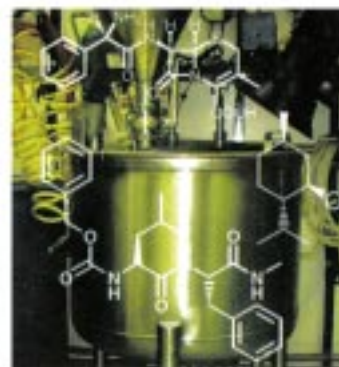


**Protein-
kristalle**



Biopharmazeutika



Biokatalysatoren

Proteinkristalle als neue Katalysatoren

Alexey L. Margolin* und Manuel A. Navia*

Im heutigen Zeitalter der Molekularbiologie wird die Kristallisation von Proteinen häufig als erster notwendiger Schritt betrachtet, um Strukturinformationen durch die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Anders gesehen sind Proteinkristalle aber auch Stoffe, deren chemische und physikalische Eigenschaften sie für eine Reihe anderer Disziplinen interessant und nützlich machen. Trotzdem war bisher die praktische Anwendung kristalliner Proteine stark eingeschränkt, was auf ihre Brüchigkeit sowie die anhaltende Skepsis in Bezug auf ihr planmäßiges

Wachstum und ihre Formulierung zurückzuführen ist. Glücklicherweise erwiesen sich diese Probleme als lösbar. Eine systematische Untersuchung der Biophysik und Biochemie der Proteinkristallisation hat gezeigt, dass man neue kristalline Proteine mehr oder weniger nach Belieben zuverlässig herstellen kann. Diese Kristalle lassen sich wiederum leicht chemisch oder mechanisch verstärken, sodass sie sich für die Vermarktung eignen. Heute werden diese neuen Materialien als Industriekatalysatoren für die Herstellung von Biotherapeutika und für umwelt-

freundliche Reaktionen sowie zur enantioselektiven Chromatographie von Pharmazeutika und Feinchemikalien kommerziell eingesetzt. In naher Zukunft wird sich ihr Anwendungsbe- reich noch vergrößern und die Reinigung und Formulierung von Proteintherapeutika sowie die Entwicklung von Adjuvans-verringerten Impfstoffen umfassen.

Stichwörter: Biotransformationen • Enzymkatalyse • Medizinische Chemie • Proteinkristalle • Wirkstoff-Forschung

1. Einleitung

Die meisten Wissenschaftler assoziieren Proteinkristalle sehr stark mit struktureller Biologie: Ihre Erzeugung ist der notwendige erste Schritt – oder notwendiges Übel – zur Durchführung von Röntgenstrukturanalysen. In Anbetracht der bemerkenswerten durch die makromolekulare Kristallographie bewirkten Fortschritte, die unser Verständnis von biologischen Vorgängen auf molekularer Ebene gemacht hat, ist dieser Interessenschwerpunkt völlig berechtigt. Bis Mai 2001 wurden auf der Internetseite der Protein Data Bank 12514 durch Röntgenstrukturanalyse ermittelte Strukturen von Membranproteinen, Enzymen, Nucleinsäuren und Protein-Nucleinsäure-Komplexen, Hormonen und ihren Rezeptoren, Kohlenhydraten, Peptiden und Viren veröffentlicht.^[1] Viele dieser Strukturen beschreiben die atomare Anordnung von Komplexen spezifischer Liganden mit therapeutisch

interessanten Zielproteinen. In zahlreichen Fällen führte diese Information zu bewährten Medikamenten, die durch Struktur-bezogenes Design entwickelt wurden.^[2] Viele Aspekte dieses riesigen und umfassenden Gebiets sind in der Literatur behandelt.^[3]

Eine der ersten Anwendungen makromolekularer Kristallisationsmethoden ist die Reinigung von Urease aus Jackbohnen durch Sumner 1926,^[4] die als Auftakt zu weiteren biochemischen Untersuchungen dieses Enzyms diente.^[5] Sumners Arbeit liegt zeitlich vor dem 1934 von Bernal und Crowfoot erbrachten Nachweis, dass Kristalle des Enzyms Pepsin Röntgenstrahlen bei atomarer Auflösung beugen können.^[6] Schon vor den Versuchen von Sumner gab es bereits im 19. Jahrhundert mehrere Kristallisationen von Hämoglobinen, Samenproteinen und anderen nichtenzymatischen Proteinen, die von Fruton^[7] und McPherson beschrieben wurden.^[8]

Abgesehen von ihrer Verwendung zur Strukturaufklärung und – in begrenztem Umfang – zur Reinigung von Proteinen wurden Proteinkristalle in der Vergangenheit wenig genutzt. Dies kann teilweise auf die speziellen Bedingungen zurückgeführt werden, unter denen Proteinkristalle gewöhnlich wachsen und gehandhabt werden, da diese mit den meisten in Betracht gezogenen Anwendungen weitgehend unvereinbar sind. Zudem sind Makromolekülkristalle ziemlich brüchig und neigen selbst unter verhältnismäßig milden Bedingungen dazu, sich aufzulösen oder zu zerspringen.

[*] Dr. A. L. Margolin
Altus Biologics Inc.
625 Putnam Ave., Cambridge, MA 02139 (USA)
Fax: (+1) 617-577-6502
E-mail: margolin@altus.com
Dr. M. A. Navia
The Althexis Company
1365 Main Street, Waltham, MA 02145 (USA)
Fax: (+1) 781-647-5552
E-mail: navia@althexis.com

Vor diesem Hintergrund wollten wir quervernetzte Enzymkristalle (cross-linked enzyme crystals, CLECs)^[9] und später – etwas allgemeiner – quervernetzte Proteinkristalle (cross-linked protein crystals, CLPCs) mit erheblich höherer Stabilität und verbesserten Gebrauchseigenschaften herstellen, die den Routineeinsatz derartiger Enzyme und anderer Proteine bei den in der chemischen Produktion herrschenden drastischen Bedingungen ermöglichen.^[10] CLECs werden derzeit bei der Synthese von Feinchemikalien, chiralen Zwischenstufen und Peptiden verwendet. Diese Umsetzungen werden heute nicht nur im Labormaßstab, sondern auch großtechnisch mit mehreren Kilogramm Katalysator und Tausenden Kilogramm des Produkts durchgeführt.

Im Verlauf unserer Untersuchungen galt unser Interesse auch anderen Anwendungen der Kristalle sowie weiteren Verbesserungen von Kristallisations- und Vernetzungsmethoden. Zu diesen nachstehend detailliert besprochenen Anwendungen gehören:

- 1) die Kristallisation als „Routine“-Verfahren zur Reinigung von Proteinen und anderen Makromolekülen
- 2) die Stabilisierung von Proteintherapeutika, um die Freisetzung des Wirkstoffs zu erleichtern und die Haltbarkeit vor der Verwendung zu verlängern

- 3) die Nutzung neuer mikroporöser CLPCs als „bioorganische Zeolithe“ und chirale Träger in der Chromatographie
- 4) der Abbau von Nervengiften zur biologischen Wiederherstellung und zivilen Verteidigung
- 5) biomedizinische Anwendungen wie Lumenaltherapien (siehe Abschnitt 4.4.1), selbstadjuvierende Impfstoffe und Biosensoren

Bemerkenswert an all diesen Überlegungen ist, dass uns die Natur solche exakt aufgebauten Makromoleküle gegen eine verhältnismäßig geringe Anstrengung unsererseits zur Verfügung stellt. Wie Bernal und Crowfoot in ihrer historischen Veröffentlichung feststellen, ist „...the arrangement of atoms inside the protein molecule... of a perfectly definite kind“. Die Proteinmoleküle in einem Kristall sind „...relatively dense globular bodies, perhaps joined together by valency bridges, but in any event separated by relatively large spaces which contain water“. Die Regelmäßigkeit, Einheitlichkeit und Präzision eines Kristallgitters – Merkmale, die bei Beugungsexperimenten effektiv genutzt werden – implizieren andere Eigenschaften und Wirkungen, deren Anwendung bisher noch nicht genug untersucht wurde. Welche anderen Mittel könnten beispielsweise dazu dienen, Objekte atomarer

Alexey L. Margolin erhielt 1975 an der Universität Moskau den M.Sc. in Chemie und promovierte dort 1979 in bioorganischer Chemie. Im Anschluss daran setzte er seine Forschungsarbeiten am Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry fort. 1986 ging er an das Massachusetts Institute of Technology, wo er mit Professor Alexander Klibanov über enzymkatalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln arbeitete. Von 1988 bis 1993 war Dr. Margolin für die Biokatalyseforschung am Merrell Dow Research Institute verantwortlich. Danach ging er zu Altus Biologics, wo er die Forschung und Entwicklung quervernetzter Enzymkristalle leitete. Er ist derzeit Vice President of Science bei Altus Biologics und verantwortlich für alle wissenschaftlichen Aktivitäten des Unternehmens. Im Mittelpunkt seiner Forschungsinteressen stehen die Biokatalyse, die Verwendung von Enzymen in der organischen Synthese und die Stabilisierung und Immobilisierung von Proteinen. Zu seinen neueren Arbeiten gehört die Entwicklung von Proteinkristallen zur Produktion, Formulierung und Freisetzung von Biopharmazeutika.



A. L. Margolin



M. A. Navia

Manuel A. Navia, geboren in Havana auf Kuba, erhielt 1967 den B.A. in Physik von der New York University und 1969 den M.S. in Biophysik von der University of Chicago. Nach einer Unterbrechung des Studiums durch den Militärdienst promovierte er 1974 in Biophysik an der University of Chicago unter der Anleitung von Professor Paul Sigler über die Struktur von tRNA. Bei einem Postdoc-Aufenthalt an den National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, untersuchte er mit Dr. David Davies die Strukturen eines intakten Antikörpers und von Antikörperbruchstücken. Seine Arbeiten in den Merck Research Laboratories von 1980 bis 1989 über strukturabhängiges Arzneimittel-Design (SBDD, structure-based drug design) von Enzyminhibitoren führten zur Zulassung und Vermarktung von Medikamenten. Von 1989 bis 1997 arbeitete Manuel Navia bei Vertex Pharmaceuticals in Cambridge, Massachusetts, wo er die Strukturen von Calcineurin, dem IL-1 β umwandelnden Enzym (Caspase-1) und der HIV-Protease im Rahmen von SBDD-Programmen zu Immunsuppression, Entzündung und HIV-Infektion aufklärte. Das Programm über die HIV-Infektion führte zur Entdeckung und Entwicklung von Amprenavir, das inzwischen zur Bekämpfung von AIDS zugelassen ist. Während seiner Zeit bei Vertex war Manuel Navia Miterfinder der CLEC-Technologie und Gründer der heutigen Altus Biologics. Er ist Mitbegründer und seit 1997 Präsident der Altheix Company in Waltham, Massachusetts, eine Firma, die sich dem strukturbezogenen Design neuer Antibiotika widmet.

Größenordnung wie einen Cofaktor oder eine prosthetische Gruppe in einem Protein exakt in einer bestimmten räumlichen Anordnung zu positionieren, indem man nur seine Finger benutzt!

2. Kristallognese: Ordnung aus dem Chaos

Über die Wissenschaft der Kristallognese wurde eingehend und umfassend berichtet.^[11] Proteinmoleküle aggregieren durch Übersättigung bei hoher Proteinkonzentration sowie in Gegenwart von Reagentien oder unter Bedingungen, die die Löslichkeit von Proteinen verringern. Werden die Lösungsbedingungen auf geeignete Weise verändert, spiegeln die sich zuerst bildenden intermolekularen Assoziationen (Abbildung 1 a–c) die gleichen Wechselwirkungen wider, die

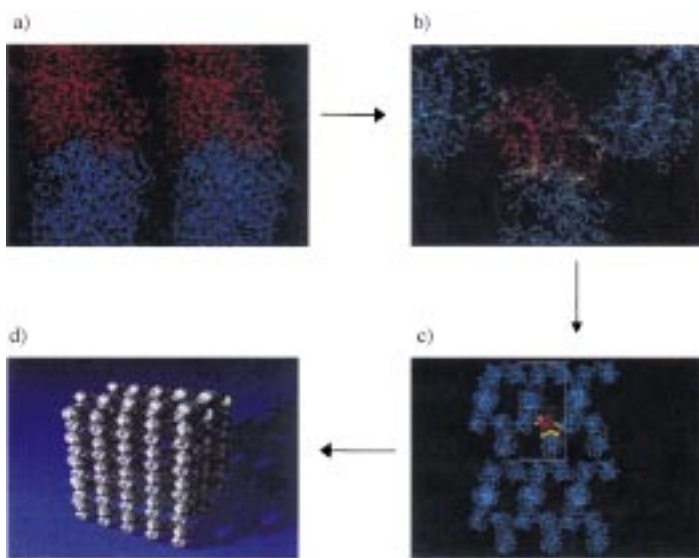


Abbildung 1. Serin-Carboxypeptidase II in der $P4_22$ -Kristallform. a) Räumliche Darstellung der Kontaktregion;^[13] b) Querschnitt durch ein inneres Molekül (rot) der Elementarzelle, die an intermolekularen Kontakten beteiligten Bereiche sind gelb hervorgehoben, darunter ist die in (a) gezeigte Region mit ausgedehnten Kontakten sowie zwei weitere Regionen mit weniger Kontakt; c) Querschnitt durch einen hypothetischen Präkristallisationskomplex; d) Kristallisationskern (siehe Tabelle 2).

sich später im Körper des letztendlich gebildeten makroskopischen Kristalls fortsetzen (Abbildung 1 d).^[12] Diese anfänglich gebildeten Komplexe haben völlig andere physikochemische Eigenschaften als die resultierenden Kristalle, was sich beispielsweise in den oft unterschiedlichen Bedingungen äußert, die zur Bildung von Kristallisationskeimen einerseits und zum Kristallwachstum aus solchen Impflingen andererseits erforderlich sind.

Die Präkristallisationskomplexe können recht klein sein und aus nur fünf oder zehn Elementarzellen bestehen. Abbildung 1 c zeigt in einem Modellquerschnitt, wie ein derartiger Präkristallisationskomplex für die Serin-Carboxypeptidase II in der von Liao et al.^[13] beschriebenen tetragonalen Kristallform aussehen könnte. Abbildung 1 d gibt hingegen ein wesentlich größeres kristallines Aggregat aus etwa 30 Elementarzellen wieder, das ein Kristallisationskern für

die weitere Kristallisation durch geordneten Zuwachs von Proteinen unter Übersättigungsbedingungen sein könnte. Durch weiteres Wachstum kann anschließend ein großer makroskopischer Kristall entstehen, der sich für eine Röntgenstrukturanalyse eignet. Sowohl die Bildung des Kristallisationskeims als auch das Wachstum erfolgen in übersättigten Lösungen, in denen die Proteinkonzentration den Wert ihrer Gleichgewichtslöslichkeit überschreitet. Vor kurzem konnte die Struktur der Präkristallisationskomplexe des Proteins Apoferritin und ihr Übergang zu Kristallisationskernen durch Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) direkt sichtbar gemacht werden.^[14] Eine Erweiterung dieser Untersuchungen auf eine größere Zahl von Makromolekülen könnte erheblich zu unserem Verständnis der entscheidenden ersten Schritte bei der Kristallbildung beitragen.

