Новые ингибиторы тромбина: молекулярный дизайн с использованием суперкомпьютеров и экспериментальное подтверждение активности

А. Н. Романов[1], В. Б. Сулимов[1], О. А. Кондакова[1], А. В. Сулимов[1], Ф. В. Григорьев[1], Е. И. Синауридзе[2], Ю. В. Кузнецов[3], В. В. Воеводин[1], Ф. И. Атауллаханов[2]

[1]Научно-исследовательский вычислительный центр МГУ, Москва,
[2]Гематологический научный центр РАМН, Москва,
[3]Институт органической химии им. Зелинского РАН, Москва

В настоящее время становится общепризнанным, что современные лекарственные средства должны избирательно воздействовать на определенные белки в организме человека, отвечающие за то или иное заболевание, не затрагивая остальные органы и ткани. Блокировать работу поврежденного белка можно путем заполнения его активного центра малой органической молекулой — ингибитором. Таким образом, начальный этап создания нового лекарства заключается в нахождении подходящего ингибитора для активного центра выбранного белка-мишени.

Значительные достижения в области изучения строения генов в последние десятилетия привели к экспоненциальному росту числа потенциальных терапевтических белков-мишеней, доступных для исследования. В то же время в фармацевтической индустрии значительно возросли временные и финансовые затраты для того, чтобы пройти путь от нахождения соединения-лидера (хорошего активного ингибитора) до официального одобрения лекарства и вывода его на рынок. При этом основные затраты приходятся на начальную стадию разработки лекарства — определение соединения-лидера. Поэтому основные усилия компаний, работающих в данной области, направлены на сокращение времени создания потенциальных кандидатов в лекарство и увеличение их количества. Значительную помощь в решении данных проблем может оказать использование компьютеров для поиска соединений-лидеров. Начиная с конца 90-х гг. прошлого века, отбор потенциальных кандидатов с помощью компьютерных программ или «виртуальный скрининг» является реальной альтернативой традиционным методам поиска,

принятым в фармацевтической промышленности. В ходе процедуры виртуального скрининга химическое соединение (лиганд) позиционируется в активном центре протеина. Позиционирование осуществляется путем поиска глобального минимума на сложной энергетической поверхности протеина. Учитывая большое количество внутренних степеней свободы лиганда, решение задачи глобальной минимизации становится нетривиальной проблемой. Даже применение эвристических стратегий поиска не позволяет сократить количество вычислений ниже 10^8—10^9. Процедуру виртуального скрининга можно ускорить, применяя технологии распределенных вычислений на суперкомпьютерах любой архитектуры.

Существует целый ряд обзорных статей, посвященных подробному описанию методологии компьютерного моделирования лекарственных средств [1—4]. Поэтому в данной статье хотелось бы только привести краткое описание процедуры виртуального скрининга. Данная процедура состоит из следующих этапов:

1. Выбор белка-мишени и исходного набора органических соединений.

2. Подготовка исходных данных для последующей компьютерной обработки.

3. Позиционирование набора соединений в белке-мишени (процедура докинга).

4. Ранжирование соединений по значению оценочной функции (процедура скоринга).

5. Последующая обработка полученных результатов.

6. Отбор ряда соединений для синтеза и экспериментальной проверки.

Такая схема является в настоящее время традиционной и в зависимости от разных исследовательских групп может различаться только используемыми программами и способами подготовки и обработки данных.

Подготовка исходных данных

Начальным этапом процесса виртуального скрининга является стадия выбора и подготовки исходных данных: белков-мишеней и набора органических соединений, среди которых будет проводиться поиск. В качестве исходного набора органических

веществ могут выступать коллекции физически доступных соединений, которые могут быть заказаны и получены как от компаний, занимающихся продажей химических веществ, так и от некоммерческих организаций. Наиболее подробный список доступных баз данных такого рода можно найти в информационной системе MDL (http://www.mdli.com). Примером такой коллекции может служить база данных Национального института рака США NCI diversity [5]. Другой тип — это так называемые виртуальные библиотеки, где соединения конструируются из определенных элементарных блоков. Такие соединения могут впоследствии быть синтезированы, поскольку элементарные блоки, из которых они создаются, являются реагентами или веществами, содержащимися в базах данных химических компаний.

