

УДК 577.151.042, 577.152.27.10, 57.052.6

Панель тирозиновых киназ как инструмент для разработки противораковых препаратов

Т. В. Ракитина^{1,2,*}, О. В. Юдкина^{3,4}, Е. В. Смирнова¹, А. В. Липкин^{3,4}¹ Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10² Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33³ Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59⁴ Российский научный центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

* E-mail: taniarakitina@yahoo.com

РЕФЕРАТ Одно из направлений таргетной (целевой) терапии в онкологии связано с открытием фармакологического потенциала низкомолекулярных ингибиторов онкогенных тирозиновых киназ. В настоящее время исследования, направленные на создание новых терапевтически значимых ингибиторов, невозможны без комбинации информационных и экспериментальных подходов, включая биохимический, клеточный или *in silico* скрининг и изучение трехмерной структуры активного центра киназы в комплексе с ингибитором с помощью методов кристаллизации и рентгеноструктурного анализа или молекулярного моделирования. Настоящая работа является примером сочетания экспериментального подхода к поиску ингибиторов с компьютерным анализом потенциального механизма действия активных соединений, которое позволило предложить 2-гидроксифенольную группу в качестве основы для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ.

Ключевые слова: тирозиновые киназы; низкомолекулярные ингибиторы; скрининг химической коллекции; 2-гидроксифенольная группа.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие роли онкогенных тирозиновых киназ (ТК), получивших способность к неконтролируемой активации в результате генетических нарушений, в развитии раковых заболеваний и терапевтического потенциала их ингибирования ознаменовало новую эру в онкологии, отмеченную появлением в клинической практике таргетных, направленных на определенную белковую мишень препаратов [1]. Наиболее перспективным подходом к ингибированию онкогенных ТК считают использование низкомолекулярных химических соединений, способных конкурировать с молекулой АТФ за связывание с активным центром фермента и тем самым ингибировать киназу [2]. Первым примером успешного использования этого подхода является создание лекарственного препарата иматиниб (гливек), подавляющего активность тирозинкиназных рецепторов Kit и PDGFR, а также нерецепторной слитой тирозинкиназы Vcr-Abl [3]. Сейчас в клинической практике помимо иматиниба используют ряд препаратов аналогичного действия, но гораздо большее их число находится на разных стадиях разработки и испытаний, и параллельно идет активный поиск новых классов химических соединений, способных ингибировать тирозиновые киназы [4]. Неослабевающая активность исследователей в области разработки ингибиторов ТК связана как с уже отмеченной ролью белков этого класса в онкогенезе [2], так и со способностью мутантных форм ТК приобретать устойчивость к действию уже известных ингибиторов [5]. Кроме того, следует отметить проблему недостаточной селективности химических ингибито-

ров, действие которых направлено на АТФ-связывающие участки киназ [6], и наоборот, терапевтическую значимость одновременного ингибирования альтернативных сигнальных путей, вызывающих онкогенную трансформацию клетки [7].

Современные подходы к разработке новых терапевтически значимых ингибиторов основаны на комбинации информационных и экспериментальных методов, включая биохимический, клеточный или *in silico* скрининг и изучение трехмерной структуры активного центра киназы в комплексе с ингибитором с помощью кристаллизации и рентгеноструктурного анализа или методами молекулярного моделирования [8, 9]. Известно, что применение вычислительных методов требует информации о пространственной структуре активного центра белка-мишени или его близких аналогов, а результаты компьютерного моделирования должны быть подтверждены экспериментально. Таким образом, поиск и изучение специфичности ингибиторов требуют создания белковых панелей рекомбинантных киназных мишеней [6]. Следует отметить, что для наработки функционально активных тирозиновых киназ, как правило, используют бакуловирусную систему экспрессии [10].

Целью настоящей работы было создание панели функционально активных тирозиновых киназ и поиск ингибиторов в коллекции низкомолекулярных соединений. Анализ результатов скрининга с помощью молекулярного моделирования позволил предположить, что 2-гидроксифенольная группа является перспективной основой для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения функционально активных тирозиновых киназ использовали бакуловирусную систему экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen, США).

