

# Organische Proteinchemie: Entdeckung von Wirkstoffen durch die chemische Modifizierung von Proteinen

Jörg Rademann\*

**Stichwörter:**

Chemische Ligation · Medizinische Chemie · Proteine · Wirkstoffsuche

Lange war die Herstellung und Veränderung von Proteinen eine Domäne der molekularbiologischen Methoden. Mit modernen Ligationstechniken gelingt heute jedoch nicht nur die De-novo-Herstellung von Proteinen, sondern auch deren gezielte chemische Modifizierung.<sup>[1-3]</sup> Damit wurde eine „Organische Proteinchemie“ begründet, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Proteinen und zur Entwicklung der chemischen Biologie leistet. Die chemische Modifizierung von Proteinen erweist sich dabei als ein vielversprechender Weg zu neuen Proteinwirkstoffen und niedermolekularen Proteinliganden.

Zur chemischen Veränderung von Proteinen werden vorzugsweise Ligationstechniken angewandt. Unter chemischer Ligation versteht man Synthesemethoden, die in wässrigen Puffern unter neutralen, milden Bedingungen selektive Verknüpfungen an teilweise ungeschützten Biopolymeren durchführen (Abbildung 1). Ausgangspunkt für die heutigen Ligationstechniken war die Entdeckung von Wieland et al., dass teilweise ungeschützte Thioester von Aminosäuren und Peptiden in neutraler wässriger Lösung mit N-terminalen Cysteinresten selektiv Peptidbindungen

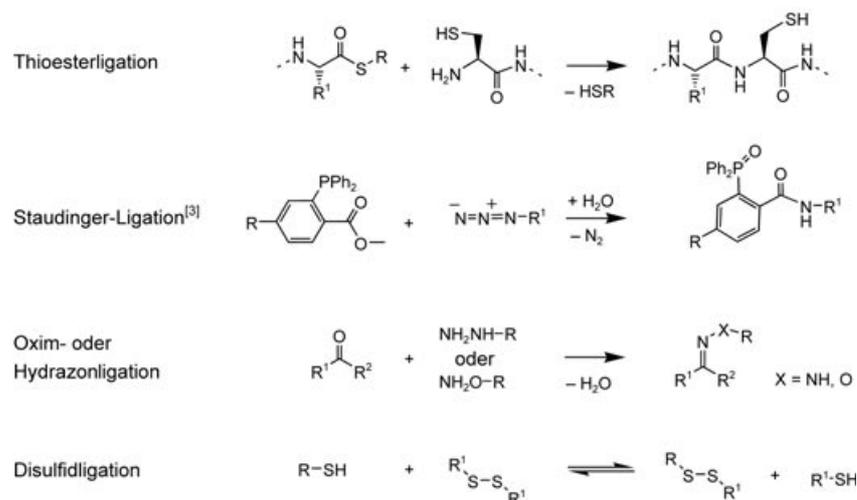


Abbildung 1. Ligationstechniken für die De-novo-Synthese und Modifizierung von Proteinen.

bilden.<sup>[1]</sup> Dabei entsteht durch „Thio-Umesterung“ zunächst ein intermediärer Cysteinthioester, der dann über eine S-N-Acylverschiebung in eine stabile Amidbindung umlagert. Schon in der Originalpublikation aus dem Jahr 1953 wurde die Vermutung geäußert, dass ein natürliches Syntheseprinzip von cystein-haltigen Peptiden und Proteinen gefunden worden sei. In den 90er Jahren wurde diese Thioesterligation von der Gruppe um Kent als „natürliche chemische Ligation“ bezeichnet und erfolgreich zu De-novo-Synthesen von Proteinen in wässrigen Puffern verwendet.<sup>[2]</sup> Der Erfolg der Thioesterligation regte die Entwicklung weiterer Ligationstechniken an, die vielfältige Anwendungen für die Synthese von Proteinen und Proteinmimetika gefunden haben (Abbildung 1).

Der besondere Vorteil der chemischen Proteinsynthese ist der Zugang zu

chemisch modifizierten Biopolymeren, die mithilfe von molekularbiologischen Methoden nicht erhalten werden können. Durch die organische Synthese wird es möglich, Proteine mit neuen Eigenschaftsprofilen gezielt zu erzeugen. Aktivität, Selektivität und Stabilität von Biopolymeren werden steuerbar, und Proteine können ebenso maßgeschneidert werden wie kleine organische Moleküle.

