

## Válaszok Dr. Szalai Csaba opponensi kérdéseire

Először is köszönetet szeretnék mondani Dr. Szalai Csabának a dolgozat alapos és gyors értékeléséért és bírálatáért. A Bírálóval azon megjegyzésével, hogy szerencsés lett volna egy, a legfontosabb eredményeinket bemutató fejezet beillesztése az értekezésbe teljesen egyetértek, és sajnálom, hogy ennek hiányával többletmunkát adtam. Az alábbiakban az Opponens értekezés olvasása során felmerült megjegyzéseire, kérdéseire kívánok válaszolni:

*A PBA-PCR kapcsolatban felmerült a kérdés, hogy tesztelték-e mások is, illetve mennyire terjedt el a módszer:*

Jelenleg 11 idézettség található a közleményre, és ezek közül egy igazolja, hogy a módszert alkalmazták is a kísérletek során. Ebben a munkában a PBA-PCR segítségével egy sejtes HTS-sel történő kópiaszám variáció analízis érzékenységét növelték.

<https://doi.org/10.1101/2020.01.21.908897> Egy évvel az eredményeink megjelenése után, megjelent egy, a miénkkel azonos elgondoláson alapuló aszimmetrikus PCR. A közleményben a blokkoló primer 3' dideoxy nukleotidot tartalmaz a 3' vég foszforiláció helyett. Meglepő módon ez a módszer csak abban az esetben működik, ha a blokkoló primer csak az első néhány PCR ciklust követően kerül a reakció elegybe.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00401> A többi hivatkozó közleményből nem derül ki egyértelműen, hogy a szerzők kísérleteikben alkalmazták-e a PBA-PCR-t.

A bíráló 6.33. ábrához kapcsolódó szöveges részre vonatkozó megjegyzésével egyetértek, a leírtak valóban félreérthetők. Helyesebb lett volna úgy fogalmazni, hogy a mérés 0,1-20 µg/ml koncentráció-tartományban lineáris.

*Az ábrához kapcsolódó további kérdésként merült fel, hogy jelent-e meg a publikáció a DOS-ELONA módszerről:*

Az első ELONA-nak nevezett eljárás 1996-ban jelent meg, ahol is egy VEGF szelektív ellenanyagot, egy fluoreszcein-jelölt aptamert és egy fluoreszcein specifius és alkalikus foszfatáz-konjugált antitestet használtak a fehérje kimutatására. [doi.org/10.1038/nbt0896-1021](https://doi.org/10.1038/nbt0896-1021) Ismereteim szerint a mi közleményünk ismertette az első teljesen aptameren alapuló ELONA eljárást, és azóta több tucat, tulajdonképp DOS-ELONA-át alkalmazó publikáció jelent meg. E cikkek szerzőinek a döntő része azonban nem ragaszkodott az eredeti ELONA elnevezéshez, elterjedtebbé és általánosabbá vált a ELAA (enzyme linked aptamer assay).megnevezés.

**1. Milyen jövőjét látja az aptamerek vagy a spigelmerek alkalmazásának terápiás és diagnosztikai eljárásokban?**

Amikor aptamerekkel kapcsolatos kutatásaimat elkezdtem még csak tizenöt év telt a felfedezésük óta, és kutatók egy szűk köre dolgozott ezen a területen. Azokban az időkben a résztvevő kutatók az aptamerek gyakorlati életben történő alkalmazását a közeli jövőre vizionáltak, míg az aptamerek általános elfogadottsága meglehetősen alacsony volt. Ha azt vesszük figyelembe, hogy idestova 30 éve írták le az első aptamereket, és egyetlen aptamer jelent meg a terápiában és egyetlen sem a humán diagnosztikában, akkor azt kell, mondjuk, a kételkedők a táborának volt igaza, az aptamerek tudományos szempontból érdekesek lehetnek, de gyakorlati jelentőséggel nem bírnak. Az aptamerekkel kapcsolatos várakozásokat még borúsabbá teszi a Macugen néven forgalmazott, időskori nedves makula

degeneráció (AMD) kezelésére alkalmazott egyetlen aptamer-alapú gyógyszer üzleti sikertelensége. A Macugen nem csak az első aptamer-alapú gyógyszer volt, de egyben a AMD kezelésében is áttörést hozott, mivel ez volt az első VEGF-t megcélzó AMD terápia. A Macugen-ek az évek során számos ellenanyag-alapú kompetitorra jelent meg a piacon, és ezek közül kettő fedti le a piac több mint 90%-át, többségük a Macugen-hez hasonló piaci sikereket mondhat magáénak. <https://doi.org/10.1038/nrd3790> Habár a különböző termékek, hatékonyságáról és alkalmazhatóságáról nincs részletes információ, az ellenanyag-alapúak között vannak a Macugen-nél hatékonyabb szerek is.

