントを同定できる生物物理学的な方法、例えば、核磁気共鳴法や X 線結晶構造解析、質量分析法、が用いられることが多い。近年、SPR がフラグメントスクリーニングの生物物理学的アッセイ法として大きな注目を集めるよう

になってきた。前項で述べた通り、SPR では結合レスポンスの大きさは結合分子の分子量にほぼ比例するため、分子量の小さいフラグメントの結合による SPR シグナルは極めて小さい。しかしながら、低分子-タンパク質相互作用解析のための SPR プロトコールは確立されており、³⁾ 標的タンパク質を十分量固定化することができればフラグメントの結合を検出することは可能である。また、最近では、創薬ターゲットとなっているタンパク質の多くは、大腸菌で発現させることが難しく、必然的に、より高次の発現系であるバキュロウィルス-昆虫細胞系や CHO 細胞、HEK 細胞などを用いてタンパク質発現・調製を行うため、NMR や X 線でフラグメントスクリーニングを実施するのに十分なタンパク質量を確保することが難しくなってきた。一方、SPR では、一回の固定化に数 μg のタンパク質しか消費しないため、タンパク質の調製が難しい場合、フラグメントスクリーニングの手段として非常に有効である。加えて近年数社から Array 型の SPR 装置が市販され、一日で数百個から数千個の化合物スクリーニングが可能になったことで、SPR をフラグメントスクリーニングに用いる報告例が増えてきた。^{6–8)}

3. SPR を用いたフラグメントスクリーニング

フラグメントスクリーニングの実施フローを図に模式的に示す (Fig. 1)。SPR を用いたフラグメントスクリーニングの実施は、一般的な低分子-タンパク質相互作用解析、例えば既に最適化された化合物の標的タンパク質に対する結合解析を調べの場合と比べ、特別な注意が必要である。というのは、フラグメントは一般に結合活性が弱く、高濃度でスクリーニングを実施することになるため、固定化した標的タンパク質への非特異的な結合が観察されるからである。これら非特異的な結合を示す化合物と特異的な結合をするフラグメントを区別して、特異的な結合フラグメントを選び出すことが極めて重要で



三浦隆昭

中外製薬株式会社創薬基盤技術研究部
主席研究員。1993 年東京大学大学院理
学系研究科修士課程修了後、日本ロシ
ュ(株)入社。1996–1998 年 F. Hoffmann-
La Roche (スイス) 出向、2002 年中外
製薬(株)、日本ロシュ(株)統合により現
職。専門分野は生物物理学的手法による
分子間相互作用解析。博士 (農学)。

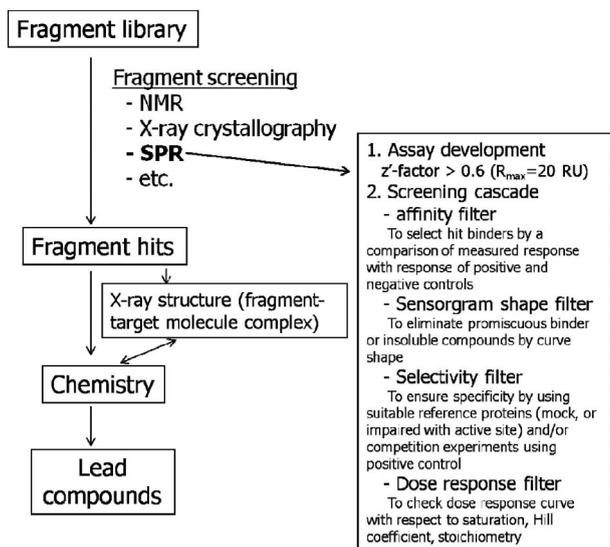


Fig. 1. Schematic Drawing of Fragment-based Approach and Fragment Screening Assay Cascade Using Surface Plasmon Resonance Technology

ある。以下、スクリーニングの各ステップにおいて顧慮すべき点について順を追って述べる。

3-1. 一次スクリーニング フラグメント一次スクリーニングの実施に当たっては、タンパク質の固定化量と化合物濃度、それからフラグメントライブラリに含まれる化合物の溶解度に注意して実験条件を決定する。

