

A kovalens enziminhibíció számításos kémiai jellemzése†

MIHALOVITS Levente Márk,^{a,*} FERENCZY György^a és KESERŰ György Miklós^a

^aTermészettudományi Kutatóközpont, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, 1117 Budapest, Magyar Tudósok Körútja 2.

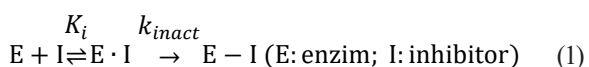
1. Bevezetés

Modern társadalmunkban a gyógyszerhasználat a mindennapos élet elengedhetetlen részévé vált. A gyógyszerkutatás folyamatos fejlődésével egyre hatékonyabb készítményeket gyártanak különféle betegségek gyógyítására, illetve az életminőség javításának érdekében. A számítógépek teljesítőképeségének robbanásszerű növekedésével egyre gyakoribbá válik a számítógépes gyógyszertervezés alkalmazása is a gyógyszerkutatás korai fázisaiban, ezzel is növelve a kutatómunka hatékonyságát és csökkentve a kutatásra fordítandó költségek mértékét. A hivatalosan is elfogadott gyógyszerhatóanyagok jelentős hányadának a felfedezési szakaszában valamilyen formában jelen volt a kísérleti mellett a számításos módszerek alkalmazása is.^{1,2}

A számításos kémiai módszerek használata a kovalens inhibitorok kutatásában is jelentős szerepet játszik. Ezek a molekulák a nem-kovalens társaiktól eltérően a célzott fehérjével a másodlagos kölcsönhatásokon kívül kovalens kötést is létesítenek. Bár bizonyos képviselőiket korábban is alkalmazták, a kovalens inhibitorok célzott kutatása csak az ezredforduló táján indult el. A kovalens mechanizmusú gyógyszerkészítményeket azóta széleskörűen használják különféle patológiás állapotok kezelésére, leginkább rákterápiában. Az amerikai gyógyszerügynökség (FDA) által 2011 és 2019 között elfogadott 14 kovalens inhibitor közül 10-et daganatos betegségekkel kapcsolatos indikációban törzskönyveztek.³

A kovalens inhibitorok számos előnnyel rendelkeznek a nem-kovalens gátlószerekkel szemben, ezek közül a fontosabbak a jobb biokémiai hasznosulás, a hosszabb tartózkodási idő, az alacsonyabb dózis igény, a magasabb terápiás index és bizonyos gyógyszerrezisztenciás mechanizmusok kiküszöbölésének lehetősége.⁴

A kovalens inhibíció mechanizmusa két lépésből áll (**1. egyenlet**), ezek a molekuláris felismerés és a kémiai reakció. Az első során az inhibitor molekula másodlagos kötéseket alakít ki a célzott enzimmal, majd a második, kovalens lépésben kémiai kötést létesít a célzott nukleofil oldallánccal.



A molekuláris felismerést a K_i egyensúlyi állandó, míg az irreverzibilis kovalens reakciót a k_{inact} sebességi állandó jellemzi. (Vizsgálataink irreverzibilis kovalens inhibitorokra korlátozódnak; reverzibilis kovalens inhibitorok vizsgálata részben eltérő megközelítést igényel.⁵) Mivel mindkét lépés egyforma jelentőségű a kötődési események során, így együttes jellemzésük elengedhetetlen a kovalens inhibíció megfelelő leírásához. Mindkét állandó mérhető kísérleti módszerekkel, de a számításos kémiai eszközökkel való meghatározásuk is lehetséges a nem-kovalens kötődési szabadentalpia (ΔG) és a kémiai reakció gátmagasságának (ΔG^\ddagger) számításával és a következő egyenletek használatával:

$$\Delta G = RT \ln(K_i) \quad (2)$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln\left(\frac{k_{inact}}{k_b T/h}\right) \quad (3)$$

ahol R az univerzális gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, k_b a Boltzmann-állandó és h a Planck-állandó.

A K_i és k_{inact} konstansok alkalmasak a kísérleti és számított értékek összehasonlítására, bizonyos esetekben azonban, ezek helyett csak az adott molekulára mért IC_{50} érték áll rendelkezésre, mely azt a ligandum koncentrációt jelöli, mely alkalmazásával a vizsgált fehérje aktivitása a felére csökken. Mivel az IC_{50} gyakran időfüggést mutat a kovalens inhibíció folyamán, ezért alkalmazása a fent említett összehasonlításra fenntartásokkal kezelendő.

Egyik gyakori módszer a kovalens inhibíció számítógépes meghatározására, azaz a ΔG és ΔG^\ddagger számítására, molekuladinamikai (MD) szimulációk futtatása és ezek értékelése. A kötődési szabadentalpia termodinamikai integrálással vagy szabadentalpia perturbáció segítségével számolható, míg a kémiai reakció gátmagassága, a reakció közbeni elektron átrendeződés miatt, vegyes kvantummechanika/molekulamechanika (QM/MM) alapú torzító potenciált alkalmazó molekuladinamikák segítségével számolható.⁶

Munkánk során a fent említett módszerek kombinálásával kifejlesztettünk egy komplex, molekuladinamika alapú protokollt, melyben a kovalens inhibíció mindkét lépése modellezhető és az inhibíciót jellemző konstansok számolhatók. A kidolgozott módszert több, gyógyszerkutatási szempontból releváns fehérjén teszteltük: MurA, KRAS, EGFR, ITK, BTK, BMX, immuno- és konstitutív protea-

† Mihalovits Levente Márk Computational characterization of covalent enzyme inhibition című PhD értekezéséhez kapcsolódó tézisfüzet alapján készült.

