



Kele Péter

Természettudományi Kutatóközpont

Nobel-díj klikkelésért?

A különböző tudományterületek iránt elkötelezett kutatók minden ősszel izgatottan várják az új Nobel-díjasok neveinek kihirdetését. Így volt ez 2022. október 5-én, az idei kémiai Nobel-díj esetében is. Előzetes találgatások persze mindig vannak: vajon mely kémiával kapcsolatos terület képviselői lesznek a kitüntetettek? Az előző években már többször felmerült a klikk-kémia üttörőinek neve. Idén pedig valóban K. Barry Sharpless és Morten Meldal számára ítélte oda a Nobel-bizottság a rangos elismerést a klikk-kémia alapjainak lefektetéséért. A harmadik kitüntetett Carolyn Bertozzi, akinek neve a klikk-reakciókon alapuló eljárások élő rendszerekben való alkalmazhatóságával, az ún. biortogonális kémiával forrt össze immár (1. ábra). [1]

De mi is az a klikk-kémia?

Bonyolult, például fiziológiai hatással rendelkező molekulák előállítása akár hónapokig, évekig is elhúzódhat, míg nem ritkán 10–20 kémiai reakció eredményeként, az egyszerű alkotóelemek összekapcsolásával eljutnak a komplex tulajdonságokkal rendelkező célvegyületig. Közben az egyes reakciókat gyakran lépésenként kell optimalizálni, hogy a kívánt átalakítás megfelelő hozammal szolgáltassa az egyes köztermékeket. Mennyivel egyszerűbb lenne, ha az egyes építőelemeket akár változtatható sorrendben is, jó hatásfokkal tudnánk összekapcsolni! Valószínűleg Barry Sharpless fejében is ez járhatott, amikor az élő szervezeteket felépítő biopolimerek bioszintetikus folyamatait alapul véve lefektette a klikk-kémia alapjait 2000-ben. [2] Közleményében összegyűjtött egy tucat már ismert reakciót, melyek számos oldószerben, így akár vizes közegben, széles hőmérsékleti és pH-skála mellett is megbízhatóan, jó hatásfokkal játszódnak le, melléktermékek keletkezése nélkül, egyszerűen tisztítható termékek eredményezve. E reakciók gyors és hatékony lejátszódása a reaktánsok magas energiataralmából fakadó nagy termodinamikai hajtóerőnek köszönhető. A klikk-paradigmát közlő munkájában alapvetően szén-heteroatom kötések kiépítését eredményező re-



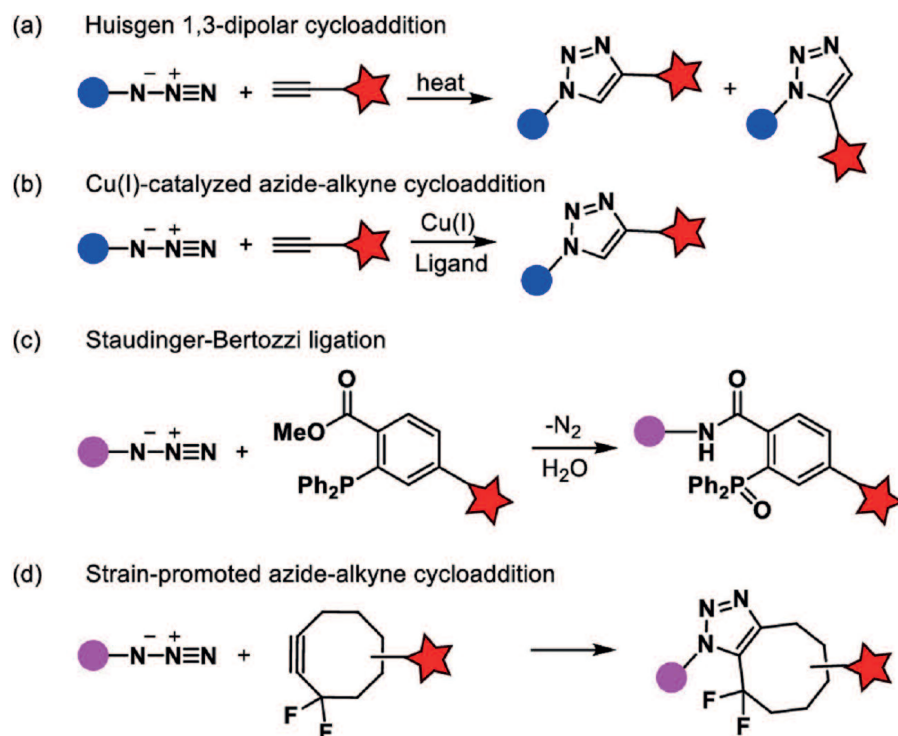
1. ábra. Carolyn Bertozzi, Morten Meldal és K. Barry Sharpless (<https://cen.acs.org/people/nobel-prize/Click-bioorthogonal-chemistry-win-2022-Nobel-Prize-in-Chemistry/100/i36>)

