

Kovalentní léčiva

Marta Kučerová

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie
a farmaceutické analýzy, Hradec Králové

Kovalentní léčiva jsou látky schopné tvořit reverzibilní nebo ireverzibilní kovalentní vazbu s makromolekulárním cílem v organismu. Navzdory riziku nežádoucích reakcí organismu se design takových látek stal trendem posledních dvou desetiletí. V článku jsou shrnuta léčiva působící kovalentním mechanismem z různých indikačních skupin a eventuálně doplněna odkazem na krystalografickou strukturu v databázi Protein Data Bank. Dále jsou diskutovány výhody i nevýhody použití kovalentních léčiv.

Klíčová slova: kovalentní vazba, cílené kovalentní inhibitory.

Covalent drugs

Covalent drugs are substances capable of forming a reversible or an irreversible covalent bond with a macromolecular target in the body. Despite the risk of adverse reactions in the organism, the design of such agents has become a trend over the last two decades. Drugs acting by covalent mechanisms from different indication groups are summarized in this article and possibly supported with a reference to the crystallographic structure in the Protein Data Bank. The advantages and the disadvantages of using covalent drugs are also discussed.

Key words: covalent bond, targeted covalent inhibitors.

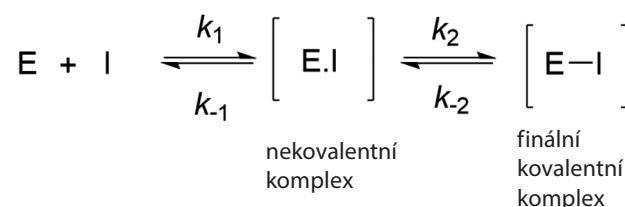
Úvod

Většina dosavadních snah o nalezení nových léčiv se zaměřovala na sloučeniny vytvářející nekovalentní, reverzibilní interakce s makromolekulárními cíli v organismu, většinou proteiny. Tento přístup nabízí několik výhod: bere v úvahu relativní rychlost disociace komplexu léčivo-protein a dále resyntézu proteinu. Tento klasický design léčiv je primárně založen na optimalizaci nekovalentních interakcí (1) za účelem zlepšení účinnosti a/nebo selektivity, aby se zabránilo jakékoli nespecifické aktivitě nebo vazbě mimo cíl (angl. off-target activity/binding). Přesto se odhaduje, že každé léčivo používané v klinické praxi interaguje s přibližně šesti cíli. Snaha vyhnout se vazbě mimo makromolekulární cíl omezuje ve vývoji perspektivní látky nesoucí reaktivní chemickou funkční skupinu z důvodu rizika imunologických nebo histologických faktorů. Během posledních dvou desetiletí ovšem došlo k renesanci a schválení mnoha kovalentních inhibitorů jako farmakoterapeutik. V současné době funguje asi 30 % všech používaných léčiv působících na enzymy prostřednictvím kovalentního mechanismu (2, 3).

Kovalentní léčiva jsou sloučeniny schopné vytvořit kovalentní vazbu s makromolekulárním cílem. Reakce probíhá z biochemic-

kého hlediska ve dvou krocích. Prvním je rychlé vytvoření nekovalentního komplexu (např. enzym-inhibitor) a druhým krokem je vznik kovalentní vazby mezi léčivem a makromolekulárním cílem (Obr. 1). V závislosti na typu kovalentní interakce se inhibice může pohybovat od reverzibilní ($k_2 > 0$) po zcela ireverzibilní ($k_2 = 0$), kdy obnovení aktivity cíle vyžaduje biosyntézu nové makromolekuly, např. enzymu (2, 4, 5, 6).

Obr. 1. Schéma kovalentní inhibice



E – enzym, I – inhibitor, k_1 – rychlostní konstanta vzniku nekovalentního komplexu enzym-inhibitor, k_{-1} – rychlostní konstanta zpětné nekovalentní interakce, k_2 – rychlostní konstanta vzniku kovalentní vazby mezi enzymem a inhibitorem, k_{-2} – rychlostní konstanta zpětné reakce vzniku kovalentní vazby

Design kovalentních léčiv

V minulosti byla do praxe zavedena některá kovalentní léčiva, aniž by byl znám mechanismus jejich účinku, a byl vysvětlen až s odstupem času, např. kyselina acetylsalicylová (1899), beta-laktamová antibiotika (penicilin 1944), omeprazol (1989) nebo klopidoogrel (1997) (4). Prvním pozorovaným případem kovalentních xenobiotik byly organofosfátové inhibitory acetylcholinesterázy (1943) (2). Důvodem pro obavy z použití kovalentních léčiv byly některé nežádoucí účinky jako idiosynkratické reakce a toxicita metabolitů, např. paracetamolu. Zhruba po roce 2000 došlo k renesanci kovalentních léčiv, resp. kovalentních inhibitorů a začaly být designovány látky se záměrem ovlivňovat cíleně jeden specifický biologický cíl (angl. targeted covalent inhibitors). Odhaduje se, že zhruba ke třetině enzymatických cílů se vyskytuje klinicky používané kovalentní léčivo (4).

