

KOVALENTNA VEZAVA PRI ZDRAVILNIH UČINKOVINAH – NAJ JO IŠČEMO ALI SE JI IZOGIBAMO?

COVALENT BINDING DRUGS – SOMETHING TO BE SOUGHT OR SHUNNED?

AVTORJI / AUTHORS:

asist. dr. Nika Strašek Benedik, mag. biokem.

asist. Vid Kavaš, mag. farm.

doc. dr. Anže Meden, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: anze.meden@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Kovalentne zdravilne učinkovine imajo pomembno vlogo v humani medicini. S tvorbo stabilnih kovalentnih vezi s specifičnimi aminokislinskimi ostanki v svojih makromolekularnih tarčah dosežejo močnejše in dolgotrajnejše terapevtske učinke kot klasične učinkovine, ki izkoriščajo le reverzibilne interakcije. Njihovo dolgo zadrževanje na tarči omogoča redkejšo odmerjanje, kar lahko zmanjša pojav neželenih učinkov. Vseeno pa razvoj kovalentnih zdravilnih učinkovin ni brez izzivov, saj pomisleki glede izventarčne vezave in potencialne imunogenosti zahtevajo skrbno načrtovanje in optimizacijo za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti. V zadnjem desetletju je prišlo do bistvenega napredka na področju načrtovanja, selektivnosti in razumevanja mehanizmov delovanja kovalentnih zdravilnih učinkovin, kar je omogočilo razvoj novih zdravil, zlasti v onkologiji, infektologiji in nevrologiji. Sodobne kovalentne zdravilne učinkovine dokazujejo, da je s premišljenim pristopom mogoče oblikovati učinkovite, selektivne in varne kovalentne učinkovine z velikim terapevtskim potencialom.

KLJUČNE BESEDE:

bojna glava, ireverzibilni zaviralci, kovalentne zdravilne učinkovine, načrtovanje zdravilnih učinkovin

ABSTRACT

Covalent drugs play an important role in human medicine. By forming stable covalent bonds with specific amino acid residues of their macromolecular targets, they can achieve stronger and longer-lasting therapeutic effects than conventional drugs, which form reversible interactions. Their prolonged target residence allows for less frequent dosing, which can reduce the incidence of adverse effects. However, the development of covalent drugs is not without challenges, as concerns about off-target binding and potential immunogenicity require careful design and optimization to ensure safety and efficacy. Over the past decade, significant progress has been made in the design, selectivity, and mechanistic understanding of covalent drugs, enabling the development of new therapeutics, especially in oncology, infectious diseases, and neurology. Modern covalent drugs demonstrate that with careful consideration and design effective, selective, and



safe covalent drugs with high therapeutic potential can be developed.

KEY WORDS:

