

## Proteinsynthese durch chemische Verknüpfung ungeschützter Peptide in wässriger Lösung

Michael A. Walker\*

Proteine sind für die Organische Chemie, die Biochemie und die medizinische Chemie unentbehrlich. Enzyme werden als Katalysatoren zur Racematspaltung und zum Aufbau von so herausfordernden Zielverbindungen wie den Kohlenhydraten eingesetzt. Mit mutierten Proteinen können Informationen über Funktionen und Strukturen von Proteinen erhalten werden. In der medizinischen Chemie werden Proteine als Zielverbindungen für Wirkstoff-Assays und als Therapeutica eingesetzt. Eine Grundvoraussetzung für all diese Anwendungen in der Forschung ist die Zugänglichkeit der Proteine in hinreichend großen Mengen.

Gegenwärtig spielt die Rekombinationsmethode eine bedeutende Rolle für die Proteinsynthese. Sie ist auf lineare Peptide mit proteinogenen Aminosäuren anwendbar, neuere Entwicklungen ermöglichen allerdings auch den Einsatz nichtkodierter Aminosäuren. Für Organiker ist dieser Weg der Proteinsynthese nur begrenzt anwendbar, da ihnen die zum Umgang mit diesen Methoden erforderliche Erfahrung in der Molekularbiologie fehlt. Eine Alternative ist die chemische Peptidsynthese am festen Träger. Proteine aus mehr als 50 Aminosäuren sind nach dieser Methode wegen Löslichkeitsproblemen und zahlreichen Verunreinigungen durch Auslassungen und Epimerisierungen allerdings nur schwer herzustellen.

Um diese Einschränkungen zu umgehen, hat man sich der chemischen Kupplung mittelgroßer Proteinfragmente zugewandt. Drei Wege sind beschritten worden: die Fragmentkupplung seitenkettengeschützter Peptide am festen Träger,<sup>[1]</sup> die enzymatisch katalysierte Kupplung von Peptidfragmenten<sup>[2]</sup> und die chemische Verknüpfung (ligation) ungeschützter Peptidfragmente in wässriger Lösung (eine Methode, die auch als „orthogonale Verknüpfung“, „natürliche chemische Ligation“ oder „dove tailing“ bezeichnet wird). Die zuletzt genannte Methode bietet gegenüber herkömmlichen Kupplungsverfahren den Vorteil, daß keine Aktivierung der Carboxygruppen und kein Schutz der Seitenketten erforderlich sind, wodurch die Choselektivität und die Löslichkeit verbessert werden. Theoretisch kann dieses Verfahren auf einen weiteren Bereich von Substraten angewendet werden als die enzymatischen Methoden.

Die meisten Verfahren zur chemischen Verknüpfung ähneln herkömmlichen Protein-Querverknüpfungs- und -Konjuga-

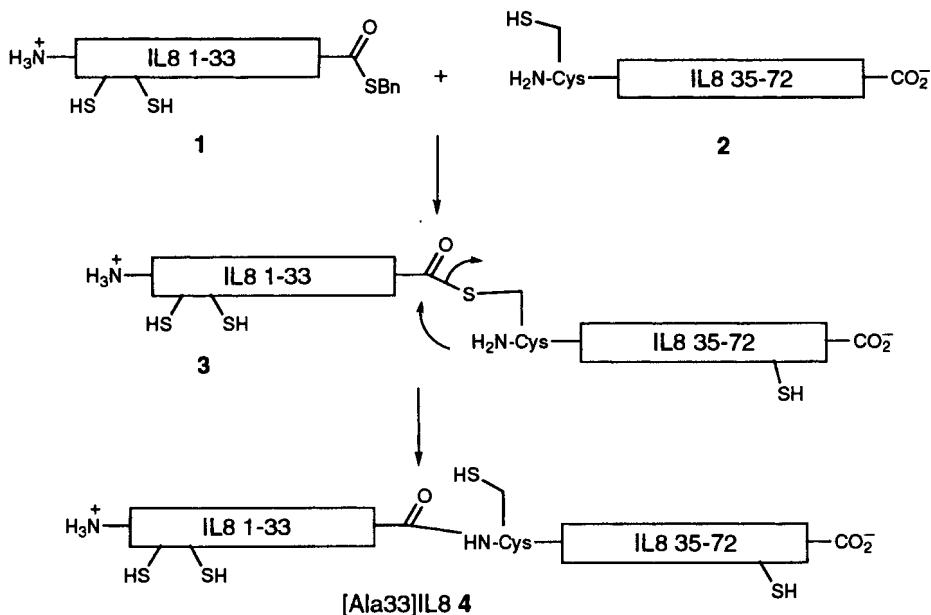
tionsmethoden, abgesehen davon, daß die Proteine nicht als Gemische entstehen, sondern einheitlich sind. Die Peptidsegmente werden durch „orthogonale Reaktionen“<sup>[3]</sup> wie die Bildung von Hydrazon-, Thioester-, Disulfid- oder Thioetherbindungen verknüpft. Auf diese Weise sind beispielsweise Degrados Vier-Helix-Bündel,<sup>[4]</sup> G-CSF und verkürzte G-CSF-Analoga,<sup>[5]</sup> ein künstliches Protein,<sup>[6]</sup> HIV-1-Protease, Blutplättchen-GP-IIb-IIa- und  $\beta$ -Faltblatt-Modellproteine<sup>[7]</sup> hergestellt worden. Diese Proteine unterscheiden sich allerdings von natürlich vorkommenden Proteinen insofern, als daß sie an der Verknüpfungsstelle eine nichtnatürliche Funktionalität aufweisen.

