



Bioorthogonale Chemie Hot Paper

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202205348

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202205348

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202205348



# DFT-basierte Entdeckung von Ethynyl-Triazolyl-Phosphinaten als modulare Elektrophile für die chemoselektive Cystein-Biokonjugation und Profilierung

Christian E. Stieger, Yerin Park, Mark A. R. de Geus, Dongju Kim, Christiane Huhn, J. Sophia Slenczka, Philipp Ochtrup, Judith M. Mächler, Roderich D. Süßmuth, Johannes Broichhagen, Mu-Hyun Baik,\* und Christian P. R. Hackenberger\*

In memoriam Professor Ulf Diederichsen

**Abstract:** Wir berichten über eine Dichtefunktionaltheorie (DFT)-basierte Entdeckung von Ethynyl-Triazolyl-Phosphinaten (ETP) als eine neue Klasse elektrophiler Verbindungen für die selektive Biokonjugation von Cystein. Mit Hilfe der Cu<sup>I</sup>-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in wässrigem Puffer konnten wir eine Vielzahl funktioneller elektrophiler Bausteine, darunter auch Proteine, aus Diethynylphosphinat herstellen. Wir verwendeten diese ETP-Reagenzien, um fluoreszierende Peptid-Konjugate für die Markierung von Rezeptoren auf lebenden Zellen sowie ein stabiles und biologisch aktives Antikörper-Wirkstoff-Konjugat zu erhalten. Darüber hinaus konnten wir ETP-Elektrophile unter nativen Bedingungen in ein Azid-haltiges Ubiquitin einbauen und ihr Potenzial für die Protein-Protein-Konjugation demonstrieren. Schließlich zeigen wir die exzellente Cystein-Selektivität dieser neuen Klasse von Elektrophilen in Massenspektrometrie basierten, proteomweiten Reaktivitätsstudien und unterstreichen damit die generelle Anwendbarkeit in homogenen Biokonjugationsstrategien zur Verknüpfung zweier komplexer Biomoleküle.

## Einleitung

Die chemische Funktionalisierung von Proteinen ermöglicht es, ihre biologische Funktion zu untersuchen und zu verändern und neue Biotherapeutika, insbesondere Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs), zu entwickeln.<sup>[1,2]</sup> Bei diesen Anwendungen ist ein homogenes und gut definiertes Konjugat erwünscht.

Ein Ansatz dies zu erreichen besteht darin, unnatürliche Aminosäuren mit unterschiedlichen bioorthogonalen Reaktivitäten in Proteine einzubauen.<sup>[3-5]</sup> Alternativ kann man sich die inhärente Reaktivität der kanonischen Aminosäureseitenketten zunutze machen. Chemoselektive Modifikationen der meisten Aminosäuren in Proteinen werden in der Regel durch elektrophile Reagenzien durchgeführt, die auf nukleophile Aminosäuren abzielen, insbesondere Lysin und Cystein.<sup>[2,6-8]</sup> Die Sulfhydrylgruppe des Cysteins ist aufgrund ihres geringen natürlichen Vorkommens und ihrer hohen Nucleophilie unter physiologischen Bedingungen ein besonders attraktives Ziel für die Biokonjugation.<sup>[9]</sup> Maleimide werden am häufigsten als Elektrophile in der Cystein-Biokonjugation eingesetzt, obwohl die gebildete Thiosuccinimid-Bindung für die Retro-Michael-Reaktion anfällig ist, was für die Konjugation von zytotoxischen Molekülen problematisch sein kann.<sup>[10,11]</sup> Um dieses Problem zu überwinden, wurden mehrere alternative Methoden zur Cysteinmarkierung entwickelt, darunter Vinylsulfonamide,<sup>[12]</sup> Car-

[\*] C. E. Stieger, Dr. M. A. R. de Geus, C. Huhn, Dr. P. Ochtrup, J. M. Mächler, Dr. J. Broichhagen, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (Deutschland)  
E-mail: hackenbe@fmp-berlin.de

C. E. Stieger, C. Huhn, Dr. P. Ochtrup, J. M. Mächler, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger  
Institut für Chemie, Humboldt Universität zu Berlin  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

Y. Park, D. Kim, Prof. Dr. M.-H. Baik  
Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)  
Daejeon 34141 (Republik Korea)

Y. Park, D. Kim, Prof. Dr. M.-H. Baik  
Center for Catalytic Hydrocarbon Functionalizations, Institute for Basic Science (IBS)  
Daejeon 34141 (Republik Korea)  
E-mail: mbaik2805@kaist.ac.kr

J. S. Slenczka, Prof. Dr. R. D. Süßmuth  
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin  
Strasse des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

bonyl-Acryl-Derivate,<sup>[13]</sup> hypervalente Iod-Reagenzien,<sup>[14,15]</sup> und metallorganische Reagenzien.<sup>[16,17]</sup> Dennoch bleiben mäßige Selektivität oder geringe Reaktivität unter physiologischen Bedingungen weiterhin problematisch.<sup>[18]</sup>

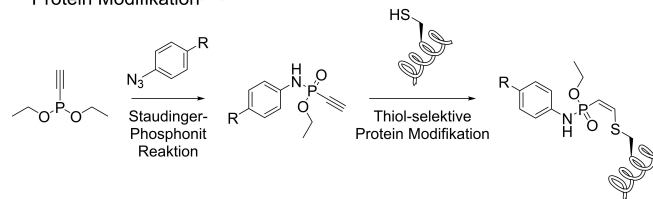
Neben der Selektivität und Stabilität sind auch die synthetische Zugänglichkeit und die Modularität des Elektrophils wichtig. Während Peptide in organischen Lösungsmitteln problemlos mit einem Elektrophil funktionalisiert werden können, stellen wässrige Umgebungen eine enorme Herausforderung dar. Die genetische Kodierung latenter bioreaktiver Elektrophile war teilweise erfolgreich,<sup>[19]</sup> jedoch führt der Einbau reaktiverer Elektrophile oft zu unspezifischen Reaktionen mit zytosolischen Thiolen.<sup>[20]</sup> Deshalb ist die gebräuchlichste Strategie zur Positionierung eines hochreaktiven Elektrophils auf Proteinen die Verwendung von bis-elektrophilen Linkern, die an Cysteine oder andere nucleophile Reste gebunden werden können. Jedoch werden häufig unerwünschte intramolekulare Reaktionen<sup>[21]</sup> und Dimerisierungen beobachtet.<sup>[22,23]</sup> Alternativ kann eine nucleophile Aminosäure chemisch in ein Elektrophil umgewandelt werden, wie es beispielsweise bei der Umpolung von Cystein, Tyrosin und Histidin demonstriert wurde.<sup>[24–27]</sup>

Eine weitere attraktive Anwendung von Elektrophilen liegt im Bereich der Chemoproteomik<sup>[28]</sup> zur zielgerichteten Anreicherung und Analyse eines spezifischen (Sub-)Proteoms. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten die Reagenzien eine hohe Markierungseffizienz, eine einheitliche Modifikation, eine ausgezeichnete Aminosäureselektivität sowie Stabilität des gebildeten Konjugats gewährleisten.<sup>[18]</sup> Heute wird dieser Ansatz häufig zur Aufklärung der proteomweiten Redox-Empfindlichkeit von Cysteinen<sup>[29]</sup> sowie deren kovalente Bindung durch elektrophile Fragmente,<sup>[30,31]</sup> Naturstoffe,<sup>[32]</sup> oder Wirkstoffe eingesetzt.<sup>[33]</sup>

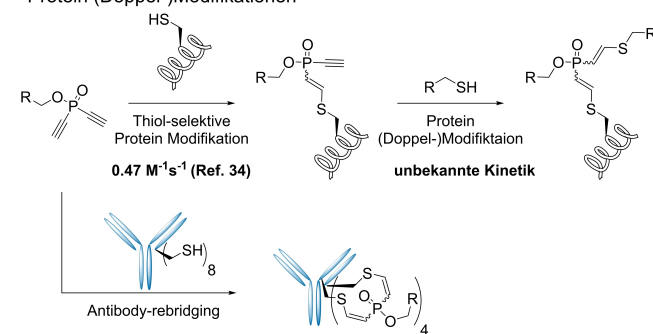
Im Rahmen unserer jüngsten Bemühungen, Diethynylphosphinate als Disulfid-verbrückende Reagenzien für stabile Antikörpermodifikationen zu etablieren, haben wir diese bifunktionellen Cystein-selektiven Elektrophile für die schrittweise Funktionalisierung eines Proteinsubstrats eingesetzt (Schema 1B).<sup>[34]</sup> In diesem Protokoll wurde eine elektrophile Gruppe durch Reaktion mit Diethynylphosphinat an einer ehemaligen Cysteinseitenkette installiert und anschließend mit einem thiolhaltigen kleinen Molekül oder Peptid umgesetzt, um das gewünschte Konjugat zu erzeugen. Trotz dieser Entwicklungen kann der Einbau von Thiolen in kleine Moleküle synthetisch aufwändig sein und ist mit dem inhärenten Problem der Disulfidbildung verbunden. Daher wollten wir andere modulare und synthetisch unkomplizierte Strategien nutzen, um Cystein-selektive Elektrophile in kleine Moleküle, Peptide und Proteine einzubauen.

