

Enzym Engineering/Biokatalyse

Optimierte Designer-Enzyme für die pharmazeutische Industrie

ANDREAS KUNZENDORF, UWE T. BORNSCHEUER
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, ABT. BIOTECHNOLOGIE & ENZYMKATALYSE,
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

Enzymes, the driving biocatalysts in living organisms, are typically not suited for large-scale industrial use. In the last decade, enzyme engineering has evolved into the key technology to design tailor-made enzymes for chemical and pharmaceutical applications. We highlight current trends in enzyme engineering and biocatalysis based on outstanding examples from the pharmaceutical industry.

DOI: 10.1007/s12268-022-1852-0
© Die Autoren 2022

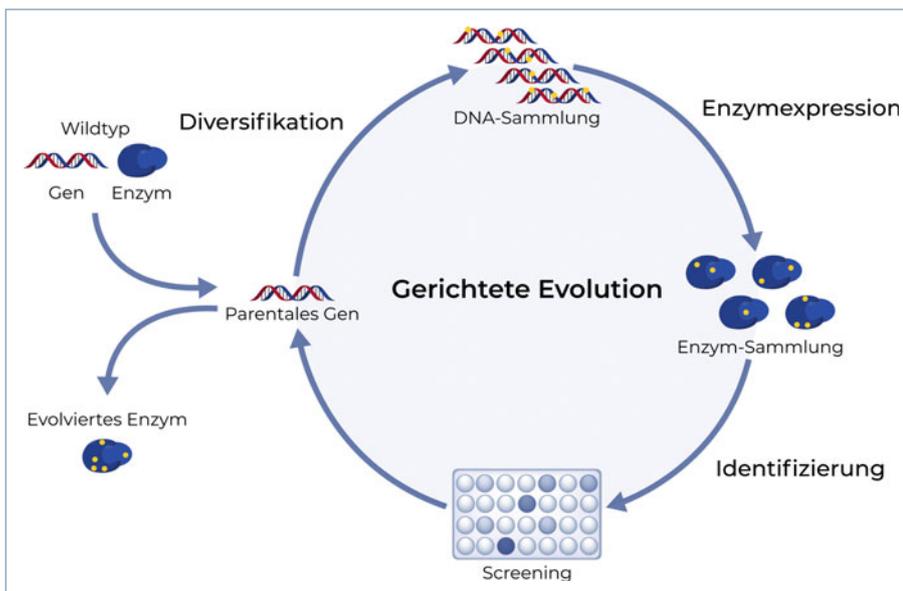
Die Biokatalyse ist eine attraktive Alternative zur „klassischen“ organischen Synthese. Enzyme ermöglichen die industrielle Herstellung von komplexen Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen mit dem Vorteil hoher Selektivität, Umweltfreundlichkeit und Nachhaltigkeit [1, 2]. So bietet die

große Molekularstruktur von Enzymen, mit zahlreichen unterschiedlichen funktionellen Aminosäuren, die ideale Voraussetzung um Verbindungen durch zahlreiche Interaktionen selektiv zu binden und Reaktionen mit hoher Chemo-, Regio- und Stereoselektivität zu katalysieren. Wasser kann anstelle von