Основной ресурс, в котором содержаться все общедоступные кристаллические структуры белков — это Protein Data Bank [6] (www.rcsb.org/pdb). Данный ресурс содержит информацию о том, кто и когда получил и расшифровал структуру данного белка, когда данные были впервые опубликованы, разрешение с которым определялась кристаллическая структура и параметры эксперимента по рентгеновской дифракции, классификация белка и описание молекулярной структуры и биологических функций. Также содержаться файлы с координатами структуры белка и лиганда, химические компоненты, находящиеся в активном центре, изображение комплекса, а также масса другой информации, полезной при изучении данной мишени. В настоящее время в базе данных PDB содержится более 40 000 кристаллических структур комплексов протеин-лиганд.

Для использования исходного набора соединений в последующей процедуре докинга необходима предварительная подготовка входящих в этот набор структур. Прежде всего, необходимо сгенерировать трехмерные структуры молекул, включая все их возможные таутомерные формы. Для генерации трехмерных структур можно использовать такие программы, как например Corina [7]. Помимо этого молекула должна находиться в зарядовом состоянии, соответствующем степени кислотности среды, в которой проводиться докинг. Это достигается удалением или добавлением протона в определенных группах молекулы.

Белки-мишени также требуют определенной подготовки, которая во многом зависит от используемой программы докинга.

Во многих случаях, необходимо расставить атомы водорода на аминокислотных остатках и тщательно проверить зарядовые состояния остатков, расположенных в активном центре протеина.

Процедура докинга

Одна из основных трудностей при проведении процедуры докинга — это учет внутренних степеней свободы лиганда и протеина. Существующие на сегодняшний день программы докинга можно разделить на три группы в зависимости от того, каким образом в них учитываются внутренние степени свободы лигандов.

К первой группе относятся программы, использующие систематические методы: метод малых приращений, конформационный поиск и использование баз данных. В основе систематических методов лежит попытка перебора всех степеней свободы молекулы, что зачастую приводит к проблеме комбинаторного взрыва, поэтому были разработаны методики постепенного построения (приращения) лиганда внутри активного сайта. Одна из наиболее распространенных методик — это разделение лиганда на жесткую часть, которая позиционируется в активном центре, и гибкие фрагменты, которые постепенно пристраиваются к данному ядру. По данному принципу построены программы DOCK, FlexX, Glide [8—10].

Другой метод — это использование библиотек заранее рассчитанных конформаций. В таком случае проблема сводиться к процедуре докинга заранее оптимизированного и жесткого лиганда в активный центр. Данная методика используется в такой программе как FLOG [11].

Вторая группа — методы случайного поиска или стохастические методы. К ним относятся моделирование методом Монте-Карло, генетический алгоритм и табу поиск. В данных алгоритмах случайным образом меняется конформация лиганда или группы лигандов, а затем оценивается энергия взаимодействия получившейся структуры с активным центром протеина. Наиболее распространенными в данной группе являются метод Монте-Карло и генетический алгоритм. Они используются в программах AutoDock, DOCK, Gold [12—15]. Несколько отличную идеологию имеет метод табу поиска. Основная идея данного

алгоритма заключается в анализе исследованного ранее конформационного пространства группы лигандов. Критерием отбора нужной структуры служит величина среднеквадратичного отклонения вновь определенных значений координат данного соединения от координат этого же вещества, полученных ранее. Одним из примеров реализации данного алгоритма служит программа PRO_LEADS [16].

И наконец, третья группа — это прямые методы моделирования: молекулярная динамика и минимизация энергии. Молекулярная динамика — это наиболее популярный метод моделирования, но зачастую молекула может не преодолеть энергетический барьер за разумное время расчета и лиганд будет позиционирован в локальном минимуме.

Процедура скоринга

Оценка энергии взаимодействия белок-лиганд и ранжирование предсказанных конформаций лигандов (скоринг) — это ключевой аспект виртуального скрининга. Скоринг должен отделять «настоящие» лиганды от «ложно позитивных», т. е. лигандов, которые, несмотря на значение оценочной функции, предсказывающее их активность, не будут проявлять таковой в эксперименте. Также как и для докинга существует три типа оценочных (скоринг) функций.