Cílené kovalentní inhibitory mohou být definovány jako ligandy nesoucí funkční skupinu nízké reaktivity schopnou vázat se rychle na specifický nekatalytický zbytek vazebného místa makromolekulárního cíle (7). Podmínkou kovalentního mechanismu je přítomnost elektrofilní funkční skupiny v molekule léčiva anebo schopnost léčiva přejít biotransformací in vivo na chemicky reaktivní elektrofilní metabolit. Příklady kovalentních inhibitorů, které se podávají v neaktivní formě proléčiva a vyžadují metabolizaci na aktivní formu, jsou klopidoogrel, omeprazol, isoniazid, disulfiram, gemcitabin ad. (4, 8).

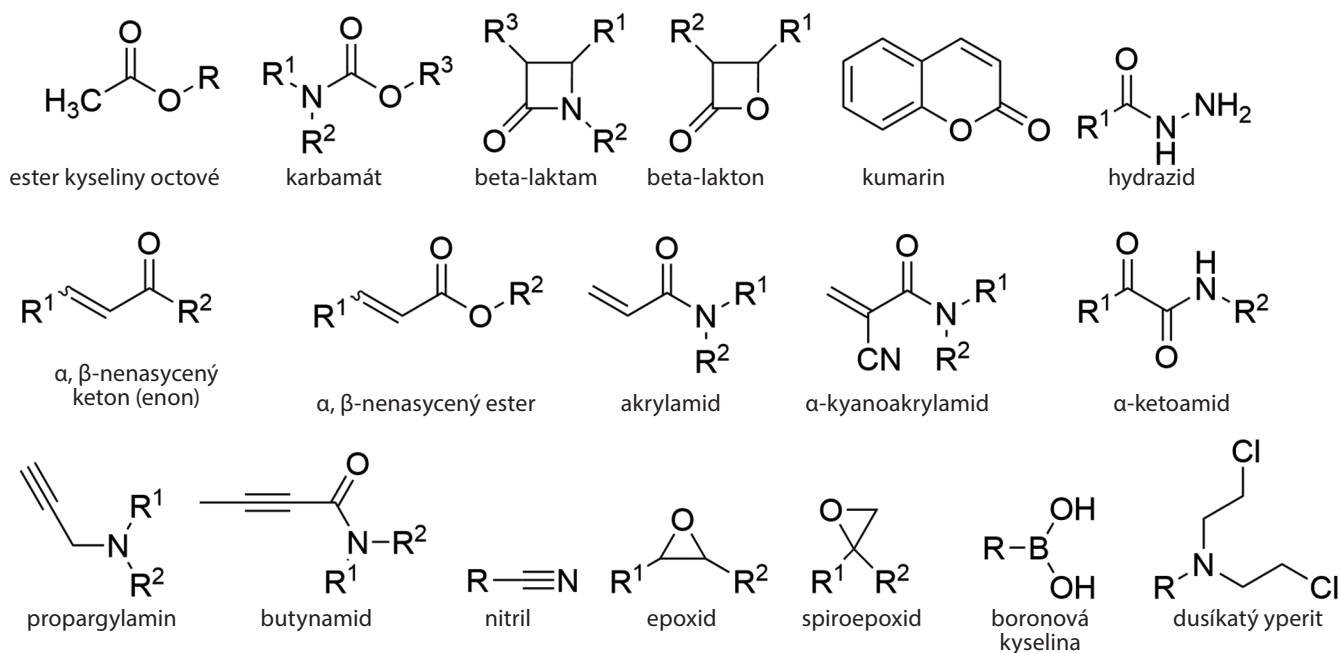
Navazováním reaktivních forem léčiv na bio-makromolekuly v organismu může ovšem hrozit poškození tkání nebo aktivace imunitního systému prostřednictvím hapténizace proteinů (4). Imunitní aktivace se může projevit jako anafylaxe, krevní dyskrázie, jaterní nebo kožní reakce (8). Vysoce reaktivní látky schopné kovalentního navazování by mohly způsobovat také mutagenézi nebo karcinogenézi (9). Je tedy potřeba rozlišovat a vybírat mezi vysocí reaktivními funkčními skupinami, tzv. toxikofory (např. chinony, acylhalogenidy), které se při