* Tel.: +36 1 382 6974; e-mail: mihalovits.levente@ttk.hu

szóma. A módszer elsődleges célja vegyületek inhibíciós aktivitás szerinti rangsorolása, de a mechanizmuskutatásban és szelektivitás vizsgálatban való alkalmazásának lehetőségét is megvizsgáltuk.

2. Módszerek

A kovalens inhibíció számítógépes jellemzéséhez a számítási kémiai módszerek széles skálájának alkalmazása szükséges. A ligandum reaktivitás számításához kvantummechanikai (QM) módszereket alkalmaztunk, míg a kiindulási fehérje-ligandum komplexek előállítását a további lépések kezdő szerkezeteként molekulamechanikai (MM) eszközökkel történt. A vizsgált molekulák kötőpózeit kísérletileg ismert röntgenszerkezetek és ligandum dokkolás segítségével határoztuk meg.

Az így képzett fehérje-ligandum komplexek szerkezetét klasszikus molekuladinamikák futtatásával finomítottuk, illetve a kötőpókok stabilitását is vizsgáltuk a szimulációk során. A kapott trajektóriák információval szolgáltak az adott fehérjekonformációk stabilitásáról, a szerkezeti régiók dinamikai tulajdonságairól és bizonyos fehérje mozgással kapcsolatos események előfordulásáról is. Mivel a kovalens inhibíció folyamata során magas energiájú állapotokon is keresztül megy a fehérje-ligandum komplex, ezért a torzítatlan, klasszikus molekuladinamikák futtatásán túl szükség van torzító potenciált is alkalmazó szimulációk elvégzésére is, a magas energiájú állapotok megfelelő mintavételezésének érdekében.⁷ Ennek megfelelően, a kémiai reakciók modellezéséhez QM/MM alapú torzított molekuladinamikákat futtattunk, nevezetesen „steered” (kormányzott) MD-t (SMD) és umbrella sampling (esernyő mintavételezés, US) MD-t. Az SMD szimulációk során egy időfüggő torzító potenciált alkalmazunk, mely potenciálnak a minimuma folyamatosan mozog előre egy, a kötődési folyamatokat leíró reakciókoordináta mentén, ezzel elősegítve a magasabb energiájú régiók mintavételezését. Az US hasonló elvet követ, de egyetlen szimuláció helyett egy sorozat MD szimulációból áll (ablakok), melyek mindegyike a reakciókoordináta mentén különböző helyeken pozícionált, de állandó torzítópotenciált tartalmaznak. A szabadentalpia profil, mint a reakciókoordináta függvénye, más néven az átlagos erő potenciál görbéje (potential of mean force curve, PMF) az US MD módszer esetében megszerkeszthető a szimulációk eredményéből. Az általunk alkalmazott módszer során, az SMD-eket a US szimulációk ablakainak kezdőszerkezetének létrehozására alkalmaztuk, míg a kovalens reakciók energiaprofilját az US ablakok során mintavételezett reakciókoordináta értékek eloszlásából számoltuk, súlyozott hisztogram analízissel (weighted histogram analysis method, WHAM). Végezetül a kapott energiaprofilból számoltuk ki a sebességhatározó lépéshez tartozó gátmagasságot (ΔG^\ddagger).

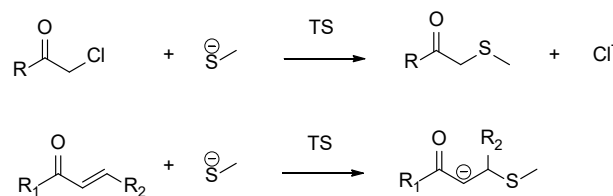
A szintén molekuladinamika alapú termodinamikai integrálás (TI) módszerével két adott állapot közötti szabadentalpia különbség számolható. Specifikus, kémiai vagy al-

kémiai (kémiailag nem valós) átalakításokat is tartalmazó termodinamikai ciklusok szerkesztésével és a ciklus lépéseire alkalmazott TI szimulációk segítségével a ligandumok közötti kötődési szabadentalpia különbségek (affinitás különbségek), vagy ugyanazon ligandum hasonló enzimekben tapasztalható kötődési szabadentalpia különbsége (szelektivitás) is számolható. A TI szimulációk futtatása magában foglalja egy sorozat MD elvégzését, folyamatosan növekvő csatolási paraméterrel (λ), így fokozatosan átalakítva a kiindulási szerkezetet a perturbált szerkezetté. A $\Delta\Delta G$ értékek meghatározása a szerkezet-átlagolt entalpia változásnak a megtett út menti integrálásával történik. Munkánk során egy sor ligandum átalakítást végeztünk és a kapott kötődési szabadentalpia különbség értékeket ($\Delta\Delta G$) egy alkalmasan választott konstanssal eltoltuk, így számítva az adott ligandumokra jellemző abszolút kötődési szabadentalpiát (ΔG).

