



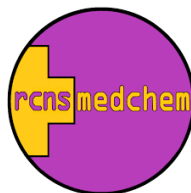
M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR

A kovalens enziminhibíció számításon kémiai jellemzése

Tézisfüzet

Szerző: Mihalovits Levente Márk
Témavezető: Ferenczy György
Konzulens: Keserű György Miklós



Gyógyszerkémiai Kutatócsoport
Természettudományi Kutatóközpont,
Eötvös Loránd Kutatóhálózat

2021

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

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 teljesítőképességének 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 számítási módszerek alkalmazása is.^{1,2}

A számítási 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 bírnak 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 kikerülésének lehetősége.⁴

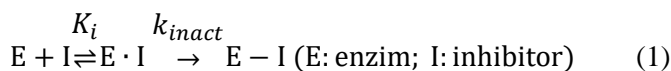
A kovalens inhibíció mechanizmusa két lépésből áll (**1. egyenlet**), ezek a molekuláris felismerés és a kémiai reakció. Az első során az inhibitor molekula másodlagos kötéseket alakít ki a célzott enzimmagkörnyezettel, majd a második, kovalens lépésben kémiai kötést létesít a célzott nukleofil oldallánccal.

¹ Talele T, Khedkar S, Rigby A.; *Curr Top Med Chem*, **2010**, *10*, 127–41.

² Sabe VT, Ntombela T, Jhamba LA, Maguire GEM, Govender T, Naicker T, et al.; *Eur J Med Chem*, **2021**, *224*, 113705

³ Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A.; *RSC Med Chem*, **2020**, *11*, 876–84.

⁴ Johnson DS, Weerapana E, Cravatt BF.; *Future Med Chem*, **2010**, *2*, 949–64



A molekuláris felismerést a K_i egyensúlyi állandó, míg az irreverzibilis kovalens reakciót a k_{inact} sebességi állandó jellemzi. Mivel mindkét lépés egyforma jelentőséggel bírhat a kötődési események során, így együttes jellemzésük elengedhetetlen a kovalens inhibíció megfelelő leírásához. Mindkét állandó mérhető kísérleti módszerekkel, de a számítós 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 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.⁵

Munkám során a fent említett módszerek kombinálásával kifejlesztettem egy komplex, molekuladinamika alapú protokollt, melyben a kovalens inhibíció mindkét lépése modellezhető és a megfelelő inhibíciót jellemző konstansok számolhatók. A kidolgozott módszert egy sor releváns fehérjén

⁵ De Vivo M, Masetti M, Bottegoni G, Cavalli A.; *J Med Chem*, **2016**, 59, 4035–61.

teszteltem, melyek között jelen volt a MurA, KRAS, EGFR, ITK, BTK, BMX, immuno- és konstitutív proteaszóma is. A módszer célja elsődleges vegyületek inhibíciós aktivitás szerinti rangsorolása, de a mechanizmuskutatásban és szelektivitás vizsgálatban való alkalmazásának lehetőségét is megvizsgáltam.

2. MÓDSZEREK

A kovalens inhibíció számítógépes jellemzéséhez a számításhoz 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 keresztülmegy 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.⁶

Ennek megfelelően, a kémiai reakciók modellezéséhez QM/MM alapú torzított molekuladinamikákat futtatunk, név szerint „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 pozicionált, de állandó torzítópotenciált tartalmaz. A szabadentalpia profil, mint a reakciókoordináta függvénye, más néven az átlagos erő potenciál görbéje (potential of mean force curve, PMF) mindkét módszer esetében megszerkeszthető a szimulációk kiértékelése után. Az általunk alkalmazott

⁶ Abrams C, Bussi G.; *Entropy*, **2013**, *16*, 163–99.

