

自由エネルギー摂動法計算における リガンドネットワーク構造の効率化

杉田 駿也¹ 大上 雅史^{1,a)}

概要：自由エネルギー摂動法 (Free Energy Perturbation, FEP) では、構造の近いリガンド間の相対的な標的結合親和性を予測できる。複数のリガンドについて FEP で予測を行う場合、全ての組合せの予測を行うと精度が下がり、計算コストも大きくなるため、適切なリガンド間での予測を行うことが重要である。リガンドをノード、FEP 計算を行うリガンド間をエッジとして表すと、ネットワークとして表現することができる。本研究では、どのようなネットワークで FEP 計算の精度が最も向上するのか、既存手法 LOMAP や DiffNet により生成されたネットワークの精度を検証し、課題について議論した。

1. 序論

計算支援による創薬研究の重要性が高まっている。候補となる化合物から標的タンパク質との結合親和性が大きいと予測される分子を選び、その後の実験的解析につなげる計算機スクリーニングがよく活用されている。結合親和性の評価にはタンパク質とリガンドの絶対結合自由エネルギー (ΔG) の厳密な計算は重要であり、様々な方法が議論、研究されてきた。特に近年では、方法論の発展と計算機の向上、またワークフローの自動化により広く使われるようになってきている [1, 2, 3, 4, 5, 6]。

結合自由エネルギーの計算では、分子動力学法 (molecular dynamics, MD) を用いて、分子のコンフォメーションによるボルツマン分布からサンプリングを行う。しかし、絶対結合自由エネルギーを直接シミュレーションによって求めるには、十分なサンプリングを要するため計算時間が膨大になり、大規模なデータセットには使えないという問題がある [7]。そこで、絶対結合自由エネルギーを直接計算するのではなく、錬金術的な (アルケミカル, alchemical) 相対結合自由エネルギーの計算をすることで、間接的に絶対結合自由エネルギーを計算する手法が使われている。図 1 に示す通り、相対結合自由エネルギー $\Delta\Delta G$ は、タンパク質結合状態と溶液中で一方のリガンドを他方のリガンドに変化させたときの自由エネルギー ΔG の差として計算できる。リガンド A が溶液中からタンパク質に結合するための絶対結合自由エネルギーは ΔG_1 、リガンド B が溶液中からタンパク質に結合するための絶対結合自由エネルギーは

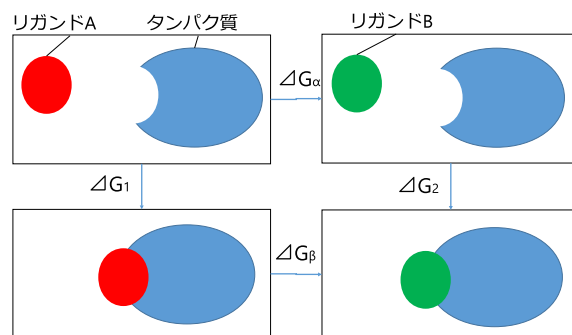


図 1: 標準的な相対結合自由エネルギー計算の熱力学サイクル。青がタンパク質を、赤、緑がリガンドを示している。上下間の絶対結合自由エネルギー ($\Delta G_1, \Delta G_2$) を計算するかわりに、錬金術的な中間状態を用いて自由エネルギー変化 ($\Delta G_\alpha, \Delta G_\beta$) を計算することで、絶対結合自由エネルギー ($\Delta G_1, \Delta G_2$) の差を求める。

ΔG_2 である。また、溶液中でリガンド A がリガンド B に変化するための結合自由エネルギーは ΔG_α 、タンパク質に結合した状態のリガンド A がリガンド B に変化するための結合自由エネルギーは ΔG_β である。状態変化における熱力学的エネルギーは保存されるため、式 (1) が成立する。

$$\Delta G_1 + \Delta G_\beta - \Delta G_2 - \Delta G_\alpha = 0 \quad (1)$$

このため、リガンド A から B の相対結合自由エネルギー $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ は、式 (2) で表すことができる。

$$\Delta\Delta G_{A \rightarrow B} = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_\beta - \Delta G_\alpha \quad (2)$$