Unsere aktuelle Arbeit beschreibt die Entdeckung von 1,2,3-Triazolyl-substituierten Ethynylphosphinaten (ETP) als leicht zugängliche, schnelle und hochselektive Thiol-Elektrophile (Schema 1C), die auf Computermodellen der Dichtefunktionaltheorie basieren. Diese Moleküle können leicht aus verschiedenen Azid-haltigen Molekülen durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in wässrigem Puffer zugänglich gemacht werden. Nach der Cycloaddition zeigen die Elektrophile im Vergleich zu Diethynylphosphinaten eine bemerkenswert hohe Reaktivität mit Cystein und

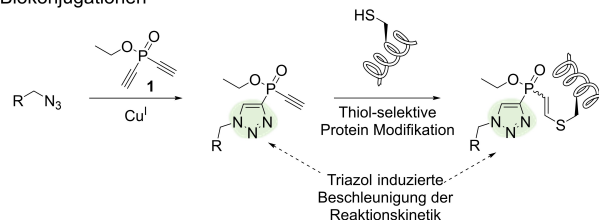
#### A. Staudinger-induzierte elektrophile Phosphonamide für die Cys-selektive Protein Modifikation<sup>[35]</sup>



#### B. Diethynyl-phosphinate für das Cys-selektive Antikörper-Rebridging und Protein (Doppel-)Modifikationen<sup>[34]</sup>



#### C. Diese Arbeit: Modulare Bausteine für justierbare chemoselektive Thiol Biokonjugationen



**Schema 1.** Allgemeines Konzept der ungesättigten PV-Elektrophile bei der Cys-selektiven Proteinmarkierung A) Elektrophile Phosphonamide, die über die chemoselektive Staudinger-Phosphonit-Reaktion erzeugt werden, reagieren selektiv mit Cysteinresten in Proteinen. B) Diethynyl-Phosphinate können selektiv mit zwei verschiedenen Thiol-Nucleophilen reagieren und ermöglichen die Doppelmodifizierung von Proteinen und die Disulfidüberbrückung zwischen den Ketten in IgG-Antikörpern. C) CuAAC-Funktionalisierung von Diethynylphosphinaten erzeugt ETP-Reagenzien, die eine erhöhte Reaktionskinetik bei der selektiven Cystein-Modifikation von Proteinen zeigen.

übertreffen unsere zuvor beschriebenen Phosphonamidat-Elektrophile (Schema 1A)<sup>[35]</sup> in Antikörper-Markierungsexperimenten. Wir zeigen den Nutzen dieser Reagenzien bei der Herstellung verschiedener biologisch relevanter Peptid-, Protein- und Antikörper-Konjugate. Darüber hinaus zeigen wir, dass ETP-Elektrophile in wässrigen Systemen in Azid-haltigen Proteinen eingebracht und zur Protein-Protein-Konjugation verwendet werden können. Schließlich demonstrieren wir die ausgezeichnete Cystein-Selektivität von ETP-Elektrophilen durch proteomweite Reaktivitätsprofile.

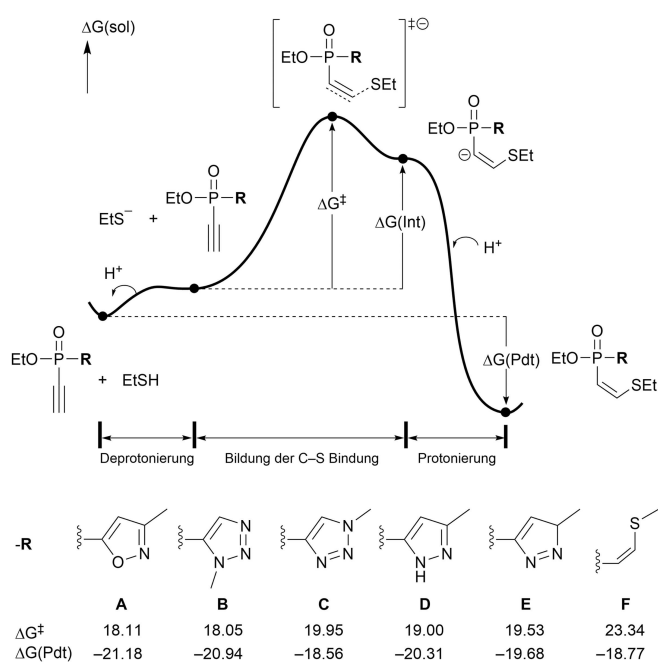
## Ergebnisse und Diskussion

Wir begannen unsere Untersuchung mit der Bestimmung der kinetischen Parameter der zweiten Thiol-Addition an

Diethynylphosphinat (Schema 1B). So haben wir ein kleines thiolhaltiges Fluorophor (EDANS-SH) mit einem Überschuss an Ethyldiethynylphosphinat (**1**) umgesetzt und Thiovinyl-ethynylphosphinat **2** in guter Ausbeute (*Z*-Isomer, 76%) erhalten. **2** wurde einer äquimolaren Menge von reduziertem Glutathion in einem wässrigen Puffer bei pH 8.5 ausgesetzt<sup>[36,37]</sup> und wir beobachteten eine reibungslose Umwandlung in eine Mischung der *E*- und *Z*-Isomere des Glutathion-Addukts. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $0.29 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Abbildung S5) war etwas niedriger als die Kinetik, die wir zuvor für die erste Thiol-Addition des Diethynylphosphinats berichtet hatten ( $0.47 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Schema 1B).<sup>[34]</sup> Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, hatten wir zunächst vor, elektronenziehende (EWG) Alkohol-Substituenten in **1** zu verwenden, wie dies bereits für ungesättigte Phosphoramidate gezeigt wurde.<sup>[36]</sup> Alle Versuche, Diethynylphosphinate mit EWG-Alkohol-Substituenten zu isolieren, scheiterten jedoch an der schnellen Hydrolyse der P-O-Bindung. Frühere Arbeiten aus unseren Labors haben gezeigt, dass Dichtefunktionaltheorie (DFT) Berechnungen die relativen Geschwindigkeiten der Thiolkonjugationen mit den jeweiligen  $\text{P}^{\text{V}}$ -Elektrophilen vorhersagen können.<sup>[38]</sup> Die Analyse der Molekülorbitale deutet außerdem darauf hin, dass der Schlüsselfaktor zur Steigerung der Reaktivität in der Stabilisierung des negativ geladenen Zwischenprodukts liegt, das beim nukleophilen Angriff des Thiolats entsteht, wobei die Delokalisierung des anionischen Charakters durch Hyperkonjugation erreicht wird. Die Bindung P-XEt (X: S, O und NH), die sich in einer antiperiplanaren Position zum Einzelpaar befindet, spielte eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme der Elektronendichte. Auf der Grundlage dieses Konzepts haben wir untersucht, ob wir die Akzeptanzfähigkeit neuer Substituenten mit  $\pi$ -Systemen, die von **1** aus zugänglich sind (d.h.  $\pi$ -Acidität), zur Verbesserung der Reaktivität nutzen können.

Wir nahmen an, dass mehrere heterozyklische Substituenten, die elektronegative Sauerstoff- und/oder Stickstoffatome enthalten, geeignet wären, um sowohl einen elektronenziehenden induktiven Effekt als auch eine  $\pi$ -Konjugation mit den Einzelpaarelektronen zu erreichen. Daher haben wir uns auf die Reagenzien **A–E** konzentriert, die Isoxazol-(**A**-), 1,2,3-Triazol-(**B** und **C**-), 1*H*-Pyrazol-(**D**-) und 3*H*-Pyrazol-(**E**-) Substituenten enthalten, und ihre Reaktionsprofile mithilfe von DFT berechnet. Wir modellierten die Reaktivität der zuvor beschriebenen Verbindung **2**, indem wir den anhängenden Substituenten als Methylgruppe in Verbindung **F** abschnitten (Abbildung 1).

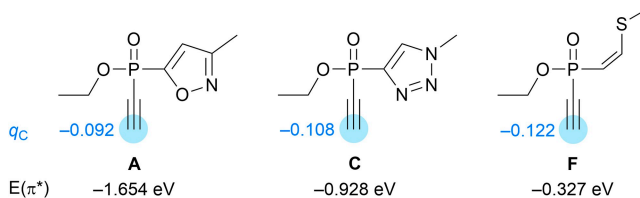
Das allgemeine Schema des Reaktionsenergieprofils für die Michael-Addition an die Elektrophile **A–F** ist in Abbildung 1, dargestellt, einschließlich Ethanithiol (EtSH) als Modell für eine nukleophile Reaktionskomponente. In wässrigem Puffer (z. B. pH 6.5–8.5) befinden sich EtSH und das entsprechende Thiolat-Anion  $\text{EtS}^-$  im Gleichgewicht. Da das Thiolat das bessere Nukleophil ist, nahmen wir die schrittweise Deprotonierung von EtSH und den anschließenden nukleophilen Angriff von  $\text{EtS}^-$  an, um das Carbanion-Zwischenprodukt zu bilden. Die berechneten Reaktionsbarrieren ( $\Delta G^\ddagger$ ) für die jeweiligen Elektrophile wurden



**Abbildung 1.** Reaktionsenergieprofil der Thiol-Addition der Reagenzien **A–E** und einer Modellverbindung **F**. Energien in  $\text{kcal mol}^{-1}$ , berechnet auf dem Theorieniveau B3LYP-D3/cc-pVTZ(-f)//B3LYP-D3/6-31G\*\*.