Ein besonders lohnendes Ziel ist die Konstruktion chemisch veränderter Proteine mit erhöhter Bioverfügbarkeit und Stabilität, um so neue und verbesserte Peptid- oder Proteinwirkstoffe zu erzeugen. Hier wurde kürzlich durch die chemische Herstellung eines synthetischen, polymerstabilisierten Erythropoietins ein wichtiger Meilenstein gesetzt.<sup>[4]</sup> Das humane Erythropoietin (EPO), ein Glycoprotein-hormon, ist als Proteinwirkstoff hoch interessant, da es

[\*] Prof. Dr. J. Rademann  
FMP Forschungsinstitut für  
Molekulare Pharmakologie  
Robert-Rössle-Straße 10  
13125 Berlin (Deutschland)  
und  
Institut für Chemie  
Freie Universität Berlin  
Takustraße 3  
14195 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-94793-159  
E-mail: rademann@fmp-berlin.de

Wachstum, Differenzierung und Reifung von Stammzellen zu Erythrozyten stimuliert. Die große klinische Bedeutung für die Therapie von Anämien lässt sich daran ermesen, dass der jährliche EPO-Umsatz 1 Milliarde Dollar übersteigt. Leider ist die Wirkung von natürlichem EPO durch die geringe Halbwertszeit begrenzt. Deshalb wurde jetzt eine chemische EPO-Mutante hergestellt, die durch zwei verzweigte Polyetherstrukturen gegen biologischen Abbau geschützt ist, ohne dass die stimulierende Aktivität auf Blutkörperchen-Vorläuferzellen reduziert wäre. In Ratten hat das synthetische Protein eine längere Halbwertszeit und führt zu einer stärkeren Erhöhung des Hämatokrit-Werts als natürliches EPO.

Hergestellt wurde das chemisch modifizierte EPO durch eine geschickte Kombination von Thioester- und Oximligationen (Abbildung 2). Eine von natürlichem EPO abgeleitete Peptidkette mit 166 Aminosäuren wurde zunächst in vier Fragmente (A–D) unterteilt und durch Standard-Festphasenmethoden aufgebaut. Da natürliches EPO die für die Ligation notwendigen Cysteinseitenketten nicht in ausreichender Zahl enthält, wurden zwei Glutamatreste am N-Terminus der Fragmente C und D

durch Cystein ersetzt. Im Anschluss an die Ligation wurden diese Cysteinreste mit Bromessigsäure alkyliert, um glutamatähnliche Seitenketten zu erhalten. Die Fragmente B, C und D enthielten einen N-terminalen Cysteinbaustein; in den Fragmenten B und D war diese Gruppe mit einer *S*-Acetamidomethylgruppe (Acm) geschützt. Ferner wurden in die Fragmente A und D je ein *N*<sup>ε</sup>-Lävulinyl-Lysin eingebaut. Die darin enthaltene Ketofunktion diente zur Anknüpfung je eines verzweigten Aminoxy-Polyethers durch Oximligation. Die beiden Polyether wurden an den Positionen von zwei der vier im natürlichen Glycoprotein enthaltenen Oligosaccharide angeknüpft. Anschließend wurden die Fragmente durch Thioesterligation zusammengefügt, und nach Faltung und Reinigung wurde ein einheitliches Produkt mit einer Masse von 50825 Da erhalten.<sup>[5]</sup>

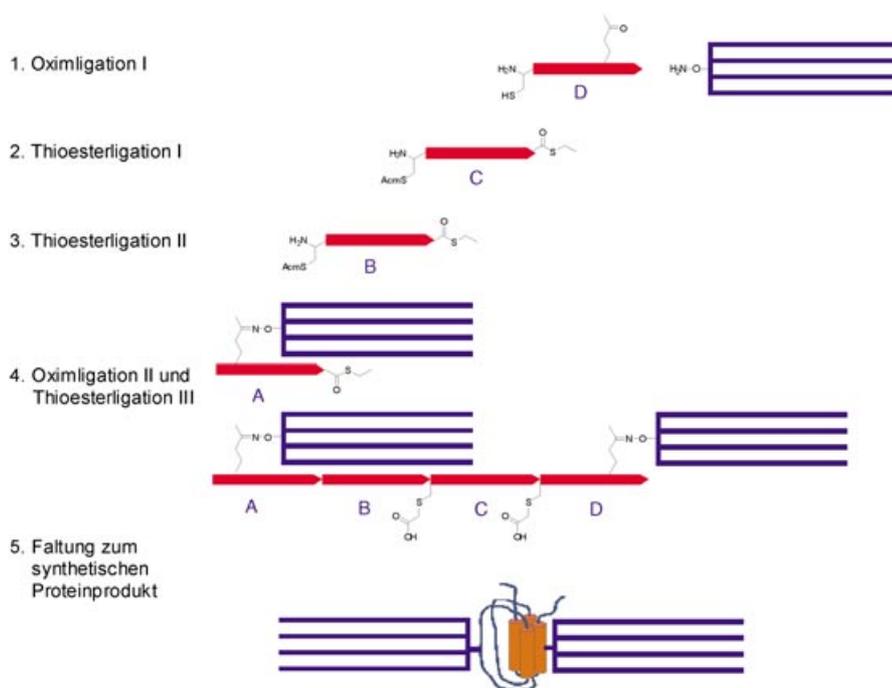
Ketoproteine als Ausgangspunkt für die Oximligation wurden bereits in den 60er Jahren von Dixon durch eine kupferkatalysierte Transaminierung von Proteinen mit Glyoxylat hergestellt.<sup>[6]</sup> Kürzlich wurde diese Reaktion zu einer wertvollen präparativen Methode weiterentwickelt.<sup>[7]</sup> Ketopeptide mit beliebigen Seitenketten sind neuerdings