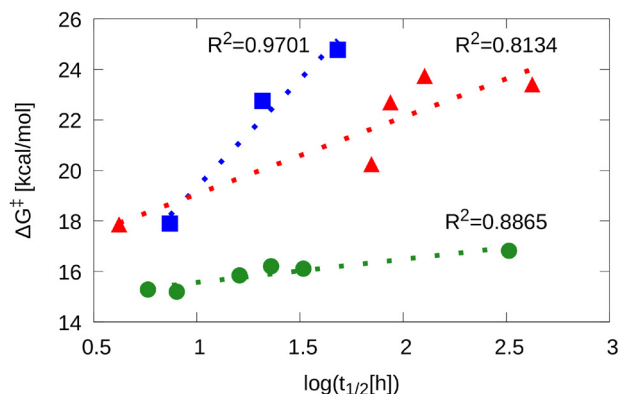
3. Eredmények

3.1. Kovalens inhibitorok reaktivitásának előrejelzése

Munkám kezdeti fázisában, modell reakciók átmeneti állapotának számításával foglalkoztunk. A modellezett rendszerek magukban foglalták a vizsgált ligandumot és egy cisztein oldalláncot helyettesítő metil-tiolátot (**1. ábra**). A számolások során a B3LYP DFT funkcionált alkalmaztuk 6311G**(d,p) bázissal. A reakciógátakat az átmeneti állapot és a reaktáns állapotú vegyületek energiájának különbségeként számoltuk ki. A kapott gátmagasságokat összehasonlítottuk a kísérleti GSH félélet időkkel, amely egy ciszteinnel szembeni ligandum reaktivitást jellemző leíró (**2. ábra**).



1. ábra. Modellezett reakciók

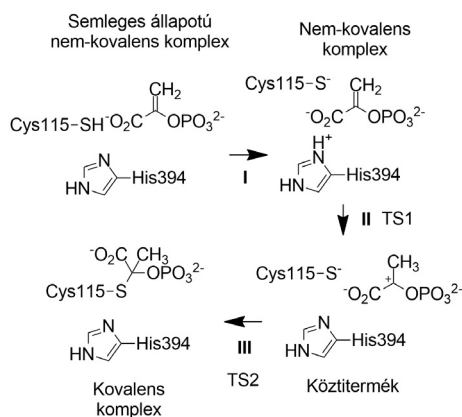


2. ábra. A vizsgált modellreakciók számolt gátmagasságai a kísérleti félélet idő logaritmusának függvényében. Az eltérő színek, eltérő reaktív molekularész (warhead) tartalmazó molekulák csoportjait jelölik: akrilamidok (háromszög), akrilészterek (négyzet), α-kloroacetamidok (kör)

A kísérleti és számolt adatok közötti összefüggést vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy jobb korreláció érhető el, ha azt vegyülettípusonként külön vizsgáljuk. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a kovalens reaktivitás előrejelzése kvantumkémiai számolásokkal sikeresen elvégezhető, leginkább azonos reaktív szerkezeti elemet tartalmazó molekulák csoportjára.⁸

3.2. A MurA enzim katalitikus mechanizmusa és kovalens gátlása

A MurA-val kapcsolatos vizsgálatok célja az enzim működési mechanizmusának tisztázása és egy robusztus, MD alapú, a kovalens enzim-ligandum reakciók jellemzésére szolgáló módszer kifejlesztése volt. Bár a MurA katalitikus mechanizmusát korábban már tanulmányozták,⁹ az aktív centrum oldalláncainak a katalízis során betöltött szerepe és a Cys115 oldallánc jelentősége mind a katalízis, mind a kovalens inhibíció során csak részben tisztázott. Az említett cisztein az enzim flexibilis hurok régiójában található és a természetes szubsztrát foszfoenol-piruváttal (PEP) és kovalens inhibitorokkal is létesíthet kötést.¹⁰ Mivel a PEP-el és az inhibitorokkal való kötődéshez is szükséges a cisztein oldallánc aktiválása, azaz deprotonálása, elsőként ennek lehetőségeit vizsgáltuk meg. Klasszikus MD szimulációk futtatásával megvizsgáltuk mely oldalláncok közelítik meg a kérdéses ciszteint, miközben a hurok régió dinamikus viselkedését is tanulmányoztuk, melynek zárt konformációjával alakul ki az enzim kötőhelye. A trajektória értékelése során a His394 oldalláncot azonosítottuk, mint deprotonáló ágens. Mivel az enzim natív formájában a hurok régió a nyitott állást veszi fel és ennek változását a kofaktor UDP-N-acetilglükózamin (UNAG) kötődése idézi elő, ezért mind a katalitikus mind a gátlási reakció az UNAG bekötődéssel és a hurok régió záródásával indul. A potenciális aktiválódási reakciót, azaz a Cys115-His394 protontranszferet és a PEP kötődését (3. ábra) QM/MM MDk futtatásával vizsgáltuk. A szimulációk kiértékeléséből származó PMF görbe és a PEP esetében PMF felszín alapján megállapítottuk, hogy az aktiválási reakció energetikailag lehetséges, a PEP kötődése pedig két konzekutív lépésből áll, először a PEP kettős kötésének protonaddíciójából, majd a tiolat nukleofil támadásából.¹¹