verwendet, um die Reaktionskinetik zwischen ihnen zu vergleichen. Die berechneten  $\Delta G^\ddagger$ -Werte nehmen in der Reihenfolge  $23.3 \text{ (F)} > 20.0 \text{ (C)} \approx 19.5 \text{ (E)} \approx 19.0 \text{ (D)} > 18.1 \text{ (A)}$   $\text{kcal mol}^{-1}$  (**B**), ab, was darauf hindeutet, dass die neu entwickelten Elektrophile **A–E** viel reaktiver sein sollten als **F**. Schließlich wird das Zwischenprodukt durch Wasser irreversibel protoniert, um das endgültige Thiol-Additionsprodukt zu bilden. Die Elektrophilie der Serie von  $\text{P}^{\text{V}}$ -Reagenzien lässt sich durch DFT-berechnete Teilladungen des reaktiven terminalen Kohlenstoffatoms an der Ethynylgruppe erklären, da atomare Ladungen als Maß für die elektronenziehende Fähigkeit verschiedener funktioneller Gruppen verwendet werden können.<sup>[39–43]</sup>

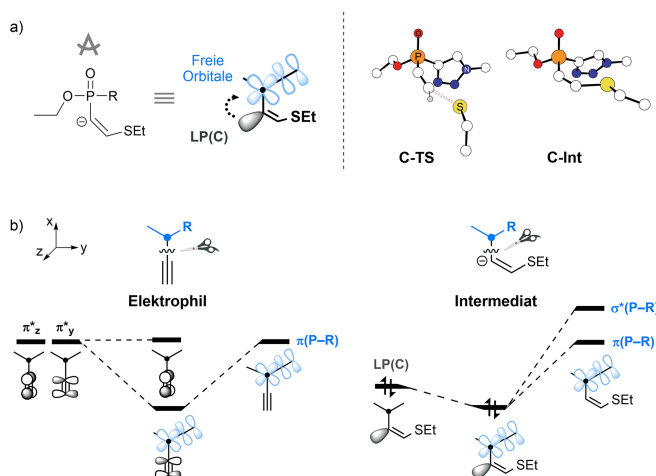
Eine natürliche Populationsanalyse<sup>[44]</sup> wurde durchgeführt, um den induktiven Effekt der unterschiedlichen Substituenten in den Elektrophilen **A**, **C** und **F** zu vergleichen (Abbildung 2). Die atomaren Ladungen korrelieren mit den Reaktionsbarrieren und sind am positivsten für **A** ( $-0.092$ ), gefolgt von **C** ( $-0.108$ ), und am negativsten für **F**



**Abbildung 2.** Vergleich zwischen den Elektrophilen **A**, **C** und **F**.  $q_{\text{C}}$ : Natürliche atomare Ladung am reaktiven Kohlenstoff,  $E(\pi^*)$ : Energie des reaktiven  $\pi^*$ -Orbitals des Elektrophils. (Für weitere Details siehe Abbildung S3 und S4).

(−0.122). Zusammen mit den Teilladungen können die Grenz-molekülorbitale verwendet werden um die Elektrophilie oder Nukleophilie zu erklären,<sup>[42,45–48]</sup> wobei die Energieniveaus der Orbitale die Effizienz der bindungsbildenden Wechselwirkung beeinflussen.<sup>[49]</sup> Die Energie des reaktiven  $\pi^*$ -Orbitals der  $P^V$ -Elektrophilen ist am niedrigsten für **A** (−1.65 eV), gefolgt von **C** (−0.93 eV) und am höchsten für **F** (−0.33 eV), was dem Reaktivitätstrend entspricht (Abbildung 2).

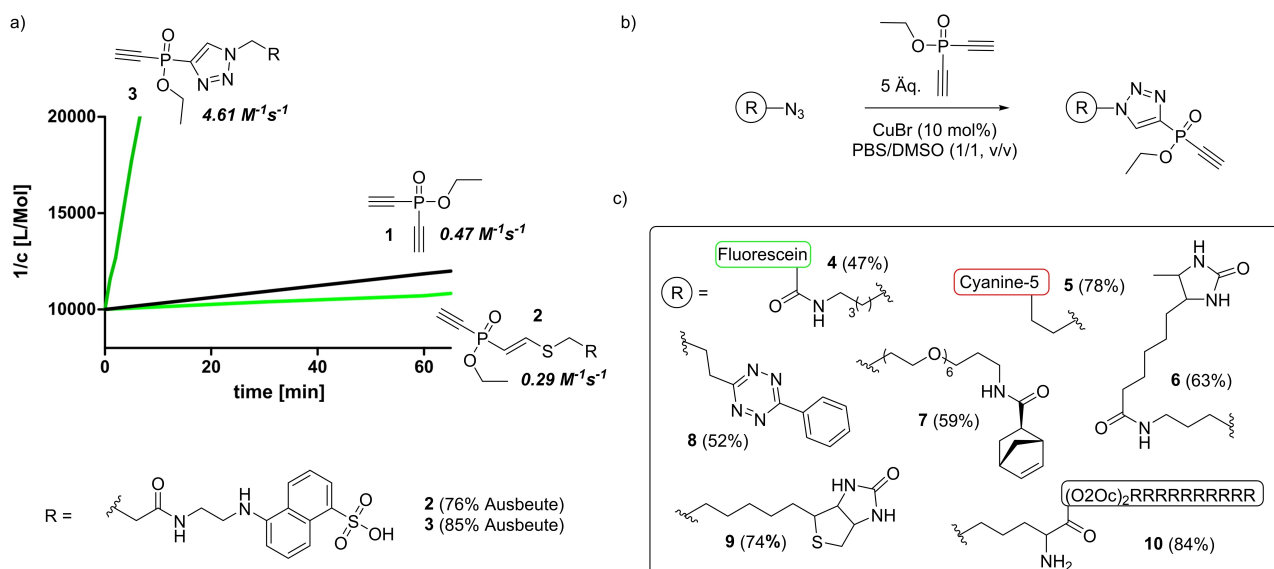
Wir haben weiter untersucht, wie die Substituenten das  $\pi$ -System beeinflussen, um die Reaktivität zu erhöhen. Die



**Abbildung 3.** a) Die allgemeine Konformation von Übergangszuständen und Intermediaten von oben gesehen (links). Geometrie von **C-TS** und **C-Int** als Repräsentanten (rechts). b) Konzeptualisierte Orbitalmischung zwischen zwei Fragmenten für das LUMO von Elektrophilen und das HOMO von Zwischenprodukten. (Für die tatsächlichen Molekülorbitale, siehe Abbildung S1 und S2).

Verzerrung der  $P-C=C$ -Bindung in der Geometrie des Übergangszustands (TS) und des Carbanion-Zwischenprodukts (Int) ist dadurch gekennzeichnet, dass das  $sp^2$ -hybridisierte Einzelpaar bevorzugt antiperiplanar zur  $P-R$ -Bindung liegt (Abbildung 3a). Die optimierte TS- und Zwischenstruktur von **C** (C-TS und C-Int) sind in Abbildung 3a dargestellt. Dieses strukturelle Merkmal findet sich auch im vorherigen System, in dem  $P-R$   $\sigma$ -Bindungen (R: S, O und NH) die Elektronendichte über Hyperkonjugation aufnehmen. In ähnlicher Weise ist die Delokalisierung von Elektronen in freie Orbitale in Verbindung mit den  $P-R$ -Bindungen möglich, wie in Abbildung 3b dargestellt. Die Vermischung zwischen den  $\pi$ -Systemen der Ethynylgruppe und der  $P-R$ -Bindung ist im LUMO der Elektrophilen deutlich zu erkennen. Die Konjugation erhöht die Reaktivität der  $\pi^*_y$ -Orbital im Vergleich zum  $\pi^*_z$ -Orbital, außer im Fall von **F**, und begünstigt letztlich die Bildung von Einzel-elektronenpaaren in dieser Richtung.

Dem Leitfaden der theoretischen Studie folgend nehmen wir an, dass 1,2,3-Triazol-substituierte Phosphinat-Elektrophile leicht über eine  $Cu^I$ -katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition zugänglich sein könnten. Daher haben wir die Synthese von ETP-Elektrophilen ausgehend von EDANS- $N_3$  und Phosphinat **1** untersucht. Während 1–3 Äquivalente Phosphinat in Gegenwart von 10 Mol-%  $CuBr$  hauptsächlich zu einem di-funktionalisierten Phosphinat führten, konnten wir mit 5 Äquivalenten Phosphinat das gewünschte mono-funktionalisierte Molekül **3** in 85 % Ausbeute erhalten (Schema 2a). Um die Berechnungsergebnisse zu validieren, führten wir, wie zuvor beschrieben, eine kinetische Analyse mit Glutathion als Modell-Thiol durch. Phosphinat **3** zeigte eine beschleunigte Reaktionskinetik von  $4.61 M^{-1}s^{-1}$  (Abbildung S5) und übertraf damit Phosphinat **2** um etwa das 15-fache, was mit den DFT-berechneten Reaktionsbarrieren übereinstimmt (Schema 2a). Diese Ergebnisse haben uns



**Schema 2.** a) Schematische Darstellung der experimentellen Thiol-Additionskinetik der Phosphinate **1–3** bei pH 8.5. b) Synthetisches Verfahren zur Herstellung funktionalisierter ETP-Elektrophile. c) Funktionelle Elektrophile, die mit dem in b dargestellten synthetischen Verfahren erhalten wurden (Werte stellen die isolierte Ausbeute dar).

dazu inspiriert, verschiedene funktionalisierte ETP-Elektrophile zu synthetisieren (Schema 2b). Mit dem beschriebenen Verfahren konnten wir ETP-Reagenzien mit Fluorophoren (**3**, **4** und **5**), Affinitäts-Tags (**6** und **9**) oder bioorthogonalen Click-Handle (**7** und **8**) in mäßiger bis guter Ausbeute herstellen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese Strategie es ermöglicht, ein ETP-Elektrophil in ein Azidhaltiges zellpenetrierendes R<sub>10</sub>-Peptid (**10**) einzubauen (Schema 2c).

