

# **Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet ja niiden kaupallisuus**

Niklas Vello

Pääaine (Kemia)  
LuK-tutkielma  
Laajuus: 6 op

22.08.2024  
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kemian laitos

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Niklas Vello

**Otsikko:** Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet ja niiden kaupallisuus

**Ohjaaja:** Kari Kopra

**Sivumäärä:** 20 sivua

**Päivämäärä:** 22.08.2024

## 1. Tiivistelmä sivu

Kovalenttiset inhibiittorit ovat erityisryhmä lääkkeitä, jotka sisältävät reaktiivisen ryhmän, ja jotka muodostavat kovalenttisen sidoksen kohdeproteiinin kanssa. Kovalenttisesti sitoutuvia lääkeaineita pidetään käsitteellisesti erillisinä tavanomaisista, ei-kovalenttisesti sitoutuvista lääkeaineista, eriävän toimintaperiaatteensa vuoksi. Kovalenttinen sidos pidentää lääkkeen ja sen kohteen vuorovaikutuksen kestoa, jonka ansiosta lääkeannostukset ovat pienempiä ja vaikutusaika on pidempi.

Reaktiivisten funktionaalisten ryhmien määrätietoinen lisääminen jo olemassa oleviin lääkeaihiöihin mahdollistaa tehokkaan ja selektiivisen lääkkeen kohdennuksen haluttuun proteiiniin. Toiminnan vaatimuksena on, että inhibiittorin sitoutumisalueella on kohdeproteiinissa kohdentamiseen soveltuva aminohappo, kuten kysteini. Kovalenttisia lääkkeitä on markkinoilla mm. syöpien, maha-suoli-, keskushermosto-, sydän- ja verisuonisairauksien, sekä infektioiden hoitoon.

Kovalenttisiä lääkkeitä on käytetty sairauksien hoitoon jo yli vuosisadan ajan, mutta edellisen 15 vuoden aikana tutkimukset ovat laajentuneet huomattavasti. Alkuvaiheessa kovalenttista mekanismia ei tunnettu, ja vasta jälkikäteen huomattiin, että mekanismia on käytetty jo aspiriinin kohdalla, ennen 1900-lukua. Noin 30% markkinoilla olevista lääkkeistä on kovalenttisesti sitoutuvia. Viimeisen 10 vuoden aikana markkinoille on hyväksytty 14 uutta kovalenttista lääkettä. Viimeisimpinä vuonna 2021 ja 2022 markkinoille hyväksytyt sotorasibi ja adagrasibi, jotka ovat KRAS G12C mutaatioita omaaville kasvaimille ensimmäiset hyväksytyt lääkeaineet. Myös Pfizerin kehittämä viruslääke Paxlovid, hyväksyttiin vuonna 2021 COVID-19 viruksen hoitoon. Lukuisat kovalenttiset lääkkeet ovat WHO:n keskeisimpien lääkeaineiden listalla, ja esimerkiksi klopidoogreeli oli Yhdysvalloissa 29. kirjoitetuin reseptilääke vuonna 2020.

## 2. Avainsanat

Syöpä, pistemutaatio, markkinat, inhibiittori, kovalenttinen sitoutuminen

## 3. Sisällysluettelo

1. Tiivistelmäsiivu.....	2
2. Avainsanat.....	3
3. Sisällysluettelo .....	3
4. Lyhenneluettelo.....	3
5. Johdanto .....	4
6. Kirjallisuuskatsaus .....	4
6.1 Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet.....	4
6.1.1 Kovalenttisten inhibiittoreiden kehityksen historia .....	6
6.1.2 Penisilliinin toimintamekanismi .....	10
6.1.3 Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS).....	12
6.1.4 Brutonin tyrosiinikinaasi.....	13
6.2 Kovalenttisten lääkkeiden markkinointi ja kaupallisuus .....	14
6.2.1 Edut, turvallisuus ja ongelmat.....	14
6.2.2 Maine ja tulevaisuus.....	16
7 Yhteenveto .....	17
8. Lähdeluettelo.....	18

## 4. Lyhenneluettelo

FDA (engl. FDA) – Food and Drug Administration, eli Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto.

EMA (engl. EMA) – European Medicines Agency, eli Euroopan Lääkevirasto

PBP (engl. PBP) – Penicillin-binding proteins, eli penisilliiniä sitovat proteiinit

PPI (engl. PPI) – Proton pump inhibitors, eli protonipumpun estäjät

EGFR - Epidermaalinen kasvutekijäreseptori

BTK - Brutonin tyrosiinikinaasi

KRAS – Kirsten rat sarcoma virus

WHO – World Health Organization, maailman terveysjärjestö

MRSA – Methicillinresistant staphylococcus aureus, eli metisilliinille resistentti staphylococcus aureus – sairaalabakteeri

EGFR - epidermaalinen kasvutekijäreseptori

## 5. Johdanto

Tässä tutkielmassa käsitellään kovalenttisesti sitoutuvia lääkeaineita, niiden ominaisuuksia, haittoja, mahdollisuuksia, sekä markkinaosuutta.

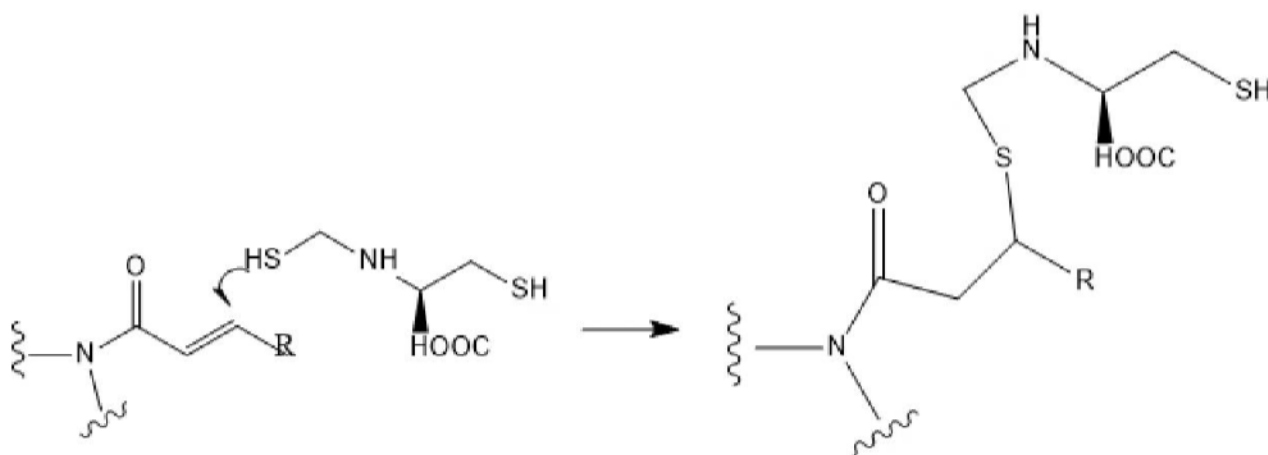
Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet sisältävät reaktiivisen funktionaalisen ryhmän, joka muodostaa kovalenttisen sidoksen proteiinikohteiden kanssa. Tämä antaa lisäaffiniteettia lääkkeen sitoutumiseen liittyvien, ei-kovalenttisten vuorovaikutusten lisäksi. Huoli liiasta reaktiivisuudesta mahdollisesta selektiivisyyden puutteesta ovat aikaisemmin pysäyttäneet lisätutkimuksia. Monet varhaiset kovalenttiset lääkkeet löydettiin biologisella seulonnalla, ja kovalenttiset molekyylimekanismit ovat selvinneet vasta myöhemmin.[2] Kovalenttisiä lääkkeitä on käytetty sairauksien hoitoon jo yli vuosisadan ajan, mutta viime aikoina on ilmaantunut biokemiallisia työkaluja ja menetelmiä, jotka helpottavat kovalenttisten lääkkeiden järkevää ja rationaalista suunnittelua. Reaktiivisten funktionaalisten ryhmien määrätietoinen lisääminen olemassa oleviin lääkeaihioihin voi mahdollistaa tehokkaan ja selektiivisen kohdeproteiinien eston, kuten erilaisten syöpien hoitoon käytetyt kovalenttiset epidermaalisen kasvutekijäreseptorin ja Brutonin tyrosiinikinaasin estäjät osoittavat. [2]