式 (2) から分かる通り、リガンド A またはリガンド B のどちらかの絶対結合自由エネルギーが既知の場合は、も

¹ 東京工業大学 情報理工学系 情報工学系

^{a)} ohue@c.titech.ac.jp

う一方の絶対結合自由エネルギーも相対結合自由エネルギーから計算できる。自由エネルギー摂動法 (Free Energy Perturbation, FEP) は、 ΔG_1 および ΔG_2 を使わずに、 ΔG_α および ΔG_β を計算して $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ を求める手法であり、リガンド A からリガンド B へと徐々に変化させながら仮想的な中間状態のシミュレーション計算を行うため錬金術的計算 (alchemical free energy calculation) と呼ばれる。

実際の FEP 計算のワークフローでは、一定程度の ΔG_k が既知のリガンドと、 ΔG_k を推定したい未知のリガンドの組合せについて FEP 計算を行っていくことになる。FEP 計算対象のリガンド同士の関係をエッジとみなし、リガンドをノードとみなすことで、ネットワークとして考えることができる (図 2 に FEP ネットワークの例を示す)。

FEP 計算については、二重トポロジー [8] や力場の改良 [9]、レプリカ交換法によるサンプリングの向上 [10] といった、計算精度の向上に重点を置かれた研究が多く、FEP ネットワークの構築や実利用に関する研究事例が少ないのが現状である。そのため、どのようなネットワークが FEP 計算に適しているかは未だ答えがなく、FEP ネットワークの最適な構成法を検討することは計算コストや精度向上のために重要である。現状では、経験的に重要なネットワーク上の性質を重視したヒューリスティックな手法 (LOMAP [11]) が広く用いられている。加えて、式 (2) によって推定される ΔG_k の計算値についても、単に計算するだけでなく背後にある統計的誤差を加味して最小化することをが重要である。これについては、FEP 計算の回数を最適に割り振ることで測定誤差を抑える手法 [12] が存在しており、 $\Delta\Delta G$ の計算結果をエッジに重みとして与えたときに各ノードの ΔG_k を推定する方法が提案されている [12, 13]。

本稿では、いくつかの FEP ネットワーク構成や $\Delta\Delta G$ から ΔG_k を予測する手法について、計算機実験を通して性能を評価することを目的とする。特に、複数のネットワーク構成による FEP 計算の結果から課題を明らかにし、その解決策を議論する。

2. 既存手法

2.1 準備

FEP ネットワークにおいて、 i, j, k をリガンド (ノード)、 e をエッジとし、特にリガンド i, j 間のエッジを ij で表す。 i, j 間の相対結合自由エネルギーを $\Delta\Delta G_{ij} = x_{ij}$ と表記し、 j, i 間の相対結合自由エネルギー $\Delta\Delta G_{ji} = x_{ji}$ と区別する*1。また、リガンド i の結合自由エネルギーを $\Delta G_i = x_i$ と表記する。このとき、 $x_{ij} = x_i - x_j$ である。

*1 理論上は $x_{ij} = -x_{ji}$ であるが、シミュレーション上の誤差の問題から実際上は一致するとは限らない。

2.2 DiffNet

DiffNet[12] は、 $\Delta\Delta G$ の計算は複数回 (n_e 回) 行うことで値が収束するという考えのもとで、FEP 計算による相対結合自由エネルギーおよび化合物 (エッジ) 間の性質から絶対結合自由エネルギー x_e を推定する、あるいは最適な計算回数 n_e を算出するアルゴリズムである。

まず、各 x_e の計算誤差 ε_e を、平均 0・分散 $\sigma_e^2 = s_e^2/n_e$ の正規分布に従うと考える。標準偏差 σ_e は FEP 計算の難しさを考慮して各々のリガンド間に事前に設定する。例えば、Flare FEP[14] においては、エッジスコア [11] や MBAR エラー [15] が用いられる。