Die Methoden und Mechanismen der Bildung von Proteinkristallen, die sich für die Röntgenstrukturanalyse eignen, wurden ausführlich beschrieben.^[15] Zur Herstellung von CLECs ist die Batch-Kristallisation zweifellos die Methode der Wahl. Dieses Verfahren ist recht viel versprechend, denn es ist einfach und lässt sich auch im großen Maßstab durchführen.^[16] Mit dieser Methode konnten wir mehr als vierzig Proteine unterschiedlicher Herkunft, z.B. Glycoproteine, Enzyme, Antikörper und Hormone, mit relativen Molekülmassen von 1–500 kDa kristallisieren. Einige dieser Kristalle sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

Durch Steuern der Kristallisationskinetik kann die Größe der Kristalle verändert werden. Im Allgemeinen liefern schnellere Kristallisationsprozesse kleinere Partikel. Für viele chemische Anwendungen, die eine vielfache Wiederverwendung des Katalysators verlangen, werden Kristalle von 50–150 μm bevorzugt, da sie gute Filtriereigenschaften in Verbindung mit hoher Aktivität bieten. Kleinere Kristalle ($<5\mu\text{m}$) eignen sich besser für biomedizinische und andere Anwendungen, bei denen eine Wiederverwendung nicht notwendig ist. In einigen Fällen können aus kleineren Kristallen größere poröse Aggregate hergestellt werden, um so die Sedimentationseigenschaften zu erhöhen, ohne die Substrat/Produkt-Diffusionscharakteristik zu beeinflussen.

2.1. Kristallisation als Mittel zur Reinigung

Kristallinität ist immer mit Reinheit assoziiert worden. Tatsächlich hatten die ersten Arbeiten über Proteinkristallisation die Reinigung von reinen homogenen Proteinen aus komplexen Extrakten zum Ziel. Dass aus verhältnismäßig rohen Gemischen Proteinkristalle gezüchtet werden können, bewiesen die bereits 1840 durchgeführte Kristallisation des Proteins Hämoglobin durch Hunefeld sowie die nachfolgenden Kristallisationen durch Reichert und Brown.^[17] Weitere eindrucksvolle Beispiele wie die Kristallisation von Ferritin aus frischer geschnittener Pferdemilz durch einfaches Zugabe zweiwertiger Ionen,^[18] die direkte Kristallisation von Lysozym aus Eiweiß^[19] und die Kristallisation von Albuminen, Pflanzenproteinen und Enzymen wurden von McPherson beschrieben.^[20] Viele dieser Kristallisationen wurden im Gramm-Maßstab durchgeführt und lieferten hohe Ausbeuten an Protein.

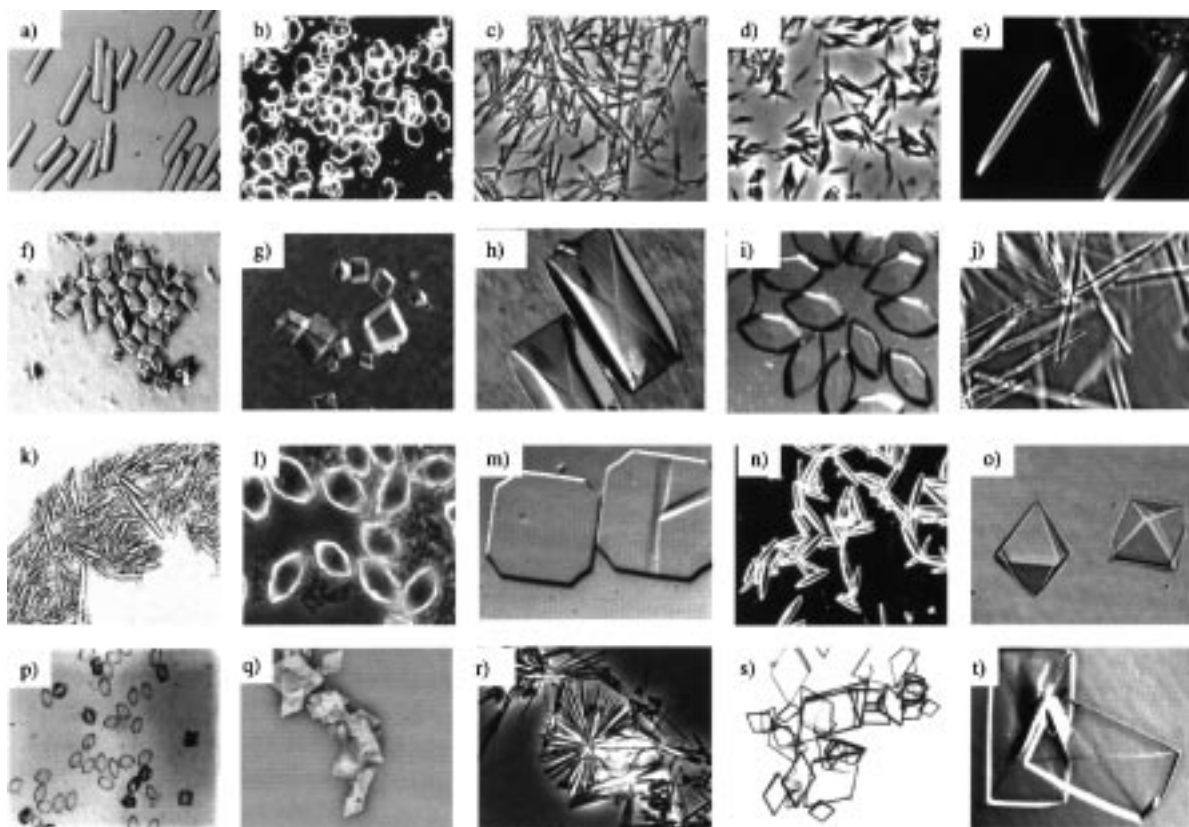


Abbildung 2. Ausgewählte Enzymkristalle. a) und b) Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Vergrößerung: $\times 360$); c) Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* ($\times 720$), d) Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* ($\times 720$); e) Schweineleberesterase ($\times 720$); f) und g) Everlase ($\times 360$ bzw. $\times 180$); h) und i) Savinase ($\times 180$); j) Subtilisin aus *Bacillus licheniformis* ($\times 720$); k) Humanserumalbumin ($\times 720$); l) und m) Lipase aus *Candida antarctica* ($\times 360$ bzw. $\times 180$); n) Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* ($\times 180$); o) Urease aus Jackbohnen ($\times 360$); p) H254R-Organophosphor-Hydrolase ($\times 360$); q) Organophosphorsäure-Anhydrolase aus *Alteromonas* sp. ($\times 360$); r) Rituximab ($\times 720$); s) Lipase aus *Candida rugosa* ($\times 360$); t) Penicillin-Acylase aus *E. coli* ($\times 180$).

Das Aufkommen und die Anwendung der Röntgenkristallographie brachte für das Gebiet der Proteinkristallisation einschneidende Veränderungen. Dabei verschob sich das Interesse von der Entwicklung verlässlicher Reinigungsmethoden zur Herstellung von Einkristallen mit Beugungsqualität. Heute ist die Reinigung von Proteinen und anderen Makromolekülen durch Kristallisation relativ selten.^[21] In einer Zeit, die von der Chromatographie als dem Hauptverfahren zur Reinigung von Proteinen und anderen Makromolekülen beherrscht wird, erscheinen die vor mehr als hundert Jahren bahnbrechenden Kristallisationsmethoden altmodisch und hoffnungslos überholt.

Die Kristallisation als Reinigungsmethode litt zudem zunehmend unter der Aura, die das Wachstum von Makromolekülkristallen mit Beugungsqualität für die Röntgenstrukturanalyse umgibt. In dieser Hinsicht muss man genau unterscheiden zwischen Kristallen, die für Beugungsuntersuchungen benötigt werden, und solchen, die anderweitig für die Proteinreinigung oder die Weiterentwicklung zu quervernetzten Proteinkristallen ideal wären. Erstere müssen ziemlich groß sein, damit die von ihnen gestreuten Röntgenstrahlen mit unseren Geräten nachzuweisen sind. Außerdem müssen Kristalle mit Beugungsqualität entsprechend geordnet und frei von inneren Fehlern (z. B. Zwillingsbildung) sein, sodass das Auflösungs-niveau Strukturdarstellungen liefert,

die biologisch relevant sind. Die für Reinigungszwecke hergestellten Kristalle müssen nur so groß sein, dass sie von Gelöstem abgetrennt und isoliert werden können, wobei das Ziel ist, das Verfahren ergiebig, schnell und letztlich ökonomisch zu machen.

Diesen Anforderungen entsprechen mehrere großtechnische Kristallisationen industriell verwendeter Enzyme.^[22] Judge et al. haben Ovalbumin als Modellprotein aus einem Gemisch mit 2 Gew.-% Ovalbumin, 0.167 Gew.-% Conalbumin und 0.167 Gew.-% Lysozym in $> 99\%$ Reinheit kristallisiert.^[23]

Hohe Ausbeuten und Reinheit wurden bei einer Kristallisation im großen Maßstab von Thermolysin^[24] und *Candida rugosa*-Lipase (CRL) erzielt.^[25] Das zweite Beispiel ist besonders aufschlussreich: Zuerst wurde reines CRL durch Ionenaustauschchromatographie erhalten und danach eine Kristallisationsmethode entwickelt. Mit diesem Verfahren konnte reines CRL aus einem kommerziell erhältlichen Gemisch mit 5–6 Gew.-% CRL und mindestens drei weiteren Enzymen (weniger als 2 Gew.-%) erhalten werden.

Diese und andere Beispiele belegen, dass die großtechnische Proteinkristallisation eine wirkungsvolle Alternative zu klassischen Reinigungsmethoden ist, da sie Reinigungsverfahren rationalisieren und hochkonzentrierte Aufschlammungen des reinen Proteins liefern kann, die für weitere Formulierungen zur Verfügung stehen.

2.2. Quervernetzung

Während bei der Kristallisation von Proteinen eine exakte räumliche Molekülanordnung entsteht, führt eine direkt anschließende Vernetzung innerhalb des Kristalls zum „Einschluss“ der Proteine im kristallinen Zustand – außerhalb der zur Kristallisation führenden Bedingungen. Aus historischer Sicht ist Glutaraldehyd bei weitem das gebräuchlichste Vernetzungsmittel für Enzymkristalle.^[26] Glutaraldehyd ist ungefährlich, billig und einfach in der Handhabung. Der Wirkungsmechanismus der Vernetzung ist allerdings noch nicht genau bekannt.^[27] Die Quervernetzung ist offensichtlich auch in Gegenwart exogener Amine irreversibel und lässt sich nicht mit der einfachen Bildung von Schiff-Basen erklären. Da Glutaraldehyd ein Gemisch aus Oligomeren unterschiedlicher Länge und Struktur bilden kann,^[28] ist die Umsetzung mit diesem Vernetzungsmittel nicht genau voraus-sagbar. Die Vernetzungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Konzentrationen und Reaktionsdauer) müssen sorgfältig optimiert werden (übermäßiges Vernetzen kann zu Proteinniederschlägen und Aktivitätsverlust führen), um eine hohe Stabilität und Aktivität von CLEC-Katalysatoren zu gewährleisten. Trotz dieser Nachteile behielten die mit Glutaraldehyd vernetzten Enzymkristalle fast die gleiche Aktivität gegenüber kleineren Molekülen und waren wesentlich stabiler als die entsprechenden löslichen Enzyme.

Außer Glutaraldehyd verwendeten wir für die Quervernetzung von Enzymkristallen mehrere homo- und heterobifunktionelle Reagentien mit Spacern, deren Längen 3–30 Å betragen (Abbildung 3). Besonders interessant sind die spaltbaren Reagentien: Wenn die Aktivität vollständig vernetzter Kristalle gegenüber makromolekularen Substraten niedrig bleibt (siehe Abschnitt 3.1), kann man CLPCs entwickeln, die unter bestimmten Bedingungen intakt und stabil bleiben, sich bei geänderter Umgebung aber mit der Zeit auflösen und aktiv werden. Dies lässt sich durch Ändern des Vernetzungsgrads oder durch den Einsatz spaltbarer Vernetzungsreagentien erreichen.

Ein interessantes Beispiel für die Verwendung spaltbarer Vernetzungsreagentien gibt Abbildung 4.^[29] In Kristallen der *Candida rugosa*-Lipase (CRL) wurden zuerst mit dem Traut-Reagens (Abbildung 3) zusätzliche SH-Gruppen eingeführt. Anschließend wurden die SH-Gruppen mit dem spaltbaren homobifunktionellen Reagens DPDPB (Abbildung 3) quervernetzt. Die vollständig vernetzten CRL-Kristalle zeigen im

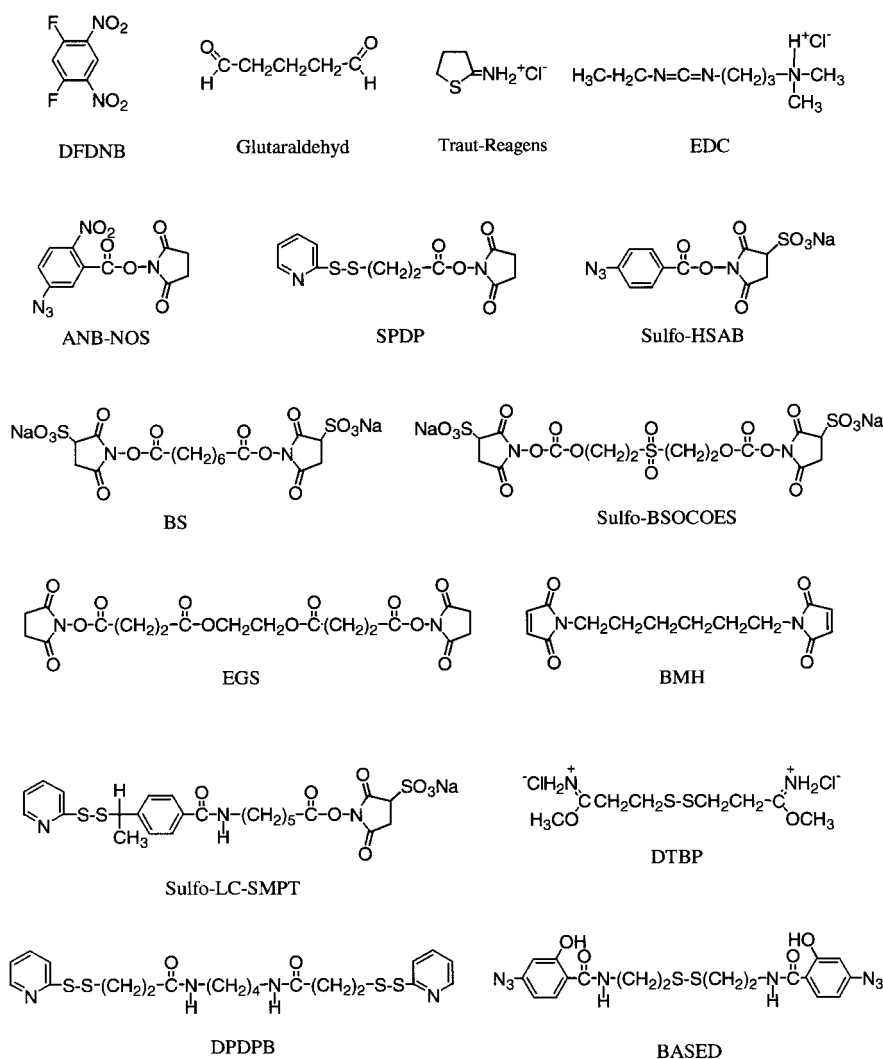


Abbildung 3. Typische Reagentien zur Quervernetzung von Proteinkristallen. DFDNB = 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid; ANB-NOS = N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid; SPDP = N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat; Sulfo-HSAB = N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoat; BS = Bis(sulfosuccinimidyl)suberat; Sulfo-BSOCOES = Bis[2-(sulfosuccinimidyl)oxycarbonyloxy]ethylsulfon; EGS = Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat); BMH = Bismaleimidohexan; Sulfo-LC-SMPT = Sulfosuccinimidyl-6-[α-methyl-α-(2-pyridyldithio)-toluamido]hexanoat; DTBP = Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat · 2 HCl; DPDPB = 1,4-Di-[3'-(2'-pyridyldithio)-propionamido]butan; BASED = Bis-[β-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfid.