Bei neueren Methoden werden „natürliche“ Amid-Kupplungsstellen über eine zweistufige Reaktion aufgebaut: Zunächst werden zwei Fragmente über eine schnelle, chomoselektive Reaktion, wie die Thioester-, Disulfid- oder Thiazolidin-Bildung, in Kopf-Schwanz-Anordnung verknüpft, so daß die Amino- und die Carboxygruppe in enge Nachbarschaft zueinander gebracht werden. Anschließend wird die Amidbindung geknüpft, die wegen des intramolekularen Charakters der Reaktion durch eine hohe „effektive Molarität“ begünstigt ist. Es sind weder ein Schutz der Seitenketten noch eine Aktivierung der Carboxygruppe erforderlich. Diese Methode ist verwandt mit der in den Pionier-Arbeiten von Wieland et al.<sup>[8]</sup> sowie Brenner et al.<sup>[9]</sup> beschriebenen und ähnelt der Peptidverknüpfungsmethode von Kemp et al.<sup>[10]</sup> durch Seitenketten einfang sowie der „konformationsgesteuerten Rekombination“ aktiver Peptidfragmente.<sup>[11]</sup> Die Einfachheit und Vielseitigkeit dieser Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele deutlich.

[Ala<sup>33</sup>]JL8 **4**, ein aus 72 Aminosäuren bestehendes Protein, wurde von Kent et al. synthetisiert (Schema 1).<sup>[12]</sup> Das Benzylthioester-Peptidsegment **1** und das mit einem Cysteinrest endende Segment **2** wurden durch Festphasensynthese hergestellt. Sie wurden in wässriger Pufferlösung (pH 7.6, Phosphat, 6 M Guanidinhydrochlorid) in Gegenwart von Phenylmethanthon verknüpft, wodurch die Disulfid-Bildung vermieden wurde. Das Produkt, der Thioester **3**, konnte nicht isoliert werden, da es sich spontan durch eine S → N-Acylgruppenwanderung zu [Ala<sup>33</sup>]JL8 umlagerte. Es ist bemerkenswert, daß die inneren Cystein-Thiolgruppen die Kupplung nicht beeinträchtigen. An der Luft bildeten sich die beiden natürlichen Disulfidbrücken.

Tam et al. wendeten ein ähnliches Verfahren zur Synthese von Modellpeptiden aus bis zu 54 Aminosäuren an.<sup>[13]</sup> Die Reaktion wurde in Hinblick auf den pH-Wert optimiert. Durch Zusatz von Hilfsstoffen wie R<sub>3</sub>P und R'SH (2 bzw. 10 Äquiv.) wurden

[\*] Dr. M. A. Walker  
Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute  
5 Research Parkway, Wallingford, CT 06492 (USA)  
Telefax: Int. + 203/284-7702



Schema 1. Synthese von  $[\text{Ala}^{33}] \text{IL8}$  nach Kent et al.