Um die Anwendbarkeit von ETP-Elektrophilen für die Cys-selektive Markierung von Proteinen und Antikörpern zu untersuchen, haben wir den therapeutischen Antikörper Trastuzumab, der gegen Her2 gerichtet ist, als Modellsystem gewählt. Zunächst haben wir Thiovinylphosphinat **2** und Triazolylphosphinat **3** verglichen. Trastuzumab (5 mg mL<sup>-1</sup> in Tris-Puffer pH 8.3) wurde mit 8 Äquivalenten TCEP reduziert (37 °C, 30 min). Anschließend wurden 8 Äquivalente des entsprechenden Phosphinats zugegeben, und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt (Abbildung 4a). Während Verbindung **2** eine durchschnittliche Markierung von 4.2 Fluorophoren pro Antikörper erzielte, erreichte Verbindung **3** eine fast stöchiometrische Markierung aller freien Cysteinthiole im Antikörper, was einem Fluorophor-zu-Antikörper-Verhältnis (FAR) von 7.4 entsprach (Abbildung 4b und S6). In einem Kontrollexperiment, bei dem der Antikörper vor der Reaktion mit den beiden Phosphinaten nicht reduziert wurde, konnte durch

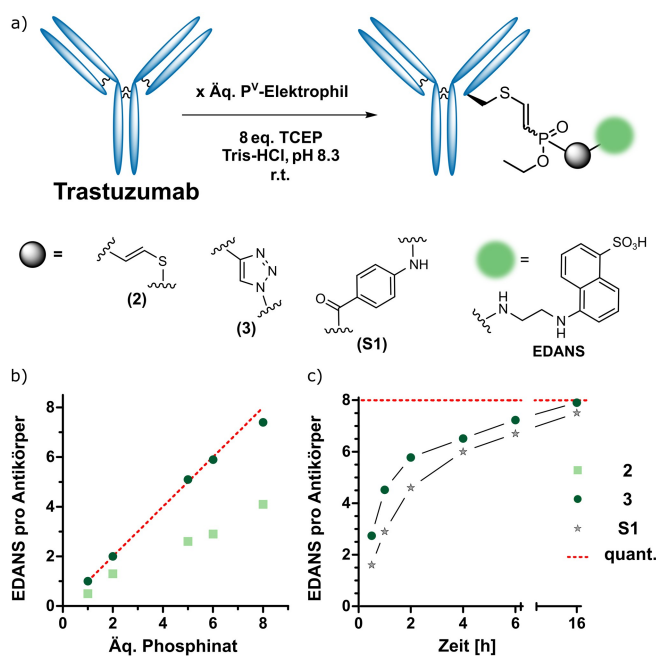
SDS-PAGE und intakter Protein Massenspektrometrie (MS) keine Modifikation festgestellt werden (Abbildung S4b). Auch ein größerer Überschuss an **3** (100 Äquiv.) führte in Abwesenheit eines Reduktionsmittels zu keiner Antikörpermarkierung (Abbildung S7). Die Beobachtung einer fast stöchiometrischen Markierung bei der Verwendung von 8 Äquivalenten EDANS-ETP veranlasste uns zu untersuchen, ob dies ein allgemeines Phänomen ist. Wir titrierten Trastuzumab mit steigenden Mengen der Phosphinate **2** und **3** (Abbildung 4a). Zu unserer Freude beobachteten wir eine vollständige Antikörpermarkierung mit bis zu 5 Äquivalenten und eine nahezu stöchiometrische Markierung mit 6 und 8 Äquivalenten von Phosphinat **3**. Im Gegensatz dazu erreichte Verbindung **2** nach der gleichen Zeit für alle Äquivalente nur eine Markierung von etwa 50 % (Abbildung 4b).

Schließlich verglichen wir auch Ethinyl-Triazolyl-Phosphinate mit unseren früher berichteten Ethinyl-Phosphonamidaten (PA) in Bezug auf die Antikörpermarkierung.<sup>[35]</sup> Wir führten ein Zeitverlaufsexperiment durch, bei dem reduziertes Trastuzumab mit 10 Äquivalenten des entsprechenden P<sup>V</sup>-Elektrophils inkubiert wurde, und überwachten die Reaktion über 16 Stunden mit Hilfe von Intakt-Protein-MS. Wir beobachteten, dass sowohl die PA- als auch die ETP-Reagenzien nach der Reaktion über Nacht eine nahezu vollständige Umwandlung erreichten (FAR 7.5 bzw. 7.9); nach kürzeren Reaktionszeiten führte Phosphinat **3** jedoch zu einem höheren Grad der Funktionalisierung (Abbildung 4c).

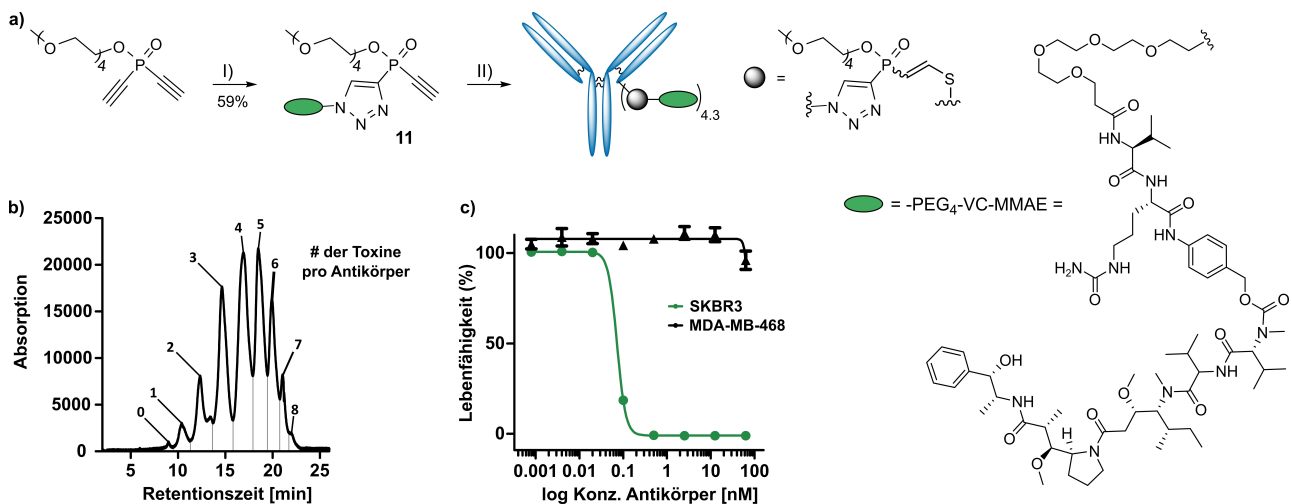
Neben der schnellen Reaktionskinetik und der Cystein-Selektivität ist auch die Serumstabilität der Verknüpfung eine Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, um gefährliche Off-Target-Effekte zu verhindern. Um dies zu testen, haben wir ein Antikörper-Fluorescein-Konjugat unter Verwendung von Phosphinat **4** (siehe Hintergrundinformationen 3.5) hergestellt und es 14 Tage lang bei 37 °C in menschlichem Serum inkubiert. Erfreulicherweise wurde kein signifikanter Transfer auf andere Serumproteine beobachtet. (Abbildung S8) Darüber hinaus haben wir die Serumstabilität von Thiol-Thiol-Konjugaten, die mit Diethinylphosphinaten gebildet wurden, mit einem Fluoreszenz-Quenching-Assay überprüft (siehe Hintergrundinformationen 3.6).<sup>[34,35]</sup> Das gequenchte FRET-Paar **F1** wurde aus Phosphinat **3** und DABCYL-Peptid **P2** (38 %, Abbildung S9a) synthetisiert. Die Inkubation von **F1** in einem physiologischen Puffer in Gegenwart von überschüssigen kleinen Thiolen und in menschlichem Serum zeigte keinen Anstieg des Fluoreszenzsignals, was auf eine ausgezeichnete Stabilität hinweist (Abbildung S9b).

Ermutigt durch die einfache Zugänglichkeit, hohe Reaktivität und Stabilität als Cystein-Konjugate haben wir ETP-Elektrophile zur Herstellung von ADCs verwendet.

