



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



VÁLASZOK WÖLFLING JÁNOS BÍRÁLATÁRA

Köszönöm Bírálónak a dolgozatomra adott pozitív értékelését az értekezésben szereplő eredmények elismerését, valamint, jövőbemutató, koncepcionális kérdéseit melyek megválaszolása lehetőséget ad a téma jelenlegi kihívásainak, jövőbeli kutatási irányainak ismertetésére. Köszönöm, és elfogadom a bírálónak a dolgozattal kapcsolatos kritikai megjegyzéseit.

Meg lehet-e határozni a bioortogonális reakciók hozamát az élő sejtekben? Amennyiben igen, milyen módszerek állnak ehhez rendelkezésre?

A bioortogonális reakciók hozamának sejten belüli meghatározása több tényezőtől függ. Így például döntően befolyásolja azt a reagensnek membrán-permeabilitása, stabilitása vagy a reakció sejten belüli kinetikája. Az sem egyszerűsíti a helyzetet, hogy rendszerint csak az egyik bioortogonális reagens koncentrációját ismerjük pontosan, a másik, ellenoldali bioortogonális funkciót biotechnológiai eljárással juttatjuk a cél-biomolekulába (metabolizmus, genetikai kódolás). Mindazonáltal van lehetőség arra, hogy a reakciók sejten belüli kinetikáját vagy akár hozamát meghatározzuk. A sejten belüli reakció kinetikája jól becsülhető pl. bioortogonalizált fluoreszcens fehérjék fluoreszcens jelölésével, majd a két kromofór közti energiatranszfer mérésével, ahogy azt mi is tettük: <https://doi.org/10.1002/cbic.201600284>. Amennyiben kimondottan a bioortogonális reakció sejten belüli hozamának a meghatározása a cél, adhatjuk mindkét reagenst ismert koncentrációban. Teljes membránpermeabilitást feltételezve és kellő időt hagyva a sejten belüli akkumulációra, a második lépésben az ellenoldali bioortogonális funkcióval rendelkező jelzővegyületet (radionukliddal jelzett, fluoreszcens/fluorogén vegyület) hozzáadva a reakció előrehaladása akár időben is követhető, majd a végső mennyiség is meghatározható a jel intenzitásából. Ezen kívül lehetőség van a bioortogonális reakció termékének meghatározására a sejt(ek) lízisét követően tömegspektrometriás módszerekkel is. Pl. az előzetesen bioortogonalizált fehérjéhez egy affinitás címkét is fuzionálva az össz-bioortogonalizált és a bioortogonális reakcióban átalakult fehérje mennyisége is meghatározható. Ily módon egyébként fluoreszcens módszerek segítségével is meghatározható a hozam. Példák hasonló megközelítésekre: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00355>, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00494>.

Az el nem reagált reagens jelenléte, vagy az esetleges mellékreakciók termékei nem okozhatnak-e toxicitást in vivo, pl. az emberi szervezetben? Eltérő lehet-e a bioortogonálisan módosított származékok metabolizmusa a módosítatlanokétól? Vélhetően így van. Nem okoz ez humán alkalmazás esetén problémákat?

Bár a bioortogonalitás definíció szerint biokompatibilis (azaz nem toxikus) és szelektív reakciókra igaz úgy a reagens, mint a termékek oldaláról, a humán alkalmazás szempontjából természetesen szükséges vizsgálni ezeket a tulajdonságokat. A kérdés rendkívül időszerű. A bioortogonális reakciókon alapuló megközelítések ugyanis a közelmúltban (2020) jutottak el a klinikai fázisba (Shasqi – fázis 2, illetve Tagworks – <https://www.tagworkspharma.com/pipeline>; fázis 1 2025-ben kezdődik) és csak mostanában kezdenek el gyűlni az ilyen jellegű adatok, melyek közül egyelőre kevés nyilvánosan hozzáférhető. E két humán alkalmazás a tetrazin – transz-ciklootén reakció által kiváltott kötőhasítási (click-to-release) megközelítéssel kapcsolatos, mely segítségével kémiai kontrolláltan szabadítható fel



