

# Die Wissenschaft von Proteinen im Reich der organischen Chemie begründen: Totalsynthese von SEP (synthetisches Erythropoeseprotein)

Stephen B. H. Kent\*

Chemische Proteinsynthese · EPO · Glycoprotein-mimetika · Peptidthioester · Proteindesign

**E**rythropoietin, bekannt als EPO, ist ein hormonelles Glycoprotein, das die Produktion von roten Blutkörperchen stimuliert. Rekombinantes EPO wurde als „die wohl erfolgreichste Droge, die durch die Revolution der rekombinanten DNA-Technologie hervorgebracht wurde“, beschrieben. In jüngerer Zeit hat das EPO-Glycoproteinmolekül eine Renaissance als bedeutendes Ziel der organischen Synthesechemie erfahren. In diesem Kurzaufsatz möchte ich auf frühere wichtige Arbeiten zur chemischen Synthese eines maßgeschneiderten EPO-Analogons eingehen, das volle biologische Aktivität und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aufwies. Das Design und die Synthese dieses „synthetischen Erythropoeseatoms“ waren damals ihrer Zeit voraus und haben in den letzten Monaten wieder neue Bedeutung gewonnen. Ich möchte hier die Geschichte einer der wesentlichen Leistungen der Synthesechemie etwas detaillierter dokumentieren, als es in der Primärliteratur möglich ist, wobei auch auf den heutigen Kontext eingegangen werden soll.

## 1. EPO

### 1.1. Entdeckung, Isolierung und molekulare Struktur

Das Vorkommen eines biologischen Faktors, der die Produktion von roten Blutkörperchen stimuliert, wurde schon 1906 vorgeschlagen<sup>[1]</sup> und in weiterführenden Experimenten bestätigt. Erythropoetin selbst wurde zuerst von Goldwasser und Mitarbeitern 1977 an der University of Chicago in hoher Reinheit aus humanem Urin gewonnen.<sup>[2,3]</sup> Diese Arbeiten waren die Kulmination eines fünfzehn Jahre währenden Forschungsprojektes. Dieses humane EPO konnte als Glycoprotein identifiziert werden, das aus einer Polypeptidkette von 166 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken aufgebaut war (Abbildung 1).<sup>[4]</sup> Die Struktur des

bakteriell exprimierten, nichtglycosylierten humanen Met-Lys-[Asn24Lys, Asn38Lys, Asn83Lys]-EPO wurde durch NMR-Spektroskopie<sup>[5]</sup> und Röntgenkristallographie bestimmt. Im zweiten Fall war EPO an die extrazelluläre Domäne des EPO-Rezeptors gebunden (Abbildung 2).<sup>[6]</sup>

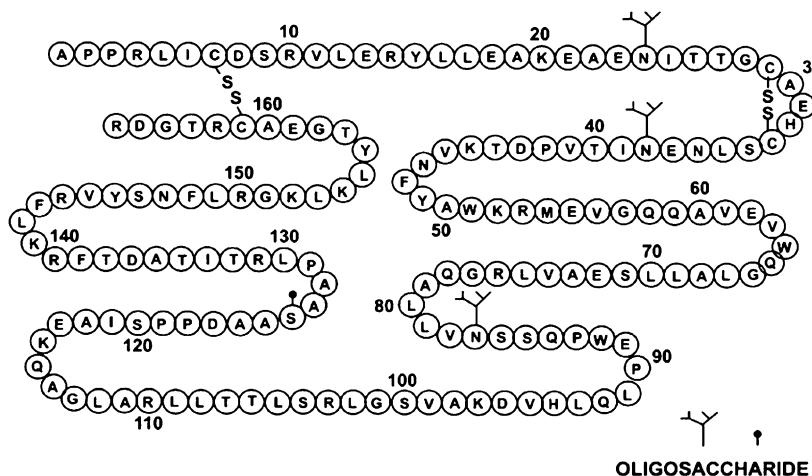
Humanes, aus natürlichem Urin isoliertes EPO hat nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) ein apparentes Molekulargewicht von ca. 34000 und zeigt ein heterogenes Glycosylierungsmuster, vor allen wegen einer unterschiedlichen Zahl von Sialinsäuren. Sowohl natürliches humanes als auch rekombinant in Säugerzellen exprimierte EPO weisen drei N-glycosidisch verknüpfte, komplexe Oligosaccharide und eine O-glycosidisch verknüpfte Bindung auf (Abbildung 3).<sup>[7]</sup>

### 1.2. Rolle der Glycosylierung für die biologische Aktivität von EPO

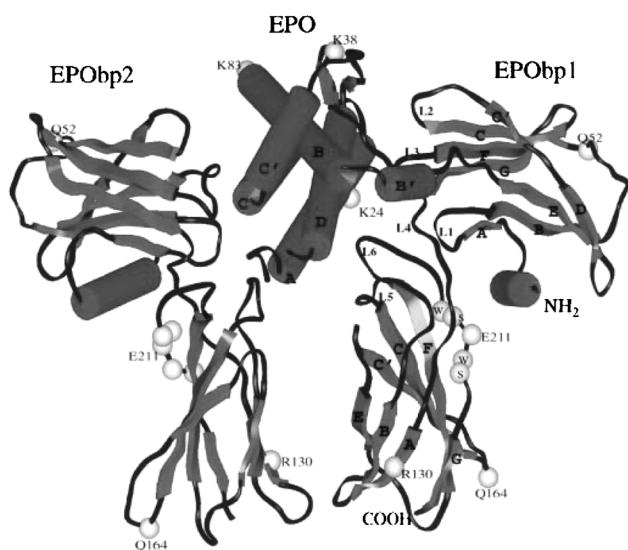
Bei In-vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Deglycosylierung von EPO, das aus natürlichen Quellen isoliert worden war, dessen Fähigkeit, an Rezeptor-exprimierende Zellen zu binden und diese zu aktivieren, nicht verringert; allerdings wurde dabei die biologische Aktivität in vivo inhibiert.<sup>[8]</sup> Ähnliche Befunde wurden mit glycosylierten und nichtglycosylierten rekombinanten EPO-Proben erhalten.<sup>[9]</sup> Es folgt aus diesen Ergebnissen, dass in vivo die Glycosylierung die Geschwindigkeit beeinflusst, mit der EPO aus dem Blutkreislauf entfernt wird – sie beeinflusst aber nicht Rezeptorbindung und -aktivierung.

[\*] Prof. Dr. S. B. H. Kent

Department of Chemistry, University of Chicago  
Chicago, IL 60637 (USA)  
E-Mail: skent@uchicago.edu  
Homepage: <http://chemistry.uchicago.edu/faculty/faculty/person/member/stephen-bh-kent.html>



**Abbildung 1.** Die chemische Struktur von EPO. Wiedergabe aus Lit. [51].



**Abbildung 2.** Röntgenkristallstruktur von Met-Lys[Asn24Lys,Asn38-Lys,Asn83Lys]-EPO, gebunden an seinen Rezeptor. Wiedergabe aus Lit. [6].