covalent drugs, drug design, irreversible inhibitors, warhead

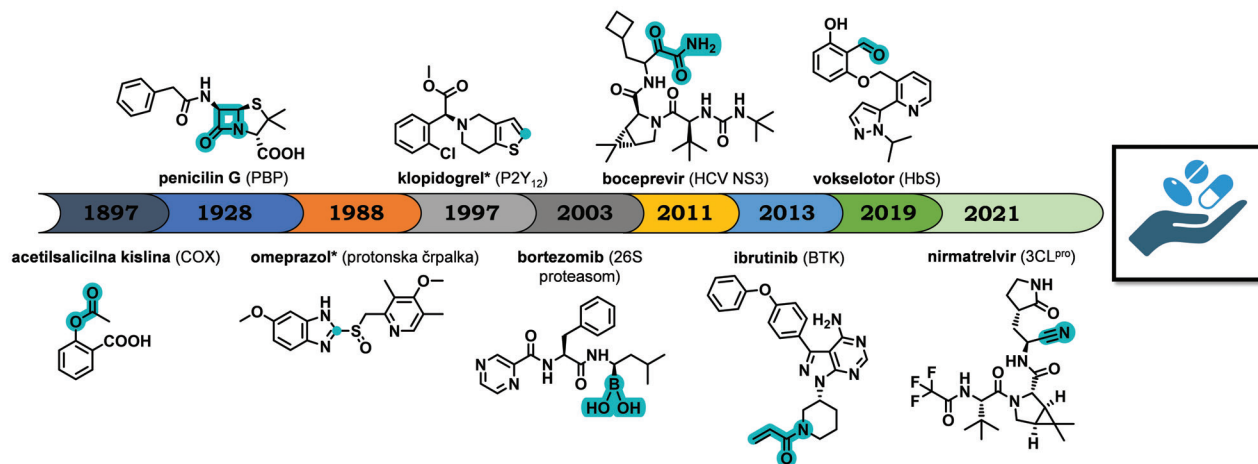
1 UVOD

V zadnjih dveh stoletjih je odkrivanje novih zdravilnih učinkovin (ZU) bistveno prispevalo k napredku medicine in omogočilo obvladovanje bolezni, ki so bile v preteklosti neozdravljive. Pomemben razred ZU so t. i. kovalentne zdravilne učinkovine (kZU), katerih delovanje temelji na tvorbi kovalentne vezi z njihovo makromolekularno tarčo. Čeprav je v preteklosti kemijska reaktivnost ZU pogosto vzbujala zadržke, danes razvoj kZU doživlja preporod. To je predvsem posledica boljšega razumevanja njihovega delovanja, večje selektivnosti in naraščajočega števila uspešnih primerov iz klinične prakse (1–3).

2 ZGODOVINSKI RAZVOJ KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN TER UPORABA V KLINIČNI PRAKSI

Prve kZU, ki delujejo na osnovi kovalentne vezave, so bile odkrite že na koncu 19. in v začetku 20. stoletja, na primer β -laktamski antibiotiki (penicilini) in acetilsalicilna kislina. Vendar pa so v drugi polovici 20. stoletja zaradi zavedanja o nespecifični vezavi, imunogenosti in toksičnosti reaktivnih spojin tovrstne učinkovine postale nezaželeni in so jih začeli izločevati že v zgodnjih fazah razvoja zdravil. Veliko kZU se je dolgo uporabljalo, ne da bi poznali njihov kovalenten mehanizem delovanja: najširše uporabljana ZU, acetilsalicilna kislina, je kovalenten zaviralec ciklooksigenaze, vendar so njen mehanizem delovanja odkrili šele leta 1971, 72 let po njenem prihodu na trg (1, 3).

Ponovni zagon načrtnega razvoja kZU se je zgodil po letu 2013 z uspešno registracijo ibrutiniba (slika 1), zaviralca Brutonove tirozin kinaze. Od takrat kZU predstavljajo pomemben del razvojnih programov tudi v velikih farmacevtskih podjetjih, kar se odraža v vse večjem številu znan-



Slika 1: Pregled razvoja kovalentnih zdravilnih učinkovin v zadnjih dveh stoletjih. V oklepajih so navedene njihove tarčne makromolekule, letnica označuje čas odkritja ali prihoda na trg. Z zeleno so označene elektrofilne funkcionalne skupine (bojne glave), z zvezdico pa tiste učinkovine, ki postanejo reaktivne šele po biološki aktivaciji. Prirejeno po (1). COX – ciklooksigenaza, PBP – peniciline vezoči proteini, P2Y₁₂ – purinergični receptor P2Y₁₂, HCV NS3 – nestrukturni protein 3 virusa hepatitisa C, BTK – Brutonova tirozin kinaza, HbS – hemoglobin S, 3CL^{pro} – 3C-podobna proteaza.

Figure 1: An overview of the development of covalent drugs over the past two centuries. Their macromolecular targets are listed in parentheses, the years indicate either the discovery or market entry year. Electrophilic functional groups (warheads) are highlighted in green, and an asterisk marks compounds in which the reactive site becomes exposed only after biological activation. Adapted from (1). COX – cyclooxygenase, PBP – penicillin-binding proteins, P2Y₁₂ – purinergic receptor P2Y₁₂, HCV NS3 – hepatitis C virus nonstructural protein 3, BTK – Bruton tyrosine kinase, HbS – haemoglobin S, 3CL^{pro} – 3C-like protease.