Lisäksi kovalenttisten lääkeaihioiden tunnistaminen niin sanotun elektrofiilit ensin - lähestymistapojen avulla on johtanut myös kovalenttisten lääkkeiden, kuten KRASG12C- ja SARS-CoV-2-pääproteaasin kovalenttisten estäjien löytämiseen. Erityisesti KRASG12C-estäjien löytö todistaa kovalenttisten seulontatekniikoiden hyödyllisyyden, joista on tullut tehokkaampia ja yleisempiä viimeisen vuosikymmenen aikana. Kemoproteomiikka-alustoja on ilmaantunut täydentämään kovalenttista lääkeaihioseulontaa ja auttamaan lääkeaihioiden löytämisessä, selektiivisyyden profiloinnissa ja kohteen tunnistamisessa. [2]

## 6. Kirjallisuuskatsaus

### 6.1 Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet

Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet sisältävät reaktiivisen funktionaalisen ryhmän, joka muodostaa kovalenttisen sidoksen proteiinikohteiden kanssa, antaakseen lisäaffiniteettia lääkkeen sitoutumiseen liittyvien ei-kovalenttisten vuorovaikutusten lisäksi. Viimeisen 30 vuoden aikana kovalenttisten lääkkeiden rationaalinen suunnittelu on herättänyt lisää kiinnostusta, ja ei-konservoituneiden aminohappojen kovalenttisesta kohdentamisesta on tullut yleistä. Tänä päivänä kysteini on yksi käytetyimmistä aminohapoista kovalenttisesti sitoutuvien lääkeaineiden kanssa, ja kysteiniin kanssa reagoivia taistelukärkiä on kehitetty useita. [2]



Kuva 1. Michael-addition mekanismi, akryyliamidin taistelukärkeä kysteiniin. Mukailtu artikkelista [25]

Kysteini on lähtökohtaisesti käytetyin aminohappo, johtuen sen korkeasta reaktiivisuudesta ja vähäisestä määrästä proteasomissa. Äskettäin raportoitu analyysi viittaa, että 36 % kovalenttisista funktionaalisista ryhmistä on suunniteltu kohdistumaan kysteiniin, kun taas paljon vähemmän niitä käytetään lysiniä (17 %), seriiniä (15 %), tyrosiinia (8 %), treoniinia (6 %), histidiini (5%), aspartaattia (4%), glutamaattia (4%), tryptofaania (2%), metioniinia (1%), arginiinia (1%) ja proliinia (1%) vastaan. [27]

Kovalenttisesta sitoutumisesta johtuva affiniteetin kasvu ja vaikutusajan (engl. residence time) piteneminen ovat inspiroineet lääkekemistejä tutkimaan kovalenttisiä lääkeaineita huolimatta mahdollisesta kohteen ulkopuolisesta reaktiivisuudesta. Monissa tapauksissa kompromissit reaktiivisuuden, selektiivisyyden ja tehon välillä ovat tuottaneet turvallisia ja tehokkaita lääkeaineita. Näistä hyviä esimerkkejä ovat Brutonin tyrosiinikinaasin (BTK) estäjä ibrutinibi ja epidermaalisen kasvutekijäreseptorin estäjä osimertinibi. BTK:ta käydään tarkemmin läpi kappaleessa 6.1.4. Lisäksi kovalenttisilla modifikaatiolla tapahtuva voimakas esto on mahdollistanut perinteisesti riippumattomien proteiinien kohdistamisen, josta esimerkkinä on sotorasibin hyväksyntä, joka on mutantti-KRAS G12C -GTPaasin estäjä. Kovalenttiin keskittyminen heti alusta alkaen sen sijaan, että kovalenttinen vaikutusmekanismi löydetäisiin vasta jälkikäteen, tarjoaa mahdollisuuksia parantaa lääkesuunnittelua. [2]

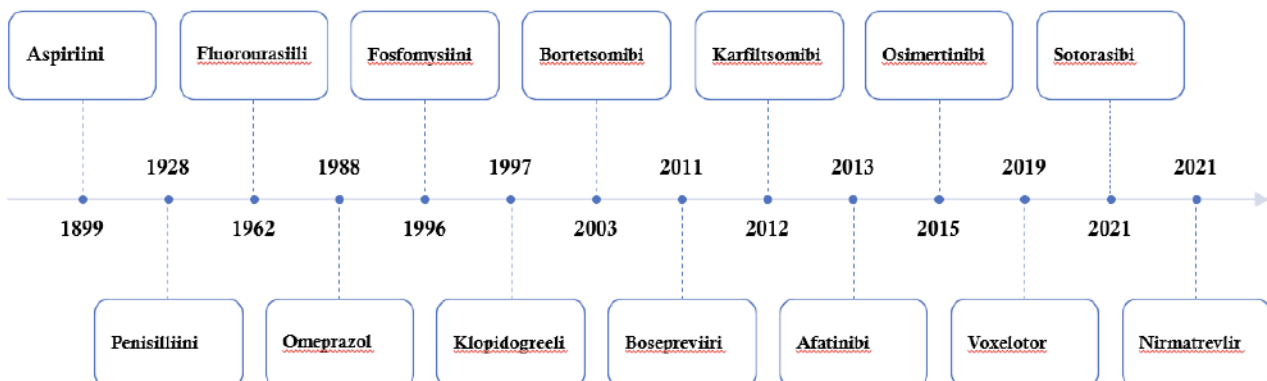
### 6.1.1 Kovalenttisten inhibiittoreiden kehityksen historia

Yhdisteitä, jotka sisältävät reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä, on pitkään vältetty lääkekemiassa. Ne on jätetty pois yhdisteiden seulontakokeista, koska ne voivat häiritä määrittystä. Monissa tapauksissa historiallisten esimerkkien varjolla kovalenttiset mekanismit havaittiin vasta sen jälkeen, kun näiden käyttö oli jo laajalti levinnyt.