Коллекция низкомолекулярных органических соединений, содержащая более десяти тысяч химических веществ с молекулярными весами от 150 до 600, для поиска ингибиторов тирозиновых киназ была предоставлена ООО «Кембридж», Москва (<http://chembridge.com/datasheets/KINASet.pdf>). Все соединения, растворенные в ДМСО до 1 мм концентрации, хранили в аликвотах на -20°C.

Получение бакуловирусов. Фрагменты кДНК, кодирующие 16 белков, были клонированы с помощью классического подхода: обратная транскрипция на матрице тотальной РНК, ПЦР и лигирование в T-easy вектор (Promega, США). Полный список киназ и детали клонирования представлены в табл. 1. После проверки нуклеотидных последовательностей секвенированием фрагменты кДНК были перенесены в вектор pFastBacHT-B с сохранением рамки считывания при переходе от последовательности, кодирующей шесть гистидинов, к кДНК целевого белка. Полученные конструкции pFastBacHT-ТК использовали для трансформации клеток *E.coli* штамма *DH10Bac*, где плазида рекомбинировала с геномом бакуловируса. Рекомбинантные бакмиды

выделяли из клеток *E.coli* и вводили в клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9), культивируемые на шести-луночных планшетах при 27°C. В трансфицированных клетках происходила сборка вирусных частиц, которые вызывали лизис клеток и накапливались в ростовой среде. В процессе развития инфекции клетки синтезировали и накапливали целевые 6×Гис-ТК. Все процедуры по работе с бакуловирусами проводили согласно рекомендациям к экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen, США).

Выделение 6×Гис-ТК. Клеточный осадок (~10⁹ клеток или 10 г биомассы), полученный из 1 л инфицированной культуры, замораживали при -70°C, а затем лизировали в 50 мл буфера А (500 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl pH 8.5 и 0.1 % Triton X-100) с добавлением ДНКазы и ингибиторов протеаз. Дeterгент-нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием (15 000 г, 1 ч, +4°C), осветленный лизат инкубировали с 2 мл Ni²⁺ сефарозы при +4°C в течение часа. По окончании связывания смолу отмывали буфером А, содержащим 30 мМ имидазол, до полного исчезновения белка в отмывке, а специфически связавшийся белок элюировали со смолы буфером А, содержащим 350 мМ имидазол. Выделенные 6×Гис-ТК переводили из элюирующего буфера в буфер, содержащий 50 мМ Tris-HCl pH 8.5, 100 мМ NaCl, 0.05 % Triton X-100, путем обессоливания