### 1.3. Rekombinantes EPO als humanes Therapeutikum

Humanes EPO war eines der ersten rekombinanten Proteine, die als humanes Therapeutikum zur Behandlung von

Anämie und zum Einsatz bei Dialysepatienten entwickelt wurden.<sup>[10]</sup> Diese Patienten können damit eine wiederholte Bluttransfusion vermeiden. Von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassenes rekombinantes EPO wird in CHO-Zellkulturen exprimiert und besteht aus einer 165 Aminosäure langen Polypeptidkette, die identisch mit der Sequenz des reifen humanen EPO ist (allerdings wurde das C-terminale Arg<sup>166</sup> während der Expression entfernt). Rekombinantes EPO weist ein heterogenes Glycosylierungsmuster mit charakteristischen Isoformen auf. Sie unterscheiden sich voneinander durch die Zahl der Sialinsäuren, aus denen sich eindeutige isoelektrische Punkte ergeben; isoelektrische Fokussierung der rekombinanten EPO-Isoformen führt zu deutlich unterschiedlichen Mustern von rekombinantem und natürlichem, aus Urin gewonnenem EPO (Abbildung 4).<sup>[11]</sup>

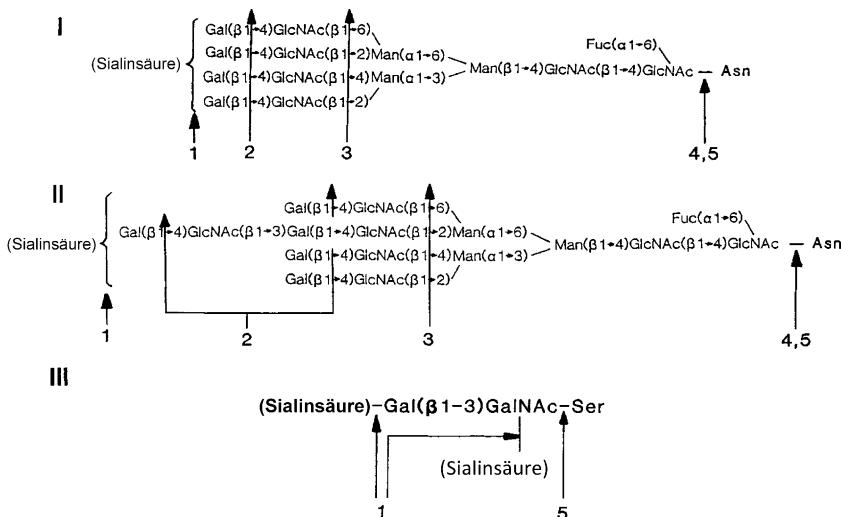
Dieser Unterschied in den Gesamtladungsmustern von natürlichen und rekombinanten EPO-Isoformen bildet die Grundlage für die Identifizierung der Herkunft des im Blut von Ausdauersportlern gefundenen EPO.<sup>[11]</sup> Der Missbrauch von EPO im Ausdauerleistungssport war nach seiner Einführung als Medikament weit verbreitet, und der Einsatz von EPO als Dopingmittel führt seit nunmehr über zehn Jahren immer wieder zu Schlagzeilen. Dennoch bleibt die Behandlung mit rekombinantem EPO als Therapeutikum eine der Erfolgsgeschichten der biotherapeutischen Industrie; EPO ist „wohl das erfolgreichste Medikament, das die Revolution der rekombinanten DNA-Technologie hervorgebracht hat“.<sup>[12]</sup>



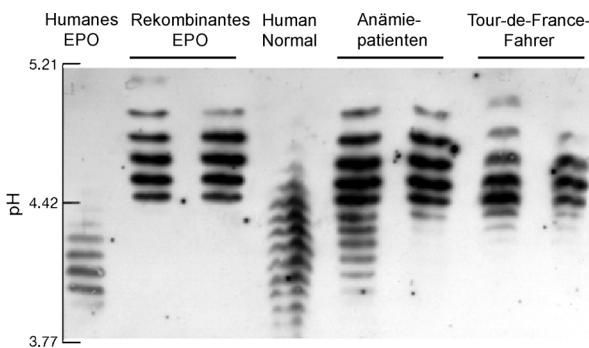
Stephen Kent erhielt seinen B.Sc. und M.Sc. in seiner Heimat Neuseeland und promovierte (in organischer Chemie) an der U.C. Berkeley. Von 1974 bis 1981 forschte er mit Bruce Merrifield an der Rockefeller University. Kent hatte Fakultätspositionen am California Institute of Technology und im The Scripps Research Institute inne. Von 1997 bis 2001 war er Forschungsleiter bei Gryphon Sciences. Gegenwärtig ist er Chemieprofessor an der University of Chicago.

### 1.4. EPO als Ziel der organischen Synthesechemie

In den späten 1990er Jahren begann ein Team von Chemikern, Biochemikern und Biologen bei Gryphon Sciences (South San Francisco, USA), durch chemische Totalsynthese ein EPO-Analogon herzustellen, das eine definierte kovalente Struktur, volle biologische Aktivität und verbesserte therapeutische Eigenschaften aufweisen sollte. Unser Ziel war die eindeutige chemische Synthese eines EPO-Analogs, dessen Polypeptidkette mit monodispersen synthetischen Polymeren modifiziert ist, die die hydrodynamischen



**Abbildung 3.** Struktur komplexer Glycane, die bei rekombinant in Säugerzellen hergestelltem EPO nachgewiesen wurden. Die Pfeile markieren die Spaltstellen spezifischer Glycosidasen. Wiedergabe aus Lit. [7].



**Abbildung 4.** Isoelektrische Fokussierung von natürlichen und rekombinanten EPO-Formen. Wiedergabe aus Lit. [11].

Eigenschaften und Ladungen des EPO-Glycangerüstes nachahmen. Es wurde erwartet, dass es die Herstellung von chemisch synthetisierten Glycoprotein-mimetischen Formen von EPO in hoher Reinheit und mit definierter kovalenter Struktur ermöglichen würde, die EPO-Grundstruktur systematisch derart abzuwandeln, dass EPO-Analoga mit verbesserten Wirkstoffeigenschaften erhalten werden könnten.

Eine solche Zielsetzung erfordert den Zugang zu effektiven chemischen Methoden für die Proteinsynthese sowie neue Verfahren zur Konstruktion von monodispersen Glycanmimetika. Zugleich müssen die molekularen Ursachen der Auswirkungen der Glycosylierung auf die biologischen Eigenschaften von EPO verstanden werden. Sind all diese Voraussetzungen erfüllt, sollte dies zu einem chemischen EPO-Analogon mit eindeutiger molekularer Struktur und sorgfältig maßgeschneiderten Eigenschaften führen.