Первый тип — это физические или основанные на силовых полях функции (force-field based). Такого рода функции определяют сумму двух энергий: энергии взаимодействия протеин-лиганд и внутренней энергии лиганда. Наиболее часто взаимодействие между лигандом и протеином описывается только Ван-дер-Ваальсовым и электростатическим членами, пренебрегая энтропийными эффектами. Кроме того, возникает проблема учета эффектов связанных с участием растворителя в протеин-лиганд взаимодействии. Наиболее известные силовые поля, на которых строятся скоринг-функции это Tripos, Amber и MMFF94 [17—19].

Второй тип — эмпирические скоринг-функции, которые параметризуются таким образом, чтобы адекватно воспроизводить экспериментальные результаты, например, энергии связывания протеин-лиганд или энергии конформаций лигандов. Функцио-

нальная форма таких функций обычно проще, чем у физических, и состоит из суммы некоррелирующих членов. Такой тип скоринг-функции используется, например, в программа LUDI [20].

Третий тип — функции, основанные на базах знаний (knowledge-based). Идеология данного типа функций сходна с предыдущим типом, но в данном случае делается попытка воспроизвести экспериментальные структуры, а не энергии взаимодействия. Подобные функции включены в программы PMF и DrugScore [21, 22].

Обработка результатов и отбор соединений

В настоящее время на этом этапе компьютерные методы играют лишь вспомогательную роль, а основная нагрузка по-прежнему ложится на самих исследователей. Существует ряд программно реализованных физических фильтров, таких как оценка лекарственного подобия, токсичности, растворимости, которые могут быть использованы в ходе последующего отбора соединений. Также можно применять геометрические и статистические критерии для выбора наиболее перспективных лигандов. Однако, чаще всего, исследователю приходиться ориентироваться на свою химическую интуицию или имеющиеся знания, чтобы отобрать для последующего синтеза вещества, которые со значительной долей вероятности проявят свои ингибирующие качества в экспериментах.

Система молекулярного моделирования KeenBASE

Система молекулярного моделирования KeenBASE была разработа для того, чтобы помогать разработчикам новых лекарств находить новые ингибиторы для заданных белков-мишеней с помощью компьютерного моделирования **in silico**. При этом применение этой системы не ограничивается только областью фармацевтики, но относится также к сельскому хозяйству (разработке гербицидов), ветеринарии и экологии. Общая схема работы программного комплекса KeenBASE приведена на рис. 1. Легкость в перенастройках создаваемой системы позволяет быстро переключаться на новые белки-мишени и значительно расширить круг потенциальных пользователей. Схема работы системы в общем виде соответствует общепринятой схеме виртуального

скрининга. Сложность и точность, используемых в системе алгоритмов, приводит к тому, что время расчета одного лиганда существенно возрастает и может составлять от 1 до 100 часов на одном процессоре. Для того, чтобы иметь возможность анализировать базы данных, содержащие тысячи молекул, в наш комплекс была встроена система распределенных вычислений X-Com (разработка лаборатории профессора В. В. Воеводина НИВЦ МГУ). Эта система позволяет одновременно производить расчет группы лигандов на различных кластерных платформах и персональных компьютерах независимо от того, какая операционная система на них установлена.