Таблица 1. Детали создания панели тирозиновых киназ

Тирозиновые киназы	Acc. N AA	Прямой и обратный праймеры ¹ (5'–3')
Abl – Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1	NP_005148 2–601	GGATCCTTGGAGATCTGCCTGAAGCTG ACTCGAGCCGAACAAGTTGGTCTTTTG
Alk – Anaplastic Lymphoma Kinase Receptor	NP_004295 1092–1406	CATGGATCCTACAACCCCAACTAC GCTCGAGTTATTCCACAAGTGGACCAT
Blk – B-Lymphocyte Kinase	NP_001706 2–505	GGATCCGGGCTGGTAAGTAGCA CTCGAGGGCTGCAGCTCGTACTG
CSF1R – Colony Stimulating Factor 1 Receptor	NP_005202 545–972	GGATCCAAGTACCAGGTCCGCT CTCGAGCAGAACTGATAGTTGTTG
Csk – C-Terminal c-Src Kinase	NP_004374 2–450	TGGATCCTCAGCAATACAGCGCC ACTCGAGAGGTGCAGCTCGTGGGTT
Eph A2 – Ephrin Receptor A2	NP_004422 562–976	AGATCTAGGAGGAAGAACCAGC CTCGAGATGGGGATCCCCACAG
FGFR1 – Fibroblast Growth Factor Receptor 1	NP_056934 398–820	GGATCCAAGAGTGGTACCAAGAAGAGT TTCTCGAGCGGCGTTTGGAGTCCGCCATT
FGFR2 – Fibroblast Growth Factor Receptor 2	NP_075259 402–822	GGATCCAAGAACACGACCAAGAAGC CTCGAGGTTTAAACACTGCCGTTTATG
IGFR1 – Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	NP_000866 974–1294	GGATCCAGAAAGAGAAATAACAGCAGG GCTCGAGTTAATCCAGTCTCTCCGGCTC
InsR – Insulin Receptor	NP_000199 982–1382	GGATCCAGGCAGCCAGATGGGCCGCTG CTCGAGGAAGGATTGGACCCGAGGCAAG
Kit – Stem Cell Factor Receptor	NP_000213 545–976	TGGATCCTACAAATATTTACAGAAACCC TTCTCGAGACATCGTCTGTCACAAGCAG
Lyn – Yamaguchi Sarcoma Viral Related Oncogene Homolog 2	NP_002341 полноразм.	GGGATCCGGATGTATAAAATCAAAGG GGAATTCTCGAGGGCTGCTGCTGGTATT
PDGFRa – Platelet-Derived Growth Factor Receptor-а	NP_006197 552–1089	GGATCCAAGCCAGTTCAGGATCCGAT GTCGACAGGAAGCTATCCTGTCTCCG
Pyk2 – Focal Adhesion Kinase 2	NP_004094 353–762	TGGATCCCGGCTGCAGGGTGAGACCA TTCTCGAGTTAACGGGAGATGGATACTC
Syk – Spleen Tyrosine Kinase	NP_003168 полноразм.	GGATCCGCCAGCAGCGGCATGGCTGAC CTCGAGTTCACCACCTCATAGTAGTA
Yes – Yamaguchi Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1	NP_005424 11–542	CGGGATCCCCAGCCATTAATAACAGAC TCGTCGACAAATTTCTCTGGCTGGTA

¹ – Выделены сайты рестрикции, используемые для переклонирования из T-easy вектора в pFastBacHT-B.

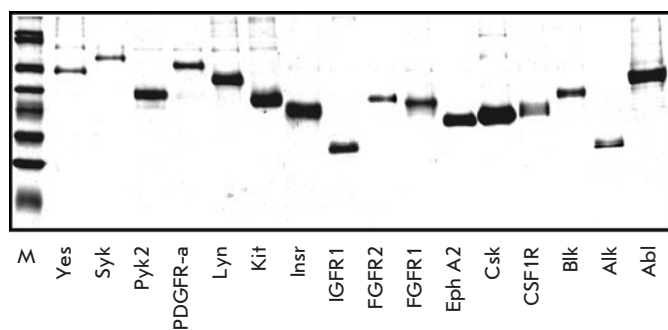


Рис. 1. Анализ очищенных препаратов рекомбинантных 6xHis-ТК. Электрофореграмма разделения белков в 10 % ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси G-250. Слева маркер молекулярных масс (116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 кДа), далее – нанесены 10 мкл аликвоты 6xHis-ТК

на колонке PD-10 и после добавления ДТТ до 2 мМ и глицерина до 50 % помещали на -20°C.

Определение активности 6xHis-ТК. В каждую киназную реакцию вносили АТФ до 10 мкМ концентрации, универсальный субстрат тирозиновых киназ poly(Glu₄-Tyr) (Sigma, США) до 10 мкг и одну из 6xHis-ТК в количестве 30, 60 или 90 нг в 1xкиназном буфере: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5 мМ MnCl₂, 5 мМ MgCl₂, 0.01 % Tween-20 и 2 мМ DTT. Для контроля исходного уровня АТФ реакции проводили в отсутствие киназы. Киназные реакции проводили в объеме 30 мкл в ячейках 384-луночных планшетов, при 30°C, в течение 15 мин и проявляли путем добавления 10 мкл реагента Kinase-Glo (Promega, США). Люминесценцию детектировали с помощью Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer, США). Для определения активности 6xHis-ТК проводили два эксперимента в трипликатах.

