

Σχεδιασμός Φαρμακευτικών Ενώσεων με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Θ. Μαυρομούστακος, Μ. Ζερβού, Ε. Μαντζουράνη

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας,
Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, 116 35 Αθήνα

Περίληψη □ Ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμακευτικών μορίων έχει ως στόχο την αποδοτικότερη σύνθεση καινοτόμων φαρμακευτικών ενώσεων. Χρησιμοποιεί τη μοριακή βάση του υπό μελέτη συστήματος φαρμακευτικού μορίου-υποδοχέα, και τις φυσικοχημικές παραμέτρους οι οποίες το προσδιορίζουν. Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού συνιστά ένα ανεκτίμητο εργαλείο στη διαδικασία αυτή. Στο ακόλουθο άρθρο ανασκόπησης θα αναφερθούν δύο παραδείγματα στα οποία αναδεικνύεται η συνεισφορά της μεθοδολογίας: παρουσιάζεται εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στο κέντρο δράσης (υποδοχέα), όταν αυτό είναι γνωστό, καθώς και σε περιβάλλοντα το οποία μπορούν να το προσομοιάσουν, όταν δεν έχει επιτευχθεί απομόνωσή του.

Εισαγωγή

Ο σχεδιασμός καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων επιτελείται με δύο κύριες διεργασίες, το συστηματικό ή ορθολογικό τρόπο και το μη συστηματικό ή εμπειρικό. Ο μη συστηματικός ή εμπειρικός τρόπος σχεδιασμού νέων εν δυνάμει βιοδραστικών μορίων, βασίζεται στη γνώση την οποία έχει ο συνθετικός χημικός για το σύστημα καθώς και τη διαίσθησή του. Ο συστηματικός ή ορθολογικός συνίσταται:

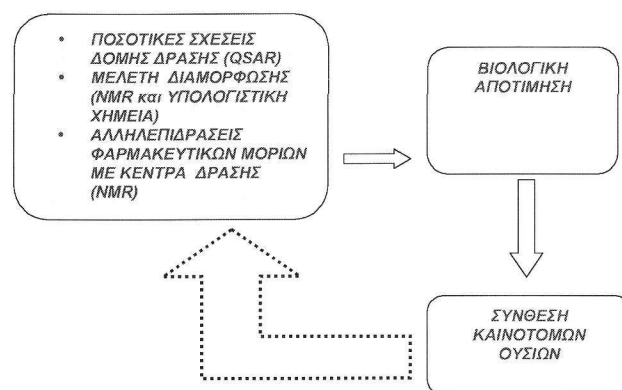
(i) Στην κατανόηση των φυσικοχημικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων που προσδιορίζουν την αλληλεπίδραση του φαρμάκου στο κέντρο δράσης. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν την ανάλυση διαμορφωτικού χώρου των μορίων, τον προσδιορισμό των θέσεων πρόσδεσης στο κέντρο δράσης (docking), το οποίο μπορεί να είναι η βιολογική μεμβράνη ή ο διαμεμβρανικός υποδοχέας καθώς και την αξιολόγηση των θέσεων αυτών για την ανάδειξη της βέλτιστης (scoring).

(ii) Στο σχεδιασμό νέων φαρμακοφόρων τμημάτων τα οποία βελτιστοποιούν τις φυσικοχημικές αλληλεπιδρά-

σεις με το κέντρο δράσης.

Είναι κατανοητό ότι ο ορθολογικός σχεδιασμός υπερτερεί του μη συστηματικού τρόπου σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων, γιατί βασίζεται στη γνώση σε μοριακό επίπεδο του υπό μελέτη συστήματος.

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στον ορθολογικό σχεδιασμό, όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα ροής (Σχήμα 1). Η συνεισφορά της θα δειχθεί με δύο παραδείγματα.



Σχήμα 1: Στο διάγραμμα ροής παρουσιάζεται ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμακευτικών μορίων

1. Σχέσεις Δομής Δράσης με χρήση NMR (SAR by NMR)

Οι Σχέσεις Δομής Δράσης (Structure-Activity Relationships) με χρήση NMR (SAR by NMR) είναι μία καινοτόμος μέθοδος σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων η οποία εισήχθη το 1990 από την ερευνητική ομάδα του Stephen Fesik στα εργαστήρια της Φαρμακευτικής εταιρείας Abbott των Η.Π.Α.¹⁻²³

Στην εφαρμογή της μεθόδου συντέτιναι:

(α) Η δυνατότητα παραγωγής αριθμού συνθετικών αναλόγων μιας πρωτότυπης ένωσης σε σύντομο χρονικό διάστημα

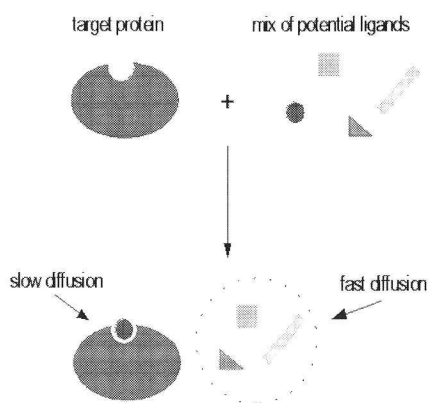
(β) Η δυνατότητα εφαρμογής ταχέων βιολογικών δοκιμών στις συνθετικές ενώσεις

(γ) Η εξέλιξη στην τεχνολογία της φασματοσκοπίας NMR με την εισαγωγή παλμών βαθμίδας πεδίου.