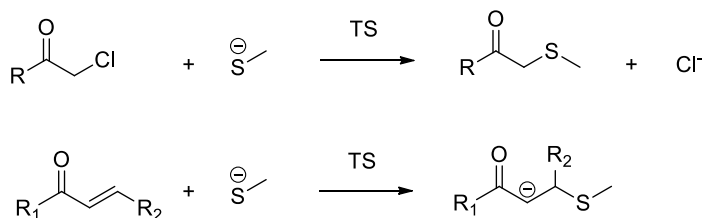
módszer során azonban, az SMD-eket a US szimulációk ablakainak kezdőszerkezetének létrehozására alkalmaztuk, míg a kovalens reakciók energiaprofilját a US ablakok során mintavételezett reakciókoordináta értékek eloszlásából számoltuk súlyozott hisztogram analízissel (weighted histogram analysis method, WHAM). Végezetül a kapott energiaprofilból számoltuk ki a sebességmeghatározó lépéshez tartozó gátmagasságot (ΔG^\ddagger).

A szintén molekuladinamika alapú termodinamikai integrálás (TI) módszerével két adott állapot közötti szabadentalpia különbség számolható. Specifikus, kémiai vagy alkímiai átalakításokat is tartalmazó termodinamikai ciklusok szerkesztésével és a ciklus lépéseire alkalmazott TI szimulációk segítségével a ligandumok közötti kötődési szabadentalpia különbségek, adott esetben ugyanazon ligandum hasonló enzimekben tapasztalható kötődési szabadentalpia különbsége 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

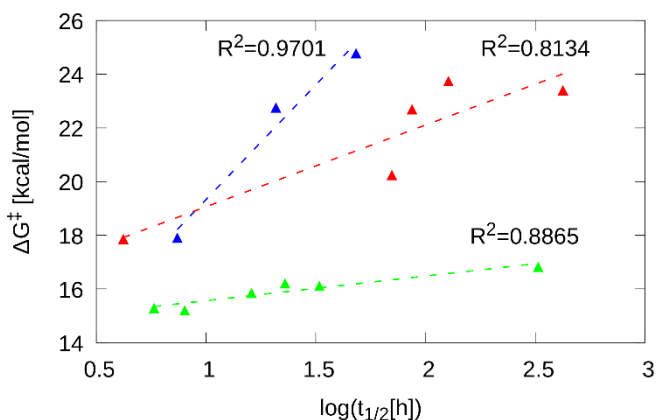
3.1. KOVALENS INHIBITOROK REAKTIVITÁSÁNAK ELŐREJELZÉSE [T4]

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 6-311G**(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 időkkal, amely egy ciszteinnel szembeni ligandum reaktivitást jellemző leíró (**2. ábra**).



1. ábra Modellezett reakciók

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.



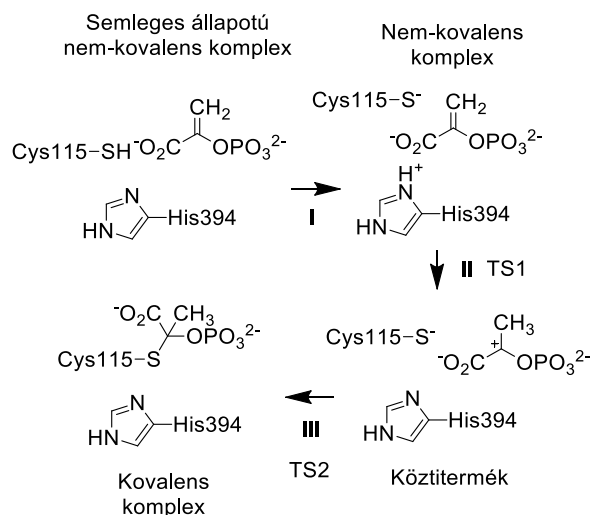
2. ábra A vizsgált modellreakciók számolt gátmagasságai a kísérleti félelet idők logaritmusának függvényében. Az eltérő színek, eltérő reaktív molekularésszel (warhead) bíró molekulák csoportjait jelölik: akrilamidok (piros), akrilészterek (kék), α -kloroacetamidok (zöld)

3.2. A MURÁ ENZIM KATALITIKUS MECHANIZMUSA ÉS KOVALENS GÁTLÁSA [T1]

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,⁷ az aktív

⁷ Gautam A, Rishi P, Tewari R.; *Appl Microbiol Biotechnol*, **2011**, *92*, 211–25

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.⁸ 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 kiértékelése 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-acetylglucosamine (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 protontranszfert és a PEP kötődését (**3. ábra**) QM/MM MD-k 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 tiolát nukleofil támadásából.