## 2. Chemische Proteinsynthese

### 2.1. Geschichte

Vor über 100 Jahren stellte Emil Fischer fest, dass die Herstellung von Proteinmolekülen eine wichtige Zielsetzung der Synthesechemie sei. In seinen Ausführungen anlässlich der Verleihung des zweiten Nobelpreises in Chemie sagte Fischer: „*Trotzdem wird das chemische Rätsel des Lebens nicht gelöst werden, bevor nicht die organische Chemie ein anderes noch schwierigeres Kapitel, die Eiweißstoffe, in gleicher Weise wie die Kohlenhydrate bewältigt hat.*“<sup>[13]</sup>

Franz Hofmeister und Emil Fischer schlugen unabhängig voneinander die Peptidtheorie zur Erklärung der kovalenten Struktur von Proteinen vor. Proteine sind lineare Polymere aus  $\alpha$ -Aminosäuren, die durch Amid(Peptid)-Bindungen miteinander verbunden sind. In den folgenden fünf Dekaden entwickelten Fischer, seine wissenschaftlichen Nachfolger und Chemiker aus der ganzen Welt verschiedene anspruchsvolle Methoden zur Totalsynthese von Peptiden, die in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden können.<sup>[14]</sup>

Erst mit der Bestimmung der kompletten kovalenten Struktur des Insulins mit 51 Resten durch Sanger in den späten 1950er Jahren<sup>[15]</sup> wurde die Aminosäuresequenz verfügbar, die eine Totalsynthese erst ermöglichte: „*One significant result of this work is that it demonstrates that insulin, and probably other proteins, are homogeneous substances with unique structures and are not merely statistically random polymers of amino acids. This brings the science of proteins into the realms of classical organic chemistry and opens up the way to similar studies of the many other proteins that exist in nature and hence to a better understanding of the chemistry of life.*“<sup>[16]</sup>

Bis zu den 1970er Jahren haben immer leistungsfähigere Methoden zur Herstellung von kristallinem Insulin geführt, das volle biologische Aktivität aufwies.<sup>[17]</sup> Gleichzeitig mit diesen Entwicklungen wurde von Merrifield die Festkörperpeptidsynthese (SPPS) eingeführt.<sup>[18]</sup> SPPS ist der Archetyp der Polymer-gestützten organischen Synthese; diese Methode

machte die präparative Peptidchemie einem weiten Kreis von Wissenschaftlern zugänglich und erhöhte die Zahl der chemisch hergestellten Peptide stark.

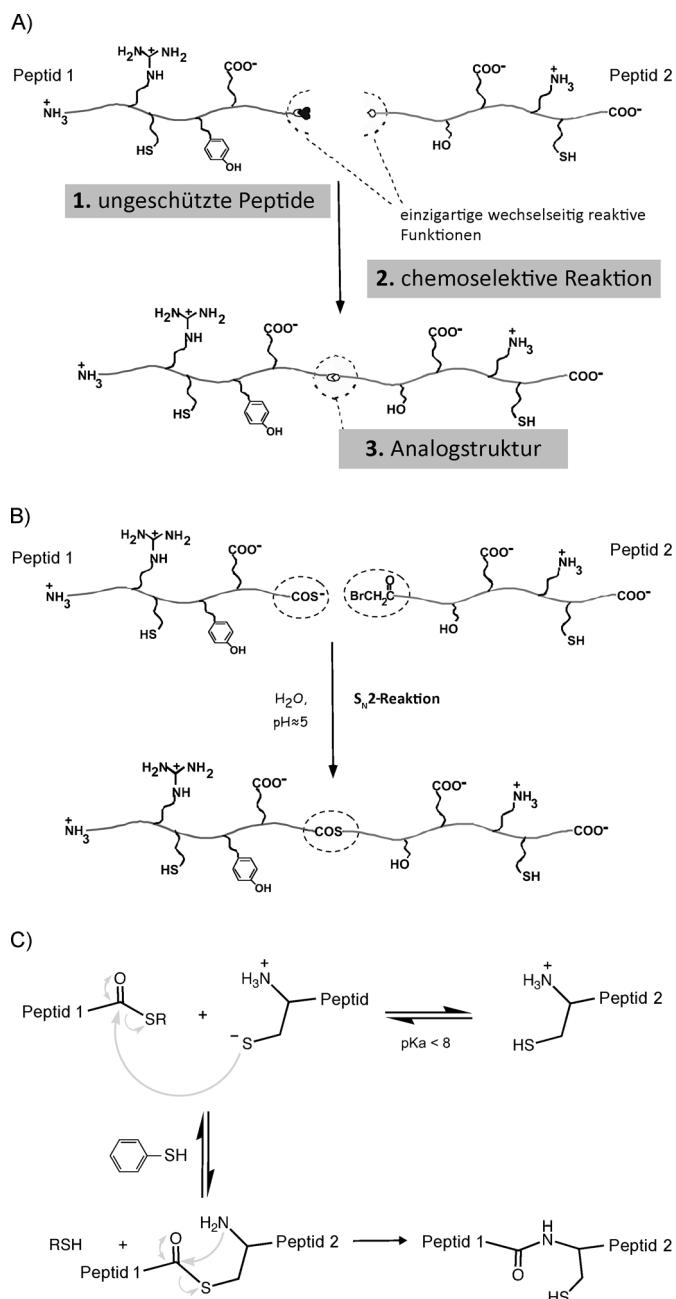
Die inhärenten Eigenschaften der beiden Syntheseansätze in Lösung und im Festkörper verhinderten jedoch eine praktikable, reproduzierbare Totalsynthese von Proteinen mit typischer Größe.<sup>[19]</sup> Bei der SPPS können Nebenprodukte entstehen, die von nicht vollständigen Reaktionen oder Nebenreaktionen herrühren. Da diese Produkte harzgebunden sind, sammeln sie sich während der Synthese an und führen zu einer komplexen Mischung von Endprodukten. Peptidsynthesen in Lösung haben den Nachteil geringer Löslichkeit der vollständig geschützten Peptidsegmente in organischen Lösungsmitteln und führen damit zu langsamten Reaktionen und schlechten Ausbeuten. Zusätzlich kann unter basischen Reaktionsbedingungen Racemisierung an der C-terminalen Aminosäure auftreten. Für Peptidsynthesen sowohl in Lösung als auch an der festen Phase gibt es Besonderheiten, die eine effektive Aufreinigung der Zwischenprodukte erschweren und ihre analytische Charakterisierung stören.<sup>[19]</sup> Infolgedessen war die chemische Synthese von Proteinen mit mehr als ca. 50 Aminosäuren ein entmutigendes und äußerst fragwürdiges Unterfangen.