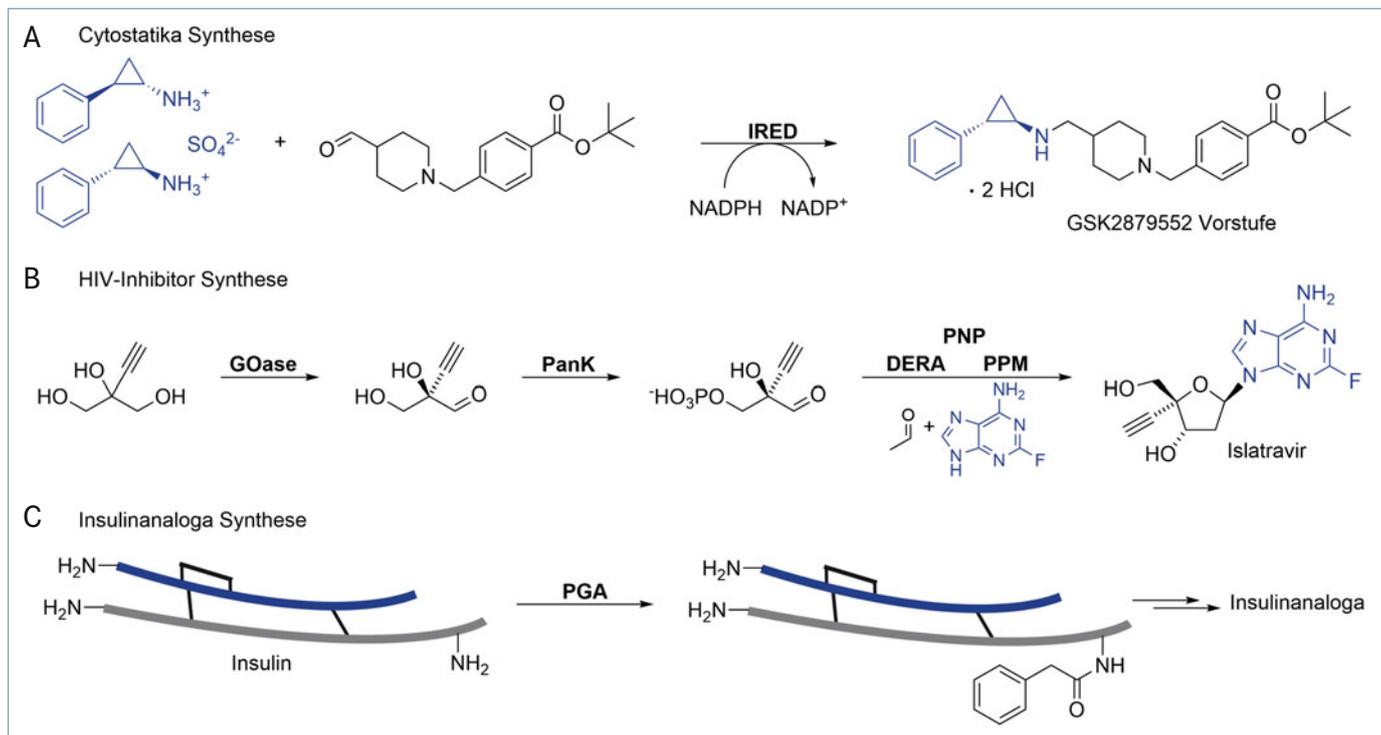
organischen Lösungsmitteln für enzymatische Reaktionen eingesetzt werden und Schutzgruppen sind auch für die Herstellung komplexer Verbindungen meistens nicht notwendig. Zudem können Enzyme relativ einfach rekombinant mikrobiell exprimiert werden und durch die genetische Kodierung steht eine Vielzahl an modernen molekularbiologischen Methoden zur Verfügung, um Enzyme durch Enzym Engineering mittels gerichteter Evolution (*directed evolution*) für industrielle Prozessbedingungen zielgerichtet zu optimieren.

Enzymoptimierung mittels gerichteter Evolution

Die Grundsteine des Enzym Engineering durch gerichtete Evolution wurden Mitte der 90er-Jahre maßgeblich von Willem P. Stemmer und Frances H. Arnold (Nobelpreis 2018) in wegweisenden Arbeiten gelegt [3]. Wurden Enzyme vorher durch rationale Mutagenese für einzelne Reaktionsparameter optimiert, erlaubt gerichtete Evolution nun die Anpassung an eine Vielzahl von Prozessparametern, unabhängig von tiefergehendem Wissen über die Enzymstruktur oder den enzymatischen Reaktionsmechanismus. Gerichtete Evolution besteht aus zwei Schlüsselschritten (**Abb. 1**). In einem ersten Schritt werden Mutationen in das codierende Gen eingeführt, sodass eine Sammlung an Enzymvarianten generiert wird. Im zweiten Schritt werden in einem Enzym-Screening Varianten mit verbesserten Eigenschaften identifiziert. Enzymvarianten mit Mutationen, die zu einer Verbesserung führen, dienen als Ausgangspunkt weiterer Runden gerichteter Evolution in einem iterativen Prozess. Anfänglich stellte jedoch die langwierigen Verfahren von Enzymidentifikation, Enzym Engineering und Prozessoptimierung hin zu einem etablierten Industrieprozess große Hindernisse für den weitreichenden Einsatz von Biokatalysatoren in industriellen Verfahren dar. Inzwischen beschleunigen rasche Entwicklungsfortschritte bei molekularbiologischen und bioinformatischen Methoden – aktuell über das Design von



