

А. П. Крицишин

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів-10, Україна, 79010. E-mail: kryshchyshyn.a@gmail.com

Фрагмент-орієнтований дизайн лікарських засобів

Фрагмент-орієнтований дизайн лікарських засобів є одним із сучасних методів розробки нових лікарських засобів (ЛЗ), що розглядається як альтернатива до широко-використовуваного методу високоефективного біологічного скринінгу. В роботі охарактеризовані суть та принципи фрагмент-орієнтованого дизайну (ФОД), представлено методологічні підходи, а також наступні методи оптимізації ідентифікованих «фрагментів» при побудові малих «лікоподібних» молекул. Описані основні принципи біофізичних методів аналізу комплексів фрагмент – біо-мішень, що лежать в основі ФОД, їх переваги та недоліки. До останніх належать метод термічного зсуву, що базується на флуоресценції; методи спектроскопії ПМР, мас-спектрометрії та метод поверхневого плазмонного резонансу. Найбільш інформативним та ефективним інструментом скринінгу комплексів залишається рентгеноструктурний аналіз. Охарактеризовані основні підходи до створення фармакологічно активних молекул на основі ідентифікованих фрагментів, а саме, методи «злиття фрагментів», «з'єднання фрагментів» та «наращування фрагментів». Перспективність та важливість фрагмент-орієнтованого дизайну ЛЗ підтверджена конкретними прикладами – кандидатами у ЛЗ та введеним у клінічну практику препаратом Вемурафенібом, які розроблені з використанням методу ФОД ЛЗ.

Ключові слова: фрагмент-орієнтований дизайн ЛЗ; молекулярний фрагмент; лігандна ефективність

A. P. Kryshchyshyn

Fragment-based drug design (FBDD)

Fragment-based drug design (FBDD) is one of the modern techniques used for developing new drugs, and an alternative to the widely used high throughput screening. The main methodological approaches of FBDD, as well as the methods of optimization for the identified “fragments” when transferring them to the drug-like molecules have been described. The basic principles of the biophysical methods for analysis of the fragment – bio-target complexes and their application have been shown. Advantages and disadvantages of such methods as fluorescence-based thermal shift, NMR-spectroscopy, mass spectrometry, surface plasmon resonance are discussed. The most informative and efficient tool for the complex screening is X-ray crystallography. The main approaches to development of the pharmacologically active molecules based on the identified fragments, namely the methods of “fragment merging”, “fragment linking” and “fragment growing”, are given. The prospects and importance of the given method has been confirmed by the specific examples of drug candidates and the anti-tumor drug Vemurafenib approved and developed using FBDD.

Key words: fragment-based drug design FBDD; molecular fragment; ligand efficiency

А. П. Крицишин

Фрагмент-ориентированный дизайн лекарственных средств

Фрагмент-ориентированный дизайн лекарственных средств является одним из современных методов разработки новых лекарственных средств и является альтернативой широко используемому методу высокоэффективного биологического скрининга. В работе представлены основные методологические подходы ФОД, а также методы оптимизации идентифицированных «фрагментов» в малые «druglike» молекулы. Описаны основные принципы биофизических методов анализа комплексов фрагмент – био-мишень, лежащие в основе ФОД, их преимущества и недостатки. К последним принадлежат метод термического сдвига, основанный на флуоресценции; методы ПМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, поверхностного плазмонного резонанса. Наиболее информативным и эффективным методом скрининга комплексов является рентгеноструктурный анализ. Приведены основные подходы к созданию фармакологически активных молекул на основе фрагментов, а именно методы «слияния фрагментов», «соединения фрагментов» и «наращивания фрагментов». Перспективность и важность метода фрагмент-ориентированного дизайна лекарственных средств подтверждена конкретными примерами – кандидатами в лекарственные средства и введенным в клиническую практику препаратом Вемурафенибом, которые разработаны с использованием метода ФОД ЛС.

Ключевые слова: фрагмент-ориентированный дизайн ЛС; молекулярный фрагмент; лигандная эффективность

Сучасні стратегії пошуку нових лікарських засобів (ЛЗ) поєднують *in silico* підходи (віртуальний скринінг, молекулярний докінг, QSAR-аналіз), комбінаторну хімію та високоефективний скринінг. Одним із найуспішніших є метод високоефективного біологічного скринінгу (ВЕБС, high-throughput screening), який дозволяє за короткий тер-

мін досліджувати активність десятків тисяч сполук відносно визначеної біологічної мішені. Повністю оцінювати продуктивність зазначених технологій рано, враховуючи час (10-15 років), необхідний для відкриття та розробки нового ЛЗ. Варто відмітити, що жодним з вищезазначених методів неможливо охопити якусь значну частину

ймовірного хімічного простору. Близько половини проектів ВЕБС є неуспішними внаслідок невдалого вибору базових малих молекул [1]. Більше того, ВЕБС є дорогою процедурою; купівля, зберігання та скринінг сотень тисяч або навіть мільйонів сполук виснажує ресурси невеликих компаній та академічних центрів.

Таким чином, потреба альтернативних ефективних підходів для розробки малих активних молекул залишається актуальною. В цьому контексті слід відзначити фрагмент-орієнтований дизайн лікарських засобів (ФОД ЛЗ), що розвинувся протягом останніх років. Парадоксально, але даний метод базується на скринінгу малих кількостей сполук (до декількох тисяч) і спрямований на пошук низькоафінних фрагментів (із значеннями Kd в межах високих концентрацій від мікромолярних до мілімолярних) [2]. ФОД ЛЗ презентує суттєву зміну парадигми для медичних хіміків як у філософському плані, так і в значенні методології та виробничого процесу. Зокрема він відводить від потенційних сполук-хітів із «лікоподібними» властивостями на основі ензимного високоєфективного скринінгу та привертає увагу до пошуку сполук, що зв'язуються з біомішенню слабо, залишаючись при цьому ефективними [3].

1. Переваги та недоліки фрагмент-орієнтованого дизайну лікарських засобів. Лігандна ефективність.

Процес ФОД ЛЗ починається з ідентифікації дуже малих молекул (фрагментів), що за розміром становлять близько половини молекули типового ЛЗ. Дані молекулярні фрагменти в процесі дизайну збільшують або зв'язують між собою з метою розробки сполук-лідерів. Хоча передумови цього методу виникли більше, ніж 30 років тому, тільки в середині 90-х рр. минулого століття було імplementовано достатньо чутливі та швидкі експериментальні технології для його реалізації. З тих пір ФОД ЛЗ набув широкого застосування як у наукових лабораторіях, так і в промисловості і відіграв важливу роль у розробці більш ніж 18 нових ЛЗ [3]. На противагу високоєфективному біологічному скринінгу, де тесту-

ються величезні бібліотеки «лікоподібних» молекул, базовим принципом ФОД ЛЗ є дослідження невеликих бібліотек менших за розміром молекул. З практичної точки зору чим менша молекула, тим менше можливостей зв'язування (рис. 1) і тим ефективнішим є дослідження хімічного простору для фрагментів [4].

Теорія, що лягла в основу ФОД ЛЗ, вперше запропонована Уільямом Дженксом (Brandeis University) [6]: корисним було б описувати зміни вільної енергії Гіббса комплексу молекули з протеїном А-В та його окремих компонентів А, В у вигляді «внутрішньої енергії зв'язування» компонентів А та В та «енергії Гіббса зв'язку» (рис. 2). Середня частина рис. 2 відображає метод зв'язування фрагментів, запропонований Дженксом: два молекулярні фрагменти, що зв'язуються з близько розташованими сайтами мішені, об'єднують в одну молекулу. Як і у випадку ВЕБС, необхідна хімічна оптимізація молекули. Результати практичного застосування даної концепції були викладені в статті Abbott Laboratories у 1996 [7]. Однак, з того часу багато наукових груп зіткнулося з тим, що процес зв'язування фрагментів виявився набагато складнішим, ніж передбачалося спочатку. Частково труднощі пов'язані з «недосконалим» зв'язуванням двох фрагментів між собою, причому велика частина приросту активності втрачається внаслідок напруги лінкера [8, 9]. Тому часто альтернативою методу зв'язування фрагментів є метод їх нарощування до досягнення задовільної взаємодії з протеїном (рис. 2).

Крім ефективнішого охоплення хімічного простору у ФОД ЛЗ, його перевагою є те, що ймовірність виділення сполук-хітів серед менших молекул є вищою, ніж серед молекул більшого розміру та складнішої структури [10]. Практичне підтвердження цієї гіпотези відбулося більш ніж через 15 років з моменту публікації Дженкса. Медичні хіміки зіткнулися з проблемою пошуку оптимальних фрагментів і основним питанням: що з ними робити далі? Біофізичні технології, такі як рентгеноструктурний аналіз відіграють ключову роль у вирішенні поставлених задач і є од-

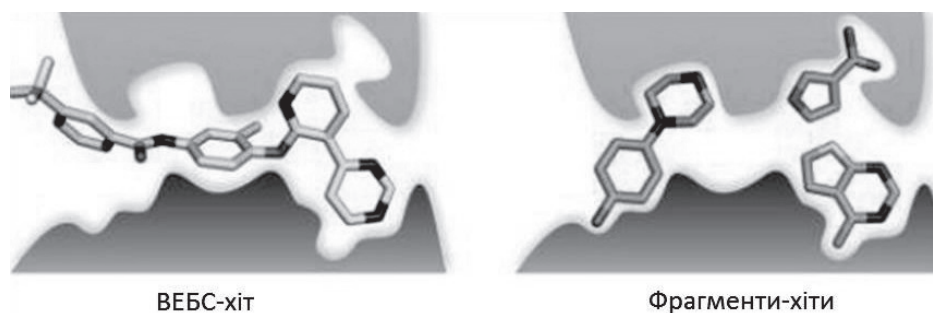


Рис. 1. Візуалізація методів ВЕБС та ФОД ЛЗ (ВЕБС-хіти можуть зв'язуватися з мішенню внаслідок численних субоптимальних взаємодій. На противагу фрагменти-хіти є ефективнішими лігандами, зв'язуючись за допомогою меншого числа оптимальних взаємодій (адаптовано з [5])

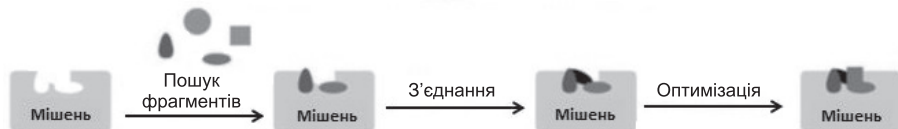
Традиційний ВЕБС**Фрагмент-орієнтований дизайн ЛЗ, з'єднання фрагментів****Фрагмент-орієнтований дизайн ЛЗ, нарощування фрагментів**

Рис. 2. Схематичне порівняння ВЕБС (верхня частина) з методами «з'єднання» (серед.) та «нарощування» фрагментів (адаптовано з [3])

ним з основних методів оцінки зв'язування фрагментів із біологічною мішенню.

У процесі скринінгу фрагментів в експериментах на ізольованих ензимах виявилися деякі підводні камені – розчинність, реактивні молекули та агрегація.

Розчинність. Першим викликом у пошуку фрагментів є розчинність: багато фрагментів зв'язується з протеїнами при константі дисоціації 1 мМ або навіть вище, а в таких концентраціях багато органічних молекул є нерозчинними. Таким чином, перед скринінгом необхідно є перевірка розчинності фрагментів у відповідному біологічному буфері. Хоча ця вимога виглядає очевидною, вона часто не береться до уваги, особливо, якщо дослідники вперше використовують метод ФОД ЛЗ [3].

