
Promiscuity and Selectivity in Covalent Enzyme Inhibition: A Systematic Study of Electrophilic Fragments

Christian Jöst, Christoph Nitsche, Therese Scholz, Lionel Roux,
and Christian D. Klein *

J. Med. Chem., **2014**, 57, 7590–7599. DOI: 10.1021/jm5006918

Wipf Group Current Literature

Chaemin Lim

12/06/2014

Covalent Inhibitors

- ✓ Covalent ligand-target interactions offer significant pharmacological advantages
 - Increased biochemical efficiency
 - Longer duration of action
 - Potential for improved therapeutic index
 - Potential to avoid some drug resistance mechanisms
- ✓ However, covalent protein modification has also been implied in immunotoxicity and idiosyncratic hypersensitivity reactions, particularly if the covalent inhibitor is highly reactive and/or lacks specificity.

It is therefore of extreme importance to tune the reactivity of the electrophilic “warhead” to the intended enzyme target, in order to avoid off-target reactivity.

Targeted Covalent Inhibitors

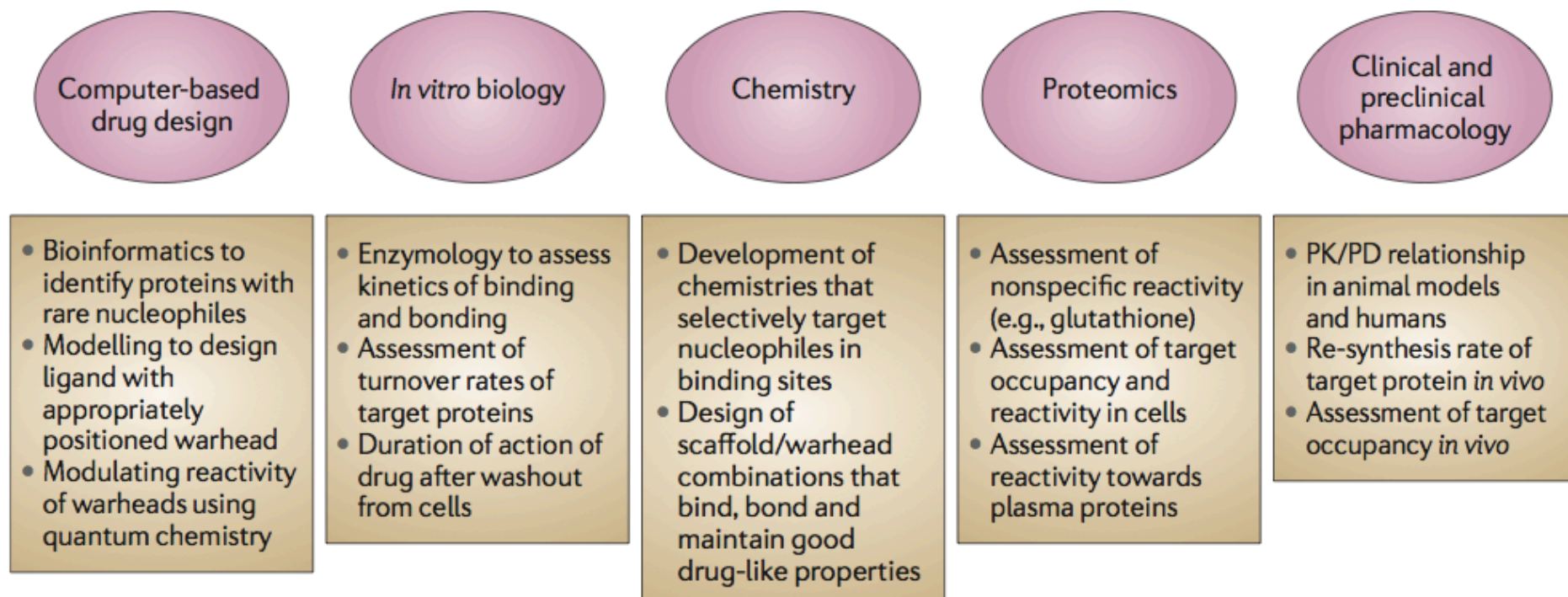


Figure 3 | **Special considerations in the discovery and development of targeted covalent inhibitors.** For each area, specific activities that are important for designing and optimizing covalent drugs are highlighted. PK/PD, pharmacokinetics/pharmacodynamics.