akciókat, például cikloaddíciók (pl. 1,3-dipoláris cikloaddíciók), Diels–Alder-reakciókat vagy feszült gyűrűs rendszerek (pl. epoxidok, aziridinek) felnyílásával járó nukleofil szubsztitúciós átalakításokat sorolt fel. Nem sokkal később, Sharpless és Meldal egymástól függetlenül egy időben köz-

zétették felfedezésüket egy régen ismert reakció módosításáról, ami azóta a klikk-kémia egyik legismertebb kémiai átalakítása lett.

Azidok és alkinok termikus aktiválást igénylő, magas hőmérsékleten lejátszódó, két regioizomer triazol termék eredményez-

2. ábra. a) Huisgen 1,3-dipoláris cikloaddíció, b) azidok és alkinok Cu(I)-katalizált cikloaddíciója, a Bertozzi által kifejlesztett c) Staudinger–Bertozzi- és d) gyűrűfeszültség által hajtott azid-alkin reakció ([6])





nyező reakciója már a hatvanas évek óta ismert volt a német Rolf Huisgen munkásságának köszönhetően (2.a ábra). [3] Sharpless és Meldal felfedezte, hogy ha réz(I)ionokat adunk katalitikus mennyiségben azidok és láncvégi alkinok elegyéhez, már szobahőmérsékleten is végbemegy a reakció, szinte 100%-os hozammal, ráadásul regiospecifikusan, kizárólag az 1,4-triazol terméket eredményezve (2.b ábra). [4,5] A réz(I)ionok oxidációjának elkerülése érdekében gyakran alkalmaznak különféle komplexáló ágenseket is, például C-vitamint, amely egyben redukálószerként is funkcionál. Kísérletek hosszú sora igazolja, hogy a Cu(I)-katalizált azid-alkin cikloaddíció (CuAAC) a klikk-kémia minden feltételének megfelel. A kutatókból olykor olykor előbújó *Homo ludens*re jellemző, hogy a szóban forgó reakció tolerálóképességét narancsleben, emberi vérben és whiskyben is tesztelték – sikeresen. [6]

Az azóta a klikk-kémia „zászlóshajója” ismert réz-katalizált azid-alkin reakció az évek során számos alkalmazásra talált. A különböző építőelemekből levezethető vegyülettáráktól a bonyolult gyógyszerjelölt vegyületek előállításán és az anyagtudományon át a DNS-térképezésig szinte mindenhol találkozhatunk vele. Még sejtek biomolekuláinak kémiai módosításai is kivitelezhetők e reakcióval, bár a szükséges rézionok mérgező hatása miatt a réz-katalizált azid-alkin reakció élő sejtekben való alkalmazása erősen korlátozott. Történetek ugyan próbálkozások arra, hogy a Cu(I)ionokat a katalitikus tulajdonság megtartása mellett különféle ligandumokkal „ártalmatlanítsák”, ám ezek a megoldások nem terjedtek el a klikk-kémiát biológiai rendszerekben alkalmazni akaró kutatók körében. [7]

A fehérjék kémiai módosítására alkalmas klasszikus módszerek, mint a nukleofil motívumot tartalmazó aminosavak (Cys, Lys) oldalláncait elektrofil ágensekkel (pl. Michael-akceptorokkal, izotiocianáttal) célzó megoldások, általánosan elterjedtek voltak a biológiai rendszereket a kémia eszközeivel vizsgáló kutatók körében, ám e módszerek csekély specificitással rendelkeznek. A szelektivitás növelése érdekében kidolgoztak ugyan ritkán előforduló, specifikus reaktivitással rendelkező aminosav-oldalláncokat (Trp, Tyr) célzó módszereket is, ám itt is számolni kellett a kémiai módosítás kevésbé specifikus kivitelezésével. Carolyn Bertozzi egy merőben új megközelítést javasolt e probléma megoldására. A természetben előforduló csoportok helyett inkább olyan nem természetes, bio-