Реактивні молекули є ще однією проблемою; ними можуть бути не тільки самі фрагменти, але й домішки. Відомо багато типових реактивних молекул, зокрема ацилгаліди, альдегіди, аліфатичні естери, алкілгалогеніди, ангідриди, α -галогенкарбонільні сполуки, азириди, 1,2-дикарбонільні сполуки, епоксиди, галогенозаміщені піримідини, гетероатом-гетероатом одинарні зв'язки, іміни, акцептори Міхаеля та β -гетерозаміщені карбонільні

сполуки, пергалоген-кетони, фосфонові естери, тіоестери, сильфонові естери та сульфанілгалогеніди тощо [11]. Не можна стверджувати, що ці класи сполук не є ефективними, деякі з них присутні в молекулах ЛЗ, але всі вони можуть ковалентно зв'язуватися з протеїнами, тому потрібно з обережністю інтерпретувати результати скринінгу сполук, що містять такі фрагменти. Дж. Баель відніс такі сполуки до так званих PAINS (pan assay interference compounds) – сполуки, що створюють перешкоди при інтерпретації результатів біологічного скринінгу [12], хоча, зважаючи на кількість ЛЗ, що містять такі функціональні групи, його твердження залишаються дискусійними.

Ще складнішими для аналізу є речовини, що не реагують прямо з протеїнами, але діють як оксиданти, генеруючи, наприклад, пероксид гідрогену, який, в свою чергу, може інактивувати досліджуваний протеїн. Приклади таких речовин наведені на рис. 3, всі вони є малими молекулами, що можуть тестуватися у ФОД ЛЗ. Сполуки **1-3** інгібують протеїн-тирозинфосфатазу РТР1В шляхом генерування пероксиду гідрогену у присутності буфера, що містить відновні речовини, – звичайна практика для утримання протеїнів у від-

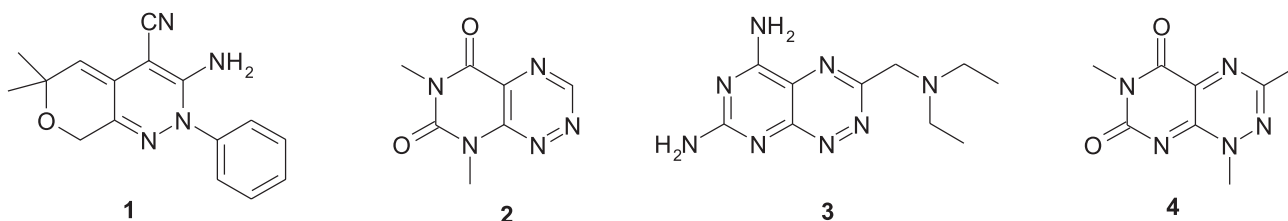


Рис. 3. Приклади сполук, що генерують гідрогену пероксид в умовах експерименту (1-3) та молекули 4, що не тестувалися на наявність окисно-відновних властивостей

новленому стані [13, 14]. Проблемою є те, що сполуки **1-3** можуть бути відновлені і послідовно окиснені киснем, виділяючи в процесі водню пероксид. На жаль, цей тип механізму важко відстежити. Наприклад, коли сполука **4** була описана як новий інгібітор протеїн-протеїнової взаємодії, не було зроблено жодної спроби виключити можливість утворення гідрогену пероксиду [15]. Фактично, сполука **4** та деякі її аналоги таки генерують пероксид гідрогену, який дуже ймовірно відповідає за встановлений ефект [16, 17].

Агрегація. Багато малих молекул при відносно високих концентраціях можуть утворювати агрегати у водних розчинах, які, в свою чергу, можуть неспецифічно інгібувати протеїни і спотворювати результати аналізу [18]. Цей ефект залежить від концентрації – ймовірність агрегації тим вища, чим вища концентрація, необхідна для виявлення низькоафінних лігандів. Прикладами таких лікарських засобів є бензилбензоат та мекфенамінова кислота [19]. Масштаб проблеми було досліджено при скринінгу більш ніж 70000 молекул з метою виявлення інгібіторів AmpC b-лактамази [20]. Із ідентифікованих 1274 сполук-хітів 1213 (більше, ніж 95 %) мали здатність до агрегації. Ще гіршим виявилось те, що ці сполуки часто є достатньо активними, а ефект зберігається навіть при порівняно низьких концентраціях. Нещодавно було досліджено ряд інгібіторів крузаїну з IC_{50} на рівні 200 нМ, але наступні дослідження довели їхню здатність до агрегації; таким чином, оптимізація сполук-хітів неавтоматично привела до утворення активних похідних із незадовільними фізико-хімічними властивостями [21].

Найпростішим методом попередження агрегації є додавання невеликих кількостей неіоногенного детергенту до середовища біологічного дослідження [22]. Іншими методами є підвищення концентрації протеїну, що як правило, не впливає на величини IC_{50} . Центрифугування зразків може усунути агрегати, а поточна цитометрія чи динамічне світлове скатерування застосовуються для їх виявлення. Нарешті, незвична крутизна дозозалежних кривих також може бути ознакою наявності агрегатів [23].

Вищезгадані проблеми були одними з причин повільного розвитку методу ФОД. Явище агрегації практично не бралось до уваги до початку століття, тому часто медичні хіміки, намагаючись оптимізувати слабоактивні сполуки-хіти, підвищували їх агрегаційні властивості, а оптимізовані молекули в кінцевому підсумку могли бути ефективними у високих наномолярних та низьких мікромолярних концентраціях. На щастя, на сьогодні науковці володіють достатньо ефективними інструментами для розуміння можливих недоліків ФОД ЛЗ та їх попередження.

Концепція лігандної ефективності застосовується для оцінки якості сполук-хітів первинного скринінгу, а також для моніторингу якості хітів протягом процесу їх оптимізації. Хопкінс з колегами [24] дали визначення лігандної ефективності LE (ligand efficiency, LE), [ккал/моль/важк.атом.] як:

$$LE = -\Delta G/HAC \approx -RT \ln(IC_{50})/HAC,$$

де: ΔG – вільна енергія зв'язування ліганду з протеїном; HAC – кількість важких атомів у ліганді; IC_{50} – досліджена активність ліганду відносно протеїну.

Передумови цієї концепції сформувалися ще в перших роботах Кунца, Кольмана та співавт. [25]. Рис. 4 ілюструє дану концепцію та її роль у «хімічному трактуванні» сполук-хітів. Графіки описують широкий діапазон молекулярної маси та активності сполук-хітів, отриманих із ВЕБС та ФОД, до яких застосовувалися такі ж типові вимоги і критерії, як до сполук-лідерів. Молекулярна маса фрагментів-хітів буде знаходитися в діапазоні 120-250 Da, а їх активні концентрації – в діапазоні від мМ до 30 мкМ. Для перетворення їх на активні сполуки-лідери потрібно підвищити їх біологічну активність, що майже завжди супроводжується збільшенням молекулярної маси. На противагу, молекулярна маса хітів, отриманих з ВЕБС буде в межах 250-600 Da, а активні концентрації знаходяться у мікро- та субмікромолярному діапазоні. Часто для розробки якісних рядів сполук-лідерів виникає необхідність зменшення молекулярної маси поряд зі збереженням або підвищенням активності. Як показує досвід, цього дуже складно досягти. Високоактивні сполуки-лідери мають тенденцію бути активними відносно свого розміру, наприклад, активна концентрація 100 нМ характерна для молекулярної маси 350 Da. Таким чином, фізико-хімічні властивості є важливим критерієм відбору.

Виходячи з останніх результатів ПМР та рентгеноструктурного скринінгу, можна зробити висновки, що фрагменти-хіти підпорядковуються «правилу трьох», де молекулярна маса < 300, донорів водневого зв'язку ≤ 3, акцепторів водневого зв'язку

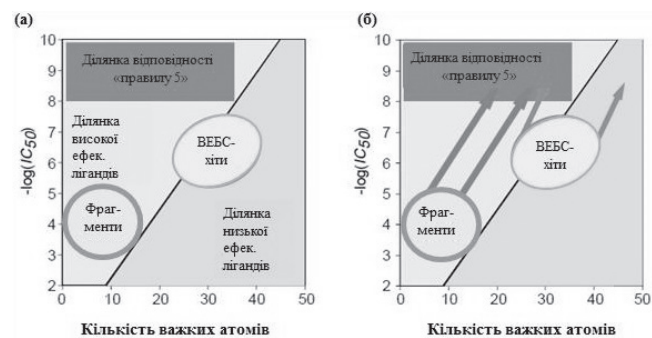


Рис. 4. Лігандна ефективність (ЛЕ) та можливість хімічної модифікації лігандів (адаптовано з [31]). Ділянка відповідності «правилу 5-ти» – відповідність правилам Ліпінського

ку ≤ 3 та $\text{ClogP} \leq 3$. Додатково дослідники із Astex запропонували, що кількість зв'язків, які обертаються, повинна бути ≤ 3 та площа полярної поверхні молекули $\leq 60 \text{ \AA}^2$ [26]. «Правило трьох» може бути корисним для розробки бібліотек фрагментів та диференціювання їх від «лікоподібних» сполук, що відповідають «правилу 5-ти» [27], але різні наукові групи встановлюють свої обмеження при розробці бібліотек фрагментів тощо.

Для отримання оптимізованої сполуки з $\text{IC}_{50} = 10 \text{ нМ}$, комплементарній правилу Ліпінського щодо ММ (≤ 500), максимальна кількість важких атомів повинна бути ~ 36 , що веде до ЛЕ (лігандної ефективності) $\approx 0,3$. Тоді ЛЕ $\approx 0,3$ є мінімальною ефективністю і позначається на графіку лінією, що розділяє дві області (графік а). Ліва частина графіка містить сполуки, що відповідають правилам Ліпінського з активністю хоча б 10 нМ . Низькоафінні сполуки та/або низькомолекулярні фрагменти також потрапляють до групи високоефективних лігандів. Фрагменти зі слабкою афінністю не будуть визначатися або взагалі не будуть зв'язуватися з мішенню. У суміжній частині розташовані хіти, виявлені за допомогою ВЕБС, що включають низькомолекулярні сполуки-хіти, здатні до хімічної модифікації, як і багато менш привабливих сполук із посередньою афінністю до біомішені. Оптимізація фрагментів або сполук-хітів (із ВЕБС) пов'язана з ускладненням структури та збільшенням молекулярної маси [28-30] (графік б). Оптимізація є ефективною тоді, коли активність підвищується поряд із відносним збереженням

початкової лігандної ефективності. В обох частинах графіка це ілюстровано стрілками, паралельними до постійної ЛЕ. Зважаючи на простоту структур та низьку молекулярну масу фрагментів, оптимізація, що зберігає ЛЕ, веде до утворення сполук комплементарних з «правилом 5». На противагу, внаслідок оптимізації сполук-хітів із ВЕБС із початковою низькою ЛЕ отримуються потенційно активні високомолекулярні ліганди, що, як правило, не відповідають правилам Ліпінського і є не найкращими кандидатами в ЛЗ. Сполуки-лідери із ВЕБС із високою ЛЕ часто можуть бути оптимізовані до відповідності «правилу 5-ти».

2. Скринінг фрагментів. Методи їх трансформації у лікоподібні молекули

Скринінг фрагментів. Невеликі молекулярні фрагменти утворюють небагато зв'язків із біомішенню, тому виявлення та доведення останніх потребує чутливих і точних методів скринінгу. Як правило, фрагментний скринінг включає ряд біофізичних методів дослідження для доведення наявності комплексу фрагмент/біомішень та додаткової інформації про точне місце зв'язування з активним сайтом. Такі завдання краще вирішують методи термічного зсуву (thermal shift), поверхневого плазмонного резонансу (рис. 6), хоча й інші методи застосовуються, як наприклад, мас-спектрометрія (рис. 5). Послідовний скринінг із застосуванням методу ПМР-спектроскопії дає вичерпні докази афінності і часто передують рентгеноструктурному аналізу для визначення точного механізму зв'язування (рис. 5).