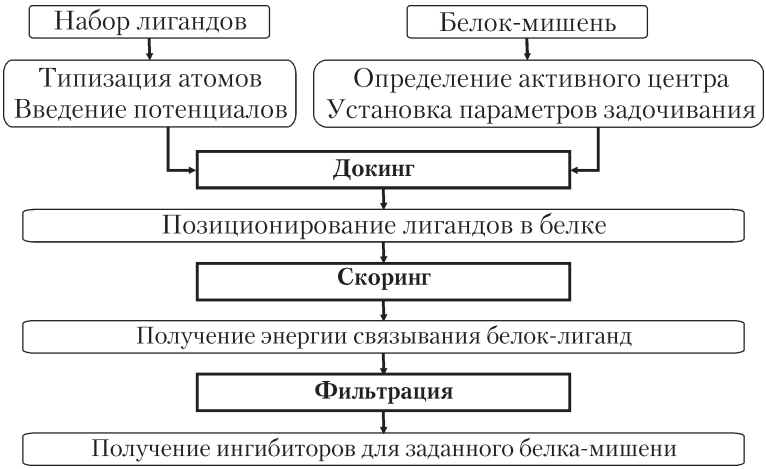


Рис. 1. Общая схема работы системы KeenBASE

Генетический алгоритм

Основным вычислительным модулем программного комплекса KeenBASE является программа докинга SOL [23], основным алгоритм которой — генетический алгоритм. Перед генетическим алгоритмом глобальной оптимизации стоит задача нахождения глобального минимума общей энергии в пространстве размерностью $N+6$, где N — количество внутренних степеней свободы лиганда. Под общей энергией мы понимаем сумму внутренней энергии лиганда и энергии лиганда в потенциальном поле протеина. Цифра 6 учитывает сумму трех вращательных и трех поступательных

степеней свободы при движении лиганда как целого. Понятно, что даже при умеренной сложности молекулы лиганда (N=5–6) проблема поиска глобального минимума функции в пространстве размерностью более 10 является непростой задачей.

Суть генетического алгоритма заключается в моделировании процессов эволюции по Дарвину некоей популяции, составленной из отдельных особей. Под особью мы понимаем лиганд в одной из возможных конформаций и его положение в активном центре. Наследственность каждой особи или генотип, который служит критерием для естественного отбора, представляет собой одномерный массив a_i вещественных чисел (генов) в диапазоне от 0 до 1 — хромосому. Каждая хромосома однозначно определяет положение лиганда в пространстве, при этом величина каждого гена соответствует нормированной на 1 величине соответствующей степени свободы лиганда. Так, например, если лиганд имеет 4 внутренних степени свободы, то его хромосома состоит из 10 генов, из которых 4 описывают внутренние вращения в лиганде, 3 — его перемещение как целого и 3 — вращение лиганда как целого.

Первоначальная популяция особей создается заполнением генов всех хромосом при помощи генератора случайных чисел. После этого происходит подсчет полной энергии для каждой особи и лучшие особи с минимальной энергией отбираются в так называемый mating pool, где они участвуют в создании нового поколения особей. Новое поколение формируется из особей mating pool при помощи трех генетических операторов — скрещивания, прямого переноса и мутации. **Скрещивание** представляет собой создание новой хромосомы из двух родительских хромосом путем случайного объединения их генов. Все остальные особи создаются путем **прямого переноса** из mating pool. Затем на образованную таким образом популяцию действует оператор мутации. **Оператор мутации** с некоторой вероятностью подвергает случайному изменению значение гена в хромосоме. Наряду с описанными операторами осуществляется также **прямой перенос элиты** (особей с наименьшей общей энергией) из предыдущего в последующее поколение. Это операция проводиться во избежание утери уже найденных в процессе оптимизации лучших решений. Описанная процедура смены поколений повторяется заданное пользователем число раз. Для того чтобы

еще более стимулировать исследование разнообразных областей энергетической поверхности и предотвратить преждевременную концентрацию процесса поиска вокруг локального минимума, в алгоритме реализована так называемая концепция **нишинга**. Она предусматривает наблюдаемое в природе ослабление конкуренции между особями, занимающими различные экологические ниши, т. е. сильно друг от друга отличающимися по генотипу. Нишинг провоцирует разнообразие особей в популяциях и предотвращает преждевременное попадание поиска в локальный минимум.

В ходе работы программы процедура вызова генетического алгоритма совершается определенное число раз, получая несколько решений. Анализ взаимного положения этих решений важен для выяснения качества работы программы и корректности полученных результатов. С этой целью производится кластеризация найденных решений соответственно их расположению. Для этого вычисляется матрица среднеквадратичного отклонения (RMSD) решений друг от друга. После получения матрицы RMSD происходит процедура кластеризации — решения, RMSD между которыми не превышают некоторой заданной величины (обычно 1 Е), собираются в один кластер. Кластеризация выявляет качество докинга. Если имеется небольшое количество многонаселенных кластеров, то можно считать, что докинг произведен успешно. Если кластеров много и они содержат небольшое количество решений, то, возможно, глобальный минимум не найден и необходим новый запуск программы с другими параметрами.