Als Kargo wählten wir Monomethyl-Aristatin E (MMAE), ein starkes antimimetisches Medikament, das üblicherweise als zytotoxisches Molekül bei der Herstellung von ADCs verwendet wird und das wir zuvor bei der Herstellung von Phosphonamidat-verknüpften ADCs eingesetzt hatten.<sup>[50]</sup> Nach der HPLC-Reinigung erhielten wir das ETP-funktionalisierte Toxin (**11**) in einer Ausbeute von



**Abbildung 4.** Herstellung von Antikörper-Fluorophor-Konjugaten (AFC) unter Verwendung verschiedener P<sup>V</sup>-Elektrophile a) Reaktionsprinzip der simultanen Reduktions- und Alkylierungsreaktion unter Verwendung der Phosphinate **2** und **3** und des Phosphonamidats **S1**. b) Äquivalenz-Screen der beiden Phosphinate zeigt eine nahezu quantitative Markierung mit ETP **3**. c) Der Zeitverlauf der Antikörper-Markierungsreaktion unter Verwendung von 10 Äquivalenten des entsprechenden Elektrophils zeigt eine bessere Reaktionskinetik für **3** im Vergleich zum Phosphonamidat **S1**.

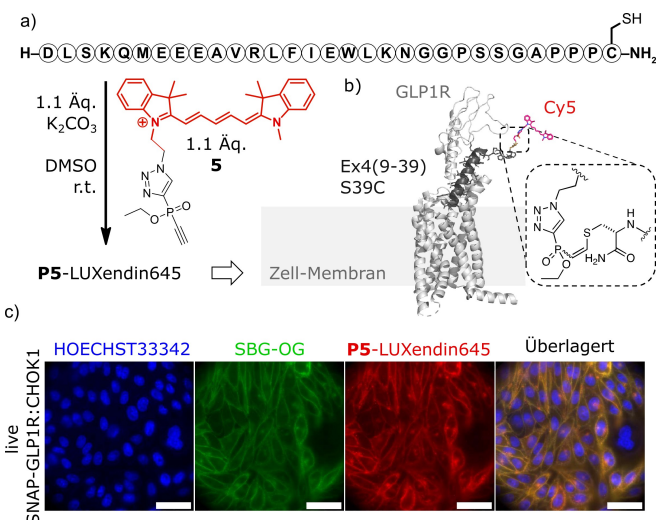


**Abbildung 5.** Synthese und biologische Evaluation des ETP-abgeleiteten ADCs: a) Synthese eines ETP-funktionalisierten Toxins für die Herstellung eines Trastuzumab-basierten ADCs. I) 0.2 Äquiv.  $N_3$ -PEG-VC-MMAE, 10 mol% CuBr, PBS/DMSO (2:8, v/v), 0.5 h r.t.; 59% Ausbeute. II) 0.2 Äquiv. Trastuzumab ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 8 Äquiv. TCEP (in Bezug auf Trastuzumab), Tris-Puffer (50 mM, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.3), 4 h r.t. b) Hydrophobe-Interaktion-Chromatographie des aufgereinigten ADC Trastuzumab-11. c) Konzentrationsabhängige zelluläre Zytotoxizität des generierten ADCs in Her2<sup>+</sup> (SKBR3, grün) und Her2<sup>-</sup> (MDA-MB-468, schwarz) Zelllinien.

59%. (Abbildung 5a) Mit dem elektrophil-modifizierten Toxin in der Hand begannen wir, seine Anwendbarkeit bei der Antikörpermarkierung zu untersuchen. Da die Experimente mit EDANS-ETP **3** zeigten, dass bereits nach 4 Stunden der größte Teil des Reagenzes reagiert hatte (Abbildung 4c), wurden die Reaktionen nach dieser Zeit abgebrochen und untersucht. Die Intakt-Protein-Massenspektrometrie ergab, dass bereits 5 Äquivalente des ETP-Wirkstoffs ausreichen, um nach der relativ kurzen Reaktionszeit ein durchschnittliches Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis (DAR) von 4 zu erreichen. Daher haben wir die Reaktion auf 1 mg Trastuzumab skaliert, um weitere biologische Tests durchführen zu können. Nach der Reinigung durch Größenausschluss-Chromatographie (SEC) wurde der funktionalisierte Antikörper in 80%iger Ausbeute (0.8 mg) erhalten. Die Analyse mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC) ergab, dass die meisten Antikörper-Moleküle mit 3–6 Wirkstoffmolekülen funktionalisiert sind, was zu einem durchschnittlichen DAR von 4.3 führt. (Abbildung 5b) Die zelluläre Zytotoxizität unseres gegen Her2 gerichteten ADC wurde anschließend mit den Her2<sup>-</sup> MDA MB-468 und den Her2<sup>+</sup> SKBR3 Zelllinien untersucht. Während die Proliferation der Antigen-exprimierenden Zelllinie durch Trastuzumab-**11** bereits ab einer Konzentration von 0.5 nM vollständig gehemmt werden konnte, wurden Antigen-negative Zellen erst bei sehr hohen Konzentrationen des ADCs (>100 nM, Abbildung 5c, S8) beeinflusst. Diese vielversprechenden Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von ETP-Reagenzien als modulare Bausteine für die Herstellung wirksamer Biopharmazeutika.

Als nächstes haben wir diese Moleküle zur Cysteinelektiven Peptidmodifikation eingesetzt. Als Modellpeptid wählten wir Exendin4(9–39) mit einer Ser→Cys Punktmutation an Position 39 (Ex4(9–39)<sub>S39C</sub>). Dieses Peptid ist ein potenter Antagonist des Glucagon-like Peptide-1-Rezeptors

(GLP1R),<sup>[51]</sup> einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Klasse B, der an der Glukosehomöostase und der Nahrungsaufnahme beteiligt ist und ein Blockbuster-Medikamentenziel für die Behandlung von Diabetes darstellt (Abbildung 6a und b).<sup>[52,53]</sup> Da es nur wenige validierte Antikörper für seinen Nachweis gibt,<sup>[54]</sup> haben wir vor kurzem Ex4(9-39)<sub>S39C</sub> mit verschiedenen Fluorophoren ausgestattet, um

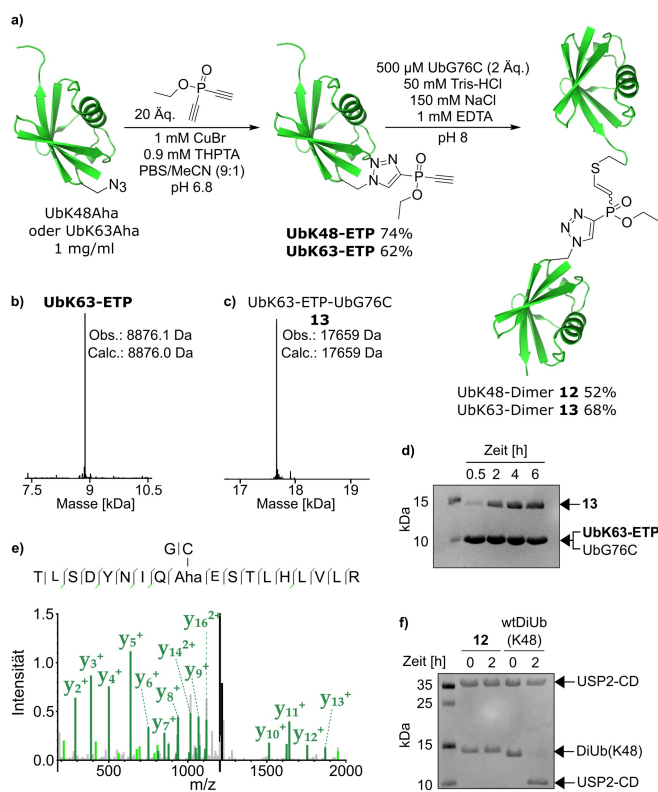


**Abbildung 6.** Synthese und Anwendung eines P5-verknüpften LUXendin645. a) Die Primärsequenz des LUXendin-Grundgerüsts Ex4(9–39)<sub>S39C</sub> wird mit dem Cy5-Elektrophil **5** versehen, um P5-LUXendin645 zu erhalten. b) Schematische Darstellung von P5-LUXendin645, das an GLP1R gebunden ist, mit Hervorhebung der Linker-Chemie. c) Mikroskopie von lebenden SNAP-GLP1R:CHO-K1-Zellen unter Verwendung von fernrotem P5-LUXendin645 in rot (Hoechst33342 in blau, SBG-OG für die Markierung der Zelloberfläche mit SNAP-Tags in grün). Maßstabsbalken = 40  $\mu\text{m}$ .

**LUXendine** zu erhalten, die GLP1R für verschiedenen bildgebende Verfahren spezifisch markieren.<sup>[51,55]</sup> Die Modifizierung dieses Peptids ist aufgrund der drei Prolinreste, die sich *N*-terminal zum C-terminalen Cystein befinden, eine besondere Herausforderung. Für seine Derivatisierung wählten wir das ETP-funktionalisierte Cy5-Fluorophor **5**. Nach einer 8-stündigen Reaktion bei Raumtemperatur wurde der vollständige Verbrauch des Ausgangsmaterials beobachtet und das gewünschte Peptid-Fluorophor-Konjugat, welches nun als **P5-LUXendin645** bezeichnet wird, wurde in 28 % Ausbeute nach RP-HPLC isoliert, wie in Abbildung 6a dargestellt. In der Tat markierte **P5-LUXendin645** spezifisch CHO-K1-Zellen, die SNAP-GLP1R<sup>[56]</sup> stabil exprimieren, wie die Epifluoreszenzmikroskopie zeigte, ohne Anzeichen einer schlechteren Färbung als sein Gegenstück LUXendin645 (Abbildung 6c). SNAP-Tag-Markierung weist die Spezifität von **P5-LUXendin645** für SNAP-GLP1R, unter Verwendung eines zellimpermeablen OregonGreen Substrats (SBG-OG) eindeutig nach<sup>[57]</sup>, während als Kontrolle untransfizierte Zellen nicht markiert wurden (Abbildung S10).