KLJUČNI POUDARKI

- Kovalentne zdravilne učinkovine tvorijo (stabilne) kovalentne vezi s tarčami, kar omogoča močnejše, dolgotrajnejše delovanje in redkejšo odmerjanje.
- Tovrstne učinkovine imajo pomembno vlogo predvsem v onkologiji, infektologiji in nevrologiji – na primer ibrutinib, amoksicilin, nirmatrelvir, rivastigmin.
- Napredek v zadnjih desetletjih je zmanjšal pomisleke o nespecifični reaktivnosti, saj je z optimizacijo reaktivnosti »bojnih glav« možno doseči visoko selektivnost in zmanjšati neželene učinke.
- Reverzibilni kovalentni zaviralci združujejo prednosti kovalentne vezave z boljšo varnostjo zaradi nadzorovanega razpada kovalentnega kompleksa.
- Na UL FFA razvijajo nove kovalentne zaviralce za proteaze, MurA, imunoproteasom, transpeptidaze in tarče, udeležene v nevrodegenerativnih boleznih.

stvenih objav in novih kZU, ki so prišle na trg. Lani je bilo na trgu že več kot 55 kZU, katerih letna tržna vrednost presega 50 milijard ameriških dolarjev (1, 4).

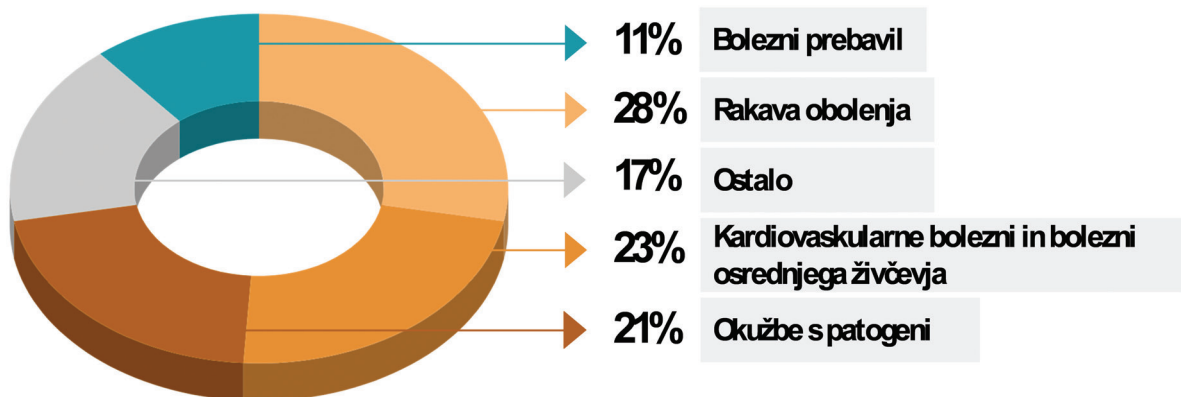
Največji delež kZU se uporablja v onkologiji (28 %), kamor spadajo afatinib, ibrutinib, osimertinib, adagrazib, dacomitinib in akalabrutinib. Sledijo zdravila za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni in bolezni osrednjega živčevja (23 %), kot so saksagliptin, klopidogetrel, vokselotor, rivastigmin in razagilin. Približno 21 % kZU se uporablja za zdravljenje okužb s patogeni, kamor uvrščamo peniciline, cefalosporine, fosfomicin, nirmatrelvir, telaprevir in boceprevir. Manjši,

a klinično pomemben delež (11 %) kZU, predstavljajo ZU za bolezni prebavil, predvsem zaviralci protonске črpalke (slika 2) (5).

V zadnjih letih se raziskave intenzivno usmerjajo v razvoj reverzibilnih kovalentnih zaviralcev, ki združujejo prednosti kovalentne vezave in prilagajanje trajanja učinka (moduliranje hitrosti razpada kZU-tarča), s čimer se zmanjša tveganje za neželene učinke (6). Veliko pozornosti se namenja tudi selektivnemu ciljanju proteinov, ki so težko dostopni za modulacijo z malimi molekulami (angl. *undruggable*), kot so transkripcijski faktorji in regulatorji signalnih poti, in razvoju kovalentnih himernih razgrajevalcev (molekul PRO-TAC) (7–9).

