

sungsmitteln durchschauen, wird auch unser Verständnis der molekularen Erkennung sprunghaft wachsen. Praktische Anwendungen werden sich daraus freilich erst in fernerer Zukunft ergeben. Gegenwärtig möge der Hinweis genügen, daß es große Hoffnungen gibt, Materialien mit neuartigen Formen und Eigenschaften zu finden.

- [1] D. Philp, J. F. Stoddart, *Synlett* **1991**, 445.
- [2] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89; *ibid.* **1990**, *102*, 1347 bzw. **1990**, *29*, 1304.
- [3] a) J. F. Stoddart, *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, xii; b) W. Saenger, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 344.
- [4] R. S. Wylie, D. H. Macartney, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3136.
- [5] R. Isnin, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8188.
- [6] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature* **1992**, *356*, 325.
- [7] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 197.
- [8] Siehe Anmerkungen in einem Artikel von R. Dagani, *Chem. Eng. News* **1992**, *70* (15), 39.

- [9] A. Harada, M. Kamachi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1322; siehe auch *Macromolecules* **1990**, *23*, 2821.
- [10] M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, C. Vicent, D. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 630.
- [11] Für Beispiele von kammartigen Rotaxanpolymeren mit nichtkovalent gebundenen Cyclodextrinen in den Seitenketten siehe M. Born, H. Ritter, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1991**, *121*, 471.
- [12] J. F. Stoddart in *Host-Guest Molecular Interactions – From Chemistry to Biology* (Ciba Found. Symp. No. 158), Wiley, Chichester, **1991**, S. 5.
- [13] P. L. Anelli, N. Spencer, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5131.
- [14] P. R. Ashton, M. Groguez, A. M. Z. Slawin, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6235.
- [15] P. L. Anelli, P. R. Ashton, R. Ballardini, V. Balzani, M. Delgado, M. T. Gandolfi, T. T. Goodnow, A. E. Kaifer, D. Philip, M. Pietraszkiewicz, L. Prodi, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, C. vicent, D. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 193.
- [16] Y. X. Shen, H. W. Gibson, *Macromolecules* **1992**, *25*, 2058.
- [17] Nach Fertigstellung dieses Beitrags wurde ein *lipophiles* [2]-Rotaxan (das von Wylie und Macartney ist *hydrophil*) beschrieben: G. Wenz, E. van der Bey, L. Schmidt, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 758; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 783.

## Protein Engineering: Modifiziertes Hämoglobin als Blutersatzstoff

Von Timm-H. Jessen und Rolf Hilgenfeld\*

Der Enthusiasmus, mit dem die gezielte Veränderung der Eigenschaften von Proteinen auf gentechnischem Wege, genannt Protein Engineering<sup>[1]</sup>, noch vor wenigen Jahren mit nationalen und internationalen Programmen gefördert wurde, scheint allmählich abzuflauen. Die Schlagworte von heute sind eben andere (Nanotechnologie, Glycobiologie) als vor fünf Jahren – in unserer kurzlebigen Zeit ein ganz normaler Vorgang. Und es scheint, als ob einige Protagonisten des Protein Engineering in der Tat mehr versprochen haben als sie – zumindest kurzfristig – halten konnten. Das Design maßgeschneiderter Enzyme für die Katalyse organischer Reaktionen mit hoher Stereoselektivität hat bisher nur in Ausnahmefällen funktioniert – kein Wunder, ist doch unser Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen nach wie vor ziemlich eingeschränkt. Während die schnellen und spektakulären Erfolge, abgesehen von einigen Waschmittelproteasen, also weitgehend ausgeblieben sind, tritt das Protein Engineering nunmehr in eine Konsolidierungsphase, in der realistische Fragestellungen wissenschaftlich solide bearbeitet werden können – und siehe da, die Früchte der Arbeit reifen allmählich heran. Dies zeigt sich insbesondere bei Proteinen, die als Therapeutika eingesetzt werden oder werden sollen, und deren Eigenschaften durch gezielte Modifizierung besser den Erfordernissen angepaßt werden können. So läßt sich etwa der Wirkungseintritt von Humaninsulin durch den spezifischen Austausch bestimmter Aminosäurereste beschleunigen<sup>[2]</sup>, während wieder andere Modifikationen des Hormons zu einer verlängerten Wirkdauer führen und damit die Zahl der notwendigen Injektionen verringert werden kann<sup>[3]</sup> – unnötig zu erwähnen, welche Erleichterung dies für den Diabetiker sein wird.