3. ábra. A PEP Cys115-höz való kötődésének mechanizmusa

Hasonló deprotonálódási mechanizmust feltételezve, modelleztük a Cys115 kovalens reakcióját három sorozat eltérő reaktív molekularészletet (warhead) tartalmazó, ciszteint célzó inhibitorral szemben. Minden sorozat két kísérletileg igazolt aktív és egy inaktív molekulát tartalmazott. A reakciók gátjait minden enzim-ligandum rendszerre kiszámoltuk, majd összevetettük a kísérleti aktivitási értékekkel (1. táblázat). A kapott gátmagasságok alapján történő aktív-inaktív elválasztás sikeresnek bizonyult, mindhárom sorozat esetében a legmagasabb gátat az inaktív vegyülethez tartozóan számoltuk. Az eredmények bizonyították a módszer hatékonyságát kovalens inhibitorok prioritizálásában.¹¹

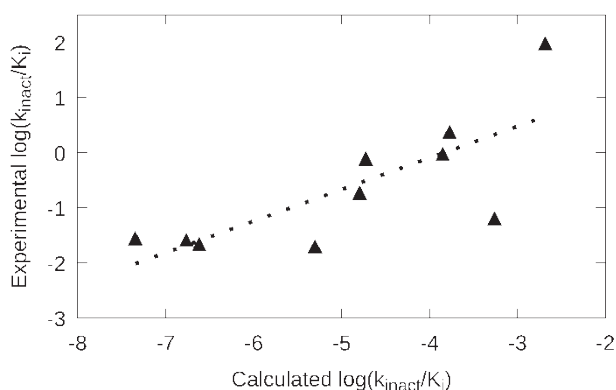
1. táblázat. MurA ligandumok kísérleti és számított tulajdonságai

Vegyület	Maradék aktivitás [%]	Típus	GSH félélet idő [h]	ΔG^\ddagger [kcal·mol ⁻¹]
M1	NE ^a	Aktív	NE ^a	13.3
M2	NE ^a	Aktív	NE ^a	11.1
M3 ^b	93	Inaktív	77.5	19.6 ^c , 20.2 ^d
M4	3	Aktív	0.0	22.3
M5	3	Aktív	0.0	19.9
M6	110	Inaktív	32.8	27.8
M7	12	Aktív	0.2	10.8
M8	1	Aktív	0.0	11.3
M9	95	Inaktív	127.0	16.5

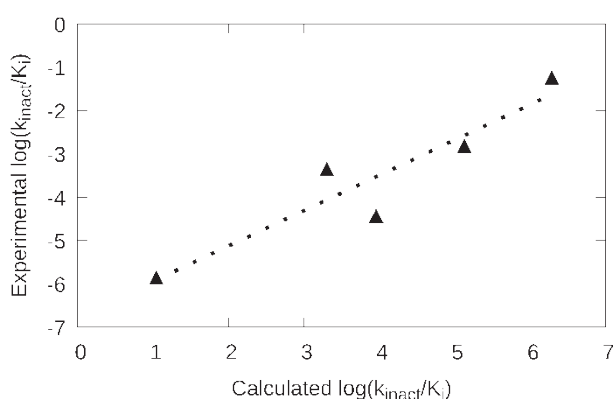
^aNE – nem elérhető, ^bRacém, ^cR-enantiomer, ^dSenantiomer

3.3. Kovalens inhibitorok affinitásának és szelektivitásának vizsgálata

A MurA-nál alkalmazott számolásoknál azzal a feltétellezzel éltünk, hogy ezen kisméretű molekulák esetén a nem-kovalens kötődés csak elhanyagolható energijárulékot ad a teljes gátláshoz, így ennek számolásától eltekintettünk. A következőkben arra törekedtünk, hogy a kovalens kötődés mindkét lépését figyelembe vevő és modellezni képes módszert fejlesszünk ki. A kovalens reakció modellezésére az előzőekben is már használt QM/MM MD szimulációkat futtattunk, míg a kötődési szabadenergia különbségek számítására termodinamikai integrálást alkalmaztunk. Az így felépített számítási protokoll teszteléséhez két adatkészletet használtunk a megfelelő kísérletileg meghatározott konstansokkal. A tesztelés során tíz KRAS^{G12C} és öt EGFR^{T790M/L858R} inhibitor teljes szabadentalpiái jellemzését végeztük el. A szimulációk futtatása után meghatározott ΔG és ΔG^\ddagger értékeket a megfelelő K_i és k_{inact} állandókká alakítottuk az előzőekben bemutatott egyenletek (2. és 3. egyenlet) segítségével és összehasonlítottuk ezeket a kísérletileg meghatározott értékekkel. A számított mennyiségek a kísérletileg talált tendenciákat tükrözték, ezzel bizonyítva a kidolgozott számítási protokoll teljesítőképességét (4. és 5. ábra).¹²



4. ábra. KRAS^{G12C} inhibitorok kísérleti és számított $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékeinek összehasonlítása