Zusätzlich zur Erzeugung von ETP-Elektrophilen auf der Basis von kleinen Molekülen und Peptiden waren wir neugierig, ob man diese Strategie auf die Funktionalisierung von Azid-haltigen Proteinen ausweiten und sie in Protein-Protein-Konjugationen einsetzen kann. Zur Überprüfung der Umsetzbarkeit haben wir Ubiquitin (Ub) als Modellprotein gewählt. Die Bindung von Ubiquitin an ein Zielprotein, die auch als Ubiquitinierung bezeichnet wird, ist eine reversible posttranslationale Modifikation, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich des Proteinabbaus und der DNA-Reparatur, reguliert.<sup>[58]</sup>

Frühere Studien haben gezeigt, dass chemisch synthetisierte Poly-Ubiquitine mit verschiedenen Konjugationsstellen ein wertvolles Instrument zur Untersuchung ihrer biologischen Funktion sind.<sup>[59]</sup> Wir haben bereits über den Einbau elektrophiler Vinylphosphonothiolate in Ubiquitin und die anschließende Anwendung in der künstlichen Protein-Ubiquitinylierung berichtet.<sup>[37]</sup> Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass wasserfreies DMSO mit TFA als Lösungsmittel verwendet werden muss und eine anschließende HPLC-Reinigung erforderlich ist. Im Gegensatz dazu kann, wie in dieser Arbeit zuvor gezeigt, der Einbau des ETP-Elektrophils in physiologischen Puffern mit nur einer geringen Menge an organischen Co-Lösungsmitteln erreicht werden. Durch die verbesserte Reaktivität des ETP-Elektrophils verglichen mit Phosphonothiolaten erhofften wir uns darüber hinaus eine bessere Effizienz bei der Protein-Protein-Konjugation. Um ein Azid-haltiges Protein zu erhalten, verwendeten wir einen von Schneider et al. entwickelten Ansatz, der es ermöglicht, Azidohomoalanin (Aha) in Ub einzuführen.<sup>[60]</sup> Nach diesem Verfahren exprimierten wir die beiden Ub-Mutanten UbK48Aha und UbK63Aha für die anschließende Modifikation mit Phosphinat **1** (Abbildung 7a und Hintergrundinformationen 3.9). Im Vergleich zu den Experimenten mit kleinen Molekülen haben wir unser CuAAC-Protokoll leicht angepasst (siehe Hintergrundinformationen 3.10). Nach 5 Stunden Reaktionszeit beobachteten wir die vollständige Umwandlung der Aha-Mutanten mittels



**Abbildung 7.** a) Synthetische Strategie zur Darstellung von elektrophilem Ubiquitin aus ortsspezifisch installierten K→Aha-Mutanten. b), c) Intakte Protein-MS Analyse des ETP-funktionalisierten **UbK63-ETP** (b) und des künstlichen Ub-Dimers **13** (c). d) Zeitverlauf der Konjugation von **UbK63-ETP** an UbG76C, beobachtet durch SDS-Page. e) MS/MS-Spektrum, das die Verbrückungsstelle von **13** identifiziert. f) SDS-PAGE-Analyse von Ub-Dimer **12**, inkubiert mit USP2-CD.

Intakt-Protein-MS. Überschüssiges Kupfer, Ligand und Phosphinat wurden durch Dialyse gegen PBS mit 5 mM EDTA für 16 h, gefolgt von Größenausschlusschromatographie (SEC) entfernt, um ETP-modifiziertes **UbK63-ETP** und **UbK48-ETP** in 74 % bzw. 62 % Ausbeute zu erhalten (Abbildung 7b). Als nächstes wollten wir diese Protein-Elektrophile in der Protein-Protein-Konjugation einsetzen. Daher unterzogen wir sowohl **UbK63-ETP** als auch **UbK48-ETP** der Biokonjugation mit einer UbG76C-Mutante. Die Reaktionen wurden in Tris-Puffer bei pH 8 durchgeführt und mittels Intakt-Protein-MS und SDS-PAGE überwacht (Abbildung 7c und d und S12). Das Ausgangsmaterial war nach 6 Stunden Reaktionszeit vollständig verbraucht, und die entsprechenden Ub-Dimere (**12** und **13**) wurden über SEC gereinigt und in 58 % und 47 % Ausbeute isoliert.

Um die Verknüpfung und die Cystein-Selektivität zu überprüfen, wurden die gereinigten Dimere mit Trypsin verdaut und mittels Bottom-up-Proteomik analysiert. Durch den Einsatz sowohl konventioneller als auch spezieller Vernetzungsproteomik-Software konnten die korrekten Verknüpfungsstellen ohne nachweisbare Nebenreaktivität verifiziert werden (Abbildung 7e und S13).<sup>[61,62]</sup> Darüber hinaus wurde die Proteaseresistenz der verknüpfungsspezifisch synthetisierten Ubiquitin-Dimere gegenüber deubiqu-

itinierenden Enzymen (DUBs) untersucht. Während das DUB USP2 in der Lage war, K48-verknüpftes Wildtyp-Diubiquitin vollständig zu spalten, wurde kein Abbau unseres synthetischen Analogons **12** beobachtet (Abbildung 7f).

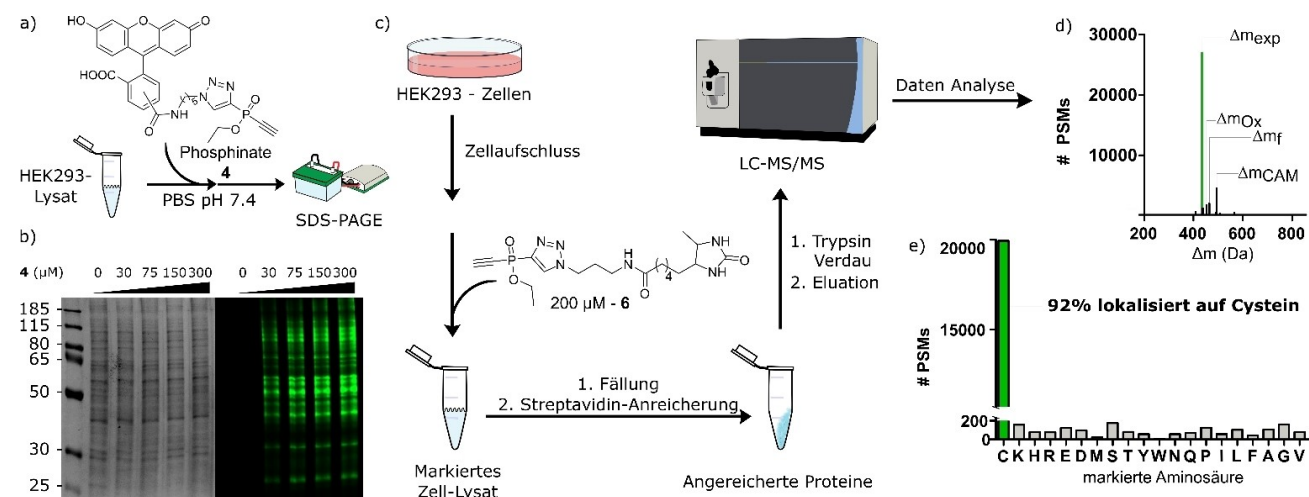
Nachdem wir die Nützlichkeit von ETP-Reagenzien für die selektive Cysteinmodifikation von Proteinen nachgewiesen hatten, wollten wir diese Verbindungsklasse bei der proteomweiten Cysteinmarkierung in Ganzzell-Lysaten untersuchen. Um dies zu testen, wurde HEK293-Zelllysat (1 mg mL<sup>-1</sup> in PBS pH 7.4) für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen von Phosphinat **4** behandelt, bevor es mittels SDS-PAGE und In-Gel-Fluoreszenz analysiert wurde (Abbildung 8a). Die Coomassie-Färbung wurde zur Kontrolle der gleichen Beladung verwendet. Wir beobachteten eine konzentrationsabhängige Markierung des Ly-sats und bereits bei der Verwendung von 30 μM **4** wurde ein dezentes Fluoreszenzsignal beobachtet (Abbildung 8b).

Um die Stellen der Markierung zu identifizieren, verwendeten wir Desthiobiotin-ETP **6** und adaptierten ein kürzlich von Zanon et al. entwickeltes Protokoll,<sup>[18]</sup> das eine unverzerrte Analyse der proteomweiten Elektrophilselektivität ermöglicht (Abbildung 8c). Kurz gesagt, HEK293-Lysat (1 mg mL<sup>-1</sup>, PBS pH 8.3) wurde 45 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 200 μM Phosphinat **6** behandelt. Anschließend wurden die Proteine mit eiskaltem Aceton ausgefällt und mit immobilisierten Streptavidin angereichert. Nach dem tryptischen Verdau und der Elution der markierten Peptide wurden die Proben mittels hochauflösender Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Um die Masse der Modifikation zu identifizieren, führten wir eine offene Suche in MS-Fragger mit zuvor optimierten Einstellungen durch.<sup>[18,63]</sup> Wir konnten erfeststellen, dass die auffälligste Modifikation in allen drei Replikaten der erwarteten Masse einer Alkylierung mit

Phosphinat **6** entspricht ( $\Delta m_{\text{exp}}$ , 27137 Peptid-Spektrum-Übereinstimmung (PSMs)). Darüber hinaus wurden auch die Modifikationsmasse plus Oxidation ( $\Delta m_{\text{Ox}}$ , 1747 PSMs), Formylierung ( $\Delta m_f$ , 2005 PSMs), und Carbamidomethylierung ( $\Delta m_{\text{CAM}}$ , 4546 PSMs) entdeckt (Abbildung 8d).