Проведение скрининга коллекции низкомолекулярных соединений. Скрининг проводили путем определения способности химических соединений снижать активность тирозиновых киназ, измеряемую в люминесцентном киназном тесте. Все необходимые разведения компонентов киназных реакций готовили в 1xкиназном буфере непосредственно перед началом скрининга. Реакции проводили в лунках 384-луночного планшета, в трипликатах, вручную или при помощи MultiPROBE II (Packard, США). В каждый планшет включали контрольные ячейки, содержащие АТФ с киназой без ингибиторов (0 % ингибирования) и АТФ без киназы (100 % ингибирования). Киназные реакции собирали и проводили в следующем порядке: 1) в лунки добавляли 10 мкл 30 мкМ потенциального ингибитора или 3 % ДМСО, 2) добавляли 10 мкл 1xкиназного буфера с требуемым количеством киназы, 3) инкубировали 20 мин при 20°C, 4) добавляли 10 мкл 30 мкМ АТФ с 10 мкг poly(Glu₄-Tyr), 5) инкубировали 90 мин при 30°C, 6) добавляли 10 мкл реагента Kinase-Glo и измеряли люминесценцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью создания панели тирозиновых киназ для проведения скрининга химической коллекции были выбраны 16 белков, принадлежащих к пяти семействам рецепторных ТК и пяти семействам нерецепторных ТК (табл. 1). Для ре-

цепторных и некоторых цитоплазматических ТК вместо полноразмерных белков были использованы фрагменты, содержащие киназные домены, которые представляют собой функциональную модель для поиска и изучения АТФ конкурентных ингибиторов [11]. Для экспрессии рекомбинантных белков была выбрана бакуловирусная система, считающаяся оптимальной для получения функционально-активных тирозиновых киназ [10]. В N-концевые области рекомбинантных белков были введены последовательности из 6 гистидиновых остатков, что позволяло выделять все шестнадцать 6xHis-ТК в одну стадию с помощью металло-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-сефарозе, которую проводили, основываясь на методических рекомендациях, разработанных для данного типа хроматографии, и результатах аналитических экспериментов по оптимизации условий выделения белков. Финальный протокол выделения приведен в разделе «Материалы и методы».

Выделенные белки анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси G-250 (рис. 1). Все 6xHis-ТК обладали электрофоретическими подвижностями, соответствующими расчетным молекулярным весам, и имели чистоту не менее 70 % (табл. 2). Все 16 продуктов экспрессии были однозначно подтверждены с помощью

Таблица 2. Характеристики 6xHis-ТК после стандартного эксперимента по наработке и выделению

6xHis-ТК	Мол. вес ¹ (кДа)	Чистота ² (%)	Выход ³ (мг)	Уд. акт. ⁴ (нмоль/мин · мг)	Количество на 1 тест ⁵ , нг/тест
Abl	72.5	85	6	118	50
Alk	38.8	75	1	60	90
Blk	63.8	80	3.5	91	60
CSF1R	54.0	80	5	98	60
Csk	56.7	90	20	153	40
Eph A2	53.4	95	10	110	50
FGFR1	52.5	70	1.5	223	20
FGFR2	53.8	70	1.5	245	20
IGFR1	39.8	80	2	147	40
Insr	51.4	85	6.5	131	40
Kit	55.0	75	3	80	70
Lyn	63.4	75	1.5	332	20
PDGFR-a	67.4	70	2.5	84	70
Pyk2	52.0	80	3.5	86	70
Syk	78	70	1.9	131	50
Yes	65.7	70	1.5	273	20

¹ – Расчетный молекулярный вес рекомбинантных 6xHis-ТК.
² – Чистоту белка определяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси G-250.
³ – Выход 6xHis-ТК из 1 литра (10 г) клеток определяли исходя из концентрации белка, определенной по методу Бредфорд.
⁴ – Удельные активности определяли при концентрации фермента 1.5 мкг/мл (45 нг/тест, рис. 2).
⁵ – Количество 6xHis-ТК, гидролизующее за 90 мин инкубации не более 80 % исходного количества АТФ, рассчитывали исходя из удельных активностей и проверяли экспериментально.