Covalent drugs – Time line

Predominant examples: aspirin, β -lactam antibiotics, proton pump inhibitors, etc...

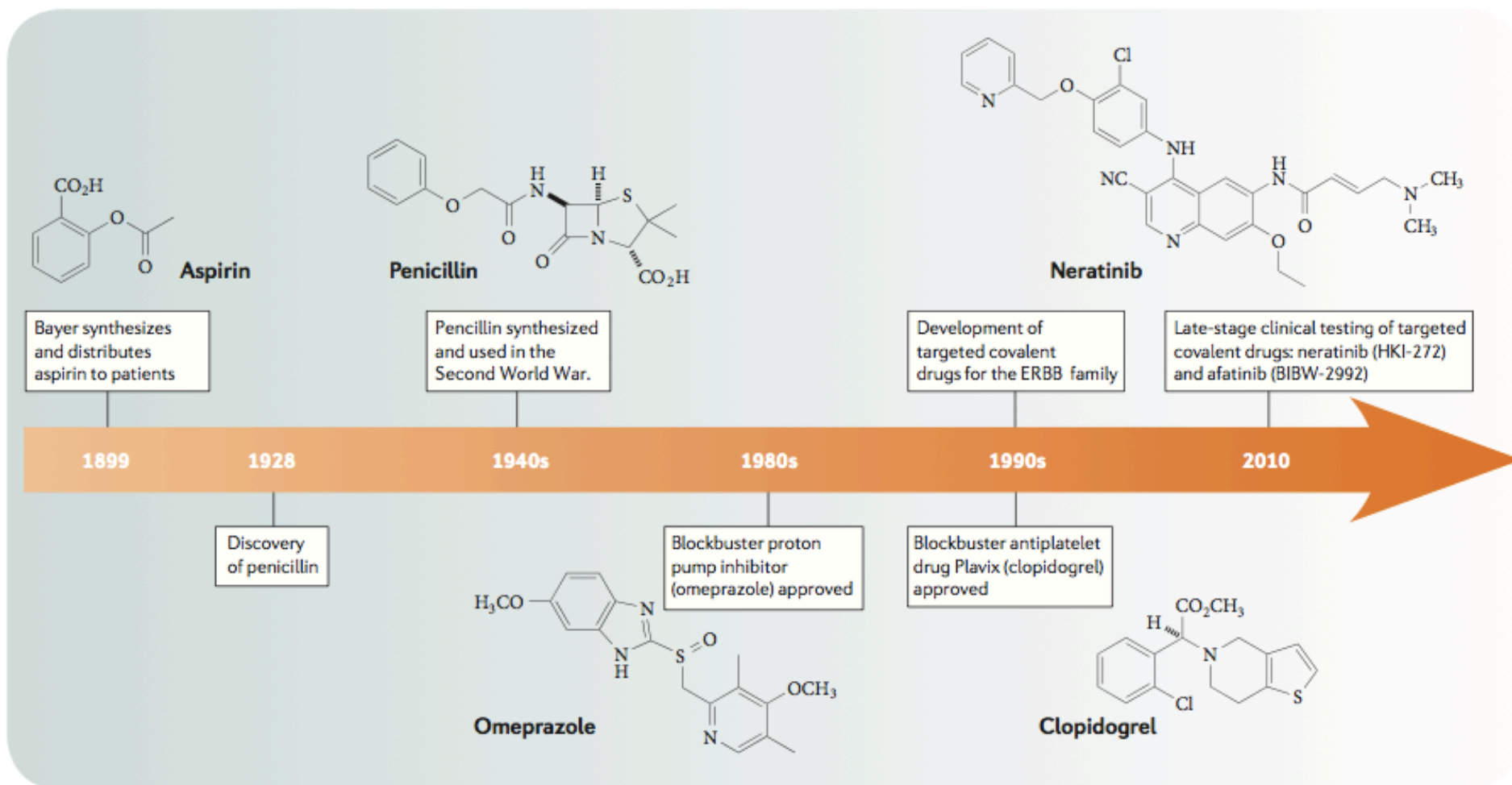
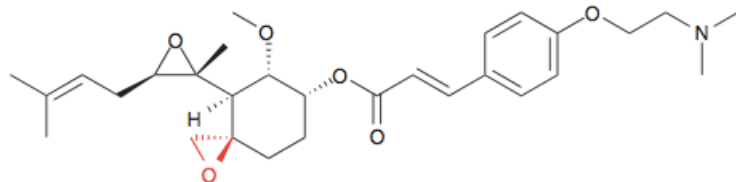