最適な n_e を算出するには、計算資源が有限であるとして、推定量の全体的な統計誤差 s_e を最小にするように最適化する問題と考える。一方 x_e を推定する場合には、計算回数 n_e が既に確定しているため、統計誤差 s_e を最小化するように最適化する。通常の利用では $n_e = 1$ であるが、 n_e を変化させた方が良い場合も考えられる。

結合自由エネルギーは、それぞれ式 (3)、式 (4) で表せる。

$$x_i = \hat{x}_i + \varepsilon_i \quad (3)$$

$$x_{ij} = x_i - x_j = \hat{x}_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (4)$$

よって尤度関数 L は式 (5) のように表される。

$$L = \prod_i (\sqrt{2\pi}\sigma_i)^{-1} \exp\left(-\frac{(x_i - \hat{x}_i)^2}{2\sigma_i^2}\right) \times \prod_{i < j} (\sqrt{2\pi}\sigma_{ij})^{-1} \exp\left(-\frac{(x_i - x_j - \hat{x}_{ij})^2}{2\sigma_{ij}^2}\right) \quad (5)$$

ここで $\mathbf{z} = (z_i)$ および $\mathbf{F} = (F_{ij})$ を、

$$z_i = \sigma_i^{-2} \hat{x}_i + \sum_{j \neq i} \sigma_{ij}^{-2} \hat{x}_{ij}$$

$$F_{ij} = \begin{cases} \sigma_i^{-2} + \sum_{k \neq i} \sigma_{ik}^{-2} & \text{if } i = j \\ -\sigma_{ij}^{-2} & \text{if } i \neq j \end{cases}$$

とすると、式 (5) の $\mathbf{x}$ に関する最大化は、式 (6) と書き換えられる。

$$\mathbf{F}\mathbf{x} = \mathbf{z} \quad (6)$$

$\mathbf{F}$ はフィッシャー情報行列であり、 x_i 推定値の共分散 $\mathbf{C}$ が $\mathbf{F}$ の逆行列 $\mathbf{F}^{-1}$ となる。 $\mathbf{F}^{-1}$ を最小化することで、 x_e の推定値または最適な n_e 値を算出することができる。

2.3 LOMAP

LOMAP[11] は、FEP ネットワークを構築する手法である。LOMAP では結合自由エネルギーが未知のリガンドと既知のリガンドの区別をしない。DiffNet[12] と異なり、厳密な統計に基づいた手法ではなく、FEP 計算やリガンド最適化変換における経験的に重要な性質を抽象化した手法である。以下はその概略である。



表 1: thrombin データセットでの結果. Flare FC は全結合ネットワーク, Flare Benchmark は Flare FEP におけるデフォルトの設定である. DiffNet は各エッジスコアの情報をを用いてネットワーク最適化を行い, その後の ΔG の推定も DiffNet を用いた.

手法	$ \mathcal{E} $	R^2	MUE kcal/mol
Schrödinger FEP+[17]	16	0.50	0.42 ± 0.11
Flare Benchmark	13	0.75	0.27 ± 0.08
Flare FC	55	0.81	0.31 ± 1.20
DiffNet	55	$0.60 (2.1 \times 10^{-5})$	$0.44 (0.16)$

4.3 計算環境および評価方法

FEP 計算には Cresset 社の Flare FEP[14] を用いた. タンパク質のセットアップには Amber Tools 2019 を, リガンド力場は GAFF2 を用い, 電荷は AM1-BCC で計算した. 各リガンド間の刻み幅である λ -windows は, Flare FEP の機能により, 2 ps の事前シミュレーションとサンプリング不足の検出を反復的に行うことで自動的に決定される. また, 実際の FEP 計算のシミュレーション時間は 4 ns である. 全ての計算には東京工業大学の TSUBAME 3.0 スーパーコンピュータ (f.node) を用いた.