lógiailag és kémiailag is inert funkciókra irányult a figyelme, melyek szelektív reakcióba vihetők egymással. Sikerral azonosított egy ilyen reakciót, mely azidok Staudinger-féle, foszfánokkal történő redukcióján alapul. Olyan foszfán-származékokat fejlesztett ki, melyek egy elektrofil csapdát tartalmaztak, így alkalmasak a redukciós lépésben keletkező intermedier intramolekuláris befogására stabil kovalens kötés kiépülése mellett (2.c ábra). További megoldandó feladat volt a cél-biomolekulák előzetes módosítása az egyik ilyen nem természetes motívummal. Az azid funkciós csoport kis mérete lehetővé tette, hogy azido-építőelemek, például Bertozzi esetében az *N*-azidoacetilmannózamin, a sejtek metabolizmusa segítségével épüljenek be a felszíni glikánstruktúrába. Az azóta Staudinger–Bertozzi ligációs eljárásról ismert módszer hatékonyságát számos példán keresztül ismerhettük meg. [8]

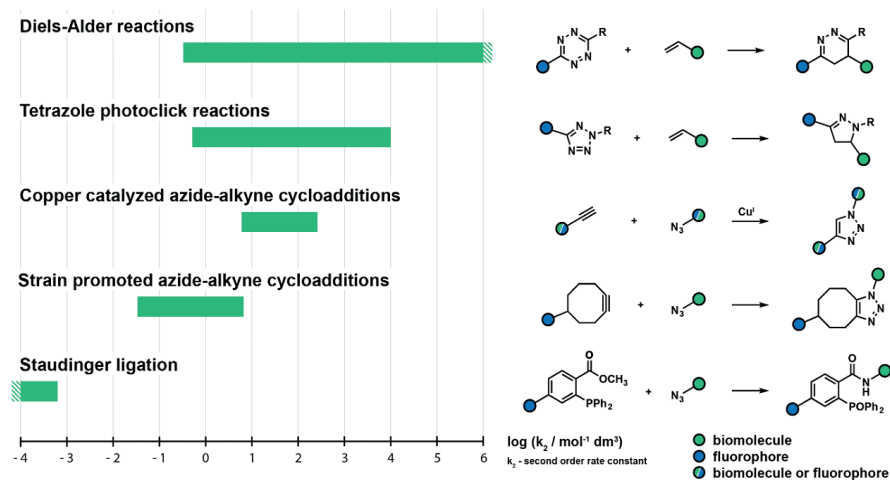
Az azidok és elektrofil csapdát tartalmazó foszfánok reakciója sok szempontból megfelel a Sharpless által definiált klikk-kritériumoknak, egyedül a reakció sebessége hagy maga után kívánnivalót. Mivel a Cu(I)-katalizált azid-alkin cikloaddíció is nem természetes, kémiailag és biológiailag inert funkciós csoportok közt játszódik le, joggal feltételezhetjük, hogy Bertozzi is felfigyelt rá, és szívesen alkalmazta volna sejtek felszíni szénhidrátjainak tanulmányozására, ha nem lett volna ott az a fránya rézion. Az irodalom tanulmányozása közben találkozhatott egy 1953-ban közölt cikkel, melyben Alfred Blomquist leírta, hogy ha az alkin funkciós csoportot egy 8 szénatomból álló gyűrűbe kényszeríti, akkor az így kapott ciklooktin azidokkal robbanásszerű gyorsasággal reagál. [9] Bertozzi meglátta a lehetőséget ebben a szintén régóta