Olivöl-Assay eine viel niedrigere spezifische Aktivität (2.3 U mg^{-1}) als das native lösliche Enzym (732 U mg^{-1}). Nach einstündiger Inkubation der CRL-CLECs mit Cystein hatten sich die Kristalle jedoch vollständig gelöst und wiesen 85 % ihrer Anfangsaktivität auf. Das Prinzip der kontrollierten Auflösung von CLPCs wurde erfolgreich zur Herstellung von Subunit-Impfstoffen, Reinigungsenzymen und Kosmetika eingesetzt (siehe Abschnitt 4.4.2).

3. Eigenschaften von Proteinkristallen

Chemisch vernetzte Proteinkristalle sind gegenüber Denaturierung durch Hitze, organische Lösungsmittel und Proteolyse deutlich stabiler als die entsprechenden löslichen Proteine (Tabelle 1).^[10a, 30] Die Ursache dieser Proteinstabili-

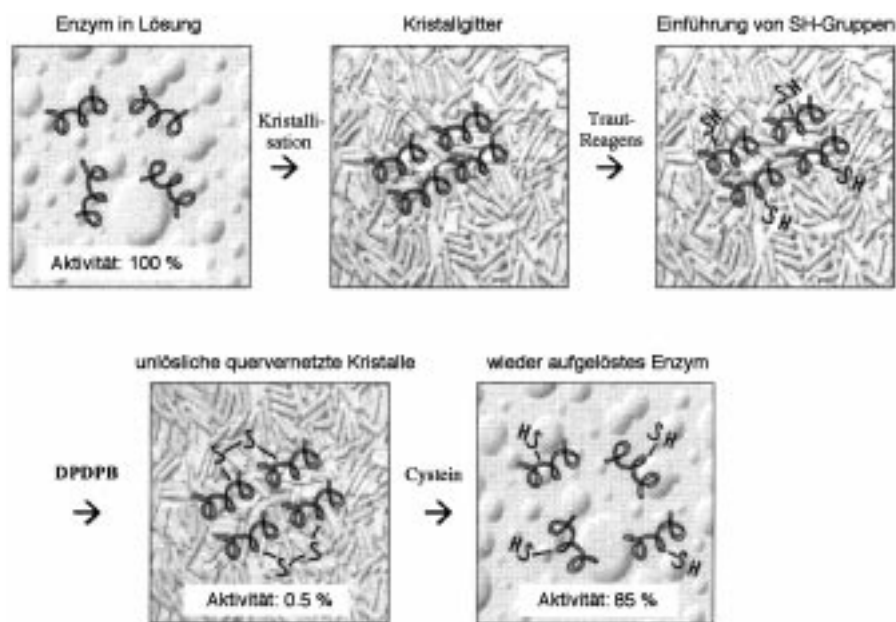


Abbildung 4. Kontrollierte Auflösung eines mit einem spaltbaren Reagens quervernetzten CLPC.

sierung ist allerdings unklar: Sie könnte auf die Kristallinität des Materials, die chemische Modifizierung der Proteine oder eine Kombination aus beidem zurückgehen. Wir haben kürzlich die physikalische Stabilität von Pulverformulierungen der Proteine untersucht und festgestellt, dass kristalline Pulver von CRL und Glucose-Oxidase erheblich stabiler sind als amorphe Proteine.^[31] Bei erhöhter Temperatur können kristalline Proteine ihre native Konformation besser erhalten (siehe Abschnitt 4.4.3) und neigen weniger zur Aggregation. Die Ursache für diese konformative Stabilität liegt in den einzigartigen Eigenschaften des kristallinen Zustands. Proteinkristalle sind hochgeordnete dreidimensionale Molekülanordnungen, in denen die Position jedes Moleküls im Raum genau bestimmt ist.^[32] Typische amorphe Feststoffe haben dagegen keine weit reichende Ordnung und demzufolge ganz andere physikalische Eigenschaften als Verbindungen im kristallinen Zustand. Das größere freie Volumen und die molekulare Unordnung macht amorphe Stoffe dem flüssigen Zustand ähnlicher und führt zu einer niedrigeren Gesamtstabilität gegenüber dem kristallinen Zustand.^[33]

Beim Übergang eines Proteins aus der Lösung in eine kristalline Umgebung wird ein erheblicher Teil seiner Oberfläche für das Lösungsmittel unzugänglich. Diese Verringerung der erreichbaren Oberfläche hängt von der Größe des Proteins ab und variiert etwa zwischen 10 und 60 %.^[34] Die eingeschlossenen Teile der Proteinmoleküle bilden zusätzliche intermolekulare Wechselwirkungen aus. Protein-Protein-Kontakte in Kristallen wurden bei Hunderten von Proteinen und vielen Kristallformen untersucht.^[35] Eine typische gemeinsame Grenzfläche bei einem monomeren Protein hat eine Fläche von 570 Å², umfasst zehn Aminosäurereste von jedem Partner und enthält 30 Van-der-Waals-Kontakte.^[36] Diese Zahlen variieren stark mit der Größe des Proteins und seiner Kristallform, können aber eine unzugängliche

Oberfläche von mehr als 2000 Å² und 100 Aminosäurereste je Kontakt erreichen. Diese bei der Kristallisation neu gebildeten intermolekularen Proteinkontakte, seien es Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Salzbrücken, verringern die Beweglichkeit und unterdrücken die Entfaltung des Proteinmoleküls. Man geht davon aus, dass die natürliche Konformation eines Proteins gegenüber der entfalteten Struktur nur geringfügig, um etwa 40 kJ mol⁻¹, begünstigt ist. Eine einzige zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung (2–26 kJ mol⁻¹) oder mehrere polare Kontakte können somit die Halbwertszeit eines Proteins um einige Größenordnungen erhöhen.^[37]

Bemerkenswerterweise beeinflusst die Größe des Kristalls die Proteinstabilität kaum. Das lässt sich am besten erklären, indem man die relativen Proportionen „innerer“ Elementarzellen in den kleinen Präkristallisationskomplexen, in einem typischen Kristallisationskern, in einem kleinen, zur Formulierung als CLEC geeigneten Kristall und schließlich in einem großen, für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristall betrachtet. Als innere Elementarzelle bezeichnet man dieje-

Tabelle 1. Stabilität quervernetzter Enzymkristalle.

Enzym	Medium	<i>t</i> _{1/2} (löslich)	<i>t</i> _{1/2} (CLEC)	Lit.
Thermolysin	Tris-Puffer, pH 7.0; 65 °C	6 h	kein Aktivitätsverlust nach 5 Tagen	[9]
	50 % THF, DMSO, Aceton; 25 °C	1.5–8 h	kein Aktivitätsverlust nach 5 Tagen	
	Pronase	< 5 min	> 95 % Aktivität nach 4 Tagen	
Alcalase	Acetatpuffer, pH 5.7; 60 °C	11 h	kein Aktivitätsverlust nach 7 Tagen	[110]
	50 % Aceton; 40 °C	4 Tage	kein Aktivitätsverlust nach 7 Tagen	
Subtilisin	Acetatpuffer, pH 5.7; 70 °C	< 1 min	> 1 h	[111]
	Autolyse, pH 8.0; 30 °C	20 h	< 1 % Aktivitätsverlust nach 20 h	[112]
	Acetonitril, 45 °C	8.5 h	31 Tage	
Selenosubtilisin	50 % Aceton; 40 °C	< 1 Tag	kein Aktivitätsverlust nach 10 Tagen	[113]
Carboxypeptidase A	8 M Harnstoff	völlige Inaktivierung	keine Inaktivierung	[114]
<i>Candida rugosa</i> -Lipase	50 % THF, DMF, DMSO	< 1 h	> 150 h	[25]
Penicillin-Acylase	50 % iPrOH/H ₂ O; 25 °C	2 h	20 % Aktivitätsverlust nach 4 Tagen	[115]
Aldolase (Kaninchenmuskel)	Phosphatpuffer; RT	1–5 Tage	kein Aktivitätsverlust nach 6 Monaten	[116]
Lactat-Dehydrogenase	Puffer, 25 °C	2.5 Tage	< 10 % Aktivitätsverlust nach 25 Tagen	[117]
Alkohol-Dehydrogenase	Puffer, pH 6–8; 30 °C	< 15 Tage	kein Aktivitätsverlust nach 90 Tagen	[118]
Glucose-Isomerase	45 % Glucose/Fructose-Lösung, pH 7; 77.5 °C	71 min	407 min	[119]

Tabelle 2. Einfluss der Kristallgröße auf den Anteil an Elementarzellen im Kristallinneren.

Objekt	Größe	Zahl der Elementarzellen		Innerer Anteil
		Gesamt	Äußerer Anteil	
Elementarzelle	1 nm × 1 nm × 1 nm	1	1	0 %
Präkristallisationskomplex	3 nm × 3 nm × 3 nm	27	26	3.7 %
Kristallisationskern	5 nm × 5 nm × 10 nm	125	75	40 %
Kleiner Kristall	1 μm × 1 μm × 2 μm	2 × 10 ⁹	3 × 10 ⁶	99.9999 + %
Großer Kristall	100 μm × 100 μm × 200 μm	2 × 10 ¹⁵	3 × 10 ¹⁰	99.9999 + %

Grundlage der Berechnungen ist die tetragonale Elementarzelle der Serin-Carboxypeptidase II (Raumgruppe $P4_12_12$; Abmessungen der Elementarzelle: $a = b = 98.6 \text{ \AA}$, $c = 210 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$).^[13]

nige, die vollständig von allen beim Aufbau eines makroskopischen Kristalls verwendeten intermolekularen Wechselwirkungen umgeben ist. Den anderen, „äußeren“ Elementarzellen fehlen eine oder mehrere dieser Wechselwirkungen, z. B. bei den Elementarzellen an der Oberfläche eines entstehenden Kristalls. In Tabelle 2 sind die relativen Anteile innerer und äußerer Elementarzellen in den vier Stadien des Kristallwachstums gegenübergestellt.

Elementarzellen im Kristallinneren sind völlig in die im Kristall auftretenden intermolekularen Wechselwirkungen eingebunden und werden durch sie optimal stabilisiert. Von einer geringen Zahl Elementarzellen abgesehen, ist das meiste Proteinmaterial im Kristall „intern“, und die Merkmale dieses Zustands bestimmen dann vermutlich die tatsächlich auftretende Eigenschaft jener Form. Auch für die kleinsten CLECs liegt der Anteil stabilisierter Elementarzellen praktisch bei 100 % ebenso wie für die viel größeren Kristalle, die zur Strukturbestimmung von Makromolekülen durch Röntgenbeugung eingesetzt werden können.

3.1. Enzymaktivität im kristallinen Zustand

Die spezifischen intermolekularen Wechselwirkungen, die für die erhöhte Stabilität von Proteinen im kristallinen Zustand verantwortlich sind, können auch die Beweglichkeit von Proteinmolekülen einschränken und ihre Aktivität drastisch verringern.^[38] Drei Hauptfaktoren – die Kristallgröße, die Größe des Substrats und die Konformation des Enzyms im Kristall – steuern die Enzymaktivität im kristallinen Zustand. In vielen Fällen lässt sich die komplette Aktivität eines Enzymkristalls wegen des begrenzten Stofftransports nicht verwirklichen. Das Problem der eingeschränkten Diffusion im kristallinen Zustand wurde in mehreren Publikationen behandelt.^[39] Die kritische Kristalldicke (d_c),^[40] unterhalb derer Diffusionseinschränkungen nicht signifikant von den kinetischen Parametern (k_{kat} und K_m) des Enzyms, seiner Konzentration $[E]$ und dem Diffusionskoeffizienten des Substrats (D_{eff}) im Kristall abhängen, ist durch Gleichung (1) gegeben.

$$d_c = (D_{\text{eff}} K_m / k_{\text{kat}} [E])^{1/2} \quad (1)$$

Tabelle 4. Aktivität quervernetzter Enzymkristalle gegenüber großen Substraten.

Enzym	Substrat	Teilchengröße [μm]	CLEC-Aktivität [μmol/min mg Protein]	Aktivität ^[a] [%]
Subtilisin	Azocasein	1.2	9.2	35
Thermolysin	oxidierte Insulin-B-Kette	35	0.44	4

[a] Aktivität bezogen auf natives Enzym.

Die kritische Dicke für Kristalle der verhältnismäßig langsam wirkenden Hydrolasen liegt in der Größenordnung von mehreren Mikrometern. Für schnelle Reaktionen hat d_c allerdings schätzungsweise die Dicke der Elementarzelle.^[41] Dabei darf man nicht vergessen, dass zwar auch relativ große Kristalle dick genug sein können, um diffusionsfrei zu sein, im Allgemeinen aber eine gute Korrelation zwischen der Kristallgröße und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht (Tabelle 3).

Tabelle 3. Einfluss der Teilchengröße auf die Enzymaktivität.

Enzym	Teilchengröße [μm]	CLEC-Aktivität [μmol/min mg Protein]	Aktivität ^[a] [%]
Alcalase	40	5	24
	1.2	16	76
Penicillin-Acylase	142	5	21
	57	17	71

[a] Aktivität bezogen auf natives Enzym.

Von praktischer Bedeutung ist die Tatsache, dass es keine Diffusionseinschränkungen gibt, solange die Substratkonzentration höher ist als K_m , was zu Beginn eines enzymkatalysierten Prozesses häufig der Fall ist. Wenn die Substratkonzentration im Verlauf der Reaktion unter K_m sinkt, führen Stofftransporteffekte zu verminderter Aktivität des Kristalls.^[42]

Die Größe eines Substrats kann sich erheblich auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirken. Auch wenn große Moleküle wie Casein (MW 24 000), die Insulin-B-Kette^[24] (MW 3500), Cytochrom c^[43] (MW 12 000) und Polyethylenglycol^[74] (MW bis zu 10 000) grundsätzlich, zumindest teilweise, durch die Poren von Proteinkristallen diffundieren können, sind die Reaktionsgeschwindigkeiten im Allgemeinen niedriger (Tabelle 4).

Die dritte wichtige Größe, die sich auf die Aktivität eines kristallinen Katalysators auswirkt, ist die konformative Beweglichkeit des Enzyms im kristallinen Zustand. In vielen Fällen war die Aktivität kristalliner Enzyme auch dann signifikant niedriger als die gelöster Enzyme, wenn Diffusionseinschränkungen ausgeschlossen waren (Tabelle 5).

Tabelle 5. Aktivitäten quervernetzter Enzymkristalle.

Enzym	Substrat	k_{kat} -Verhältnis (nativ/Kristall)	K_{m} -Verhältnis (nativ/Kristall)	$k_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$ -Verhältnis (nativ/Kristall)	Lit.
Carboxypeptidase A	BzGly-Phe	17	0.11	155	[120]
	BzGly-OPhe	48	0.04	1200	
Carboxypeptidase B	BzGly-Arg	17	0.03	570	[121]
	BzGlyOArg	150	0.17	1470	
Phosphorylase A	Glucose-1-P	179	1.2	149	[122]
Phosphorylase B	Glucose-1-P	57	1	57	[122]
Subtilisin	TosylArg-OMe (TAME)	4.5	2.2	2.1	[111]

Möglicherweise sind in einigen Kristallformen die Wirkstellen der Enzymmoleküle eingeschlossen und daher für das Substrat nicht zugänglich. Diese Schwierigkeiten können im Prinzip behoben werden, indem mehrere Kristallformen desselben Enzyms hergestellt werden.