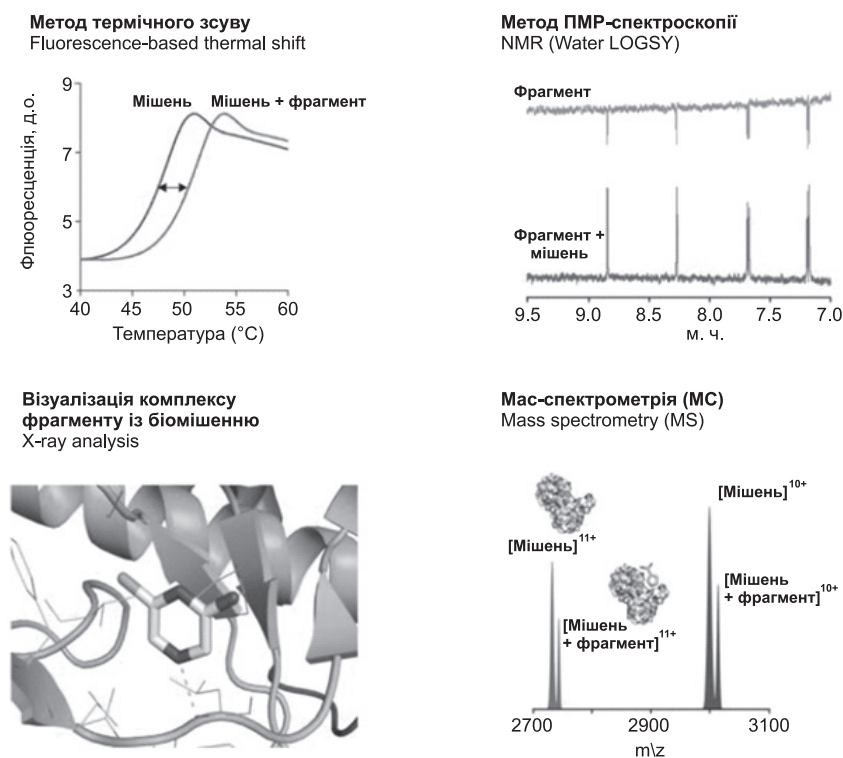


Рис. 5. Приклади біофізичних методів дослідження комплексів фрагмент/біомішень (адаптовано з [5])

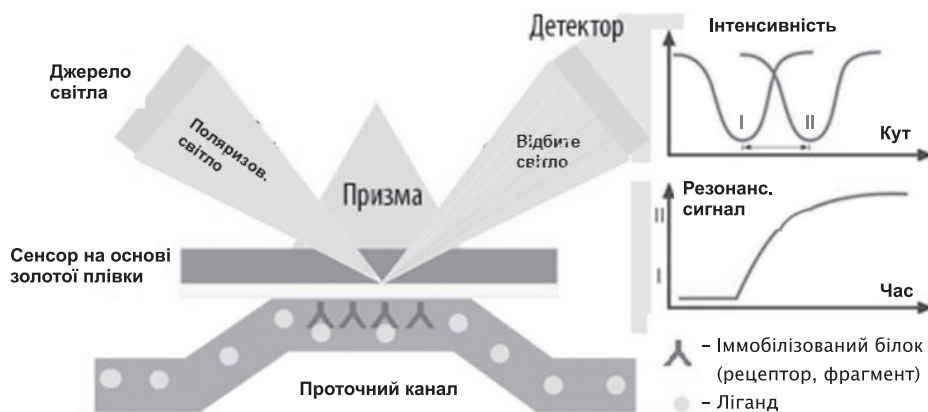


Рис. 6. Принцип методу поверхневого плазмонного резонансу

Метод термічного зсуву, що базується на флуоресценції (Fluorescence-based thermal shift). Наявне, найшвидшим методом фрагментного скринінгу є метод термічного зсуву білків [32]. Ця технологія визначає сполуки, що підвищують температуру денатурації цільового протеїну (ΔT_m) шляхом зв'язування з ним та стабілізації нативного стану. Моніторинг термічного процесу розкручування білка проводиться з використанням екзогенного, флуоресцентного барвника. Внаслідок слабого зв'язування фрагментів прогнозовані зсуви є малими. Хіт часто класифікують як сполуку, що спричиняє ΔT_m у два рази більше за стандартне відхилення вимірної температури топлення, як правило 1 °C. Метод розглядається як допоміжна процедура перед, наприклад, ПМР скринінгом. Фершт та співавт. застосували метод термічного зсуву для дослідження зв'язування близько 1900 фрагментів із мутованою порожньою онкогенного Y220C p53 пухлинного протеїну-супресора [33]. У результаті було ідентифіковано 47 фрагментів із ΔT_m більше, ніж 0,5 °C; максимальне значення ΔT_m становило 1,8 °C.

Метод спектроскопії ПМР. Метод аналізу зв'язку структура-активність за ПМР («SAR by NMR») хоча й є достатньо грубим методом оцінки комплексів протеїн-фрагмент, але саме він довів практичність та доцільність ФОД ЛЗ [7]. Даний підхід вимагає наявності 2D ПМР-спектрів протеїну в присутності та відсутності фрагменту. Зміна хімічних зсувів протеїну у присутності фрагменту вказує на зв'язування, а якщо хімічні зсуви асоціюються зі специфічними залишками протеїну, можна навіть визначити точну локалізацію фрагменту. В такому випадку спектр базується на зміні сигналів протеїну, відповідно метод називається ПМР «із визначеним протеїном». Даний метод обмежений можливістю роботи тільки із відносно малими молекулами протеїнів (≈ 30 -40 kD); також він потребує достатньо великих кількостей протеїну, інколи більше, ніж 200 мг [7]. Деякі наукові групи розробили технологію ПМР «із визначеним лігандом», в якому беруть до уваги зміни сигналів

фрагменту, а не протеїну. До таких методів належать одновимірний (1D) ^1H ПМР експеримент (наприклад, Carr-Purcell-Meiboom-Gill, CPMG), метод різниці переходу насичення ПМР (saturation transfer difference, STD), метод градієнтної спектроскопії (waterligand observed via gradient spectroscopy, WaterLOGSY) [33-35]. У методі CPMG спостерігається зменшення інтенсивності сигналів протонів фрагменту внаслідок зв'язування з протеїном [36].

Метод різниці переходу насичення ПМР (STD) полягає у визначенні різниці релаксації між досліджуваними малими молекулами та макромолекулами [37]. Виконання такого експерименту потребує значно менше протеїну, ніж метод аналізу зв'язку структура-активність за ПМР; метод є прикладним для протеїнів з більшою молекулярною масою; недоліком залишається неможливість визначення сайту зв'язування. Процедура отримання 1D спектра є достатньо швидкою (~ 15 хв), а підвищити пропускну здатність можна шляхом скринінгу двох або більше фрагментів у сумішах. Інформацію про афінність фрагменту та зв'язуючий сайт мішені можна також отримати шляхом заміни фрагменту на ліганд з відомим механізмом дії. Такий підхід був використаний у пошуку фрагментів афінної до АТФ кишені Hsp90. Скринінг сумішей із 10-12 фрагментів був проведений у присутності та відсутності раніше відомого АТФ-конкурентного ліганду PU3 [38]. Із досліджуваних 1351 фрагментів було знайдено 82 сполуки-хіти та розроблено ряд нових АТФ-конкурентних інгібіторів Hsp90.

Скринінг та валідація фрагментів одночасно може проводитися складнішим 2D методом ^{15}N - ^1H HSQC ПМР «із визначеним протеїном», у якому визначаються фрагмент-індуковані хімічні зсуви у ^{15}N - ^1H крос-піках у ^{15}N -маркованому цільовому протеїні [35]. Хоча метод вимагає затрати часу та матеріалів, він точно описує локалізацію та характер зв'язування фрагменту.

Рентгеноструктурний аналіз є найбільш інформативним та ефективним методом аналізу, що за одну процедуру надає інформацію як про ва-

лідні сполуки-хіти, так і про механізми зв'язування [39-41]. Кристали біо-мішені просочуються висококонцентрованими «коктейлями» фрагментів або розчинами індивідуальних фрагментів (до 50 мМ на одну сполуку). У випадку скринінгу сумішей може бути доцільним рескринінг індивідуальних компонентів суміші для однозначного трактування електронної густини. Кристал протеїну повинен бути стійким із роздільною здатністю дифракційної решітки вище, ніж 2,5 Å; зв'язуючий сайт в кристалічній ґратці повинен піддаватися дії розчинників та/або мати безперешкодний доступ. Для складніших кристалічних систем у випадках, коли зв'язування ліганду індукує значну конформаційну зміну, що руйнує кристал, можливою є співкристалізація із сумішами фрагментів.

Компанія Astex Pharmaceuticals першою використала підхід високоефективного рентгеноструктурного скринінгу фрагментів, що є ключовим компонентом їхньої патентованої платформи Rugarid. В одному з досліджень вчені компанії Astex провели скринінг 500 фрагментів відносно циклін-залежної кінази 2 (ЦЗК 2 – ключова регуляторна кіназа у клітинному циклі і відповідно приваблива протиракова мішень), просочуючи кристали ЦЗК 2 сумішами з 4 фрагментів [42]. У результаті рентгеноструктурного аналізу ідентифіковано 30 комплексів протеїну з фрагментами, що зв'язалися в активному сайті АТФ. Оптимізація структури, клітинної активності та фармакокінетичних властивостей сполуки-хіта призвела до похідного АТ7519, що є на стадії клінічних досліджень для терапії ряду гематологічних карцином [42].

Останні досягнення у *мас-спектрометрії* дозволили використовувати цей метод як додаткове дослідження у ФОД ЛЗ [43]. В найпростішому варіанті суміші фрагментів з протеїнами іонізуються (методом електроспреєвої іонізації, ESI) і зв'язування фрагменту оцінюється за збільшенням маси біомолекулярного іону відповідно на величину приєднаного фрагменту.

Поверхневий плазмонний резонанс. У методі прямого поверхневого плазмонного резонансу (рис. 6) цільова біомолекула ковалентно зв'язується із золотою поверхнею біосенсорного чіпу, а розчини індивідуальних речовин послідовно пропускаються над ним [44]. Якщо фрагмент зв'язується з імібілізованою мішенню, в реальному часі спостерігається збільшення поверхневої маси. Кінетика зв'язування та афінність фрагментів може бути обчислена на основі часу затримки асоціації-дисоціації фрагменту. Ця технологія дозволяє ідентифікувати зв'язування малих молекул із молекулярною масою до 100 Da, суттєво зменшує кількість помилкових позитивних результатів неспецифічних агентів та потребує не більше, ніж 25-50 мкг протеїну. Експеримент можна прово-

дити також методом конкурентної заміни, в якому відомий ліганд наноситься на поверхню, а протеїн формує з ним комплекс. При нанесенні конкурентного фрагменту руйнування комплексу ліганд-протеїн виявляється як суттєва зміна сигналу.

Віртуальний скринінг. Останнім часом *in silico* ехнології стали значно інформативнішими, складнішими і, основне, доступнішими. Для оцінки можливості ширшого використання молекулярного докінгу Вердонг та співавт. систематично аналізували ряди скорингових функцій та методологій докінгу для фрагментів та «лікоподібних» молекул [45]. При цьому брався до уваги рентгеноструктурний аналіз комплексів кожної досліджуваної молекули з протеїном. Зважаючи на валідність досліджуваних малих молекул виникало питання: наскільки точно процедура молекулярного докінгу надає інформацію про механізми зв'язування? Виявилось, що приблизно у половині випадків і фрагменти, і «лікоподібні» молекули були правильно зв'язані. Тако, був зроблений висновок, що хибні зв'язування відбувалися внаслідок різних причин у випадках фрагментів та «лікоподібних» молекул, а саме: положення фрагментів були достатньо точними, але недостатньо добре були обчислені їх скорингові функції; незадовільний вибір конформацій «лікоподібних» молекул спричиняв неточне зв'язування.

Для активнішого застосування молекулярного докінгу останній повинен не тільки забезпечувати інформацію про механізм зв'язування, але й оцінювати зміну вільної енергії ліганду у розчиннику при його зв'язуванні з протеїном. Відповідно, слід враховувати найбільш енергетично вигідну конформацію ліганду, умови десольватації, взаємодію з молекулами води та конформаційні зміни протеїну. Із такими ускладненими вимогами та високим рівнем помилкових позитивних результатів застосування методології докінгу у скринінгу фрагментів виглядає не дуже привабливим. Якщо застосування *in silico* методів є виправданим у ВЕБС, то для ФОД ЛЗ використання таких є менш актуальним, зважаючи на значно меншу кількість досліджуваних молекул та високу ефективність біофізичних методів аналізу. Коли на пізніших етапах скринінгу для оптимізації фрагментів та сполук-лідерів необхідно порівняння з існуючою інформацією про хімічну структуру, *in silico* методи знаходять своє застосування. Для покращення алгоритмів молекулярного докінгу та особливо скорингових функцій, нещодавно було упорядковано загальнодоступну базу даних SERAPhC (Selected Fragment Protein Complexes – Вибрані комплекси фрагмент-протеїн) високоякісних комплексів протеїн-ліганд, що надає можливості імплементації нових комп'ютерних методів та інструментів [46].