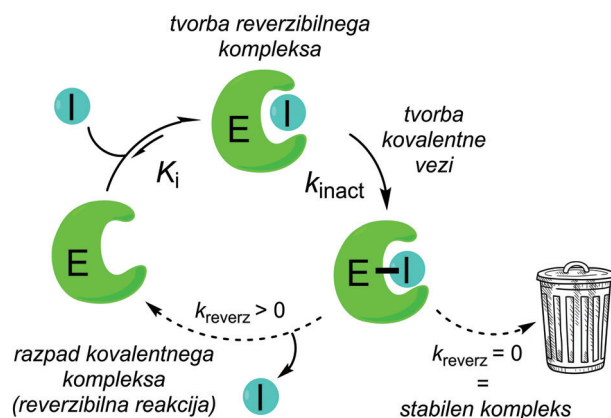
3 MEHANIZEM DELOVANJA

Večina kZU v svoji strukturi vsebuje reaktivno funkcionalno skupino, t. i. bojno glavo, ki je najpogostejše elektrofilne narave. Ta se kovalentno veže na nukleofilni aminokislinski ostanek v tarčnem proteinu, kot so cistein, serin, histidin ali lizin. V primeru encimov gre pogosto za katalitične ostanke, ki imajo povečano reaktivnost. Izbira bojne glave ima ključen vpliv na selektivnost, jakost delovanja in varnostni profil kZU. Med najpogostejše uporabljene so akrilamidi, kloroacetamidi in nitrili, saj omogočajo natančno modulacijo reaktivnosti in so hkrati dovolj varni (5, 10–11).



Slika 2: Razporeditev registriranih kZU po področjih uporabe. Povzeto po (5).

Figure 2: Distribution of therapeutic areas of covalent drugs. Adapted from (5).



Slika 3: Dvostopenjski proces vezave kovalentnega zaviralca (I) na encim (E). Povzeto po (3).

Figure 3: The covalent inhibitor (I) binds to the enzyme (E) in a two-step process. Adapted from (3).

Poseben razred predstavljajo tarčni kovalentni zaviralci (angl. *targeted covalent inhibitor*, TCI), ki najprej prepoznajo tarčo preko specifičnih nekovalentnih interakcij, nato pa ob ugodni orientaciji tvorijo kovalentno vez z bližnjim nekatalitičnim aminokislinskim ostankom, običajno cisteinom. Primer takšne učinkovine je sotorasib, ki selektivno cilja onkogeno mutacijo Gly12Cys v proteinu K-Ras, pri čemer izkorišča mutirani ostanek za selektivno tvorbo kovalentne vezi. Ta strategija omogoča visoko specifičnost znotraj družine sorodnih proteinov, medtem ko uporaba nizko reaktivnih bojnih glav, kot so na primer akrilamidi, zmanjšuje tveganje neselektivne vezave na izventarčne proteine (12, 13).

Še en pomemben razred so t. i. »samomorilski zaviralci« (angl. *mechanism-based oz. suicide inhibitors*), ki sami po sebi niso reaktivni, njihova bojna glava se namreč razkrije šele med encimsko katalizirano pretvorbo, ki hkrati vodi do trajne inaktivacije encima. Primeri teh so klavulanska kislina (β -laktamazni zaviralec), eflornitin (zaviralec ornitin dekarboksilaze), selegilin (zaviralec monoamin oksidaze) in vigabatrin (zaviralec γ -aminobutanojska kislina aminotransferaze) (14, 15).

Vezava kZU običajno poteka v dveh korakih. Prvi je nekovalentno prepoznavanje tarče, ki temelji na klasičnih interakcijah (vodikove vezi, ionske interakcije, van der Waalove sile, interakcije π - π in kation- π) in je opisan z vezavno konstanto K_i . V drugem koraku, ko sta bojna glava in tarča ustrezno orientirani in v bližini, sledi kovalentna reakcija, katere hitrost določa konstanta k_{inact} (slika 3). Za primerjavo učinkovitosti kZU se pogosto uporablja razmerje k_{inact}/K_i , ki povezuje obe fazi vezave.

Srednje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) so za katarakterizacijo kZU neustrezne, saj se z daljšo predinkubacijo liganda z encimom vrednost IC_{50} znižuje. Vseeno so lahko uporabne kot presejalni test za identifikacijo potencialnih kovalentnih zaviralcev (16, 17).