designu nevyužívají, a mezi mírně nebo slabě elektrofilními skupinami, které se naopak v designu uplatňují. Při racionálním návrhu chemické struktury kovalentních inhibitorů je vždy nutné optimalizovat jak afinitu nekovalentní vazby (k_i v Obr. 1), tak reaktivitu elektrofilní hlavičky (vyjádřena jako k_2 v Obr. 1). Navíc je potřeba mnohem více dbát na celkové stanovení selektivity vůči cíli, mimocílových aktivit, biologického poločasu, nežádoucí reaktivity např. vůči glutathionu nebo plazmatickým proteinům a celkově na dodržení kritérií kladených na potenciální léčiva (angl. drug-like properties). K těmto účelům se využívají metody s radioaktivně značenými ligandy a hmotnostní spektrometrie (Activity-Based Protein Profiling). Metody virtuálního screeningu, které využívají znalosti trojrozměrné struktury cílových i mimocílových proteinů, pomáhají s designem molekul a jejich strukturní optimalizací a umožňují tak snížit náklady na preklinické testování (4, 10, 11, 12).

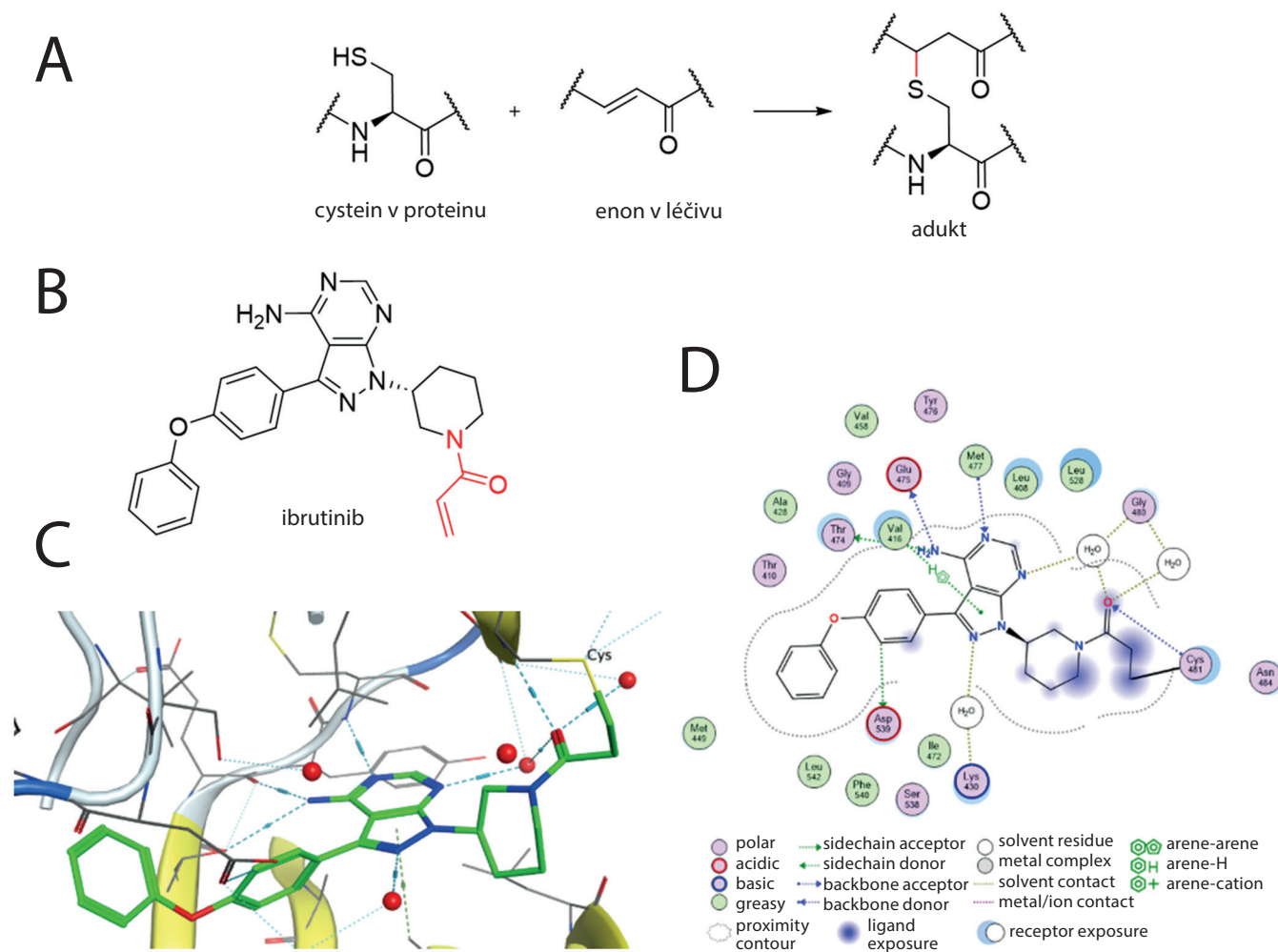
Typickými kovalentně se vážajícími funkčními skupinami jsou aktivované acyly v esterech, β -laktamech, karbamátech, dále α , β -nenasycené ketony (enony), α , β -nenasycené amidy (akrylamidy), α -ketoamidy, nitrily, boronové kyseliny, azidiny, epoxidy ad. (4, 5, 13). Na Obr. 2 jsou uvedeny příklady takových funkčních skupin, jejich reaktivita může být ovlivněna navázanými substituenty. Je snahou vyhnout se při designu léčiv vysocí reaktivním funkčním skupinám, které by se chovaly v organismu příliš promiskuitně (5, 8, 14).