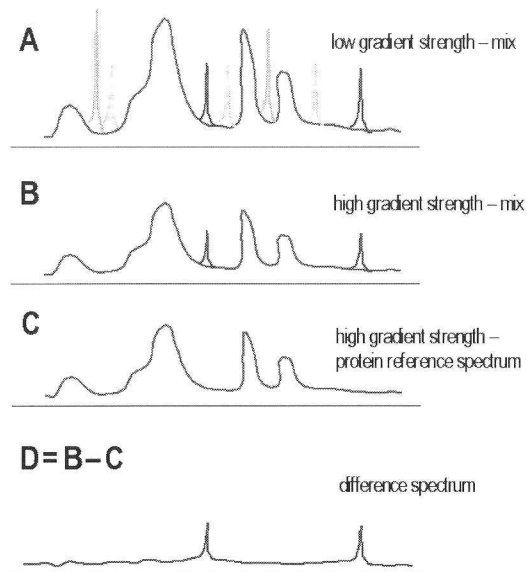
Η μέθοδος βασίζεται στη διευκρίνιση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης στόχου, μετά από απομόνωση της. Η ιδέα αυτή δεν είναι πρωτότυπη. Χημικοί και βιοχημικοί την είχαν ήδη χρησιμοποιήσει για να κατανοήσουν και να προβλέψουν τη φαρμακευτική δράση. Ας δούμε πώς εφαρμόζεται η υλοποίηση αυτής της ιδέας με χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Βιβλιοθήκες (libraries) που περιλαμβάνουν 100,000-200.000 ενώσεις δοκιμάζονται για να διαπιστωθεί εάν έχουν δυναμικό δέσμευσης στην πρωτεΐνη στόχο. Τα μόρια αυτά ονομάζονται «εν δυνάμει προσδέτες» (potential ligands) (Σχήμα 2). Συνήθως δοκιμάζονται ταυτόχρονα γύρω στους 10 προσδέτες για να επιταχυνθεί η διαδικασία (High Throughput Screening). Η διαδικασία βασίζεται στο διαφορετικό συντελεστή διάχυσης των πρωτεϊνών ($\sim 10^{10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) σε σύγκριση με τα μικρά μόρια ($\sim 10^{12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). Επιλεκτικές πειραματικές συνθήκες μπορούν να διακρίνουν τα μόρια προσδέτες από αυτά τα οποία δεν προσδένονται σε μία πρωτεΐνη.

Στο πείραμα διάχυσης 1D NMR γίνεται καταρχήν χρήση παλμών βαθμίδας πεδίου μικρής ισχύος (low potential gradient strength) ώστε να παρατηρηθούν οι κορυφές απ' όλα τα μόρια. Ένα δεύτερο πείραμα διάχυσης 1D NMR εφαρμόζεται, στο οποίο αυξάνεται η ισχύς των παλμών βαθμίδας πεδίου. Στο δεύτερο πείραμα οι κορυφές των μορίων τα οποία δεν προσδένονται στην πρωτεΐνη δεν θα εμφανισθούν στο φάσμα. Οι ενώσεις, όμως, οι οποίες προσδένονται στην πρωτεΐνη λόγω του μικρότερου συντελεστή διάχυσης του συμπλόκου, θα παρατηρηθούν (Σχήμα 3).



Σχήμα 2: Το πείραμα NMR μπορεί να διακρίνει μεταξύ των μορίων τα οποία προσδένονται στην πρωτεΐνη (μικρό συντελεστή διάχυσης) και αυτών τα οποία δεν προσδένονται



Σχήμα 3: Φάσματα NMR τα οποία έχουν ληφθεί με χρήση παλμών βαθμίδας πεδίου διαφορετικής ισχύος. (Α) Χρήση χαμηλής ισχύος παλμών βαθμίδας πεδίου. Στο φάσμα παρατηρούνται κορυφές οι οποίες οφείλονται, τόσο στην πρωτεΐνη όσο και στον προσδέτη. (Β) Χρήση ισχυρής βαθμίδας πεδίου. Παρατηρούνται μόνο τα μόρια τα οποία προσδένονται στην πρωτεΐνη. (Γ) Δείγμα αναφοράς της πρωτεΐνης με χρήση υψηλής ισχύος βαθμιδωτού πεδίου και (Δ) Φάσμα διαφοράς $D=B-C$

Το φάσμα διαφοράς $D=B-C$ θα περιέχει κορυφές του μορίου το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη. Από τις κορυφές συντονισμού του φάσματος εξακριβώνεται η ταυτότητα του μορίου προσδέτη.

Η μέθοδος αυτή είναι απλή εξαιτίας της αποκλειστικής χρήσης φασματοσκοπίας 1D NMR. Το πείραμα διαρκεί μερικά λεπτά και απαιτούνται μόνο μικρές ποσότητες μη επισημασμένης πρωτεΐνης. Επίσης, πολλές ενώσεις μπορούν να δοκιμασθούν ταυτόχρονα. Η ανάλυση γίνεται αυτόματα και οι ενώσεις που δεσμεύονται μπορούν να ταυτοποιηθούν, αφού συγκριθούν με φάσματα αναφοράς.