Für ein rationales Design eines solchen Austauschs von Aminosäuren ist natürlich eine genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Proteins erforderlich, wie sie in bestimmten Fällen (bei kleinen Proteinen) durch NMR-

Techniken und in der Regel durch die Proteinkristallographie geliefert wird. So bildete die Röntgenstrukturanalyse von Hämoglobin durch M. Perutz et al. (MRC Cambridge)<sup>[4]</sup> die Grundlage für gentechnische Modifikationen dieses Blutproteins, über die K. Nagai et al. (MRC) kürzlich zusammen mit Forschern der Firma Somatogen (Boulder, Colorado) in *Nature* berichteten<sup>[5]</sup>. Mit diesem veränderten Hämoglobin scheint nach Jahrzehnten intensiver Forschung erstmals ein wirkungsvoller und gleichzeitig sicherer Blutersatzstoff in greifbare Nähe gerückt.

Dem Hämoglobin kommt die entscheidende Aufgabe beim Sauerstofftransport im Körper zu. Eingeschlossen in die roten Blutkörperchen wird das Protein in der Lunge mit Sauerstoff beladen, um diesen in den Kapillargefäßen des Gewebes in die Atmungskette einzuschleusen. Hämoglobin besteht aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Polypeptidketten ( $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer), die je ein  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiges Protoporphyrin IX, das Häm, enthalten. Lokal unterschiedliche Gaspartialdrücke, allosterische Effektoren sowie die Kooperativität des Tetramers modulieren die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins in idealer Weise<sup>[6]</sup>. Da Hämoglobin der entscheidende Bestandteil des Blutes ist, lag sein Einsatz als Blutersatzstoff nahe; der Bedarf für einen solchen war angesichts der Probleme von Transfusionen mit Blutkonserven (Verfügbarkeit, Blutgruppenzugehörigkeit und Lagerstabilität) immer vorhanden, wird aber angesichts der zunehmenden Belastung mit pathogenen Viren in jüngster Zeit dringlich<sup>[7]</sup>.

Da aber Hämoglobin selbst als Blutersatzstoff nicht unproblematisch ist, wurden auch völlig andere Ansätze verfolgt. Mit den Perfluorkohlenwasserstoffen wurden vollsynthetische Sauerstofftransporter entwickelt, die bei Applikation als Emulsion Sauerstoff proportional zu seinem Partialdruck binden können. Die geringe Viskosität der Emulsionen sowie die Verwendbarkeit in Fällen, bei denen religiöse Gründe dem Patienten Bluttransfusionen verbieten, erhöhten die Attraktivität dieser Entwicklung<sup>[8]</sup>. Mit Perfluorooctylbromid ist derzeit eine Verbindung in der klinischen Prüfung, die das Problempotential dieser Ersatzstoffe

[\*] Dr. R. Hilgenfeld, Dr. T.-H. Jessen  
Hoechst Aktiengesellschaft  
Postfach 80 03 20, W-6230 Frankfurt 80

– geringe Sauerstoffkapazität, Immunogenität, Hepatotoxizität und Lagerungsstabilität – verringern soll<sup>[9]</sup>.

Der Großteil der Forschungsansätze lehnt sich jedoch an das Hämoglobinmolekül selbst an. Schon 1916 wurde erstmals am Menschen eine intravenöse Infusion einer Hämoglobulinlösung durchgeführt<sup>[10]</sup>. Hämoglobin kann aus Erythrocyten gewonnen werden, deren Verfallsdatum bereits überschritten ist. Bei der Reinigung muß allerdings peinlich genau auf das Entfernen von Zellmembranresten (Stroma) geachtet werden, die eine starke Immunreaktion hervorrufen können<sup>[11]</sup>. Selbst körpereigenem Hämoglobin werden diese immunogenen Eigenschaften zugeschrieben, wenn es sich in großen Mengen im Plasma und nicht in den roten Blutkörperchen befindet. Bei der Verwendung von Rinder- oder Schweinehämoglobin als Blutersatzstoff dürfte die Gefahr der Immunotoxizität noch erheblich größer sein<sup>[12]</sup>.