Yksi näkyvimmistä ja tunnetuimmista esimerkeistä on ei-steroidinen tulehduskipulääke, aspiriini, jota on markkinoitu vuodesta 1899. Aspiriinin vaikutusmekanismia ei tiedetty vuoteen 1971 asti, jolloin onnistuttiin todistamaan, että aspiriini estää tiettyjen eikosanoidien tuotannon. Tämä tapahtuu, kun aspiriini modifioi kovalenttisesti entsyymiä siirtämällä sen asetyyliryhmän, ja täten estää syklo-oksigenaasi-entsyymin toiminnan.[2]

Varhaiset kovalenttiset inhibiittorit ovat yleensä peräisin luonnollisista lähteistä, tai vähintään niiden inspiroimia.  $\beta$ -laktaamiantibiootit, kuten penicillium-sienten tuottamat penisilliinit, sitoutuvat penisilliiniä sitoviin proteiineihin, jotka taas osallistuvat bakteerin soluseinän synteesiin. Penisilliini-B-laktaami sitoutuu kovalenttisesti penisilliiniä sitovan proteiinin aktiivisen kohdan seriiniin, muodostaen inaktiivisia penisilloyylientsyymejä. [2]

Taulukossa 1 kerrotaan tärkeimmistä kovalenttisesti sitoutuvista lääkeaineista tarkemmin. Aikajanasta näemme, että 2000-luvulla kiinnostus kovalenttisiä lääkkeitä kohtaan on ollut selvästi nousussa, ja tämän myötä uusia lääkeaineita saadaan markkinoille yhä useammin. Kovalenttisten lääkeaineiden tärkeimmät virustanpölväät on saavutettu viimeisen vuosikymmenen aikana, johtuen siitä, että tutkimuksia tehdään yhä enemmän, ja onnistumisten myötä rahoitusta uusille kovalenttisille inhibiittoreille on saatavilla.

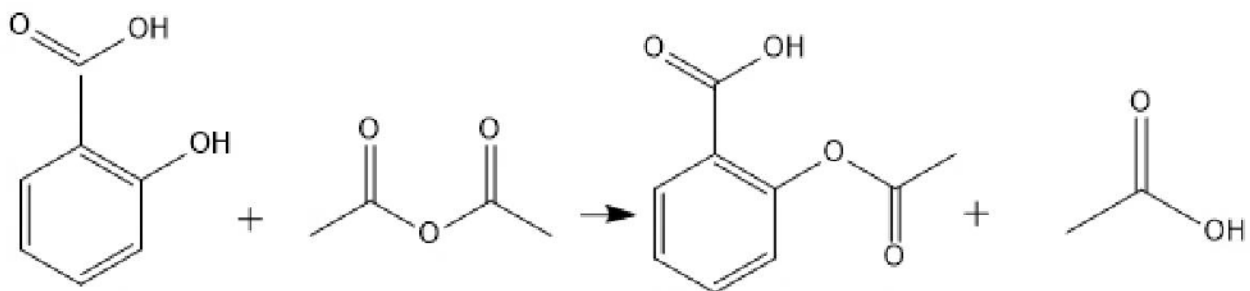


Taulukko 1. Aikajana tärkeimpien kovalenttisten lääkkeiden hyväksymisestä markkinoille. [2]

*Salisyylihappoa* valmistettiin synteettisesti jo 1800-luvun puolivälissä. Lääkkeenä sitä ei kuitenkaan käytetty, sillä salisyylihapon haittavaikutuksia oli runsaasti. Tästä hieman siedettävämpää versiota sai aikaiseksi Charles von Gerhard, joka sai vuonna 1853 valmistettua salisyylihaposta asetyloidun muodon, eli asetyylisalisyylihapon. Tätä ei kuitenkaan lähdetty markkinoimaan vielä tällöin.

Vuosisadan lopulla Felix Hoffman ja Arthur Eichengrun panostivat asetyylisalisyylihapon kehittämiseen, ja saivat teollisen synteesisimenetelmän valmiiksi 1897. Vuonna 1899 se patentoitiin kauppanimellä *Aspirin*, ja tuote saatiin markkinoille. Aspiriini oli tuohon aikaan ensimmäisiä, teollisesti valmistettuja, tulehduskipulääkkeitä.

Aspiriinin ensisijaisia kohteita ovat syklo-oksigenaasi-, laktoperoksidaasi- ja kitotriosidaasiperheet. Yleisin mekanismi kohdistuu syklo-oksigenaasiin, jolloin aspiriinin asetyyliryhmä sitoutuu entsyymiin seriinijäämökseen, joka estää prostaglandiinien tuotannon. Prostaglandiinit ovat rasvahappoja, ja estämällä niiden synteesiä voidaan vaikuttaa tulehdusreaktioihin. [3]



Kuva 2. Salisyylihappo asetyloidaan muodostamaan aspiriinia

*Fluorourasiili* on solunsalpaajalääke, ja se saatiin lääketieteelliseen käyttöön vuonna 1962. Kyseinen lääke patentoitiin jo vuonna 1956, ja se on listattuna WHO:n Tärkeimpien lääkeaineiden -listalla. Kyseessä on siis edelleen maailmanlaajuisesti käytetty syöpälääke, jolla on tärkeä rooli erityisesti paksusuolensyövän hoidossa. Fluorourasiili on heterosyklinen aromaattinen ja orgaaninen yhdiste, jonka rakenne vastaa DNA:n ja RNA:n pyrimidiinimolekyylejä. Rakenteensa ansiosta lääkeaine häiritsee nukleosidiaineenvaihduntaa, johtaen sytotoksisuuteen ja solukuolemaan. [5]

*Omepratsoli* hyväksyttiin närästyslääkeaineena lääketieteelliseen käyttöön vuonna 1988. Omepratsolia käytetään refluksitaudin, peptisen haavataudin ja Zollinger-Ellinson oireyhtymän hoitoon. Näiden lisäksi omepratsolia voidaan käyttää maha-suolikanavan verenvuotoa estävänä

lääkeaineena. Kyseessä on protonipumpun estäjä, joka sisältää sylfoonirikkiä pyramidirakenteessa, ja voi siksi esiintyä joko S- tai R-enantiomeereinä. Happamissa olosuhteissa molemmat enantiomeerit muuttuvat akiraalisiksi tuotteiksi, jotka reagoivat ATPaasin kysteeiniryhmässä, täten estäen parietaalisolujen kykyä tuottaa mahahappoa normaalisti. [6]

*Fosfomysiini* on orgaaninen yhdiste, jolla on antibioottisia ominaisuuksia. Sitä käytetään virtsatieinfektioiden hoitamiseen.

Varsinainen tuote saatiin valmiiksi Espanjassa jo 1960-luvun loppupuolella, mutta suun kautta otettava lääkemuoto, joka paransi lääkkeen luotettavuutta, sekä markkina-arvoa, hyväksyttiin Yhdysvalloissa 1996 tuotenimellä Monurol. Fosfomysiini sitoutuu kovalenttisesti kysteiinin tioliryhmään ja inaktivoi sen. [7], [8]

*Klopidogreeliä* käytetään sydän- ja verisuonisairauksien hoidossa. Se on hyytymistä estävä lääkeaine, joka patentoitiin vuonna 1982, ja hyväksyttiin lääketieteelliseen käyttöön Yhdysvalloissa vuonna 1997. Klopidogreeli vähentää sydäninfarktin ja aivohalvauksen riskiä potilailla, joilla tiedetään olevan ateroskleroosi, eli valtimotauti. Vuonna 2020 klopidogreeli oli 29. kirjoitetuin reseptilääke Yhdysvalloissa (yli 19 miljoonaa kirjoitettua reseptiä). Klopidogreeli estää selektiivisesti adensiinidifosfaatin sitoutumista verihiiutaleiden tiettyyn reseptoriin P2Y<sub>12</sub>, ja siitä seuraavaa adensiinidifosfaattivälitteistä glykoproteiinikompleksin aktivaatiota, estäen verihiiutaleiden aggregaatiota. [9]