Kovalentna interakcija med kZU in tarčo je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Za ireverzibilne zaviralce velja, da je razpad kovalentnega kompleksa počasnejši od sinteze tarče *de novo* ($k_{reverz} = 0$ ali $k_{reverz} < k_{de\ novo\ sinteza}$, slika 3). Pri reverzibilnih kZU pa kompleks razpade hitreje, kar omogoča natančnejšo regulacijo aktivnosti in manjšo verjetnost haptentizacije, torej nastanka imunogenih produktov. Znani primeri reverzibilnih kZU so vildagliptin in saksagliptin (zaviralca dipeptidil peptidaze 4; tvorba iminoetra), boceprevir (zaviralec nestrukturnega proteina 3 virusa hepatitisa C; tvorba hemiketala), bortezomib (proteasomski zaviralec; tvorba boronatega estera), rivastigmin (zaviralec holin esteraz; tvorba karbamata) (18, 19).

V primerjavi s klasičnimi ZU, ki delujejo izključno prek reverzibilnih interakcij, imajo kZU več prednosti (slika 4). Z ustreznim načrtovanjem, ki vključuje zmanjšanje reaktivnosti bojne glave ter optimizacijo nekovalentnih interakcij v začetnem kompleksu EI (slika 3), je mogoče doseči boljšo jakost delovanja. Zaradi nižjih odmerkov se zmanjšuje tveganje za nespecifične učinke in toksičnost, saj afiniteta do tarče ni več odvisna le od klasičnih interakcij, temveč jo dodatno okrepi kovalentna vez. Kljub skrbnemu načrtovanju vseeno ne moremo predvideti ali preprečiti vseh možnih nezaželenih učinkov, ki vključujejo tudi preobčutljivostne reakcije in haptentizacijo, zato je potrebno temeljito testiranje v predklinični in klinični fazah razvoja novih kZU (2–5, 20).

4 NAČRTOVANJE IN RAZVOJ NOVIH KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Načrtovanje novih kZU lahko v grobem razdelimo na dva glavna pristopa. Prvi temelji na izhodiščnem nekovalentnem ligandu, kjer v strukturo liganda načrtno vgradimo elektrofilno bojno glavo, ki je sposobna reagirati s točno določenim aminokislinskim ostankom v tarči. Za ta pristop običajno potrebujemo kristalno strukturo kompleksa ligand–tarča, pri načrtovanju pa si pomagamo s številnimi računalniškimi metodami. Z uporabo tega principa sta bila razvita zaviralca tirozin kinaz: ibrutinib in afatinib. Drugi pristop temelji na rešetanju knjižnic elektrofilnih spojin, kjer najprej identificiramo kovalentne ligande, nato pa z nadaljnjo optimizacijo in struk-

PREDNOSTI

- večja jakost delovanja
- večja učinkovitost ligandov (angl. *ligand efficiency*)
- dolgo zadrževanje na tarči in daljši učinek
- uporaba nižjih odmerkov
- manj verjeten pojav odpornosti pri onkoloških in protimikrobnih kZU
- možno je ciljanje proteinov, ki so težko dostopni za modulacijo z malimi molekulami
- selektivnost pri TCI
- učinek traja tudi po izločitvi proste kZU iz telesa
- po tvorbi kovalentne vezi ni več substratne kompeticije pri encimskih tarčah
- tipično ugodnejše ADME lastnosti, manjša molekulska masa

SLABOSTI

- neselektivna vezava na izventarčne makromolekule in posledično neželeni učinki (hepatotoksičnost, mutagenost, kancerogenost ...)
- možna haptizacija, alergijski odziv, preobčutljivostne reakcije
- zahtevnejše načrtovanje, razvoj in vrednotenje

Slika 4: Prednosti in slabosti kovalentnih zaviralcev (3, 5, 16). ADME – absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, kZU – kovalentna zdravilna učinkovina, TCI – tarčni kovalentni zaviralci.

Figure 4: Advantages and disadvantages of covalent inhibitors (3, 5, 16). ADME – absorption, distribution, metabolism, elimination, kZU – covalent binding drug, TCI – targeted covalent inhibitors.