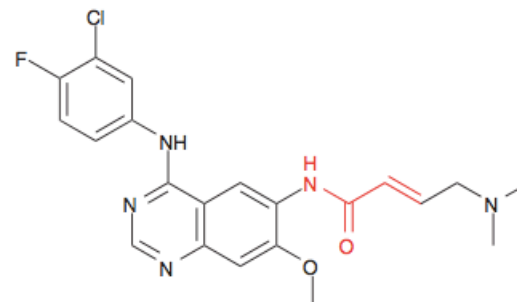
Figure 2 | **Timeline of covalent drugs.** Over the past 100 years there have been many examples of medicines that are covalent drugs.

Representative illustrations of new covalent drugs



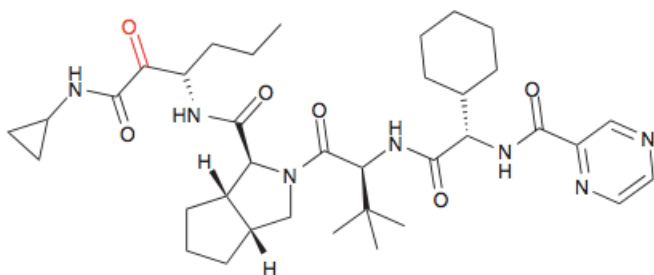
ZGN-433 (Beloranib) (Zafgen Pharma)

Biochemical target: **Methionine aminopeptidase 2**
 Electrophilic site: **Spiro-epoxide (covalent interaction with catalytic histidine)**
 Indication: **Obesity**
 Daily dose - **3 to 6 mg twice weekly, intravenous**
 Clinical status: *End of phase Ib (poised to enter phase II)*



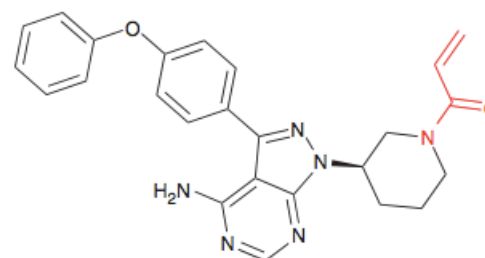
Afatinib (Tomtovok) (Boehringer Ingelheim)

Biochemical target: **HER-2, EGFR tyrosine kinases**
 Electrophilic site: **α,β -unsaturated acrylamide (covalent interaction with cysteine)**
 Indication: **Cancer**
 Daily dose - **40 – 50 mg QD, oral**
 Clinical status: *Phase III -> Launched*



Telaprevir (Incivek™) (Vertex)

Biochemical target: **Hepatitis C virus protease**
 Electrophilic site: **carbonyl (reversible hemiketal with catalytic serine)**
 Indication: **Hepatitis C**
 Daily dose - **2250 QD, oral**
 Clinical status: *Launched*




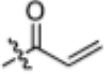
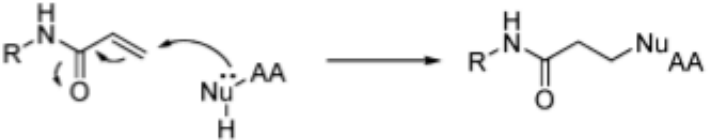
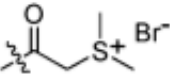
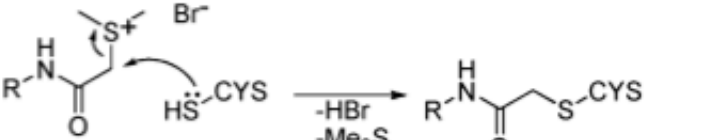
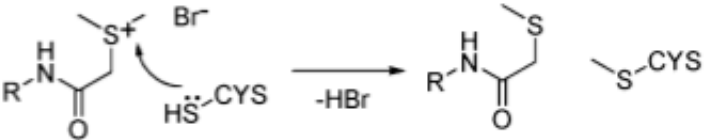
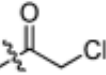
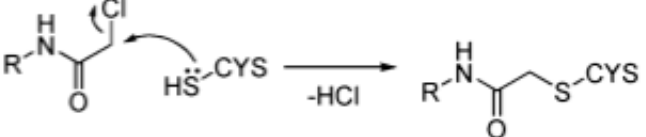
PCI-32765 (Pharmacyclics)