Sieben Dekaden nach Fischer wurde der Status der präparativen Proteinchemie von Kenner 1977 anlässlich seiner „Bakerian Lecture“ vor der Royal Society über die letztlich erfolglose Peptidsynthese in Lösung des Enzyms Lysozym eloquent zusammengefasst.: „... the vitality of organic synthesis is far from exhausted by the efforts of the previous decades. Nevertheless such investigations, intriguing though they be, do not tackle the fundamental problem alluded to earlier in this lecture, namely the simulation in the laboratory of Nature's marvellous intramolecular coupling of carboxyl and amino groups on the template of protein biosynthesis ... What is required is a general method for coupling sections of a polypeptide chain by virtue of an intramolecular condensation.“<sup>[20]</sup>

## 2.2. Chemische Ligation

Anfang der 1990er Jahre wurde jene Methode, die Kenner sich vorgestellt hatte, nach dem Prinzip der „chemischen Ligation“ entwickelt:<sup>[21]</sup> die chemoselektive kovalente Kondensation ungeschützter Peptide, ermöglicht durch Bildung einer nichtnatürlichen Analogstruktur am Ligationsort (Abbildung 5 A).

Über die Ursprünge des Konzeptes der chemischen Ligation ist bereits berichtet worden.<sup>[22]</sup> Um die Nützlichkeit der Methode zu demonstrieren, verwendeten wir ursprünglich eine Thioester-bildende Ligationschemie (Abbildung 5 B), und nur kurze Zeit später entwickelten wir die „native chemische Ligation“ (Abbildung 5 C), die auf Thioester-vermittelter, Amid-bildender Kondensation von ungeschützten Peptidsegmenten am Xaa-Cys-Verknüpfungsort basiert.<sup>[23]</sup> Die native chemische Ligation wurde als konzeptionelle Erweiterung der Thioester-bildenden chemischen Ligation entwickelt und ist in Einklang mit dem chemischen Ligationskonzept, demzufolge zunächst ein nichtnatürlicher Thioester am Ort der Ligation gebildet wird. Der Erfolg der nativen



**Abbildung 5.** Chemische Ligation von ungeschützten Peptidsegmenten. A) Chemoselektive kovalente Kondensation, ermöglicht durch die Bildung eines nichtnatürlichen Analogons am Ligationsort;<sup>[21]</sup> B) chemische Ligation unter Bildung eines Thioesters;<sup>[21]</sup> C) native chemische Ligation; das anfängliche Ligationsprodukt enthält einen nichtnatürlichen Thioester, der sich durch eine intramolekulare nukleophile Reaktion in die native Peptid(Amid)-Bindung am Ligationsort umlagert.<sup>[23]</sup>

chemischen Ligation basierte auf dem Wissen des korrekten Reaktionsmechanismus. Der Schlüssel hierzu waren geeignete Thioarylkatalysatoren, die einen schnellen wie auch einleitenden reversiblen Thioester-bildenden Schritt gewährleisteten; infolgedessen ist die Reaktion regioselektiv: Nur der mit dem N-terminalen Cys gebildete Thioester kann die irreversible intramolekulare Umlagerung eingehen, um das Amid-haltige Endprodukt der Ligation zu bilden.<sup>[24,25]</sup> Die

native chemische Ligation wird in wässrigen Lösungsmitteln bei neutralen pH-Werten durchgeführt; chaotrope Substanzen wie 6M Guanidinium-Hydrochlorid ermöglichen es im Allgemeinen, millimolare Peptidkonzentrationen zu verwenden, was zu annehmbaren Reaktionsgeschwindigkeiten und fast quantitativen Ligationsausbeuten führt. Bis heute bleibt die native chemische Ligation die wirkungsvollste Ligationschemie.

Das Prinzip der chemischen Ligation und die native chemische Ligation haben unsere Fähigkeit beeinflusst, Proteine durch chemische Totalsynthese herzustellen.<sup>[26]</sup> Die chemo-selektive Reaktion von ungeschützten Peptiden ist praktisch und robust. Dieses einfache Verfahren zur Totalsynthese von Proteinen löste mit einem Schlag alle Probleme, die den klassischen Ansatz von Reaktionen in organischen Lösungsmitteln mit einem maximalen Schutzgruppenkonzept so schwierig gemacht hatten: In millimolarer Konzentration sind ungeschützte Peptide in 6M Guanidinium-Hydrochlorid nahezu immer löslich, sodass die native chemische Ligation in wenigen Stunden ablaufen kann. Sogar mit größeren Peptidsegmenten ist die Kondensation fast quantitativ. Da die Reaktion unter neutralen Bedingungen durchgeführt wird, erfolgt keine Racemisierung.

Darüber hinaus hat der Zugang zu gut charakterisierten, ungeschützten, synthetischen Peptiden in hoher Reinheit die Beschränkungen überwunden, die durch die statistische Akkumulierung von harzgebundenen Nebenprodukten hervorgerufen wurden, was die Synthese größerer Peptide verhinderte. Wie auch immer die Größe der durch SPPS hergestellten Peptide ausfällt, die chemische Ligation ermöglicht nunmehr durch Verdopplung und wiederholte Verdopplung die maximale Größe der durch chemische Totalsynthese hergestellten Polypeptidketten zu steigern. Mit dem Aufkommen der chemischen Ligation wurden Proteine mit voller biologischer Aktivität und Molekülmassen von über 20 kDa durch Totalsynthese zugänglich.<sup>[27,28]</sup>

### 2.3. Synthese von Peptidthioestern

Die effiziente Herstellung von Peptidthioestern als Bausteine der nativen chemischen Ligation ist der Schlüssel für eine erfolgreiche chemische Proteinsynthese. Übliche Strategien der SPPS sind ungeeignet zur Präparation von Peptiden mit einem vorab gebildeten Thioester, da dieses Strukturelement leicht durch nukleophile Amine angegriffen wird. Sowohl Piperidin, das verwendet wird, um die N<sup>α</sup>-Fmoc-Schutzgruppen abzuspalten, als auch das freigesetzte und neutralisierte N-terminale Amin, das bei der Standard-Boc-Chemie nach jedem Schritt der SPPS entsteht, werden mit einem vorhandenen Thioester reagieren (Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). Eine zweckmäßige Alternative, um diese Anfälligkeit der Thioester-haltigen Peptide zu umgehen, bietet die In-situ-Neutralisierungs-Boc-Chemie.<sup>[29]</sup> Bei jedem Schritt der Synthese wird das Peptidharz mit dem vorab gebildeten Thioester in der Gegenwart von hohen Konzentrationen der zugegebenen, aktivierten Boc-Aminosäure neutralisiert. Damit wird der Thioester nicht den Amin-Nukleophilen ausgesetzt. Diese

einfache und effektive SPPS-Chemie wurde ursprünglich entwickelt, um eine Aggregation der wachsenden Peptidkette zu minimieren – sie ist aber auch ein unkomplizierter Weg, um Peptidthioester für die chemische Proteinsynthese zu generieren.<sup>[30]</sup>

### 2.4. Aufreinigung und analytische Kontrolle

Peptidthioester sind vollständig stabil unter Bedingungen, die normalerweise für die Handhabung von synthetischen Peptiden angewendet werden (typischerweise 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser/Acetonitril-Lösungsmitteln). Die ungeschützten Rohpeptide können leicht über Umkehrphasen(RP)-HPLC aufgereinigt werden. Über analytische RP-HPLC mit kombinierter Massenspektrometrie (LCMS) lässt sich die Qualität der Aufreinigung exakt verfolgen. Die Verwendung von ungeschützten Peptidsegmenten hat die routinemäßige analytische Kontrolle durch hochauflösende Methoden wie LCMS erleichtert und die einfache Aufreinigung von synthetischen Zwischenprodukten und Endprodukten durch präparative HPLC ermöglicht. Die Reinheit und korrekte Masse können durch LCMS direkt bestimmt werden, da die Endprodukte in ungeschützter Form erhalten werden. Eine solch präzise Bestimmung der Masse ist eine wichtige Bestätigung, dass tatsächlich ein Proteinmolekül mit korrekter Struktur erhalten wurde.