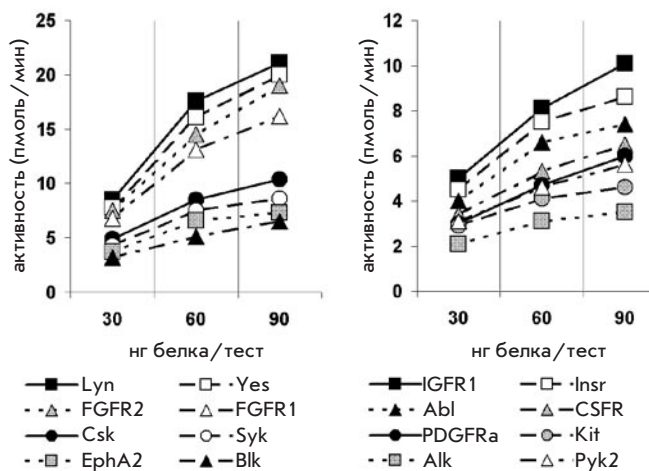


Рис. 2. Активность 6хГис-ТК. Активность киназ, измеренная в люминесцентном киназном тесте, выражена в пикомолях фосфата, перенесенного с молекул АТФ на субстрат poly(Gly₄-Tyr) указанным количеством киназы за 1 мин. Представлены средние значения, полученные в результате двух экспериментов, проводимых в трипликатах

MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Концентрацию очищенных 6×Гис-ТК определяли по методу Бредфорд, выходы рекомбинантных белков составляли от 1 до 20 мг белка на литр инфицированных клеток (табл. 2).

Для определения активности выделенных киназ был выбран метод, основанный на прямом одностадийном измерении количества АТФ в киназной реакции с помощью люминесцентного реагента Kinase-Glo, хорошо сочетающийся с процедурой проведения высокопроизводительного скрининга [12]. Уровень люминесценции, измеренный в киназной реакции или контроле, переводили в молярность АТФ, используя стандартную кривую титрования, после чего определяли количество АТФ, гидролизованное

каждой киназой за 1 мин, и строили графики зависимости уровня киназной активности от количества фермента в реакционной смеси (рис. 2). Удельную активность определяли при концентрации фермента 1.5 мкг/мл (45 нг в реакции) и выражали в нмоль фосфата, перенесенного от молекулы АТФ на субстрат за 1 мин в пересчете на 1 мг киназы при стандартных условиях реакции. Удельная активность для 6×Гис-ТК, а также рассчитанные на ее основе количества ферментов, добавляемые в киназные реакции при проведении скрининга химической коллекции, приведены в табл. 2.

Протокол проведения скрининга коллекции низкомолекулярных соединений приведен в разделе «Материалы и методы». Потенциальные ингибиторы тестировали против каждой из 16 киназ в одной рабочей концентрации (10 мкМ). При разработке протокола скрининга учитывали то, что люминесцентный реагент Kinase-Glo обеспечивает линейную зависимость между количеством АТФ в реакции и интенсивностью люминесцентного сигнала в диапазоне концентраций АТФ от 1 до 100 мкМ. Исходя из начальной концентрации АТФ 10 мкМ количество добавляемой киназы подбирали так, чтобы по окончании инкубации в реакционной смеси оставалось не менее 20 % негидролизованного АТФ. Выбор проводили на основании удельной активности ТК и проверяли в аналитическом эксперименте. После проведения киназных реакций и измерения люминесценции относительные люциферазные единицы нормализовали на контрольные реакции и переводили в % ингибирования. Достоверность результатов скрининга подтверждали вычислением Z' фактора для каждого планшета, используя метод Zhang et al. [13]. Z' фактор для большинства планшетов составлял более 0.5, а среднее значение Z' фактора для всего скрининга было 0.59 ± 0.1. Соединения, в 10 мкМ концентрации ингибирующие активность хотя бы одной из 16 6×Гис-ТК на 50 % и более, отбирали для последующей проверки, проводимой в двух независимых экспериментах.