Biochemical target: **Bruton's tyrosine kinase**
 Electrophilic site: **α,β -unsaturated acrylamide (covalent interaction with cysteine)**
 Indication: **Cancer**
 Daily dose - **420 mg QD, oral**
 Clinical status: *Phase II -> Launched (Ibrutinib)*

In this study: Objectives

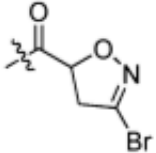
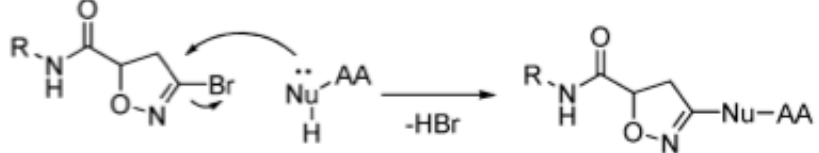
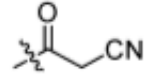

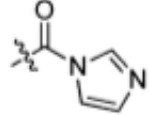
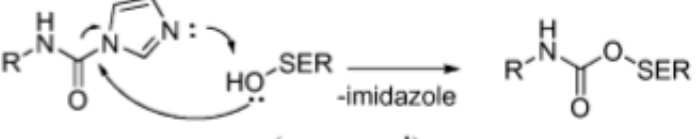
- ✓ First, to study the selectivity and reactivity of an extended group of electrophiles toward biological targets;
 - **Six reactive groups** with modulated electrophilicity were combined with 11 nonreactive aliphatic and aromatic moieties, resulting in a small combinatorial library of **72 fragment-like compounds**.
- ✓ Second, to identify electrophilic fragments that covalently modify the target enzymes
 - Compounds were **screened against a group of 11 enzyme targets** to assess their selectivity and their potential for promiscuous binding to proteins.

Electrophiles for Covalent Protein Modification

#	Electrophile	Targeted nucleophiles	Example	Binding mode
1		-	-	-
2		Cysteine, Threonine	Afatinib ⁴³ Syringolin A ¹⁴	
3		Cysteine	Transglutaminase inhibitors ^{12, 44}	 
4		Cysteine	Metazachlor ¹¹	

- Acrylamides (**2**), dimethylsulfonium salts (**3**), and chloroacetyl amides (**4**) are considered to be electrophiles that primarily react with cysteine residues.

Electrophiles for Covalent Protein Modification

#	Electrophile	Targeted nucleophiles	Example	Binding mode
5		Cysteine	Bromoacivicin ^{16, 45, 46}	
6		Serine	NEP-inhibitors ⁴⁷	
7		Cysteine	Balicatib ⁴⁸	(proposed)
		Serine	L-norvaline methylester azolide ¹⁸	
				(proposed)