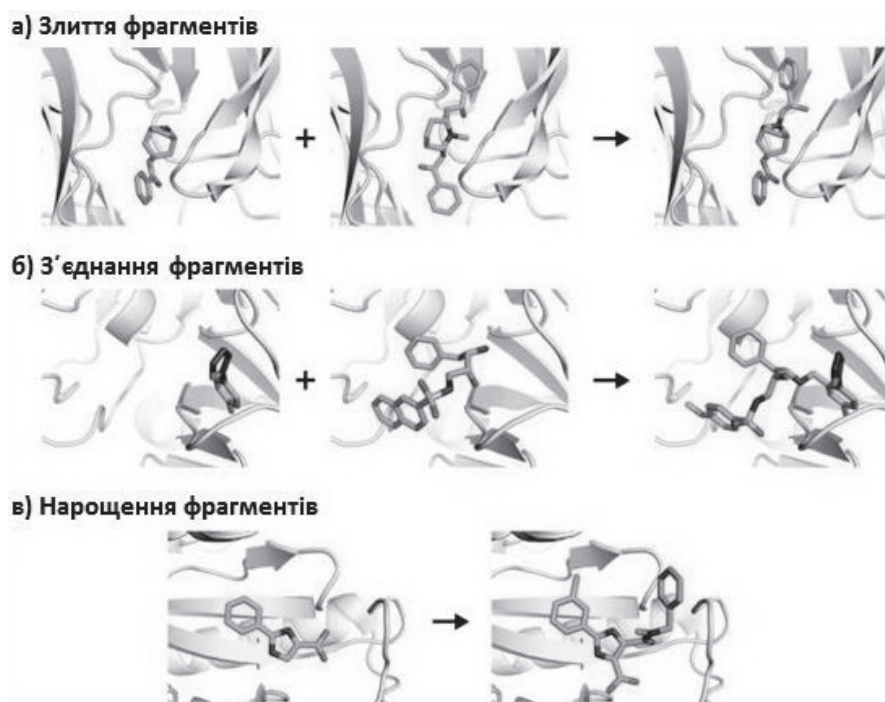


Рис. 7. Схематична візуалізація підходів до розробки «лікоподібних» молекул на основі фрагментів (адаптовано з [5])

Додаткову інформацію про структуру фрагментів, які зв'язуються одночасно в сусідніх сайтах, можна отримати при спостереженні міжлігандних ядерних ефектів Оверхаузера (ILOEs) [47]. На сьогодні розроблені практичні методи отримання кількісних даних афінності, як наприклад, ізотермічна титраційна калориметрія, що базується на точному вимірюванні швидкості поглинання або виділення тепла в процесі взаємодії досліджуваної біомолекули з лігандом [48]. Цей метод є легким у виконанні, високочутливим, вичерпно характеризує термодинаміку процесу і може використовуватися для вимірювання широкого спектра значень KD. Важливим недоліком методу є те, що для кожного експерименту потрібна значна кількість цільового протеїну.

Важливо відзначити, що вибір технології залежить як від ресурсів закладу, так і від наукового підходу, а оптимальним варіантом є комбінування декількох методів, що доповнюють один одного.

Від фрагменту до «лікоподібної» молекули. Як уже зазначалось існує кілька підходів до розробки «лікоподібних» молекул на основі фрагментів (рис. 7): злиття фрагментів, з'єднання та нарощення.

Метод *злиття фрагментів* полягає у включенні структурних компонентів молекул (що накладаються одна на одну) у фрагмент на основі даних про комплекси інших фрагментів, субстратів та відомих лігандів з протеїном [3]. Структурні особливості використовуються для ідентифікації важливих функціональних груп, що відповідають за взаємодію та зв'язування фрагментів із

біо-мішенню, останні, в свою чергу, беруться за основу для дизайну гібридних активних похідних. Зазначена стратегія була застосована Едінком та співавт. для пошуку лігандів до протеїнів, що зв'язують ацетилхолін (рис. 7а). Сполука-лідер із $K_d = 320$ нМ була спроектована шляхом накладання кристалічних структур природного алкалоїду лобуліну та ідентифікованого бензоат-заміщеного фрагменту нортропіну [49].

Наведений метод також використано при ФОД лігандів до протеїну Hsp90 (рис. 8). Злиття триазинового фрагменту ($IC_{50} = 350$ мкМ) із активною молекулою, ідентифікованою методом *in silico* скринінгу ($IC_{50} = 0,9$ мкМ), дозволило спроектувати молекулу із значеннями IC_{50} в межах 50-58 нМ [50].

Ще одним прикладом успішного використання методики злиття фрагментів є пошук інгібіторів РІЗу кінази [51]. Ряд імідазопіримідинових фрагментів, виявлених за допомогою рентгеноструктурного аналізу, накладалися з інгібіторами, взятими з літературних джерел (рис. 9).

Внаслідок проведених досліджень було синтезовано ряд гібридних молекул із тiazолідиндіоновим фрагментом, найактивнішою серед яких виявилась сполука з активною інгібуючою концентрацією 34 нМ та високою селективністю до 43 досліджуваних кіназ (рис. 10).

Метод з'єднання фрагментів є концептуально найбільш привабливою стратегією для розробки активних молекул у ФОД ЛЗ. Він вимагає ефективного з'єднання двох фрагментів, що зв'язуються в окремих сайтах (локалізації зв'язування не

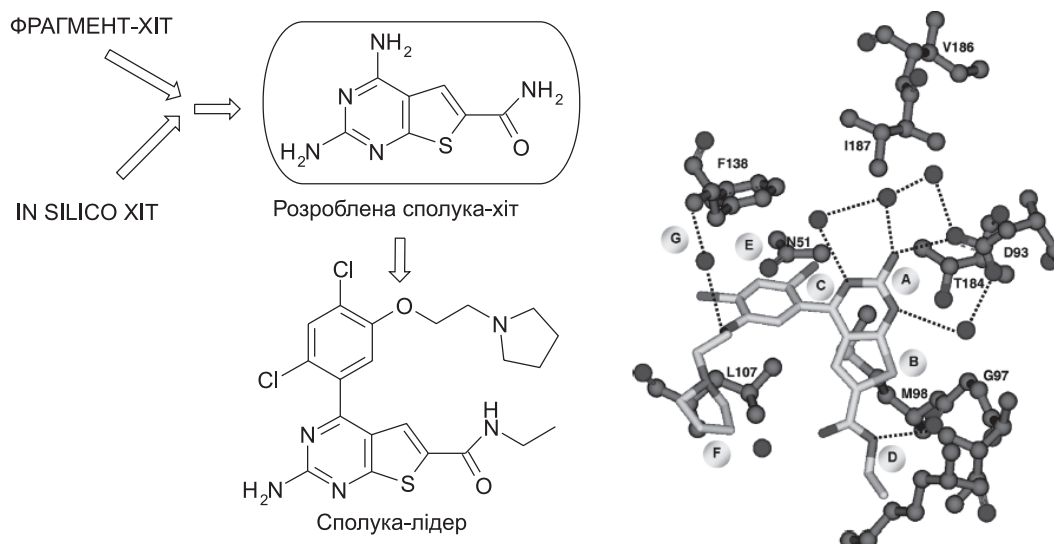


Рис. 8. Перорально активний інгібітор Hsp90 – похідне 2-амінотієно[2,3-d]піримідину, розроблений шляхом поєднання *in silico* скринінгу та ФОД ЛЗ [50]

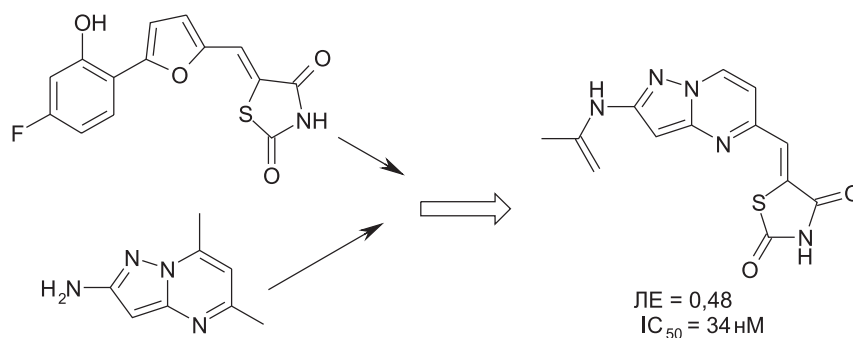


Рис. 9. Злиття імідазопіримідинових фрагментів з похідними тіазолідиндіону для одержання високоактивного інгібітора Р13у кінази

накладаються одна на одну). Теоретично сполука, отримана поєднанням фрагментів за допомогою ідеального лінкера, повинна мати вільну енергію Гіббса (зв'язування) кращу, ніж сума енергій індивідуальних фрагментів [52]. Відповідно, вкрай бажано ідентифікувати фрагменти у суміжних ки-

шенях протеїну. Фрагменти зв'язуються з мішенню в найкращій орієнтації; таким чином, будь-який варіант їх з'єднання в одну молекулу повинен дозволити зберегти конформації індивідуальних фрагментів, а ідеальний лінкер не тільки збереже їх конформації, але й дозволить існування

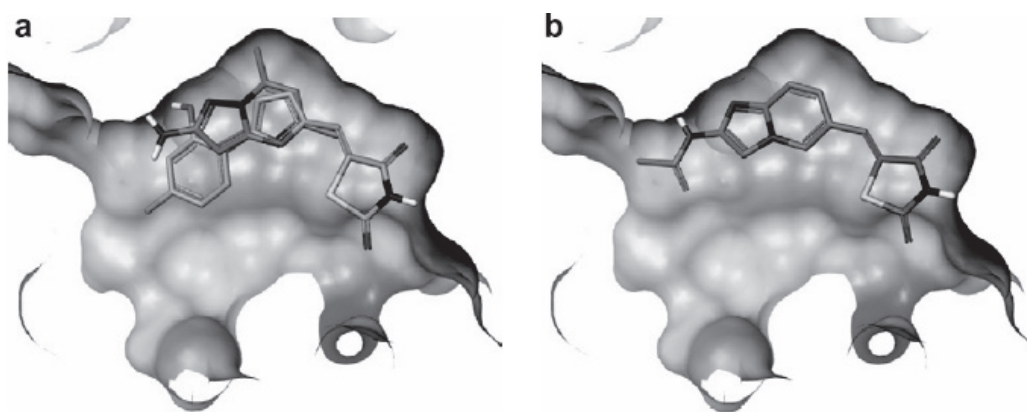


Рис. 10. а) накладання активного імідазопіримідинового фрагменту із тіазолідиндіоновим похідним; б) зв'язування гібридної сполуки з активним сайтом Р13у кінази (адаптовано з [51])

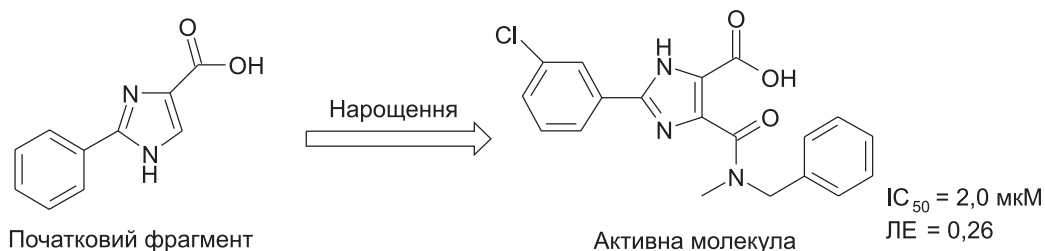


Рис. 11. Метод «нарощування фрагментів» у пошуку інгібіторів ротамази Pin1

додаткових просторових точок зв'язування з протеїном. Зменшення ступенів свободи зв'язаної сполуки у розчині за рахунок жорсткого лінкера зменшить затрату енергії при зв'язуванні активної сполуки (із мішенню) порівняно з більш гнучким лінкером. Також бажано зменшити кількість зв'язків, що обертаються, зважаючи на емпірично встановлений факт, що така умова покращує пероральну біодоступність [53]. Дуже гнучкий лінкер може спричинити «гідрофобний розпад» малої молекули у розчині. Якщо «складена» конформація в розчині не відтворює конформацію зв'язування, буде створюватися енергетичний бар'єр для приймання правильної конформації сполуки в комплексі з протеїном.