3-1-1. タンパク質の固定化量と化合物濃度

既に述べた通り、分子量の小さいフラグメントの結合による SPR シグナルは小さいため、十分なタンパク質量を固定化する系を構築することが重要である。F. Hoffmann-La Roche の Huber らは、SPR の結合アッセイ系のスクリーニングデータの信頼度を示す指標として、HTS アッセイ系の信頼度を示す指標として使われる Eq. (1) で表される Z' -factor を利用することを提案している。⁶⁾

$$Z' = 1 - \left(\frac{3 * (Stdv_{neg.control}) + 3 * (Stdv_{pos.control})}{R_{max.pos.control} - R_{neg.control}} \right) \quad (1)$$

($Stdv_{neg.controls}$, $Stdv_{pos.control}$ はそれぞれ陽性対照、陰性対照に対する結合レスポンスの標準偏差。 $R_{max.pos.controls}$, $R_{neg.control}$ は、陽性対照、陰性対照に対する結合レスポンスの平均値。)

BiacoreT100 を例にとれば、結合レスポンスの標準偏差は約 1 RU 程度なので、系の信頼度が十分と判断される Z' -factor=0.7-0.8 を確保するために必

要な結合レスポンスの最大値 (R_{max}) は 20 RU 程度であることが分かる。例えば、50 kDa の標的タンパク質を固定化し、活性保持率 50% とした場合、分子量 200 のフラグメントについて $R_{max}=20$ RU を得ようとする、必要な固定化量は 10 kRU とかなり高いことが確認できる。フラグメントスクリーニング用に SPR 系を構築する場合、精製度・比活性の高いタンパク質を用いて、可能な限り高い活性保持率で固定化できる条件を見つけ出すことが重要である。

化合物のアッセイ濃度の設定にも注意が必要である。SPR では、一点濃度でスクリーニングをする場合、化合物の親和性の高さに応じて結合レスポンスの大きさが決まる。したがって、アッセイ濃度は、検出可能な化合物の親和性の範囲に直接的に影響する。Abbott の Hajduk らは、同社の FBDD 過去データの解析から、最適化合物として分子量 500, $K_d=1$ nM の化合物を得るためには、出発点となるフラグメント分子が、例えば、分子量 250 の場合は、 $K_d=50 \mu\text{M}$ 、分子量 200 の場合は、 $K_d=150 \mu\text{M}$ 程度の結合親和性を有していることが必要であることを報告している。⁹⁾ それでは、 $K_d=150 \mu\text{M}$ のフラグメントを検出するためにはアッセイ濃度はどのくらいに設定する必要があるだろうか。ベースラインのノイズレベル ± 1 RU として、3 RU 以上の結合が有意の結合レスポンスとして検出できるとすると、 $R_{max}=20$ RU の場合、化合物濃度と結合レスポンスの関係を親和性毎に示した Fig. 2 を参考にし、必要な化合物濃度はおよそ $30 \mu\text{M}$ 程度であることが分かる。一方、化合物濃度を $100 \mu\text{M}$ に設定した場合、検出可能な化合物の親和性の上限は、およそ $K_d=500 \mu\text{M}$ であることが、同様に Fig. 2 から見積もることができる。タンパク質の固定化量が少ない、あるいは、活性保持率が低いなどの理由で、 R_{max} が 20 RU より小さい場合は、検出感が低くなるため、 R_{max} に応じて化合物のアッセイ濃度を上げる必要がある。

3-1-2. 化合物の溶解度 Biacore に代表される流路系を用いた SPR 測定装置においては、試料溶液中に固体が存在すると、バルブや流路の詰まりの原因となるため、化合物は完全に溶媒に溶解した状態で装置に添加する必要がある。試料として用いるフラグメントは通常 100% ジメチルスルホキシド