Nejčastějším cílem kovalentních léčiv jsou proteiny nebo DNA. Mezi cílové proteiny patří především enzymy (např. proteázy a hydrolázy), příp. receptory. Kovalentní léčiva se vážou nejčastěji na sulfanylové skupiny cysteinu, jehož zastoupení v lidském genomu činí pouze 2,3 %, což může přispívat k selektivitě kovalentních léčiv (10). Dále mohou interagovat s aminokyselinami obsahujícími hydroxyskupiny (obvykle serin, příp. tyrosin, threonin), aminokyselinami nesoucími v postranním řetězci aminoskupiny (lysin), ale také s koenzymy enzymů (2, 15, 16).

Obr. 2. Elektrofilní funkční skupiny léčiv schopné kovalentní interakce s makromolekulárními cíli v organismu (kresleno v ChemDraw 22.2.0, R , R^1 , R^2 , R^3 = alkyl, aryl, příp. vodík/y)



Obr. 3. A – Michaelova adice sulfanylové skupiny cysteinu na léčivo obsahující enon; červeně je vyznačena nově vzniknuvší kovalentní vazba v aduktu; B – chemická struktura ibrutinibu, červeně je vyznačen reaktivní fragment akrylamidu; C – krystalografická struktura ibrutinibu (zeleně) navázaného kovalentně na cystein Brutonovy tyrosinkinázy (PDB ID:5P9J) v trojrozměrném zobrazení; D – krystalografická struktura ibrutinibu navázaného kovalentně na cystein Brutonovy tyrosinkinázy (PDB ID:5P9J) v dvojrozměrném zobrazení s legendou (A a B kresleno v ChemDraw 22.2.0, C a D zpracováno v programu MOE 2020.0901)



Přehled kovalentních léčiv

Kovalentní léčiva je možné rozdělit podle typu reakce, která probíhá s makromolekulárním cílem, na následující: acylující, alkylující, navazující se kovem (metalující) nebo polokovem, vytvářející disulfidové vazby nebo vazby přes selen, vytvářející hemiketal, reagující Michaelovou adicí a Pinnerovou reakcí (8).

Nejčastější reakcí cíleného kovalentního inhibitoru je Michaelova adice sulfanylové skupiny cysteinu na α , β -nenasycenou karbonylovou sloučeninu (Obr. 3A) (17), což je většinou ireverzibilní reakce, zatímco u nitrilů probíhá vazba většinou reverzibilně (12). Jako příklad kovalentního léčiva je uveden ibrutinib (Obr. 3B) navázaný na Brutonovu tyrosinkinázu (BTK 1) v trojrozměrném (Obr. 3C) i dvojrozměrném zobrazení (Obr. 3D).

Z celkového počtu kovalentních léčiv je 33 % užíváno jako antiinfektiva (především β -laktamová antibiotika), 20 % jako antineoplastika, 15 % jako léčiva užívaná v léčbě poruch gastrointestinálního traktu (GIT) a 15 % léčiv indikovaných v léčbě poruch centrálního nervového systému (CNS) a kardiovaskulárního systému (KVS) (4), i když statistiky se mohou v jiných zdrojích mírně lišit (15).