5. ábra. EGFR^{T790M/L858R} inhibitorok kísérleti és számított $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékeinek összehasonlítása

Ezen kívül egy akrilamid reaktív csoportot tartalmazó vegyület három rokon kinázzal, ITK-val, BTK-val és BMX-szel szembeni szelektivitását is megvizsgáltuk. A kötődési szabadentalpia különbségek számítása során oldallánc mutációs termodinamikai integrálást végeztünk. A fehérjék cisztein oldallánca és a választott inhibitor között végbenő kémiai reakciókat az általános QM/MM MD alapú módszerrel végeztük (2. táblázat). Ezek után két vegyület egyszeres és kétszeres EGFR mutánsval szembeni szelektivitásának vizsgálatát is elvégeztük, szintén oldallánc mutációs TI segítségével, a $\Delta\Delta G$ -k számításával (2. táblázat, 3. táblázat).

A kapott számadatok és a szimulációs trajektóriák elemzésének segítségével értelmezni tudtuk a szelektivitási különbségeket, s bemutattuk, hogy az általunk fejlesztett komplex számítási protokoll szelektivitási kérdések megválaszolására is alkalmas.¹²

2. táblázat. Kísérleti (exp) és számítási eszközökkel meghatározott (calc) kötődési szabadentalpiák (ΔG), kötődési szabadentalpia különbségek ($\Delta\Delta G$) és reakció gátak (ΔG^\ddagger) a választott akrilamid reaktív csoportot tartalmazó vegyület inhibíciójának jellemzésére. (Az energia értékek mind kcal·mol⁻¹-ban szerepelnek)

Enzim	ΔG_{exp}	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$	$\Delta G_{\text{exp}}^\ddagger$	$\Delta G_{\text{calc}}^\ddagger$
ITK	-10.4	-	-	25.1	24.3
BTK	-5.8	-	-	21.1	19.6
BMX	-8.6	-2.8 ^a	-2.3 ^a	22.9	22.9

^aBTK BMX mutáció

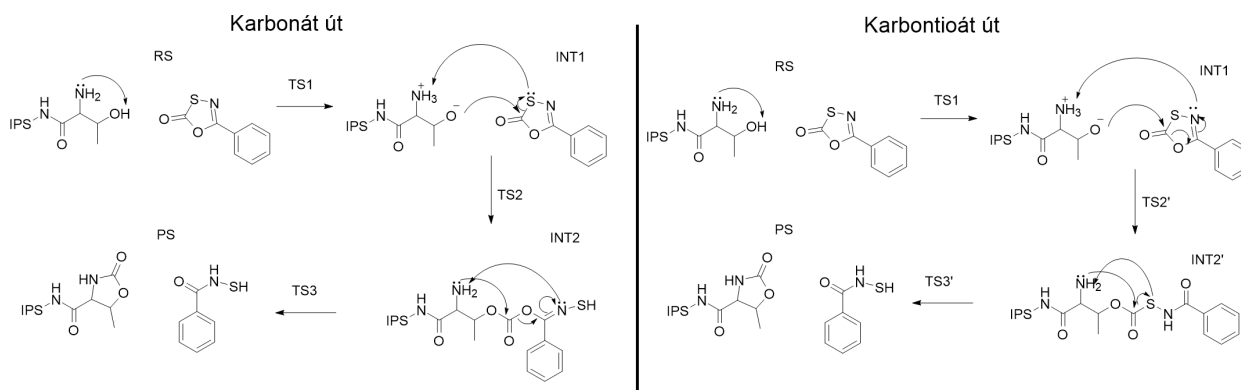
3. táblázat. EGFR inhibitorok szelektivitását jellemző kísérleti ($\Delta\Delta G_{\text{exp}}$) és számított ($\Delta\Delta G_{\text{calc}}$) kötődési szabadentalpia különbségei. (Az energia értékek mind kcal·mol⁻¹-ban szerepelnek)

Inhibitor	Mutáció	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$
17	T790->M790	-2.8	-0.7
18	T790->M790	-4.7	-3.3
Enzim	Átalakítás	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$
L858R	17->18	1.5	0.5
L858R/T790M	17->18	-0.4	0.3