▲ Abb. 1: Workflow Enzym Engineering durch gerichtete Evolution. Das Wildtyp-Gen dient als Ausgangspunkt, um durch molekularbiologische Methoden Mutationen in das Gen einzuführen (Diversifikation). Die hierdurch erzeugte DNA-Sammlung kann mikrobiell exprimiert werden und die Enzym-Sammlung durch eine geeignete Screening-Methode (u. a. UV-vis-, GC- oder HPLC-Analyse) nach Enzymvarianten mit verbesserten Eigenschaften durchsucht werden (Identifizierung). Die Varianten mit deutlicher Verbesserung dienen als Ausgangspunkt für weitere Optimierungsrunden.



▲ **Abb. 2:** Biokatalytische Syntheserouten der pharmazeutischen Industrie. **A,** Synthese der GSK2879552-Vorstufe mittels einer optimierten Imin-Reduktase (IRED). **B,** Multienzymkaskade für die Herstellung von Islatravir mit fünf optimierten Enzymen in drei Reaktionsschritten. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind Hilfsenzyme (vier Enzyme) nicht dargestellt. GOase: Galaktoseoxidase; PanK: Pantothenatkinase; DERA: Deoxyribose-5-Phosphat-Aldolase; PPM: Phosphopentomutase; PNP: Purine-Nukleosid-Phosphorylase. **C,** Derivatisierung von humanem Insulin mittels einer evolvierten Penicillin-G-Acylase (PGA). Neben der hier dargestellten Acetylierung ist auch die selektive Hydrolyse von Phenylacetyl-Schutzgruppen möglich, sodass alle sechs möglichen Insulinvarianten mit einfacher oder doppelter Phenylacetyl-Schutzgruppe durch unterschiedliche PGA-Varianten hergestellt werden konnten.

small, but smart-Bibliotheken unterstützt durch *machine learning* – sowie die Entwicklung effizienter Hochdurchsatzverfahren Enzym Engineering drastisch. Daher werden Biokatalysatoren nun in zahlreichen industriellen Anwendungen für die Herstellung von komplexen Verbindungen eingesetzt.

Insbesondere die pharmazeutische Industrie, angetrieben durch hohe Anforderungen an Produktreinheit sowie zunehmende molekulare Komplexität, aber auch eine gesteigerte Nachfrage nach umweltfreundlichen und nachhaltigeren Prozessen, greift verstärkt auf biokatalytische Methoden zurück. So lassen sich Syntheserouten verkürzen, Neben- und Abfallprodukte verringern und höhere Ausbeuten erzielen. Neue und herausragende biokatalytische Syntheserouten der pharmazeutischen Industrie, bei denen evolvierte Enzyme zum Einsatz kommen, werden nachfolgend näher vorgestellt.

Cytostatika-Synthese

Imin-Reduktasen (IREDs) katalysieren die reduktive Aminierung von Aldehyden oder Ketonen mit Aminen unter Verwendung des Ko-Faktors NAD(P)H. Die daraus hervorge-

henden chiralen Amine sind eine wichtige Produktklasse für die pharmazeutische Industrie. Jedoch verhinderten das limitierte Substratspektrum, ein hoher Aminüberschuss und eine verhältnismäßig hohe Enzymbeladung die industrielle Anwendung von IREDs. Für die chirale Vorstufensynthese von GSK2879552, einem LSD1-Inhibitor für die Behandlung von Leukämie und Lungenkrebs, gelang es durch gerichtete Evolution eine IRED soweit zu optimieren, dass die notwendige Substratkonzentration, die Enzymbeladung, der Puffer-pH und die Produktausbeute für einen industrielle Anwendung erreicht wurden [4]. Da die Wildtyp-IRED zu Beginn der gerichteten Evolution unter den gewünschten Prozessbedingungen inaktiv war, wurden die Reaktionsbedingungen während der Evolution schrittweise verschärft. Zuerst wurden 256 von 296 Aminosäurepositionen der Wildtyp-IRED durch Einzel-Sättigungsmutagenese gezielt verändert. In der zweiten und dritten Evolutionsrunde wurden dann nützliche Mutationen aus der ersten Runde rekombiniert. Moderne bioinformatische Methoden ermöglichten additive, synergistische oder nachteilige Effekte von rekombina-