Для подтверждения корректности физических и математических закономерностей, заложенных в программу докинга, было проведено специальное исследование, называемое валидацией программы. Результаты валидации приведены на сайте www.keenbase.ru и они показывают, что точность позиционирования лигандов с помощью нашей программы соизмерима с точностью существующих мировых аналогов. Так для нативных лигандов тромбина, взятых из базы данных PDB, точность позиционирования составляет порядка 1.6 Е. Также по результатам валидации был определен размер кубической области, в которую осуществляется позиционирование лиганда. В наших расчетах ребро куба составляет 22 Е или 101 точку сетки и включает в

себя активный центр протеина и окружающие его аминокислотные остатки.

Энергия лиганда в поле протеина дает указание на прочность комплекса протеин-лиганд. Чем ниже эта энергия, тем интереснее данный лиганд. Однако при оценке прочности связывания нужно принимать во внимание и энтропийные факторы, возникающие из-за ограничений степеней свободы лиганда при его связывании с протеином. Поэтому, для окончательной оценки прочности связывания лиганда с протеином в программе докинга используется скоринг-функция, имеющая следующий вид:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha E_{VdW} + \beta E_{ES} + \delta G_{GB(\text{protein-ligand})} +$$
$$+\varepsilon G_{\text{proteindesolvation}} + \mu G_{\text{liganddesolvation}} + E_{\text{ligandinner}}$$

где E_{VdW}, E_{ES} — Ван-дер-Ваальсово и электростатическое взаимодействия между протеином и лигандом, которые описываются в рамках модели силового поля MMFF94. $G_{GB(\text{protein-ligand})}$ – потенциал экранирования электростатического взамодействия зарядов протеина с зарядами лиганда, $G_{\text{proteindesolvation}}$, $G_{\text{liganddesolvation}}$ — потенциал десольватации соответственно протеина и лиганда и описываются в рамках приближения обобщенного Борна [24]. Значения скоринг-функции рассчитываются для каждого полученного генетическим алгоритмом решения.

Разработка новых ингибиторов тромбина

Нарушения процесса свертываемости крови — одна из распространенных проблем, с которыми сталкивается современная медицина. Образование нежелательных тромбов угрожает, например, пассажирам, совершающим длительные авиаперелеты (так называемый синдром экономического класса), а также пациентам, проходящим процедуру гемодиализа или возмещения большой кровопотери. Кроме того, в группу риска входят все люди старше 60 лет. Ключевым ферментом в сложной системе свертываемости крови является тромбин. Именно он производит превращение белка фибриногена, в фибрин, который и образует основу тромба. Казалось бы, наиболее очевидный путь подавить нежелательное образование тромба — блокировать работу тромбина — т. е. найти прямой ингибитор этого фермента.

Но, как ни странно, все современные антикоагулянты (лекарственные вещества, предотвращающие или замедляющие свертывание крови), применяемые в нашей медицинской практике реализуют другие, непрямые механизмы воздействия на систему свертываемости. Отсюда — узкий терапевтический диапазон, непредсказуемость воздействия и, как следствие, — ограниченное применение. Более того, в некоторых тяжелых случаях такие антикоагулянты оказываются попросту бессильны предотвратить тромбообразование. В настоящее время в клинической практике для предотвращения избыточного тромбообразования используется **гепарин**, который является всего лишь кофактором природного ингибитора тромбина — антитромбина (ATIII). При недостатке в крови ATIII введение гепарина не подавляет активность тромбина и единственный выход в данном случае — это добавить прямой ингибитор тромбина. Понятен интерес, который проявляют ведущие мировые фармакологические фирмы (Merck, Boehringer-Mannheim и др.) к разработке лекарственного средства — прямого ингибитора тромбина. Существует только один прямой низкомолекулярный синтетический ингибитор тромбина — **аргатробан**, разрешенный к клиническому применению.