3.4. Kovalens immunoproteaszóma inhibitorok kötődésének és szelektivitásának vizsgálata

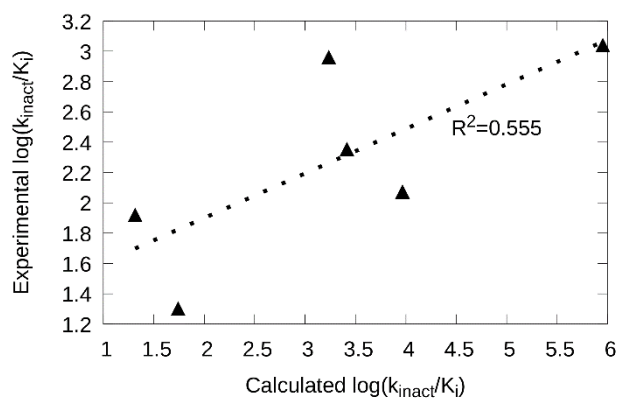
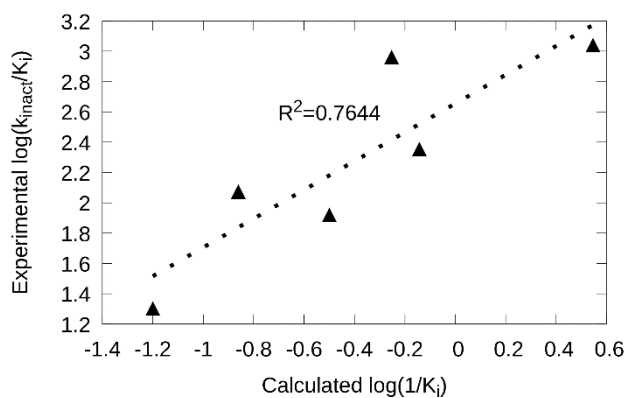
Végezetül a kovalens inhibíció számítási kémiai módszerekkel történő jellemzését kiterjesztettük bonyolultabb kémiai reakcióval kötődő vegyületekre is; oxatiazolon származékok immunoproteaszóma gátlását vizsgáltuk. Elsőként két javasolt reakcióút közül az energetikailag kedvezőbbet határoztuk meg a legegyszerűbb vizsgált oxatiazolon származék PMF profiljainak számításával (6. ábra). Ennek során a karbonát utat, mint valószínűbb mechanizmust azonosítottuk. Ezután meghatároztuk a reakciósor sebesség-meghatározó lépését is, mely egy aszinkron, két kötés kialakulásából álló folyamatnak adódott. Ezt követően meghatároztuk az összes kiválasztott oxatiazolon származék sebességmeghatározó-lépésének gátmagasságát és a kötődési szabadentalpia értékét. Az ezekből számolt $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékeket összevetettük a kísérleti adatokkal. Az eredmények között jó korrelációt találtunk, ezzel validálva a TI MD és QM/MM US MD kombinációját tartalmazó módszert bonyolultabb kötődési mechanizmusú inhibitorok energetikai jellemzésének használatára is (7. ábra).¹³

Az előzőben meghatározottnál jobb korrelációt fedeztünk fel a számított $\log(1/K_i)$ és a kísérleti $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékek között (8. ábra), ezzel azt bizonyítva, hogy a kötődési affinitásban tapasztalt különbségeket főként a nem-kovalens lépésben felfedezhető eltérések okozzák.



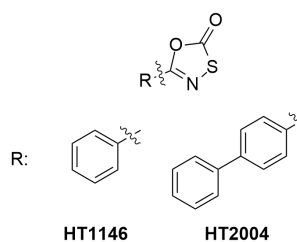
6. ábra. A HT1146 vizsgált mechanizmusa az iPS-al szemben.

$$\log\left(\frac{k_{\text{inact}}[A]}{K_i[A]}\right) - \log\left(\frac{k_{\text{inact}}[B]}{K_i[B]}\right) = \frac{\log(e)}{RT}(-\Delta G^\ddagger[B] + \Delta G^\ddagger[A] - \Delta G[B] + \Delta G[A]) = \frac{\log(e)}{RT}(-\Delta\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G) \quad (4)$$

7. ábra. Immunoproteaszóma inhibitorok kísérleti és számított $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékeinek összehasonlítása. (A k_{inact} értékek s^{-1} , a K_i értékek M mértékegységben szerepelnek.)8. ábra. A kísérletileg meghatározott $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ és a számított $\log(1/K_i)$ összehasonlítása. (A K_i értékek M, a k_{inact} értékek s^{-1} mértékegységben szerepelnek.)

A módszer szelektivitás értelmezésére való alkalmazását proteaszóma célpontokra is elvégeztük. Kiválasztottunk két, az előzőekben is vizsgált oxatiazolon származékot (9. ábra) jelentősen eltérő immuno- és konstitutív proteaszóma szelektivitással és különböző oldallánc mutációs és ligandum mutációs TI szimulációk futtatásával meghatároztuk az átalakítások során tapasztalható kötődési szabadentalpia különbségeket. Ezzel párhuzamosan a ligandumok cPS-hez való kovalens kötődésének sebesség-meghatározó lépésének gátmagasságát is kiszámoltuk. A 4. egyenlet összefüggést teremt a k_{inact}/K_i -vel, és a szabadentalpiákkal kifejezett szelektivitások között.

Az összehasonlításhoz szükséges adatok a 4. táblázatban találhatóak. Ezeket megvizsgálva ismét jó egyezést találtunk a számított és kísérleti adatok között. A trajektóriák analízise során azonosítottunk egy Gln53Ser mutációt, mely a konstitutív proteaszómában az iPS-nél tapasztaltól eltérő Met45 konformációt okoz, melynek a ligandum méretétől függő hatása van a kovalens gátlás folyamatának energia viszonyaira.¹³



9. ábra. Proteaszóma szelektivitás vizsgálatára kiválasztott vegyületek

4. táblázat. Kísérleti és számításos eszközökkel meghatározott szabadentalpia különbségek a HT1146 és HT2004 között, illetve az iPS és cPS között. (Az energiaértékek mind $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ -ban szerepelnek.)