*Bortetsomibi*, tuotenimeltään Velcade, on orgaaninen yhdiste, jota käytetään multippeli myelooman ja manttelisolulyymfooman hoidoissa. Bortetsomibia testattiin pienelle ihmisryhmälle, joilla oli multippeli myelooma, kliinisissä tutkimuksissa 1990-luvulla. Vuonna 1999 se vietiin pidemmälle kliinisissä testeissä, ja lopulta vuonna 2003 se hyväksyttiin käytettäväksi lääkeaineeksi multippelin myelooman hoidossa. Tämä oli merkittävä virstanpylvät ensimmäisenä proteasomi-inhibiittorina, joka on otettu käyttöön pahanlaatuisten sairauksien hoidossa. Kenties tärkein bortetsomibin syöväntvastaiseen aktiivisuuteen liittyvistä tekijöistä on Noxa; proapoptooppinen proteiini, joka on vuorovaikutuksessa antiapoptooppisten proteiinien kanssa ja johtaa solukuolemaan. [10]

*Bosepreviiri* on suoravaikutteinen hepatiitti C-viruksen proteaasi-inhibiittori, jota käytettiin yhdessä peginterferonin ja ribaviriinin kanssa, kroonisen hepatiitti C:n genotyypin 1 hoidossa. Se hyväksyttiin lääkekäyttöön alun perin vuonna 2012, mutta se poistettiin 2015 tehokkaampien ja paremmin



siedettävien hoito-ohjelmien tieltä. Tuona aikana Bosepreviiri oli paljon käytetty hepatiittilääke, aiheuttaen kuitenkin erilaisia haittavaikutuksia, kuten anemiaa ja rintakipuja. [11]

*Karfilsomibi* on proteasomin estäjä ja antineoplastinen aine, jota käytetään multippelin myelooman hoidossa. Karfilsomibiin liittyy alhainen seerumin entsyymiarvojen nousu hoidon aikana, ja se on osallisena kliinisesti ilmeisissä akuuteissa maksavaurioissa, joista osa on johtanut jopa kuolemaan. Karfilsomibi on epoksomisiini johdannainen, jolla on potentiaalista antineoplastista vaikutusta. FDA hyväksyi vuonna 2012 karfilsomibin käytettäväksi multippelia myeloomaa sairastavilla ihmisillä, jotka ovat saaneet vähintään kaksi aiempaa hoitoa, ja jotka ovat osoittaneet taudin etenemistä viimeistään 60 päivän kuluessa viimeisen hoidon päättymisestä. 28päivän lääkehoitojakso maksaa noin 10000 dollaria, ja hoitojaksojen määrä/pituus on yksilöllistä. [12]

*Afatinibi* on tyrosiinikinaasireseptorin estäjä, jota käytetään metastoittaisen, ei-pienisoluisen keuhkosyövän valikoitujen muotojen hoidossa. Afatinibiin liittyy ohimenevää aminotransferaasipitoisuuden nousua hoidon aikana, ja sen on raportoitu aiheuttavan joissain tapauksissa kliinisesti ilmeistä akuuttia maksavauriota ja harvinaisissa tapauksissa joka kuoleman. FDA hyväksyi afatinibin käytettäväksi syöpälääkkeeksi vuonna 2013, ja se kuuluu WHO:n keskeisempien lääkkeiden listalle. [13]

*Osimertinibi*, tuotenimeltään Tagrisso, on pienimolekyylinen tyrosiinikinaasireseptorin estäjä ja antineoplastinen aine, jota käytetään pitkälle edenneen ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoidossa. Se on EGFR:n tyrosiinikinaasin estäjä, joka sitoutuu EGFR:n mutanttisiin muotoihin. Osimertinibiin on yhdistetty seerumin aminotransferaasiarvojen nousu hoidon aikana, ja harvoin myös kliinisesti ilmeinen akuutti maksavaurio. Osimertinibi hyväksyttiin lääketieteelliseen käyttöön Yhdysvalloissa vuonna 2015 ja Euroopan Unionissa 2016. [15]

*Voxelotor* on ainoa sirppisolusairauteen ja vielä tarkemmin taudin taustalla olevaan patologiaan auttava lääkeaine. Vuoden 2019 marraskuussa Voxelotor sai nopeutetun hyväksynnän Yhdysvalloissa sirppisolusairauden hoitoon yli 12-vuotiailla. Lääkeaine muodostaa kovalenttisen sidoksen seriiniin ja parantaa hapen sitoutumista punasoluun. EMA hyväksyi Voxelotorin käytön sirppisoluanemiaan liittyvän hemolyyttisen anemian hoidossa helmikuussa 2022.

Sirppisolusairaus on huomattavasti eliniänodotetta lyhentävä (noin 30 vuotta). Se on hyvin haastava verisairaus, ja pelkästään Yhdysvalloissa sitä sairastaa noin 100 000 ihmistä, maailmanlaajuisesti

noin 20 miljoonaa. Se voi johtaa tuskalliseen kipuun, aivohalvaukseen, infekioon ja moniin muihin, verisuonten tukkeutumisesta johtuviin komplikaatioihin. [16]

*Nirmatrelvir* on Pfizerin kehittämä viruslääke, tuotenimeltään Paxlovid, jota käytetään COVID-19:n hoitoon. Lääkeaineessa on peptidomimeettinen molekyyli, joka muodostaa kovalenttisen sidoksen kysteiniiniin. Pfizer allekirjoitti lisenssisopimuksen Yhdistyneiden Kansakuntien tukeman lääkepatenttipoolin kanssa marraskuussa 2021, jotta Nirmatrelviria voidaan valmistaa ja myydä 95 eri maassa. [17]

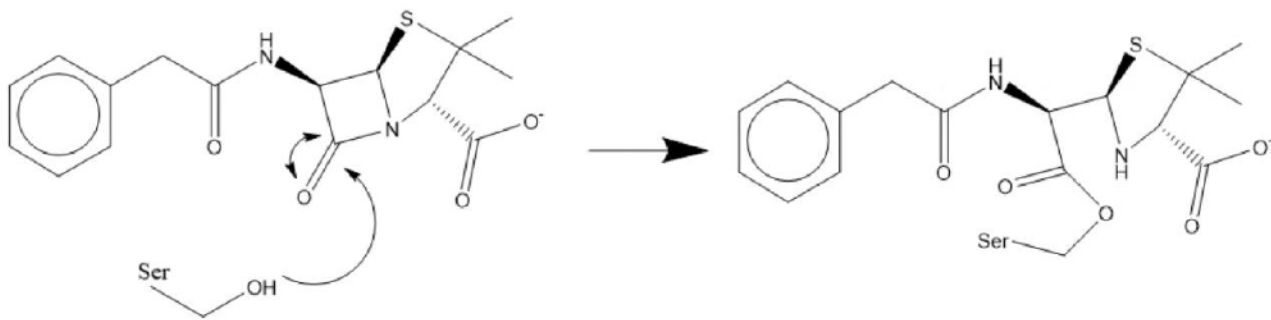
Viime vuosina on myös havaittu, että kovalenttisten ja ei-kovalenttisten lääkkeiden vaikutustapojen erilliset vahvuudet voidaan yhdistää. Tämä toteutetaan suunnittelemalla yhdisteitä, joissa yhdistyvät huolellisesti viritetty reaktiivisuus spesifiseen komplementaarisuuteen kohteen kanssa. [1]