Наша лаборатория в НИВЦ МГУ вместе с Гематологическим научным центром РАМН (лаборатория профессора Ф. И. Атауллаханова) и Институтом органической химии РАН на протяжении более полутора лет занимается разработкой прямых ингибиторов тромбина. В рамках разработанной системы KeenBASE и с помощью технологии распределенных вычислений X-Com было проведено несколько больших компьютерных экспериментов для выявления соединений, потенциально являющихся ингибиторами тромбина.

Первый эксперимент проводился в Рождественские каникулы 2006 г. в течение 10 дней. За это время было рассчитано 2123 молекулы из базы данных NCI diversity, где среднее время расчета составило 20 часов на 1 молекулу. В эксперименте участвовали 273 процессора компьютеров НИВЦ МГУ и Южноуральского университета в г. Челябинске. Результаты этих расчетов позволили нам сделать первые предсказания и отобрать соединения, которые должны проявлять активность в экспериментах. Проведенные измерения заказанных соединений из этой бесплатной базы данных показали, что часть соединений действительно

обладала ингибирующей активностью, что подтвердило наши предсказания и позволило создать фокусированные виртуальные библиотеки для дальнейших исследований.

Второй эксперимент, продолжительностью 4 дня, состоялся в рамках первого фестиваля науки, проходившего в МГУ в октябре 2006 года. Тогда в эксперименте были задействованы компьютеры НИВЦ, ВМиК МГУ, университета Дубны, Южноуральского (г. Челябинск) и Башкирского университетов (г. Уфа), 600 процессоров. Было рассчитано 1840 молекул из которых около 37 штук было отобрано для последующего синтеза.

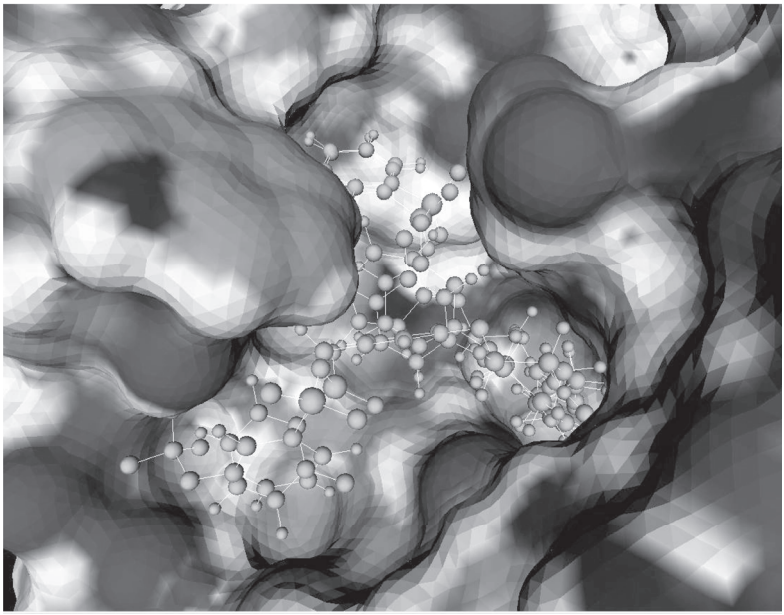


Рис. 2. Расположение ингибиторов в активном центре тромбина

И, наконец, самый последний эксперимент проводился на кластере «Скиф-Cyberia», установленном в Томском госуниверситете в течение 5 дней в конце мая начале июня 2007 г., 1120 процессоров. В связи с тем, что расчеты проводились на фокусированной библиотеке, которая была построена специально для оптимизации соединения-лидера, то требовалась их высокая точность, поэтому параметры расчета были отличными от пре-

дыдущих экспериментов. В результате среднее время, затраченное на 1 лиганд, составило около 72 часов.

Наряду с большими компьютерными экспериментами, текущими расчетами, которые проводились в ходе работы, непрерывно было занято около 20 процессоров на кластере НИВЦ МГУ.

По результатам расчетов несколько сотен соединений имеют значения скоринг-функции, сравнимые со значением для соединений-лидеров, что позволило спрогнозировать их высокую ингибирующую способность. На рис. 2 показано положение нескольких лигандов из данной библиотеки в активном центре тромбина.