Átalakítás/mutáció	Kísérleti $-\Delta\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G$	Számított $-\Delta\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G$
HT1146->HT2004 iPS	-1.4	-2.0
HT1146->HT2004 cPS	3.0	4.5
HT1146 iPS->cPS	0.8	0.4
HT2004 iPS->cPS	5.1	6.7

4. Összefoglalás

Mivel a kovalens inhibíció, mint gyógyszer hatásmechanizmus rendkívüli fontosságú területté vált napjainkra, így szükséges minden lehetőséget megragadni mellyel a kovalens inhibitorok azonosítása segíthető. Egyik ilyen lehetőség a kovalens inhibitorok kötődésének számítógépes modellezése, melynek segítségével a kötődés energia-viszonyait jellemezhetjük. Munkánk kezdetén egy olyan összetett módszer kifejlesztését tűztük ki célul, mellyel a kovalens kötődés mindkét lépése jellemezhető. Ennek során különböző kovalens inhibitorok kötődését vizsgáltuk kovalensen támadható fehérjékkel szemben. A módszer validálása során mechanizmus kutatást is végeztünk.

Mechanizmust javasoltunk a MurA enzim által katalizált reakcióra, mely tartalmaz egy a kofaktor UDP-N-acetilglükózamin (UNAG) általi hurok záródást, majd ezt követően egy Cys115 His394 közötti protonátmenetet, ezzel aktiválva a Cys115 oldallánc tiolját a természetes szubsztráttal (foszfoenol-piruvát, PEP) vagy ciszteint célzó kovalens inhibitorokkal szembeni nukleofil támadáshoz. A PEP kötődési mechanizmusára azt találtuk, hogy először protonálódik a His394 által, majd adduktot képez a Cys115-tel.

Megmutattuk, hogy a MurA Cys115 oldallánca és kilenc oxirán, α -haloeton, α -haloacetamid, akrilamid és vinil-szulfon származék között végbemenő kémiai reakciók számított gátmagasságai alapján a ligandumok aktív-inaktív besorolása elvégezhető.

Kifejlesztettünk egy komplex molekuladinamika alapú szabadentalpiát számító protokollt a teljes kovalens inhibíció jellemzésére, beleértve a nem-kovalens és kovalens lépést is. A módszert sikeresen validáltuk több releváns fehérjén, név szerint KRAS-on, EGFR-en, ITK-n, BTK-n és BMX-en. A módszer segítségével szelektivitási becsléseket is sikeresen tettünk, néhány kiválasztott vegyület rokon kinázokkal, illetve EGFR mutánsokkal szembeni kötődési szabadentalpia különbségeinek számításával.

Tisztáztuk az immunoproteaszóma Thr1 oldallánca és oxatiazolon származékok között végbemenő kémiai reakció mechanizmusát, QM/MM molekuladinamikák használatával és az umbrella sampling mintavételezési technika segítségével. A mechanizmusok vizsgálata során a karbonát utat a karbontioát útnál energetikailag kedvezőbbnek találtuk. Ezen kívül megmutattuk, hogy az aktivált Thr1 O_γ általi nukleofil támadás, valamint a terminális aminocsoport és az oxatiazolon gyűrűből származó negatív töltésű kénatom közötti proton transzfer aszinkron kötődési események, és együttesen ezek alkotják a teljes reakciósor sebesség meghatározó lépését.

Bemutattuk hat oxatiazolon származék esetében, hogy az immunoproteaszómával szemben mért gátlási aktivitásukban tapasztalt különbségeket elsődlegesen a molekuláris felismerési lépés során fellépő eltérések okozzák, a kémiai reakciótól való függésük kisebb mértékű. Értelmeztük

két oxatiazolon származék immuno- és konstitutív proteaszómával szembeni eltérő szelektivitását, mely során egy Gln53Ser mutáció által okozott Met45 konformációváltozást találtunk, mint a szelektivitási különbség fő oka. A cPS-ban és az iPS-ban eltérő konformáció a ligandum méretétől függő hatást gyakorol az inhibitorok kötődésére és kémiai reakciójára.

Bár az elsődleges célja a kidolgozott módszernek a vizsgált vegyületek kötődésének energetikai leírása és az ez alapján történő vegyület rangsorolás, munkánk során bemutattuk a protokoll szelektivitási vizsgálatokban és mechanizmus-kutatásban való alkalmazhatóságát is. A módszer hatékony támogatást nyújthat kovalens inhibitorok azonosítását célzó gyógyszerkutatási munkában, főként szerkezet optimalizációs feladatokban

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti a Gyógyszerkémiai Kutatócsoport valamennyi tagját a kutatómunkámban való folyamatos segítségnyújtásért és a hatékony munkakörnyezet megteremtéséért.