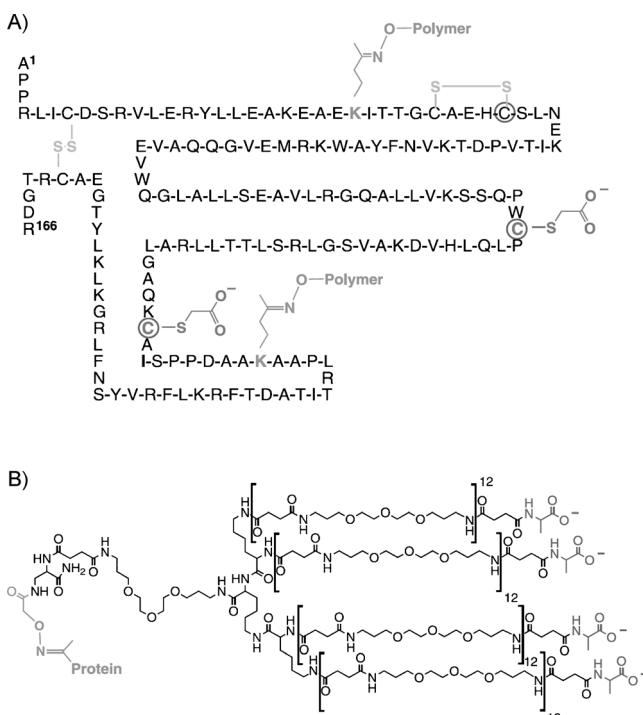
## 3. Synthetisches Erythropoeseprotein (SEP)

In den späten 1990er Jahren stand eine Reihe praktischer Methoden für die Proteinsynthese zur Verfügung.<sup>[31]</sup> Dies ermöglichte es uns zu versuchen, ein Glycoprotein als Wirkstoff mit dem Ziel zu entwickeln, die therapeutischen Eigenschaften von EPO zu verbessern. Unsere Ziel war, ein „designates Glycoproteinanalogon“ – d. h. ein mimetisches Glycoprotein mit definierter chemischer Struktur, voller biologischer EPO-Aktivität und verbesserten pharmakokinetischen (PK-)Eigenschaften – durch chemische Totalsynthese herzustellen.

Mehrere Aspekte waren für das Design des SEP-Moleküls entscheidend: Zum einen sollten Modifikationen der Polypeptidstruktur gleichzeitig die Synthese erleichtern und die biologische Aktivität erhalten. Zum anderen sollten die komplexen N-Glycane, die sowohl bei natürlichem als auch bei rekombinantem EPO nachgewiesen wurden, durch Polymere ersetzt werden, die ähnliche hydrodynamische Eigenschaften und Ladungsmuster aufweisen. Das oberste Ziel des Forschungsvorhabens bestand darin, durch chemische Totalsynthese systematisch die therapeutischen Eigenschaften von EPO zu verbessern.

### 3.1. Design

Die kovalente Struktur des SEP-Zielproteins ist in Abbildung 6 abgebildet.<sup>[32]</sup> Die 166 Aminosäuren lange Polypeptidkette von SEP enthält auch das natürliche C-terminale



**Abbildung 6.** Synthetisches Erythropoeseprotein (SEP). A) Kovalente Struktur von SEP; B) Struktur der „mimetischen Glycangruppe“, ausgestattet mit einer negativ geladenen Ladungskontrolleinheit. Das zweigeteigte Polymer war monodispers; molekulare Summenformel:  $C_{737}H_{1354}N_{112}O_{267}$ , Molekulargewicht: 16057.2 (durchschnittliche Isotopenzusammensetzung). Wiedergabe aus Lit. [32].

Arg<sup>166</sup>, das nicht in rekombinantem humanem EPO gefunden wurde. In den Positionen 24, 89, 117 und 126 wurden Aminosäuren ausgetauscht, um geeignete Positionen für die Ligation der ungeschützten Peptidfragmente und das Anbringen der verzweigten Polymerketten zu generieren (siehe Abschnitt 3.2).

Die komplexen *N*-Glycane von natürlichem und rekombinantem humanem EPO wurden durch ein „mimetisches Glycangerüst“ ersetzt. Es handelte sich dabei um ein monodisperses verzweigtes Polymer, das planmäßig konstruiert wurde, um das hydrodynamische Volumen und andere Eigenschaften des natürlichen Glycoproteins nachzubilden. Größere hydrodynamische Volumina verzögern die renale Clearance durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR – Gesamtvolume des Primärharns, das von allen Glomeruli beider Nieren zusammen in einer definierten Zeiteinheit gefiltert wird). In die verzweigten Polymere wurden Carboxylate eingebaut, um die natürlich vorkommenden Sialinsäuren zu ersetzen. Es ist bekannt, dass diese negative Ladung die Clearance durch die renale Filtration verlangsamt.<sup>[8,9]</sup> Die chemische Synthese der neuartigen Polymerkonstrukte basierte auf der Präzisionsoligomersynthese von Rose und Vizzavona, bei der 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin/Succinsäureanhydrid(TTD-SUCC)-Chemie zur Anwendung kommt,<sup>[33]</sup> und umfasste eine Kombination von Festphasenchemie und Synthesen in Lösungsmitteln. Das resultierende monodisperse und verzweigte Polymer enthielt eine einzige Aminoxyfunktion. Diese reagierte chemoselektiv mit dem Keton eines Lävulinsäure-modifizierten Lysins unter Bildung

eines Oxims.<sup>[34]</sup> Ein Alanin wurde mit seinem N-Terminus an jeden der TTD-SUCC-Oligomerzweige gebunden, um negative Ladungen bereitzustellen, die den Effekt von Sialinsäuren im humanen EPO-Glycoprotein simulieren sollten.