Прикладом цього методу є поєднання *n*-хлорофенілтетразолу ($IC_{50} = 330$ мкМ), що зв'язується з кишеною S1 тромбіну, з аміноспиртом ($IC_{50} = 100$ мкМ), що зв'язується в суміжній кишени. В результаті було синтезовано ряд сполук, IC_{50} найактивнішої серед яких становило 1,4 нМ (рис. 76) [54]. Хоча й є успішні приклади методу з'єднання фрагментів, вони залишаються швидше винятками. Порівняльне дослідження методів з'єднування та нарощення фрагментів показало, що вимоги до лінкерів суттєво обмежують поле оптимізації активних молекул (із фрагментів), ніж це можливо у методі нарощення фрагментів [55].

Метод нарощування фрагментів. Частіше знаходять ряд фрагментів, що зв'язуються в одному сайті і потім їх «нарощують» шляхом хімічного синтезу для дослідження подальших взаємодій з протеїном. Вибір фрагментів залежить не тільки від їх активності, але й від лігандної ефективності (ЛЕ), можливості синтетичної модифікації молекули та інших загальних вимог медичної хімії. Важливою буде також інформація про взаємодію досліджуваної біомішені з відомими субстратами або з існуючими ЛЗ. На кожній стадії дизайну, синтезу та тестування фрагментів необхідно є оцінка лігандної ефективності, яка є зручним методом об'єктивно оцінити ефективність доданої молекулярної маси.

Подальший розвиток концепції ЛЕ полягає в аналізі групової ефективності, в якому оцінюється вклад індивідуальних хімічних груп у межах молекули [56]. Введення ліпофільних груп у мо-

лекули сполук-лідерів може бути швидким методом підвищення їх ефективності. З іншого боку, це може спричинити утворення нерозчинних сполук із високими агрегаційними властивостями, неспецифічним механізмом зв'язування та низькою біодоступністю. Робота з такими сполуками ускладнюється, як і SAR-аналіз при низькій розчинності стає менш достовірним. Тому стратегія підвищення активності цим методом із наступним введенням полярних груп у молекули для досягнення відповідності із «правилом 5-ти» є невдалою. Загальною стратегією трансформації фрагменту у сполуку-лідер буде оптимізація останнього шляхом додавання полярних груп для забезпечення гідрогенних зв'язків із протеїном спочатку, а потім – послідовного введення гідрофобних залишків у молекулу. Хоча підвищення полярності може відразу не дуже корелювати із покращенням активності фрагменту такі властивості, як розчинність, селективність та фармакокінетичні показники можуть бути оптимізовані у фінальній молекулі.

Прикладом «методу нарощення» є розробка інгібітора ротамази Pin1 [57] (рис. 7в). Вихідною стала найактивніша феніл-імідазольна кислота із $IC_{50} = 180$ мкМ та ЛЕ = 0,34. Її оптимізація шляхом введення атома хлору у фенільне кільце і бензиламідного залишку у молекулу дозволили отримати сполуку-лідер із $IC_{50} = 2,0$ мкМ та ЛЕ = 0,26 ккал/моль/важк.ат (рис. 11).

Цікавим прикладом ФОД інгібіторів Aurora A кінази (задіяної в патогенезі раку) є розробка сполуки-лідера AT9283 із субмікромольною активністю [58]. Початкові фрагменти **5** та **6** були вибрані із результатів скринінгу інгібіторів циклін-залежної кінази 2. Кристалічні структури мішені з цими фрагментами показали, що бензімідазольний залишок зв'язується з більш гідрофобною кишеною Aurora A кінази, ніж це відбувається у комплексі з циклін-залежною кіназою 2. Для покращення селективності останніх було введено основну функціональну групу та замінено феніламідний залишок на циклопропілсечовину, що призвело до утворення сполуки-лідера AT9283 (рис. 12), яка знаходиться на стадії клінічних досліджень як потенційний ЛЗ для фармакотерапії метастазуючих пухлин та гемобластозів [59].

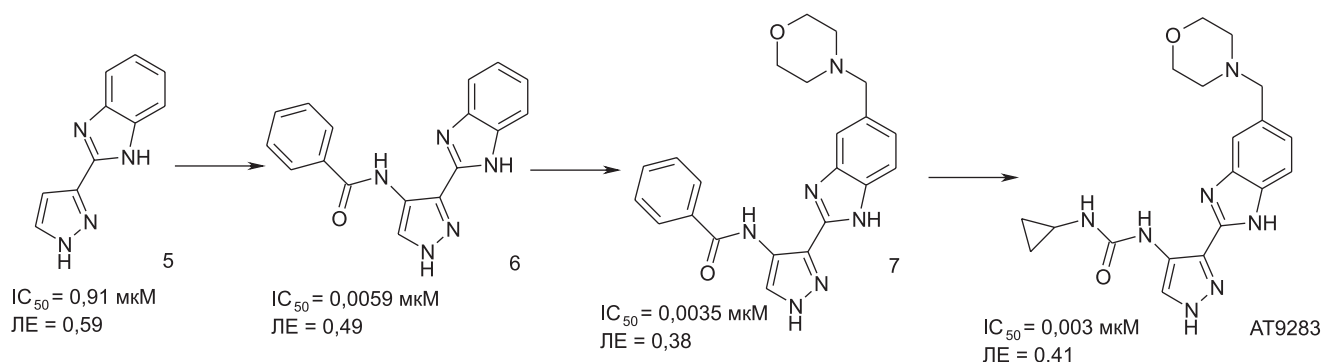


Рис. 12. Нарощування фрагментів А та В у пошуку інгібіторів Aurora А кінрази (AT9283)

Слід відмітити, що дослідження кристалічної структури комплексу AT9283 із Aurora А кіназою виявило ідентичне зв'язування AT9283 та початкового фрагменту 5 (рис. 13).

Це є однією з основних переваг «методу нарощування фрагментів», який часто дозволяє збереження оптимального положення початкових фрагментів в оптимізованій активній молекулі після додавання інших функціональних груп чи їх заміни.

3. Приклади деяких біологічно активних сполук та лікарських засобів, розроблених із застосуванням фрагмент-орієнтованого скринінгу

Перші огляди по ФОД ЛЗ з'явилися у 2004 р. [60, 61], коли приклади сполук-лідерів, розроблених цим методом, були одиничні. Позитивна динаміка останніх років не дозволяє охопити всі успішні приклади. У таблиці наведені деякі з них. Найкращим підтвердженням доцільності застосування методу є приклади сполук, що знаходяться на етапі клінічних досліджень або вже вийшли на ринок. Так, найуспішнішим результатом ФОД ЛЗ на сьогодні є протипухлинний препарат **Вемурафеніб** [62], зареєстрований у 2011 році.

Науковці компанії Plexxikon досліджували активність «малих» молекул із молекулярною масою

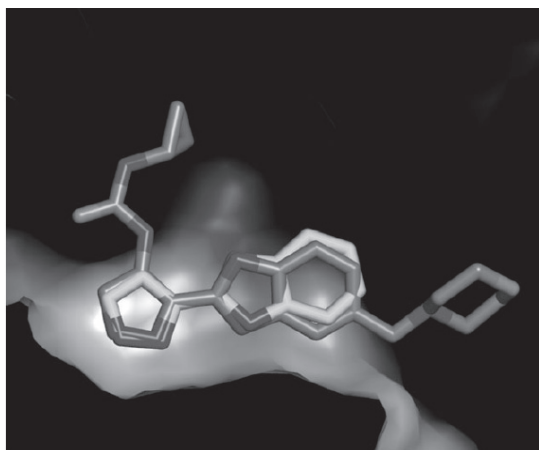


Рис. 13. Накладання початкового фрагменту А та кінцевої сполуки AT9283 (адаптовано із [3])

Таблиця

Кандидати в лікарські засоби відкриті із застосуванням ФОД ЛЗ, що знаходяться на стадії клінічних досліджень та ЛЗ Вемурафеніб [63]

Лікарський засіб/біологічно активна сполука	Поточний результат	Мішень	Фармацевтична компанія
1	2	3	4
Вемурафеніб (PLX-4032)	Зареєстрований ЛЗ у 2011	BRAF ^{V600E} кіназа	Plexxikon
МК-8931	3 фаза КД	BACE1	Merck
ABT-199	–	BCL-2	AbbVie
AT13387	2 фаза КД	HSP90	Astex
AT7519	–	CDK1,2,4,5	Astex
AT9283	–	Aurora-кіназа, JAK2	Astex
AUY-922	–	HSP90	Novartis/Vernalis
AZD5363	–	АКТ	AstraZeneca/Astex
Індегітазар	–	PPAR агоніст	Plexxikon
Лініфаніб (ABT 869)	–	VEGF & PDGFR	AbbVie
LY2886721	–	BACE1	Lilly
LY517717	–	FXa	Lilly/Protherics
Навітоклас (ABT 263)	–	BCL-2/BCL-xl	AbbVie
PLX3397	–	FMS, KIT, FLT3	Plexxikon
ABT-518	1 фаза КД	MMP-2 & MMP-9	Abbott
ABT-737	–	BCL-2/BCL-xl	Abbott

Продовження таблиці

1	2	3	4
AT13148	–	AKT, p70S6K	Astex
AZD3839	–	BACE1	AstraZeneca
DG-051	–	LTA4H	deCODE/ Emerald
IC-776	–	LFA-1	Lilly/ICOS
JNJ- 42756493	–	FGF-4	J&J/Astex
LP-261	–	Tubulin	Locus
LY28811376	–	BACE1	Lilly
PLX-5568	–	Кіназа	Plexikon
SGX-393	–	BCR-ABL	SGX
SGX-523	–	Met	SGX
SNS-314	–	Aurora- кіназа	Sunesis

від 150 до 350 Da (бібліотека з 20000 речовин) відносно декількох кіназ у концентрації 200 нМ. Було ідентифіковано потенційний фрагмент 7-азаіндол **8** та кристалографічно встановлено його зв'язування із пуриновим зв'язуючим сайтом Pim-1 кінази. На відміну від AT9283 (рис. 13) фрагмент **8** зв'язувався із мішенню в декількох орієнтаціях. Оптимізація останнього до сполуки **9** підвищила його активність та спричинила зв'язування молекули з мішенню в одній орієнтації. Наступна оптимізація привела до PLX4720 та фінальної сполуки **PLX4032** (рис. 14). Дві останні молекули є

селективними до родини Raf-кіназ, а саме до онкогенної мутації V600E B-Raf кінази порівняно з іншими кіназами включно із початковою мішенню – Pim-1.

У процесі створення **Вемурафенібу** використано модульну концепцію «наращування якоря», коли за основу береться незмінний протягом всього процесу початковий «скафолд», в який систематично вводяться різні функціональні групи/замісники для створення зв'язків із неокупованими субодинаціями сайту біо-мішені (рис. 15). Фрагмент 7-азаіндолу займав гідрофобну щілину біля активного сайту B-Raf кінази і залишався незмінним впродовж всіх перетворень. У спрямованому пошуку замісників, які б оптимально взаємодіяли з основним амідом Asp594, було відкрито арил-сульфонамідну групу. Пропільна група була вибрана тому, що вона підходила до специфічної для мутованої B-Raf кінази внутрішньої кишені, спочатку виявленої при аналізі кристалічних структур метильного та етильного аналогів. Хлорофенільний замісник у 5 положенні азаіндолу був відкритий в процесі незалежної оптимізації активності та фармакокінетичних показників. Таким чином, стратегія «наращування якоря» дозволила ідентифікацію нового покоління селективних інгібіторів кінази із онкогенною мутацією.