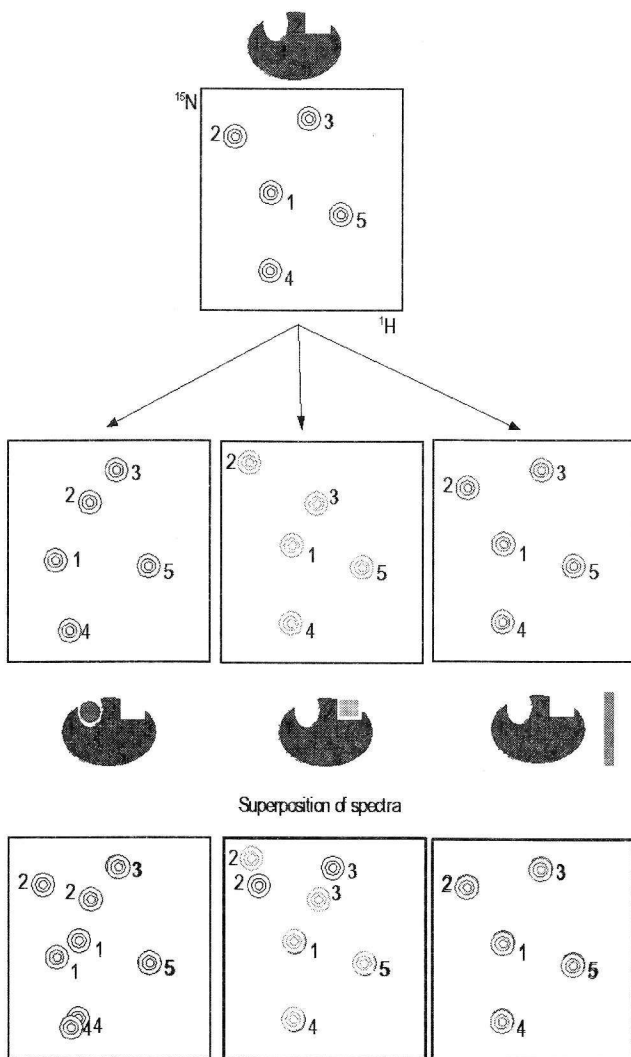
Βάση της μεθόδου αποτελεί η ιδέα ότι μία ένωση που έχει εκλεκτική πρόσδεση στον υποδοχέα ή στις ενζυμικές βιολογικές δοκιμές είναι βιοδραστική. Υπάρχει βέβαια πάντα το ενδεχόμενο καμία από τις δοκιμαζόμενες ενώσεις να μη δεσμεύεται στον υποδοχέα. Ένα παράδειγμα μπορεί να θεωρηθεί η περίπτωση των ερευνητών του εργαστηρίου της Abbott, οι οποίοι δοκίμασαν γύρω στις 15.000 ενώσεις για να ταυτοποιήσουν ισχυρούς ανταγωνιστές της μεταλλοπρωτεϊνάσης στρομελυσίνης. Οι ενώσεις αυτές απέτυχαν στο σύνολό τους να προσδεθούν στην πρωτεΐνη. Από το παράδειγμα αυτό γίνεται φανερό ότι είναι θέμα επιλογής βάσης αν θα ανιχνευθούν βιοδραστικές ενώσεις¹⁻³.

Σε μία βελτιωμένη προσέγγιση χρησιμοποιούνται ως αρχικοί προσδέτες μικρού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις οι οποίες έχουν ασθενή και εξειδικευμένη πρόσδεση. Με χρήση συνθετικής χημείας οι ενώσεις αυτές, που προσδένονται στα αντίστοιχα τμήματα του υποδοχέα,

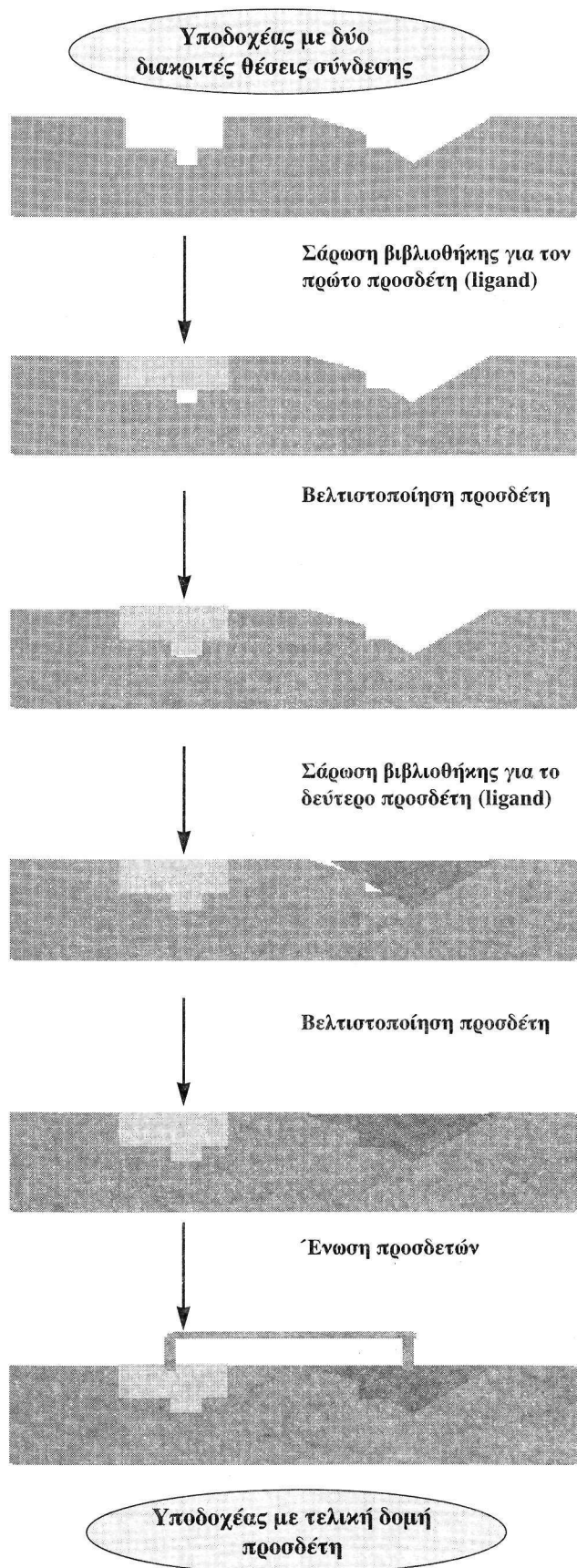
συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρα (link). Το νέο μόριο που προκύπτει από αυτή τη σύνδεση παρουσιάζει αυξημένη εκλεκτικότητα.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για να παρατηρηθεί η πρόσδεση είναι η φασματοσκοπία 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) ^{15}N - ^1H . Για την εκτέλεση του πειράματος αυτού απαιτείται η επισήμανση της πρωτεΐνης με ^{15}N . Στο πείραμα 2D HSQC ^{15}N - ^1H παρατηρούνται οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις της πρωτεΐνης, τόσο παρουσία όσο και απουσία του φαρμακευτικού μορίου (Σχήμα 4). Μόρια που δεν προσδένονται στον υποδοχέα δεν προκαλούν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις της πρωτεΐνης. Αντίθετα μόρια τα οποία προσδένονται ισχυρά στο δραστικό κέντρο προκαλούν σημαντικές αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις της πρωτεΐνης^{4,7}.