In dieser Hinsicht sind die Lipasen ein interessantes Beispiel. Man nimmt an, dass Lipasen zwei wichtige Zustände einnehmen können, die durch die Position des Deckels bestimmt werden – eines beweglichen Strukturelements, das die Bindung des Substrats an die aktive Stelle ermöglicht.^[44] Obwohl die Aktivität von Lipasen um das 10^3 – 10^4 -fache steigt, wenn ihre natürlichen Substrate, z.B. Lipide, als Emulsion vorliegen,^[45] scheint eine Grenzflächenaktivierung bei der Hydrolyse von wasserlöslicheren oder kleinen synthetischen Substraten nicht notwendig zu sein.^[12] Wir synthetisierten CRL-CLECs in der „offenen“^[46] und der „geschlossenen“^[47] Kristallform^[47] und verglichen ihre Aktivität und Enantioselektivität bei der Racematspaltung von Ketoprofen (Abbildung 5). Die Aktivität der offenen Form war fast dreimal so hoch wie die der geschlossenen Form, und auch die Enantioselektivität der offenen Form war höher.

In bestimmten Fällen kann der Enzymkristall sogar aktiver sein als das gleiche Enzym in Lösung. Beispielsweise hatten die mit oberflächenaktiven Substanzen behandelten CLECs von Lipasen und Subtilisin in organischen Lösungsmitteln höhere spezifische Aktivität als die nativen Enzyme.^[48] Noch eindrucksvoller sind Ergebnisse, die wir vor kurzem erzielten: Mit SulfolC-SMPT (Abbildung 3) quervernetzte CRL-Kristalle waren im Olivenöl-Assay fünf- bis siebenmal aktiver als das reine native Enzym.^[49] Interessanterweise führt die gleiche Modifizierung des löslichen Enzyms nicht zu einer Zunahme der Enzymaktivität. Offenbar ist die chemische Modifizierung von CRL im Kristall eine andere als in Lösung.



Abbildung 5. Räumliche Darstellung des Ca-Verlaufs von *Candida-rugosa*-Lipase (CRL). Die Serin-, Histidin- und Glutaminsäurereste, die die katalytische Triade von CRL bilden, sind mit S209, H449 und E341 bezeichnet. Der helixförmige Deckel ist mit dicken Linien gezeichnet, wobei das geschlossene Konformer weiß und das offene grau ist. (Aus Lit. [13] und [14] und der Brookhaven Protein Data Bank: P. Grochulski und M. Cygler, <http://www.pdb.bnl.gov/>, Dateien „1crl“ (offene Form) und „1trh“ (geschlossene Form), Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [124].)

4. Anwendungen

Proteinkristalle können nach drei Hauptmethoden formuliert werden (Abbildung 6): Zum einen können sie durch multifunktionelle Reagentien vollständig zu CLPCs oder CLECs vernetzt werden, die in verschiedenen Lösungsmitteln völlig unlöslich bleiben und viele Male wieder verwendet werden können. Zum anderen können Proteinkristalle so

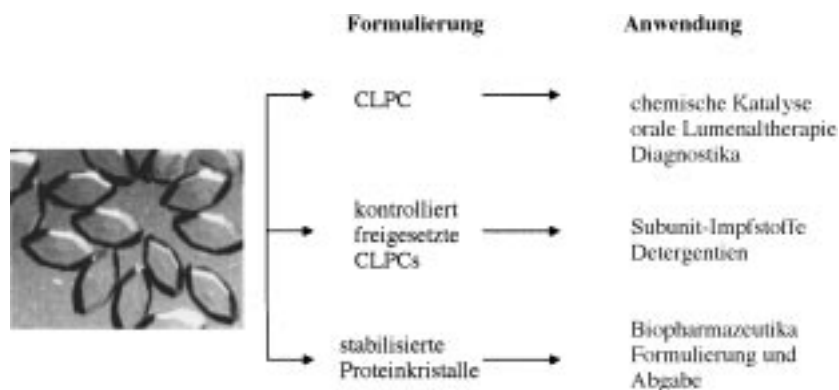


Abbildung 6. Drei Hauptmethoden zur Formulierung von Proteinkristallen und die dazugehörigen wichtigen Anwendungsbereiche.

vernetzt werden, dass sie sich bei Änderungen von Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Konzentration usw. auflösen. Schließlich können Proteinkristalle in ein anderes Lösungsmittel überführt werden, in dem sie ohne chemische Veränderung unlöslich bleiben, oder einfach getrocknet werden. Diese Formulierungsflexibilität ermöglicht mehrere interessante Anwendungen. Wir betrachten zunächst die Anwendungen quervernetzter Enzymkristalle (CLECs).

4.1. Synthesechemie

Unter den häufig genannten Erklärungen für die geringe Akzeptanz von Enzymen durch die chemische Industrie wie hohe Kosten, begrenzte Substratspezifität oder niedrige Enantioselektivität für nicht natürliche, synthetische Substrate ist der Hauptgrund zweifellos die mangelnde Enzymstabilität bei erhöhten Temperaturen und drastischen Verfahrensbedingungen. Bekannte Strategien zur Stabilisierung von Enzymen sind das Protein-Engineering, die Verwendung von Enzymen aus extremen Umgebungen (Extremozyme),^[50] die Immobilisierung,^[51] die chemische Modifizierung^[52] und die Verwendung von CLECs.^[30]

Ein Vorteil der CLEC-Katalysatoren besteht darin, dass sich in vielen Fällen die Enzymstabilität ohne Verluste der spezifischen Aktivität steigern lässt. Zudem können CLEC-Katalysatoren gleichzeitig eine signifikant höhere Stabilität und Produktivität in wässrigen wie in organischen Lösungsmitteln aufweisen. CLEC-Partikel bleiben im Verlauf des Verfahrens unlöslich und können viele Male verwendet werden, sodass die Produktivität der Katalysatoren zunimmt. Außerdem sind CLEC-Katalysatoren in manchen Fällen deutlich enantioselektiver als das Rohenzymgemisch, wie anhand der Racematspaltung von Profen-Wirkstoffen nachgewiesen wurde.^[25]

4.1.1. Racematspaltung mit Hydrolasen

Abbildung 7 zeigt mehrere Substrate für CLEC-katalysierte enantioselektive Umwandlungen. Die Protease Subtilisin findet in der organischen Synthese bei enantio- und regio-spezifischen Reaktionen, Knüpfung von Amidbindungen und Hydrolysen in wässrigen und organischen Lösungsmitteln breite Anwendung.^[53] Dabei schränken allerdings zwei Hauptprobleme den Nutzen dieses Katalysators ein: 1) die geringe Stabilität in Wasser (hauptsächlich aufgrund von Autolyse) und mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln^[54] und 2) die niedrige Aktivität in reinen organischen Lösungsmitteln. Die Autolyse verringert nicht nur die Lebensdauer des Katalysators, sondern macht auch die Trennung und Reinigung der Reaktionsprodukte zeitraubend und teuer. Besonders gravierend ist dieses Problem bei der Synthese von Peptiden und Pharmazeutika, da hier sehr hohe Anforderungen an die Produktreinheit gestellt werden. Dagegen macht die niedrige Aktivität von Subtilisin in organi-

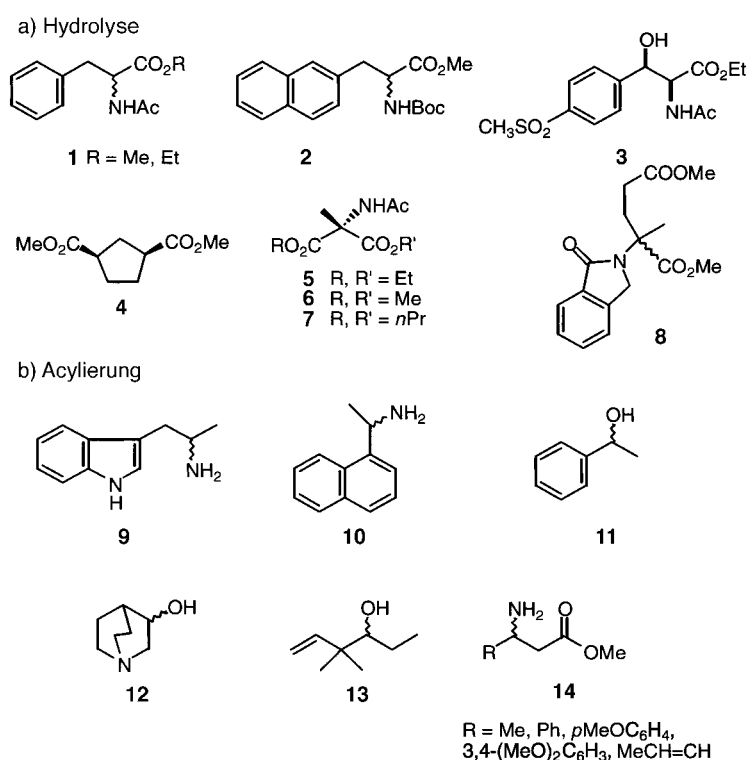


Abbildung 7. Substrate für CLEC-katalysierte enantioselektive Hydrolysen (a) und Acylierungen (b) (Ac = Acetyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl).

schon Lösungsmitteln manche Verfahren zu langsam und damit unwirtschaftlich.^[55] Mit Subtilisin-CLEC verliefen die Racematspaltungen von Aminosäureestern und vielen organischen Verbindungen hoehenantioselektiv. Sowohl natürliche als auch nicht natürliche Aminosäuren wurden mit diesem Katalysator effizient gespalten.^[110] *N*-Acetylphenylalaninmethylester **1** lieferte durch Hydrolyse die *L*-Säure und den nicht umgesetzten *D*-Ester mit einem Enantiomerenüberschuss von 96 % bzw. >99 %. Auch die nicht natürlichen Aminosäuren *N*-Boc-3-(2-naphthyl)alaninmethylester **2** und *threo*-*N*-Acetyl- β -hydroxy-*p*-methylsulfonylphenylalaninethylester **3** wurden durch diesen Katalysator mit hoher Enantioselektivität gespalten. Die enantioselektive Hydrolyse des *meso*-Diesters **4** lieferte den Monoester mit 96 % *ee*, während der prochirale Diethylester **5** enantioselektiv zur entsprechenden Monosäure hydrolysiert wurde (97 % Ausbeute, 81 % *ee*). Da die Größe der dem stereogenen Zentrum benachbarten Gruppe die Enantioselektivität der enzymatischen Racematspaltung meistens beeinflusst, wurden auch der Methylester **6** und der Propylester **7** aus **5** hergestellt und mit dem Katalysator hydrolysiert. Dabei wurden für die Bildung der entsprechenden Monosäuren aus **6** und **7** ähnliche Enantioselektivitäten wie für die Hydrolyse von **5** erhalten. Ein weiteres interessantes Beispiel für die enantioselektive Hydrolyse mit Subtilisin-CLEC ist die Herstellung des Thalidomid-Analogons **8**. Beide Enantiomere wurden mit 95 % *ee* isoliert.^[56]

Da Subtilisin-CLEC in reinen organischen Lösungsmitteln wirksam und stabil ist, wurde der Katalysator in diesen Lösungsmitteln zur Racematspaltung von Alkoholen und Aminen eingesetzt.^[110] Aus α -(1-Naphthyl)ethan-1-amin **10** wurden das entsprechende Butyramid und das nicht umgesetzte

Amin mit 98 % bzw. >98 % *ee* erhalten.^[18b] Die Racematspaltung von α -Methyltryptamin **9** mit diesem Katalysator lieferte das (*R*)-Amin mit >98 % *ee* bei einer Umsetzung von 53 %; der *ee*-Wert des Amidprodukts betrug 94 % bei einem Umsatz von 20 %. Nach der Umesterung von 1-Phenylethanol **11** mit diesem Katalysator lagen das Esterprodukt (Umsetzung 30 %) und der Alkohol mit einem *ee*-Wert von 92 % bzw. 40 % vor. Der gleiche Katalysator wurde auch erfolgreich zur enantioselektiven Acylierung von racemischem 3-Chinuclidinol **12** mit Vinylbutyrat in 2-Methyl-3-butanol eingesetzt. Das (*R*)-Enantiomer wurde nach der Kristallisation in 68 % Ausbeute und mit 96.2 % *ee* isoliert.

Die Naturstoffe Epothilon A und B haben zwar eine ganz andere Struktur als Taxol, aber eine sehr ähnliche Antitumor-Wirkung. Von besonderer Bedeutung ist ihre wesentlich höhere Aktivität gegenüber Zell-Linien, die gegen viele Pharmazeutika resistent sind.^[57] Taylor et al. haben eine eindrucksvolle Totalsynthese von Epothilon A beschrieben.^[58] Dabei verwendeten die Autoren quervernetzte Kristalle der Lipase aus *Pseudomonas* (jetzt *Burkholderia*) *cepacia* (ChiroCLEC-PC), um eine Racematspaltung der Schlüsselverbindung **13** durch selektive Acylierung mit Vinylacetat in *tert*-Butylmethylether durchzuführen. Bei einer Umsetzung von 47 % und einer Enantioselektivität >20:1 konnte der gewünschte (*R*)-Alkohol effizient in Gramm-Mengen erhalten werden. Da der nicht umgesetzte (*S*)-Alkohol durch einfache Oxidation/Reduktion leicht epimerisiert und der Katalysator ohne signifikanten Aktivitätsverlust wieder verwendet werden kann, eignet sich die Methode hervorragend für einen größeren Maßstab.