Seine physiologische Aufgabe kann das Hämoglobin nur innerhalb der Erythrocyten erfüllen. Nur dort befindet sich das 2,3-Diphosphoglycerat (DPG), der essentielle allosterische Effektor für die Sauerstoffabgabe an das Gewebe<sup>[13]</sup>, und nur innerhalb der Erythrocyten ist die Konzentration des Hämoglobins so hoch, daß das Tetramer als solches stabil ist. Diese Bedingungen bilden einen fatalen Synergismus, sobald Hämoglobin frei im Plasma vorliegt: Die Sauerstoffaffinität ist so hoch, daß das Gewebe unterversorgt wird; die oxygenierte Form des Hämoglobins zerfällt in verdünnter Lösung leicht in  $\alpha\beta$ -Dimere<sup>[6]</sup>, und diese wiederum sind mit einem Molekulargewicht von 32 kD so klein, daß sie über die Niere ausgeschieden werden und in großen Mengen dieses Organ erheblich schädigen<sup>[14]</sup>. Die Bemühungen, Hämoglobin dennoch als Ersatzstoff zu verwenden, konzentrieren sich daher auf seine Verkapselung in Liposomen<sup>[15]</sup> sowie auf Modifizierungen des Proteins, die die Tetramerstruktur stabilisieren und gleichzeitig die Sauerstoffaffinität senken. Die chemische Verknüpfung der Untereinheiten durch Glutar- oder Fumarsäurederivate ist hier bislang am erfolgreichsten<sup>[16]</sup>. Ausbeuten und Reinigung der modifizierten Hämoglobine, mangelnde Kooperativität und Produktstabilität sowie Probleme in der klinischen Prüfung setzen diesem Ansatz bislang aber Grenzen<sup>[9]</sup>.

Seit Ende der siebziger Jahre ist Hämoglobin auch Gegenstand der gentechnischen Forschung. Nachdem anfangs  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten getrennt exprimiert wurden, ist mittlerweile die Expression eines voll funktionellen Humanhämoglobins in *E. coli* und Hefe sowie transgenen Mäusen und Schweinen möglich<sup>[17]</sup>. Natürlich können auch diese rekombinanten Hämoglobine in unmodifizierter Form nicht als Blutersatzstoffe eingesetzt werden, da sie wie das aus Erythrocyten isolierte Protein eine zu hohe Sauerstoffaffinität in Abwesenheit von 2,3-Diphosphoglycerat aufweisen und in Dimere dissoziieren. Beide Probleme wurden jetzt von den MRC- und Somatogen-Forschern<sup>[5]</sup> mit einem gentechnischen Ansatz gelöst. Der C-Terminus einer der beiden  $\alpha$ -Ketten, in der dreidimensionalen Struktur dem N-Terminus der anderen  $\alpha$ -Polypeptidkette räumlich nahe, wurde mit diesem durch einen Glycinrest verknüpft, ohne daß die Kooperativität des Moleküls maßgeblich beeinträchtigt wurde. Diese Fusion verhindert den Zerfall in Dimere und führt damit zu einer längeren in-vivo-Halbwertszeit des Hämoglobins. Weiterhin wurde die Mutation  $\beta 108\text{Asn} \rightarrow \text{Lys}$ , die in einem natürlich vorkommenden Hämoglobin mit erniedrigter Sauerstoffaffinität (Hämoglobin Presbyterian) nachgewiesen wurde<sup>[18]</sup>, in

das  $\beta$ -Gen implementiert und so die Sauerstoffbindung des rekombinanten Produkts in der Tat erniedrigt. Versuche an Ratten und Hunden sind bisher sehr erfolgreich verlaufen<sup>[5]</sup>.

Es ist schwierig zu beurteilen, ob sich die Forscher von Somatogen und des MRCs mit dieser Arbeit an die Spitze des Rennens um einen effizienten und sicheren Blutersatzstoff gesetzt haben. Denn ein Rennen ist es sicherlich: Mindestens sieben Firmen leisten intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeit auf diesem Gebiet, um Erstanbieter auf einem Weltmarkt zu werden, der auf 10 Mrd. Dollar geschätzt wird. Publiziert wird wegen des Konkurrenzdrucks sehr wenig; eine ausgeprägte „Gerüchteküche“ ist die Folge, und so kursieren beispielsweise Vermutungen über Fälle von Nierenversagen bei Freiwilligen nach Verabreichen von unmodifiziertem Hämoglobin noch nach 1978<sup>[19]</sup>. Um solchen Praktiken Einhalt zu gebieten und mehr Transparenz zu schaffen, berief die FDA (Food and Drug Administration) vor knapp zwei Jahren ein Treffen der führenden Firmen und Forschungsgruppen ein; es resultierte ein anerkannter Forderungskatalog, den potentielle Blutersatzstoffe erfüllen müssen, bevor klinische Tests zugelassen werden können. Die Firma Somatogen wird mit ihrer Publikation in *Nature* jetzt der Forderung nach Transparenz gerecht; es bleibt abzuwarten, ob die am Tier so positiv verlaufenen Versuche des gentechnisch modifizierten Hämoglobins der klinischen Prüfung standhalten werden.