### 6.1.2 Penisilliinin toimintamekanismi

*Penisilliini* löydettiin alun perin *Penicillium chrysogenum* -homesienestä eristämällä. 1896 huomattiin aineen antibioottinen vaikutus, tämän löydöksen teki ranskalainen lääketieteen opiskelija Ernest Duchesne. Tällöin penisilliiniä ei kuitenkaan luokiteltu vielä lääkkeeksi, vaan siihen tiensä löysi Alexander Fleming, vuonna 1928. Penisilliini on yksi tunnetuimmista lääkeaineista. [4]

Beetalaktaamiantibiootit eli penisilliini ja kefalosporiinit, ovat hyvin tutkittu terapeuttisten aineiden luokka, jotka estävät soluseinän synteesin. Penisilliinit, kuten muutkin beetalaktaamiperheen antibiootit, sisältävät tyypillisen nelijäsenisen beetalaktaamirenkaan (kuva 3.). Penisilliini tappaa bakteereita sitoutumalla beetalaktaamirenkaan ohi DD-transpeptidaasiin, inhiboimalla sen silloitusaktiivisuutta ja estämällä uuden soluseinän muodostumisen. Ilman soluseinää bakterisolun on herkkä ulkopuoliselle vedelle ja molekyyliä paineille, mikä aiheuttaa solun nopean kuoleman. Ihmissolut eivät sisällä soluseinää, jolloin penisilliinihoito johtaa bakterisolukuolemaan vaikuttamatta ihmissoluihin. [19]

Gram-positiivisilla bakteereilla on paksut soluseinät, jotka sisältävät peptidoglykaania suurissa määrin. Gram-negatiivisille bakteereille on taas ominaista ohuimmat soluseinät ja alhaiset peptidoglykaanitasot. Gram-negatiivisten bakteereiden soluseinämiä ympäröi lipopolysakkaridikerros (LPS), joka estää antibiootin pääsyn soluun. Tämän vuoksi penisilliini on tehokkain Gram-positiivisia bakteereita vastaan, joissa on suurin DD-transpeptidaasiaktiivisuus. [23]



Kuva 3. Penisilliinin mekanismi. Mukailtu artikkelista [25]

Bakteerit lisääntyvät nopeasti ja ovat hyvin alttiita geneettisille mutaatioille kasvaessaan esimerkiksi antibiootin läsnäollessa. Ajan myötä bakteeripopulaatiossa voi syntyä geneettisiä mutaatioita, jotka tarjoavat niin sanotun eloonjäämisedun, jolloin bakteerit voivat jatkaa kasvua ja lisääntymistä antibiootin läsnäollessa. Tästä johtuen syntyy resistentti kanta, joka voidaan tappaa vain käyttämällä vaihtoehtoisia ja/tai vahvempia antibiootteja.

Antibioottiresistenssin mahdollisuus kasvaa valtavasti, jos antibiootteja käytetään väärin, tai toistuvasti. Bakteerikannat voivat tulla vastustuskykyiseksi myös useammalle, kuin yhdelle antibiootille, mikä johtaa superbakteereihin. Superbakteereita on erittäin vaikea hoitaa lääketieteellisesti. [23]

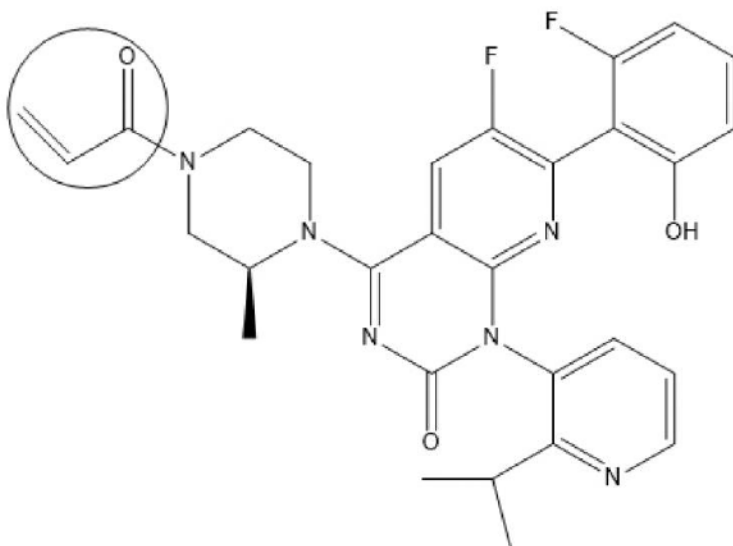
Bakteerit kehittävät antibioottiresistenssiä useiden eri mekanismien kautta. Jotkut bakteerit voivat tulla vastustuskykyisiksi penisilliinille tuottamalla beetalaktamaasia, joka tuhoaa penisilliinin beetalaktaamirenkaan, ja tekee antibiootista täten tehottoman. Yksi tunnettu ja yleinen esimerkki on *Staphylococcus aureus*. Se on stafylokokkeihin kuuluva kokkibakteeri, ja monimutkaisuudesta kertoo se, että bakteeri koostuu noin 2600 geenistä ja 2,8 miljoonasta emäsparista. *Staphylococcus aureus* tuottaa korkeita pitoisuuksia beetalaktamaasia ja aiheuttaa infektioita veressä, keuhkoissa ja ihossa. Useimmat *Staphylococcus aureus* -kannat ovat jo resistenttejä penisilliineille. Hoitona tähän, tutkijat ovat kehittäneet synteettisen penisilliinin muodon, joka on resistentti beetalaktamaasille. Sitä kutsutaan toisen sukupolven penisilliiniksi, tai penisillinaasiresistenteiksi penisilliineiksi. Näitä ovat dikloksasilliini, oksasilliini, nafsilliini ja metisilliini. Nopeasti kehityksen jälkeen tutkijat tunnistivat metisilliineille resistentit *Staphylococcus aureus* -kannat, joita kutsutaan metisilliiniresistentiksi *Staphylococcus aureus* -kannaksi (MRSA). MRSA käyttää toista resistenssin menetelmää voittaakseen metisilliinin. Se säätelee penisilliiniä sitovan proteiinin alhaisen affiniteetin muotoa, joka ei sido

antibioottia ja jonka aktiivisuus ei ole estynyt. Tähän mennessä MRSA on osoittanut yleisresistenssin kaikille beetalaktaamiantibiooteille, ja on täten erittäin vakava terveysriski. [23]

### 6.1.3 Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS)

Sotorasibi (AMG510) on syöpälääke, jota käytetään ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoitoon, ja joka kohdistuu KRAS -proteiinissa spesifiseen mutaatioon (G12C), ja jota koodaa KRAS-geeni. Sotorasibi on siis KRAS-mutaatioita omaaville kasvaimille kohdennettuna hoitona ensimmäinen hyväksytty hoito. Se hyväksyttiin Yhdysvalloissa toukokuussa 2021 ja Euroopan unionissa tammikuussa 2022. Hyväksyntä oli suuri läpimurto. [18]