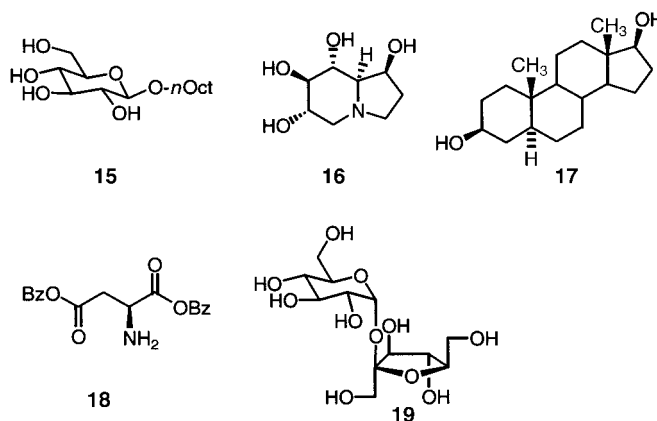
Neben anderen Katalysatoren wurde für die Racematspaltung der β -Aminosäureester **14**, die zur Herstellung von Peptidmimetika dienen, auch ein Penicillinacylase-CLEC eingesetzt. Die gewünschten (*S*)-Enantiomere wurden in wasserhaltigem (2 %) Toluol mit >95 % *ee* erhalten.^[59]

4.1.2. Regioselektive Reaktionen

Subtilisin-CLECs zeigen gegenüber vielen Verbindungen, die mehrere funktionelle Gruppen aufweisen, ausgezeichnete Regioselektivität.^[110] So reagierte die 6-Hydroxygruppe von *O*-*n*-Octyl- β -D-glucopyranosid **15** selektiv mit *N*-Cbz-Phe-OBzl zum Peptidozucker. Die Reaktion von Castanospermin **16** und 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol **17** zu den entsprechenden Monoestern fand selektiv an der 3-Hydroxygruppe bzw. der 17-Hydroxygruppe statt. Der α -Ester von Asparaginsäuredibenzylester **18** (Bz = Benzyl) wurde hingegen in 97 % Ausbeute selektiv zur Monocarbonsäure hydrolysiert. Linhardt et al. synthetisierten mit dem gleichen Katalysator eine Reihe von 1'-*O*-Acylsucroederivaten **19**;^[60] sie erhielten 1'-*O*-Laurylsucrose, 1'-*O*-Myristylsucrose und 1'-*O*-Stearyl sucrose in 80–90 % Ausbeute. Dieses Verfahren ist eine umweltfreundliche Alternative zu den zuvor verwendeten zinnorganischen Reagentien.^[61]

4.1.3. Synthese von Peptiden und Peptidmimetika

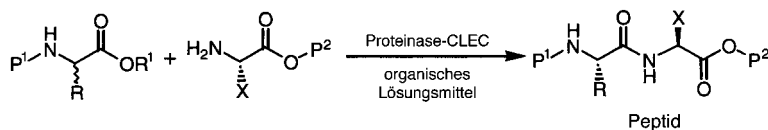
Bei der Synthese von Peptiden und der milden Hydrolyse von Aminosäure- und Peptidamiden wur-



den mehrere Protease-CLECs erfolgreich eingesetzt.^[62, 110] Mit Subtilisin-CLEC als Katalysator gelingt die effiziente Synthese von Peptiden in >90 % Ausbeute aus L- und D-Aminosäureamid-Nucleophilen. Mehrere Peptide wurden in 90-proz. EtOH mit Thermolysin-CLEC synthetisiert, das auch in einem Kreisprozess zur Herstellung von Aspartam in Ethylacetat eingesetzt wurde.^[24]

Eine der interessantesten Anwendungen von Protease-CLECs ist die Synthese von chiralen Alkylamiden. Chirale Alkylamide von Peptiden und Aminosäuren sind wichtige Synthesebausteine mehrerer viel versprechender im Handel befindlicher Pharmazeutika wie HIV-Protease-Inhibitoren, Enkephaline und Antibiotika. In chemischen Verfahren sind der Verknüpfungsschritt und die Racematspaltung im Allgemeinen getrennte Prozesse: Zuerst werden optisch reine Verbindungen hergestellt, und anschließend erfolgt die Verknüpfung. Obwohl die Peptidchemie in Lösung und an der Festphase in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte gemacht hat,^[63] wird die großtechnische Herstellung von Peptiden häufig beeinträchtigt durch partielle Racemisierung, mäßige Ausbeuten und die schwierige Entfernung von Nebenprodukten, die während der Verknüpfungen gebildet werden. Besonders problematisch ist dabei Dicyclohexylharnstoff, der aus dem allgemein verwendeten Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) entsteht.^[64, 65]

Wie wir feststellten, war die Verwendung optisch reiner Substrate nicht notwendig. Die hohe Enantioselektivität des Katalysators für L-Aminosäuren und S-Amine führte unabhängig von der optischen Reinheit der Substrate zur Bildung des (*S,S*)-Alkylamids (Schema 1). Durch eine Racematspaltung *in situ* entstanden auch dann optisch reine Alkylamide, wenn (*R,S*)-Amine oder sogar (*R,S*)-Amine zusammen mit (*R,S*)-Aminosäuren eingesetzt wurden. Im zweiten Fall betrug der Diastereomerenüberschuss des Produkts mehr als 98 % (Tabelle 6).^[62, 110] Die Methode wurde auch auf die Synthese von Einzelisomeren der Matrixmetalloprotease-Inhibitoren (MMPI) D1927 und D2163 mit Thermolysin-



Schema 1. Proteinase-CLEC-katalysierte Synthese von Peptiden und Peptidmimetika.

Tabelle 6. Synthese von Peptidmimetika.

Carboxylat	Amin	Produkt	Lösungsmittel	Ausb. [%]	de [%]
(S)-Z-PheOBz	(R,S)-Me-Tryptamin	(S,S)-Z-Phe-Me-Tryptamin	MeCN	> 98	> 98
(R,S)-Z-PheOBz	(R,S)-Me-Tryptamin	(S,S)-Z-Phe-Me-Tryptamin	MeCN	95	> 98
(S)-NACLeuOMe	(R,S)-NapEt	(S,S)-NACLeuNapEt	3MP	66	91
(S,S)-Z-AlaSerOMe	(R,S)-NapEt	(S,S,S)-Z-AlaSerNapEt	MeCN	98	> 98

NapEt = α -(1-Naphthyl)ethylamin, 3MP = 3-Methylpyridin.

CLEC angewandt. Dabei wurde das asymmetrische Schlüsselement durch PeptiCLEC-TR-vermittelte Amidbildung zwischen einer freien Carbonsäure ($R^1 = H$ in Schema 1) und einem Amin eingeführt.^[66]

4.1.4. Dehydrogenasen

Ein Hauptvorteil der enzymkatalysierten Reduktion der Carbonylgruppe von Ketonen und Aldehyden gegenüber der Verwendung von Hydrolasen bei der Synthese chiraler Verbindungen sind die meistens wesentlich höheren Ausbeuten. Indem man den prochiralen Charakter von Carbonylgruppen nutzt, lässt sich tatsächlich die Bildung racemischer Zwischenstufen umgehen.^[67]

Anders als hydrolytische Enzyme benötigen Dehydrogenasen Cofaktoren wie NAD(P)H, Flavine oder PQQ (Pyrrolochinolinchinon), die in situ regeneriert werden müssen. Nicotinamid-Cofaktoren sind im Unterschied zu anderen Cofaktoren nicht fest an Dehydrogenasen gebunden und können leicht in die Lösung dissoziieren. Wird NAD(H) jedoch zusammen mit einer Dehydrogenase kristallisiert, bleibt der Cofaktor fest an das Enzym gebunden und kann innerhalb des Komplexes durch ein gekoppeltes Substratsystem wieder verwendet werden. Diese Idee wurde erstmals von Lee et al. vorgestellt,^[68] die bei Kristallen der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (horse liver alcoholdehydrogenase, HLADH) eine gute Aktivität (26 % gegenüber der in Lösung) und erhöhte Stabilität der vernetzten Kristalle in Gegenwart von Zinksalzen nachwiesen. Unter Verwendung dieses Systems erhielten wir für HLADH-NAD(H)-CLEC ohne Zugabe von exogenem NADH hohe Aktivität (64 % bezogen auf gelöstes Enzym).^[118] Mit diesem Komplex wurden die Ketone **20–24** (Abbildung 8) reduziert. Die Enantioselektivität und die stereochemische Präferenz von HLADH-NAD(H)-CLEC entsprachen denen des löslichen Enzyms. Aus der Tatsache, dass der HLADH-NAD(H)-CLEC-Komplex erheblich stabiler ist als HLADH oder NADH, schlossen wir, dass die kristalline Umgebung nicht

nur das Enzym, sondern auch den Cofaktor schützt. Weitere Arbeiten werden zeigen, ob der Cofaktor im CLEC mit anderen Dehydrogenasen fest gebunden bleibt, ohne zu dissoziieren.

Eine andere Methode, nämlich die Kristallisation von Lactatdehydrogenase ohne einen Cofaktor, nutzten Sobolov et al., um in einer Elektolysezelle aus Brenztraubensäure L-Milchsäure herzustellen.^[69] Der Katalysator behielt über 25 Tage konstante Aktivität und war gegenüber dem pH-Wert weit weniger empfindlich als das lösliche Enzym.

4.1.5. Andere Enzyme

Abgesehen von Hydrolasen und Dehydrogenasen wurden auch andere Enzyme, darunter Glucose-Isomerase,^[70] Fructosediphosphat-Aldolase^[116] und Hydroxynitril-Lyase^[71] kristallisiert, quervernetzt und als Katalysatoren für chemische Reaktionen eingesetzt. Das Synthesepotential der Aldolase und der Hydroxynitril-Lyase wird durch die Reaktionen einer Reihe von Modellverbindungen belegt.

4.1.6. Produktivität

Ein entscheidender Faktor bei der Bewertung jedes Katalysators ist seine Produktivität – wie viele Kilogramm eines Produkts lassen sich mit einem Kilogramm Katalysator herstellen? Die hohe spezifische Aktivität und Stabilität von CLEC-Katalysatoren unter schwierigen Bedingungen, z. B. in organischen oder wässrig-organischen Lösungsmitteln, bei erhöhter Temperatur und unter hoher Scherbeanspruchung, resultiert in einer Produktivitätszunahme des Katalysators. Ein gutes Beispiel für die hohe Produktivität von CLEC-Katalysatoren in organischen Lösungsmitteln ist die durch CLECs von *Pseudomonas cepacia* lipase katalysierte Racematspaltung von 1-Phenylethanol mit Vinylacetat in Toluol.^[72] Bei dieser Reaktion liefert 1 mg des Katalysators mehr als 4.6 g Produkt (98.5 % ee), was einer Volumenproduktivität von 30 gL⁻¹ und einem Substrat-Katalysator-Verhältnis von 4600 entspricht. Die hohe Produktivität von Synthesekatalysatoren mit niedriger Molekülmasse wird als ihr Hauptvorteil gegenüber Enzymen mit hoher Molekülmasse angesehen.^[73] Dieses Beispiel belegt jedoch klar, dass ein CLEC trotz der hohen Molekülmasse und des für ein Enzym ungewöhnlichen Reaktionsmediums hochproduktiv sein kann und mit den besten Katalysatoren der asymmetrischen Synthese verglichen werden kann.

Bei einer sehr wichtigen Arzneimittelgruppe, den Antibiotika, werden heute 6-APA (6-Aminopenicillinsäure) und 7-ADCA (7-Aminodesacetoxycephalosporansäure) im Tonnenmaßstab mit der quervernetzten Kristallform von Peni-

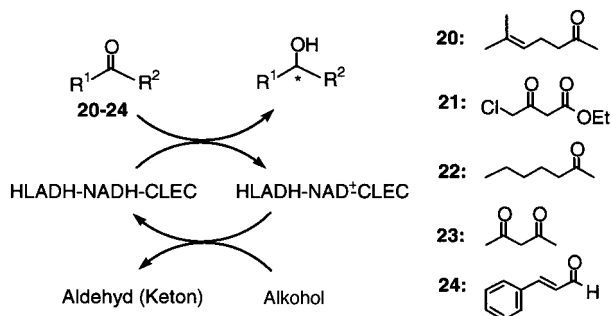


Abbildung 8. HLADH-katalysierte Umsetzungen.

cillin-G-Amidase (SynthaCLEC-PA) produziert. Auch hier belegen erste Versuche einer Mehrzyklen-Hydrolyse von Pen-G klar die Stabilität von Enzymen in der vernetzten Kristallform (Abbildung 9). Weitere Beispiele für die Wiederverwendung von CLECs sind in Tabelle 7 aufgeführt.

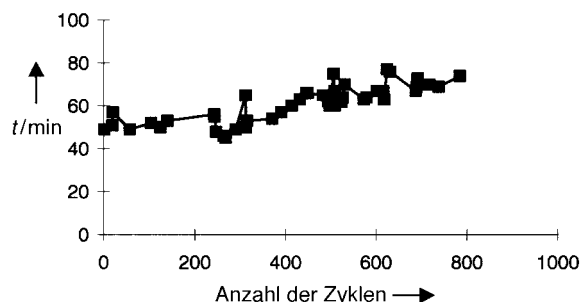


Abbildung 9. Mehrzyklen-Hydrolyse von Penicillin G. Penicillin G (8%) wurde bei pH 8 und 28 °C unter Rühren in einer 150-mL-Filtrierzelle mit 10-µm-Filter hydrolysiert. Nach jedem Zyklus wurde das Reaktionsgemisch entfernt und frisches Substrat in die Zelle gegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NH_4OH konstant gehalten.

4.2. Proteinkristalle als bioorganische Zeolithe

Proteinkristalle und anorganische kristalline Stoffe wie Zeolithe haben mehrere gemeinsame Eigenschaften. Beide sind kristalline mikroporöse Materialien mit einheitlicher Porengrößenverteilung, die durch die Anordnung ihrer Elementarzellen festgelegt ist.

Durch Anwendung der Makromolekül-Porosimetrie konnten wir die scheinbare Porengröße und ihre Verteilung in festen und leicht hydratisierten porösen Sorbentien direkt aus der Größenausschluss-Chromatographie (size exclusion chromatography, SEC) abschätzen. Demnach bieten CLPCs breite Bereiche bei der Porengröße (15–100 Å), der Porosität (0,5–0,8) und der Porenoberfläche (800–2000 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).^[74] Die experimentell erhaltenen Werte zur Porosität von CLPCs stimmen gut mit Schätzungen des Lösungsmittelgehalts überein, die auf den verfügbaren kristallographischen Daten von Thermolysin und Lipasen beruhen. Typische Proteinkristalle enthalten das Lösungsmittel in Kanälen, die 30–65 % des gesamten Kristallvolumens ausmachen.^[75] Auf einem zylindrischen Porenmodell basierende Berechnungen der Porengröße ergaben für alle untersuchten CLPCs eine enge, symmetrische Porengrößenverteilung, wobei die berechnete Abweichung der Porendurchmesser vom Mittelwert weniger als 10 % betrug. Allerdings sollte man bedenken, dass die Kanäle in Proteinkristallen eine ziemlich komplizierte Struktur haben, die mit einem einfachen Zylindermodell kaum

beschrieben werden kann. Tatsächlich lässt die räumliche Darstellung des Kristallgitters von CRL ein die Elementarzelle des Kristalls durchziehendes Netz aus Kanälen mit engen Verbindungshälsen erkennen. Die in Abbildung 10 gezeigten Kanäle durchziehen die kristalline Elementarzelle (und folglich auch die kristallinen makroskopischen Sorbenspartikel) hauptsächlich in Richtung der kristallographischen *a*-Achse mit signifikanten Querkälen parallel zur kristallographischen *b*-Achse. Die Kanäle parallel zur *c*-Achse sind deutlich enger.

In gewissem Sinne sind Proteinkristalle eine gesonderte und einzigartige Gruppe von Molekularsieben mit einer Porengröße zwischen 20 und mehr als 100 Å Durchmesser (Abbildung 11). Die Weite und Linearität der Solvenskanäle (blau in Abbildung 11) hängt großenteils davon ab, wie die Moleküle in einer bestimmten Raumgruppe gepackt sind. Kristalle der menschlichen Superoxid-Dismutase (Abbildung 11F) haben z.B. weite Lösungsmittelkanäle, die den Kristall gerade durchqueren, während die Moleküle der Superoxid-Dismutase aus *Xenopus laevis* Kristalle mit dichter Packung bilden, in denen die Solvenskanäle relativ eng und gewunden sind (Abbildung 11A). Während Zeolithe thermisch wesentlich stabiler sind, lassen sich bei Proteinkristallen Porengröße, Porosität und chemische Eigenschaften der Porenoberfläche besser kontrollieren. Ein besonderer Vorteil von Proteinkristallen gegenüber anderen porösen Materialien ist die Chiralität. Die L-Aminosäuren, aus denen sich Proteine zusammensetzen, sorgen für eine asymmetrische Umgebung, die zur Enantiomerentrennung und in der Katalyse genutzt werden kann. Außerdem lässt sich die Mikroumgebung dieser Kristallkanäle (Ladung und hydrophobe Eigenschaften) mit bewährten Verfahren der Proteinchemie oder durch Kristallisation modifizierter rekombinanter Proteine verändern, die eigens zu diesem Zweck entwickelt wurden.

Außer der Katalyse ist die Chromatographie ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet quervernetzter Proteinkristalle.^[74] Beispielsweise bietet Thermolysin-CLEC (stäbchenförmige Teilchen von 7 µm Länge) ein gutes Trennvermögen über mindestens drei verschiedene Mechanismen: Größenausschluss (Abbildung 12A), Adsorption (Abbildung 12B) und Enantiomerentrennung (Abbildung 12C–D). Wie bereits erwähnt, können CLPCs als neue Art bioorganischer Zeolithe angesehen werden. Die Fähigkeit von CLPCs, Moleküle nach der Größe zu trennen, kann von der porösen Struktur der Kristalle herrühren (Abbildung 11). Dagegen lässt sich die Trennung kleiner Moleküle aufgrund ihrer chemischen Struktur und Chiralität auf die intrinsische Strukturvielfalt und Chiralität des Proteins in der stationären

Tabelle 7. Wiederverwendung quervernetzter Enzymkristalle.