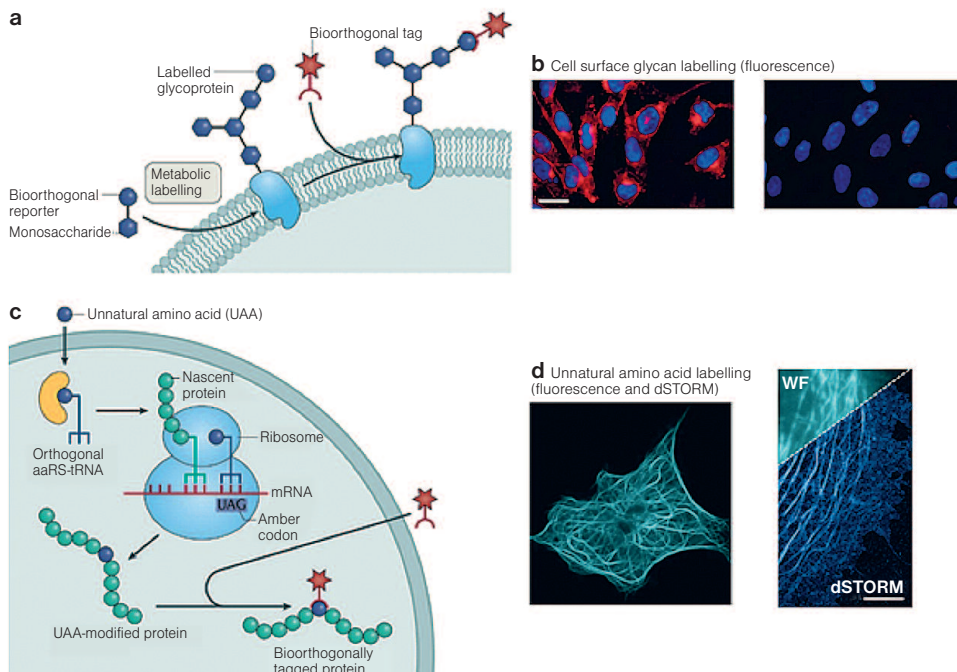
ismert reakcióban, hogy az azid-alkin reakciót biokompatibilissá tegye. [10]

A hármas kötés gyűrűbe kényszerítése ugyanis annyi többletenergiaival látja el az alkin funkciós csoportot, ami már lehetővé teszi, hogy azidokkal réz nélkül is lejátszódjék a reakció, akár szobahőmérsékleten, vizes közegben is. Bár az így kivitelezett reakció jóval lassabb, mint a rézzel katalizált verzió, az évek során a gyűrűfeszültség további növelésével vagy különféle szubsztituensek segítségével sikerült ezt feltornászni a réz-katalizált változatot megközelítő sebességre (2.d ábra). [10] Bertozzi ezzel megalapozta a klikk-kémia biokompatibilis verzióját, mely reakción kívül azóta már több, szintén biokompatibilis, a klikk-kémia kritériumainak megfelelő kémiai átalakítást is leírtak (3. ábra). [11, 12] E biokompatibilis klikk-reakciók gyűjtőneve a bioortogonális kémia; a név az ilyen kémiai átalakítások biokompatibilitására (bio) és kemoszelektivitására (ortogonális) utal. [13] A bioortogonális reakciókban részt vevő funkciós csoportok szerkezetidegenek, biológiailag inertek, azaz biokompatibilisek és kémiai inertségüknek köszönhetően nem reagálnak az élő szervezetekben megtalálható számos kémiai funkciós csoporttal. Abban az esetben viszont, ha egy bioortogonális funkciós csoport találkozik a hozzá tartozó reakciópartnerrel, mint zsák a foltját, úgy találják meg egymást és lépnek szelektíven, gyorsan, stabil kovalens kötés kialakításával járó reakcióba. A bioortogonális reakciók megalapozták egy új tudományág, a kémiai biológia kialakulását, amely a kémiai eszköztárat felhasználva célozza a biológiai folyamatok megismerését.

Bioortogonálisan alkalmazható fluoreszcens markerek segítségével ismerte meg

3. ábra. Bioortogonális reakciók sebességének összehasonlítása a másodrendű sebességi állandók alapján ([11])





4. ábra.

a Szénhidrátok metabolikus módosítása bioortogonalizált cukrokkal

b azidomannózammal kezelt és nem kezelt sejtek mikroszkópos képe fluoreszcens foszfánszármazékkal való reakció után (Staudinger–Bertozzi-ligáció)

c nem természetes, bioortogonalisan módosított aminosavak fehérjékbe építése a genetikai kód kiterjesztésével

d bioortogonalisan módosított fehérjét expresszáló sejtek konfokális és szuperfelbontású mikroszkópos képe fluoreszcens jelzést követően (átdolgozva [16] alapján)

Bertozzi is a sejtek felszíni szénhidrát-struktúrájának szerepét például az embrionális fejlődésben. [14]