また比較対象として Flare FEP benchmark mode における FEP ネットワーク (LOMAP[11] で生成), Schrödinger FEP+ による文献報告 [17] と計算精度を比較した.

精度の評価には, リガンドの ΔG_i の真値と計算値における決定係数 R^2 および絶対平均誤差 (mean unsigned error, MUE) を用いた. 全ての FEP 計算の実施は 1 回のみ行った.

5. 実験結果

5.1 全結合 FEP ネットワークの計算結果

thrombin データセットにおける FEP 計算結果を表 1 に示す. 表 1 の “Flare FC” は全結合ネットワークでの結果を示しており, “Schrödinger FEP+” および “Flare Benchmark” は比較対象である. 表 1 の通り, thrombin データセットでは, Flare FC は Flare Benchmark に決定係数 R^2 では勝るが, 平均絶対誤差 MUE では劣る結果となった. 4 倍以上の計算資源を必要とするにもかかわらず, 有意な予測結果の改善は見られなかった.

DiffNet[12] による FEP ネットワークの構築は, 測定回数を指定するため, 厳密には 1 度しか FEP 計算を行っていないデータに適用することは正しくない. ここでは DiffNet による最適化において, エッジが張られたリガンド間について 1 度だけ FEP 計算を行うものとしてネットワーク構築を行った. 表 1 の “DiffNet” では各エッジスコアの情報をを用いてネットワーク最適化を行い, その後の ΔG の推定も DiffNet の方法を用いた.

表 2: tyk2 データセットでの結果

手法	$ \mathcal{E} $	R^2	MUE kcal/mol
Schrödinger FEP+[17]	24	0.79	0.44 ± 0.09
Flare Benchmark	22	0.39	0.89 ± 0.21
Flare FC	78	0.12	2.29 ± 0.30
DiffNet	78	$0.05 (2.2 \times 10^{-2})$	$0.92 (0.30)$

また, tyk2 データセットにおける結果を表 2 に示す. tyk2 における Schrödinger FEP+ および Flare Benchmark は, リガンド数が異なるため直接的な比較が難しいが, Flare FC の結果は他の 2 つの手法と比べて悪かった. これは, リガンドの状態サンプリングが十分にできないエッジが多く, 相対結合自由エネルギーの誤差が大きくなったことが原因であると考えられる.

5.2 ランダムなネットワークにおける精度

ランダムネットワークの計算精度を, 各エッジ数に対する精度の範囲で示した結果を図 3 に示す. ランダムにサンプリングされた FEP ネットワークの中で最良の精度を示す FEP ネットワークは, thrombin データセットでは 14 エッジ, $MUE = 0.15$, $R^2 = 0.89$ であり, tyk2 データセットでは 20 エッジ, $MUE = 0.28$, $R^2 = 0.88$ であった. thrombin データセットのこの結果は表 1 の Flare Benchmark よりも良かった.

tyk2 データセットの結果が thrombin データセットと比べて著しく低い理由については, サンプリングが十分でない FEP 計算のエッジが複数存在したことが挙げられる. 一方で thrombin データセットでは, 不十分なサンプリングが行われたエッジが全くないにもかかわらず, 全結合 FEP ネットワークの精度よりも高い精度を持つネットワークが存在する. いずれのデータセット, 評価軸においても, 全結合 FEP ネットワークの精度よりも高い精度を持つネットワークが存在することは重要である. また, LOMAP[11] の FEP ネットワークの構築手法は図 3 において破線で示されているが, 図 3 から LOMAP よりも良い精度を示す FEP ネットワークが多く存在することが分かる.

以上の結果から, 単に全てのエッジを計算することは望ましくなく, 測定資源を適切に割り振ることが重要である. LOMAP[11] においては, 難しい FEP 計算を避けるアルゴリズムを採用しており, 少なくともサンプリングが十分に行えないようなエッジでの FEP 計算は避けるべきであろう. LOMAP[11] より精度の高い FEP ネットワークの構築は, FEP 計算ワークフローの全体の精度の向上にとって重要である. 一方で, 既存のネットワーク特徴量について ΔG の精度との関連を調べたが, ほとんどの特徴量は相関が低く関連性が見られなかった.