Megjegyzendő, hogy a Macugen üzleti sikertelenségének paradoxon módon az aptamerek rendkívüli szelektivitása is részét képezi. A Macugen a VEGF-A izoforma heparinkötő doménjéhez kötődik, ezzel szemben a makula degeneráció kezelés egyik piacot uraló terméke az off label szerként alkalmazott Avastatin, egy, minden izoformát felismerő, teljes VEGF-re generált ellenanyag. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1290077> Habár a Macugen több szempontból is úttörő gyógyszer, üzletileg kudarc, ugyanis 2012-ben kivonták a forgalomból.

Nem kerülhető meg, hogy az aptamerek "népszerűtlenségének" egy további oka ne kerüljön tárgyalásra. Az aptamerkutatók első két évtizedében, egy-egy aptamer szelekciójának leírás elegendő lehetett névös folyóiratokban megjelenő közleményekhez, minek következtében számos olyan aptamer szekvenciája vált ismertté, amelyek nem estek át sem részletes karakterizáláson, sem gyakorlati alkalmazásokban történő tesztelésen. Feltételezhető, hogy számos kutató ezeket az aptamerekkel használva kezdett kísérletekbe, és a negatív eredmények érthető módon az aptamerekből történő kiábránduláshoz vezettek.

Habár az aptamerek mindennapi életben történő megjelenése egyelőre sötét képet mutat, a tudományos szakirodalomban folyamatosan jelennek meg olyan ígéretes közlemények, amelyek igazolják, hogy az aptamerek nem csak egyszerű alternatívái az ellenanyagoknak, hanem új diagnosztikai és terápiás eljárásokat is lehetővé tesznek. Ezek közül csak egy-egy extrém diagnosztikai, illetve terápiás példát szeretnék kiemelni. Larry Gold, a SELEX leírója által alapított vállalatnál (SomaLogic) kifejlesztett technológia, a SomaScan 55 µl mintából 7000 fehérje expressziójának egyidejű mérésére alkalmas. <https://somalogic.com> A metodika iránti igényt jól illusztrálja, hogy a néhány éve elérhetővé vált SomaScan-t használó közlemények száma exponenciálisan növekszik, számuk jelenleg közel 500. Az aptamerekben rejlő, tumoros sejteket megcélzó terápiás lehetőség a DNS origamik aptamerekkel történő kombinálása. A közlemény egy trombinnal töltött, nucleolin szelektív aptamerrel jelölt DNS nanorobotot ismertet, amely a tumoros sejtek felszínén lévő nucleolinhoz kötődve kinyílik, és a kiszabadult trombin a tumor mikro környezetében koagulációt iniciál. <https://doi.org/10.1038/nbt.4071>

Annak fényében, hogy az aptamerek jelenleg nem elérhető teranosztikai eljárásokra nyitnak lehetőséget, költséghatékonyan előállíthatók és a környezeti behatásoknak jól ellenállnak, azt várom, hogy előbb vagy utóbb, de a piacon is meg fognak jeleni.

## **2. Milyen előnyei lehetnek az aptamer alapú vírusdiagnosztikának a PCR (RT-PCR) alapú módszerekkel szemben?**

Habár a gyakorlati jelentősége miatt fontos az aptamer-alapú vírusdiagnosztikát az egyik legáltalánosabb alkalmazott vírus kimutatási eljárással összevetni, a két módszer nehezen összehasonlítható, lévén az egyik a vírus örökítőanyagának, míg a másik a fehérjekomponenseinek kimutatására irányul. További fontos különbség a két megközelítés között, hogy az egyik esetben a detektálandó molekula sokszorozható, míg a másik esetében erre nincs lehetőség. A két módszer előnyei és hátrányai tulajdonképp erre a két

tényezőre vezethetők vissza. A PCR alapú vírusdiagnosztikai rendszerek rendkívül érzékenyek, az amplifikáció viszont magas költségű és általában a feladatnak dedikált laboratóriumot igényel. A diagnosztikai PCR-rel kapcsolatos fejlesztések elsősorban a műszerfejlesztés, a teljes munkafolyamat egy műszerbe történő integrálásának irányába folynak. Meglátásom szerint a nukleinsav-alapú diagnosztikának minden hátránya ellenére is megvan a létjogosultsága, és a fejlesztések egy fontos iránya az izotermális amplifikációs (RCA és LMAP) eljárások további optimalizálása.