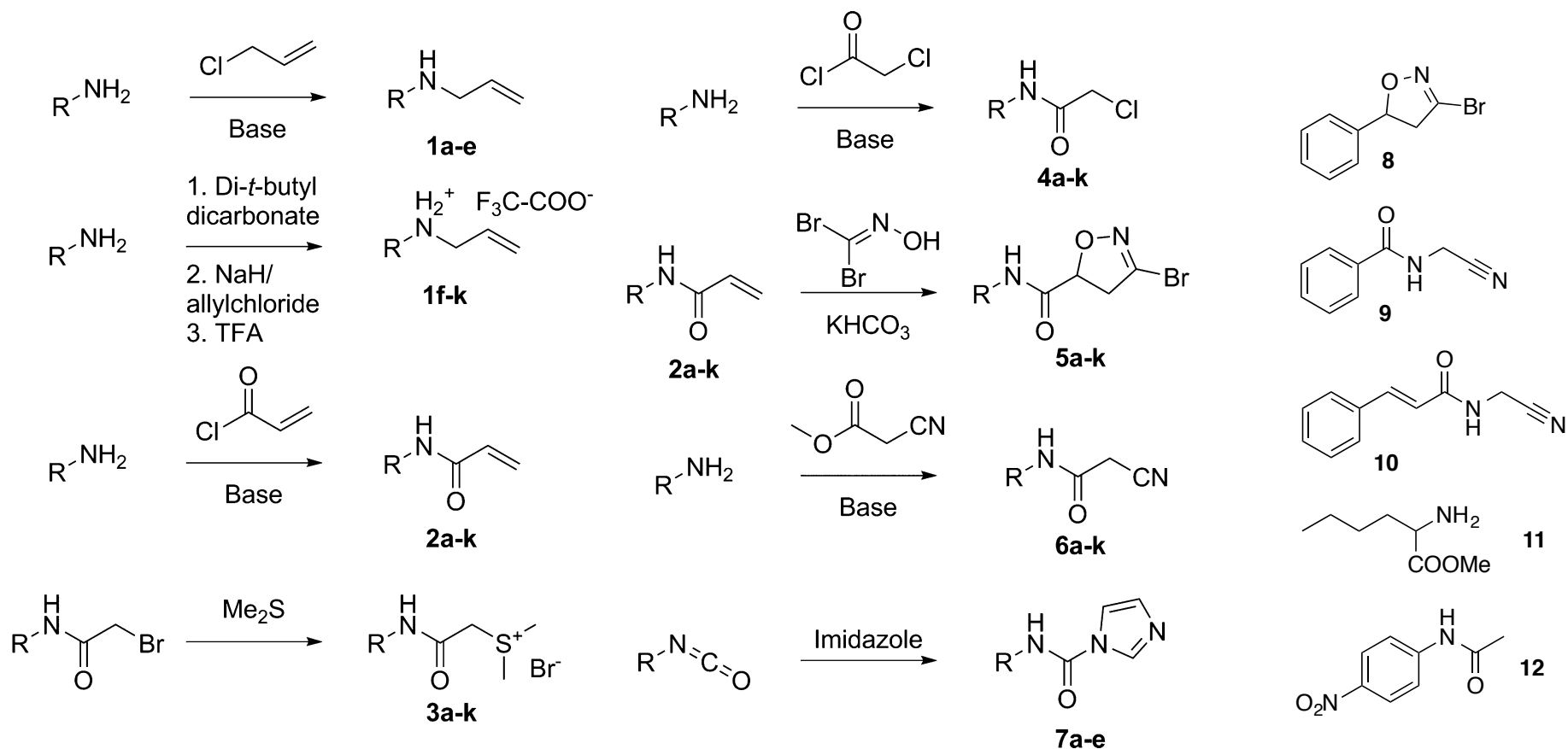
- Bromodihydroisoxazoles (**5**) are expected to target cysteines, serines, lysines, or similar nucleophiles.
- Nitriles (**6**) as well as imidazole-1-carboxamides (**7**) are considered to have a preference for catalytic serine residues.