Nachdem wir die Masse der Modifikation identifiziert hatten, war unser nächster Schritt die Analyse der Aminosäureselektivität. Dazu haben wir eine Offset-Massensuche mit  $\Delta m_{\text{exp}}$  als Modifikationsmasse durchgeführt. Bei dieser Suche wird jede Aminosäure als potenzielle Modifikationsstelle betrachtet, was eine unvoreingenommene Untersuchung ermöglicht.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden so gefiltert, dass sie nur PSMs mit einer Falsch-Positiv-Rate (FDR) von weniger als 1 % auf Peptidebene enthielten, um eine gute Datenqualität zu gewährleisten. Außerdem wurden in unserer Analyse nur Spektren berücksichtigt, bei denen MS-Fragger eine einzige Modifikationsstelle zuordnen konnte. Von den 22102 Spektren, die den oben genannten Kriterien entsprachen, befanden sich 20429 (92 %) an einem Cysteinrest (Abbildung 8e). Die restlichen Spektren verteilten sich auf alle anderen 19 proteinogenen Aminosäuren, wobei keine von ihnen mehr als 150 identifizierte Spektren erreichte (< 0.7 %). Wenn wir uns die Ergebnisse genauer ansehen, stellen wir fest, dass von den 1673 Spektren, die nicht auf ein Cystein lokalisiert wurden, 817 einem Aminosäurerest zugeordnet sind, der an ein Cystein angrenzt. Eine eindeutige Lokalisierung ist oft schwierig, wenn MS/MS-Spektren nicht genügend Peptidfragmente enthalten. Um dieser Unsicherheit Rechnung zu tragen, haben wir einen Delta-Score > 1 (die Score-Differenz zwischen der besten und der zweitbesten Modifikationsstelle) verwendet. Von den verbleibenden Spektren (19595 PSMs) wurden 95 % an einem Cystein modifiziert (Abbildung S14). Diese Ergebnisse un-



**Abbildung 8.** Untersuchung der proteomweiten Cystein-Reaktivität von ETP-Elektrophilen. a) Arbeitsablauf für die Markierung von Ganzzell-Lysat mit dem fluoreszierenden Phosphinat **4** und die anschließende Analyse. b) SDS-PAGE-Analyse von Zell-Lysat, das mit zunehmender Elektrophil-Konzentration behandelt wurde. c) Illustration des Arbeitsablaufs für die unverzerrte Analyse der Elektrophil-Selektivität mittels MS-basierter Proteomik. d) Histogramm der Modifikationen, die bei der offenen Suche mit MS-Fragger in drei Replikaten entdeckt wurden.  $\Delta m$  von Phosphinat **6** ist grün hervorgehoben. ox = Oxidation (+15.99 Da), f = Formylierung (+27.99 Da), CAM = Carbamidomethylierung (+57.02 Da). e) Häufigkeit der identifizierten Modifikationsstellen bei Verwendung von  $\Delta m_{\text{exp}}$  als Offset-Masse. # Die Anzahl der PSMs entspricht der Summe von drei unabhängigen Replikaten.



terstreichen die hervorragende Cystein-Selektivität der ETP-Elektrophilen. Schließlich führten wir eine konventionelle Suche mit MS Amanda<sup>[61]</sup> durch, wobei wir die erhaltenen Parameter für Desthiobiotin-ETP (Modifikationsmasse: 438.2136; Modifikationsstelle: Cys) als variable Modifikation verwendeten. (Siehe Hintergrundinformationen 2.11.2 für Details) In drei unabhängigen Replikaten konnten insgesamt 8661 unterschiedliche markierte Cysteine aus 3978 Proteinen identifiziert werden. Interessanterweise stellten wir fest, dass selbst bei einer geringeren Zelllysatkonzentration und einer geringeren Gesamtproteinmenge (0.1 mg mL<sup>-1</sup>, 50 µg Gesamtmenge) immer noch 7023 unterschiedliche Cysteine als markiert identifiziert werden konnten (Abbildung S15).

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Ethinyl-Triazolyl-Phosphinate als modulare, hochgradig Cystein-selektive Elektrophile für die Protein- und Antikörper-Markierung vorgestellt. Die Entdeckung dieser Verbindungsklasse wurde durch DFT-Berechnungen ermöglicht, die im Vergleich zu Diethinyl- oder Thiovinylphosphinaten eine bessere Thiol-Additionskinetik vorhersagten. Wir haben gezeigt, dass verschiedene funktionelle komplexe Moleküle durch ein einfaches CuAAC-Protokoll leicht mit ETP-Elektrophilen ausgestattet werden können, was eine einzigartige Möglichkeit für den ortsspezifischen Einbau hochreaktiver Elektrophile in Proteine bietet. Das Potenzial dieser Chemie für die Herstellung funktioneller Biokonjugate wurde durch die Herstellung eines ADC mit zellspezifischer Toxizität und fluoreszierenden Peptiden, die speziell auf Zelloberflächenrezeptoren abzielen, weiter unterstrichen. Darüber hinaus wurde die Cystein-Selektivität im Proteom-Maßstab demonstriert, indem zugängliche Cystein-Reste im Zell-Lysat markiert und anschließend mittels Bottom-up-Proteomik analysiert wurden. Angesichts der leichten Zugänglichkeit, der schnellen Reaktionskinetik und der ausgezeichneten Stabilität als Biokonjugate gehen wir davon aus, dass die ETP-Reagenzien eine breite Anwendung als elektrophile chemische Sonden und bei der Herstellung von hochwertigen Proteinkonjugaten finden und die Entwicklung von Biopharmazeutika der nächsten Generation ermöglichen werden.

Die Massenspektrometrie Rohdaten wurden beim ProteomeXchange Consortium über das PRIDE Partner Repository<sup>[64]</sup> mit dem Dataset Identifier PXD033004 hinterlegt.<sup>[65]</sup>

## Danksagung

Wir danken I. Kretschmer und R. Volkmer für die Peptidsynthese, R. Birke für mikroskopische Unterstützung, K. K.-Hassanin für die Expression von Ub-Aha-Mutanten, B. Kindt für technische Unterstützung und M. Holly-Nadler für Unterstützung bei LC-MS/MS-Messungen. Wir danken Dr. B. Jones (Imperial London) für die Bereitstellung der stabilen SNAP-GLP1R:CHO-K1 Zelllinie und Dr. M.-A.

Kasper (Tubulis) für Cy5-N<sub>3</sub>. Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, SPP1623 HA 4468/10-1 und RTG2473 “Bioactive Peptides” Projektnummer 392923329), der Leibniz-Gemeinschaft (SAW-2018-FMP-4-P5Label, T18/2017) und der Einstein Stiftung Berlin (Leibniz-Humboldt-Professur) unterstützt. Die Berechnungsstudien wurden vom Institute for Basic Science in Korea (IBS-R10-A1) unterstützt. C.E.S. wird durch ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes und M.A.R.deG. durch ein PostDoc-Stipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung unterstützt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

## Interessenkonflikte

Die in diesem Manuskript beschriebene Chemie ist Teil einer Patentanmeldung (Appl. Number: EP21170097.6) von C.E.S., P.O. und C.P.R.H. J.B. hat eine Lizenzierungsvereinbarung mit Celtarys Research zum LUXendin Vertrieb.

## Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die massenspektrometrischen Proteomikdaten wurden beim ProteomeXchange-Konsortium über das PRIDE-Partner-Repository mit der Datensatzkennung PXD033004 hinterlegt (C. E. Stieger, C. P. R. Hackenberger, 2022, Ethinyl-1,2,3-triazolyl-phosphinate based electrophiles for cysteine labelling, PRIDE, PXD033004).