A fehérjéken alapuló vírusdiagnosztika költsége általánosságban alacsonyabb, mint a PCR-t használó eljárásoké, és sok esetben helyben és gyorsan kivitelezhetők. A jelenleg elérhető, vírusfehérjéket kimutató rendszerek specificitását ellenanyagok biztosítják. Ezek aptamerekre történő cseréje csökkentheti a költségeket, növelheti a rendszer robusztusságát, illetve gyorsabban előállíthatók a megjelenő új vírusvariánsokra szelektív receptorok. A felsoroltak közül az első két tulajdonság kifejezett előnyt jelent a helyben használatos laterális áramlásos tesztekben (LFA), aptamerek alkalmazásával jól tárolható és könnyen szállítható vírusfehérje detektáló készletek állíthatók össze.

<https://doi.org/10.3390/ph15010090> Habár az LFA tesztek érzékenysége elmarad a PCR-alapúakétól, aptamerekkel is összeállíthatók alacsony víruskimutatási határral rendelkező elektrokémia és optikai szenzorok. Ezen utóbbiak alkalmazása azonban már komolyabb műszerezettséget igényel, így magasabb költségekkel jár, helyben gyakran nem kivitelezhető, így a PCR-alapú vírusdiagnosztikánál is látott tényezők korlátozzák alkalmazhatóságukat.

### **3. Milyen diagnosztikai célokra javasolna DOS-ELONA módszert, kizoríthatja-e esetleg valahol az ELISA-t?**

Az aptamerek hagyományos, mikrotiterlemez ELISA-ban történő alkalmazása "csak" - az aptamerek kedvező kémiai tulajdonságainak, viszonylag gyors és olcsó előállíthatóságuknak köszönhetően - jobban tárolható és költséghatékonyabb rendszereket eredményezhetne. Némi túlzással kijelenthető, hogy a felhasználó szempontjából az ELISA és ELONA közötti gyakorlati különbség a költségigény és tárolhatóság, így addig nem várható, hogy az ELONA válik uralkodóvá, amíg a piaci szereplők nem látják potenciált az ELONA készletek fejlesztésében. Figyelembe véve a tényt, hogy a hagyományos, mikrotiterlemezes ELISA diagnosztikai jelentőség folyamatosan csökken, nem valószínűsíthetők intenzív ELONA fejlesztések.

Mindezek alapján inkább olyan fehérjekimutatási eljárásokban várható az aptamerek térnyerése (pl. nanopórus-alapú szenzorok), ahol technológiailag alkalmasabbak, mint az ellenanyagok. Ebből a szempontból a kis méret és az irányítható kémiai módosítás az aptamerek előnyös tulajdonságai. <https://doi.org/10.3390/s20164495>

### **4. A fehérjeszintézisben használt búzacsíra-alapú rendszerrel van-e lehetőség a humán szervezetre jellemző poszttranszlációs módosításokra?**

Az emlős sejtekben ismert poszttranszlációs módosításokat (foszforiláció, lipidáció, glikoziláció, metiláció stb.) jórészt növényekből származó mintákban is azonosították. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01168>) Az egyéb organizmusokhoz hasonlóan, növényekben is a foszforiláció a legszéleskörűbben feltárt poszttranszlációs módosítás, és az eredmények alapján kijelenthető, hogy a foszforilációs mintázatok az olyan evolúciósan konzervált kinázokon, mint pl. a MAPK-ok, illetve azok szubsztrátjain nagyfokú homológiát mutatnak az állati megfelelőikkel. ([https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6_10)) Hasonló következtetésre jutott az a tanulmány is, amelyben a növényi és humán N-terminális