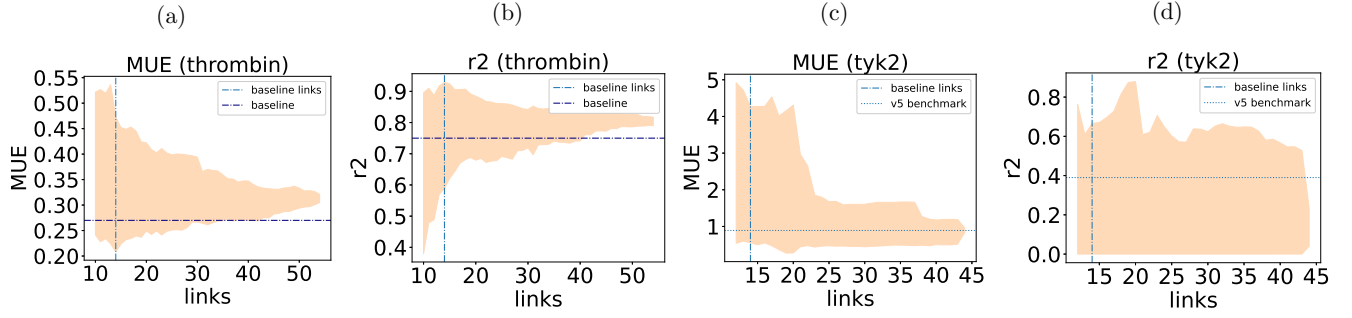


図 3: エッジ数毎における MUE または R^2 の存在範囲. ランダムサンプリングによるネットワーク構築のため, 図示された範囲外の精度を示すネットワークが存在する可能性がある. 破線は Flare FEP benchmark mode におけるエッジ数及び精度である. (a) thrombin データセットにおけるエッジ毎の MUE の存在範囲. エッジ数が最も大きい 55 エッジのときと比べて精度が良いネットワークがエッジ数が少ない領域に存在する. (b) thrombin データセットにおけるエッジ毎の R^2 の存在範囲. エッジ数が多い場合の FEP ネットワークの精度は範囲が狭く, 比較的安定している. (c) tyk2 データセットにおけるエッジ毎の MUE の存在範囲. 計算時間の問題から tyk2 の全てのエッジは 78 であるが, 45 エッジから範囲のサンプリングを行っている. (d) tyk2 データセットにおけるエッジ毎の R^2 の存在範囲. 45 エッジの時点から $R^2 = 0$ になってしまう FEP ネットワークが存在している.

5.3 今後の課題：共通の誤差の導入

エッジ数の増加にあわせて精度を増加させられるような ΔG の予測アルゴリズムの提案も重要である. FEP 計算によって算出された $\Delta\Delta G$ は経験的には固定誤差 (ランダムノイズでない誤差) が存在する [16] ため, 統計的に厳密な手法 [12, 13] におけるランダムノイズの収束は, 現実には必ずしも成立しないと考えられる.

式 (4) に対して固定誤差 $\mu_{ij} \sim \mathcal{N}(0, \alpha_{ij}^{-2})$ を仮定すると, 式 (4) は式 (7) で書き換えられる.

$$x_{ij} = \hat{x}_{ij} + \mu_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (7)$$

このとき尤度関数 L は式 (8) となる.

$$L = \prod_i (\sqrt{2\pi}\sigma_i)^{-1} \exp\left(-\frac{(x_i - \hat{x}_i)^2}{2\sigma_i^2}\right) \times \prod_{i<j} (\sqrt{2\pi}\sigma_{ij})^{-1} \exp\left(-\frac{(x_i - x_j - \hat{x}_{ij} - \mu_{ij})^2}{2\sigma_{ij}^2}\right) \quad (8)$$