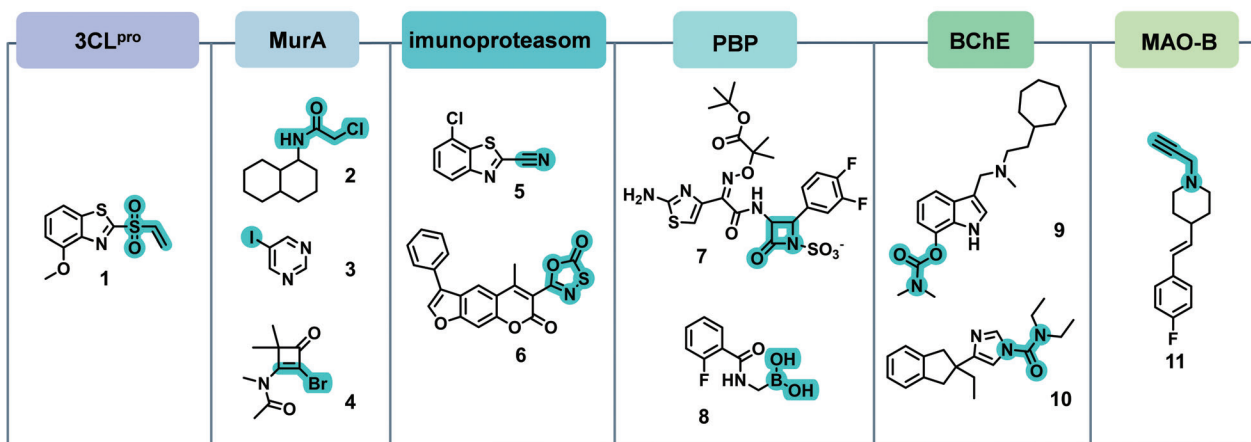
turno podprtim načrtovanjem izboljšamo njihove nekovalentne interakcije z izbrano tarčo. K temu pristopu sodi tudi t. i. »*fragment growing*«, kjer identificiramo reaktivni fragment z elektrofilno bojno glavo, ki mu nato postopoma dodajamo substituentne ter s tem povečujemo afiniteto do izbrane tarče prek nekovalentnih interakcij. Ta metoda omogoča širše preiskovanje kemijskega prostora in je posebej uporabna v zgodnjih fazah odkrivanja zdravilnih učinkovin (1, 10).

Za identifikacijo zadetkov pri obeh pristopih se poleg encimske kinetike pogosto uporabljajo še masna spektrometrija in kemoproteomske metode. Med slednjimi izstopa profiliranje proteinov na osnovi aktivnosti (angl. *activity-based protein profiling*, ABPP), ki omogoča neposredno oceno encimske aktivnosti s pomočjo kemično reaktivnih sond. Te poleg bojne glave vključujejo še poročevalni element, ki omogoča zaznavo vezave, denimo fluorofor ali biotin (21).

4.1 RAZVOJ NOVIH KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA FAKULTETI ZA FARMACIJO

Na Katedri za farmacevtsko kemijo, na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, se že dalj časa ukvarjamo z načrto-

vanjem, sintezo in vrednotenjem novih kovalentnih zaviralcev različnih encimskih tarč. Na sliki 5 je predstavljenih nekaj primerov iz raziskovalnih projektov naše raziskovalne skupine v zadnjih desetih letih. Vinil sulfon (slika 5-1) je bil v času covid-19 identificiran kot kovalenten zaviralec glavne proteaze (3CL^{pro}) virusa SARS-CoV-2 (22). Kloroacetamid (slika 5-2) je bil znotraj serije najmočnejši kovalentni zaviralec UDP-*N*-acetilglukozamin enolpiruvil transferaze MurA, ki je udeležena v sintezi bakterijske celične stene (23). Kovalentna zaviralca MurA sta tudi 5-iodopirimidin (slika 5-3) in bromo-ciklobutenaminon (slika 5-4) (24, 25). 2-cianobenzotiazol (slika 5-5) in psoralenski derivat (slika 5-6) sta bila razvita kot zaviralca podenote β 5i človeške imunoproteasoma (26, 27). Kot zaviralci transpeptidaze penicilin vezočega proteina 1b (PBP1b) iz *Streptococcus pneumoniae* so bili razviti monobaktami, kot je spojina (slika 5-7) (28), in boronska kislina (slika 5-8), ki reagira z lizinom v PBP1b (29). Na področju nevrodegenerativnih bolezni smo odkrili *O*-aril karbamat (slika 5-9) kot psevdoirverzibilen zaviralec človeške butirilholin esteraze ter spojino na sliki 5-10. Slednja je plejotropno predzdravilo, ki karbamoilira in hkrati zavre butirilholin esterazo, ob tem se sprosti druga ZU, α_2 antagonist atipamezol, ki zavre hiperfosforilacijo proteina tau (30, 31). *Trans*-izomer 1-pro-