torischen Mutationen zu identifizieren und so den gesamten Screening-Aufwand deutlich zu verringern. Nach lediglich drei Evolutionsrunden konnte die Vorstufe für GSK2879552 mittels der optimierten IRED mit 84 Prozent Ausbeute, 99,9 Prozent Produktreinheit und über 99 Prozent Enantiomerenüberschuss enzymatisch gewonnen werden. Im Vergleich mit dem vorherigen chemischen Syntheseweg für diese Zielverbindung wurden die Reaktionsschritte, toxische Nebenprodukte und der Einsatz von Lösungsmitteln reduziert, sodass der biokatalytische Syntheseweg deutlich nachhaltiger und umweltfreundlicher war.

HIV-Inhibitor-Synthese

Sicherlich eines der herausragendsten Beispiele für den Erfolg von Enzym Engineering ist die biokatalytische Syntheseroute für Islatravir, einem Reverse-Transkriptase-Inhibitor zur Behandlung von HIV [5]. Insgesamt wurden fünf Enzyme durch gerichtete Evolution optimiert, um in einer ausschließlich biokatalytischen Reaktionskaskade in drei Schritten und in einer „Eintopf-Synthese“ den finalen Wirkstoff Islatravir mit drei

Stereozentren herzustellen. Zusätzlich wurden vier weitere Enzyme zur Regeneration von Ko-Faktoren eingesetzt. Diese eindrucksvolle Kombination von Enzymen außerhalb eines Ganzzellsystems wurde maßgeblich durch die Optimierung aller fünf einzelnen Enzyme realisiert. Dabei wurden die Enzyme nicht nur hinsichtlich ihrer Aktivität für die nicht natürlichen Substrate, sondern auch ihrer Selektivität, Produktinhibition sowie Stabilität optimiert. Hierfür wurden bis zu 34 Aminosäuren für einzelne Enzyme in über zwölf Evolutionsrunden verändert. Mit insgesamt neun eingesetzten Enzymen in einer Reaktionskaskade konnte Islatravir letztendlich mit einer Ausbeute von 51 Prozent in drei Schritten gewonnen werden. Gegenüber der chemischen Synthese, mit über 16 Schritten und lediglich 16 Prozent Ausbeute, stellte dies eine deutliche Verbesserung der Reaktionsschritte und Atomökonomie dar. Insbesondere die Effizienz von Enzymen, Substrate mit hoher Selektivität umzusetzen, ermöglichte es so, viele Reaktionsschritte in einer Reaktionskaskade zu kombinieren und die aufwendige Isolierung von Zwischenprodukten zu vermeiden.

Insulinanaloga-Synthese

Neben der Herstellung niedermolekularer Verbindungen gewinnt auch die selektive Funktionalisierung höhermolekularer Strukturen, wie z. B. pharmazeutischer Peptid- und Proteinkonjugate, mittels enzymatischer Verfahren zunehmend an Bedeutung. So sind Insulinanaloga, die durch Biokonjugation ausgehend von rekombinantem humanem Insulin hergestellt werden und unterschiedliche pharmakokinetische Profile aufweisen, für die Behandlung von Diabetes besonders von Bedeutung. Humanes Insulin besitzt drei freie Aminogruppen (**Abb. 2C**), die gezielt durch Biokonjugation verändert werden können. Jedoch ist eine selektive, rein chemische Unterscheidung der freien Aminogruppen, um diverse Modifizierungen einzuführen, nur bedingt möglich. Deutlich vielversprechender ist eine kürzlich veröffentlichte chemoenzymatische Strategie [6]. Evolierte Varianten des Enzyms Penicillin-G-Acylase (PGA) fügten hierfür gezielt Phenylacetyl-Schutzgruppen in humanes Insulin ein oder