Souhrnné tabulky 1–3 s kovalentními léčivy byly vytvořeny na základě publikací (2, 4, 8, 9, 18) a byly doplněny rešerší záznamů databáze Protein Data Bank (PDB) (19) a informací SmPC (Summary of Product Characteristics) s ohledem na látky registrované v České republice (databáze AISLP). Databáze PDB shromažďuje experimentálně zjištěné trojrozměrné struktury makromolekul, včetně komplexů léčiv s jejich makromolekulárními cíli. Na webu PDB (www.rcsb.org) je u jednotlivých záznamů v záložce Structure implementován jednoduchý 3D prohlížeč makromolekulárních struktur s navázanými léčivy, takže pro jednoduché zobrazení struktury podle PDB ID není nutné disponovat softwarem pro práci s 3D modely makromolekul. Tabulky nemusí být zcela vyčerpávající. Není uvedena skupina reverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy odvozená od fysostigminu (distigmin, neostigmin, pyridostigmin, ambenonium) používaná k terapii myasthenia gravis a atonie GIT, protože nejsou uvedeny v PDB. U početných skupin léčiv byli vybráni reprezentativní zástupci, navíc v PDB stále přibývají nové struktury.

Je nutné zmínit, že kovalentním mechanismem mohou působit i některá cílená protinádorová léčiva používaná ve formě konjugátů s protilátkami. V ČR jsou nebo byly registrovány např. kalicheamycin

Tab. 1. Přehled kovalentních léčiv s antibakteriálním a antivirovým účinkem a inhibičním účinkem na β -laktamázy se zařazením do příslušné podskupiny a příslušné záznamy experimentálně ověřených struktur z PDB (19)

Skupina léčiv	Zástupci	PDB ID
beta-laktamová antibiotika – peniciliny	benzylpenicilin	6BSR, 1FQG
	ampicilin	3ITA
	amoxicilin	6KGV
	piperacilin	6H5O, 6Q9N
beta-laktamová antibiotika – cefalosporiny	cefuroxim	5ZQE, 3ZG9
	cefixim	6P55
	cefoperazon	5DF8
	ceftarolin	3ZFZ, 5TW8, 5TW4, 6MKI
beta-laktamová antibiotika – monobaktamy	aztreonam	6KGU, 3UE0, 3PBS, 5HLB
beta-laktamová antibiotika – karbapenemy	meropenem	6KGS
	ertapenem	6XV5
inhibitory beta-laktamázy	tazobaktam	1RCJ, 1VM1, 1TDG, 3ZNT, 3NIA (karbapenemáza) 6XFS, 4A5R, 2H10, 7QNK, 6H2I, 7QLP
	sulbaktam	8EBR, 8EC4, 8ECF
	vaborbaktam	6V7H, 6V7H
inhibitor UDP- <i>N</i> -acetylglukosamin-1-karboxyvinyltransferázy	fosfomicin	3LTH, 1UAE, 5U4H, 2RL2, 5WI5, 6NKJ, 3KR6, 3VCY, 4R7U,
antituberkulotika – inhibitor enoyl-acyl carrierproteinreduktázy	isoniazid	2IDZ
antituberkulotika – inhibitor alanin-racemázy	D-cykloserin	4LUT, 3E6E, 1XQK, 1XQL
antivirotika – inhibitory HCV proteázy NS3/4A	telaprevir	3SV6, 3SV7, 3SV8 v komplexu s proteázou SARS-CoV-2: 7C7P, 6ZRT, 6XQS, 7NBS, 7K6D, 7LB7
	boceprevir	3LOX, v komplexu s proteázou SARS-CoV-2: 6WNP, 7BRP, 7C6S, 6ZRU, 6XQU, 7COM, 7NBR, 7K40
	narlaprevir	3LON, v komplexu s proteázou SARS-CoV-2: 7D1O, 6XQT, 7JYC

(v konjugátu jako ozogamicin, tj. gemtuzumab ozogamicin a inotuzumab ozogamicin) a monomethylauristatin E (v konjugátu jako vedotin, tj. brentuximab vedotin, enfortumab vedotin a polatuzumab vedotin, nebo jako mafodotin, tj. belantamab mafodotin) (2).