A korábban említett, azido-cukrok metabolikus beépítésén alapuló, szénhidrátok kémiai módszerekkel való tanulmányozására alkalmas módszeren túl további lökést adott a bioortogonalis kémia élő rendszerekben való alkalmazásához olyan technológiák fejlődése, melyek még hatékonyabban, és még jobb szelektivitással teszik lehetővé cél-biomolekulák előzetes bioortogonalizálását (4. ábra). Az egyik ilyen eljárás a fehérjék N- vagy C-terminálisához fuzionált, enzimaktivitással rendelkező címkek (pl. halo-, SNAP-, CLIP-tag) alkalmazása, melyek például ciklooktinnal módosított szubsztrátok segítségével kiválóan használhatók bioortogonalis motívum bevitelére. A genetikai kód kiterjesztésén alapuló, nem természetes aminosavak helyspecifikus beépítésével pedig lehetővé vált egy adott fehérje szinte bármely pontjának bioortogonalis módosítása. Nukleinsavak általános, a metabolizmus segítségével történő, nem természetes nukleotidokkal való bioortogonalizálásán kívül lehetséges nem természetes építőelemek helyspecifikus beépítése PCR-technológiával. A szakirodalomban ezenkívül ismeretes bioortogonalis foszfolipidek kémiai biológiai alkalmazása is. Ennek megfelelően, bioortogonalis kémiai megközelítésen alapuló alkalmazásokra szép számmal találunk példákat a szakirodalomban az egyszerű jelölésektől a protein-profilírozáson át a különböző képalkotó diagnosztikai eljárásokig. [15]

És hogy hogyan tovább?

A legújabb kutatási eredményeknek köszönhetően a bioortogonalis kémia már nem csak molekulák összekapcsolásáról szól. Lehetséges a bioortogonalis funkciók csoportok közti reakciók felhasználása hatóanyagok felszabadítására, aktiválására is, ami a reakciók nagymértékű specificitásának köszönhetően célzott terápiás megközelítések megvalósítását teszi lehetővé. Ez utóbbi alkalmazás vizsgálata már klinikai fázisban tart. [16]

A Természettudományi Kutatóközpont Kémiai Biológia Kutatócsoportjában pedig olyan fejlesztéseken dolgoznak, amelyek lehetővé teszik a bioortogonalis kémia által jelentett nagyfokú kémiai kontroll egyéb szabályozóelemekkel, például fényvel való kombinációját. A két szabályzóelem együttes alkalmazásával olyan eljárás kifejlesztéséhez nyílik meg az út, mely lehetővé teszi tumorterápiás szerek hely- és időkontrollált felszabadítását. A módszer segítségével a terápiás eljárások hatékonysága növelhető, míg a nem kívánt mellékhatások minimalizálhatók. [17]

IRODALOM

- [1] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/>
- [2] Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2001) 40, 2004.
- [3] Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future, *Angew. Chem. Int. Ed.* (1963) 2, 565.
- [4] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2002), 41, 2596–2599.
- [5] Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regio-

specific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.* (2002) 67, 3057–3064.

- [6] Wu, P., The Nobel Prize in Chemistry 2022: Fulfilling Demanding Applications with Simple Reactions, *ACS Chem. Biol.* (2022) 17, 2959.
- [7] Li S., Wang L., Yu F., Zhu Z. et al., Copper-Catalyzed Click Reaction on/in Live Cells. *Chem Sci.* (2017) 8, 2107–2114.
- [8] Saxon E, Bertozzi C. R., Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction, *Science* (2000) 287, 2007.
- [9] Blomquist, A. T., Liu, L. H., Many-membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne, *J. Am. Chem. Soc.* (1953) 75, 9, 2153–2154.
- [10] Agard, N. J., Prescher, J. A. and Bertozzi, C. R., A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems, *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126, 15046–15047.
- [11] Cserép, G. B., Herner, A., Kele, P., Bioorthogonal fluorescent labels: a review on combined forces, *Methods Appl. Fluoresc.* (2015) 3, 042001.
- [12] Mike L.W.J, Smeenk, Jordi Agramunt, Kimberly M. Bonger, Recent developments in bioorthogonal chemistry and the orthogonality within, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2021) 60, 79.
- [13] Sletten, Ellen M., Bertozzi, Carolyn R., Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2009) 48, 6974–6998.
- [14] Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L., Bertozzi C. R., In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish, *Science* (2008) 320, 664–667.
- [15] Scinto, S.L., Bilodeau, D.A., Hincapie, R. et al., Bioorthogonal chemistry. *Nat Rev Methods Primers* (2021) 1, 30.
- [16] <https://www.nature.com/articles/d41587-019-00017-4>
- [17] Bojtár, M., Németh, K., Domahidy, E., Knorr, G., Verkman, A., Kállay, M., Kele, P., Conditionally activatable visible-light photocages, *J. Am. Chem. Soc.* (2020) 142, 15164–15171.