



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Alkynes in covalent enzyme inhibitors: down the kinetic rabbit hole

Mons, E.

Citation

Mons, E. (2024, April 11). *Alkynes in covalent enzyme inhibitors: down the kinetic rabbit hole*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3734191>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3734191>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Epilogue



Nederlandse Samenvatting
Curriculum Vitae
List of Publications
Acknowledgements

Alkynen in Covalente Enzym Remmers: Val in het Kinetische Konijnenhol

Er was eens... een tijd waarin remmers met een mogelijke covalent bindingsmechanisme actief werden uitgesloten van industriële geneesmiddelenontwikkelingsprogramma's, ondanks dat er genoeg veilige en veelgebruikte medicijnen zijn waarvan pas later bleek dat ze onomkeerbaar en covalent binden aan het te remmen eiwit. In **Hoofdstuk 1** laten we zien hoe dit sentiment in de afgelopen twee decennia langzaam is omgeslagen, omdat het met covalente remmers mogelijk is om resistentie tegen bestaande medicijnen te overwinnen en voorheen onaantastbare oncogenen te remmen. Dit heeft geleid tot de toegenomen ontwikkeling van gericht covalente remmers (TCI's): medicijnen die een strategisch geplaatst elektrofiel bevatten dat een covalente binding kan vormen met een nucleofiel aminozuur (zoals cysteïne of serine) in het doeleiwit. Een belangrijke factor in het verbeteren van de veiligheid van TCI's is de identificatie van nieuwe chemische groepen die reactief zijn met een cysteïne in het doeleiwit, maar niet te reactief zijn met andere thiolen in de cel. Een verrassende kandidaat hiervoor is het niet-geactiveerde alkyn, of acetyleen, aangezien algemeen geaccepteerd wordt dat niet-geactiveerde alkynen 'inert' zijn ten opzichte van cellulaire componenten onder fysiologische omstandigheden. In 2013 ontdekten de onderzoeksgroepen van Ovaa en Mootz per toeval, en onafhankelijk van elkaar, dat Ub(I)-Prg – bedoeld als bouwsteen voor protease-bestendige niet-hydrolyseerbare substraten – een covalent Markovnikov-type thiovinyl adduct kan vormen met het katalytische cysteïne van Ub(I)-proteases. Covalente adducten werden echter alleen gedetecteerd wanneer het gepropargyleerde peptide een relatief groot herkenningselement had (>1,8 kDa), en introductie van substituenten op het propargylamide hinderden de vorming van adducten met UCHL3. In dit proefschrift verkennen we de restricties en veelzijdigheid van de nieuwe *in situ* thiol-alkynadditie: van niet-geactiveerde alkynen als reactieve groep in irreversibele covalente geneesmiddelen tot gesubstitueerde propargyl-analoga in chemische biologische reagentia.

Er zijn veel manieren om indirect van de (tijdsafhankelijke) afname van intact drug en/of eiwit af te leiden dat ze mogelijk een covalente interactie ondergaan, maar uiteindelijk levert alleen de experimentele detectie van het covalente eiwit-medicijn adduct sluitend bewijs op van een covalent bindingsmechanisme. In **Hoofdstuk 2** worden technologieën besproken die een strikt onderscheid kunnen maken tussen een covalent adduct en een niet-covalent complex. De experimentele validatie van een covalent adduct is gebaseerd op een detecteerbare verandering die alleen plaatsvindt bij een covalente binding zoals een toename van de massa (MS), onafgebroken elektronendichtheid tussen het eiwit en het medicijn (eiwitkristallografie), een verandering in intrinsieke spectroscopische eigenschappen, verschuiving van de chemische verschuiving δ (NMR), detectie van eiwitten gemodificeerd met een fluorescente ABP die afgeleid is van het geneesmiddel (gel-elektroforese-gebaseerde/homogene ABPP), of de verrijking van eiwitten die covalent gemodificeerd zijn met een geneesmiddel-afgeleide ABP (chemische proteomics ABPP).

In **Hoofdstuk 3** zijn we vervolgens dieper ingegaan op het principe dat er andere kinetische parameters gebruikt worden om de sterkte van covalente remmers te vergelijken, waarbij we ons met name gericht hebben op het verband tussen experimentele meetcondities en de algebraïsche modellen die gebruikt worden om die kinetische parameters te bepalen. Een covalent adduct vormt niet instantaan (op een kinetische tijdschaal), dus met het verstrijken van langere (pre)incubatietijden zal de remmende werking toenemen en deze tijdsafhankelijke enzym activiteit kan in algebraïsche modellen ingepast worden om zo de relevante kinetische parameters te achterhalen. In deze algebraïsche formules zijn echter aannames – die zelden expliciet vermeld worden – ingebed ten opzichte van de experimentele meetcondities. Met behulp van kinetische simulatiescripts was het mogelijk om de wiskundige formules te vertalen naar gesimuleerde meetresultaten op basis van vooraf ingestelde testcondities, en zo te valideren wat de consequenties zijn als er niet voldaan wordt aan de algebraïsche aannames. Deze simulaties zijn vervolgens gebruikt om een uitgebreide, complete gids samen te stellen voor de evaluatie van covalente remmers in enzymatische metingen: vier stapsgewijze experimentele protocollen met bijbehorende data analyse protocollen afgestemd op de covalente bindingsmodi.