Target Enzymes

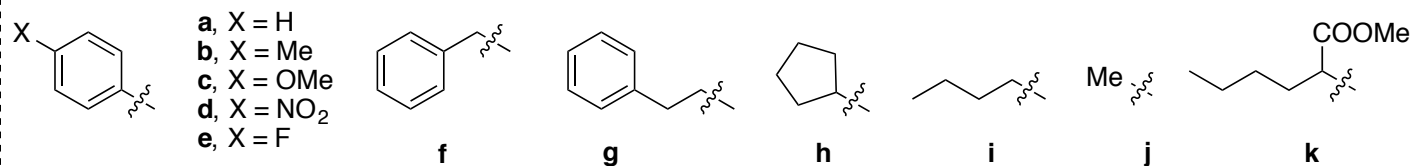
Table 3. Target Enzymes

name	abbreviation	type	native organism	catalyzed reaction	function	nucleophilic residues in or near the active site
dengue virus protease	DEN	serine endoprotease	Dengue Virus	cleavage of viral polyprotein ⁴⁹	production of viral enzymes	SER135 ⁵⁰
West Nile virus protease	WNV	serine endoprotease	West-Nile Virus	cleavage of viral polyprotein	production of viral enzymes	SER135 ⁵¹
thrombin	THR	serine endoprotease	<i>Bos taurus</i>	conversion of fibrinogen (coagulation factor I) to fibrin (factor Ia) ⁵²	coagulation	SER195 ⁵³
<i>E. coli</i> methionine aminopeptidase	ecMetAP	metallo exoprotease	<i>E. coli</i>	cleavage of N-terminal methionine ⁵⁴	protein maturation	HIS79
<i>Homo sapiens</i> methionine aminopeptidase type 1	hsMetAP-1	metallo exoprotease	<i>H. sapiens</i>	cleavage of N-terminal methionine	protein maturation	HIS231 ⁵⁵
<i>E. coli</i> MurA	MurA	transferase	<i>E. coli</i>	transfer of enol pyruvate from PEP to UDP-N-acetylglucosamine	bacterial murein biosynthesis ⁵⁶	CYS115 ⁵⁴
<i>E. coli</i> MurB	MurB	oxidoreductase	<i>E. coli</i>	reduction of EP-UDP-N-acetylglucosamine to UDP-Mur-NAC	bacterial murein biosynthesis	SER229 ⁵⁷
<i>E. coli</i> MurC	MurC	ATP-dependent ligase	<i>E. coli</i>	ligation of L-Ala and UDP-Mur-NAC	bacterial murein biosynthesis	—
<i>E. coli</i> MurD	MurD	ATP-dependent ligase	<i>E. coli</i>	ligation of D-Glu and UDP-Mur-NAC-L-Ala	bacterial murein biosynthesis	CYS413
<i>E. coli</i> MurE	MurE	ATP-dependent ligase	<i>E. coli</i>	ligation of mDAP and UDP-Mur-NAC-L-Ala-D-Glu	bacterial murein biosynthesis	(LYS391)
<i>E. coli</i> MurF	MurF	ATP-dependent ligase	<i>E. coli</i>	ligation of D-Ala-D-Ala and UDP-Mur-NAC-L-Ala-D-Glu-mDAP	bacterial murein biosynthesis	CYS371

Synthesis of the Compounds




group R: Non-reactive moieties that were combined with the electrophiles



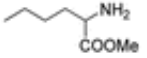
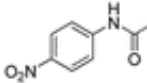
10

Enzyme Inhibition Data

✧ Data for nonreactive controls (**1a–k**, **11**, and **12**)

Reactive group	Substituent	k_{GSH} [l/(mol·s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	<i>ecMetAP</i> [%]	<i>hsMetAP1</i> [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]
 1	a	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	22	16	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	b	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15
	c	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	20	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	d	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	20	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	e	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	f	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	g	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	h	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	i	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	19	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	j	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	k	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

- Show little or no inhibition of any of the enzymes and did not react with GSH on a time scale relevant to the assays.

 11	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	22	n.i.	18	17	n.i.
 12	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

*n.r., no reaction; $k < 0.1 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$;


n.i., no inhibition (<15%);

color code: green, 15-29%.

- Concentration of test compounds: 25 μM for *ecMetAP*, *hsMetAP1*, THR, and MurA-MurF; 50 μM for DEN and WNV.

Enzyme Inhibition Data

✧ Data for acrylanilides and -amides (2a–k)

Reactive group	Substituent	k_{GSH} [1/(mol·s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	<i>ecMetAP</i> [%]	<i>hsMetAP1</i> [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]
 2	a	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	b	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	c	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	d	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	e	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	f	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	g	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	h	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Acrylamide	i	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	20	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	k	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

- The acrylanilides and –amides are inactive in all enzymatic assays. They were not reactive toward GSH on a time scale relevant for the assays (<5% conversion over 3 h), but formation of GSH adducts was detected by LC-MS after extended incubation times.

- Also the unsubstituted acrylamide showed only negligible binding to all enzymes and GSH.

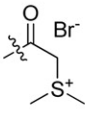
(Earlier report already indicated that acrylamide has a half-life of ~3 h at cellular levels of glutathione (~3 mM))

*n.r., no reaction; $k < 0.1 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; n.i., no inhibition (<15%); color code: green, 15-29%.

- Concentration of test compounds: 25 μM for *ecMetAP*, *hsMetAP1*, THR, and MurA-MurF; 50 μM for DEN and WNV.

Enzyme Inhibition Data

✧ Data for dimethylsulfonium salts (**3a–k**)

Reactive group	Substituent	k_{GSH} [l/(mol·s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	<i>ecMetAP</i> [%]	<i>hsMetAP1</i> [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]	
 3	a		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	32	n.i.	
	b													
	c													
	d													
	e			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15	n.i.	
	f			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	g			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	h			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.
	i			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	29	n.i.
	j			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	14	n.i.	20	n.i.
	k			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	20	n.i.	25	n.i.


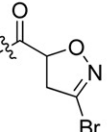
*n.r., no reaction; $k < 0.1 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; n.i., no inhibition (<15%); color code: green, 15-29%.