Hivatkozások

1. Talele T, Khedkar S, Rigby A.; *Curr Top Med Chem* **2010**, *10*, 127–41.
<https://doi.org/10.2174/156802610790232251>
2. Sabe VT, Ntombela T, Jhamba LA, Maguire GEM, Govender T, Naicker T, et al.; *Eur J Med Chem* **2021**, *224*, 113705
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>
3. Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A.; *RSC Med Chem* **2020**, *11*, 876–84.
<https://doi.org/10.1039/D0MD00154F>
4. Johnson DS, Weerapana E, Cravatt BF.; *Future Med Chem* **2010**, *2*, 949–64
<https://doi.org/10.4155/fmc.10.21>
5. Zhang H, Jiang W, Chatterjee P, Luo Y.; *J Chem Inf Model* **2019**, *59*, 5, 2093–2102
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00959>
6. De Vivo M, Masetti M, Bottegoni G, Cavalli A.; *J Med Chem* **2016**, *59*, 4035–61.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>
7. Abrams C, Bussi G.; *Entropy* **2013** *16*, 163–99.
<https://doi.org/10.3390/e16010163>
8. Mihalovits LM, Ferenczy GG, Keserü GM.; *Int J Quant Chem* **2021**, *122*, e26768
<https://doi.org/10.1002/qua.26768>
9. Gautam A, Rishi P, Tewari R.; *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *92*, 211–25
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3512-z>
10. Zhu JY, Yang Y, Han H, Betzi S, Olesen SH, Marsilio F, et al.; *J Biol Chem* **2012**, *287*, 12657–67.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.342725>
11. Mihalovits LM, Ferenczy GG, Keserü GM, *J Chem Inf Model* **2019**, *59*, 5161–5173.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00691>
12. Mihalovits LM, Ferenczy GG, Keserü GM.; *J Chem Inf Model* **2020**, *60*, 6579–6594
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00834>
13. Mihalovits LM, Ferenczy GG, Keserü GM, *Comp Struct Biotech J* **2021**, *19*, 4486–4496.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.008>

Computational characterization of covalent enzyme inhibition

Since the early 2000s covalent enzyme inhibition and covalent drug design have become one of the most significant fields of research in terms of medicinal chemistry. Covalent inhibitors offer longer residence time, wider therapeutic index, and lower dosage requirements than the non-covalent counterparts. The mechanism of covalent inhibition consists of two consecutive steps, namely the molecular recognition (non-covalent step) and the covalent bond formation between the targeted amino acid sidechain and the warhead region of the ligand. Such mechanism requires careful drug design strategy to maintain the target specificity and chemical reactivity of the designed compounds while avoiding potential off target reactivity and toxicity. It is of high importance to predict the free energy of both the non-covalent and covalent binding steps as these energies indicates the overall binding of the potential compounds. Beside the routine experimental tests, such as the measurement of GSH half-life, computational chemistry offers further tools for the proper prediction of the binding of potential covalent inhibitors.

Our aim was to develop a computational chemistry based method which is able to account for both steps of the covalent inhibition. Our work involves mechanistic and retrospective studies regarding the binding of selected covalent inhibitors into various covalently druggable proteins, such as MurA, KRAS^{G12C}, EGFR mutants, ITK, BTK, BMX and Immunoproteasome.

Regarding the antibacterial target MurA, we have proposed a mechanism for the reaction catalyzed by the enzyme. This includes the loop closure upon UNAG (UDP-*N*-acetylglucosamine) binding, followed by a proton transfer between Cys115 and His394 that activates the cysteine residue for the nucleophilic attack towards the natural substrate PEP or the cysteine targeting inhibitors. We found that PEP is first protonated by His394 and Cys115 forms a covalent adduct with the protonated PEP.

We have shown that the active-inactive separation of ligands is possible based on the calculated barriers of the inhibition reaction between MurA and nine selected compounds containing oxirane, α -haloketone, α -haloacetamide, acrylamide and vinyl-sulfone warheads.

We have developed a complex molecular dynamics based protocol characterizing the complete covalent protein inhibition including both the non-covalent and covalent steps. The protocol was validated successfully on a set of relevant protein targets, namely on KRAS, EGFR, ITK, BTK and BMX. Selectivity assessments were also carried out explaining binding affinity differences of specific compounds towards the related kinases and EGFR mutants.

We have clarified the mechanism of the covalent reaction between the Thr1 residue of immunoproteasome and an oxathiazolone derivative using QM/MM molecular dynamics umbrella sampling calculations. We have determined that the carbonate pathway is favored over the carbonylthioate route. We showed that the nucleophilic attack of the activated Thr1 O γ and the proton transfer between the terminal amino group of Thr1 and the negatively charged sulfur of the ligand are asynchronous events, composing the rate determining step.

We have shown that the differences in the iPS inhibitory activity of six examined oxathiazolone compounds are primarily affected by the molecular recognition, and less by the chemical reaction. We interpreted the immunoproteasome versus constitutive proteasome selectivity of two compounds. We found that the Gln53Ser mutation causes different Met45 conformation in cPS compared to iPS and this has a ligand size dependent effect on the binding and reactions of inhibitors.

Though, the primary aim of the developed protocol is to aid covalent drug design through an enhanced compound ranking process, the applicability is not limited to activity based compound prioritization. We successfully used the developed scheme in selectivity studies evaluating the binding free energy difference between the same ligand binding to related proteins, performing sidechain mutational TI simulations. The QM/MM free energy simulations are well suited to explore reaction mechanisms in complex systems, and the identified reaction mechanisms of covalent inhibitors are used in the characterization of the covalent inhibition process, in compound ranking and in structure optimization.