μ_{ij} の推定は, サイクルエラー, すなわちある閉路 (エネルギーの総和が 0) を考えたときに生じる誤差を用いる. FEP ネットワークではリガンド i, j, k のすべてのペアについて以下の等式が成立する.

$$0 = x_{ij} + x_{jk} + x_{ki} \quad (9)$$

これは, $x_{ij} = x_i - x_j$ より明らかである. 他方, FEP 計算にはシミュレーション上の誤差が存在し, 次のようなサイクルエラー $c_{i,j,k}$ が生じる.

$$c_{i,j,k} = \hat{x}_{ij} + \hat{x}_{jk} + \hat{x}_{ki} \quad (10)$$

式 (9) から式 (10) を引くと

$$-c_{i,j,k} = \mu_{ij} + \mu_{jk} + \mu_{ki} + \varepsilon_{ij} + \varepsilon_{jk} + \varepsilon_{ki} \quad (11)$$

となり, μ_{ij} に関する最適化問題が以下のように設定できる.

$$\begin{aligned} &\text{maximize} \quad \ln L(\mu|\alpha) = \sum_e \left(-\frac{\alpha_e}{2} \mu_e^2\right) \\ &\text{subject to} \quad \sum_{e \in l} \mu_e = -c_l - \sum_{e \in l} \varepsilon_e \quad \text{for } \forall l \in \mathcal{C} \end{aligned} \quad (12)$$

ここで, $\mathcal{C}$ は FEP ネットワークにおけるすべての閉路の集合であり, α_e は固定誤差 μ_e の標準偏差の逆数である. 対数尤度が μ_e の 2 次関数となっており, 最適解を得ることができる.

たとえばリガンドが 3 つ ($\{0, 1, 2\}$) のデータセットを考える. この場合, 式 (12) は次のようになる.

$$\begin{aligned} &\text{maximize} \\ &\ln L(\mu|\alpha) = \left(-\frac{\alpha_{01}}{2} \mu_{01}^2\right) + \left(-\frac{\alpha_{12}}{2} \mu_{12}^2\right) + \left(-\frac{\alpha_{20}}{2} \mu_{20}^2\right) \\ &\text{subject to} \quad \mu_{01} + \mu_{12} + \mu_{20} = d \end{aligned} \quad (13)$$

これを解くと, 以下を得る.

$$\begin{aligned} \mu_{01} &= \frac{d\alpha_{12}\alpha_{20}}{\alpha_{20}\alpha_{12} + \alpha_{01}\alpha_{20} + \alpha_{01}\alpha_{12}} \\ \mu_{12} &= \frac{d\alpha_{01}\alpha_{20}}{\alpha_{20}\alpha_{12} + \alpha_{01}\alpha_{20} + \alpha_{01}\alpha_{12}} \\ \mu_{20} &= \frac{d\alpha_{01}\alpha_{12}}{\alpha_{20}\alpha_{12} + \alpha_{01}\alpha_{20} + \alpha_{01}\alpha_{12}} \end{aligned}$$

すなわち, 3 つのリガンドの任意のペアにおいて (十分なサンプリングでの) FEP 計算が可能な場合, 上式によって厳密解を算出することが可能である.

6. 結論

相対結合自由エネルギーの計算は、理論的發展や計算性能の向上により注目されているが、FEP ネットワークの予測された複数の相対結合自由エネルギー $\Delta\Delta G$ が矛盾する結果をもたらす場合の一般的な処理や統計的な処理は確立されておらず、経験に頼っている。

本研究では、これまでの統計的手法や FEP ネットワークの構築手法について、さまざまなネットワークの可能性とともに検証を行った。全結合の FEP ネットワークによる FEP 計算では、より高い精度の得られる FEP ネットワークが数多く存在することが示唆され、経験的に優れた FEP ネットワークを構築するといわれる LOMAP や、統計的厳密性に優れた DiffNet と比較して、さらに良いネットワークを与える方法の可能性を示している。なお、全結合の FEP ネットワーク自体を用いた場合は理想的には最も良い精度が得られそうではあるが、DiffNet による ΔG 推定法では大きな誤差を含むエッジを過大評価または過小評価することから、実際には最良の結果になるとは言えなかった。