Η προσέγγιση αυτή μπορεί να ανιχνεύσει πολύ χαμηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεις (low affinity inter-



Σχήμα 4: Μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων λόγω πρόσδεσης μορίων σε διαφορετικές θέσεις σύνδεσης του υποδοχέα. Τα κάτω φάσματα προκύπτουν από υπέρθεση του φάσματος αναφοράς της πρωτεΐνης με εκείνα που προκύπτουν από τις προσδέσεις των μορίων στις διάφορες θέσεις σύνδεσης.

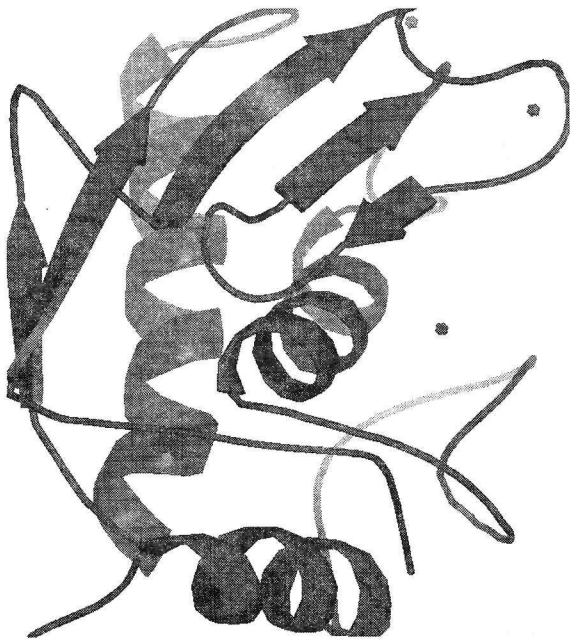


Σχήμα 5: Βήματα τα οποία ακολουθούνται για την εξεύρεση βέλτιστων προσδετών σ' έναν υποδοχέα

actions) με τιμές K_D της τάξεως του mM. Η όλη διαδικασία που ακολουθείται παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.

Ας δούμε πώς η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται στην προσπάθεια ανεύρεσης αναστολέων της μεταλλοπρωτεϊνάσης στρομελυσίνης, όπου προηγούμενες προσπάθειες έχουν αποτύχει.

Η στρομελυσίνη είναι μία μεταλλοπρωτεΐνη η οποία περιέχει ψευδάργυρο και εμπλέκεται στη διαμόρφωση του ιστού. Σχετίζεται, τόσο με την αρθρίτιδα όσο και με την ανάπτυξη μεταστάσεων από όγκους. Γι' αυτό η ανάπτυξη αναστολέων της μεταλλοπρωτεϊνάσης μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην αντιμετώπιση και των δύο ασθενειών. Η διαμόρφωση της στρομελυσίνης συνίσταται σε 5 πτυχωτά φύλλα τα οποία τυλίγονται γύρω από τρεις α -έλικες. Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται σε μία μεγάλη εσοχή στα δεξιά του ενζύμου αμέσως μετά από την κεντρική α -έλικα (Σχήμα 6).

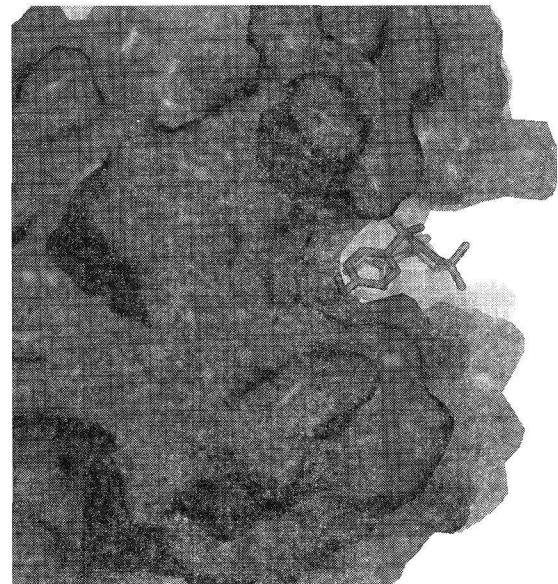
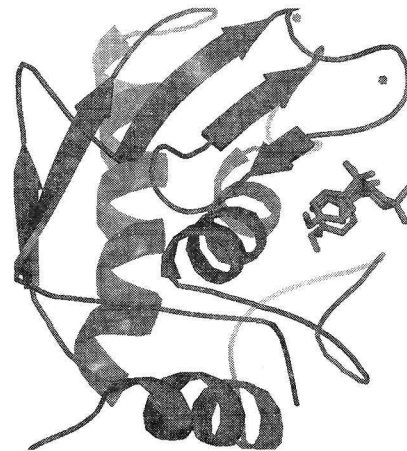


Σχήμα 6: Διαμόρφωση της στρομελυσίνης

Η πρόσδεση αναλόγων στο δραστικό κέντρο παρουσιάζεται στο Σχήμα 7. Ο στόχος της ερευνητικής αυτής εργασίας ήταν να εξευρεθούν πεπτιδομιμητικά ανάλογα των ήδη γνωστών ανταγωνιστών πεπτιδικής φύσης. Οι τελευταίοι δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα καθώς ένζυμα στον οργανισμό οδηγούν στην ταχύτατη υδρόλυση και αδρανοποίησή τους.