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



gyógyszerhatóanyag. Ezekben az eljárásokban az alkalmazott bioortogonális reagensek stabilitása, biokompatibilitása megfelelő, esetleges bomlásuk során sem tapasztaltak toxikus mellékhatásokat. A két megközelítés kémiaiilag hasonló, ám koncepciójában eltérő. A Shasqi technológia a pretargeting elvet alkalmazza a lokalizáció elérése érdekében, ezt tetrazinnal módosított hidrogél injektálásával (<https://doi.org/10.1002/adtp.202000243>) vagy antitestekkel (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.3c00365>) érik el. A Tagworks ezzel szemben az antitest-hatóanyag konjugátumok (ADC) működési elvét használja ki, nem internalizálódó antigént felismerő antitesthez/diabodyhoz transz-ciklookténon (TCO) keresztül konjugált hatóanyaggal (Doxorubicin, Dox vagy monometilaurisztatinnal, MMAE). A Shasqi módszer esetében a tetrazint tartalmazó hidrogél injektálása után szisztémásan adják a transz-ciklookténnal (TCO) inaktivált hatóanyagot (Dox) (prodrug), mely a pretargeting helyén található tetrazin molekulákkal lokálisan felszabadul, miközben az el nem reagált TCO-Dox a kismolekulákra jellemző gyors kiürülési mechanizmust követi. A Tagworks eljárásban a tumor környezetében történő ADC feldúsulását követően (antitest esetén még beiktatnak egy ún. clearing eljárást, mellyel kivonják a szervezetből (gyors májon keresztüli kiürüléssel) a még szabadon keringő Ab-TCO-Dox konjugátumot), a kismolekulás aktivátor tetrazint adják szisztémásan. A Tagworks hozzáférhető adatai alapján behatóan tanulmányozták a szisztémásan adagolt reagensek stabilitását, keringési idejét, kiürülését. Ezek alapján az aktivátor tetrazinnak pl. 12 perc a keringési felezési ideje, a nem kötődő diabody-konjugátum pedig egerekben 2 nap alatt teljesen kiürül, ami jól illeszkedik a TCO reagens 5,5 napos inaktiválási felezési idejéhez (<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03880-y> és <https://doi.org/10.1007/s41061-025-00495-y>). Fontos megjegyezni, hogy ezekben az alkalmazásokban a klikk-termékek nem önmagukban keletkeznek, hanem vagy antitesthez/diabodyhoz (Tagworks), vagy egy hidrogél implantátumhoz kötve (Shasqi). Az antitesteknek a kis bioortogonális csoporttal való módosítása gyakorlatilag nem befolyásolja azok farmakokinetikai szempontból alaposan jellemzett tulajdonságait, míg a másik megközelítésben a klikk termék nem hagyja el az implantátumot.

A Memorial Sloan Kettering Cancer Center által fejlesztett, eredetileg csontrák bioortogonális kémiai alapú képalkotó diagnózisára alkalmas eljárás ugyancsak a pretargeting megközelítésen alapul. A kutyákban sikerrel alkalmazott megközelítésben a csontrákos sejteket biszfoszfónáttal módosított TCO vegyülettel célozták, majd ezt követően PET képalkotásra alkalmas rézkomplexszel módosított tetrazinnal (^{64}Cu -Tz) jelölték (<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00220>). A kísérletek igazolták, hogy az egészséges sejtek csak minimális mértékben vették fel a radioligandot, annak feldúsulását a célterületen kívül a vesékben és a húgyhólyagban figyelték meg, ami a hatékony kiválasztásnak volt köszönhető. E pretargeting megközelítés analógiájára jelenleg hasnyálmirigyrák PET diagnózisára alkalmas, antitest alapú pretargeting módszert fejlesztettek ki, melyet jelenleg a klinikai fázisban (fázis 1) tesztelnek.

A fehérjék bármilyen jellegű módosítása befolyásolhatja azok eredeti funkcióját, stabilitását. A törekvés a bioortogonális kémiában nyilvánvalóan az, hogy ez ne következhesen be, ez lenne az ideális eset. Ismeretesek-e a bioortogonális reakciók kapcsán erre vonatkozóan kutatási eredmények a szakirodalomban?

Fehérjék bioortogonális módosításának legfejlettebb, a fehérje funkciójának és szerkezetének legkisebb perturbációjával járó módja az, amikor a fehérjében előzetesen pontmutációval egy természetes aminosavat kicserélünk egy bioortogonalizált, nem-természetes aminosavra. Annak lehetőségei, hogy ezt az aminosav cserét olyan helyen ejtsük meg, ahol nem okoz funkció- vagy szerkezetbeli változást az évek során jelentős fejlődésen mentek keresztül. A korábbi empirikus/racionális megközelítések általában 5-6 mutáció tesztelésével azonosítottak egy-egy optimális mutációs helyet, ahogy ezt mi is tettük <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2025-k7vd4>. Az AlphaFold térnyerésével azonban már sokkal nagyobb



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



számú, több szempontot figyelembe vevő szűrések eredményeként jelölnek ki mutációs helyeket a fehérjeszekvenciában. Jó példa erre Nikic és mtsainak munkája (<https://doi.org/10.1242/jcs.260600>), akik az AlphaFold segítségével utólagosan értették meg, hogy az empirikus/racionális módszer alapján a funkció szempontjából jónak ítélt mutációs hely miért nem eredményezte a fehérje sikeres jelölését a bioortogonális reakcióban annak ellenére, hogy a nem-természetes aminosav hatékonyan beépült és a fehérje funkciója is megmaradt. Kiderült, hogy a bevitt bioortogonális funkció egyszerűen nem hozzáférhető a jelzővegyület számára.

Az eddig alkalmazott bioortogonális reakciók száma meglehetősen alacsony az ismert szerves kémiai reakciók számához viszonyítva. Lehet-e ebben a tekintetben arra vonatkozóan javaslatot tenni, hogy ezt a számot milyen módszerekkel lehetne jelentősen bővíteni? Tekintettel a téma terület fontosságára, ilyenekre minden bizonnyal szükség lenne.