durch die milde Acylierung eines Cyanphosphorans an der Festphase zugänglich.<sup>[8]</sup>

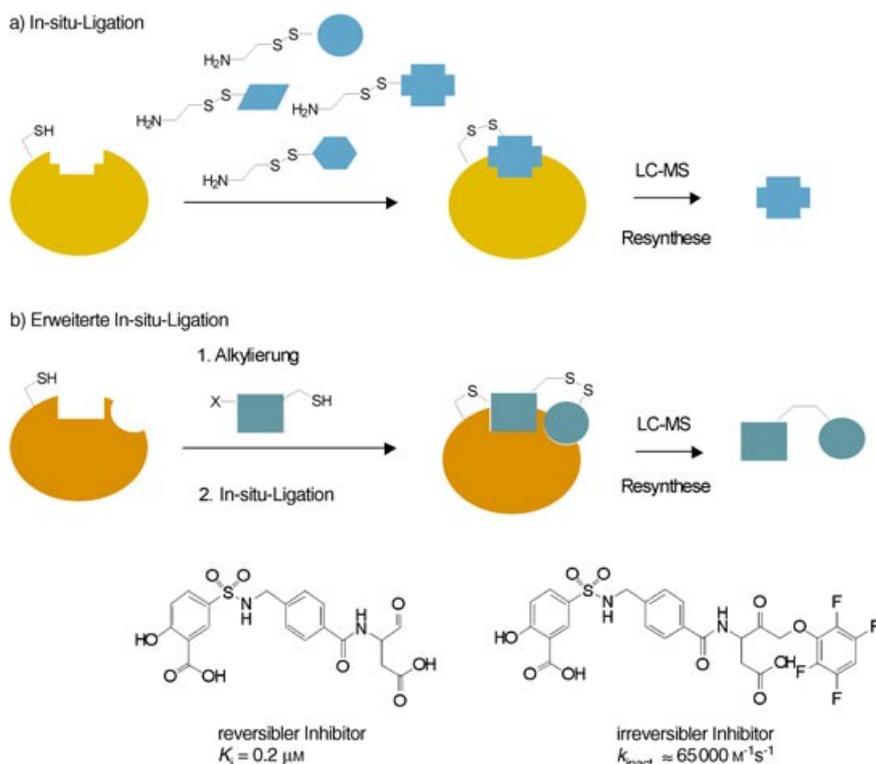
Durch den De-novo-Aufbau des Peptids ist es jedoch möglich, an Lysin-Seitenketten in definierten Positionen im Protein Lävulinsäurereste einzuführen. Alternativ können auch Dithiolan-geschützte Lävulinylreste verwendet werden. Die Ketofunktionen werden dann erst im Anschluss an die Proteinsynthese durch oxidative Spaltung freigesetzt.<sup>[9]</sup>

Chemisches Protein-Engineering kann nicht nur für die Entwicklung von Proteinwirkstoffen verwendet werden. Auch die Suche nach niedermolekularen Wirkstoffen durch chemisch modifizierte Proteine ist möglich, um geeignete Bindungstaschen und hochaffine Liganden für Proteinoberflächen zu finden. Seit langem ist es üblich, einzelne Aminosäuren in Proteinen durch gezielte Mutagenese zu variieren, um Enzymmechanismen zu verstehen und gezielt zu verändern. Mithilfe gezielter Mutagenese können jedoch auch auf der Proteinoberfläche Anknüpfungspunkte für chemische Ligationstechniken geschaffen werden. Beispielweise reagieren die frei zugänglichen Cysteinreste auf Proteinoberflächen mit Disulfiden in wässriger Lösung unter Disulfidaustausch (Abbildung 1). Bringt man nun durch gezielte Mutagenese einen Cysteinrest in unmittelbare Nähe zu der Bindungstasche eines Enzyms oder zum „heißen Fleck“ (hot spot) einer Protein-Protein-Bindungsfläche, so kann man aus einem Ensemble gelöster Disulfide bevorzugt bindende Reste selektieren und durch Massenspektrometrie (LC-MS) des synthetischen Proteinprodukts identifizieren. Auf diese Weise konnten bei Interleukin-2 aus 7000 Disulfiden aktive Strukturen herausgefiltert werden.<sup>[10]</sup>