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

⁸ Zhu JY, Yang Y, Han H, Betzi S, Olesen SH, Marsilio F, et al.; *J Biol Chem*, **2012**, 287, 12657–67.

Hasonló deprotonálódási mechanizmust feltételezve, modelleztük a Cys115 kovalens reakcióját három sorozat eltérő reaktív molekularészletet (warhead) tartalmazó, ciszteint célzó inhibitorral szemben. Minden sorozat 2 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.

1. táblázat MurA ligandumok kísérleti és számított tulajdonságai

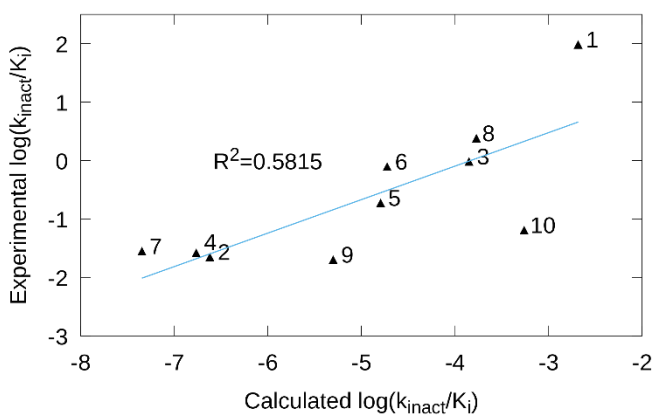
Vegyület	Maradék aktivitás [%]	Típus	GSH félélet idő [h]	ΔG^\ddagger [kcal·mol ⁻¹]
M1	NE ^a	Aktív	NE ^a	13.3
M2	NE ^a	Aktív	NE ^a	11.1
M3^b	93	Inaktív	77.5	19.6 ^c , 20.2 ^d
M4	3	Aktív	0.0	22.3
M5	3	Aktív	0.0	19.9
M6	110	Inaktív	32.8	27.8
M7	12	Aktív	0.2	10.8
M8	1	Aktív	0.0	11.3
M9	95	Inaktív	127.0	16.5

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

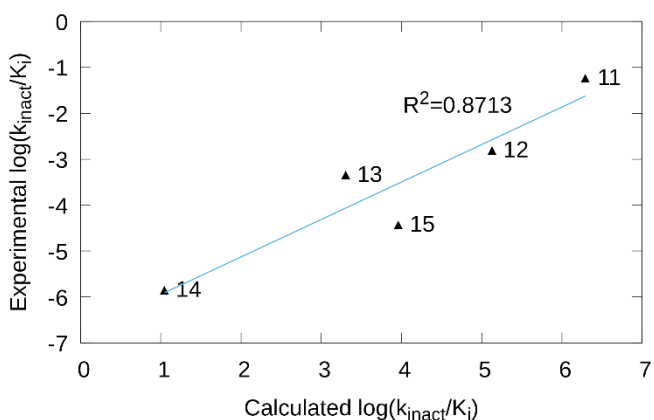
3.3. KOVALENS INHIBITOROK AFFINITÁSÁNAK ÉS SZELEKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA [T2]

A MurA-nál alkalmazott számolásoknál azzal a feltételezéssel éltünk, hogy ezen kisméretű molekulák esetén a nem-kovalens kötődés csak elhanyagolható energijárulékot ad a teljes gátláshoz, így ennek számolásától eltekintettük. 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 szabadentalpiai 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. Ennek során jó korrelációt tapasztaltunk az összehasonlított mennyiségek között, ezzel bizonyítva a kidolgozott számítási protokoll teljesítőképességét (4. és 5. ábra).



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 végbemenő kémiai reakciókat az általános QM/MM MD alapú módszerrel végeztük. Ezek után két vegyület egyszeres és kétszeres EGFR mutánszal szembeni szelektivitásának vizsgálatát is elvégeztük, szintén oldallánc mutációs TI segítségével, a $\Delta\Delta G$ -k számításával (**2. táblázat**).

A kapott szám adatok 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.