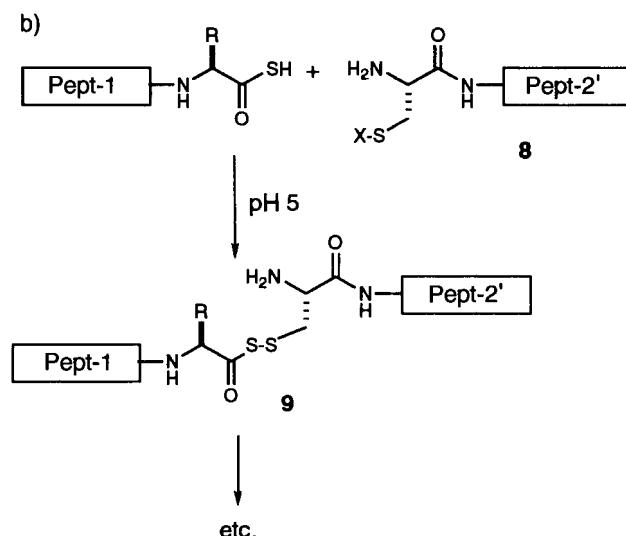
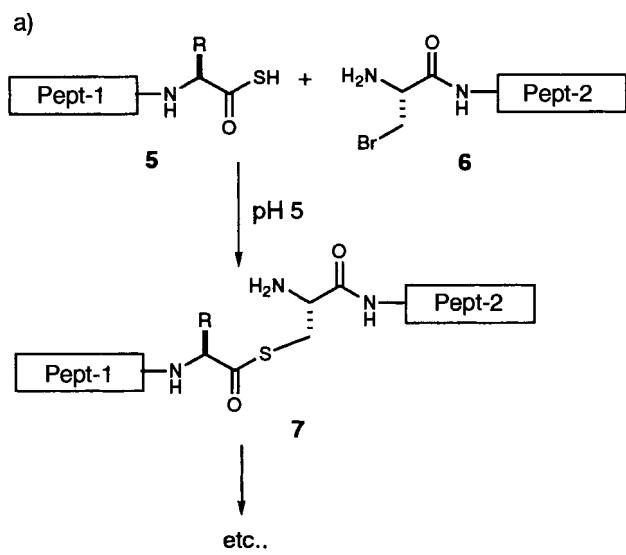
Nebenreaktionen wie die Bildung von Disulfidbrücken oder die Acylierung innerer Thiolfunktionen unterdrückt (oder umgekehrt).

Peptidthioester können auch gebildet werden, wenn man die Richtung des bei obiger Methode beschriebenen, nucleophilen Angriffs umkehrt. So reagiert die Thiosäure **5** bei pH 5 mit dem  $\beta$ -Bromalanin-substituierten Peptid **6** zum Thioester **7**, der sich unter S-N-Acylgruppenwanderung umlagert (Schema 2a). Nach diesem Verfahren haben Tam et al. ein aus 12 Aminosäureresten bestehendes, spermaaktivierendes Peptid in 85% Ausbeute synthetisiert. Auch über eine Disulfidbrücke können die Peptidfragmente verknüpft werden (Schema 2b).<sup>[14]</sup> Der S-N-Acyltransfer verläuft bei **9**

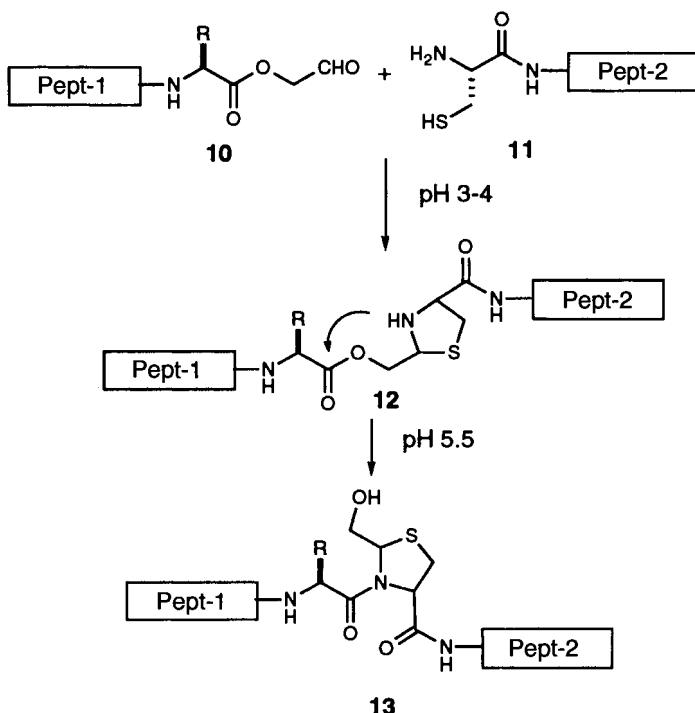
über einen sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand, wohingegen bei **7** ein fünfgliedriger durchlaufen wird. Nach der Kupplung muß die Hydrodisulfidseitenkette reduziert werden.

Tam et al. haben gezeigt, daß die Seitenkette auch durch Thiazolidin-Bildung eingefangen werden kann (Schema 3).<sup>[15]</sup> entsteht durch Acylgruppenwanderung ein Pseudoprolin. Auf diese Weise erhöht sich die Anwendungsbreite der Reaktion, da damit nicht nur AA-Cys-, sondern auch AA-Pro-Verknüpfungen in Frage kommen.

Die N-terminale Hälfte wurde als Thioester am festen Träger synthetisiert. Anschließend wurde durch  $\text{Ag}^+$ -katalysierte Umlagerung der C-terminale Glycoaldehydester eingeführt. Bei



Schema 2. Umkehrung der Richtung des nucleophilen Angriffs: Bildung von Thioestern (a) und Carboxydisulfanen (b).