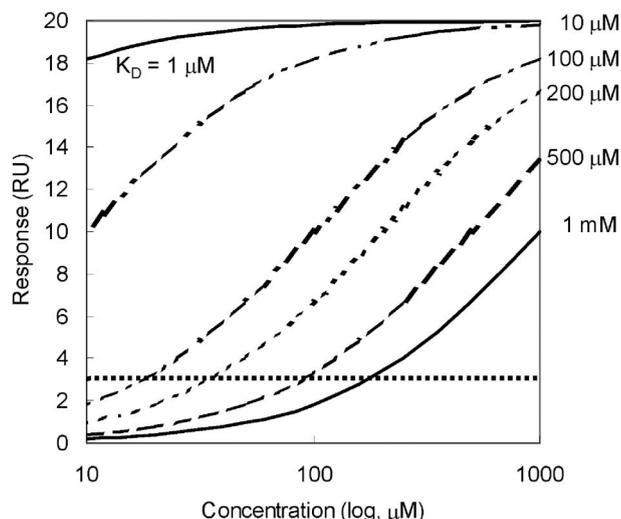


Fig. 2. Binding Responses Calculated for Various Compound Concentrations

Responses are plotted against an analyte with K_d values of 1, 10, 100, 200, 500, and 1000 μM with a concentration range of 10–1000 μM . R_{max} was set to 20 RU. The hashed bar indicates the threshold response corresponding to three times the standard deviation from an assumed noise level of ± 1 RU.

(DMSO) 中に調製されるため、フラグメントスクリーニング実施の際には、化合物の溶解を促進することを目的として、ランニング緩衝液に 3–5% (v/v) 程度の DMSO を添加する。したがって、不溶成分を含む溶液の添加を避けるために、すべての試験フラグメントに対して、あらかじめランニング緩衝液に完全に溶解していることを確認しておくか、又は、遠心ろ過を行って不溶性成分を取り除くかのいずれかを行う必要がある。

また、ランニング緩衝液に DMSO が添加されている場合、SPR に特有のいわゆる DMSO 補正の問題が生じる。DMSO は水と比べて比重が大きいため、試料溶液中の DMSO 濃度とランニング緩衝液の DMSO 濃度のわずかな違いが、試料溶液添加時に大きなレスポンス (0.01% の DMSO 濃度の違いが 13 RU に相当する) として現れてくる。タンパク質が固定化されているフローセルでは、タンパク質の容積分、この DMSO による影響が少ないため、参照セルとの差し引きだけでは、DMSO 濃度の違いによるレスポンスを完全に打ち消すことができない。フラグメントの結合によるレスポンスは極めて小さいため、こうした DMSO 濃度の違いによる影響のために検出が不可能になる場合がある。そこで、あらかじめ DMSO 濃度の異なる溶液を装置に添加して、それらの与える影響を補正できるよう

にしておく。DMSO 補正の実施については、Frostell-Karlsson らの論文に詳しい。³⁾

3-2. 一次スクリーニングからのフラグメントヒットの選択 一次スクリーニングの結果から、フラグメントヒットを選択する際には、結合レスポンスの大きさ、センサーグラムの形状、参照タンパク質への結合量との比較を考慮する。

3-2-1. 結合レスポンスに基づいたフラグメントヒット候補の選択 フラグメントヒット候補化合物の選択には第一に、化合物添加時の結合レスポンスの大きさを用いる。結合レスポンスに基づいたフラグメントヒットの選定のための閾値の設定には 2 つの方法がある。一つは、ベースラインのノイズレベルの標準偏差 (概ね ± 1 RU 程度になることが多い) を計算し、その値の 3 倍以上の結合レスポンスを与えた化合物は有意な結合と見てフラグメントヒットとして扱う方法。もう一つは、結合レスポンスを部分占有率 (Fractional occupancy, FO) に変換して、ある一定値以上 (例えば 40% 以上) を示したフラグメントをヒットとして選択する方法である。