- Concentration of test compounds: 25 μM for *ecMetAP*, *hsMetAP1*, THR, and MurA-MurF; 50 μM for DEN and WNV.

- Low unspecific reactivity
- **3b–3d** decomposed immediately upon dilution in aqueous media.
- The other dimethylsulfonium salts (**3a, 3e–k**) are stable under aqueous conditions and were not reactive toward GSH.

Enzyme Inhibition Data

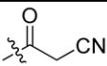
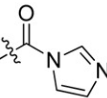
✧ Data for chloroacetylanilides and -amides (**4a–i**) & 2-bromodihydroisoxazoles (**5a–k**)

Reactive group	Substituent	k_{GSH} [1/(mol·s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	<i>ec</i> MetAP [%]	<i>hs</i> MetAP1 [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]	
 4	a	0.10	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	b	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	c	0.13	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	d	0.13	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	e	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	f	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	h	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	i	0.11	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15	n.i.
	 5	a	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
b		n.r.	n.i.	22	n.i.	19	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
c		n.r.	n.i.	21	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	18	n.i.	
d		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	28	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	44	n.i.	
e		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	23	21	
f		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	18	n.i.	16	n.i.	15	
g		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	16	n.i.	18	23	21	
h		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15	16	n.i.	
i		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	27	n.i.	
k		n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	39	n.i.	

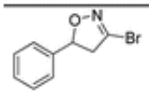
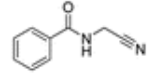
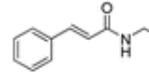
- **4a–i** showed most pronounced reactivity toward GSH of all tested compounds, but no inhibition of any enzyme. The group is therefore a slightly more reactive alternative to the acrylamides (2a-k) but retains a surprisingly low random reactivity.
- **5a–k** show no GSH reactivity and a half-life above 200 h. They showed limited inhibitory potential in the enzymatic assays and also some promiscuous binding, especially against MurE.

Enzyme Inhibition Data (Table 4)

✧ Data for cyanoacetylanilides and -amides (6a–k) & Imidazole-1-carboxamides (7a–k)

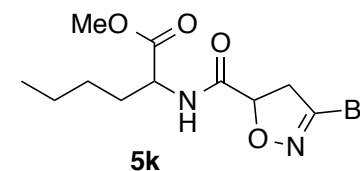
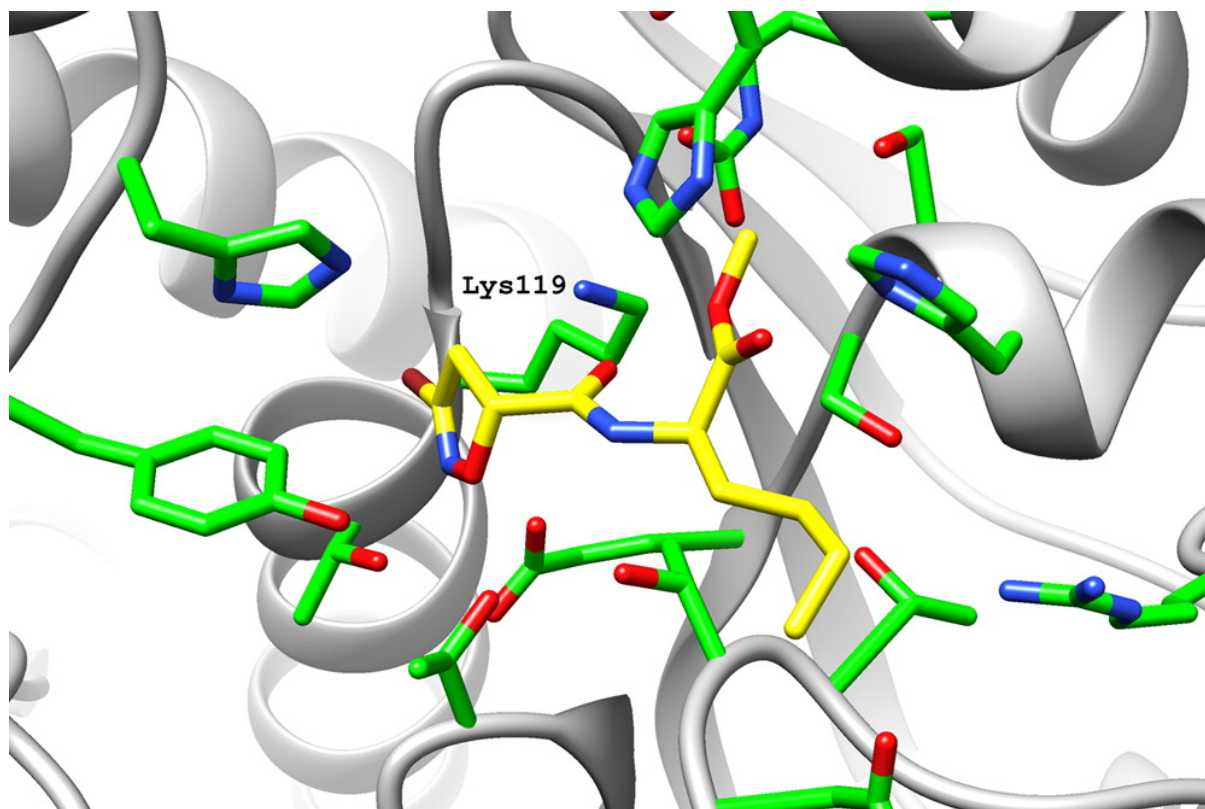
Reactive group	Substituent	k_{GSH} [1/(mol·s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	ecMetAP [%]	hsMetAP1 [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]	
 6	a	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	23	n.i.	
	b	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	c	n.r.	n.i.	16	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15	n.i.
	d	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.d.	n.d.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	e	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	f	n.r.	n.i.	18	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	g	n.r.	n.i.	22	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	h	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	16	n.i.	n.i.
	i	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	j	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	k	n.r.	n.i.	18	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
 7	a	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	b	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	c	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	d	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
	e	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	28	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	