- [1] R. Hilgenfeld in *Jahrbuch Biotechnologie, Band 2: 1988/89* (Hrsg.: P. Prave, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer, F. Wagner), Hanser, München, 1988, S. 139.
- [2] J. Brange, U. Ribell, J. F. Hansen, G. Dodson, M. T. Hansen, S. Havelund, S. G. Melberg, F. Norris, K. Norris, L. Snel, A. R. Sorensen, H. Q. Voigt, *Nature* 1988, 333, 679.
- [3] H. Berchtold, A. Liesum, M. Dörschug, K. Geisen, U. Grau, P. Habermann, R. Obermeier, D. Schwabe, G. Seipke, L. Vertesy, R. Hilgenfeld in *Insulin Receptor and Insulin Action – Molecular and Clinical Aspects* (Hrsg.: E. Bonora, M. Gigolini, P. Moghetti, G. Zoppini), Verona, 1990, S. 24.
- [4] G. Fermi, M. Perutz, M. Shaanan, R. Fourme, *J. Mol. Biol.* 1984, 175, 159.
- [5] D. Looker, D. Abbott-Brown, P. Cozart, S. Durfee, S. Hoffmann, A. J. Mathews, J. Miller-Roechrich, S. Shoemaker, S. Trimble, G. Fermi, N. Komiyama, K. Nagai, G. L. Stetler, *Nature* 1992, 356, 258.
- [6] H. F. Bunn, B. G. Forget, *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, Saunders, Philadelphia, 1986; G. K. Ackers, H. R. Halvorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974, 71, 4312.
- [7] *Blood Substitutes* (Hrsg.: K. C. Lowe), VCH, Weinheim, 1988.
- [8] T. Mitsuno, H. Ohyanagi, R. Naito, *Ann. Surg.* 1982, 195, 60.
- [9] S. J. Urbaniak, *Brit. Med. J.* 1991, 303, 1348.
- [10] A. N. Sellards, G. R. Minot, *J. Med. Res.* 1916, 34, 469.
- [11] S. F. Rabiner, J. R. Helbert, H. Lopes, L. H. Friedman, *J. Exp. Med.* 1967, 126, 1127.
- [12] N. Yoshioka, M. Z. Atassi, *Biochem. J.* 1986, 234, 441; T. M. S. Chang, *Transfus. Med. Rev.* 1989, 3, 213.
- [13] Eine Ausnahme bildet das Hämoglobin vom Rind, dessen Sauerstoffaffinität nicht durch DPG moduliert wird [7]. Dies dürfte der Grund für die Entwicklung von Rinder-Hämoglobin als Blutersatzstoff durch die Firma Biopure (Boston, Massachusetts) sein.
- [14] H. F. Bunn, W. T. Esham, R. W. Bull, *J. Exp. Med.* 1969, 129, 909; H. F. Bunn, J. H. Jandl, *ibid.* 1969, 129, 925.
- [15] R. Rabinovici, A. S. Rudolf, F. S. Ligler, T. L. Yue, G. Feuerstein, *Circ. Shock* 1990, 32, 1.
- [16] E. Bucci, A. Razynska, B. Urbaitis, C. Fronticelli, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 6191; S. R. Snyder, E. V. Welty, R. Y. Walder, L. A. Williams, J. A. Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 7280; L. R. Manning, S. Morgan, R. C. Beavis, B. T. Chait, J. M. Manning, J. R. Hess, M. Cross, D. L. Currell, M. A. Marini, R. M. Winslow, *ibid.* 1991, 88, 3329.
- [17] S. J. Hoffman, D. L. Looker, J. M. Roehrich, P. E. Cozart, S. L. Durfee, J. L. Tedesco, G. L. Stetler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 8521; M. Wagenbach, K. O'Rourke, L. Vitez, A. Wiecek, S. Hoffman, S. Durfee, J. Tedesco, G. Stetler, *Bio/Technology* 1991, 9, 57; R. R. Behringer, T. M. Ryan, M. P. Reilly, T. Asakura, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, T. M. Townes, *Science* 1989, 245, 971; *Genet. Technol. News* 1992, 12 (3), 8.
- [18] W. F. Moo-Penn, J. A. Wolff, G. Simon, M. Vacek, D. L. Jue, M. H. Johnson, *FEBS Lett.* 1978, 92, 53.
- [19] E. Parry in [7], S. 37.