Ще одним прикладом застосування ФОД ЛЗ компанією Plexikon є розробка **індеглітазару** – агоніста до PPAR рецепторів [64] (рис. 16).

Проводився скринінг фрагментів із молекулярною масою від 150 до 350 Da в концентрації 100 мкМ; для подальшого рентгеноструктурно-

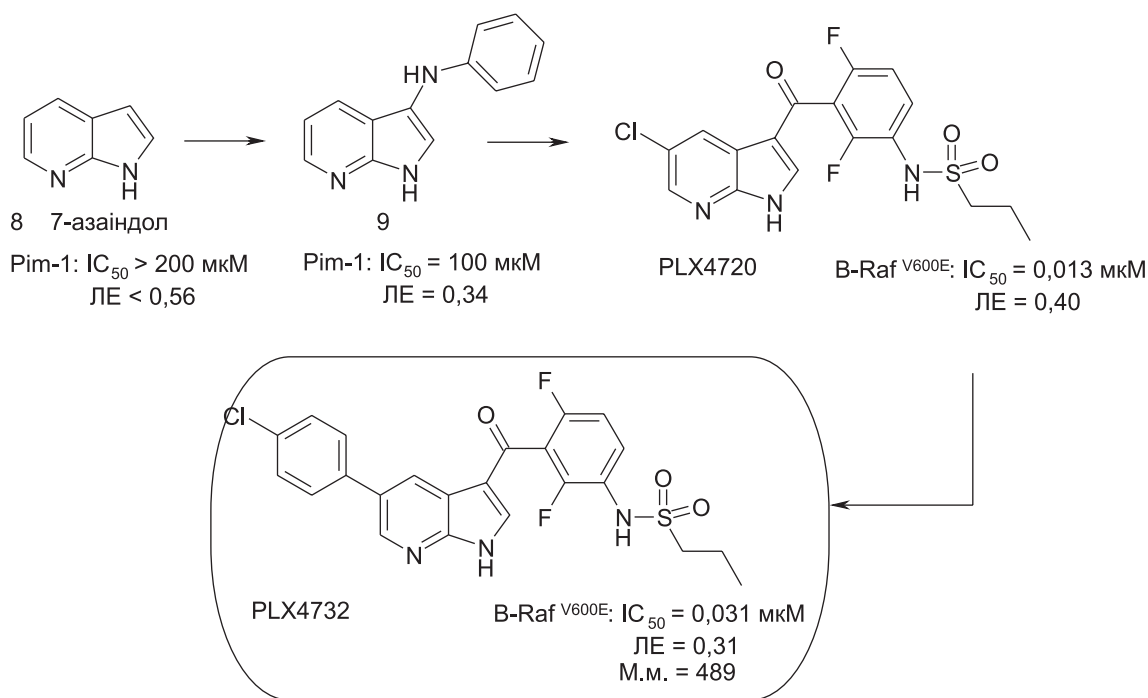


Рис. 14. Нарощування фрагментів у процесі розробки Вемурафенібу (лікування B-Raf мутованої метастатичної меланоми)

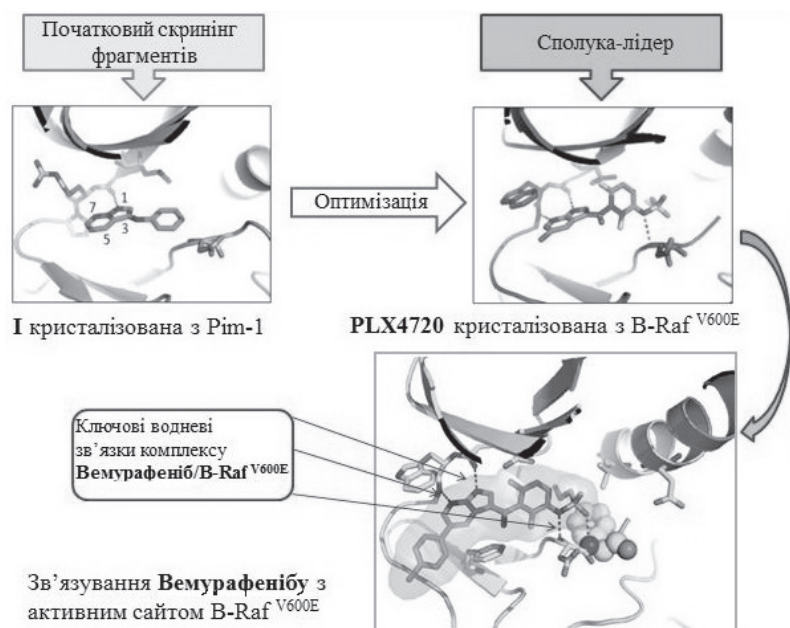


Рис. 15. Візуалізація кристалізованих комплексів початкового фрагменту I, PLX4720 та Вемурафенібу із досліджуваними кінзазами (адаптовано із [62])

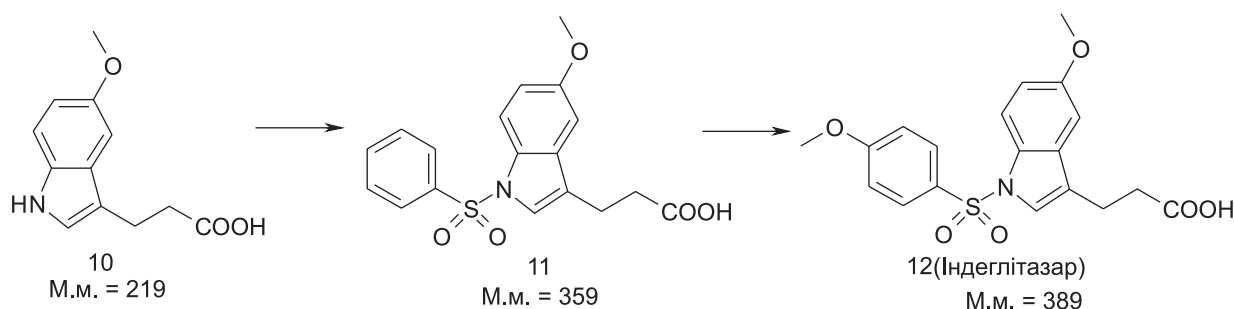


Рис. 16. Нарощування фрагменту при розробці Індеглітазару

го аналізу відбиралися фрагменти активні відносно двох або трьох видів PPAR рецепторів. Із відібраних 170 сполук тільки трохи більше однієї четвертої утворювали кристалічні структури. Метод молекулярного моделювання використовувався для оцінки всіх раніше опублікованих PPAR-агоністів для встановлення кореляції між структурними елементами сполук та активністю. Сполука **10** була слабким агоністом до всіх трьох видів PPAR-рецепторів, але кристалічна структура її комплексу із PPAR γ показала, що вона повністю зв'язується з однією кишенню, залишаючи не окупованою суміжну кишеню активного сайту. Нарощування фрагменту **10** привело до послідовного утворення значно активнішого агента **11** (EC_{50} для 3 видів рецепторів знаходилася в межах від 1,3 до 10 мкМ) та **індеглітазару 12** ($EC_{50} = 0,37-2,7$ мкМ), що знаходиться у 2 фазі клінічних досліджень. Важливу роль у цій програмі відіграв рентгеноструктурний аналіз, які застосовувався для відсіювання сполук, що слабо зв'язувалися з

PPAR-рецепторами, для встановлення механізму зв'язування активних агоністів і для, власне, нарощування фрагментів.

Висновки

В роботі коротко узагальнені основні принципи та методологічні підходи однієї з сучасних стратегій створення лікарських засобів – фрагмент-орієнтованого дизайну лікарських засобів, що презентує зміну парадигми для медичних хіміків як у філософському плані, так і в значенні методології та виробничого процесу. Фрагмент-орієнтований дизайн лікарських засобів базується на скринінгу відносно малих кількостей сполук і спрямований на пошук низькоафінних фрагментів, поєднання яких є основою для структури сполуки-лідера. У роботі висвітлені основні переваги та недоліки ФОД ЛЗ. Характеристика особливостей ФОД ЛЗ проілюстрована конкретними успішними прикладами застосування.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

1. Keseru, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates / G. M. Keseru, G. M. Makara // *Nature reviews Drug Discovery*. – 2009. – Vol. 8, Issue 3. – P. 203–212. doi : 10.1038/nrd2796.
2. Hajduk, P. J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned / P. J. Hajduk, J. Greer // *Nature reviews Drug Discovery*. – 2007. – Vol. 6, Issue 3. – P. 211–219. doi : 10.1038/nrd2220.
3. Erlanson, D. A. Introduction to Fragment-Based Drug Discovery. In *Fragment-based drug discovery and X-ray crystallography (Topics in current chemistry 317)* / D. A. Erlanson // Springer Berlin Heidelberg. – 2014. – Vol. 225. – P. 1–32. doi : 10.1007/128_2011_180.
4. Fink, T. Virtual exploration of the chemical universe up to 11 atoms of C, N, O, F: assembly of 26.4 million structures (110.9 million stereoisomers) and analysis for new ring systems, stereochemistry, physicochemical properties, compound classes, and drug discovery / T. Fink, J. L. Reymond // *Journal of chemical information and modeling*. – 2007. – Vol. 47, Issue 2. – P. 342–353. doi : 10.1021/ci600423u.
5. Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology / D. E. Scott, A. G. Coyne, S. A. Hudson, C. Abell // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51, Issue 25. – P. 4990–5003. doi : 10.1021/bi3005126.
6. Jencks, W. P. On the attribution and additivity of binding energies / W. P. Jencks // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1981. – Vol. 78, Issue 7. – P. 4046–4050. doi : 10.1073/pnas.78.7.4046.
7. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR / S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik // *Science*. – 1996. – Vol. 274, Issue 5292. – P. 1531–1534. doi : 10.1126/science.274.5292.1531.
8. Impact of linker strain and flexibility in the design of a fragment-based inhibitor / S. Chung, J. B. Parker, M. Bianchet et al. // *Nature chemical biology*. – 2009. – Vol. 5, Issue 6. – P. 407–413. doi : 10.1038/nchembio.163.
9. Discovery and design of novel HSP90 inhibitors using multiple fragment-based design strategies / J. R. Huth, C. Park, A. M. Petros et al. // *Chemical biology & drug design*. – 2007. – Vol. 70, Issue 1. – P. 1–12. doi : 10.1111/j.1747-0285.2007.00535.x.
10. Hann, M. M. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery / M. M. Hann, A. R. Leach, G. Harper // *Journal of chemical information and computer sciences*. – 2001. – Vol. 41, Issue 3. – P. 856–864. doi : 10.1021/ci000403i.
11. Rishton, G. M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening / G. M. Rishton // *Drug Discovery Today*. – 2003. – Vol. 8, Issue 2. – P. 86–96. doi : 10.1016/s1359644602025722.
12. Baell, J. B. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays / J. B. Baell, G. A. Holloway // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 53, Issue 7. – P. 2719–2740. doi : 10.1021/jm901137j.
13. Identification of a novel class of orally active pyrimido[5,4-3][1,2,4]triazine-5,7-diamine-based hypoglycemic agents with protein tyrosine phosphatase inhibitory activity / K. R. Guertin, L. Setti, L. Qi et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2003. – Vol. 13, Issue 46. – P. 2895–2898. doi : 10.1002/chin.200346171.
14. Mechanism of action of pyridazine analogues on protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) / A. Tjernberg, D. Hallen, J. Schultz et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2004. – Vol. 14, Issue 4. – P. 891–895. doi : 10.1016/j.bmcl.2003.12.014.
15. Yi, F. A novel class of small molecule inhibitors of Hsp90 / F. Yi, L. Regan // *ACS Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 3, Issue 10. – P. 645–654. doi : 10.1021/cb800162x.
16. A simple assay for detection of small-molecule redox activity / L. A. Lor, J. Schneck, D. E. McNulty et al. // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2007. – Vol. 12, Issue 6. – P. 881–890. doi : 10.1177/1087057107304113.
17. Profiling the NIH small molecule repository for compounds that generate H₂O₂ by redox cycling in reducing environments / K. M. Soares, N. Blackmon, T. Y. Shun et al. // *Assay and Drug Development Technologies*. – 2010. – Vol. 8, Issue 2. – P. 152–174. doi : 10.1089/adt.2009.0247.
18. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening / S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Vol. 45, Issue 8. – P. 1712–1722. doi : 10.1021/jm010533y.
19. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs / J. Seidler, S. L. McGovern, T. N. Doman et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2003. – Vol. 46, Issue 21. – P. 4477–4486. doi : 10.1021/jm030191r.
20. Comprehensive mechanistic analysis of hits from high-throughput and docking screens against beta-lactamase / K. Babaoglu, A. Simeonov, J. J. Irwin et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51, Issue 8. – P. 2502–2511. doi : 10.1021/jm701500e.
21. Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series / R. S. Ferreira, C. Bryant, K. K. Ang et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52, Issue 16. – P. 5005–5008. doi : 10.1021/jm9009229.
22. Feng, B. Y. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors / B. Y. Feng, B. K. Shoichet // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1, Issue 2. – P. 550–553. doi : 10.1038/nprot.2006.77.
23. Shoichet, B. K. Screening in a spirit haunted world / B. K. Shoichet // *Drug Discovery Today*. – 2006. – Vol. 11, Issue 13–14. – P. 607–615. doi : 10.1016/j.drudis.2006.05.014.
24. Hopkins, A. L. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection / A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex // *Drug Discovery Today*. – 2004. – Vol. 9, Issue 10. – P. 430–431. doi : 10.1016/s1359-6446(04)03069-7.
25. The maximal affinity of ligands / I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96, Issue 18. – P. 9997–10002. doi : 10.1073/pnas.96.18.9997.
26. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? / M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti // *Drug Discovery Today*. – 2003. – Vol. 8, Issue 19. – P. 876–877. doi : 10.1016/s1359-6446(03)02831-9.
27. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 4–17. doi : 10.1016/j.addr.2012.09.019.
28. Hann, M. M. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery / M. M. Hann, A. R. Leach, G. Harper // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2001. – Vol. 41, Issue 3. – P. 856–864. doi : 10.1021/ci000403i.
29. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective / T. I. Oprea, A. M. Davis, S. J. Teague, P. D. Leeson // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2001. – Vol. 41, Issue 5. – P. 1308–1315. doi : 10.1021/ci010366a.
30. The design of leadlike combinatorial libraries / S. J. Teague, A. M. Davis, P. D. Leeson, T. Oprea // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1999. – Vol. 38, Issue 24. – P. 3743–3748. doi : 10.1002/(sici)1521-3773(19991216)38:24<3743::aid-anie3743>3.3.co;2-l.
31. Fragment-based leads discovery: leads by design / R. A. E. Carr, M. Congreve, Ch. W. Murray, D. C. Rees // *Drug Discovery Today*. – 2005. – Vol. 10, Issue 14. – P. 987–992. doi : 10.1016/s1359-6446(05)03511-7.
32. Kranz, J. Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments / J. Kranz, Schalk –Hihi // *Methods Enzymol*. – 2011. – Vol. 493. – P. 277–298. doi : 10.1016/b978-0-12-381274-2.00011-x.
33. Toward the rational design of p53-stabilizing drugs: probing the surface of the oncogenic Y220C mutant / N. Basse, J. L. Kaar, G. Settanni et al. // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17, Issue 1. – P. 46–56. doi : 10.1016/j.chembiol.2009.12.011.
34. Combining hit 15 identification strategies: Fragment-based and in silico approaches to orally active 2-aminothieno[2,3-d]pyrimidine inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone / P. A. Brough, X. Barril, J. Borgognoni et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52, Issue 15. – P. 4794–4809. doi : 10.1021/jm900357y.
35. Klages, J. NMR-based screening: A powerful tool in fragment-based drug discovery / J. Klages, M. Coles, H. Kessler // *Analyst*. – 2007. – Vol. 132, Issue 7. – P. 693–705. doi : 10.1039/b709658p.