- Not reactive toward GSH, and stable.
- They show no promiscuous binding to the screened enzymes.

Structure	ID	k_{GSH} [1/(mol*s)]	DEN [%]	WNV [%]	THR [%]	ecMetAP [%]	hsMetAP1 [%]	MurA [%]	MurB [%]	MurC [%]	MurD [%]	MurE [%]	MurF [%]
	8	n.r.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.
	9	n.r.	n.i.	23	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	17	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	10	n.r.	17	18	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	20	n.i.	n.i.

Docking Experiment

- The bromodihydroisoxazoles have been described as cysteine-targeting electrophiles, but *ecMurE* does not contain a solvent-exposed cysteine residue.
- To pinpoint the reactive residue of *ecMurE* that interacts with this warhead, four of the most active compounds (**5d**, **5g**, **5i**, **5k**) were submitted to docking experiments.



Docked structure of **5k** in the active site of MurE. Lys119, a potential binding partner for the ligand, is located in the center of the graphic. The carbon atoms of the ligand are shown in yellow. PDB code of the target structure: 1E8C.(33) This figure was generated using Chimera.(34) 16

ESI-MS Analysis & Cell Toxicity Data

- ✓ Active site serines (DEN, WNV, THR, and MurB) are largely resistant toward inhibition by all electrophiles studied here.
- ✓ All compounds that exhibit inhibition of an enzyme were also tested for covalent adduct formation with their corresponding targets, but no adducts were found.
- ✓ The only substance showing cell toxicity with an EC₅₀ value below 50 μM is the chloroacetylanilide **4a**. When compared to **4i**, with equal GSH reactivity and no cytotoxicity below

Table 5. EC₅₀ Values of the Cell Viability Assays^a

compound	1a	1i	2a	2i	acrylamide	3a	3i	4a	4i
EC ₅₀ [μM]	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	20.9	>100

compound	5a	5d	5i	5k	6a	6i	7a	9	10
EC ₅₀ [μM]	>100	73.4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

^aHeLa-cells, incubation time: 24 h, resazurin indicator.

Conclusion

- ✓ Acryl- and chloroacetylamides/anilides as well as 2-cyanoacetamides and imidazole-1-carboxamides exhibit a surprisingly low off-target reactivity and can therefore be considered as suitable warheads in targeted covalent inhibitors.
- ✓ An unexpected but significant consequence of the present study is the relatively low inhibitory potential of the reactive compounds against the analyzed enzymes.
- ✓ In the absence of specific, noncovalent interactions between ligand and target, the covalent binding potential of electrophiles with intermediate reactivity is low.
- ✧ Target enzyme / Toxicity data / Assay condition