FO は、スクリーニング実施時に加えている陽性対照の K_d 並びに結合レスポンスから、結合レスポンスの最大値を計算し、この値とあらかじめ分子量で補正した各アナライトの結合レスポンスとの比をとることにより算出できる。FO を使えば、固定化量や標的タンパク質の大きさ、固定化したタンパク質の活性保持率など実験毎に異なる個々の結合レスポンスによらず、0–100% という一定のスケールに換算することができるので、データ処理上、この方法を採用した方が便利ことが多い。FO は、HTS のパーセント阻害に対応する値と考えることができる。

3-2-2. センサーグラムの形状の確認 ある閾値以上を示したフラグメントについては、次に、個々の試料添加時のセンサーグラム形状を検討する。フラグメントの結合親和性は一般に低いので、結合解離ともに速い矩形の結合パターンを示すことが予想される [Fig. 3(a)]. ところが、実際には理想的な結合解離のパターンを示す化合物のほかに、様々な形のセンサーグラムがみられる。例えば、非常に遅い結合・解離を示し化学量比 1 をはるかに越える大きな結合レスポンスを与えるものや形が非常に乱れているものなどである [Figs. 3(b) and (c)]. これら多くはタンパク質表面への非特異的な結合や溶

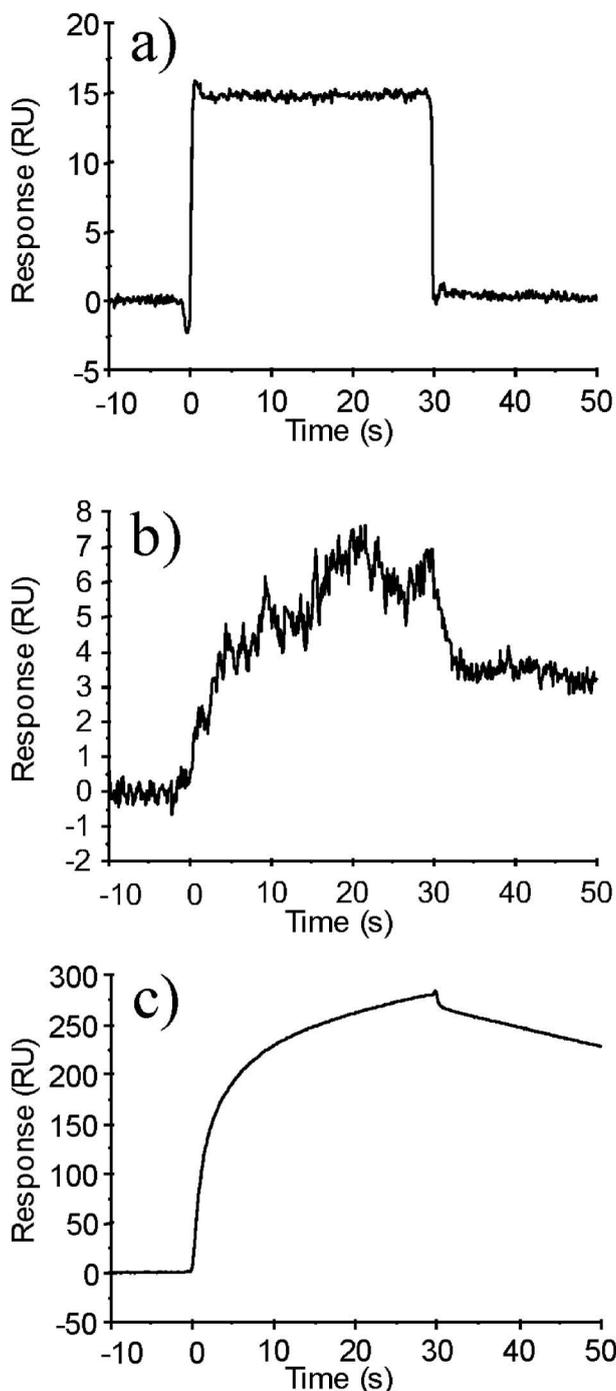


Fig. 3. Examples of Sensorgrams Observed in Fragment Primary Screening

a) The ideal sensorgram expected for true fragment hits. Association and dissociation are very rapid returning to baseline immediately after cessation of an injection. b) A sensorgram with a distorted shape. Test fragment expected is not fully dissolved. c) A sensorgram with a high binding response. Micelle formation of the test fragment is expected with slow association/dissociation with a binding stoichiometry exceeding 1.