### 3.2. Synthese

Die Synthese von SEP ist in Abbildung 7 aufgeführt. Die Polypeptidkette wurde, mit dem C-terminalen Peptid als Startpunkt, aus vier synthetischen Segmenten durch aufeinanderfolgende native chemische Ligationen aufgebaut. Die beiden N-terminalen Cys-Reste 117 und 89 der Mittelsegmente waren alkyliert, um anstelle der natürlichen Glu-Reste „pseudo-Glu“-Einheiten zu generieren. Das natürliche Cys161 wurde während der Alkylierungsreaktion durch das orthogonale Cys(picolyl)-Derivat geschützt. Die letzte Ligation wurde mit Cys33 durchgeführt, wobei die Seitenketten der natürlichen Cys7- und Cys29-Reste nicht geschützt wurden. Die N- und C-terminalen Peptidsegmente enthielten jeweils eine Kopie des verzweigten Polymers, das über eine Oximbindung an die Seitenkette eines – durch Lävulinsäure modifizierten – Lys-Restes angeknüpft war. Die natürlichen Glycosylierungsorte von EPO befinden sich an den Positionen 24 und 126, und es wurden deshalb die gleichen Stellen gewählt, um die Polymere an das Protein zu binden. Aus der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des EPO-Rezeptors im Komplex mit seinem Substrat EPO<sup>[6]</sup> konnte entnommen werden, dass die Polymere diese Bindung nicht stören würden.

### 3.3. Analytische Charakterisierung

Die vollständige, 166 Aminosäuren lange und polymer-modifizierte SEP-Polypeptidkette wurde über RP-HPLC aufgereinigt und anschließend unter gleichzeitiger Bildung der nativen Disulfidbrücken zum SEP-Protein gefaltet.<sup>[32]</sup> Die Totalsynthese von SEP wurde mehrmals wiederholt, wodurch mehr als 100 mg des hoch gereinigten Proteins erhalten werden konnten. Das chemisch synthetisierte SEP genügte den höchsten analytischen Anforderungen der damaligen Zeit: Das polymermodifizierte Protein lief als einzige Bande in SDS-PAGE und bildete bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) eine einzelne Bande mit  $pI = 5.0$ . Auch über LCMS (Molekulmasse:  $(50825 \pm 10)$  Da) konnte die Reinheit demonstriert werden. Aus dem Circular dichroismus(CD)-Spektrum konnte für das gefaltete SEP auf einen hohen helikalen Anteil geschlossen werden (Abbildung 8).

### 3.4. Biologische Aktivität

Nach Abschluss der analytischen Charakterisierung wurden die biologischen Eigenschaften von SEP evaluiert. SEP hatte volle In-vitro-Aktivität in einem Faktor-abhängigen Zelllinienproliferationsassay und zeigte zudem in einem Maus hämatokrit assay volle In-vivo-Aktivität (Abbildung 9). Es ist wichtig anzumerken, dass die ursprüngliche Intention,

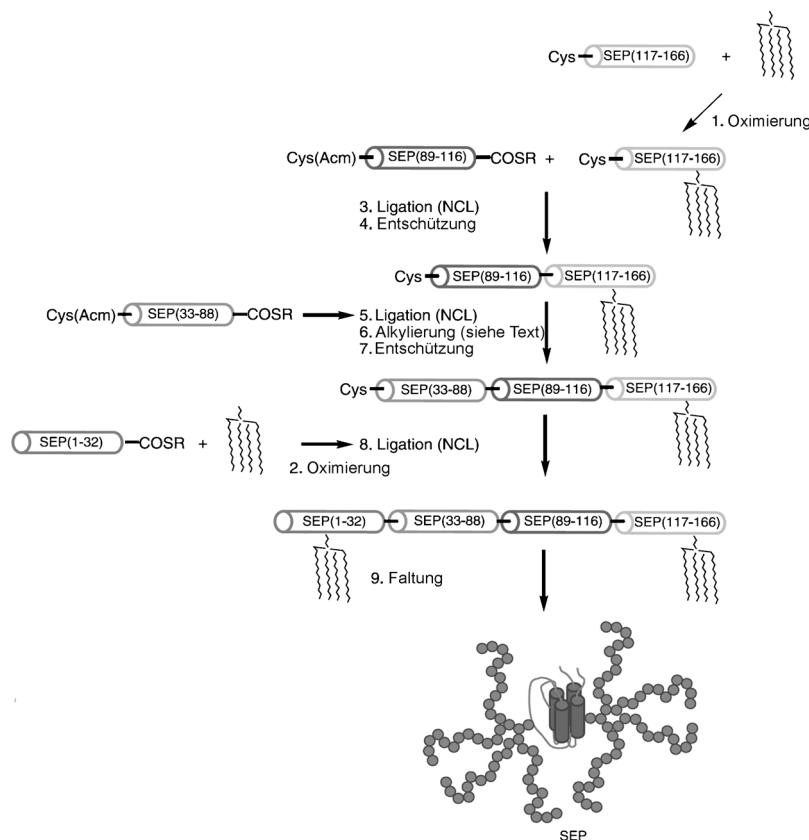


Abbildung 7. Strategie für die chemische Totalsynthese von SEP. Wiedergabe aus Lit. [32].

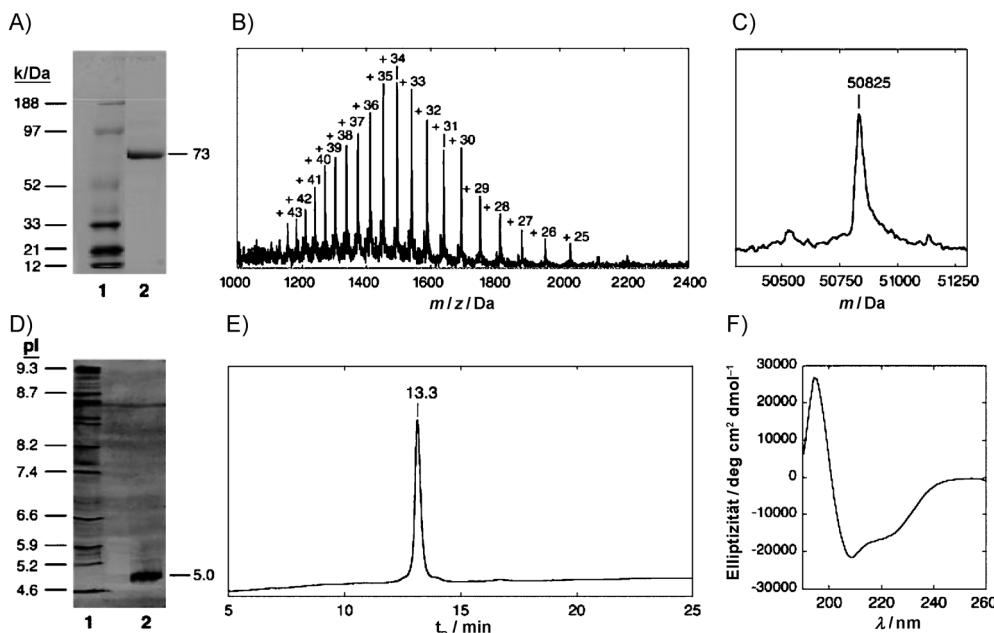
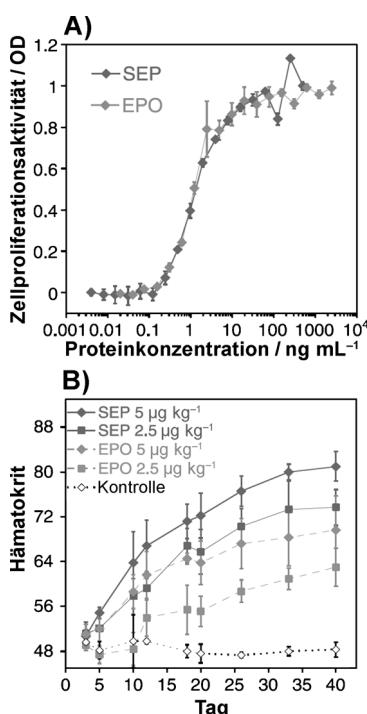