Enzym	Reaktion	Reaktionsmedium	Zyklenzahl	Lit.
Subtilisin	Trennung von α -Methyltryptamin	3-Methyl-3-pentanol	7	[110]
Selenosubtilisin	Reduktion von Hydroperoxiden	Wasser	10	[113]
<i>Candida rugosa</i> -Lipase	Trennung von Ketoprophen	50 % PEG 1000	18	[25]
Alkohol-Dehydrogenase	Reduktion von Zimtaldehyd	Wasser	Säule	[118]
Glucose-Isomerase	Produktion von Stärkezuckersirup mit hohem Fructoseanteil aus Mais	Wasser	Säule	[123]
Hydroxynitril-Lyase	Synthese von Cyanhydrinen	Butylether	5	[71]
Penicillin-Acylase	Hydrolyse von Penicillin G	Wasser	1000	[115]

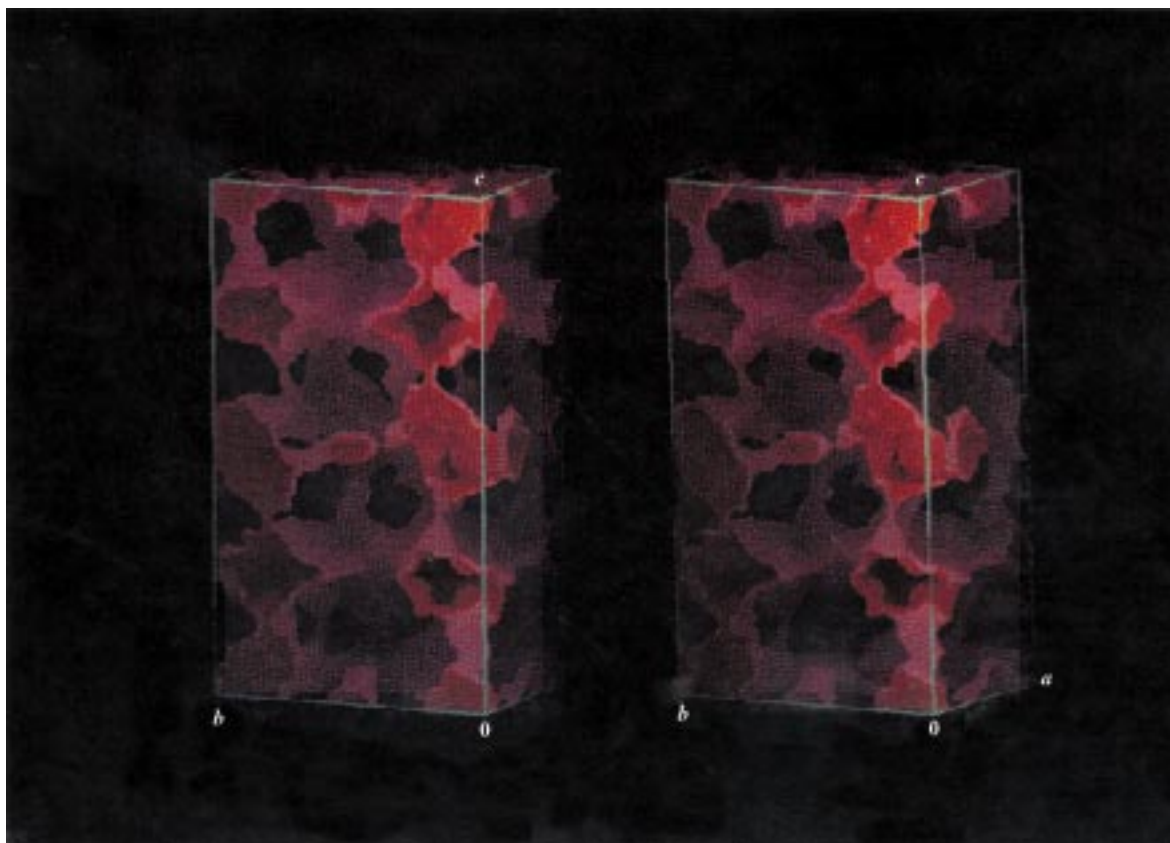


Abbildung 10. Raumansicht einer Elementarzelle des Kristallgitters von *Candida-rugosa*-Lipase (offene Form).^[46] In dieser Darstellung wurden die das Gitter bildenden Enzymmoleküle weggelassen und nur die Oberflächen der Lösungsmittelkanäle konturiert, auf der Lösungsmittelseite orange und auf der Proteinseite violett. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [74].)

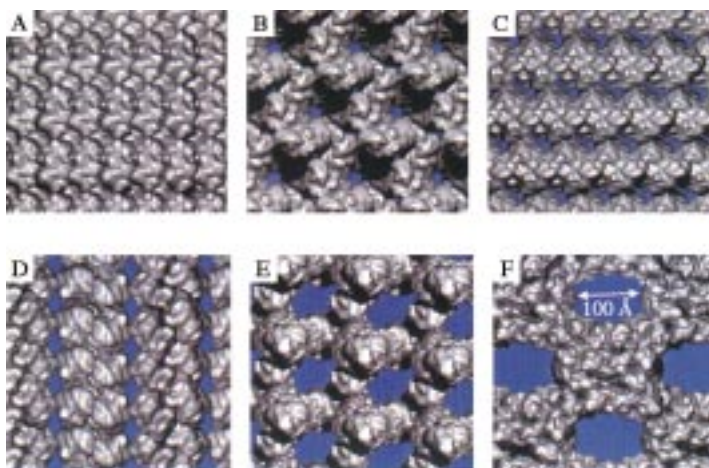


Abbildung 11. Computer-erzeugte Ansichten von sechs Enzymkristallgittern. Die Darstellungen der Oberfläche basieren auf der Elektronendichte, die aus Koordinaten der zugehörigen gelöst, bei der Brookhaven Protein Data Bank hinterlegten Kristallstrukturen berechnet wurde. Um eine Oberfläche zu erhalten, deren eingeschlossenes Volumen annähernd dem des Moleküls entspricht, wurden konturierende Isowerte gewählt. Die zugehörige Koordinatendatei und das Literaturzitat sind mitangegeben: A) 1XSO, Superoxid-Dismutase (*Xenopus laevis*); B) 8TLN,^[104] Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*); C) 1PNL,^[105] Penicillin-Acylase (*Escherichia coli*); D) 1CRL,^[28] Lipase (*Candida rugosa*); E) 1WHS,^[106] Carboxypeptidase W (Weizenkeim); F) 1SOS,^[107] Superoxid-Dismutase (Mensch, rekombinant). Alle Strukturen haben den gleichen Maßstab; der Balken entspricht 100 Å und bildet die absolute Skala der Abbildung. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [74].)

Phase zurückführen. Thermolysin-CLEC und HSA-CLPC erwiesen sich sowohl in Bezug auf die Säulenpackung (Packungsdruck 1500 psi) als auch bei der Chromatographie selbst (mehr als 500 Injektionen ohne Verringerung der Trennleistung) als ziemlich stabil. Auch mehrfache Änderungen des Elutionsmittels von Wasser zu 50 % Acetonitril hatten keinen Einfluss auf die Enantiomerentrennungen, was die hohe Stabilität der stationären Phase zeigt.

Ein anderes interessantes Beispiel ist die Reinigung von Xylit durch quervernetzte Kristalle der Glucose-Isomerase.^[76] Mit der Affinitätschromatographie wurde eine Trennleistung von etwa 1 kg Xylit je 500 kg der Kristalle erreicht.

4.3. Umweltkatalyse

Eine potentiell wichtige Anwendung von CLEC-katalysierten Verfahren ist die Entgiftung von Pestiziden und chemischen Kampfstoffen. Ein wirksamer Biokatalysator hierfür ist die Organophosphor-Hydrolase (OPH),^[77] deren Stabilität und spezifische Wirkung allerdings für diese Anwendungen wahrscheinlich nicht ausreichend ist. OPH ist ein homodimeres zinkhaltiges Metalloenzym mit ungewöhnlich breiter Substratspezifität. Es kann P-O-, P-F-, P-S- und P-CN-Bindungen in zahlreichen Insektiziden und chemischen Nervengiften hydrolysieren und diese so unschädlich machen. Die Enzymaktivität variiert stark, sie ist extrem hoch bei dem

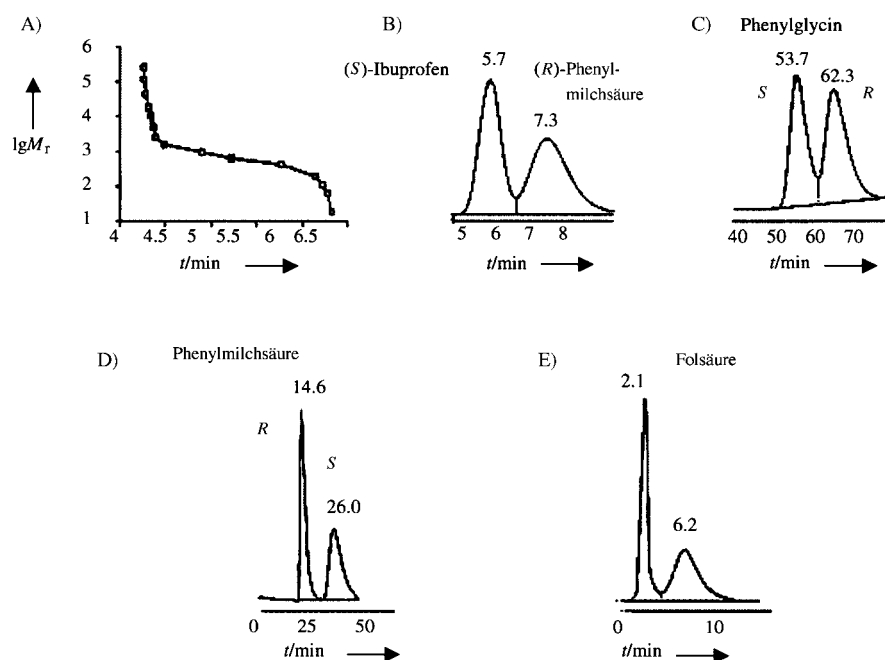


Abbildung 12. CLPC als Trennmittel. Größenausschluss-Chromatographie mit PEG-Proben ($M_w = 64-245000$ Da) (A); chirale Trennungen an gepackten Säulen mit Thermolysin-CLEC (B, C, D) oder HSA-CLPC (E). (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [74].)

Pestizid Paraoxon (P-O-Bindung; $k_{\text{kat.}} > 5000 \text{ s}^{-1}$) und sehr niedrig bei dem chemischen Kampfstoff VX (P-S-Bindung; $k_{\text{kat.}} = 0.3 \text{ s}^{-1}$).^[78] OPH ist bisher das einzige Enzym, dass das Nervengas, VX, entgiftet, wenngleich die Aktivität eher niedrig ist.^[79]

Die praktische Anwendung von OPH bei der Beseitigung von chemischen Kampfstoffen und anderen Gefahrstoffen erfordert Enzyme mit deutlich verbesserter Aktivität und Stabilität in oft schwierigen Reaktionsmedien. Da viele OPH-Substrate in Wasser kaum löslich sind, ist eine hohe Stabilität des Enzyms gegenüber organischen Lösungsmitteln besonders wünschenswert.^[80] Wir konnten zeigen, dass der OPH-CLEC tatsächlich diese Stabilität aufweist und gegen mehrere Modells substrate recht wirksam ist.

Das aktive Zentrum von OPH besteht aus einem zweikernigen Metallzentrum, indem Metalle wie Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} oder Ni^{2+} gebunden sein können.^[81] Die Art des Metalls im aktiven Zentrum des Enzyms beeinflusst seine katalytische Aktivität erheblich.^[82] Es gelang uns, das Metallion am aktiven Zentrum von OPH in der CLEC-Form auszutauschen (Abbildung 13). Dieser einfache Metallaustausch stützt die Vorstellung, dass CLECs im Wesentlichen poröse Stoffe mit Kanälen sind, die den gesamten Kristallkörper durchziehen und den Transport kleiner Moleküle in den und aus dem Kristall erleichtern. Zn^{2+} - und Co^{2+} -OPH-CLECs zeigten signifikante Aktivität gegen das verbreitete Pestizid Demeton-S^[83] und den chemischen Kampfstoff VX.^[84]

4.4. Biomedizinische Anwendung

Die Kombination aus Reinheit, hoher Stabilität und Aktivität, die Enzymkristalle für viele chemische Anwendun-

gen so nützlich macht, bietet auch auf biomedizinischem Gebiet neue Möglichkeiten.^[125] Wir betrachten Anwendungen, die auf konventionellen CLPCs (Abbildung 6 oben), CLPCs, die kontrolliert freigesetzt werden können (Abbildung 6 Mitte), und nicht quervernetzten stabilisierten Proteinkristallen (Abbildung 6 unten) beruhen.

4.4.1. Orale Lumenaltherapie

Metabolische und gastrointestinale Erkrankungen werden oft von einer mangelhaften oder fehlenden Enzym- oder Proteinfunktion an einem kritischen Punkt des Stoffwechsels hervorgerufen. So können einige Erkrankungen des Verdauungssystems bei Patienten mit zystischer Fibrose oder Pankreatitis auf ungewöhnliche Lipase-spiegel im Duodenum (Zwölffingerdarm) zurückgeführt werden. Andere Beispiele sind Erkrankungen durch angeborene Stoffwechselstörungen, z.B.

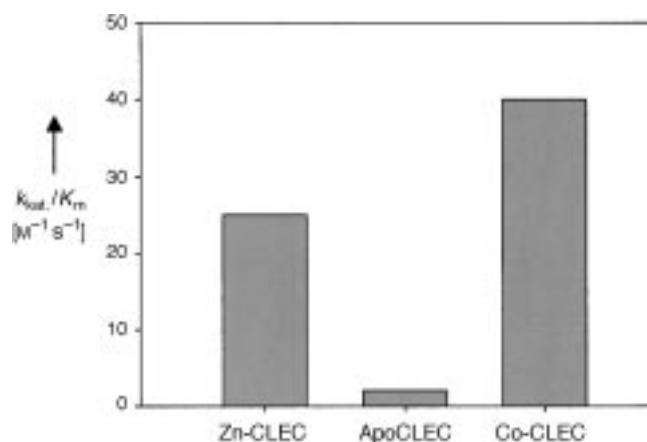


Abbildung 13. Metallaustausch an der Wirkstelle von OPH-CLEC.

die Phenylketonurie (PKU). Diese Störung des Aminosäurestoffwechsels zwingt die Patienten zu einer Diät, die großenteils aus Phenylalanin-freien Proteinhydrolysaten besteht.^[85]

Der menschliche Verdauungstrakt ist wegen der sauren Bedingungen im Magen ($\text{pH} < 2$) und der hohen Protease-Konzentrationen in Magen und Darm eine schwierige Umgebung für Proteine. Beispielsweise erreicht weniger als 1% der in das Duodenum abgesonderten lipolytischen Aktivität das Ileum (Krummdarm).^[86, 87] Es ist daher nicht überraschend, dass Schweinelipase, die in den derzeit im Handel befindlichen Medikamenten enthalten ist, eine durch chronische Pankreatitis oder zystische Fibrose verursachte Pankreas-Steatorrhoe kaum behebt.^[88] Aufgrund ihrer ausgezeichneten Stabilität und Aktivität können Proteine in der CLEC-Formulierung therapeutisch nützliche Reaktionen im Darm-

trakt auslösen, ohne durch den drastischen pH-Wert oder die Wirkung endogener Proteasen abgebaut zu werden. Ein CLEC-Therapeutikum kann daher vom Patienten oral aufgenommen werden und die gewünschte therapeutische Wirkung im Darmtrakt entfalten, während nicht abgebautes CLEC-Medikament mit dem Stuhl ausgeschieden werden kann. Unsere ersten Untersuchungen deuten darauf hin, dass mehrere Lipase-CLECs mindestens hundertmal aktiver und erheblich stabiler als kommerziell erhältliche Lipaseprodukte sind. Zudem haben wir die Wirksamkeit bestimmter Lipase-CLECs in Hunden mit Pankreasinsuffizienz nachgewiesen.^[89]

Grundsätzlich können Lipase-CLECs bei diesen Krankheiten zu attraktiveren Dosiervorschriften führen und die Tablettenmenge erheblich reduzieren und so die Patienten-Compliance sehr verbessern.