В результате проведенного скрининга были найдены шесть химических соединений, активных в отношении ТК,

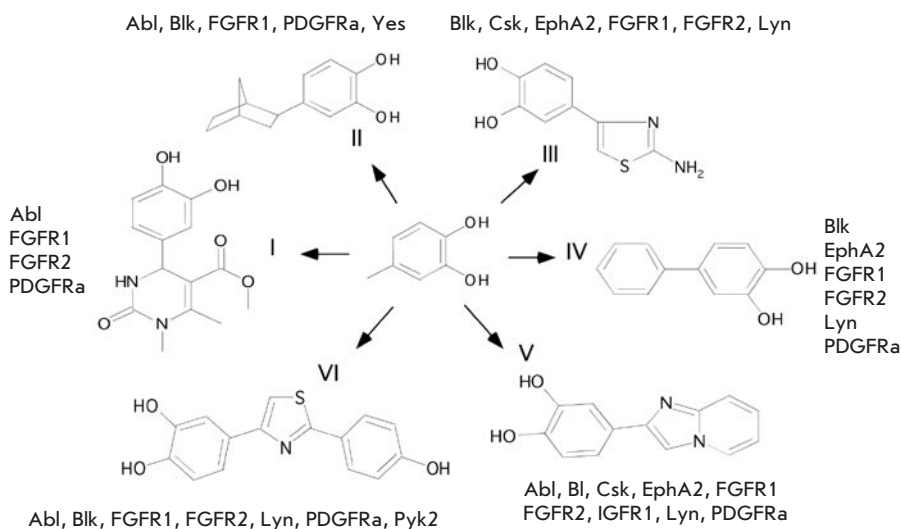


Рис. 3. Ингибиторы тирозинных киназ, найденные при скрининге химической коллекции. В центре 2-гидроксифенольная группа, общая для всех 6 ингибиторов. Около каждого ингибитора указаны ТК, активность которых данное соединение в 10 мкМ концентрации подавляет на 50 % и более

содержащие в своем составе 2-гидроксифенольную группу (рис. 3). Поиск по базам данных Chemical Abstracts Service (<http://www.cas.org/expertise/cascontent/registry/index.html>) и PubChem BioAssay (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pcassay>) выявил, что ни одно из найденных соединений не относится к числу известных ингибиторов тирозиновых киназ. Данные соединения одновременно ингибировали от четырех до девяти ТК. Наиболее частыми мишенями ингибирования были FGFR1, Abl, Blk, FGFR2, PDGFR- α , а также Lyn, Eph A2, Csk и в единичных случаях IGFR1, Puck2, Yes. Так как все соединения содержали в своем составе 2-гидроксифенольную группу, мы предположили, что именно она отвечает за способности ингибиторов взаимодействовать с киназными доменами. Известно, что классические киназные ингибиторы имеют фармакофор (минимальную молекулярную основу, определяющую биологическую активность), в котором соседние ароматическая аминогруппа и ароматический азот или кислород карбонильной группы образуют пару координированных водородных связей с шарнирной областью киназного домена (АТФ-связывающий участок), имитируя водородные связи молекулы АТФ [14]. Молекулярный докинг ингибиторов I–VI, проведенный на основе известных пространственных структур киназных доменов Csk, FGFR1, FGFR2 с помощью программы Lead Finder [15], показал, что 2-гидроксифенольная группа тоже способна сформировать пару водородных связей с аминокислотами АТФ-связывающего участка и, следовательно, может быть рассмотрена в качестве нового фармакофора тирозинкиназных ингибиторов. Поиск аналогичного взаимодействия в базе данных Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) выявил, что аналогичные водородные связи формируются в комплексах, образуемых фосфоинозитид-3-киназой (PI3-kinase) с флавоноидами кверцитином и мирицетином [16]. Следует отметить, что молекулярный вес соединений