acetilációt vetették össze, ugyanis az N-terminális leggyakrabban előforduló aminosavak ebben az esetben is átfedést mutattak. (<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015131>) Ezekkel a módosításokkal szemben a humán és növényi glikoziláció karakteres eltérést mutat. (<https://doi.org/10.2174/1381612811319310006>) Ez utóbbi tényező azonban nem befolyásolja az in vitro transzláció eredményességét, mivel a hagyományosan alkalmazott sejtkivonatok nem tartalmazzák mikroszómát, így glikozilált fehérjék termelése nem várható. E megfigyelések alapján elméletileg a növényi sejtkivonatokban is bekövetkezhetnek az emlős fehérjékre jellegzetes poszttranszlációs módosulások, általános kijelentéseket azonban nem megfogalmazhatók, minden fehérje esetében egyedileg kell megvizsgálni a poszttranszlációs módosulásokat. Az erre a kérdésre fókuszáló szakirodalom rendkívül szegényes, legjobb tudomásom szerint humán fehérjére vonatkozó vizsgálatok eredményei nem kerültek közlésre. Japán kollaborációs partnerünk személyes közlése alapján tudjuk, hogy búzacsíra-kivonatban transzlált ecet muslica és humán hisztonokon az N-terminális metionin lehasítása az egyetlen megfigyelhető poszttranszlációs módosítás. A búzacsíra proteomjában 12 olyan fehérjekinázot írtak le, melyek aktiválása nem igényel további faktorokat, a transzlációs elegyben is képesek a katalízisre. (<https://doi.org/10.1007/s10142-005-0018-8>) Ennek megfelelően a búzacsíra fehérjekivonatban várhatóan a foszforiláció a leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítása az előállított humán fehérjéknek. Habár közvetlen eredmények nem igazolják, feltételezhető, hogy a búzacsírában azonosított kinázok humán fehérjekinázok foszforilálására is képesek, mivel a búzacsíra kivonaton alapuló "Human Protein Factory" kísérletek során, olyan humán kinázok is rendelkeztek aktivitással, melyeknek aktivitása foszforiláció-függő. (<https://doi.org/10.1038/nmeth.1273>) Nem kizárható, hogy a heterológ rendszerben bekövetkezett foszforilációk nem várt aminosavakon is bekövetkezhetnek, ez azonban kevésbé valószínű, ugyanis a fehérjekinázok magas szubsztrátspecifitással rendelkeznek. Megfigyeléseink szerint a homológ rendszerben is csak a megfelelő fehérjekináz jelenlétében következik be foszforiláció, a transzlációs elegy endogén kinázai nem módosítják az AtMPK9 fehérjét. (<https://doi.org/10.1042/BJ20141176>) Mindezek figyelembevételével kijelentő, hogy a búzacsíra-fehérjekivonattal előállított fehérjék poszttranszlációs módosítása általánosságban elenyésző, és a poszttranszlációs módosításokhoz kapcsolódó nehézségek az eddigi tapasztalatok alapján nem korlátozzák a búzacsíra-alapú in vitro rendszer alkalmazhatóságát.

Fontos kiemelni, hogy az in vitro rendszerek alkalmazásával kapott adatokat mindent esetben fenntartással kell kezelni, azokat más, lehetőleg in vivo módszerekkel is meg kell erősíteni. Ez a kitétel természetesen az in vitro transzlációval kivitelezett kísérletekre is vonatkozik.

##### 5. *Immunogének-e az aptamerek/spiegelmerok?*

Az eddigi vizsgálatok szerint sem az aptamerek, sem a spiegelmerok nem minősülnek immunogének. (<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105547>) Ilyen tekintetben klinikai fázisban lévő spiegelmerokkal végezték a legkiterjedtebb vizsgálatokat. A vonatkozó kísérlet során nyulakat kezeltek szabad, valamint albuminhoz, illetve PEG-hez konjugált spiegelmerrel a normál immunizálási protokollt követve. A szabad és PEG-konjugált spiegelmerrel immunizált nyulak esetében nem tudtak spiegelmert felismerő ellenanyagot detektálni. Habár az albumin-spiegelmer konjugált kezelést követően kimutatható volt spiegelmer szelektív ellenanyag, az albumint felismerő ellenanyagok titerje ennek többszöröse volt. ([https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00190-4))

Az aptamer kezeléssel kapcsolatos eddigi legkomolyabb mellékhatás a X faktorra szelektív, pegilált aptamer, a Pegnivacogin alkalmazása során figyelték meg. A II. klinikai fázis során a 640 betegből 2 anafilaxiás sokkot kapott, és erről a két betegről igazolták, hogy már a kezeléskor rendelkeztek anti-PEG ellenanyag, és ez, nem pedig az aptamer válthatta ki a súlyos következményeket. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.058> Ennek ellenére, a súlyos mellékhatás miatt a további klinikai vizsgálatokat leállították.

Összességében, az eddig kivitelezett in vivo kísérletek azt igazolták, hogy az aptamerek nem immunogének. Ezeknek az eredményeknek némiképp ellentmond egy sejttes rendszeren kivitelezett kísérleteket ismertető közlemény, amelyben azt találták, hogy az aptamerkezelés hatására emelkedett bizonyos citokinek expressziója. Ennek fényében a terápiás alkalmazásuk előtt – csak úgy, mint az ellenanyag- és fehérje-alapú gyógyszerek esetében - elengedhetetlen az immunogenitás vizsgálatok kivitelezése.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068810>

Még egyszer szeretném kifejezni a hálámat a Bírálónak, hogy időt szentelt az értekezés alapos értékelésére és olyan kérdéseket vetett fel, melyek megválaszolásával az értekezésben nem tárgyalt témákat is tárgyalhattam.

Budapest, 2022. június 7.



Mészáros Tamás