36. Hajduk, P. J. One dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules / P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119, Issue 50. – P. 12257–12261. doi : 10.1021/ja9715962.
37. Mayer, M. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy / M. Mayer, B. Meyer // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1999. – Vol. 38, Issue 12. – P.1784–1788. doi : 10.1002/(sici)1521-3773(19990614)38:12<1784::aid-anie1784>3.3.co;2-h.
38. Taldone, T. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors / T. Taldone, W. Sun, G. Chiosis // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 17, Issue 6. – P. 2225–2235. doi : 10.1016/j.bmc.2008.10.087.
39. Electron density guided fragment-based lead discovery of ketoheokinase inhibitors / A. C. Gibbs, M. C. Abad, X. Zhang et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 53, Issue 22. – 7979–7991. doi : 10.1021/jm100677s.
40. Davies, T. G. Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography / T. G. Davies, M. Hyvönen. – Germany : Springer Heidelberg, 2012. – 225. doi : 10.1007/978-3-642-27540-1.
41. Blundell, T. L. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design / T. L. Blundell, H. Jhoti, C. Abell // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2002. – Vol. 1, Issue 1. – P. 45–54. doi : 10.1038/nrd706.
42. Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design / P. G. Wyatt, A. J. Woodhead, V. Berdini et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51. – P. 4986–4999. doi : 10.2210/pdb2vto/pdb.
43. Hofstadler, S. A. Applications of ESI-MS in drug discovery: Interrogation of noncovalent complexes / S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2006. – Vol. 5, Issue 7. – P. 585–595. doi : 10.1038/nrd2083.
44. Navratilova, I. Fragment screening by surface plasmon resonance / I. Navratilova, A. L. Hopkins // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – Vol. 1, Issue 1. – P. 44–48. doi : 10.1021/ml900002k.
45. Optimization of the interligand Overhauser effect for fragment linking: Application to inhibitor discovery against Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase / P. Sledz, H. L. Silvestre, A. W. Hung et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132, Issue 13. – P. 4544–4545. doi : 10.1021/ja100595u.
46. SERAPHiC: A benchmark for in silico fragment-based drug design / A. D. Favia, G. Bottegoni, I. Nobeli et al. // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2011. – Vol. 51, Issue 11. – P. 2882–2896. doi : 10.1021/ci2003363.
47. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-x(L) from NMR and parallel synthesis / A. M. Petros, J. Dinges, D. J. Augeri et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49, Issue 2. – P. 656–663. doi : 10.1021/jm0507532.
48. Fragment-based screening by X-ray crystallography, MS and isothermal titration calorimetry to identify PNMT (phenylethanolamine N-methyltransferase) inhibitors / N. Drinkwater, H. Vu, K. M. Lovell et al. // *Biochemical Journal*. – 2010. – Vol. 431, Issue 1. – P. 51–61. doi : 10.1042/bj20100651.
49. Fragment growing induces conformational changes in acetylcholinebinding protein: A structural and thermodynamic analysis / E. Edink, P. Rucktooa, K. Retra et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133. – P. 5363–5371. doi : 10.1021/ja110571r.
50. Combining hit identification strategies: Fragment-based and in silico approaches to orally active 2-aminothieno[2,3-d]pyrimidine inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone / P. A. Brough, X. Barril, J. Borgognoni et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52, Issue 12. – P. 4794–4809. doi : 10.1021/jm900357y.
51. Fragment based discovery of a novel and selective PI3 kinase inhibitor / S. J. Hughes, D. S. Millan, I. C. Kilty et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2011. – Vol. 21, Issue 21. – P. 6586–6590. doi : 10.1016/j.bmcl.2011.07.117.
52. Murray, C. W. The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins / C. W. Murray, M. L. Verdonk // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2002. – Vol. 16. – P. 741–753. doi : 10.1023/A:1022446720849.
53. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Vol. 45, Issue 12. – P. 2615–2623. doi : 10.1021/jm020017n.
54. Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors / N. Howard, C. Abell, W. Blakemore et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49, Issue 4. – P. 1346–1355. doi : 10.1021/jm050850v.
55. Application of fragment growing and fragment linking to the discovery of inhibitors of Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase / A. W. Hung, H. L. Silvestre, S. Wen et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – Vol. 48, Issue 45. – P. 8452–8456. doi : 10.1002/anie.200903821.
56. Verdonk, M. L. Group efficiency: A guideline for hits-to-leads chemistry / M. L. Verdonk, D. C. Rees // *ChemMedChem*. – 2008. – Vol. 3, Issue 8. – P. 1179–1180. doi : 10.1002/cmcd.200800132.
57. Discovery of cell-active phenyl-imidazole Pin1 inhibitors by structure-guided fragment evolution / A. Potter, V. Oldfield, C. Nunns et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – Vol. 20, Issue 22. – P. 6483–6488. doi : 10.1016/j.bmcl.2010.09.063.
58. Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent Aurora kinase activity / S. Howard, V. Berdini, J. A. Boulstridge et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52, Issue 2. – P. 379–388. doi : 10.1021/jm800984v.
59. Activity of the multitargeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL-positive leukemic cells / R. Tanaka, M. S. Squires, S. Kimura et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, Issue 12. – P. 2089–2095. doi : 10.1182/blood-2009-03-211466.
60. Erlanson, D. A. Fragment-based drug discovery / D. A. Erlanson, R. S. McDowell, T. O'Brien // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 47, Issue 14. – P. 3463–3482. doi : 10.1021/jm040031v.
61. Fragment-based lead discovery / D. C. Rees, M. Congreve, C. W. Murray et al. // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 3, Issue 8. – P. 660–672. doi : 10.1038/nrd1467.
62. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer / G. Bollag, J. Tsai, J. Zhang et al. // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2012. – Vol. 11, Issue 11. – P. 873–886. doi : 10.1038/nrd3847
63. Efremov, I. V. Fragment-Based Lead Generation. Lead Generation: Methods and Strategies (67, 10) / I. V. Efremov, D. A. Erlanson. – Wiley-VCH, 2016. – P. 133.
64. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent / D. R. Artis, J. J. Lin, C. Zhang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 106, Issue 1. – P.262–267. doi : 10.1073/pnas.0811325106.

References

1. Keserü, G. M., Makara, G. M. (2009). The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8 (3), 203–212. doi: 10.1038/nrd2796.
2. Hajduk, P. J., Greer, J. (2007). A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (3), 211–219. doi: 10.1038/nrd2220.
3. Erlanson, D. A. (2011). *Introduction to fragment-based drug discovery. Fragment-based drug discovery and X-ray crystallography*. Springer Berlin Heidelberg, 1–32. doi: 10.1007/128_2011_180.
4. Fink, T., Reymond, J.-L. (2007). Virtual Exploration of the Chemical Universe up to 11 Atoms of C, N, O, F: Assembly of 26.4 Million Structures (110.9 Million Stereoisomers) and Analysis for New Ring Systems, Stereochemistry, Physicochemical Properties, Compound Classes, and Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47 (2), 342–353. doi: 10.1021/ci600423u.

