



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).

Alkynes in Covalent Enzyme Inhibitors: Down the Kinetic Rabbit Hole

1. A covalent binding mode is easily overlooked in drug development programs that are not specifically focused on finding a covalent inhibitor.
This thesis, *Chapter 2-3*.
2. The nonactivated alkyne is the ideal electrophile for covalent inhibitors targeting catalytic cysteine thiols.
This thesis, *Chapter 4*.
3. The *in situ* thiol–alkyne reaction is too slow to hinder the application of nonactivated alkynes as bioorthogonal handles, but we cannot be sure it does not affect ABPP read-out: reactivity with the alkyne handle would normally go undetected as proteins that covalently react with the alkyne are not enriched/labelled.
This thesis, *Chapter 2; Chapter 4*.
4. Covalent protein–ABP adducts do not form instantly though the USP16–Ub–Prg adduct comes pretty close.
This thesis, *Chapter 3; Chapter 6*.
5. The importance of clear packing tape in kinetic evaluation of covalent enzyme inhibition is severely underestimated and underappreciated.
This thesis, *Chapter 5*.
6. Kinetic progress curves and dose-response graphs are to fitted kinetic values (e.g. k_{inact} , K_i , K_i^*), what full gels scans (including a loading control) are to gel-based quantification of protein (adduct) abundance: a valuable piece of information that should not be omitted from publication.
7. The term ‘activity-based’ in Activity-Based Probe (ABP) is misleading: covalent protein–ABP adduct formation often requires presence of a cysteine thiol rather than enzymatic activity.
Adduct of SUMO2-ABPs with inactive SENP1^{H533A} mutant: Sommer, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2511-2517.
8. The abundance of peer-reviewed publications incorrectly stating that ~30% of marketed enzyme inhibitors bind covalently demonstrates the importance of reading and citing original research papers.
“Among the 71 enzyme targets, 25 are irreversibly inhibited by drugs, and 19 of the 25 irreversibly inhibited enzymes are covalently modified by the drug.” Robertson, J.G. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5561-5571.
9. It is unfair to scrutinize the safety of irreversible covalent inhibitors more than traditional reversible inhibitors solely based on the principle of “*if it is forever, it needs to be safe*”: irreversible inhibition does not last forever as *de novo* protein synthesis will ultimately restore enzyme activity.
De Vita, E., *Future Med. Chem.* **2021**, *13*, 193-210.
10. The recognition element of a targeted covalent interactor is the *matchmaker* bringing the electrophile (*eligible bachelor*) and enzyme (*prospective partner*) in proximity to enable/promote the formation of a noncovalent complex (*relationship*) and eventually a covalent adduct (*marriage*).
11. Getting your PhD may be a party but you are not supposed to *literally* put up the decorations yourself.
12. The purpose of a PhD dissertation is to be written, not to be read.
Adapted from: Miquel Bulnes in Lab (2005).



Alkynes in Covalent Enzyme Inhibitors: Down the Kinetic Rabbit Hole

1. Een covalent bindingsmechanisme is makkelijk over het hoofd te zien in medicijnontwikkelingsprogramma's die niet specifiek op zoek zijn naar een covalente remmer.
Dit proefschrift, *Hoofdstuk 2-3*.
2. Het niet-geactiveerde alkyne is het ideale elektrofiel voor covalente remmers die binden aan het thiol van katalytische cysteïnes.
Dit proefschrift, *Hoofdstuk 4*.
3. De *in situ* thiol-alkyne reactie met kleine moleculen is te langzaam om de toepassing van niet-geactiveerde alkynen als bioorthogonale handvatten te hinderen, maar we kunnen er niet zeker van zijn dat deze reactiviteit ABPP resultaten niet beïnvloedt: reactiviteit met het alkyne wordt normaalgesproken niet gedetecteerd aangezien eiwitten die covalent reageren met het alkyne niet verrijkt of gemarkeerd worden.
Dit proefschrift, *Hoofdstuk 2; Hoofdstuk 4*.
4. Covalente eiwit-ABP adducten vormen niet instantaan, al komt de vorming van het USP16-Ub-**Prg** adduct hier dicht in de buurt.
Dit proefschrift, *Hoofdstuk 3; Hoofdstuk 6*.
5. Het belang van transparant verpakkingstape in de kinetische evaluatie van covalente enzym remmers wordt zwaar onderschat en ondergewaardeerd.
Dit proefschrift, *Hoofdstuk 5*.
6. Kinetische voortgangscurven en dosis-responsgrafieken zijn tot gevonden kinetische waarden (bijv. k_{inact} , K_p , K_i^*), wat volledige gelscans (inclusief laadcontrole) zijn tot kwantificering van het eiwit (adduct) in gel: een waardevol stukje informatie die niet mag worden weggelaten uit de publicatie.
7. De term 'op activiteit gebaseerde' in Activity-Based Probe (ABP) is misleidend: voor covalente eiwit-ABP adductvorming is vaak enkel de aanwezigheid van een cysteine thiol nodig, geen katalytische activiteit.
Adduct van SUMO2-ABPs met de inactieve SENP1^{H533A} mutant: Sommer, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2511-2517.
8. Het grote aantal wetenschappelijke publicaties waarin ten onrechte wordt gesteld dat ongeveer 30% van de medisch goedgekeurde enzymremmers covalent binden, laat het belang zien van het lezen en citeren van de originele onderzoeksbronnen.
"Among the 71 enzyme targets, 25 are irreversibly inhibited by drugs, and 19 of the 25 irreversibly inhibited enzymes are covalently modified by the drug." Robertson, J.G. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5561-5571.
9. Het is oneerlijk om de veiligheid van onomkeerbare covalente remmers strenger te beoordelen dan bij traditionele reverse remmers als dit uitsluitend gebaseerd op het principe '*als het voor altijd is, moet het veilig zijn*': onomkeerbare remmers werken niet voor eeuwig aangezien *de novo* eiwitsynthese uiteindelijk de enzymactiviteit zal herstellen.
De Vita, E., *Future Med. Chem.* **2021**, *13*, 193-210.
10. Het herkenningselement van een gericht covalente binder is de *koppelaar* die het elektrofiel (*begeerlijke vrijgezel*) en het enzym (*mogelijke partner*) bij elkaar brengt om de vorming van een niet-covalent complex (*relatie*) en uiteindelijk een covalent adduct (*huwelijk*) mogelijk te maken/te bevorderen.
11. Promoveren is een feestje, maar het is niet de bedoeling dat je *letterlijk* zelf de slingers ophangt.
12. Een proefschrift is er om geschreven te worden, niet om gelezen te worden.
Aangepast van: Miquel Bulnes in Lab (2005).