**Stichwörter:** Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) · Biokonjugation · Cysteine Profiling · Protein-Basierte Elektrophile · Protein-Protein Konjugation

- [1] A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet, N. Corvaia, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 315–337.
- [2] E. A. Hoyt, P. M. S. D. Cal, B. L. Oliveira, G. J. L. Bernardes, *Nat. Chem. Rev.* **2019**, *3*, 147–171.
- [3] J. L. Seitchik, J. C. Peeler, M. T. Taylor, M. L. Blackman, T. W. Rhoads, R. B. Cooley, C. Refakis, J. M. Fox, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898–2901.
- [4] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298–304.
- [5] R. D. Row, H. W. Shih, A. T. Alexander, R. A. Mehl, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7370–7375.
- [6] P. Ochtrop, C. P. R. Hackenberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *58*, 28–36.
- [7] N. C. Reddy, M. Kumar, R. Molla, V. Rai, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 4669–4691.
- [8] S. Sakamoto, I. Hamachi, *Anal. Sci.* **2019**, *35*, 5–27.
- [9] A. Moura, M. A. Savageau, R. Alves, *PLoS One* **2013**, *8*, e77319.
- [10] B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwkowski,

- R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189.
- [11] C. Wei, G. Zhang, T. Clark, F. Barletta, L. N. Tumeay, B. Rago, S. Hansel, X. Han, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4979–4986.
- [12] R. Huang, Z. Li, Y. Sheng, J. Yu, Y. Wu, Y. Zhan, H. Chen, B. Jiang, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6526–6529.
- [13] B. Bernardim, P. M. S. D. Cal, M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Saéz, I. S. Albuquerque, E. Perkins, F. Corzana, A. C. B. Burtoloso, G. Jiménez-Osés, G. J. L. Bernardes, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13128.
- [14] R. Tessier, J. Ceballos, N. Guidotti, R. Simonet-Davin, B. Fierz, J. Waser, *Chem* **2019**, *5*, 2243–2263.
- [15] S. A. Byrne, M. J. Bedding, L. Corcilius, D. J. Ford, Y. Zhong, C. Franck, M. Larance, J. P. Mackay, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 14159–14166.
- [16] E. V. Vinogradova, C. Zhang, A. M. Spokoyny, B. L. Pentelute, S. L. Buchwald, *Nature* **2015**, *526*, 687–691.
- [17] M. S. Messina, J. M. Stauber, M. A. Waddington, A. L. Rheingold, H. D. Maynard, A. M. Spokoyny, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7065–7069.
- [18] P. R. A. Zanon, F. Yu, P. Z. Musacchio, L. Lewald, M. Zollo, K. Krauskopf, D. Mrdović, P. Raunft, T. E. Maher, M. Cigler, C. J. Chang, K. Lang, F. D. Toste, A. I. Nesvizhskii, S. M. Hacker, *ChemRxiv* **2021**, <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14186561>.
- [19] T.-A. Nguyen, M. Cigler, K. Lang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14350–14361; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 14548–14559.
- [20] J. L. Furman, M. Kang, S. Choi, Y. Cao, E. D. Wold, S. B. Sun, V. V. Smider, P. G. Schultz, C. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8411–8417.
- [21] V. Laserna, A. Istrate, K. Kafuta, T. A. Hakala, T. P. J. Knowles, M. Alcarazo, G. J. L. Bernardes, *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 1570–1575.
- [22] M. Kasper, L. Lassak, A. M. Vogl, I. Mai, J. Helma, D. Schumacher, C. P. R. Hackenberger, *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202101389.
- [23] L. Xu, S. L. Kuan, T. Weil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13757–13777; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 13874–13894.
- [24] M. J. Lobba, C. Fellmann, A. M. Marmelstein, J. C. Maza, E. N. Kissman, S. A. Robinson, B. T. Staahl, C. Urnes, R. J. Lew, C. S. Mogilevsky, J. A. Doudna, M. B. Francis, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1564–1571.
- [25] K. Nakane, S. Sato, T. Niwa, M. Tsushima, S. Tomoshige, H. Taguchi, M. Ishikawa, H. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 7726–7731.
- [26] L. Q. Wan, X. Zhang, Y. Zou, R. Shi, J. G. Cao, S. Y. Xu, L. F. Deng, L. Zhou, Y. Gong, X. Shu, G. Y. Lee, H. Ren, L. Dai, S. Qi, K. N. Houk, D. Niu, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11919–11926.
- [27] A. M. White, I. R. Palombi, L. R. Malins, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 2809–2823.
- [28] A. J. Maurais, E. Weerapana, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 29–36.
- [29] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*, 790–797.
- [30] K. M. Backus, B. E. Correia, K. M. Lum, S. Forli, B. D. Horning, G. E. González-Páez, S. Chatterjee, B. R. Lanning, J. R. Teijaro, A. J. Olson, D. W. Wolan, B. F. Cravatt, *Nature* **2016**, *534*, 570–574.
- [31] P. R. A. Zanon, L. Lewald, S. M. Hacker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2829–2836; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 2851–2858.
- [32] D. Abegg, R. Frei, L. Cerato, D. Prasad Hari, C. Wang, J. Waser, A. Adibekian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10852–10857; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 11002–11007.
- [33] M. Kuljanin, D. C. Mitchell, D. K. Schweppe, A. S. Gikandi, D. P. Nusinow, N. J. Bulloch, E. V. Vinogradova, D. L. Wilson, E. T. Kool, J. D. Mancias, B. F. Cravatt, S. P. Gygi, *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 630–641.
- [34] C. E. Stieger, L. Franz, F. Körlin, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 15359–15364; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 15487–15492.
- [35] M. Kasper, M. Glanz, A. Stengl, M. Penkert, S. Klenk, T. Sauer, D. Schumacher, J. Helma, E. Krause, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 11625–11630; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 11751–11756.
- [36] M. A. Kasper, M. Glanz, A. Oder, P. Schmieder, J. P. Von Kries, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 6322–6329.
- [37] A. L. Baumann, S. Schwagerus, K. Broi, K. Kemnitz-Hassanin, C. E. Stieger, N. Trieloff, P. Schmieder, C. P. R. Hackenberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 9544–9552.
- [38] Y. Park, A. L. Baumann, H. Moon, S. Byrne, M. A. Kasper, S. Hwang, H. Sun, M. H. Baik, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 8141–8148.
- [39] S. L. Dixon, P. C. Jurs, *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1460–1467.
- [40] C. A. Hollingsworth, P. G. Seybold, C. M. Hadad, *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *90*, 1396–1403.
- [41] K. C. Gross, P. G. Seybold, C. M. Hadad, *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *90*, 445–458.
- [42] C. Wang, Y. Fu, Q.-X. Guo, L. Liu, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2586–2598.
- [43] S. Liu, C. Rong, T. Lu, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 3698–3704.
- [44] A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735–746.
- [45] K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 361–369.
- [46] L.-G. Zhuo, W. Liao, Z.-X. Yu, *Asian J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 336–345.
- [47] Z. Demircioğlu, Ç. A. Kaştaş, O. Büyükgüngör, *J. Mol. Struct.* **2015**, *1091*, 183–195.
- [48] J. Fleming, *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, Wiley, London, **1976**.
- [49] K. Fukui, *Science* **1982**, *218*, 747–754.
- [50] M. Kasper, A. Stengl, P. Ochtrop, M. Gerlach, T. Stoschek, D. Schumacher, J. Helma, M. Penkert, E. Krause, H. Leonhardt, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 11631–11636; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 11757–11762.
- [51] J. Ast, A. Arvaniti, N. H. F. Fine, D. Nasteska, F. B. Ashford, Z. Stamataki, Z. Koszegi, A. Bacon, B. J. Jones, M. A. Lucey, S. Sasaki, D. I. Brierley, B. Hastoy, A. Tomas, G. D’Agostino, F. Reimann, F. C. Lynn, C. A. Reissaus, A. K. Linnemann, E. D’Este, D. Calebiro, S. Trapp, K. Johnsson, T. Podewin, J. Broichhagen, D. J. Hodson, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 467.
- [52] L. L. Baggio, D. J. Drucker, *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2131–2157.
- [53] J. E. Campbell, D. J. Drucker, *Cell Metab.* **2013**, *17*, 819–837.
- [54] J. Ast, J. Broichhagen, D. J. Hodson, *EBioMedicine* **2021**, *74*, 103739.
- [55] J. Ast, A. N. Novak, T. Podewin, N. H. F. Fine, B. Jones, A. Tomas, R. Birke, K. Roßmann, B. Mathes, J. Eichhorst, M. Lehmann, A. K. Linnemann, D. J. Hodson, J. Broichhagen, *JACS Au* **2022**, *2*, 1007–1017.
- [56] B. J. Jones, R. Scopelliti, A. Tomas, S. R. Bloom, D. J. Hodson, J. Broichhagen, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 501–505.
- [57] P. Poc, V. A. Gutzeit, J. Ast, J. Lee, B. J. Jones, E. D’Este, B. Mathes, M. Lehmann, D. J. Hodson, J. Levitz, J. Broichhagen, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 7871–7883.
- [58] K. N. Swatek, D. Komander, *Cell Res.* **2016**, *26*, 399–422.
- [59] X. Sui, Y. Wang, Y. X. Du, L. J. Liang, Q. Zheng, Y. M. Li, L. Liu, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 12633–12646.
- [60] T. Schneider, D. Schneider, D. Rösner, S. Malhotra, F. Mortensen, T. U. Mayer, M. Scheffner, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12925–12929; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13139–13143.

- [61] V. Dorfer, P. Pichler, T. Stranzl, J. Stadlmann, T. Taus, S. Winkler, K. Mechtler, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3679–3684.
- [62] M. Götze, J. Pettelkau, S. Schaks, K. Bosse, C. H. Ihling, F. Krauth, R. Fritzsche, U. Kühn, A. Sinz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 76–87.
- [63] F. Yu, G. C. Teo, A. T. Kong, S. E. Haynes, D. M. Avtonomov, D. J. Geiszler, A. I. Nesvizhskii, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4065.
- [64] Y. Perez-Riverol, J. Bai, C. Bandla, D. García-Seisdedos, S. Hewapathirana, S. Kamatchinathan, D. J. Kundu, A. Prakash, A. Frericks-Zipper, M. Eisenacher, M. Walzer, S. Wang, A. Brazma, J. A. Vizcaíno, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D543–D552.
- [65] C. E. Stieger, C. P. R. Hackenberger, **2022**, Ethynyl-1,2,3-triazolyl-phosphinate based electrophiles for cysteine labelling, PRIDE, PXD033004.

Manuskript erhalten: 12. April 2022

Akzeptierte Fassung online: 6. Juli 2022

Endgültige Fassung online: 22. August 2022