2. táblázat Kísérleti (exp) és számításos 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}	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$	$\Delta G^\ddagger_{\text{exp}}$	$\Delta G^\ddagger_{\text{calc}}$
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 to BMX mutation

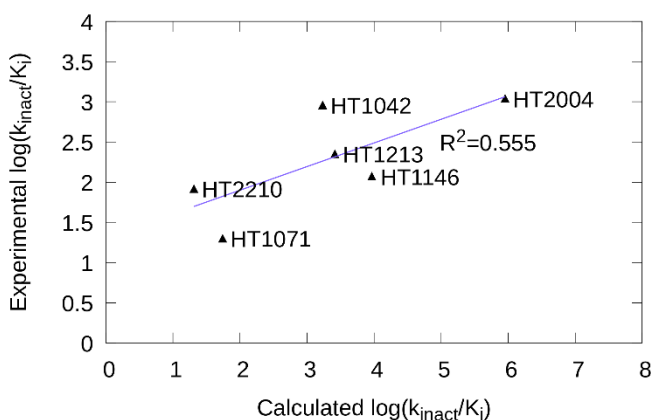
3. táblázat EGFR inhibitorok szelektivitását jellemző kísérleti ($\Delta\Delta G_{\text{exp}}$) és számított ($\Delta\Delta G_{\text{calc}}$) kötődési szabadentalpia különbségei. (Az energia értékek mind kcal·mol⁻¹-ban szerepelnek)

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 KÖTÖDÉSÉNEK ÉS SZELEKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA [T3]

Végezetül a kovalens inhibíció számításos kémiai módszerekkel történő jellemzését kiterjesztettük bonyolultabb kémiai reakcióval kötődő vegyületekre is; oxatiazolon származékok immunoproteaszóma gátlását

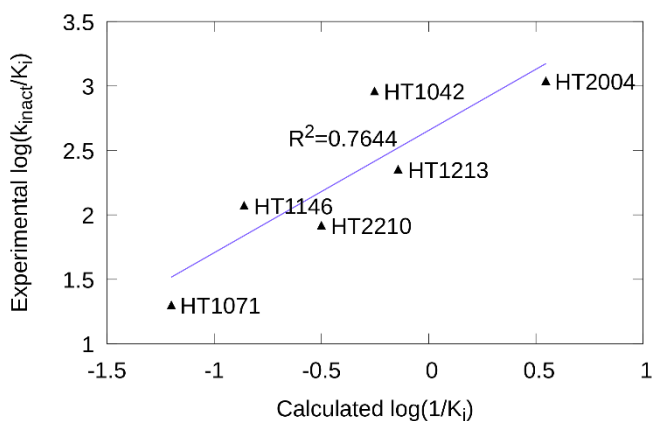
vizsgáltuk. Elsőként két javasolt reakcióút közül az energetikailag kedvezőbbet határoztuk meg a legegyszerűbb vizsgált oxatiazolon származék PMF profiljainak számításával. Ennek során a karbonát utat, mint valószínűbb mechanizmust azonosítottuk. Ezután meghatároztuk a reakciósor sebesség-meghatározó 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 fedeztünk fel, ezzel validálva a TI MD és QM/MM US MD kombinációját tartalmazó módszer bonyolultabb kötődési mechanizmusú inhibitorok energetikai jellemzésének használatára is (**6. ábra**).



6. 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.)

Az előzőben meghatározottnál jobb korrelációt fedeztünk fel a számított $\log(1/K_i)$ és a kísérleti $\log(k_{\text{inact}}/K_i)$ értékek között (**7. ábra**), ezzel azt bizonyítva, hogy a kötődési affinitásban tapasztalt különbségeket főként a nem-kovalens lépésben felfedezhető eltérések okozzák.

A módszer szelektivitás értelmezésére való alkalmazását proteaszóma célpontokra is elvégeztük. Kiválasztottunk két, az előzőekben is vizsgált oxatiazolon származékot, 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 meghatároztuk.



7. 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 **4. egyenlet** összefüggést teremt a k_{inact}/K_i -vel, és a szabad entalpiákkal kifejezett szelektivitások között.

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

Az összehasonlításhoz szükséges adatok a **4. táblázat**-ban 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-től eltérő Met48 konformációt okoz, melynek a ligandum méretétől függő hatása van a kovalens gátlás folyamatának energia viszonyaira.