Ο σχεδιασμός άρχισε από την ένωση αναφοράς (lead compound) ακετοϋδροξαμικό οξύ ($K_D=17$ mM). Με χρήση συνδετών (linkers) στο ακετοϋδροξαμικό οξύ επιτεύχθηκε η σύνθεση ένωσης με $IC_{50}=15$ nM όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 8⁹.

Πρέπει να αναφερθεί ότι ο προσανατολισμός του μορίου στο δραστικό κέντρο μπορεί να διερευνηθεί με την εκτέλεση παρόμοιων πειραμάτων, χρησιμοποιώντας κάθε



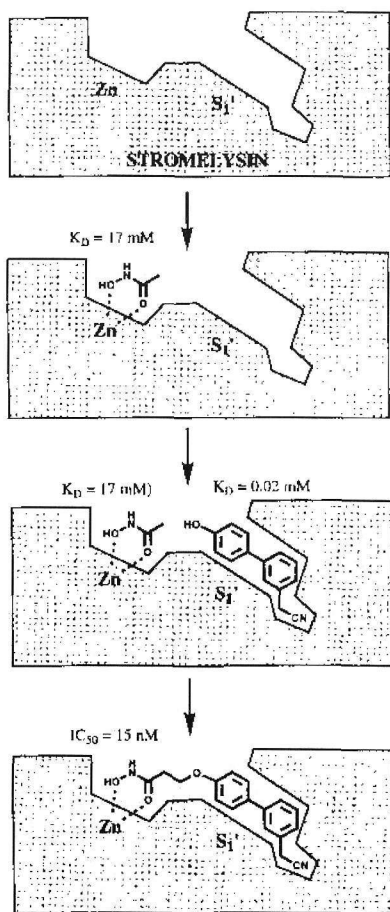
Σχήμα 7: Προφαρμογή υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της στρομελυσίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικές στερεοδομικές παραστάσεις

φορά την ίδια ένωση αναφοράς στην οποία δοκιμάζονται μία σειρά από υποκαταστάτες (Σχήμα 9)¹⁰.

2. Επίδραση διαμόρφωσης στη βιοδραστικότητα, όπως προκύπτει από δεδομένα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Οι AT1 ανταγωνιστές αποτελούν την πλέον πρόσφατη κατηγορία των αντιυπερτασικών φαρμακευτικών προϊόντων. Η δράση τους στοχεύει στην παρεμπόδιση της πεπτιδορμόνης Αγγειοτασίνης II (AII) στην πρόσδεσή της με τους AT1 υποδοχείς με επακόλουθη ελάττωση της πίεσης του αίματος.

Το μειονέκτημα των AT1 ανταγωνιστών είναι ότι έχουν μικρό χρόνο ημιζωής. Επομένως το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας εστιάζεται στην εισαγωγή νέων



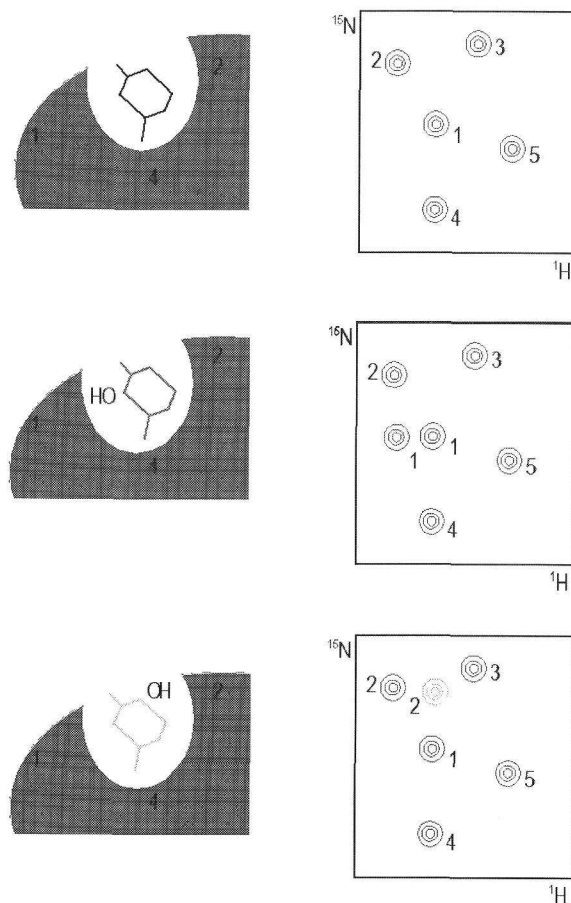
Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση στην οποία παριστάνεται ο σχεδιασμός του μορίου ανταγωνιστή της στρομελυσίνης με ισχυρή ανταγωνιστική δράση

φαρμακευτικών προϊόντων με βελτιωμένο φαρμακολογικό προφίλ²⁴.

Η σύνθεση τους βασίζεται στη μίμηση του C-τελικού τμήματος της Αγγειοτασίνης II. Η διαμόρφωση του προτύπου μορίου της λοσαρτάνης, η οποία προέκυψε με χρήση συνδυασμού φασματοσκοπίας NMR (Σχήμα 10) σε διάφορα περιβάλλοντα και μοριακής μοντελοποίησης, παρουσιάζεται στο Σχήμα 11.