Slika 5: Nekaj primerov kovalentnih zaviralcev, ki so bili v zadnjih 10 letih razviti v raziskovalni skupini na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. 3CL^{pro} – 3C-podobna proteaza, MurA – UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza, PBP – peniciline vezoči proteini, BChE – butirilholin esteraza, MAO-B – monoamin oksidaza B.

Figure 5: Selected examples of covalent inhibitors developed in the past 10 years by our research group at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana. 3CL^{pro} – 3C-like protease, MurA – UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, PBP – penicillin-binding proteins, BChE – butyrylcholinesterase, MAO-B – monoamine oxidase B.

pargil-4-stirilpiperidina (slika 5-**11**) je selektiven zaviralec monoamin oksidaze B (MAO-B), medtem ko njegov *cis*-izomer selektivno zavira izoformo A. Spojini sta primerni kot vodnici za razvoj novih ZU za zdravljenje depresije in Parkinsonove bolezni (32).

5 SKLEP

Kovalentne zdravilne učinkovine predstavljajo sodoben in racionalen pristop k razvoju ZU. Njihova sposobnost tvorbe stabilnih vezi s tarčo omogoča dolgotrajno in močnejše delovanje, redkejšo odmerjanje ter potencialno manj neželenih učinkov, kar jih postavlja v ospredje predvsem pri zdravljenju onkoloških, infekcijskih in nevroloških bolezni. Čeprav je njihov razvoj povezan z izzivi, kot sta netarčna vezava in morebitna imunogenost, napredek na področju načrtovanja, profiliranja in optimizacije omogoča zasnovo učinkovitih, selektivnih in varnih kovalentnih učinkovin. Z uravnoteženjem reaktivnosti in selektivnosti se kZU uveljavljajo kot pomembno orodje sodobne farmacije pri reševanju kompleksnih terapevtskih izzivov.

6 LITERATURA

- Boike L, Henning NJ, Nomura DK. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Dec;21(12):881–98.
- Kim H, Hwang YS, Kim M, Park SB. Recent advances in the development of covalent inhibitors. *RSC Med Chem.* 2021 May 4;12(7):1037.
- Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Apr;10(4):307–17.
- Raouf YS. Covalent Inhibitors: To Infinity and Beyond. *J Med Chem.* 2024 July 11;67(13):10513–6.
- Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Med Chem.* 2020 Aug 19;11(8):876–84.
- Faridoun, Ng R, Zhang G, Li JJ. An update on the discovery and development of reversible covalent inhibitors. *Med Chem Res.* 2023 June 1;32(6):1039–62.
- Schiemer J, Maxwell A, Horst R, Liu S, Uccello DP, Borzilleri K, et al. A covalent BTK ternary complex compatible with targeted protein degradation. *Nat Commun.* 2023 Mar 2;14(1):1189.
- Bond MJ, Chu L, Nalawansa DA, Li K, Crews CM. Targeted Degradation of Oncogenic KRASG12C by VHL-Recruiting PROTACs. *ACS Cent Sci.* 2020 Aug 26;6(8):1367–75.
- Fu MJ, Jin H, Wang SP, Shen L, Liu HM, Liu Y, et al. Unleashing the Power of Covalent Drugs for Protein Degradation. *Med Res Rev.* 2025;45(4):1045–76.