Abbildung 8. Analytische Charakterisierung von SEP. A) SDS-PAGE, apparentes Molekulargewicht 73 000; B) das Elektrospray-Massenspektrum zeigt mehrfach geladene Zustände; C) das rekonstruerte MS-Spektrum ergibt eine gemessene Masse von  $(50825 \pm 10)$  Da; D) die IEF von SEP ergibt eine einzige Bande bei  $pI = 5.0$ ; E) analytische HPLC von SEP; F) CD-Spektrum von SEP. Wiedergabe aus Lit. [32].

nämlich ein mimetisches Glycoprotein mit verbesserten physiologischen Eigenschaften zu entwickeln, umgesetzt werden konnte: SEP hatte verbesserte PK-Eigenschaften und

wurde mit weniger als der Hälfte der Geschwindigkeit von rekombinantem EPO der ersten Generation aus dem Blutkreislauf entfernt (Abbildung 9).<sup>[32]</sup>



**Abbildung 9.** Biologische Aktivität von SEP in vitro und in vivo. A) Faktor-abhängige Zelllinienproliferation in vitro; B) Hämatokrit in Mäusen als Antwort auf SEP (rot) oder rekombinantes EPO (blau). Wiedergabe aus Lit. [32].

### 3.5. Ein „designtes“ Glycoproteinanalogon

Es wurde ein mimetisches Glycoprotein mit einer neuartigen Struktur und einer Molekulmasse von 50825 Da in homogener Form durch chemische Totalsynthese hergestellt. Das synthetische Erythropoeseprotein hatte volle biologische Aktivität und bessere PK-Eigenschaften als rekombinantes humanes EPO der ersten Generation.

## 4. Nachfolgende Entwicklungen

Das Design und die chemische Totalsynthese von SEP haben demonstriert, dass die Synthesechemie mit gezielt entwickelten, nicht in der Natur vorkommenden chemischen Resten dazu genutzt werden kann, systematisch die Eigenschaften von biotherapeutischen Proteinen zu verbessern. Seit der Veröffentlichung dieser ersten Arbeit hat es einige weitere Entwicklungen gegeben.

### 4.1. Neue Synthesechemie

Unsere Fähigkeit, die organische Synthesechemie zur Herstellung von Proteinen zu nutzen, ist durch neuere Entwicklungen in der chemischen Proteinsynthese stark verbessert worden. Dazu zählen: sequenzielle native chemische Ligation in Kombination mit der N-terminalen Cys-Schutzgruppe Thiazolidin (Thz),<sup>[35,36]</sup> die eine Eintopfsynthese ermöglicht; Verbesserung des Thioarylkatalysators für die na-

tive chemische Ligation;<sup>[25]</sup> sowie eine vollständig konvergente Synthese durch kinetisch kontrollierte Ligation.<sup>[33–39]</sup>

Ein aktueller Fokus auf die Synthese von EPO mit natürlichen Kohlenhydratstrukturen hat zu zahlreichen wichtigen Beiträgen für die chemische Synthese von Proteinen geführt. Zum Beispiel wurde die Methode von Yan und Dawson, die nach einer nativen Ligation durch Desulfurierung eine Xaa-Ala-Bindung generiert,<sup>[40]</sup> ausgeweitet und auf ein breites Spektrum von Xaa-Yaa-Bindungen angewendet.<sup>[41–44]</sup> Hierzu wurde auch ein löslicher Katalysator für die Desulfurierung entwickelt.<sup>[45]</sup> Es wurden auch komplexe/remodellierte Glycane, die aus natürlichen Quellen isoliert worden waren, für die Glycoproteinsynthese verwendet.<sup>[46]</sup> Außerdem wurde für eine Semisynthese definierter EPO-Glycoformen die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation) angewendet.<sup>[47]</sup>

### 4.2. Strukturelle Charakterisierung der synthetischen Proteine

Zusätzlich zu den neuen Synthesemethoden gab es auch erhebliche Fortschritte bei der Charakterisierung der synthetischen Proteinprodukte. Wegen der komplexen makromolekularen Natur von Proteinen müssen die synthetischen Proteine einer rigorosen analytischen Kontrolle unterzogen werden. Hierzu zählen die LCMS und ladungsbasierte Methoden wie die IEF, über die die Homogenität geprüft werden kann. Die exakte kovalente Struktur kann auch durch präzise Bestimmung der Masse über LCMS – falls über die gesamte Bande gemessen wird – oder durch direkte Einspritzung des gereinigten synthetischen Proteins bestimmt werden. Die Struktur des gefalteten Proteins kann eindeutig über multidimensionale NMR-Spektroskopie<sup>[38]</sup> oder durch Röntgenstrukturanalyse unter Einbeziehung der Kristallographie von Racematen bestimmt werden.<sup>[38,39,48]</sup> Nur nachdem eine akribische Charakterisierung die Reinheit und chemische Struktur des synthetischen Proteins festgestellt hat, sollte die biologische Aktivität untersucht werden.

### 4.3. Zukünftige Perspektiven

Wie in dem kürzlich erschienenen Kurzaufsatz von Danishefsky et al. so eloquent zusammengefasst wurde,<sup>[49]</sup> hat die zehnjährige Entwicklung bei den Methoden zur Synthese von Glycopeptiden nun dazu geführt, dass die Totalsynthese von EPO mit einer komplexen nativen Glycanstruktur in erreichbare Nähe gerückt ist. Aus diesen Arbeiten werden sich nützliche Anwendungen der organischen Synthesechemie für die Herstellung von EPO-Glycoformen mit definierter Struktur und biologischen Eigenschaften ergeben: „*de novo chemical synthesis might provide a powerful path to designed glycoproteins as it offers, in principle, precise structural control while providing opportunities for systematic variation of both the structures of the glycodomains and their location within the peptide sequence.*“<sup>[50]</sup>

Durch das Design und die chemische Totalsynthese von SEP wird ein Weg zu systematisch abgestimmten Eigenschaften von EPO und anderen Glycoproteinen geebnet.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die chemische Totalsynthese von SEP – ein designates mimetisches Glycoprotein mit verbesserten Eigenschaften – war ein Meilenstein in der organischen Syntheseschemie von Proteinen. Sie illustriert anschaulich, wie effizient sich die Prinzipien der medizinischen Chemie dazu anwenden lassen, die Eigenschaften von Proteintherapeutika zu verbessern.