4.4.2. Subunit-Impfstoffe

Subunit-Impfstoffe, die aus definierten Verbindungen bestehen, sind wegen ihres überragenden Sicherheitsprofils und ihrer einfachen Produktion durch chemische Synthese oder DNA-Rekombinationstechnik äußerst attraktiv. Der Preis für diese Vorteile ist allerdings beträchtlich: Subunit-Impfstoffe sind im Allgemeinen nur schwach immunogen und können in vielen Fällen nicht mit dem abgeschwächten und inaktivierten Gesamtvirus oder pathogenen Analogon konkurrieren.^[90] Um die Immunantwort zu verstärken, benötigen Subunit-Impfstoffe generell verbesserte Adjuvantien und Träger für die Freisetzung.

Wir wollten CLPCs als Antigene verwenden und verglichen die Immunogenität des CLPC von Humanserumalbumin (HSA) mit der des löslichen Proteins. Bei Ratten induzierten hochvernetzte Kristalle eine 6–10fache und leicht quervernetzte Kristalle eine etwa 30fache Zunahme des Antikörpertiters gegenüber dem löslichen Protein und hielten ihn sechs Monate lang aufrecht.^[91] Wir vermuten, dass der Depoteffekt, die Teilchenstruktur des CLPC und die regelmäßige Struktur von Proteinkristallen zur verstärkten Produktion zirkulierender Antikörper beitragen. Tatsächlich führt die regelmäßige Struktur eines Proteinkristalls zu Vielfachkopien des Antigens, die sich dem Immunsystem als Teil eines relativ großen Partikels präsentieren (Abbildung 14). In dieser Hinsicht

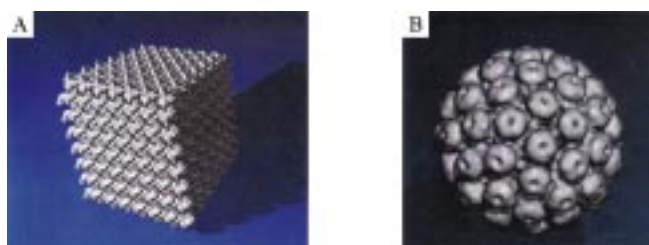


Abbildung 14. A) Computer-erzeugte Darstellung eines dreidimensionalen HSA-Kristalls. Die einzelnen Enzymmoleküle ($M_w = 66000$) sind silberfarben. Der Kristall hat entlang jeder Kante sieben Elementarzellen, seine Abmessungen betragen $41.2 \times 62.2 \times 42.5$ nm, und er enthält insgesamt 686 HSA-Moleküle. Die Oberflächendarstellung beruht auf Elektronendichterechnungen aus den bei der Brookhaven Protein Data Bank hinterlegten Atomkoordinaten der bekannten Struktur.^[108] B) Virion des Polyomavirus (50 nm) mit 360 VP1-Molekülen.^[109] (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [91].)

besteht auffallende Ähnlichkeit zwischen CLPCs und den polyvalenten Teilchenstrukturen des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HbsAg),^[92] der *Helicobacter-pylori*-Urease^[93] und Virus-ähnlichen Partikeln (VLP, virus-like particles).^[94] Eigenschaften wie die bemerkenswerte Stabilität, Reinheit, biologische Abbaubarkeit und leichte Herstellung machen CLPCs für die Formulierung von Impfstoffen äußerst interessant. Diese Arbeit ebnet den Weg für eine systematische Untersuchung über den Einfluss von Kristallinität und Quervernetzung des Proteins auf die Erhöhung der humoralen und zellulären Immunantworten.

4.4.3. Nicht vernetzte Proteinkristalle

Da trockene Proteinkristalle auch ohne Quervernetzung ziemlich stabil sein können, lassen sie sich als ungewöhnliche Formulierung zur Arzneimittelfreisetzung verwenden. Bei kleinen Molekülen ist der Nutzen des kristallinen Zustands bereits gut bekannt, und die meisten Medikamente aus diesen Verbindungen werden in kristalliner Form hergestellt. Das überrascht nicht, denn Kristallinität führt normalerweise zu besserer Lagerstabilität, Reinheit und Reproduzierbarkeit hinsichtlich der physikalischen, chemischen und therapeutischen Eigenschaften eines Medikaments.^[33] Bei makromolekularen Medikamenten liegen die Dinge ganz anders. Unter den fast 400 Biopharmazeutika,^[95] die entweder zugelassen oder im fortgeschrittenen Stadium der klinischen Prüfung sind, gibt es nur ein Produkt, nämlich Insulin, das in kristalliner Form hergestellt und verabreicht wird. Dabei bietet die Kristallisation von makromolekularen Pharmazeutika, besonders von Proteinen, erhebliche Vorteile:

- 1) wie bei Medikamenten aus kleinen Verbindungen lässt sich die Herstellung durch Kristallisation des Proteins rationalisieren
- 2) die Kristallform bietet die höchstmögliche Konzentration eines Proteins und kann bei Therapeutika wie Antikörpern, die am Ort der Freisetzung hoch dosiert sein müssen, vorteilhaft sein
- 3) da die Geschwindigkeit der Kristallauflösung von seiner Morphologie, seiner Größe und eventuell vorhandenen Arzneimittelträgern abhängt, können kristalline Proteine als bequeme trägerfreie Dosierungsform mit langsamer Freisetzung dienen (Insulin ist ein gutes Beispiel)
- 4) die Stabilität von Proteinen in kristalliner Form ist höher als die der entsprechenden löslichen oder amorphen Stoffe

Die Inaktivierung eines Proteins beginnt häufig mit einer reversiblen Entfaltung des Proteinmoleküls gefolgt von einer irreversiblen Inaktivierung, die zur Aggregation^[96] und als Folge daraus zum Verlust der biologischen Aktivität führt.^[97] Um den Aggregationsgrad von Glucose-Oxidase (GO) und CRL zu vergleichen, wurden verschiedene Präparationen dieser Enzyme bei erhöhter Temperatur inkubiert und in wässrigen Pufferlösungen rekonstituiert. Der unlösliche Niederschlag wurde abfiltriert und das lösliche Protein durch Größenausschluss-Chromatographie untersucht. Diese Versuche ergaben, dass lösliche Proteine rasch aggregieren und schwerlösliche Niederschläge bilden. Ein Vergleich der festen Formulierungen lässt darauf schließen, dass kristalline Proteine weniger zur Aggregation neigen als ihre amorphen

Formen. Bei der Inkubation von GO bei 50 °C blieben nach zwei Tagen 73 % des kristallinen Proteins (71 % Aktivität) löslich, die spezifische Aktivität der gelösten Fraktion betrug 118,6 U mg⁻¹. Die amorphe Formulierung lieferte unter den gleichen Bedingungen zwar einen etwas höheren Anteil gelösten Proteins (76 %), aber nur 27 % Aktivität und die niedrige spezifische Aktivität von 57,3 U mg⁻¹. Diese Werte deuten auf eine erhebliche Inaktivierung von amorpher GO bei der Lagerung hin. Anders als die lösliche GO, die nach der Rekonstitution hauptsächlich aus einer nativen dimeren Form besteht (höhere unlösliche Aggregate wurden durch Ultrafiltration abgetrennt), liefern feste Formulierungen ein Gemisch aus nativem Dimer und höheren löslichen Aggregaten. Diese intermolekulare Proteinaggregation ist in der amorphen Form allerdings ausgeprägter (36 % native Form) als in der kristallinen (67 % native Form). Die bei kristallinen Formulierungen geringere Tendenz zur Aggregatbildung wurde durch einen Versuch mit dem wesentlich hydrophoberen Protein CRL bestätigt: 91 % der nativen CRL-Form (Monomer) sind in der kristallinen Formulierung erhalten, aber nur 26 % in der amorphen Probe. Ein Vergleich der Größenausschluss-Chromatogramme der drei rekonstituierten CRL-Formulierungen ist in Abbildung 15 dargestellt.

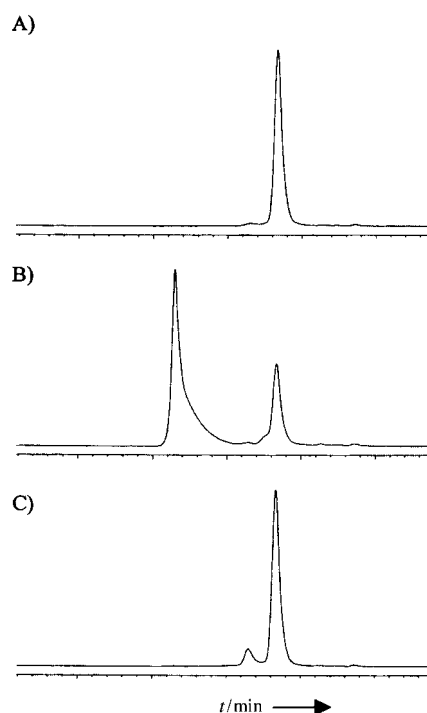


Abbildung 15. Größenausschluss-Chromatographie von rekonstituierten CRL-Formulierungen. A) lösliche, unbehandelte CRL (Kontrolle). B) Amorphe und C) kristalline, mit Sucrose formulierte CRL nach 200 Tagen bei 40 °C und 75 % RH. Die Proben wurden in PBS-Puffer, pH 7,4, gelöst. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [31].)

Eine potentiell bedeutende Anwendung von Proteinkristallen ist die Freisetzung von Proteinwirkstoffen. Die unzureichende Stabilität von Proteinen während der Verkapselung, Lagerung und Abgabe ist eines der Haupthindernisse bei der erfolgreichen Formulierung von polymeren Mikrokügelchen.^[98] Beispielsweise können kristalline Proteine

durch ihre hohe Stabilität und geringere Tendenz zur Aggregatbildung die drastischen Bedingungen der Mikroverkapselung besser überstehen und polymere Mikrokügelchen mit höherer Beladung liefern (Abbildung 16).

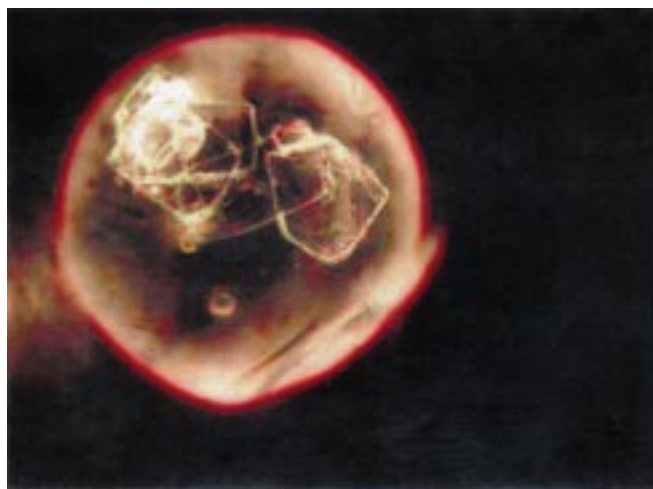


Abbildung 16. In PLGA-Mikroperlen eingelagerte Kristalle von Penicillin-Acylase.

5. Schlussbemerkungen und Ausblick

Wie bei vielen anderen Entwicklungen in Wissenschaft und Technik kann man rückblickend die Wurzeln und Vorläufer der 1992 erstmals skizzierten Methode quervernetzter Enzymkristalle^[9] und der seitdem beschriebenen Erweiterungen und neuen Realisierungen dieses Konzepts ohne weiteres erkennen. Es waren weniger die technischen Gründe, warum Sumner 1926 nicht selbst einige der hier besprochenen Anwendungen im Zusammenhang mit der Jackbohnen-Urease entwickelt hat.

Einer der Gründe für die rasche Entwicklung und Vermarktung von CLECs und CLPCs seit 1992 könnte unsere konsequent beibehaltene Auffassung sein, nach der Proteinkristalle Materialien sind, deren chemische und mechanische Stabilität deutlich erhöht werden muss. Nachdem wir bei unseren quervernetzten kristallinen Materialien eine derartige Stabilität erreicht hatten, konnten wir uns auf die Entwicklung von praktischen Anwendungsmöglichkeiten dieser Materialien konzentrieren.

Der logische erste Schritt in dieser Entwicklung waren die Enzymkatalysatoren, da sie bei wichtigen chemischen Prozessen für unerreichte Selektivität und Spezifität bei minimalen Kosten sorgen können. Seither wurden CLECs für eine Reihe von Anwendungen entwickelt, die wir in diesem Aufsatz beschrieben haben.

Stabilisierte Proteinkristalle können auch als neue Chromatographiematerialien verwendet werden, die nicht nur bei den für HPLC-Trennungen typischen drastischen Bedingungen wiederholt einsetzbar sind, sondern in denen auch die ausgezeichnete Enantioselektivität der zugrunde liegenden Proteinmatrix zum Ausdruck kommt. Auch die rasche, effektive und rentable Formulierung von Proteinwirkstoffen nie dagewesener Reinheit und Haltbarkeit wird durch diese

Technologie erheblich erleichtert, z.B. bei der Herstellung von Impfstoffen, deren immunogene Wirkung nicht von Adjuvantien und anderen komplizierenden Faktoren abhängt. Weitere therapeutische Anwendungen für stabilisierte Proteinkristalle gibt es im Überfluss, sie reichen von Freigabesystemen für Proteinwirkstoffe bis zu ihrer Verwendung in der Enzymersatztherapie.

Berücksichtigt man die derzeit durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms ausgelöste Informationsflut, muss man sich auch auf die Möglichkeiten einrichten, die Aber-tausende neue Proteine bieten, die durch Expression dieser Information durch das Proteom erstmals hergestellt werden können.^[99] Diese Informationsexplosion wird die Entwicklung von Parallelmessmethoden wie der High-Throughput (HT)-Röntgenkristallographie sicherlich beschleunigen.^[100] Die schnelle und billige Kristallisation Zehntausender Proteine könnte schnell zu einem Engpass in der gesamten Genomstrukturinitiative führen.^[101] Aus diesem Grund werden derzeit moderne Automatisierungsmethoden entwickelt, die bei der Steuerung und Optimierung von Kristallisationen eine entscheidende Rolle spielen.^[102] Obwohl diese Anstrengungen hauptsächlich zu neuen Strukturinformationen führen, werden die leistungsfähigen Kristallisationstechniken den hier besprochenen Kristallisations- und Formulierungsmethoden zugute kommen.

Diese im Entstehen begriffene „Kristallom“-Wissenschaft bietet uns ein allgemeines Verfahren, bekannte und neue entdeckte Proteine sowohl bei den in den meisten großtechnischen Verfahren üblichen drastischen Bedingungen als auch in unerreicht leistungsfähigen und nützlichen therapeutischen Anwendungen rasch und effizient einsetzbar zu machen. Sicherlich werden die zukünftigen Entwicklungen mindestens so interessant sein wie die mit dieser Technologie bereits erreichten Fortschritte.