5. Scott, D. E., Coyne, A. G., Hudson, S. A., Abell, C. (2012). Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry*, 51 (25), 4990–5003. doi: 10.1021/bi3005126.
6. Jencks, W. P. (1981). On the attribution and additivity of binding energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78 (7), 4046–4050. doi: 10.1073/pnas.78.7.4046.
7. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., Fesik, S. W. (1996). Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science*, 274 (5292), 1531–1534. doi: 10.1126/science.274.5292.1531.
8. Chung, S., Parker, J. B., Bianchet, M., Amzel, L. M., Stivers, J. T. (2009). Impact of linker strain and flexibility in the design of a fragment-based inhibitor. *Nature Chemical Biology*, 5 (6), 407–413. doi: 10.1038/nchembio.163.
9. Huth, J. R., Park, C., Petros, A. M., Kunzer, A. R., Wendt, M. D., Wang, X., Hajduk, P. J. (2007). Discovery and Design of Novel HSP90 Inhibitors Using Multiple Fragment-based Design Strategies. *Chemical Biology & Drug Design*, 70 (1), 1–12. doi: 10.1111/j.1747-0285.2007.00535.x.
10. Hann, M. M., Leach, A. R., Harper, G. (2001). Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41 (3), 856–864. doi: 10.1021/ci000403i.
11. Rishton, G. M. (2003). Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discovery Today*, 8 (2), 86–96. doi: 10.1016/s1359644602025722.
12. Baell, J. B., Holloway, G. A. (2010). New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (7), 2719–2740. doi: 10.1021/jm901137j.
13. Guertin, K. R. et al. (2003). Identification of a Novel Class of Orally Active Pyrimido[5,4-3][1,2,4]triazine-5,7-diamine-Based Hypoglycemic Agents with Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activity. *ChemInform*, 34 (46). doi: 10.1002/chin.200346171.
14. Tjernberg, A., Hallén, D., Schultz, J., James, S., Benkestock, K., Byström, S., Weigelt, J. (2004). Mechanism of action of pyridazine analogues on protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14 (4), 891–895. doi: 10.1016/j.bmcl.2003.12.014.
15. Yi, F., Regan, L. (2008). A Novel Class of Small Molecule Inhibitors of Hsp90. *ACS Chemical Biology*, 3 (10), 645–654. doi: 10.1021/cb800162x.
16. Lor, L. A., Schneek, J., McNulty, D. E., Diaz, E., Brandt, M., Thrall, S. H., Schwartz, B. (2007). A Simple Assay for Detection of Small-Molecule Redox Activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 12 (6), 881–890. doi: 10.1177/1087057107304113.
17. Soares, K. M., Blackmon, N., Shun, T. Y., Shinde, S. N., Takyi, H. K., Wipf, P., Johnston, P. A. (2010). Profiling the NIH Small Molecule Repository for Compounds That Generate H₂O₂ by Redox Cycling in Reducing Environments. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 8 (2), 152–174. doi: 10.1089/adt.2009.0247.
18. McGovern, S. L., Caselli, E., Grigorieff, N., Shoichet, B. K. (2002). A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (8), 1712–1722. doi: 10.1021/jm010533y.
19. Seidler, J., McGovern, S. L., Doman, T. N., Shoichet, B. K. (2003). Identification and Prediction of Promiscuous Aggregating Inhibitors among Known Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (21), 4477–4486. doi: 10.1021/jm030191r.
20. Babaoglu, K., Simeonov, A., Irwin, J. J., Nelson, M. E., Feng, B., Thomas, C. J., Shoichet, B. K. (2008). Comprehensive Mechanistic Analysis of Hits from High-Throughput and Docking Screens against β -Lactamase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (8), 2502–2511. doi: 10.1021/jm701500e.
21. Ferreira, R. S., Bryant, C., Ang, K. K. H., McKerrow, J. H., Shoichet, B. K., Renslo, A. R. (2009). Divergent Modes of Enzyme Inhibition in a Homologous Structure-Activity Series. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (16), 5005–5008. doi: 10.1021/jm9009229.
22. Feng, B. Y., Shoichet, B. K. (2006). A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nature Protocols*, 1 (2), 550–553. doi: 10.1038/nprot.2006.77.
23. Shoichet, B. K. (2006). Screening in a spirit haunted world. *Drug Discovery Today*, 11 (13–14), 607–615. doi: 10.1016/j.drudis.2006.05.014.
24. Hopkins, A. L., Groom, C. R., Alex, A. (2004). Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today*, 9 (10), 430–431. doi: 10.1016/s1359-6446(04)03069-7.
25. Kuntz, I. D., Chen, K., Sharp, K. A., Kollman, P. A. (1999). The maximal affinity of ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (18), 9997–10002. doi: 10.1073/pnas.96.18.9997.
26. Congreve, M., Carr, R., Murray, C., Jhoti, H. (2003). A “Rule of Three” for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today*, 8 (19), 876–877. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02831-9.
27. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4–17. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.01.
28. Hann, M. M., Leach, A. R., Harper, G. (2001). Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41 (3), 856–864. doi: 10.1021/ci000403i.
29. Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J., Leeson, P. D. (2001). Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41 (5), 1308–1315. doi: 10.1021/ci010366a.
30. Teague, S. J., Davis, A. M., Leason, P. D., Oprea, T. (1999). The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (24), 3743–3748. doi: 10.1002/(sici)1521-3773(19991216)38:24<3743::aid-anie3743>3.3.co;2-l.
31. Carr, R. A. E., Congreve, M., Murray, C. W., Rees, D. C. (2005). Fragment-based lead discovery: leads by design. *Drug Discovery Today*, 10 (14), 987–992. doi: 10.1016/s1359-6446(05)03511-7.
32. Kranz, J. K., Schalk-Hihi, C. (2011). Protein Thermal Shifts to Identify Low Molecular Weight Fragments. *Fragment-Based Drug Design – Tools, Practical Approaches, and Examples*, 277–298. doi: 10.1016/b978-0-12-381274-2.00011-x.
33. Basse, N., Kaar, J. L., Settanni, G., Joerger, A. C., Rutherford, T. J., Fersht, A. R. (2010). Toward the Rational Design of p53-Stabilizing Drugs: Probing the Surface of the Oncogenic Y220C Mutant. *Chemistry & Biology*, 17 (1), 46–56. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.12.011.
34. Brough, P. A., Barril, X., Borgognoni, J., Chene, P., Davies, N. G. M., Davis, B., Wright, L. (2009). Combining Hit Identification Strategies: Fragment-Based and in Silico Approaches to Orally Active 2-Aminothieno[2,3-d]pyrimidine Inhibitors of the Hsp90 Molecular Chaperone. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (15), 4794–4809. doi: 10.1021/jm900357y.
35. Klages, J., Coles, M., Kessler, H. (2007). NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery. *The Analyst*, 132 (7), 692–705. doi: 10.1039/b709658p.
36. Hajduk, P. J., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. (1997). One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 119 (50), 12257–12261. doi: 10.1021/ja9715962.
37. Mayer, M., Meyer, F. (1999). Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (12), 1784–1788. doi: 10.1002/(sici)1521-3773(19990614)38:12<1784::aid-anie1784>3.3.co;2-h
38. Taldone, T., Sun, W., Chiosio, G. (2009). Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (6), 2225–2235. doi: 10.1016/j.bmc.2008.10.087.
39. Gibbs, A. C., Abad, M. C., Zhang, X., Tounge, B. A., Lewandowski, F. A., Struble, G. T., Kuo, L. C. (2010). Electron Density Guided Fragment-Based Lead Discovery of Ketohekinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (22), 7979–7991. doi: 10.1021/jm100677s.
40. Davies, T. G., Hyvönen, M. (Eds.). (2012). Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography. *Topics in Current Chemistry*. doi: 10.1007/978-3-642-27540-1.
41. Blundell, T. L., Jhoti, H., Abell, C. (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1 (1), 45–54. doi: 10.1038/nrd706.

42. Wyatt, P. G., Woodhead, A. J., Boulstridge, J. A., Berdini, V., Carr, M. G., Cross, D. M., Woolford, A. J. (2008). Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi: 10.2210/pdb2vto/pdb.
43. Hofstadler, S. A., Sannes-Lowery, K. A. (2006). Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (7), 585–595. doi: 10.1038/nrd2083.
44. Navratilova, I., Hopkins, A. L. (2010). Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1 (1), 44–48. doi: 10.1021/ml900002k.
45. Sledz, P., Silvestre, H. L., Hung, A. W., Ciulli, A., Blundell, T. L., Abell, C. (2010). Optimization of the Interligand Overhauser Effect for Fragment Linking: Application to Inhibitor Discovery against Mycobacterium tuberculosis Pantothenate Synthetase. *Journal of the American Chemical Society*, 132 (13), 4544–4545. doi: 10.1021/ja100595u.
46. Favia, A. D., Bottegioni, G., Nobeli, I., Bisignano, P., Cavalli, A. (2011). SERAPhiC: A Benchmark for in Silico Fragment-Based Drug Design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51 (11), 2882–2896. doi: 10.1021/ci2003363.
47. Petros, A. M., Dinges, J., Augeri, D. J., Baumeister, S. A., Betebenner, D. A., Bures, M. G., Fesik, S. W. (2006). Discovery of a Potent Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-xL from NMR and Parallel Synthesis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2), 656–663. doi: 10.1021/jm0507532.
48. Drinkwater, N., Vu, H., Lovell, K. M., Criscione, K. R., Collins, B. M., Prisinzano, T. E., Martin, J. L. (2010). Fragment-based screening by X-ray crystallography, MS and isothermal titration calorimetry to identify PNMT (phenylethanolamine N-methyltransferase) inhibitors. *Biochemical Journal*, 431 (1), 51–61. doi: 10.1042/bj20100651.
49. Edink, E., Rucktooa, P., Retra, K. et al. (2011). Fragment growing induces conformational changes in acetylcholine binding protein: A structural and thermodynamic analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 133 (14), 5363–5371. Cited 67 times. doi: 10.1021/ja110571r.
50. Brough, P. A., Barril, X., Borgognoni, J., Chene, P., Davies, N. G. M., Davis, B., Wright, L. (2009). Combining Hit Identification Strategies: Fragment-Based and in Silico Approaches to Orally Active 2-Aminothieno[2,3-d]pyrimidine Inhibitors of the Hsp90 Molecular Chaperone. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (15), 4794–4809. doi: 10.1021/jm900357y.
51. Hughes, S. J., Millan, D. S., Kilty, I. C., Lewthwaite, R. A., Mathias, J. P., O'Reilly, M. A., Brown, D. G. (2011). Fragment based discovery of a novel and selective P13 kinase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (21), 6586–6590. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.07.117.
52. Murray, C. W., Verdonk, M. L. (2002). The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16 (10), 741–753. doi: 10.1023/A:1022446720849.
53. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (12), 2615–2623. doi: 10.1021/jm020017.
54. Howard, N., Abell, C., Blakemore, W., Chessari, G., Congreve, M., Howard, S., van Montfort, R. L. M. (2006). Application of Fragment Screening and Fragment Linking to the Discovery of Novel Thrombin Inhibitors†. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (4), 1346–1355. doi: 10.1021/jm050850v.
55. Hung, A. W., Silvestre, H. L., Wen, S., Ciulli, A., Blundell, T. L., Abell, C. (2009). Application of Fragment Growing and Fragment Linking to the Discovery of Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Pantothenate Synthetase. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (45), 8452–8456. doi: 10.1002/anie.200903821.
56. Verdonk, M. L., Rees, D. C. (2008). Group Efficiency: A Guideline for Hits-to-Leads Chemistry. *ChemMedChem*, 3 (8), 1179–1180. doi: 10.1002/cmdc.200800132.
57. Potter, A., Oldfield, V., Nunns, C., Fromont, C., Ray, S., Northfield, C. J., Moore, J. D. (2010). Discovery of cell-active phenyl-imidazole Pin1 inhibitors by structure-guided fragment evolution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (22), 6483–6488. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.09.063.
58. Howard, S., Berdini, V., Boulstridge, J. A., Carr, M. G., Cross, D. M., Curry, J., Wyatt, P. G. (2009). Fragment-Based Discovery of the Pyrazol-4-yl Urea (AT9283), a Multitargeted Kinase Inhibitor with Potent Aurora Kinase Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (2), 379–388. doi: 10.1021/jm800984v.
59. Tanaka, R., Squires, M. S., Kimura, S., Yokota, A., Nagao, R., Yamauchi, T., Maekawa, T. (2010). Activity of the multitargeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL-positive leukemic cells. *Blood*, 116 (12), 2089–2095. doi: 10.1182/blood-2009-03-211466.
60. Erlanson, D. A., McDowell, R. S., O'Brien, T. (2004). Fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (14), 3463–3482. doi: 10.1021/jm040031v.
61. Rees, D. C., Congreve, M., Murray, C. W., Carr, R. (2004). Fragment-based lead discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3 (8), 660–672. doi: 10.1038/nrd1467.
62. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 (11), 873–886. doi: 10.1038/nrd3847.
63. Efremov, I. V., Erlanson, D. A. (2016). *Fragment-Based Lead Generation. Lead Generation: Methods and Strategies* (67, 10). Wiley-VCH, 133.
64. Artis, D. R., Lin, J. J., Zhang, C., Wang, W., Mehra, U., Perreault, M., Tobin, J. F. (2008). Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (1), 262–267. doi: 10.1073/pnas.0811325106.

Надійшла до редакції 23.01.2017 р.