Часть из отобранных соединений была синтезирована в ИОХ РАН и проверена экспериментально в Гематологическом Научном центре. Измерения показали, что отобранные нами лиганды не только ингибируют тромбин, но кроме того, их ингибирующая активность существенно превышает активность **аргатробана**, что позволяет предполагать, что созданный нами новый класс низкомолекулярных синтетических ингибиторов тромбина может успешно быть использован для создания средства для коррекции гиперкоагуляции, вызываемой разбавлением плазмы.

Заключение

В заключении хочется отметить, что на разработку нового класса ингибиторов тромбина было затрачено всего 1,5 года, в большой степени благодаря тесному сотрудничеству молекулярных дизайнеров, биохимиков, биофизиков и химиков-синтетиков. В целом за время работы было рассчитано порядка 6000 соединений, около 50 из них было синтезировано. Использование компьютеров позволило не только сократить время начальной стадии разработки нового лекарства, но и материальные затраты по данному проекту. Кроме того, виртуальный скрининг увеличил химическое разнообразие потенциальных кандидатов в лекарства за счет проведения первоначального этапа поиска в базе данных, содержащих существенно различные классы органических соединений. Это позволило выбрать наиболее перспективные ингибиторы для создания фокусированных библиотек, которые впоследствии доказали свою эффективность.

Литература

1. **Lyne P. D.** Drug Discovery Today. — 2002. — **7**. — P. 1047–1055.

2. **Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J.** Nat Rev. Drug Discov. — 2004 — Vol. 3. — P. 935—949.

3. **Klebe G.** Drug Discovery Today. — 2006. — 11. — P. 580—594.

4. **Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J.** Proteins: Struct., Funct. and Bioinf. — 2006 — Vol. 65. — P. 15—26.

5. NCI (National cancer institute) diversity data base [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://dtp.nci.nih.gov/docs/3d_database/Structural_information/structural_data.html.

6. **Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissing H., Shindyalov I.N., Bourne P. E.** Nucleic Acids Res. — 2000. — 28. — P. 235—242.

7. **Sadowski J.** J. Comput. Aided Mol. Design — 1997. — **11**. — P. 53—60.

8. **Ewing T. J. A., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I. D.** J. Comput. Aided Mol. Design. — 2001. — 15. — P. 411—528.

9. **Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G.** J Mol. Biol. 1996. — 261. — P. 470—489.

10. **Friesner R. A.** et al. J Med. Chem. — 2004. — 47. — P. 1739—1749.

11. Kearsley S. K., Underwood D. J., Sheridan R. P., Miller M. D. J. Comput. Aided Mol. Design. — 1994. — **8**. — P. 565—582.

12. **Olson A. J., Goodsell D. S.** Proteins 1993. — **17**. — P. 1—10.

13. **Goodsell D. S., Olson A. J.** Proteins: Structure, Function and Genetics. — 1990. — 8. — P. 195—202.

14. **Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J.** J. Computational Chemistry — 1998. — 19. — P. 1639—1662.

15. GOLD Version 1.2 [Электронный ресурс]. — Режим доступа : http://www.ccdc.cam.ac.uk/product/life_sciences/gold. — 2003.

16. **Westhead D. R., Clark D. E., Murray C. W.** J.Comput. Aided Mol. Design. — 1997. — 11. — P. 209—228.

17. **Kramer B., Rarey M., Lengauer T.** Proteins. — 1999. — **37**. — P. 228—241.

18. **Weiner S. J., Kollman P. A., Nguyen D. T., Case D. A.** J Comp. Chem. — 1986. — 7. — P. 252.

19. **Halgren T. A.** J Comp. Chem. — 1996. — **17.** — P. 490—519, 520—552, 553—586, 587—615, 616—641.

20. **Bohm H.-J.** J.Comput. Aided Mol.Design. — 1992. — **6**. — P. 593—606.

21. **Muegge I.** Perspect. Drug. Disc. Des. — 2000. — **20**. — P. 99—114.

22. **Gohlke H., Hendlich M., Klebe G.** J Mol. Biol. — 2000. — **295**. — P. 337—356.

23. Свидетельство об официальной регистрации программ для ЭВМ № 2006611167 «SOL» от 31 марта 2006 г.

24. **Romanov A.** et.al J. Phys. Chem. A. — 2004. — 108. — 9323.