液中に微量に含まれる不溶成分によるものであるため、対応するフラグメントは、この段階で考慮から外すことが望ましい。SPR装置による非特異的な

結合とセンサーグラムの形状の関係については、Giannettiらの論文に詳しい。¹⁰⁾

3-2-3. 対照タンパク質との結合量の比較

Biacoreに代表されるSPR装置のプラットフォームでは複数の相互作用解析スポット（又はフローセル）に異なるタンパク質を固定化することにより、同一の化合物溶液に対する結合を同時に観察することができる。そこで、一次スクリーニング実施の際に、標的タンパク質の活性部位に変異の入った不活性型や、自殺基質型の阻害剤であらかじめ活性部位をブロックしたもの、又は、こうした不活性型のタンパク質が利用できない場合は標的タンパク質と全く無関係の例えばグルタチオン転移酵素（GST）など、を対照タンパク質として利用し、標的タンパク質に対してのみ結合を示すフラグメントをヒット候補として選択することができる（Fig. 4）。⁶⁻⁸⁾しかしながら、例えば点変異による不活性型変異体を対照タンパク質として用いる場合、活性部位内の変異の入った場所とは別の相互作用部位で結合しているフラグメントを除去してしまう可能性もあるため、このフィルターを適用する際は、例えば、標的タンパク質と対照タンパク質における結合レスポンスの大きさの比のクライテリアを2程度とするなど選択基準を厳しくしすぎないことが必要である。

3-3. 濃度依存性と結合位置の確認 一次スクリーニングでヒット候補化合物として選択されたフラグメントに対しては、1) 濃度依存性と2) 陽性対照化合物との競争実験による結合位置、の2つの確認実験を実施し、これら2つのフィルターを通過した化合物を最終的なフラグメントヒットとして結晶構造解析やNMR解析など次の評価を実施する。

3-3-1. 結合の濃度依存性 この実験では6-8点の異なる濃度で試験フラグメントを添加し、それぞれの濃度において取得したセンサーグラムを重ね合わせる、又は結合レスポンスを濃度に対してプロットするいわゆる結合等温曲線を見ることにより、化合物の固定化タンパク質に対する結合の濃度依存性を確認するものである。リガンド：アナライトの1:1の理想的な結合等温曲線では、Hill係数は1付近で、化合物濃度が解離定数以上に増加するにつれ、結合が飽和することにより、結合量が一定の値に収束する[Fig. 5(a)]。したがって、各フラグメントの濃度依存性が理想的なものと近いかどうかを