Die Ligation auf Proteinoberflächen kann auch verwendet werden, um neben bekannten Bindungstaschen neue Wechselwirkungsbereiche zu entdecken, die zur Steigerung der Affinität oder Selektivität eines Liganden genutzt werden könnten. Dieses Konzept wurde erfolgreich auf Caspase-3 angewandt.<sup>[11]</sup> Die Caspasen sind eine Klasse von Cysteinproteasen, die durch ihre zentrale Funktion beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle



**Abbildung 2.** Synthese einer polymermodifizierten Variante von humanem Erythropoietin durch eine Kombination von Thioester- und Oximligationen. Die blauen Bereiche kennzeichnen die Polyethereinheiten.



**Abbildung 3.** Disulfidligation auf der Oberfläche von Proteinen (In-situ-Ligation) zur Identifizierung hochaffiner Liganden und neuer Wechselwirkungsbereiche außerhalb der katalytisch aktiven Bindungstasche.

spielen (u. a. bei der Krebsentstehung). Für die In-situ-Synthese eines affinen Liganden bot sich der Cysteinrest des aktiven Zentrums an (Abbildung 3). Die Sulfanylfunktion des aktiven Zentrums wurde zunächst mit einem bekannten irreversiblen Inhibitor alkyliert, der eine maskierte SH-Funktion enthielt. Diese zweite Sulfanylfunktion reagierte dann im Sinne der beschriebenen In-situ-Ligation mit einer Disulfidbibliothek. Selektiert wurde dabei eine Ligand-Linker-Kombination, die bevorzugt eine Bindungstasche außerhalb der aktiven Position des Enzyms besetzt. Zur Kontrolle wurde die gefundene Struktur zu einem löslichen, reversiblen Inhibitor abgewandelt. Allerdings waren teilweise erhebliche Veränderungen am Linker erforderlich, um in Lösung  $K_i$ -Werte unter  $1 \mu\text{M}$  zu erreichen.

Die beiden Beispiele illustrieren die großen Fortschritte der Organischen

Proteinchemie. Über die De-novo-Synthese von Proteinen hinaus ist es mittlerweile möglich, mit chemischen Methoden die Eigenschaften von Proteinen gezielt zu verändern. Die beschriebenen Techniken können die Entwicklung von neuen Proteinwirkstoffen, aber auch die Suche nach neuen niedermolekularen Wirkstoffen erleichtern. Zugleich wird deutlich, wie wichtig Analyse- und Trenntechniken für das Erreichen derart anspruchsvoller Ziele sind. Erst die breite Verfügbarkeit von hochauflösenden massenspektrometrischen und flüssigkeitschromatographischen Techniken hat die beschriebenen Arbeiten möglich gemacht. Weiterer Forschungsbedarf besteht nach wie vor bei der genauen Charakterisierung der Ligationmethoden. Hier wäre es wünschenswert, durch systematische Arbeiten mehr über die Nebenprodukte, eventuell notwendige Schutzgruppen und das Ausmaß der

Racemisierung von Aminosäurebausteinen in Ligationsprodukten zu erfahren.

Online veröffentlicht am 20. Juli 2004

- [1] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1953**, 586, 129–149.
- [2] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [3] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007–2010; b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939–1941.
- [4] G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. H. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, 299, 884–887.
- [5] Als Ausbeuten werden für die Peptidsynthese und Ligation 15–30%, für die Oximligation 30–50%, für die Thioesterligation 40–70% und für die Faltung 25–40% angegeben. Daraus errechnet sich eine Gesamtausbeute zwischen 0.072 und 2% ohne Berücksichtigung der Ausbeuteverluste während der Peptidsynthese.
- [6] a) H. B. F. Dixon, *Biochem. J.* **1964**, 90, 2c–3c; b) H. B. F. Dixon, *Biochem. J.* **1964**, 92, 661–666.
- [7] A. Papanikos, J. Rademann, M. Meldal, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2176–2181.
- [8] S. Weik, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2595–2598; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2491–2494.
- [9] D. Tumelty, M. Carnevali, L. P. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14238–14239.
- [10] M. R. Arkin, M. Randal, W. L. DeLano, J. Hyde, T. N. Luong, J. D. Oslob, D. R. Raphael, L. Taylor, J. Wang, R. S. McDowell, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1603–1608.
- [11] D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 308–314.