Schema 3. Einfangen der Seitenkette durch Thiazolidin-Bildung und anschließende Acylgruppenwanderung.

pH 3–4 ist die Bildung des Thiazolidinrings irreversibel, weshalb **12** selektiv gegenüber anderen möglichen Aldehyd/Amin-Kondensationsprodukten entsteht. Die Bildung des Heterocyclus wurde HPLC-chromatographisch verfolgt und ist selbst in verdünnter Lösung (0.05–0.2 mM Substrat) in weniger als 5 h im wesentlichen abgeschlossen. Bei pH 5.5 findet die O→N-Acylgruppenwanderung statt ( $t_{1/2} \approx 20$  h). Drei HIV-1-Protease-Analoga wurden auf diesem Weg hergestellt: [SPro<sup>39</sup>,Abu<sup>67,95</sup>]-, [Ala<sup>38</sup>,SPro<sup>39</sup>,Abu<sup>67,95</sup>]- und [Leu-NHCH<sub>2</sub>-Thz<sup>38,39</sup>,Abu<sup>67,95</sup>]-HIV-1PR. Das zuletzt genannte entsteht aus einem Glycinalamid, das nach der Reaktion zum Thiazolidin keine Acyltransferreaktion eingeht. Auf ganz ähnlichem Weg wurde auch ein aus 50 Aminosäureresten bestehender Epidermis-Wachstumsfaktor synthetisiert.

Durch chemische Verknüpfung wurden also natürliche und nichtnatürliche Proteine von einer Größe bis zu 10–20 kDa synthetisiert. Anders als die Rekombinationsmethoden sind diese Verfahren von Synthesechemikern problemlos zu handhaben. Für die Auswahl der Verknüpfungsstelle sind allerdings Kenntnisse über die Proteinstruktur erforderlich. Es ist durchaus zu erwarten, daß mit verbesserten Verfahren bald auch Proteine aus mehr als 100–200 Aminosäureresten synthetisiert werden können.

Wegen des nichtenzymatischen Charakters der Synthese lassen sich auf einfache Weise Proteine aufbauen, die nichtkodierte Aminosäuren enthalten (z. B. Enzyme aus ausschließlich D-konfigurierten Aminosäuren). Außerdem wird es durch den modularen Charakter der Verknüpfung möglich, große Struktur motive einzufügen oder wegzulassen. Auch Strukturen ohne Gegenstück in der Natur, wie Proteindendrimere, sind nach dieser Methode leicht zugänglich.

Durch die chemische Verknüpfung von Peptidsegmenten wird es möglich sein, die Strukturen von Proteinen zu optimieren und

so deren Stabilität und Bindungsselektivität zu verbessern. Diese Entwicklung sollte durch Anwendung kombinatorischer Verfahren auf der Stufe der Aminosäuren und der Peptidfragmente zusätzlichen Aufschwung erfahren.

#### Stichworte:

Peptide · Proteine

- [1] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Grant, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11065.
- [2] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 244.
- [3] Eine „orthogonale Reaktion“ ist definiert als eine Reaktion, bei der die Funktionalitäten der Reaktionspartner so aufeinander abgestimmt sind, daß nur ein Reaktionsweg möglich ist.
- [4] S. Futaki, K. Kitigawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1267.
- [5] H. F. Gaertner, K. Rose, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, R. E. Offord, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 262.
- [6] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30.
- [7] a) M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221; b) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7263; c) H. F. Gaertner, R. E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, K. Rose, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 333; d) T. W. Muir, M. J. Williams, M. H. Ginsberg, S. B. H. Kent, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7701; f) D. R. Englebresten, B. G. Garnham, D. A. Bergman, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8871; h) M. Baca, T. W. Muir, T. M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1881; i) A. Nefzi, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 229.
- [8] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129.
- [9] M. Brenner, J. P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt, A. Hartmann, W. Schneider, U. Beglinger, *Helv. Chim. Acta* **1957**, *157*, 1497.
- [10] N. Fotohouhi, N. Galavtos, D. S. Kemp, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2803.
- [11] A. E. I. Proudfoot, K. Rose, C. J. A. Wallace, *J. Biological Chem.* **1989**, *264*, 8764.
- [12] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [13] J. P. Tam, Y.-A. Lu, C.-F. Liu, J. Shao, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 12485.
- [14] C.-F. Liu, C. Rao, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 933.
- [15] a) C.-F. Liu, C. Rao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 307; b) C.-F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584; c) C.-F. Liu, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4049; d) J. P. Tam, C. Rao, C.-F. Liu, J. Shao, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *45*, 206; e) J. C. Spetzler, J. P. Tam, *ibid.* **1995**, *45*, 78.