Wir danken unseren vielen Kollegen bei Altus Biologics, die bei der Entwicklung der CLEC-Technologie entscheidend mitwirkten und deren Namen zitiert sind. Darüber hinaus gilt unser Dank Jim Griffith (Althexis), Kirill Yakovlevsky und Yi-Fong Wang für ihre Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts und für nützliche Diskussionen. Ferner danken wir den NIH, der NSF und dem Department of Defense, die unsere Arbeit durch ihre SBIR-Programme großzügig förderten.

Eingegangen am 27. Juni 2000 [A416]
Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [2] H. Kubinyi, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **1998**, *1*, 4–15.
- [3] *Macromolecular Structures* (Hrsg.: W. A. Hendrickson, K. Wuthrich), Current Biology, London, **1999**.
- [4] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1926**, *69*, 435–441.
- [5] A. L. Dounce, P. Z. Allen, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 317–320.
- [6] J. D. Bernal, D. Crowfoot, *Nature* **1934**, *133*, 794–795.
- [7] J. S. Fruton, *Molecules and Life—Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*, Wiley-Interscience, New York, **1972**.
- [8] A. McPherson, *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**, S. 1.

- [9] N. L. St. Clair, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314–7316.
- [10] Übersichten: a) A. L. Margolin, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 223–230; b) T. Zelinski, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 746–748; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 722–724; c) J. J. Lalonde, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **1998**, *1*, 272–277. d) D. Haring, P. Schreir, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 35–38.
- [11] M. Ries-Kautt, A. Ducruix, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 23–59.
- [12] A. J. Malkin, A. McPherson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 385–395.
- [13] D. I. Liao, K. Breddam, R. M. Sweet, T. Bullock, S. J. Remington, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9796–9812.
- [14] S.-T. Yau, P. G. Vekilov, *Nature* **2000**, *406*, 494–497.
- [15] P. C. Weber, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 13–22; *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins* (Hrsg.: A. Ducruix, R. Giegé), Oxford University Press, New York, **1999**.
- [16] T. S. Lee, J. D. Vaghjani, G. J. Lye, M. K. Turner, *Enzyme Microbial Technol.* **2000**, *26*, 582–592.
- [17] „The Differentiation and Specificity of Corresponding Proteins and Other Vital Substances in Relation to Biological Classification and Organic Evolution“: E. T. Reichert, A. P. Brown, *The Crystallography of Hemoglobins*, Carnegie Institution of Washington, Washington, **1909**.
- [18] V. Laufberger, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1937**, *19*, 1575; S. Granick, *J. Biol. Chem.* **1941**, *146*, 451.
- [19] G. Alderton, H. L. Fevold, *J. Biol. Chem.* **1946**, *164*, 1.
- [20] A. McPherson, *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**, S. 6–16 und S. 235–238.
- [21] T. M. Przybycien, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 164–170.
- [22] US Patent 5728559 **1998** [*Chem. Abstr.* **1998**, *120*, 18276]; US Patent 5719048, **1998**.
- [23] R. A. Judge, M. R. Johns, E. T. White, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 316–323.
- [24] R. A. Persichetti, N. L. St. Clair, J. P. Griffith, M. A. Navia, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2732–2737.
- [25] J. L. Lalonde, C. Govardhan, N. Khalaf, A. G. Martinez, K. Visuri, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845–6852.
- [26] M. S. Doscher, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2399–2406.
- [27] D. R. Walt, V. I. Agayn, *Trends Anal. Chem.* **1994**, *13*, 425–430.
- [28] T. Tashima, M. Imai, Y. Kuroda, S. Yagi, T. Nakagawa, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 694–697.
- [29] B. Shenoy, A. L. Margolin, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [30] C. Govardhan, A. L. Margolin, *Chem. Ind.* **1995**, 689–693; H. Noritomi, K. Koyama, S. Kato, K. Nagahama, *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 467–469; C. Govardhan, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 331–335.
- [31] B. Shenoy, Yi Wang, W. Shan, A. L. Margolin, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 358–369.
- [32] A. McPherson, *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Krieger, Malabar, FL, **1989**.
- [33] B. C. Hancock, G. Zografi, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1–12.
- [34] S. A. Islam, D. L. Weaver, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 1–5.
- [35] C. Jelsch, S. Longhi, C. Cambillau, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *31*, 320–333.
- [36] J. Janin, F. Rodier, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1995**, *23*, 580–587.
- [37] R. M. Daniel, *Enzyme Microbial Technol.* **1996**, *19*, 74–79.
- [38] A. Mozzarelli, G. L. Rossi, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 343–365.
- [39] M. S. Doscher, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2399–2406; M. W. Makinen, A. L. Fink, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1977**, *6*, 301–343.
- [40] L. A. A. Sluyterman, M. J. M. de Graaf, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *171*, 277–287.
- [41] E. M. Westbrook, P. B. Sigler, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 9090–9095.
- [42] W. Tischer, V. Kasche, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 326–335, zit. Lit.
- [43] M. Tegoni, A. Mozzarelli, G. L. Rossi, F. Labeyrie, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5424–5427.
- [44] B. Rubin, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 568–572.
- [45] C. Chapus, M. Semeriva, C. Bovier-Lapierre, P. Desnuelle, *Biochemistry* **1976**, *15*, 4980–4987.
- [46] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843–12847.

- [47] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 82–91.
- [48] N. Khalaf, C. Govardhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y. F. Wang, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5494–5495.
- [49] B. Shenoy, A. L. Margolin, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [50] G. Sellek, J. Chaudhuri, *Enzyme Microbial Technol.* **1999**, *24*, 471–482.
- [51] P. Rasor in *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling* (Hrsg.: D. E. De Vos, I. F. J. Vankelecom, P. A. Jacobs), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 97–122.
- [52] V. Mozhaev, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 88–95.
- [53] a) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**; b) P. Sears, M. Schuster, P. Wang, K. Witte, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6521–6530.
- [54] C.-H. Wong, M. Schuster, P. Wang, P. Sears, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5893.
- [55] J. L. Schmitke, C. R. Wescott, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3360–3365; Y.-L. Khmel'nitsky, S. H. Welch, D. S. Clark, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2647–2648.
- [56] J. H. Shah, G. M. Swartz, A. E. Papathanassiou, A. M. Treton, W. E. Fogler, J. W. Madsen, S. J. Green, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3012–3017.
- [57] P. Giannakakou, R. Gussio, E. Nogales, K. H. Downing, D. Zaharevitz, B. Bollbuck, G. Poy, D. Sackett, K. C. Nicolaou, T. Fojo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2904–2909; K. C. Nicolaou, D. Hepworth, N. P. King, M. R. V. Finlay, R. Scarpelli, M. M. A. Pereira, B. Bollbuck, A. Bigot, B. Werschkun, N. Winssinger, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3116–3148.
- [58] R. E. Taylor, G. M. Galvin, K. A. Hilfiker, Y. Chen, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9580–9583.
- [59] D. Roche, K. Prasad, O. Repic, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3665–3668.
- [60] T. Polat, H. G. Bazin, R. J. Linhardt, *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 1319–1325.
- [61] I. R. Vlahov, P. I. Vlahov, R. J. Linhardt, *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 1.
- [62] Y. F. Wang, K. Yakovlevsky, A. L. Margolin, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5317–5320.
- [63] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143; T. Inui, M. Nakao, H. Nishio, Y. Nishiuchi, S. Kojima, T. Muramatsu, T. Kimura, *J. Pept. Res.* **2000**, *55*, 384–397.
- [64] a) M. Bodanszky, J. C. Tolle, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1977**, *10*, 380–384; b) J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 2, Krieger, **1986**, S. 1016–1024, zit. Lit.
- [65] G. Wendlber, *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* 6th ed., Vol. 12/2, **1974**.
- [66] A. D. Baxter, J. B. Bird, R. Bannister, R. Bhogal, D. T. Manallack, R. W. Watson, D. A. Owen, J. Montana, J. Henshilwood, R. C. Jackson in *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy* (Hrsg.: N. J. Clendenin, K. Appelt), Humana Press, Totowa, NJ, **1999**, S. 193–221.
- [67] *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**, S. 595–665.
- [68] K. M. Lee, M. Blaghen, J.-P. Samama, J.-F. Biellmann, *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 202.
- [69] S. B. Sobolov, M. D. Leonida, A. Bartoszko-Malik, K. I. Voivodov, F. McKinney, J. Kim, A. J. Fry, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2125–2128.
- [70] K. Visuri, Eur. Pat. 0341503, **1989**.
- [71] D. Costes, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *11*, 607–612.
- [72] N. Khalaf, C. P. Govardhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y. F. Wang, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5494–5495.
- [73] E. N. Jacobsen, N. S. Finney, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 85–90.
- [74] L. Z. Vilenchik, J. P. Griffith, N. St. Clair, M. A. Navia, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4290–4294.
- [75] B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 491–497.
- [76] a) O. Pastinen, K. Visuri, M. Leisola, *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 557–560; b) O. Pastinen, J. Jokela, T. Eerikainen, T. Schwabe, M. Leisola, *Enzyme Microbial Technol.* **2000**, *26*, 550–558.
- [77] D. P. Dumas, H. D. Durst, W. G. Landis, F. M. Raushel, J. R. Wild, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *277*, 155–159.
- [78] K. Lai, J. K. Grimsley, B. D. Kulhmann, L. Scapozza, S. P. Harvey, J. J. DeFrank, J. E. Kolakowsky, J. R. Wild, *Chimia* **1996**, *50*, 430.
- [79] V. K. Rastogi, J. J. DeFrank, T.-C. Cheng, J. R. Wild, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *241*, 294.
- [80] J. K. Grimsley, J. M. Scholtz, C. N. Pace, J. R. Wild, *Biochemistry* **1997**, *36*, 14366.
- [81] G. A. Omburo, J. M. Kuo, L. S. Mullins, F. M. Raushel, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13278–13283.
- [82] J. M. Kuo, M. Y. Chae, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1982–1988.
- [83] F. C. G. Hoskin, J. E. Walker, R. Stote, *Chem. Biol. Interact.* **1999**, *119–120*, 439–444.
- [84] T.-c. Cheng, V. K. Rastogi, U. J. DeFrank, C. Govardhan, K. Yakovlevsky, A. L. Margolin, J. K. Grimsley, J. R. Wild, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [85] C. Sarkissian, Z. Shao, F. Blain, R. Peevers, H. Su, R. Heft, T. M. S. Chang, C. Scriver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2339–2344.
- [86] P. Layer, V. L. W. Go, E. P. DiMaggio, *Am. J. Physiol.* **1986**, *251*, G475–G480.
- [87] P. Layer, G. Holtmann, *Int. J. Pancreatol.* **1994**, *15*, 1–11.
- [88] E. P. DiMaggio, J.-R. Malagelada, V. L. W. Go, C. G. Moertel, *N. Engl. J. Med.* **1977**, *296*, 1318–1322.
- [89] A. L. Margolin, B. C. Shenoy, R. J. Sandberg, E. P. DiMaggio, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [90] M. J. Newman, M. F. Powell in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Hrsg.: M. F. Powell, M. J. Newman), Plenum, New York, **1995**, S. 1–42.
- [91] N. St. Clair, B. Shenoy, L. D. Jacob, A. L. Margolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9469–9474.
- [92] W. J. McAleer, E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, M. R. Hilleman, *Nature* **1984**, *307*, 178–180.
- [93] J. W. Austin, P. Doig, M. Stewart, T. J. Trust, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7470–7473.
- [94] S. E. Adams, A. S. Kingsman in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Hrsg.: M. F. Powell, M. J. Newman), Plenum, New York, **1995**, S. 769–786.
- [95] A. M. Taylor, *Chem. Eng. News* **1998**, *76*(32), 19–31.
- [96] J. L. Cleland, M. F. Powell, S. J. Shire, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1993**, *10*, 307–377.
- [97] V. V. Mozhaev, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 88–95.
- [98] S. P. Schwendeman, M. Cardamone, A. M. Klivanov, R. Langer, M. R. Brandon in *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines* (Hrsg.: S. Cohen, H. Bernstein), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 1–49.
- [99] N. L. Anderson, A. D. Matheson, S. Steiner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 408–412.
- [100] E. Eisenstein, G. L. Gilliland, O. Herzberg, J. Moul, J. Orban, R. J. Poljak, L. Banerjee, D. Richardson, A. J. Howard, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *1*, 25–30.
- [101] S. K. Burley, S. C. Almo, J. B. Bonanno, M. Capel, M. R. Chance, T. Gaasterland, D. Lin, A. Sali, F. W. Studier, S. Swaminathan, *Nat. Genet.* **1999**, *2*, 151–157.
- [102] E. Wilson, *Chem. Eng. News* **2000**, *78*(27), 27.
- [103] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542.
- [104] D. R. Holland, D. E. Tronrud, H. W. Pley, K. M. Flaherty, W. Stark, J. N. Jansonius, D. B. McKay, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11310–11316.
- [105] H. J. Duggleby, S. P. Tolley, C. P. Hill, E. J. Dodson, G. Dodson, P. C. E. Moody, *Nature* **1995**, *373*, 264–268.
- [106] D.-I. Liao, S. J. Remington, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6528–6531.
- [107] H. E. Parce, R. A. Hallewell, J. A. Tainer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6109.
- [108] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, *358*, 209–215.
- [109] J. P. Griffith, D. L. Griffith, I. Rayment, W. T. Murakami, D. L. Caspar, *Nature* **1992**, *355*, 652–654.
- [110] Y. F. Wang, K. Yakovlevsky, B. Zhang, A. L. Margolin, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3488–3495, zit. Lit.
- [111] E. Tuchsén, M. Ottesen, *Carlsberg Res. Commun.* **1977**, *42*, 407–420.
- [112] H. Noritomi, K. Koyama, S. Kato, K. Nagahama, *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 467–469.
- [113] D. Haring, E. Schuler, P. Schreier, *Proc. 216th ACS Meeting* (Boston, MA) **1998**.

- [114] F. A. Quijcho in *Methods in Enzymology*, Vol. 44 (Hrsg.: K. Mosbach), Academic Press, New York, **1976**.
- [115] J. J. Lalonde, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [116] S. B. Sobolov, A. Bartoszko-Malik, T. R. Oeschger, M. M. Montalbano, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 42, 7751–7754.
- [117] S. B. Sobolov, M. D. Leonida, A. Bartoszko-Malik, K. I. Voivodov, F. McKinney, J. Kim, A. J. Fry, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2125–2128.
- [118] N. St. Clair, Y. F. Wang, A. L. Margolin, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 388–391; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 380–383.
- [119] K. Visuri, O. Pastinen, X. Wu, K. Makinen, M. Leisola, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 64, 377–380.
- [120] C. A. Spilburg, J. L. Bethune, B. L. Vallee, *Biochemistry* **1977**, 16, 1142–1150.
- [121] G. M. Alter, D. L. Leussing, H. Neurath, B. L. Vallee, *Biochemistry* **1977**, 16, 3663–3668.
- [122] P. J. Kasvinsky, N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 6852–6859.
- [123] K. Visuri, US Patent No. 4699882, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, 104, 87145].
- [124] J. J. Lalonde, M. A. Navia, A. L. Margolin in *Methods in Enzymology*, Vol. 286 (Hrsg.: B. Rubin, E. A. Dennis), Academic Press, New York, **1997**, S. 443–464.
- [125] J. L. de Mattos, L. V. Lukachova, L. Gorton, T. Laurell, A. A. Karyakin, *Talanta* **2001**, 54/5, 963–974.
-