Yksi pahamaineisimmista onkologisista kohteista on RAS-proteiini. RAS on GTPaasi, joka lähettää signaaleja solujen kasvua ja jakautumista varten. RAS:ia pidettiin vuosikymmeniä täysin lääkinnällisesti mahdottomana kohteena. Monien tuloksettomien yritysten jälkeen Amgen kehitti KRAS:n torjumiseksi kovalenttisen inhibiittorin AMG510:n, joka sitoutuu KRAS G12C proteiiniin inaktivoien sen ja täten estäen kasvainsolujen kasvun. KRAS on vastuussa monista erilaisista syövän muodoista. KRAS G12C-mutantissa on kysteiniipää, jota on hyödynnetty kovalenttisten inhibiittoreiden suunnittelussa. AMG510 on ensimmäinen kliinisen kehityksen KRAS G12C -estäjä. [24]

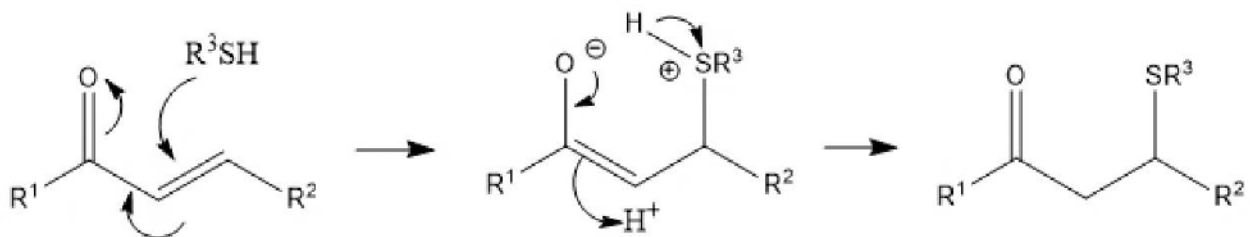


Kuva 4. KRAS -inhibiittori AMG510:n rakenne. Reaktiivinen funktionaalinen ryhmä ( $\alpha,\beta$ -tyydyttymätön karbonyyli) ympyröitynä. Mukailtu artikkelista [19]

Myös adagrasib on syöpälääke, jota käytetään ei-pienisoluisen keuhkosityövän hoitoon. Adagrasib sitoutuu sotorasibin kanssa samaan taskuun ja hyödyntää samaa kysteiiniä. Näillä kahdella lääkeaineella on kuitenkin proteiinissa eri kohde, sekä sotorasibin puoliintumisaika on vain noin neljännes adagrasibin puoliintumisajasta. [24]

#### 6.1.4 Brutonin tyrosiinikinaasi

BTK:lla on ratkaiseva rooli onkogeenisissa signaloinneissa, jotka ovat kriittisiä leukemiasolujen lisääntymiselle ja selviytymiselle monissa B-solujen pahanlaatuisissa kasvaimissa. BTK on välttämätön sekä B-solujen kehitykselle, että kypsien B-solujen toiminnalle. Viime vuosina tämän kinaasin pienimolekyyliset estäjät ovat osoittaneet erinomaista kasvainten vastaista aktiivisuutta ensin eläimille, ja myöhemmin myös kliinisissä tutkimuksissa. Näitä ovat esimerkiksi ibrutinibi ja zanubrutinibi, joilla on lähes sama mekanismi kysteiiniin. Erityisesti suun kautta annettuun ibrutinibiin liittyy hyvä vaste potilailla, joilla on uusiutunut krooninen lymfaattinen leukemia, ja vaippasolulymfooma. Tähän mennessä on kertynyt näyttöä ibrutinibin tehokkuudesta myös monissa muissa B-solujen pahanlaatuisissa kasvaimissa. [19]



Kuva 5. Thia-Michaelin addiition mekanismi. Mukailtu artikkelista [28]

*Ibrutinib* hyväksyttiin FDA:n toimesta lääkeainemerkinnällä Afatinibin kanssa samana vuonna 2013. Ibrutinib on pienimolekyylinen Brutonin Tyrosiinikinaasin (BTK) kovalenttinen estäjä, jota käytetään refraktorisen, kroonisen ja lymfosyyttisen leukemian vaippasolulymfooman eli B-solujen pahanlaatuisten kasvainten hoitoon. Suun kautta annettuna ibrutinibi inhiboi BTK-aktiivisuutta, mikä taas estää sekä B-soluaktivaation että B-soluvälitteisen signaloinnin. Tämä johtaa pahanlaatuisten B-solujen kasvun estoon. Ibrutinibiin ei ole koskaan liitetty seerumin entsyymien nousua hoidon aikana, mutta se on yhdistetty harvoin kliinisesti akuuttiin maksavaurioon, ja hepatiitti B:n uudelleenaktivoitumiseen. Myös ibrutinibi kuuluu WHO:n keskeisimpien lääkeaineiden listalle. [14]

## 6.2 Kovalenttisten lääkkeiden markkinointi ja kaupallisuus

Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet kattavat noin 30% koko lääkemarkkinoista. Kovalenttisten inhibiittoreiden ensimmäisen ilmentymisen jälkeen ala on kehittynyt merkittävästä, ja kovalenttisten lääkkeiden määrä ja merkityksellisyys on rajussa kasvussa. Kovalenttisten inhibiittoreiden lukuisat edut kumoavat alkuperäisen huolen mahdollisesta kohteen ulkopuolisesta toksisuudesta, jota on yhdistetty moneen kovalenttiseen inhibiittoriin. [19]

Analyysi 39:stä kovalenttisesta inhibiittorista, jotka FDA ja/tai EMA on hyväksynyt, osoittaa, että 33% näistä lääkkeistä on tulehdusta estäviä aineita, etenkin  $\beta$ -laktaamiluokkaan kuuluvia antibiootteja, 20% hoitaa syöpää, 15% maha-suolikanavan häiriöitä, 10% on keskushermoston, ja 5% on sydän- ja verisuonisairauksien hoitoon. Loput kovalenttiset inhibiittorit kuuluvat muiden sairauksien osa-alueille. [1]

Onkologiassa tärkeitä kovalenttisiä inhibiittoreita ovat aromataasin, tymidylaattisyntetaasin ja ribonukleotidireduktaasin estäjät. Klopidooreeli edustaa läpimurtoa verisuonisairauksissa. Protonipumpun estäjien, kuten omeprazolin, esomepratsolin, ja lansopratsolin, on osoitettu olevan tehokkaita ja turvallisia miljoonilla potilailla. Kovalenttiset inhibiittorit ovat vaikuttaneet myös keskushermoston sairauksien hoidossa (monoamiinioksidaasin estäjiä) kuten rasagliinia ja selegiliiniä on käytetty masennuksen ja Parkinsonin taudin hoitoon. Useita näistä kovalenttisista inhibiittoreista käytetään pitkäaikasihoitona, mikä taas osoittaa, että kovalenttinen vaikutusmekanismi voi olla tehokas vakavien sairauksien kroonisessa hoidossa. Vuonna 2020 pelkästään ibutrinibin ja osimertinibin myynti oli yhteensä 8,43 miljardia Yhdysvaltain dollaria. [1], [2].

### 6.2.1 Edut, turvallisuus ja ongelmat

Kovalenttisilla inhibiittoreilla on lukuisia etuja verrattuna ei-kovalenttisesti sitoutuviin lääkeaineisiin. Näitä ovat muun muassa tehokkuuden parantaminen, annoksen pienentäminen sekä pienempi riski lääkeresistenssiin.