今後、固定誤差を考慮した ΔG 算出方法を確立し、FEP ネットワークの性質に関する理解を深め、FEP ネットワークの最適な構築をできるようにすることを目指す。

謝辞 本研究は、モジユラス株式会社、JST ACT-X JP-MJAX20A3、科研費 基盤研究 (B) 20H04280 の支援を受けて行われた。

参考文献

- [1] D. E. Shaw *et al.*: Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation, *Commun ACM*, Vol. 51, pp. 91–97 (2008).
- [2] S. L. Grand *et al.*: SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations, *Comput Phys Commun*, Vol. 184, pp. 374–380 (2013).
- [3] J. E. Stone *et al.*: GPU-accelerated molecular modeling coming of age, *J Mol Graph Model*, Vol. 29, pp. 116–125 (2010).
- [4] A. W. Götz *et al.*: Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born, *J Chem Theory Comput*, Vol. 8, pp. 1542–1555 (2012).
- [5] P. Eastman *et al.*: OpenMM 4: A Reusable, Extensible, Hardware Independent Library for High Performance Molecular Simulation, *J Chem Theory Comput*, Vol. 9, pp. 461–469 (2013).
- [6] R. Susukita *et al.*: Hardware accelerator for molecular dynamics: MDGRAPE-2, *Comput Phys Commun*, Vol. 155, pp. 115–131 (2003).
- [7] S. Boresch *et al.*: Absolute Binding Free Energies: A Quantitative Approach for Their Calculation, *J Phys Chem B*, Vol. 107, pp. 9535–9551 (2003).
- [8] J. Michel, J. W. Essex: Prediction of protein–ligand binding affinity by free energy simulations: assumptions, pitfalls and expectations, *J Comput-Aided Mol Des*, Vol. 24, pp. 639–658 (2010).
- [9] L. F. Song *et al.*: Using AMBER18 for Relative Free Energy Calculations, *J Chem Inf Model*, Vol. 59, pp. 3128–3135 (2019).
- [10] W. Jiang, B. Roux: Free Energy Perturbation Hamiltonian Replica-Exchange Molecular Dynamics (FEP/H-REMD) for Absolute Ligand Binding Free Energy Calculations, *J Chem Theory Comput*, Vol. 6, pp. 2559–2565 (2010).
- [11] S. Liu *et al.*: Lead optimization mapper: automating free energy calculations for lead optimization, *J Comput-Aided Mol Des*, Vol. 27, pp. 755–770 (2013).
- [12] H. Xu: Optimal Measurement Network of Pairwise Differences, *J Chem Inf Model*, Vol. 59, pp. 4720–4728 (2019).
- [13] P. Labute, M. Ebert: Optimizing Simulations Protocols for Relative Free Energy Calculations, *ACS Symp Ser*, Vol. 1397, pp. 227–245 (2021).
- [14] M. Kuhn *et al.*: Assessment of Binding Affinity via Alchemical Free-Energy Calculations, *J Chem Inf Model*, Vol. 60, pp. 3120–3130 (2020).
- [15] M. R. Shirts, J. D. Chodera: Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states, *J Chem Phys*, Vol. 129, p. 124105 (2008).
- [16] I. Y. Ben-Shalom *et al.*: Accounting for the Central Role of Interfacial Water in Protein–Ligand Binding Free Energy Calculations, *J Chem Theory Comput*, Vol. 16, pp. 7883–7894 (2020).
- [17] L. Wang *et al.*: Accurate and Reliable Prediction of Relative Ligand Binding Potency in Prospective Drug Discovery by Way of a Modern Free-Energy Calculation Protocol and Force Field, *J Am Chem Soc*, Vol. 137, pp. 2695–2703 (2015).
- [18] G. Tedesco: Cresset Flare FEP version 5, <https://www.cresset-group.com/about/news/flare-v5-released/> (2021).