In **Hoofdstuk 4** laten we zien dat een klein herkenningselement (<600 Da) voldoende is voor de *in situ* thiol-alkynreactie. Alkyn-analogen van odanacatib (ODN) – een reversibel covalente remmer van cathepsine K,

het belangrijkste cysteineprotease bij botresorptie – werden verkregen door het reactieve nitril te vervangen door een iso-elektrische alkyn. Propargylderivaat EM04 heeft een >500 keer hogere IC_{50} voor CatK remming vergeleken met ODN, maar verdere biochemische evaluatie liet zien dat de niet-geactiveerde alkyn-analogen een irreversibele covalente binding vormen met hCatK (zonder de ongewenste covalente binding van nucleofielen in bijvoorbeeld GSH of cysteine). Eiwitkristallografie van het covalente adduct met EM07, een derivaat waarbij een fluor is vervangen door een waterstof atoom, bevestigde de vorming van een covalente Markovnikov-type thiovinylbinding tussen het EM07-alkyn en het katalytische Cys25 van hCatK. De vorming van het covalente CatK-alkyn adduct is verrassend langzaam, wat het ogenschijnlijke verlies aan potentie in de initiële activiteitsmetingen zou kunnen verklaren. In menselijke osteoclastculturen was EM04 slechts vijf keer minder potent dan ODN in het remmen van botresorptie activiteit, en was er in beide osteoclast culturen een toename te zien van het niveau van volwassen, actief CatK ten opzichte van de onbehandelde osteoclasten. De observatie dat een onomkeerbare qABP in staat was om ODN te verdringen, waardoor er juist meer actief CatK te zien is dan in de onbehandelde controles, verklaart mogelijk waarom er vaak een hogere botresorptie gezien wordt na afloop van een behandeling met ODN (in patiënten en muizen).

In **Hoofdstuk 5** is onderzocht of de niet-geactiveerde alkynen ook toegepast kunnen worden om niet-katalytische cysteïnes te binden. Het reactieve acrylamide in covalente kinaseremmer neratinib, dat een covalente binding vormt met het niet-katalytische Cys797 in de ATP-bindingslocatie van EGFR, werd vervangen door een niet-geactiveerd alkyn in 8RK57 en 8RK58. Helaas resulteerde dit niet in detectie van een covalent adduct met recombinant EGFR-kinasedomein, ondanks dat inhibitie van cellulaire EGFR (auto)fosforylering erop wees dat er sprake zou zijn van een onomkeerbaar bindingsmechanisme. Het is onwaarschijnlijk dat alkyn-analogen 8RK57 en 8RK58 een covalent bindingsmechanisme hebben, wat te wijten kan zijn aan onjuiste oriëntatie van het alkyn ten opzichte van het cysteine-thiol, maar het is ook mogelijk dat de thiol-alkynreactie in het algemeen niet toepasbaar is op niet-katalytische cysteïnes. Om dit verder te onderzoeken zullen alkynderivaten van andere kinase remmers getest moeten worden.

Op basis van eerdere bevindingen werd verondersteld dat adductvorming alleen mogelijk is met ongesubstitueerd propargylamide, aangezien covalent adduct van de gezuiverde recombinante CysDUB UCHL3 met ubiquitine-ABPs niet werd gedetecteerd als er sprake was van een eindstandig gemethyleerd propargylamine (Ub-2) of een gedimethyleerd propargylamine (Ub-5). Om de rol van verschillende substituenten te onderzoeken, is in **Hoofdstuk 6** een uitgebreid panel van propargylderivaten ingebouwd in fluorescente Rho-Ub-ABPs. Propargylamide-analogen met substituenten op de terminale danwel interne alkynpositie waren inderdaad niet reactief met UCHL3, maar waren wel in staat om covalente adducten te vormen met andere CysDUB's. USP16 is een van de meest flexibele CysDUB's, en was in staat om een adduct te vormen met zowel Rho-Ub-2 als Rho-Ub-5, maar ook hier zorgden de (grote en/of elektronen-donerende) methylgroepen voor een verminderde snelheid van adductvorming door zowel sterische als elektronische effecten. De aanvaardbare positie en omvang van substituenten op het propargylamide waren specifiek voor het protease: leden van dezelfde CysDUB-familie lieten niet perse dezelfde selectiviteit zien, wat benadrukt dat er een belangrijke rol is voor het protease in de acceptatie van omvangrijke en/of elektronen-stuwende substituenten op het propargylamide. Reactiviteit met gedimethyleerde propargylamide in Rho-Ub-5 en aanwezigheid van beide deuteriums in adducten met gedeuteerde propargylamide in Rho-Ub-[D₂]-Prg tonen aan dat het reactiemechanisme niet via een reactief alleen intermediair verloopt (*mechanisme C*).

Tot slot zijn in **Hoofdstuk 7** de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift samengevat, met als voornaamste conclusie dat de toepasbaarheid van niet-geactiveerde alkynen breder is dan eerder werd aangenomen: niet alleen is het bruikbaar als elektrofiel in relatief kleine covalente remmers (<600 kDa), maar afhankelijk van het protease is het ook mogelijk om omvangrijke substituenten op het propargylamide te plaatsen. Sindsdien is het onderzoek voortgezet door andere onderzoeksgroepen: er zijn meerdere covalente cysteineproteaseremmers met een niet-geactiveerd alkyn gepubliceerd, en het reactiemechanisme is verder geëvalueerd met behulp van berekeningen aan geavanceerde modellen. Samenvattend kunnen we stellen dat het niet-geactiveerde alkyn een optimale balans heeft van reactiviteit met het gewenste cysteineprotease en selectiviteit ten opzichte van andere eiwitten.