Nämä edut ovat vahvasti kytköksissä toisiinsa; koska kovalenttiset inhibiittorit ovat tehokkaita, niillä on korkea affiniteetti ja pitkä sitoutumiskesto, tarvittava annos ja ottotiheys ovat täten pienempiä verrattuna ei-kovalenttisesti sitoutuviin lääkeaineisiin. [19]

On osoitettu, että potilaiden myöntövyys lisääntyy merkittävästi pienemmällä annostiheydellä. Tämä on huomattu erityisesti lääkeainetta kerran vuorokaudessa annettaessa, mikä on mahdollista kovalenttisilla inhibiittoreilla. On myös raportoitu, että kovalenttisilla estäjillä on potentiaalisia etuja resistenssille alttiita kohteita vastaan. [19] Vuonna 2013 Walter tutkimusryhmineen osoittivat, että kovalenttinen estäjä CO-1686 inhiboi T790M EGFR:n lääkeresistenssimutanttia. [20]

Viime vuosien aikana tapahtuneet edistysaskeleet analyttisissä tekniikoissa ovat antaneet näkemyksiä reaktiivisten lääkeaineenvaihduntatuotteiden rakenteista. Kokoelmia toksikoforeista, eli funktionaalisista ryhmistä, jotka voidaan metaboloida reaktiiviseksi elektrofiileiksi, ovat saatavilla oppaina lääkesuunnittelussa mukana oleville lääkekemisteille. Myös lääkkeen annoksen on huomattu olevan tärkeä, sillä suurin osa hyväksytyistä lääkkeistä, jotka on vedetty pois markkinoilta turvallisuusyistä, annettiin yli 100mg:n vuorokausiannoksina. Kovalenttisilla lääkeaineilla, joilla on hyväksytyt turvallisuusprofiilit, vuorokausiannokset ovat alle 10mg. [1]

Yksi suurimmista haasteista syöpien ja tartuntatautiin hoidossa on lääkeresistenssin ilmaantuminen lääkekohteen sitoutumiskohdan mutaatioiden vuoksi. Tutkimusten mukaan irreversiibelit inhibiittorit voivat ylläpitää aktiivisuutta lääkeresistenttejä mutaatioita vastaan, jotka on saatu reversiibeileillä estäjillä hoidon jälkeen. Yksi syy siihen, miksi irreversiibelit inhibiittorit voivat olla tehokkaampia resistenssimutanteja vastaan on se, että ne eivät vaikuta eston laajuuteen, ainoastaan nopeuteen, jolla inhiboitu kompleksi muodostuu. Näin ollen riittävällä altistuksella yhdisteelle jopa huomattavasti hitaammin reagoivat mutantit estyvät täysin. [1]

Toisaalta kovalenttisilla estäjillä katsotaan usein olevan huono selektiivisyys niiden korkean reaktiivisuuden takia. Tätä väitettä vastaan on kuitenkin useat tutkimukset, jotka ovat osottaneet kovalenttisten estäjien olevan hämmästyttävänkin selektiivisiä. [19]. Kempsonin ym. tutkimus Janus-kinaaseista (JAK:sta) osoitti suurta selektiivisyyttä JAK3:sta vastaan, koska yhdisteeseen oli lisätty kovalenttinen, reaktiivinen funktionaalinen ryhmä. Samainen tutkimus osoitti myös, että yhdisteellä oli pienempi aktiivisuus muita JAK-perheen kinaaseja kohtaan, mikä taas vähentää epäspesifisen sitoutumisen mahdollisuutta. [22]

Kovalenttiset inhibiittorit voivat aiheuttaa odottamatonta tai lääkkeiden aiheuttamaa toksisuutta, tai yliherkkyyttä. Ne voivat aiheuttaa ongelmia oikean taistelukärjen valinnassa, eivätkä välttämättä sovellu kohteille, jossa entsyymit hajoavat nopeasti. Monien erityyppisten reaktiivisten

funktionaalisten ryhmien toiminta ja reaktiivisuus voivat helpottaa kovalenttisten inhibiittoreiden tulevaa suunnittelua, sekä auttaa niiden ominaisuuksien säätämisessä haittojen minimoimiseksi. [19]

Kovalenttisten lääkkeiden suurta potentiaalia koskeva epäily johtuvat suurilta osin turvallisuusongelmista. Nämä johtuvat kahteen pääluokkaan jaettujen kovalenttisiä soluproteiineja modifioivien terapeuttisten aineiden haittavaikutuksista. Ensimmäiseen näistä luokista kuuluu ne lääkkeet, jotka sisältävät jo olemassa olevan reaktiivisen, elektrofiilisen funktionalisuuden emorakenteessa (esimerkiksi penisilliini), sekä yhdisteet, jotka läpikäyvät biotransformaation (*in vivo*), jolloin saadaan kemiallisesti reaktiivisia, elektrofiilisiä metaboliitteja. [1]

Toinen ryhmä sisältää lukuisia terapeuttisia luokkia, joissa emoyhdiste altistetaan yhdelle tai useammalle metaboliselle reaktiolle, jotka johtavat kemiallisesti reaktiivisten välituotteiden muodostumiseen, jotka täten modifioivat kovalenttisesti soluproteiineja.

Erittäin reaktiivisten lääkeaineen vaihduntatuotteiden satunnainen kovalenttinen sitoutuminen solun makromolekyyleihin voi joskus johtaa akuuttiin kudosaaurioon. [1]

### 6.2.2 Maine ja tulevaisuus

Kovalenttisten inhibiittoreiden maine oli pitkään heikko. Kohteen ulkopuolisen reaktiivisuuden pelko vaikutti tähän laajalti, ja ennen 2010-lukua tutkimuksia ei ollut vielä yhtä paljon kuin nykyään. Nykytutkimusten, myös kliinisten, myötä kovalenttisesti sitoutuvista lääkeaineista löydetään yhä enemmän informaatiota ja tietotaito näiden lääkeaineiden osalta kehittyi jatkuvasti. Usealla lääkeaineella on takanaan pitkä ja onnistunut taival monien hoidettujen tapausten valossa. Jatkuvasti kehittyvien kovalenttisten inhibiittoreiden odotetaan tuovan tulevaisuudessa valtavasti toivoa muun muassa syöpien, ja infektioiden hoidossa. Koronaviruksen hoidossa käytetty nirmatrelvir, sekä keuhkosityöpään löydetty lääkeaine sotorasibi ovat näyttöjä viimeaikaisista onnistumisista. Suuria markkinaosuuksia kantavat aspiriini, penisilliini ja klopidoogreeli tulevat olemaan tärkeitä lääkeaineita jatkossakin ja monet muutkin kovalenttiset inhibiittorit tulevat kasvattamaan markkinaosuuttaan.