Η πορεία η οποία ακολουθήθηκε για την μελέτη διαμόρφωσης της λοσαρτάνης παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής του Σχήματος 12²⁵⁻²⁶.

Με βάση αυτή τη διαμόρφωση, καθώς και τη διαμόρφωση της Αγγειοτασίνης II και των παραγώγων της²⁷⁻³⁴, σχεδιάστηκε και συντέθηκε το μόριο MM1 στο οποίο οι τρεις δακτύλιοι μιμούνται τους αντίστοιχους της λοσαρτάνης³⁵. Η υπέρθεση έδειξε ότι τα μόρια αυτά έχουν τα φαρμακοφόρα τμήματα τους σε χωρική εγγύτητα (Σχήμα 13). Η βιολογική αποτίμηση του MM1 έδειξε ότι έχει παρόμοια βιολογική δράση με αυτή της λοσαρτάνης. Το πλεονέκτημα του MM1 έναντι της λοσαρτάνης είναι η εύκολη πορεία σύνθεσής του.

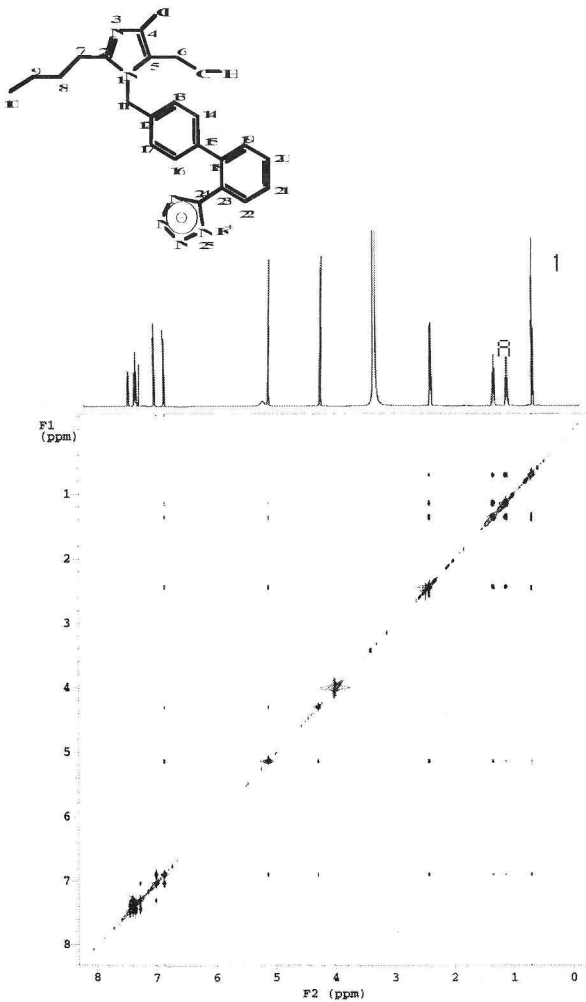


Σχήμα 9: Διαφορετικός προσανατολισμός του προσδέτη. Τα προκύπτοντα φάσματα όπως παρατηρείται ποικίλουν λόγω του διαφορετικού προσανατολισμού του φαινολικού υδροξυλίου στη θέση σύνδεσης του υποδοχέα

Συμπεράσματα

Η φασματοσκοπία NMR άρχισε τη σταδιοδρομία της περίπου πριν από εξήντα χρόνια με αναλύσεις δομών απλών μοριακών ενώσεων. Στις αρχές του 21ου αιώνα η φασματοσκοπία αυτή αποτελεί μία από τις ισχυρότερες αναλυτικές τεχνικές με ευρύτατο πεδίο εφαρμογών. Οι σύγχρονοι φασματογράφοι (state of the art) χρησιμοποιούν μαγνητικό πεδίο ισχυρότερο των 21 T και με αυτούς μπορούν να ανιχνευθούν σήματα ραδιοσυχνότητας της τάξεως του 1 GHz. Οι σύγχρονοι αυτοί φασματογράφοι δεν αποτελούν απλά όργανα μέσω των οποίων λαμβάνονται αναλυτικές πληροφορίες αλλά εντάσσονται στη διαδικασία παραγωγής καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων.

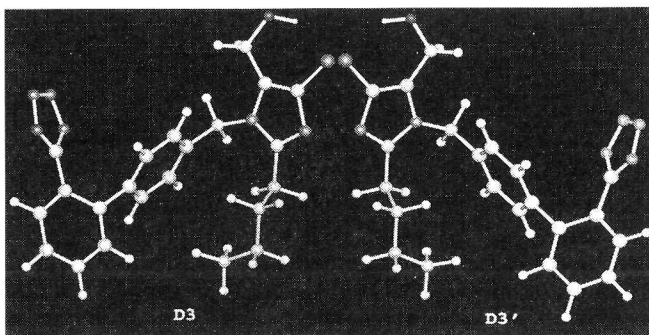
Περιγράφηκαν δύο περιπτώσεις από τις οποίες σχηματίζεται το δυναμικό και αναδεικνύεται η ανεκτίμητη συμβολή του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ως εργαλείο στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμακευτικών προϊόντων. Στο πρώτο παράδειγμα ο σχεδιασμός έγινε με βάση την πρόσδεση σε υποδοχέα με γνωστή τριοδιάστατη