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	Számított
	$-\Delta\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G$	$-\Delta\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G$
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. TÉZISPONTOK

1. Mechanizmust javasoltam a MurA enzim által katalizált reakcióra, mely tartalmaz egy a kofaktor UDP-N-acetylglucosamine (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 találtam, hogy először protonálódik a His394 által, majd adduktot képez a Cys115-tel [T1].

2. Megmutattam, hogy a MurA Cys115 oldallánca és kilenc oxirán, α -haloketon, α -haloacetamid, akrilamid és vinil-szulfon származék között végbemenő kémiai reakciók számított gátmagasságai alapján a ligandumok aktív-inaktív besorolása elvégezhető [T1].

3. Kifejlesztettem egy komplex molekuladinamika alapú szabadentalpiát számító protokollt a teljes kovalens inhibíció jellemzésére, beleértve a nem-kovalens és kovalens lépést is. A módszert sikeresen validáltam több releváns fehérjén, név szerint KRAS-on, EGFR-en, ITK-n, BTK-n és BMX-en. A módszer segítségével szelektivitási becsléseket is sikeresen tettem, néhány kiválasztott vegyület rokon kinázokkal, illetve EGFR mutánsokkal szembeni kötődési szabadentalpia különbségeinek számításával [T2,T4].

4. Tisztáztam 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 találtam. Ezen kívül megmutattam, 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 [T3].

5. Bemutattam 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. Értelmeztem két oxatiazolon származék immuno- és konstitutív

proteaszómával szembeni eltérő szelektivitását, mely során egy Gln53Ser mutáció által okozott Met48 konformációváltozást találtam, 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 [T3].

5. ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEK

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

6. PUBLIKÁCIÓK

6.1. FOLYÓIRAT KÖZLEMÉNYEK A JELEN ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN

- T1. Catalytic Mechanism and Covalent Inhibition of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA): Implications to the Design of Novel Antibacterials
L. M. Mihalovits, G. G. Ferenczy, G. M. Keserű,
Journal of Chemical Information and Modeling, **2019**, *59*, 5161–5173.
DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00691. IF(2019): 4.549 FI: 4
- T2. Affinity and Selectivity Assessment of Covalent Inhibitors by Free Energy Calculations
L. M. Mihalovits, G. G. Ferenczy, G. M. Keserű
Journal of Chemical Information and Modeling, **2020**, *60*, 6579–6594.
DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00834. IF(2020): 4.956 FI: 3
- T3. Mechanistic and thermodynamic characterization of oxathiazolones as potent and selective covalent immunoproteasome inhibitors
L. M. Mihalovits, G. G. Ferenczy, G. M. Keserű
Computational and Structural Biotechnology Journal, **2021**, *19*, 4486–4496.
DOI: 10.1016/j.csbj.2021.08.008. IF: 7.271 FI: 0
- T4. The role of quantum chemistry in covalent inhibitor design
L. M. Mihalovits, G. G. Ferenczy, G. M. Keserű
International Journal of Quantum Chemistry, **2021** (early view).
DOI: 10.1002/qua.26768. IF(2020): 2.444 FI: 0

6.2. ELŐADÁSOK A JELEN ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN

1. Kovalens UDP-N-acetilglükózamin enolpiruvil transzferáz (MurA) inhibitorok vizsgálata vegyes QM/MM molekuladinamikai szimulációk segítségével
Levente Márk Mihalovits, György G. Ferenczy, György Miklós Keserű, *KeMoMo-QSAR 2019 szimpózium, Szeged*, 2019. június 6.
2. Az UDP-N-Acetilglükózamin Enolpiruvil Transzferáz (MurA) enzim katalitikus mechanizmusa és kovalens gátlása
Levente Márk Mihalovits, György G. Ferenczy, György Miklós Keserű, *TTK SzKI szakmai előadói napok, Telki*, 2020. január 22.
3. Kovalens inhibitorok vizsgálata szabadentalpia számításokkal
Levente Márk Mihalovits, György G. Ferenczy, György Miklós Keserű, *KeMoMo-QSAR 2021 szimpózium, Szeged*, 2021. szeptember 30.