Kuten jokaisella lääkeaineella, myös kovalenttisesti sitoutuvilla on sivuoireita. Sivuoireina voi olla ihmisestä ja lääkeaineesta riippuen esimerkiksi mahavaivoja, tuki- ja liikuntaelinten särkyä, pahoinvointia ja yskää. Lääkeaineiden kehittyessä sivuoireita pystytään välttämään yhä enemmän, ja hyviä tuloksia saadaan runsaasti enemmän. [2]



## 7 Yhteenveto

Kovalenttisesti sitoutuvat lääkeaineet sisältävät reaktiivisen funktionaalisen ryhmän. Tämä muodostaa kovalenttisen sidoksen proteiini-kohteiden kanssa antaakseen lisääffiniteettia lääkkeen sitoutumiseen liittyvien ei-kovalenttisten vuorovaikutusten lisäksi. Kovalenttisesti sitoutuvilla lääkeaineilla, kuten lähes jokaisella tunnetulla lääkeaineella, on omat vahvuutensa ja heikkoutensa. [2]

Erityisesti se, että kovalenttiset inhibiittorit saavat osan affiniteetistään muodostamalla kovalenttisen sidoksen kohteensa kanssa, on ajan myötä synnyttänyt pelkoa ja ahdistusta sen mahdollisuudesta reagoida kohteen ulkopuolella. Tämä pelko johtuu pääasiassa 1970-luvulla tehdystä löydöstä, jossa bromibentseenin ja asetaminofeenin (parasetamoli) kaltaisten yhdisteiden maksatoksista ominaisuuksista, jotka metaboloituvat muodostaen todella reaktiivisia välituotteita ja sitoutuvat kovalenttisesti maksan proteiineihin. Näiden erittäin reaktiivisten lääkeaineenvaihduntatuotteiden kovalenttinen sitoutuminen solun makromolekyyleihin voi joskus johtaa akuuttiin kudonvaurioon tai se voi aktivoida immuunijärjestelmän. Tämä saattaa johtaa toksisuuteen ja vasta-aineiden syntymiseen, eli saa aikaan immuunivasteen. [1]

Kovalenttinen vaikutusmekanismi lääkeaineessa voi kuitenkin tarjota monia etuja ei-kovalenttisesti sitoutuvaan lääkeaineeseen verraten. Näiden myötä voidaan saavuttaa muun muassa suurempi teho, tarkka selektiivisyys ja pidentynyt vaikutusaika. Kaikki hyödyt vaikuttavat niin molekyyli-, potilas- kuin markkinatasollakin. Selektiivisyyden, pidemmän vaikutusajan ja suuremman tehon ansiosta lääkeaine kohdistuu tarkemmin haluttuun kohteeseen, annostusta voidaan pienentää ja harventaa, sekä lääkeaineen kulutus vähenee. Viime aikoina on myös kehitetty lääkeaineita, joissa on yhdistetty ja hyödynnetty parhaita osa-alueita kovalenttisesti sekä ei-kovalenttisesti sitoutuvista lääkeaineista. Tärkeä osa kovalenttisesti sitoutuvien lääkeaineiden toimintaa on aminohapot ja varsinkin kysteini, joka on yksi käytetyimmistä ja tärkeimmistä aminohapoista puhuttaessa kovalenttisista inhibiittoreista. Kysteinin käyttöä puoltaa sen korkea reaktiivisuus ja alhainen määrä proteasomissa. [1], [27]

Kuten Taulukosta 1. voimme huomata, kovalenttisesti sitoutuvia inhibiittoreita on kehitetty pitkän aikaa ja kuluvana aikana markkinoille on saatu lukuisia lääkeaineita, jotka ovat osaltaan vieneet eteenpäin lääketiedettä ja parantaneet mahdollisuuksia sairauksista paranemiseen. Tunnetuimpia

kovalenttisesti sitoutuvia lääkeaineita maailmanlaajuisesti on aspiriini ja penisilliini. Esimerkkinä myynnistä, pelkästään aspiriinia käytetään päivittäin maailmanlaajuisesti noin 200 miljoonan tabletin verran, sen ollessa yksi maailman käytetyimmistä lääkeaineista. Kovalenttisesti sitoutuvien lääkeaineiden markkinat maailmanlaajuisesti ovat valtavat, ja kattavat noin 30%:a koko lääkemarkkinasta. Kehitys on jatkuvaa ja kasvavaa, edellisen 10 vuoden aikana markkinoille on hyväksytty jo 14 uutta kovalenttisesti sitoutuvaa lääkeainetta. [3]

## 8. Lähdeluettelo

- [1] Singh, J., Petter, R., Baillie, T. et al. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* 10, 307–317 (2011).
- [2] Boike, L., Henning, N.J. & Nomura, D.K. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 21, 881–898 (2022).
- [3] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2244, Aspirin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2244>
- [4] Alexander F., Sir Ernst B. C., Howard W. F., Baron F., Dorothy H., Robert B., W. The Editors of Encyclopaedia. "penicillin". *Encyclopedia Britannica*, 12 Jan. 2023, <https://www.britannica.com/science/penicillin>
- [5] Cancer Treatment, Fluorouracil (5FU), (2019) <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/drugs/fluorouracil>
- [6] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 4594, Omeprazole. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Omeprazole>
- [7] Sahar T., Fazlollah S., Mostafa R., Saeed K., Seyed M. M., et al.: A look at its various aspects, *Gene Reports*, Volume 19, (2020). Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Fosfomycin - ScienceDirect
- [8] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Fosfomycin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fosfomycin>
- [9] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Clopidogrel. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zyllt>
- [10] Bortezomib continuing education activity, Sharma A, V. Preuss C, (2022), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519559/>
- [11] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Boceprevir. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boceprevir>
- [12] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Carfilzomib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carfilzomib>
- [13] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Afatinib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Afatinib>

- [14] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Ibrutinib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibrutinib>
- [15] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Osimertinib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Osimertinib>
- [16] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Voxelotor. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Voxelotor>
- [17] Marzi M, Vakil M, Bahmanyar M. National Library of Medicine, Paxlovid: Mechanism of Action (2022)
- [18] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary, Sotorasib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sotorasib>.
- [19] Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Med Chem* 876-884. (2020) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7557570/>
- [20] Walter A. O., Sjin R. T. T., Haringsma H. J., Ohashi K., Sun J., Lee K., et al.. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048995/>
- [21] Zeng M, Lu J, Li L, Feru F, Quan C, et al. Potent and Selective Covalent Quinazoline Inhibitors of KRAS G12C. *Cell Chem Biol.* 2017, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28781124/>
- [22] Hagel M., Niu D., Martin T. St, Sheets M. P., Qiao L., et al. *Nat. Chem. Biol.* 2011, Selective irreversible inhibition of a protease by targeting a noncatalytic cysteine. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21113170/>
- [23] Chow S, News Medical, Penicillin Mechanism (2023), <https://www.news-medical.net/health/Penicillin-Mechanism.aspx>
- [24] Canon J, Rex K, Saiki A, Mohr C, Cooke K, ym, The clinical KRAS G12C inhibitor AMG510 drives anti-tumour immunity (2019), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31666701/>
- [25] Swain C, Cambridge MedChem Consulting, Covalent Inhibitors (2023), [https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/lead\\_identification/covalent.html](https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/lead_identification/covalent.html)
- [26] F. Huanj, X. Han, X. Xiao, Covalent Warheads Targeting Cysteine Residue (2022), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9694382/>
- [27] McAulay K, Bilsland A, Bon M. Reactivity of Covalent Fragments and Their Role in Fragment Based Drug Discovery. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Nov 8;15(11):1366. doi: 10.3390/ph15111366. PMID: 36355538; PMCID: PMC9694498.
- [28] W.-Q. Chen, J.-A. Ma, Thia-Michael Addition <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/thia-michael-addition#>