A bioortogonális kémia bő két évtizedes történelmének első fele olyan reakciók felfedezéséről, gyakran az új perspektívában történő újralfedezéséről szólt, melyek többé-kevésbé kielégítik a bioortogonalitás feltételeit. Bár jóval ritkábban, de mostanában is jelennek meg új bioortogonális reakciókról szóló cikkek, így ezek száma, ha lassabban is, de folyamatosan bővül (pl. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201708790>). A mostani bioortogonális kutatási trendek azonban egészen más irányt vettek. Előtérbe kerültek olyan kutatások, melyek az ismert bioortogonális reagensek belső, pl. enzimatis, vagy külső, pl. fény-általi aktiválását célozzák. Ugyancsak megnőtt azoknak a bioortogonális kémiával foglalkozó kutatásoknak a száma, ami a bioortogonális reakciók által előidézett kötés hasítással foglalkoznak (click-to-release). Míg ez utóbbi messzebb visz a kérdéstől, a bioortogonális reakciók átmeneti blokkolásán és adott triggerrel való aktiválásán alapuló eljárások olyan irányt képviselnek, melyek a meglévő bioortogonális eszközkészleten belüli diverzifikálást eredményeznek. Pl. ha ugyanannak a bioortogonális funkció csoportnak a reaktivitását két, egymásra nézve kölcsönösen ortogonális triggerrel tesszük aktiválhatóvá, akkor a triggerek megfelelő sorrendben történő alkalmazásával idő- és térbeli mintázatot érhetünk el a bioortogonális reakciók lefolyásában. Ez többcsatornás, ún. multiplexing képalkotó eljárásokban különösen előnyös. Több bioortogonális reakció ortogonális triggerrel való aktiválása pedig a komplexitás további növekedését eredményezheti.

A téma területén a Diels-Alder reakciók közül az inverz elektronigényűek a gyakran alkalmazottak. Elképzelhető-e normál elektronigényű, esetleg hetero-Diels-Alder reakciók is a bioortogonális kémiában?

Az inverz elektronigényű Diels-Alder reakciók valóban dominálnak a bioortogonális kémiában, azonban találunk példát ettől eltérő mechanizmusra is. Waldmann és munkatársai butadién és maleimid származékok között lejátszódó normál elektronigényű Diels-Alder reakciót használtak fehérjék üvegfelületen való immobilizálására (<https://doi.org/10.1002/anie.200502266>). A maleimid dienofil főleg tiol típusú nukleofilekkel szembeni reaktivitása azonban erősen gátolja a kémiai reakció in celluló alkalmazását. Ráadásul a normál elektronigényű reakció sebessége is jóval elmarad a tetrazinok és feszült gyűrűs rendszerek inverz elektronigényű reakciójának sebességétől. Az irodalomban találunk példát arra is, amikor a reakció „elektronigénye” a diéneken lévő helyettesítőktől függ. Jó példa erre Wang és munkatársainak kutatása, amelyben ciklopentadién származékok és ciklootkin közti reakciót vizsgáltak fluorogén jelzés céljából (<https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02654>).

Hetero Diels-Alder reakciók bioortogonális alkalmazására pedig jó példa o-kinon metid típusú vegyületek vinil-(tio)éterekkel való reakciója (<https://doi.org/10.1021/ja401989p>; <https://doi.org/10.1021/ja302970x>; <https://doi.org/10.1039/D1OB00697E>).



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



Bár e megközelítések egyelőre nem terjedtek el széleskörűen a bioortogonális kémiai alkalmazásokban, a bioortogonális kémiai kutatások új irányai ráirányíthatják a figyelmet ezekre a reakciókra. Ebből a szempontból, véleményem szerint, a kinon-metid alapú reakcióknak különös jelentőségük van, hiszen generálásuk -enzimatis vagy fotokémiai úton- további kontrollelemek integrálását teszi lehetővé.

Úgy tűnik, hogy bizonyos szintézislépések során, gyengébb hozam esetén nem optimalizálták a reakciókörülményeket a hozam javítása érdekében, hanem csak elfogadták azt, esetleg kerestek egy másik reakcióutat. Így volt-e?

A csoportunkban folyó kutatások során valóban kevesebb hangsúlyt fektettünk az egyes reakciók körülményeinek optimalizálására. Ez elsősorban amiatt van így, mert a célmolekulák felhasználásán van a hangsúly, nem pedig az előállításán. A csoportunkban az utóbbi öt évben elkezdett új kutatási irányok miatt viszont már fontosabb szempont (klinikai transzláció, forgalmazás) a vegyületek jó hozammal történő előállítása. Ezek miatt az okok miatt, illetve a lassan változó nemzetközi trendekhez illeszkedve, melyeknek köszönhetően nagyobb ellenállást tanúsítunk a publikációs nyomással szemben, az utóbbi időben mi is igyekszünk a kémiai szempontból fontos ismeretek alaposabb tanulmányozására.

Budapest, 2025 április 4.

Kele Péter