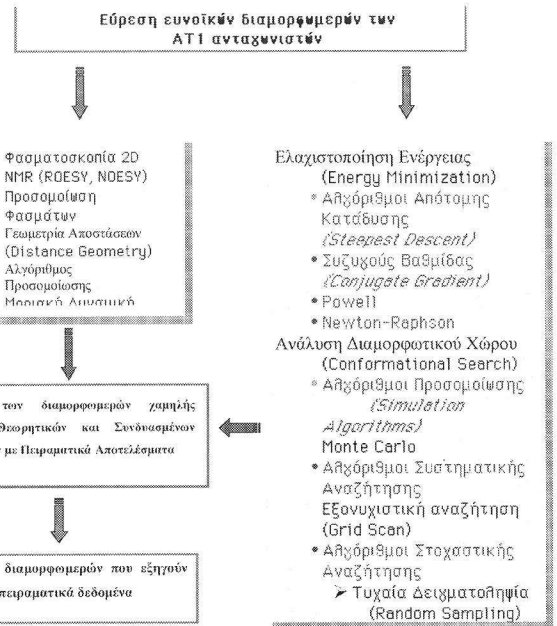
Σχήμα 10: 2D ROESY του μορίου της λοσαρτάνης

δομή. Στην δεύτερη περίπτωση δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τον διαμεμβρανικό AT1 υποδοχέα. Έτσι ο ορθολογικός σχεδιασμός βασίστηκε στη μελέτη της διαμόρφωσης της λοσαρτάνης, με συνδυασμό φασματοσκοπίας NMR και μοριακής μοντελοποίησης.

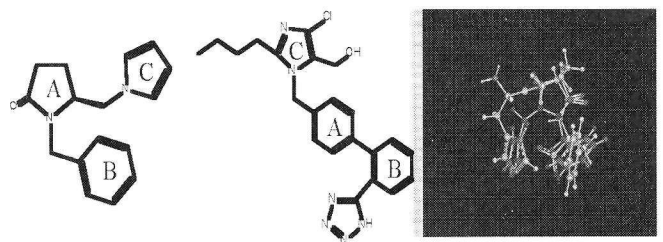
Εκτός από τα παραδείγματα που αναφέρθηκαν θα πρέπει να λεχθεί ότι η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές μπορεί



Σχήμα 11: Βιοδραστική διαμόρφωση της λοσαρτάνης όπως προέκυψε με χρήση φασματοσκοπίας NMR 2D ROESY και μοριακής μοντελοποίησης



Σχήμα 12: Διάγραμμα ροής το οποίο ακολουθείται για την ανάλυση διαμορφωτικού χώρου του φαρμακευτικού μορίου της λοσαρτάνης



Σχήμα 13: Μοριακές δομές του πρόσφατα συντηθεμένου μορίου MMI (αριστερά) και του πρωτότυπου AT1 ανταγωνιστή losartan. Τα γράμματα τα οποία βρίσκονται μέσα στους δακτύλιους δείχνουν την αντιστοιχία των δακτυλίων κατά το σχεδιασμό. Η υπέρθεση των δύο εννοικά διαμορφωμένων δομών των μορίων δείχνει ακριβώς ότι χωρικά οι αντίστοιχοι δακτύλιοι έχουν μεγάλη εγγύτητα

να χρησιμεύσει σε πολλές άλλες εφαρμογές, οι οποίες σχετίζονται με τη φαρμακολογία και την τοξικότητα καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων. Έτσι με χρήση συνδυασμού Υγρής Χρωματογραφίας και τεχνικής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μελετώνται οι μεταβολίτες νέων φαρμακευτικών ουσιών και εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με την τοξικότητά τους. Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι παρά τους περιορισμούς που παρουσιάζει η τεχνική Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (π.χ., αδυναμία δομικών μελετών σε πρωτεΐνες οι οποίες είναι μεγαλύτερες από 35 kD), οι ερευνητές βρίσκουν τρόπους για να ανταποκριθούν στις νέες προκλήσεις της εποχής μας όπως στον τομέα της πρωτεομικής (proteomics)³⁶.

Design of Novel Pharmaceutical Compounds Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

T. Mavromoustakos, M. Zervou,
E. Mantzourani

National Hellenic Research Foundation, Institute
of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas.
Constantinou 48, 116 35 Athens Greece

Summary □ The rational design of pharmaceutical molecules aims to increase the efficiency in synthesizing novel pharmaceutical products. It is based upon the understanding of the molecular basis of the system under study and the physicochemical parameters that govern it. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy consists a valuable tool in the design of novel drug compounds. In this short review the contribution of the methodology in the drug design is being demonstrated. In the first example Nuclear Magnetic Resonance experiments are applied directly in the active site (receptor) while in the second, since the receptor is not isolated, the methodology is applied in an environment that simulates the biological one.