konnten auch selektiv Schutzgruppen entfernen. Dieser Ansatz erforderte die Optimierung von sechs evolvierten PGA-Varianten über bis zu sechs Runden gerichteter Evolution bei denen zwischen acht und 26 Aminosäuren in den PGA-Enzymen verändert wurden. Während der gerichteten Evolution wurde neben der Selektivität auch die Aktivität der PGA deutlich verbessert. Nach der selektiven Protektion von Insulin durch die Phenylacetyl-Schutzgruppen konnten gezielt Biokonjugate mit den verbleibenden freien Aminogruppen hergestellt werden. Hierfür wurden in einem chemischen Reaktionsschritt u. a. kleine organische Moleküle, aber auch größere Zucker- und Peptidkonjugate zur Funktionalisierung verwendet. Anschließend konnten die Phenylacetyl-Schutzgruppen enzymatisch unter milden Reaktionsbedingungen entfernt werden, sodass die Insulinanaloga mit hoher Selektivität und Ausbeute gewonnen werden konnten.

Ausblick

Die vorhergehenden Beispiele für hochoptimierte und komplexe mehrstufige Biokatalyseprozesse demonstrieren eindrucksvoll die Leistung von Enzym Engineering im Bereich der pharmazeutischen Industrie, wie in einem kürzlich erschienenen Highlight dargestellt [7]. Enzyme können in relativ kurzer Zeit an unterschiedliche Substrate und die gewünschten Prozessbedingungen durch gerichtete Evolution zielgenau angepasst werden. Die Entwicklungszeit für die Optimierung von Enzymen hat sich dabei so weit verkürzt, dass innerhalb weniger Monate eine enzymatische Syntheseroute etabliert werden kann. Dies ist eine wichtige Grundvoraussetzung, um dem Anspruch der pharmazeutischen Industrie an kurze Entwicklungszyklen zu entsprechen [8]. Durch moderne bioinformatische Methoden für Enzym Engineering, wie den Einsatz von *machine learning* sowie künstlicher Intelligenz [9], werden sich diese Entwicklungszeit und auch der finanzielle und materielle Aufwand noch weiter reduzieren. So können bereits jetzt mit AlphaFold Proteinstrukturen von beliebigen Enzymen mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden. In Kombination mit experimentellen Daten und maschi-

nellem Lernen werden sich Enzyme noch effizienter an industrielle Anforderungen anpassen lassen. Daher ist davon auszugehen, dass zukünftig optimierte Biokatalysatoren noch viele weitere Synthesewege in der Chemie und Pharmazie deutlich vereinfachen werden. ■

Literatur

- [1] Wu S, Snajdrova R, Moore J et al. (2021) Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 60: 88–119
- [2] Yi D, Bayer T, Badenhorst CPS et al. (2021) Recent trends in biocatalysis. *Chem Soc Rev* 50: 8003–8049
- [3] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ et al. (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485: 185–194
- [4] Schober M, MacDermaid C, Ollis AA et al. (2019) Chiral synthesis of LSD1 inhibitor GSK2879552 enabled by directed evolution of an imine reductase. *Nat Catal* 2: 909–915
- [5] Huffman MA, Fryszkowska A, Alvizo O et al. (2019) Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science* 366: 1255–1259
- [6] Fryszkowska A, An C, Alvizo O et al. (2022) A chemoenzymatic strategy for site-selective functionalization of native peptides and proteins. *Science* 376: 1321–1327
- [7] Rosenthal K, Bornscheuer UT, Lütz S (2022) Cascades of evolved enzymes for the synthesis of complex molecules. *Angew Chem Int Ed Engl* 61: e202208358
- [8] Truppo MD (2017) Biocatalysis in the pharmaceutical industry – the need for speed. *ACS Med Chem Lett* 8: 476–480
- [9] Yang KK, Wu Z, Arnold FH (2019) Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering. *Nat Methods* 16: 687–694

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Andreas Kunzendorf (links) und Uwe T. Bornscheuer

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer
 Institut für Biochemie
 Universität Greifswald
 Felix-Hausdorffstraße 4
 D-17487 Greifswald
uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de