10. Mehta NV, Degani MS. The expanding repertoire of covalent warheads for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2023 Dec 1;28(12):103799.
11. Huang F, Han X, Xiao X, Zhou J. Covalent Warheads Targeting Cysteine Residue: The Promising Approach in Drug Development. *Molecules*. 2022 Nov 10;27(22):7728.
12. Gehring M, Laufer SA. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem*. 2019 June 27;62(12):5673–724.
13. Hillebrand L, Liang XJ, Serafim RAM, Gehring M. Emerging and Re-emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: An Update. *J Med Chem*. 2024 May 23;67(10):7668–758.
14. Pratt RF. On the definition and classification of mechanism-based Enzyme Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 1992;2(11):1323–6.
15. Copeland RA. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* [Internet]. Wiley; 2013. Available from: <https://books.google.si/books?id=.5yubYumdqWC>
16. De Cesco S, Kurian J, Dufresne C, Mittermaier AK, Moitessier N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur J Med Chem*. 2017 Sept;138:96–114.
17. Strelow JM. A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov*. 2017 Jan 1;22(1):3–20.
18. Patel D, Huma ZE, Duncan D. Reversible Covalent Inhibition Desired Covalent Adduct Formation by Mass Action. *ACS Chem Biol*. 2024 Apr 19;19(4):824–38.
19. Gao J, Nobile V. Chapter Three - Chemistry perspectives of reversible covalent drugs. In: Ward RA, Grimster NP, editors. *The Design of Covalent-Based Inhibitors* [Internet]. Academic Press; 2021. p. 75–94. (Annual Reports in Medicinal Chemistry; vol. 56). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774320300671>
20. Baillie TA. Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(43):13408–21.
21. Chan WC, Sharifzadeh S, Buhrlage SJ, Marto JA. Chemoproteomic methods for covalent drug discovery. *Chem Soc Rev*. 2021 Aug 2;50(15):8361.
22. Mihalovits LM, Kollár L, Bajusz D, Knez D, Bozovičar K, Imre T, et al. Molecular Mechanism of Labelling Functional Cysteines by Heterocyclic Thiones. *ChemPhysChem*. 2024;25(1):e202300596.
23. Grabrijan K, Hrast M, Proj M, Dolšak A, Zdovc I, Imre T, et al. Covalent inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzyme MurA with chloroacetamide warhead. *Eur J Med Chem*. 2022;243:114752.
24. Keeley A, Ábrányi-Balogh P, Hrast M, Imre T, Ilaš J, Gobec S, et al. Heterocyclic electrophiles as new MurA inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2018;351(12):1800184.
25. Hamilton DJ, Ábrányi-Balogh P, Keeley A, Petri L, Hrast M, Imre T, et al. Bromo-Cyclobutenaminones as New Covalent UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) Inhibitors. *Pharmaceuticals*. 2020 Nov;13(11):362.
26. Kollár L, Gobec M, Szilágyi B, Proj M, Knez D, Ábrányi-Balogh P, et al. Discovery of selective fragment-sized immunoproteasome inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2021;219:113455.
27. Sosič I, Gobec M, Brus B, Knez D, Živec M, Konc J, et al. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like ($\beta 5$) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(19):5745–8.
28. Grabrijan K, Benedik NS, Krajnc A, Bozovičar K, Knez D, Proj M, et al. Synthesis and biochemical evaluation of new 3-amido-4-substituted monocyclic β -lactams as inhibitors of penicillin-binding protein(s). *Acta Pharm*. 2024 Sept 14;74(3):423–40.
29. Kollár L, Grabrijan K, Hrast Rambaher M, Bozovičar K, Imre T, Ferenczy GG, et al. Boronic acid inhibitors of penicillin-binding protein 1b: serine and lysine labelling agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2024 Dec 31;39(1):2305833.
30. Meden A, Knez D, Brazzolotto X, Modeste F, Perdih A, Pišlar A, et al. Pseudo-irreversible butyrylcholinesterase inhibitors: Structure–activity relationships, computational and crystallographic study of the N-dialkyl O-arylcarbamate warhead. *Eur J Med Chem*. 2023 Feb 5;247:115048.
31. Meden A, Žnidaršič N, Knez D, Wang Y, Xu Z, Yang H, et al. Pleiotropic prodrugs for both symptomatic and disease-modifying treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B*. 2025 Sept 1;15(9):4807–28.
32. Knez D, Colettis N, Iacovino LG, Sova M, Pišlar A, Konc J, et al. Stereoselective Activity of 1-Propargyl-4-styrylpiperidine-like Analogues That Can Discriminate between Monoamine Oxidase Isoforms A and B. *J Med Chem*. 2020 Feb 13;63(3):1361–87.