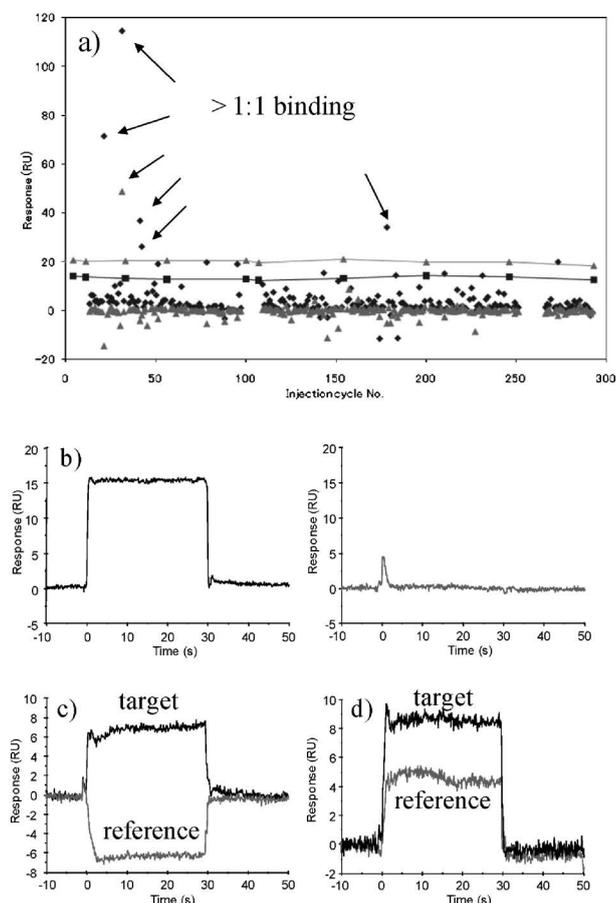


Fig. 4. Use of a Reference Protein to Identify Nonspecific Binders

a) Representation of the screening results of a 384-well plate. Binding responses for the target protein and the reference protein are shown in black and gray, respectively. Response data points connected by solid lines are the responses from reference compounds. The arrows indicate compounds that showed typical promiscuous binding greater than a binding stoichiometry of 1. b) Ideal example where binding is observed only for the target protein (left panel) and not for the reference protein (right panel). c) An example of a negative response of a reference protein. Limited solubility or non-specific binding of the fragment is expected. d) An example of a nonselective binder with binding to both the target and reference proteins.

確認し、例えば、Hill 係数の大きなフラグメントなどは非特異的な相互作用をしている可能性が高いと考えて取り除くことになる [Figs. 5 (c) and (d)]. 活性部位のポケットが比較的硬く活性に重要な相互作用が明確に規定されている例えば Kinase のアデニン結合部位、いわゆる Hinge 結合部位に対してなど理想的な結合濃度依存性を示すフラグメントが多数見つけてくることが考えられる。しかしながら、より一般的には、フラグメントの親和性が低く、濃度依存性を見るためにしばしば数百 μM 程度の高い濃度で化合物を添加するため、本来の結合部位とは別の結合親和性の低い第 2 の結合部位に対す

る結合も同時に見えてくることが多く、明確な結合飽和点を示さないフラグメントも多い。こうした挙動を示すフラグメントに対しては、陽性対照化合物の結合曲線から算出した R_{max} 以上の結合レスポンスを示したポイントを除いて、フィッティングを行う必要がある。濃度依存性実験の具体例を Fig. 5 に示す。

3-3-2. 競争実験 フラグメントの結合特異性を確認するのに最も有効なのがこの競争実験である。この実験では、3つの異なる試料溶液を固定化タンパク質上に添加して得られた結合レスポンスを比較する。まず、活性部位に結合することが既知の陽性対照化合物を飽和濃度で添加する。次にテストフラグメントを単独で添加する。そして、最後に両者の混合物を添加する。テストフラグメントが活性部位に結合している場合は、混合物添加の際、テストフラグメントの結合が陽性対照化合物により阻害されるため、観察される結合レスポンスは陽性対照化合物単独で添加した場合とほとんど変わらない。一方、両者が異なる結合部位に結合している場合には、混合物の結合レスポンスは、それぞれの化合物を単独で添加したときの結合レスポンスの和にほぼ等しくなるはずである。競争実験の例を Fig. 6 に示す。SPR 実験においては、生物学的な酵素アッセイや結合アッセイと異なり、特定の基質、リガンドに対する競合性を見ている訳ではないので、理論的には任意の2つの化合物同士について競合実験を実施することが可能である。したがって、フラグメントヒット同士について競合実験を実施することにより、個々のフラグメントヒットの結合部位をマッピングすることも可能である。⁶⁾ 一方、本実験を行うためには、あらかじめ標的タンパク質に対する適切な陽性対照化合物が知られていることが必須なので、そのような化合物がないときには本実験が実施できないことが問題である。このような場合、SPR 実験だけでなく、核磁気共鳴法 (NMR) や等温滴定カロリーメトリー (ITC) など異なる原理の物理化学的方法を組み合わせ、得られたフラグメントヒット化合物が想定した結合部位に特異的に結合しているかどうかについて十分に検証することが必要である。