Diskuze

Design a vývoj kovalentních léčiv se zaměřuje především na indikace ohrožující život a důkladně se zvažuje poměr výhod a nevýhod plynoucích z případných nežádoucích účinků (4). Mezi potenciálními výhodami kovalentních inhibitorů oproti konvenčním reverzibilním inhibitorům patří možnosti stabilního a efektivního farmakodynamického účinku při nižších terapeutických koncentracích a také snížení frekvence dávkování a z něj vyplývající vyšší compliance pacienta (2, 20). U ireverzibilně působících látek může dojít k oddělení farmakodynamiky od farmakokinetiky. Příkladem je omeprazol s biologickým poločasem 1–2 h a dávkováním 1× denně, protože poločas resyntézy protonové pumpy je 54 h a poločas obnovení sekrece žaludeční kyseliny je 28 h po podání omeprazolu (4). Další

Tab. 2. Přehled kovalentních léčiv s antineoplastickým účinkem se zařazením do příslušné podskupiny a příslušné záznamy experimentálně ověřených struktur z PDB (19)

Skupina léčiv	Zástupci	PDB ID
inhibitor aromatázy	exemestan	3S7S
inhibitory 5 α -reduktázy	finasterid	7BW1
	dutasterid	nenalezeno
inhibitor 17 α -hydroxylázy/17,20-lyázy (CYP17A1)	abirateron	3RUK
inhibitor thymidylátsynthetázy	floxuridin	4FOA, 6QXG, 3H9K, 6ZXO
inhibitory ribonukleotidreduktázy	gemcitabin	4ERP
	kladribin	nenalezeno
	klofarabin	nenalezeno
inhibitory syntézy purinových nukleotidů – antimetaboly	merkaptopurin	nenalezeno
	thioguanin	1N17, 1N14
	fludarabin	komplex s DNA primázou: 6R4U
	nelarabin	nenalezeno
	trifluridin	nenalezeno
	cytarabin	nenalezeno
	fluorouracil a jeho prekurzory tegafur, kapecitabin	1DNF, 1ICG, 1ID9, 1IDW, 1IHA
inhibitory methyltransferázy a zároveň inhibitory syntézy purinových nukleotidů – antimetaboly	azacitidin	nenalezeno
	decitabin	nenalezeno
selektivní inhibitor jaderného exportu (SINE), specificky blokuje transportér exportin 1 (XPO1)	selinexor	6XJS
antagonista α -adrenergických receptorů	fenoxybenzamin	nenalezeno
inhibitory kináz	afatinib	4G5J, 4G5P
	osimertinib	7JXM, 7JXW, 7JXP, 6Z4B, 7K1H, 7LGS
	dakomitinib	4I24
	neratinib	2JIV, 3W2Q
	mobocertinib	8F1X, 7T4I, 7T4J, 7LGS, 7A6K, 7B85
	rociletinib	5XDK, 5XDL
	olmutinib	nenalezeno
	futibatnib	6MZW
inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy	ibrutinib	5P9J
	zanubrutinib	6J6M
	akalabrutinib	8FD9
	tirabrutinib	8FF0
inhibitor K-Ras ^{G12C}	sotorasib	6USX, 6USZ, 6UT0
inhibitory proteazomu	bortezomib	3MG0
	ixazomib	5LF7
	karfilzomib	4R67
	oprozomib	5LEY, 5LEZ, 5M31
antimitotika	ixabepilon	7DAF

výhodou kovalentních inhibitorů může být kompetice o cíl s endogenním substrátem pomocí nerovnovážné vazebné kinetiky (např. kovalentní inhibitory kináz vs. ATP). Kovalentní inhibitory jsou v porovnání s nekovalentními inhibitory schopné zasahovat a vázat se i na mělká vazebná místa proteinů (např. vazba odanakatibu na katepsin K). Použití kovalentních inhibitorů může přinést rovněž snížení rizika lékových rezistencí (9). Obecně je možné konstatovat

Tab. 3. Přehled kovalentních léčiv působících na GIT, KVS, CNS a další skupiny léčiv se zařazením do příslušné podskupiny (ev. indikace) a přehled záznamů experimentálně ověřených komplexů z databáze PDB (19)