I–VI значительно ниже, чем у всех известных ингибиторов ТК, что, вероятно, и объясняет их способность проникать в АТФ-связывающие карманы различных киназ. В то же время именно низкий молекулярный вес соединений обеспечивает возможность их дальнейшего модифицирования или комбинирования с фрагментами уже известных ингибиторов ТК с целью увеличения специфичности и эффективности в отношении выбранной мишени. В дальнейшем мы планируем подтвердить результаты моделирования в экспериментах по кристаллизации ТК с найденными ингибиторами.

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы была создана белковая панель функционально активных тирозиновых киназ и проведен скрининг коллекции низкомолекулярных органических соединений, в результате которого были отобраны шесть ранее неизвестных ингибиторов, содержащих в своем составе 2-гидроксифенольную группу. Молекулярный докинг активных соединений с помощью программы Lead Finder показал, что 2-гидроксифенольная группа может быть предложена в качестве основы для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ. ●

Данная работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.512.12.2051)

и программой Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

Авторы выражают признательность ООО «Кембридж», Москва за предоставление химической коллекции, Р.Х. Зиганшину (лаборатория протеомики ИБХ РАН) за проведение MALDI-TOF-масс-спектрометрии и MolTech Ltd, Москва за проведение молекулярного моделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen P. // Nat. Rev. Drug Discov. 2002. V. 1. P. 309–315.
- Gunby R.H., Sala E., Tartari C.J., Puttini M., Gambacorti-Passerini C., Mologni L. // Anti-Cancer Agents in Med. Chem. 2007. V. 7. P. 594–611.
- Cohen M.H., Johnson J.R., Pazdur R. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11 (1). P. 12–9.
- Jianming Z., Priscilla L., Gray N.S. // Nat. Rev. Cancer. 2009. V. 9. P. 28–39.
- Hofmann W.-K., Jones L.C., Lemp N.A., de Vos S., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann O.G., Koeffler H.P. // Blood. 2002. V. 99. P. 1860–1862.
- Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie J., McLauchlan H., Klevernic I., Arthur S.C., Alessi D., Cohen P. // Biochem. J. 2007. V. 408. P. 297–315.
- Faivre S., Djellou S., Raymond E. // Semin. Oncol. 2006. V. 33 (4). P. 407–420.
- Drews J. // Science. 2000. V. 287. P. 1960–1964.
- Anderson A. // Chem. & Biol. 2003. V. 10. P. 787–797.
- Chambers S.P., Austen D.A., Fulghum J.R., Kim W.M. // Protein Expr. Purif. 2004. V. 36. P. 40–47.
- Mologni L., Sala E., Riva B., Cesaro L., Cazzaniga S., Redaelli S., Marin O., Pasquato N., Donella-Deana A., Gambacorti-Passerini C. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 177–185.
- Koresawa M., Okabe T. // Assay and Drug Dev. Technol. 2004. V. 2. P. 153–160.
- Zhang J.H., Chung T.D., Oldenburg K.R. // J. Biomol. Screen. 1999. V. 4. P. 67–73.
- Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E., Cowan-Jacob S.W., Fendrich G., Liebetanz J., Mestan J., O'Reilly T., Traxler P., Chaudhuri B., Fretz H., Zimmermann J., Meyer T., Caravatti G., Furet P., Manley P.W. // Pharmacol Ther. 2002. V. 93 (2–3). P. 79–98.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
- Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Whyman M.P., Williams R.L. // Mol. Cell. 2000. V. 6. P. 909–919.