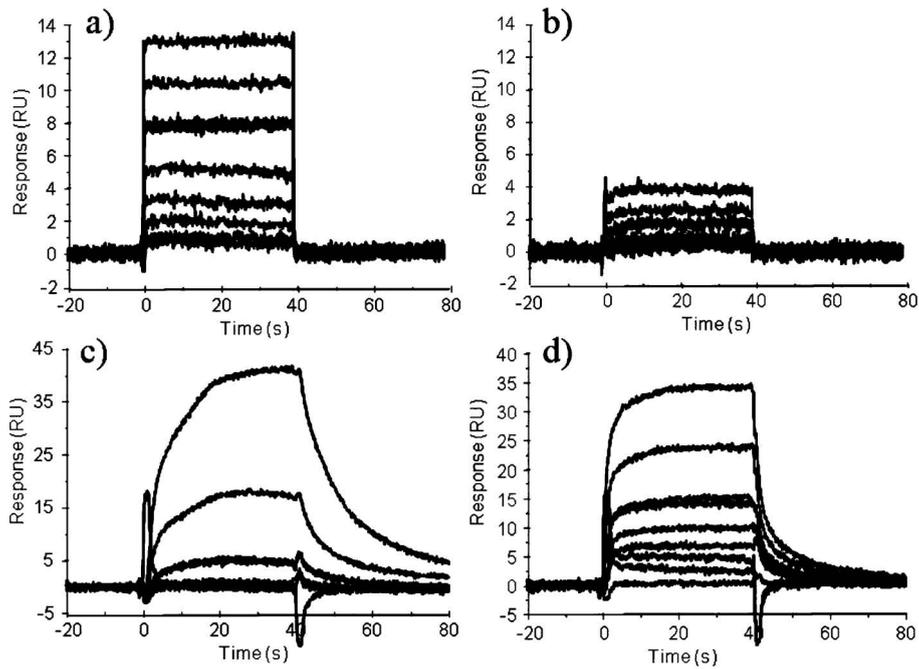


Fig. 5. Examples of Sensorgrams from Dose-dependence Experiments

a) Ideal 1 : 1 binding with fast association and dissociation and with binding saturation. b) 1 : 1 binding was expected but no saturation was observed within the range of concentrations tested. c) Compound aggregation or unspecific binding is suspected. Slow association and dissociation was observed with a Hill coefficient larger than 1. d) Compound aggregation or unspecific binding is expected at higher concentrations.