Léčiva ovlivňující GIT	antiulceróza – inhibitory protonové pumpy (H ⁺ /K ⁺ ATPasy)	(es)omeprazol	nenalezeno
		lansoprazol	nenalezeno
		pantoprazol	nenalezeno
		rabeprazol	nenalezeno
	antihyperlipidemika – inhibitor triacylglycerolipázy	orlistat	6KSM
Léčiva ovlivňující KVS	protidestičková léčiva – inhibitory purinerních P2Y12 receptorů	klopidogrel	nenalezeno
		prasugrel	nenalezeno
	antikoagulancia – inhibitor vitamin K-epoxidreduktázy	warfarin	6WV4
Léčiva ovlivňující CNS	Parkinsonova choroba – inhibitory monoaminooxidázy B	selegilin	nenalezeno
		rasagilin	2BK4
	Parkinsonova choroba – inhibitor DOPA-dekarboxylázy	karbidopa	1JS3
	Alzheimerova choroba – inhibitor acetylcholinesterázy	rivastigmin	1GQR
	antiepileptika – inhibitor GABA-transaminázy	vigabatrin	1OHW, 1OHY
	roztroušená skleróza – aktivátor nukleárního faktoru κB (NFκB)	dimethyl-fumarát	7X4W
Nesteroidní antiflogistika	inhibitor cyklooxygenázy (prostaglandin-endoperoxidsyntházy)	kyselina acetylsalicylová	3GCL
	inhibitor Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -kotransportéru	kyselina ethakrynová	nenalezeno
Odvykání alkoholismu	inhibitor aldehydreduktázy	disulfiram	nenalezeno
Hyperparathyreoidismus	inhibitor thyroxin-5'-dejodinázy	propylthiouracil	nenalezeno
	inhibitor jodid-peroxidázy	thiamazol	5FF1
Diabetes mellitus	inhibitory dipeptidylpeptidázy IV (DPP-IV)	vildagliptin	6B1E
		saxagliptin	3BJM
		alogliptin	3G0B
		linagliptin	6Y0F
Onychomykóza	inhibitor aminoacyl-tRNA syntetázy	tavaborol	nenalezeno
Osteoporóza	inhibitor katepsinu K	odanakatib	5TDI
Trypanosomiáza, alopecie	inhibitor ornithindekarboxylázy	eflornithin	2TOD
Alopecie	inhibitor Janus kinasy (JAK) 3 a rodiny tyrosinkináz (TEC)	ritlectinib	nenalezeno
Vitiligo	selektivní inhibitor Janus kinázy (JAK-1 a JAK-2)	ruxolitinib	6VGL, 6VNK, 6WTN
Dna	inhibitor xanthinoxidázy	alopurinol	3BDJ
Hereditární tyrosinémie typu 1	inhibitor 4-hydroxyfenylpyruvátdehydrogenázy	nitisinon	6J63
Hemolytická anémie způsobená srpkovitou anémií	inhibitor polymerizace hemoglobinu S	voxelotor	nenalezeno

vat, že s reverzibilními inhibitory je možné ovlivňovat i biologické cíle, které by byly nekovalentními léčivy obtížné zasažitelné (angl. undruggable targets) (3). Naopak vývoj kovalentních inhibitorů není vhodný v případech, kdy je potřeba krátkodobá nebo parciální inhibice, nebo kdy je příslušný cíl resyntetizován příliš rychle (doba kratší než jeden den) (9). Každopádně nejstarší kovalentní léčiva jako kyselina acetylsalicylová, (es)omeprazol, klopidogrel a β -laktamová antibiotika se staly blockbusterovými přípravky (7). Široké spektrum kovalentních léčiv zavedených do praxe a zároveň přísná hodnotící kritéria během jejich testování snížila obavy z jejich nežádoucích účinků způsobených promiskuitními interakcemi (6). Dalšími látkami v klinickém testování jsou např. rilzabrutinib, remibrutinib nebo spebrutinib (15).

V návrhu léčiv počítačovou chemií založeném na znalosti 3D struktury cílové makromolekuly (angl. structure-based drug design) existuje mnoho nástrojů k výpočetním predikcím kovalentního navazování (6). Vznikají také automatizované nástroje pro návrh potenciálních kovalentních léčiv, která musí být v případě pozitivních predikcí vždy následně synteticky připravena a komplexně otestována (21). V poslední době je možné zaznamenat snahy o vytvoření databází kovalentně se vázajících látek (ligandů) (13, 22, 23).

Závěr

Kovalentní léčiva se používají ve farmakoterapii velmi dlouhou dobu, nicméně design kovalentních látek se uplatňuje při racionálním návrhu molekul zhruba posledních 20 let. Díky důslednému testování sloučenin je možné vyvíjet bezpečné cílené kovalentní inhibitory. V současnosti jsou nejpočetnější skupinou kovalentních léčiv β -laktamová antibiotika a některá onkologika, především antimetabolity a inhibitory kináz. Do budoucna je možné očekávat nárůst kovalentních léčiv, neboť další látky jsou v různých stadiích preklinického a klinického testování.

Na základě znalostí detailního mechanismu působení léčiv a způsobu navazování léčiv na molekulární cíle v organismu lze vysvětlit také některé farmakokinetické a toxikologické vlastnosti léčivých látek. Tyto aspekty je nutné brát v úvahu při designu molekul léčiv farmaceutickými chemiky. V neposlední řadě přispívají znalosti přesného mechanismu účinku léčiv ke zvyšování kvality konzultační činnosti farmaceutů až už v roli lékárníka směrem k pacientům, anebo v roli klinického farmaceuta směrem k ošetřujícím lékařům a dalším zdravotnickým pracovníkům. Poskytování podrobných odborných informací o léčivech zvyšuje úroveň farmaceutické péče v rámci celého systému zdravotnictví.