Allgemein wird die Anwendung von präparativer organischer Proteinchemie zusammen mit fortschrittlichen physikalischen Methoden die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Proteinfunktion sehr erleichtern. In Zukunft wird es möglich sein, Enzyme von Grund auf neu zu entwerfen. Unter Verwendung der Syntheseschemie und Anwendung der vollen Bandbreite chemischer Funktionalitäten werden diese de novo entworfenen Enzyme als leistungsfähige und selektive Katalysatoren jedwede chemische Transformation ermöglichen. Dann wird die Wissenschaft der Proteine wirklich Teil des Reichs der organischen Chemie sein.

Ich danke dem Team des SEP Programs von Gryphon Sciences: John W. Adamson, Paolo Botti, James A. Bradburne, E. Neil Cagle, Maia Carnevali, Shiah-Yun Chen, Sonya Cressman, Milan M. Crnogorac, Vincent Gueriguiian, Christie L. Hunter, Suresh Kalbag, Peter J. Keogh, Gerd G. Kochendoerfer, Ada Kung, Jay J. Levy, Donald W. Low, Feng Mao, Les P. Miranda, Heather Porter, Laura Savatski, Janice Schindler-Horvat, Haiyan Shao, Stephen M. Stratton, Jie Tang, Stacey Traviglia, M. Con Wiedeke, Jill Wilken. Ich danke auch Dr. Darren Thompson (TSRI), der mich auf den Absatz in Emil Fischers Nobelpreisrede aufmerksam gemacht hat. COI-Offenlegung: Stephen Kent war in den 1980er Jahren Berater von Amgen und war Chief Scientist von Gryphon Sciences zur Zeit, als das SEP-Projekt initiiert wurde. Dieser Kurzaufsat wurde von Prof. Dr. Martin Engelhard (MPI Dortmund) ins Deutsche übersetzt; ich danke meinem langjährigen Freund und Kollegen für diese exzellente Arbeit.

Eingegangen am 13. Mai 2013

Online veröffentlicht am 11. Oktober 2013

- [1] P. Carnot, C. Deflandre, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1906**, 143, 348–387.
- [2] T. Miyake, C. K.-H. Kung, E. Goldwasser, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 5558–5564.
- [3] E. Goldwasser, *Perspect. Biol. Med.* **1996**, 40, 18–32.
- [4] P.-H. Lai, R. Everett, F.-F. Wang, T. Arakawa, E. Goldwasser, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 3116–3121.
- [5] J. C. Cheetham, D. M. Smith, K. H. Aoki, J. L. Stevenson, T. J. Hoeffel, R. S. Syed, J. Egrie, T. S. Harvey, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 861–866.
- [6] R. S. Syed, S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheetham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, J. Finer-Moore, S. Elliott, K. Sitney, B. A. Katz, D. J. Matthews, J. J. Wendoloski, J. Egrie, R. M. Stroud, *Nature* **1998**, 395, 511–516.
- [7] E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 188, 405–411.
- [8] M. S. Dordal, F. F. Wang, E. Goldwasser, *Endocrinology* **1985**, 116, 2293.

- [9] K. Yamaguchi, K. Akai, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 20434–20439.
- [10] J. W. Eschbach, J. C. Egrie, M. R. Downing, J. K. Browne, J. W. Adamson, *N. Engl. J. Med.* **1987**, 316, 73–78.
- [11] F. Lasne, J. de Ceaurriz, *Nature* **2000**, 405, 635.
- [12] H. F. Bunn, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, 3, a011619.
- [13] E. Fischer, *Nobel Lectures, Chemistry 1901–1921*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, **1966**, S. 21–35.
- [14] J. S. Fruton, *Molecules and Life*, Wiley-Interscience, New York, **1972**.
- [15] F. Sanger, *Nobel Lectures, Chemistry 1942–1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, **1964**, S. 544–556.
- [16] F. Sanger, *Endeavour* **1957**, 16, 48–53.
- [17] K. Eisler, B. Kamber, B. Riniker, W. Rittel, P. Sieber, M. De Gasparo, F. Marki, *Bioorg. Chem.* **1979**, 8, 443–450.
- [18] R. B. Merrifield, *Nobel Lectures, Chemistry 1981–1990*, World Scientific Publishing Co., Singapur, **1992**, S. 149–175.
- [19] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957–984.
- [20] G. W. Kenner, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1977**, 353, 441–457.
- [21] M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, 256, 221–225.
- [22] S. Kent, *Biopolymers* **2010**, 94, iv–ix.
- [23] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [24] P. E. Dawson, M. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4325–4329.
- [25] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.
- [26] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338–351.
- [27] M. Baca, T. W. Muir, M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1881–1887.
- [28] L. E. Canne, A. R. Ferré-D'Amaré, S. K. Burley, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2998–3007.
- [29] M. Schnölzer, P. F. Alewood, D. Alewood, S. B. H. Kent, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1992**, 40, 180–193. [neu veröffentlicht: M. Schnölzer, P. F. Alewood, D. Alewood, S. B. H. Kent, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, 13, 31–44].
- [30] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10068–10073.
- [31] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 925–962.
- [32] G. Kochendoerfer, S.-Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. Hunter, D. Low, N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguiian, P. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, 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.
- [33] K. Rose, J. Vizzavona, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7034–7038.
- [34] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30–33.
- [35] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2588–2592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2534–2538.
- [36] M. Villain, J. Vizzavona, K. Rose, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 673–679.
- [37] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4089–4092; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3985–3988.
- [38] T. Durek, V. Yu. Torbeev, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 4846–4851.
- [39] V. Yu. Torbeev, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1697–1700; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1667–1670.
- [40] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526–533.
- [41] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10064–10065.
- [42] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6912–6915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807–6810.
- [43] S. D. Townsend, Z. Tan, S. Dong, S. Shang, J. A. Brailsford, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3912–3916.
- [44] P. E. Dawson, *Isr. J. Chem.* **2011**, 51, 862–867.

- [45] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
- [46] Y. Kajihara, Y. Tanabe, S. Sasaoka, R. Okamoto, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5944–5953.
- [47] K. Hirano, D. Macmillan, K. Tezuka, T. Tsuji, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9721–9724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9557–9560.
- [48] T. O. Yeates, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 41–61.
- [49] R. M. Wilson, S. Dong, P. Wang, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7798–7818; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7646–7665.
- [50] C. Kann, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9047–9065.
- [51] N. Debeljak, A. J. Sytkowski, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1302–1310.