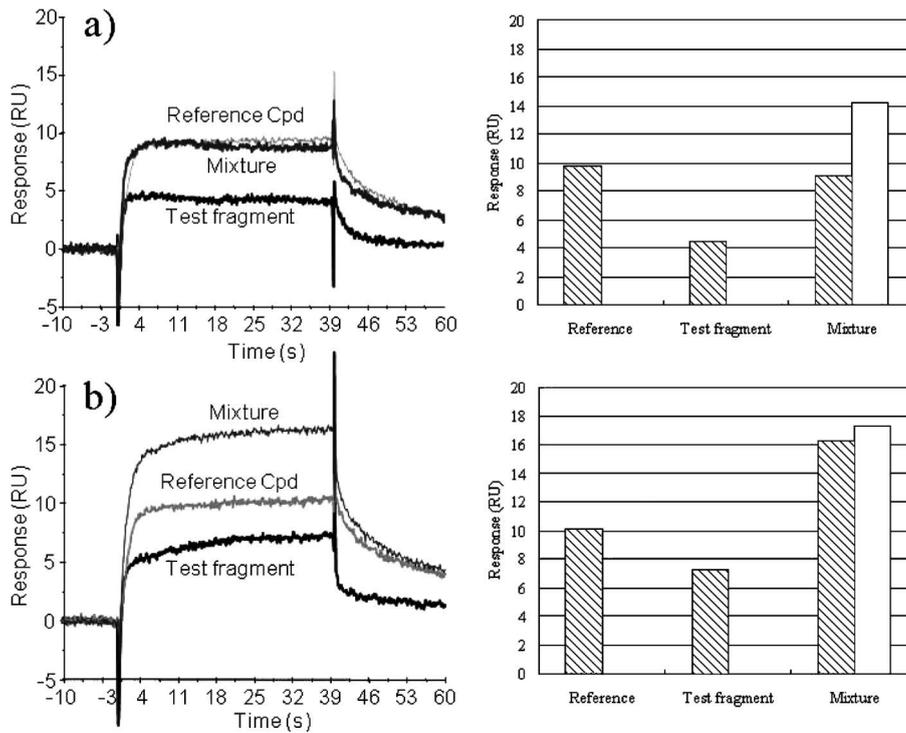


Fig. 6. Competition Experiments between a Reference Compound and Fragments

Sensorgrams (left panel) and response values (right panel) are shown for two competition experiments. The reference compound and fragment bind to the same site (a) and different sites (b). Response levels at 50 sec after the injection were used as representative values for comparison (right panel). The measured responses for the fragments, the reference and the mixtures are shown by hashed bars. The calculated responses for the mixture expected for different binding sites are shown by white bars.

4. おわりに

本稿では、まず、スループットや必要なタンパク質量が少ないなど、SPRを用いてフラグメントスクリーニングを実施することの利点について簡単に述べた後、SPRを用いたフラグメントスクリーニング実験を実施する際の具体的な注意事項、特に非特異的に結合するフラグメントを取り除き、真のフラグメントヒット化合物を選択するためにどのようなフィルターをどういう基準で用いるかについて詳述した。具体的には、一次スクリーニングにおいては、結合量、センサーグラムの形状、参照タンパク質に対する結合量、また、二次スクリーニングにおいては、結合の濃度依存性、陽性対照化合物との競争実験、という5つのフィルターを適切に用いることが必須であることを述べた。FBDDの成功のためには必須と考えられるフラグメント-標的タンパク質の複合体X線結晶構造を得るために、スループットの比較的高いSPR装置を用いて数千のフラグメントに対するプレスクリーンを行い結合特異性の保証されたフラグメントをあらかじめ選択しておく意義は高い。また、結晶構造解析が成功しない場合でも、得られたフラグメントヒットの構造を基に部分構造検索などを実施し、SPRによるアッセイデータを基準に、より親和性の高い化合物を探索して、リード化合物候補となる化合物を選択することも可能である。

REFERENCES

- 1) Kawada S., "Seitaibusshitsu Sougo Sayou no Real Time Kaiseki Jikken Hou," ed. by Nagata K., Handa H., Springer-Verlag, Tokyo, 1998, pp13-26.
- 2) Day Y. S., Baird C. L., Rich R. L., Myszkka D. G., *Protein Sci.*, **11**, 1017-1025 (2002).
- 3) Frostell-Karlsson A., Remaeus A., Roos H., Andersson K., Borg P., Hämäläinen M., Karlsson R., *J. Med. Chem.*, **43**, 1986-1992 (2000).
- 4) Rich R. L., Myszkka D. G., *J. Mol. Recognit.*, **21**, 355-400 (2008).
- 5) Hajduk P. J., Greer J., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **6**, 211-219 (2007).
- 6) Perspicace S., Banner D., Benz J., Muller F., Schlatter D., Huber W., *J. Biomol. Screen.*, **14**, 337-349 (2009).
- 7) Nordström H., Gossas T., Hämäläinen M. D., Källbrad P., Nyström S., Wallberg H., Danielson U. H., *J. Med. Chem.*, **51**, 3449-3459 (2008).
- 8) Hämäläinen M. D., Zhukov A., Ivarsson M., Fex T., Gottfries J., Karlsson R., Björsne M., *J. Biomol. Screen.*, **13**, 202-209 (2008).
- 9) Hajduk P. J., *J. Med. Chem.*, **49**, 6972-6976 (2006).
- 10) Giannetti A. M., Koch B. D., Browner M. F., *J. Med. Chem.*, **51**, 574-580 (2008).