LITERATURA

1. Kučerová M. Binding forces: types of drug interactions with molecular targets in organism. *Klin Farmakol Farm.* 2024;38(3):118-122. doi:10.36290/far.2024.019.
2. Vasudevan A, Argiriadi MA, Baranczak A, et al. Chapter One - Covalent binders in drug discovery. In: Witty DR, Cox B, editors. *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier; 2019:1-62.
3. Li QK, Chen Q, Klauser PC, et al. Developing covalent protein drugs via proximity-enabled reactive therapeutics. *Cell.* Jul 2020;182(1):85-97. doi:10.1016/j.cell.2020.05.028.
4. Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov.* Apr 2011;10(4):307-317. doi:10.1038/nrd3410.
5. Chatterjee P, Botello-Smith WM, Zhang H, et al. Can relative binding free energy predict selectivity of reversible covalent inhibitors? *J Am Chem Soc.* 2017;139(49):17945-17952. doi:10.1021/jacs.7b08938.
6. Scarpino A, Ferenczy GG, Keseru GM. Covalent docking in drug discovery: scope and limitations. *Curr Pharm Design.* 2020;26(44):5684-5699. doi:10.2174/1381612824999201105164942.
7. Gehring M. Covalent inhibitors: back on track? *Future Med Chem.* 2020;12(15):1363-1368. doi:10.4155/fmc-2020-0118.
8. Potashman MH, Duggan ME. Covalent modifiers: an orthogonal approach to drug design. *J Med Chem.* 2009;52(5):1231-1246. doi:10.1021/jm8008597.
9. Bauer RA. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today.* 2015;20(9):1061-1073. doi:10.1016/j.drudis.2015.05.005.
10. Abrányi-Balogh P, Petri L, Imre T, et al. A road map for prioritizing warheads for cysteine targeting covalent inhibitors. *Eur J Med Chem.* Dec 2018;160:94-107. doi:10.1016/j.ejmech.2018.10.010.
11. Dalton SE, Campos S. Covalent small molecules as enabling platforms for drug discovery. *ChemBioChem.* 2020;21(8):1080-1100. doi:10.1002/cbic.201900674.
12. Boike L, Henning NJ, Nomura DK. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(12):881-898. doi:10.1038/s41573-022-00542-z.
13. Du JW, Yan X, Liu ZH, et al. cBinderDB: a covalent binding agent database. *Bioinformatics.* 2017;33(8):1258-1260. doi:10.1093/bioinformatics/btw801.
14. LoPachin RM, Gavin T, DeCaprio A, Barber DS. Application of the hard and soft, acids and bases (HSAB) theory to toxicant-target interactions. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(2):239-251. doi:10.1021/tx2003257.
15. Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Med Chem.* 2020;11(8):876-884. doi:10.1039/d0md00154f.
16. Abrányi-Balogh P, Keseru GM. Warheads for designing covalent inhibitors and chemical probes. *Advances in Chemical Proteomics.* 2021:47-73.
17. Gehring M, Laufer SA. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology. *J Med Chem.* 2019;62(12):5673-5724. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01153.
18. Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry.* 2005;44(15):5561-5571. doi:10.1021/bi050247e.
19. Burley SK, Bhikadiya C, Bi CX, et al. RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D488-D508. doi:10.1093/nar/gkac1077.
20. Baillie TA. Approaches to mitigate the risk of serious adverse reactions in covalent drug design. *Expert Opin Drug Discov.* 2021;16(3):275-287. doi:10.1080/17460441.2021.1832079.
21. Zhou Y, Yu H, Vind AC, et al. Rational design of covalent kinase inhibitors by an integrated computational workflow (Kin-Cov). *J Med Chem.* 2023;66(11):7405-7420. doi:10.1021/acs.jmedchem.3c00088.
22. Guo XK, Zhang YK. CovBinderInPDB: a structure-based covalent binder database. *J Chem Inf Model.* 2022;62(23):6057-6068. doi:10.1021/acs.jcim.2c01216.
23. Gao MJ, Moumbock AFA, Qaseem A, Xu QQ, Günther S. CovPDB: a high-resolution coverage of the covalent protein-ligand interactome. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D445-D450. doi:10.1093/nar/gkab868.