Βιβλιογραφία

1. Medek A., Olejniczak E. T., Meadows R. P. and Fesik S. W. *J. Biom. NMR* 18, 229-238, 2000
2. Hajduk P. J., Olejniczak E. T. and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12257-12261, 1997
3. Medek A., Hadjuk P. J., Mack J. and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 1241-1242, 2000
4. Wiedeman P. E., Fesik S. W. Petros, A. M., Nettlesheim D. G., Mollison K. W., Lane B. C., Or Y. S. and Luly J. R., *J. Med. Chem.* 42, 4456-4461, 1999
5. Hajduk P. J., Dinges J., Miknis G. F., Merlock M., Middleton T., Kempf D. J., Egan D. A., Walter K. A., Robins T. S., Shuker S. B., Holzman T. F. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 40, 3144-3150, 1997
6. Hajduk P. J., Gomtsyan A., Didomenico S., Cowart M., Bayburt E. K., Solomon L., Severin J., Smith R., Walter K., Holzman T. F., Stewart A., McGaraughty S., Jarvis M. F., Kowaluk E. A. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 43, 4781-4786, 2000
7. Hajduk P. J., Gerfin T., Boehlen J. M., Häberli M., Marek D. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 42, 2315-2317, 1999
8. Olejniczak E. T., Hajduk P. J., Marcotte P. A., Nettlesheim D. G., Meadows R. P., Edalji R., Holzman T. F. and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5828-5832, 1997
9. Hajduk P. J., Sheppard G., Nettlesheim D. G., Olejniczak E. T., Shuker S. B., Meadows R. P., Steinman D. H., Carrera G. M., Marcotte P. A., Severin J., Walter K., Smith H., Gubbins E., Simmer R., Holzman T. F., Morgan D. W., Davidsen S. K., Summers J. B. and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5818-5827, 1997
10. Pfuhl. M. NMR Spectroscopy Lecture 6 of Biomolecules III. <http://www.le.ac.uk/biochem/mp84/teaching/lecture6.htm>
11. Muegge I., Martin Y. C., Hadjuk P. J. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 42, 2498-2503, 1999
12. Sattler M and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7885-7886, 1997
13. Yu L., Zhu C., Tse-Dinh Y. and Fesik S. W. *Biochemistry* 35, 9661-9666, 1996
14. Rienstra C. M., Hatcher M. E., Mueller L. J., Sun B., Fesik S. W. and Griffin R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10602-10612, 1998
15. Liang H., Petros A. M., Meadows R. P., Yoon H. S., Egan D. A., Walter K., Holzman T. F., Robins T. and Fesik S. W. *Biochemistry*, 35, 2095-2103, 1996
16. Olejniczak E. T., Zhou M. and Fesik S. W. *Biochemistry*, 35, 4118-4124, 1997
17. Wang H., Eberstadt M., Olejniczak E. T., Meadows R. P. and Fesik S. W. *J. Biom. NMR* 12, 443-446, 1998
18. Hajduk P. J., Boyd S., Nettlesheim D., Nienaber V., Severin J., Smith R., Davidson D., Rockway T. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 43, 3862-3866, 2000
19. Hajduk P. J., Augeri D. J., Mack J., Mendoza R., Yang J., Betz S. F. and Fesik S. W. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 7898-7904, 2000
20. Hajduk P. J., Bures M., Praestgaard J and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 43, 3443-3447, 2000
21. Losonczy J. A., Olejniczak E. T., Betz S. F., Harlan J. E., Mack J. and Fesik S. W. *Biochemistry* 39, 11024-11033, 2000
22. Hajduk P. J., Dinges J., Schkeryantz J. M., Janowick D., Kaminski M., Tufano M., Augeri D. J., Petros A. M., Nienaber V., Zhong P., Hammond R., Coen M., Beutel B., Katz L. and Fesik S. W. *J. Med. Chem.* 42, 3852-3859, 1999
23. Laura H., Larive L., Larive C. Concepts in Magnetic Resonance A, 20A, 24-41, 2004
24. Mavromoustakos T., Apostolopoulos V. and Matsoukas J. *Mini Rev. in Med. Chem.* 1, 207-217, 2001
25. Matsoukas J., Hondrelis J., Keramida M., Mavromoustakos T., Makriyannis A., Yamdagni R.,

- Wu Q. and Moore G. *J. Biol. Chem.*, 269, 5303-531, 1994
26. Mavromoustakos T., Zervou M., Zoumpoulakis P., Kyrikou I., Benetis N. P., Polevaya L., Roumelioti P., Giatas N., Zoga A., Moutevelis Minakakis P., Kolocouris A., Vlahakos D., Grdadolnik S. G. and Matsoukas J. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4, 000-000 (in press), 2004
27. Mavromoustakos T., Kolocouris A., Zervou M., Roumelioti P., Matsoukas J. and Weisemann R. *J. Med. Chem.*, 42, 1714-1722, 1999.
28. Zoumpoulakis P., Daliani I., Zervou M., Kyrikou I., Siapi E., Lamprinidis G., Mikros E. and Mavromoustakos T. *Chem. Phys. Lipids*, 125, 13-25, 2003
29. Matsoukas J. M. , Agelis G., Wahhab A., Hondrelis J., Panagiotopoulos D., Yamdagni R., Wu Q., Mavromoustakos T., Maia H.L.S., Ganter R. and Moore G.J.. *J. Med. Chem.*, 10, 4660-4669, 1995
30. Theodoropoulou E., Mavromoustakos T., Panagiotopoulos D., Matsoukas J. and Smith *J. LIPS*, 3, 209-21, 1996
31. Matsoukas J. M., Polevaya L., Ancas J., Mavromoustakos T., Kolocouris A., Roumelioti P., Vlahakos D.V. , Yamdagni R., Wu Q. and Moore G. *J. Bioorg. Med. Chem.*, 8, 1-10, 2000
32. Roumelioti P., Tselios T., Alexopoulos K., Mavromoustakos T., Kolocouris A., Moore G. J. and Matsoukas J.M. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 10, 755-758, 2000
33. Polevaya L., Mavromoustakos T., Zoumboulakis P., Grdadolnik S. G., Roumelioti P., Giatas N., Mutule I., Keivish T., Vlahakos D., Iliodromitis, E. and Kremastinos D. *J. Bioorg. Med. Chem.* 9, 1639-1647, 2001
34. Roumelioti P., Polevaya L., Zoumpoulakis P., Giatas N., Keivish, T., Haritonova A., Zoga A., Vlahakos D., Iliodromitis E., Kremastinos D., Grdadolnik S. G., Mavromoustakos T. and Matsoukas J. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 12, 2627-263, 2002
35. Moutevelis-Minakakis P., Gianni M. Stougiannou H., Zoumpoulakis P., Zoga A., Vlahakos A. D., Iliodromitis E., T. Mavromoustakos. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 13(10), 1737-1740, 2003.
36. Bradley D. *Modern Drug Discovery* 11, 28-30, 32, 34, 2001.