





Abb. 2: An der gentechnisch hergestellten IgM-Glycerase befinden sich Zuckerketten, die mit Galactose oder Sialinsäureresten enden. Durch Inkubation mit entsprechenden Enzymen werden die Zuckerketten so modifiziert, dass nun Mannosereste die Zuckerketten beenden. Die derart veränderte IgM-Glycerase gelangt nun recht effizient in die Makrophagen.

Denn nicht nur ein chemisch definiertes Molekül charakterisiert einen rekombinanten Wirkstoff, sondern ein Molekül, das in einem ganz bestimmten Produktions- und Reinigungsprozess hergestellt wurde. Damit wird es wohl Generika im klassischen Sinn bei rekombinanten Produkten nicht geben. Dies ist auch eine Konsequenz aus dem Tryptophan-Zwischenfall, bei dem es durch Umstellung des Produktionsprozesses zur Herstellung eines eher trivialen Moleküls zu fatalen unerwünschten Arzneimittelwirkungen kam, die nicht vorhersehbar waren.

### Zugelassene Medikamente

Die heute zugelassenen rekombinanten Wirkstoffe kann man in folgende Molekülarten unterteilen:

- Wachstumsfaktoren
- Antikörper
- Hormone
- Enzyme

- Inhibitoren/Rezeptorantagonisten
- Gerinnungsfaktoren
- Zytokine

Bei folgenden Indikationen bzw. Behandlungsanlässen werden heute rekombinante Wirkstoffe eingesetzt:

- Antithrombotika ● Asthma ● Atemwegsinfektionen ● Antigene ● Blutarmut ● Blutkrankheit ● Diabetes ● Fertilitätsstörung ● Hepatitis B/C ● Knochenbrüche ● Krebs ● Makuladegeneration (AMD) ● Mucoviscidose ● Multiple Sklerose ● Osteoporose ● Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie ● Rheuma ● Schleimhautentzündungen ● Schuppenflechte ● Sepsis ● Stoffwechselstörungen ● Transplantation ● Wachstumsstörung/Akromegalie ● Wachstumsstörung/Kleinwuchs ● Wundheilung

In Europa sind derzeit mehr als 130 gentechnisch hergestellte Arzneimittel zugelassen (Tab. 1).

### Molekülgruppen

Anders als weitläufig angenommen, entsprechen nur einige wenige dieser Wirkstoffe ihren natürlichen Vorbildern. Zum Teil sind diese Unterschiede als »machbare Kompromisse« einzustufen, da zur Zeit ihrer Markteinführung authentische Produkte technisch nicht oder noch nicht herzustellen waren. Zum Teil sind aber die Abweichungen von dem natürlichen Vorbild auch gewollt, da durch die Modifikation die Arzneistoffe ein besseres pharmakodynamisches und/oder pharmakokinetisches Profil im Vergleich zu den authentischen Vorbildern erhalten.

Streng genommen lassen sich heute nur unmodifizierte Proteine authentisch herstellen. Handelt es sich dagegen um Glykoproteine, die an bestimmten Aminosäurepositionen durch Oligosaccharidstrukturen modifiziert sind, so weichen die gentechnisch hergestellten Moleküle mehr oder weniger von den authentischen Biomolekülen ab. Bekanntlich ist die Information für eine Modifikation mit Zuckerseitenketten nicht in der Gensequenz gespeichert, sondern resultiert aus der Proteinsequenz und der komplexen biochemischen Ausstattung der Zelle, in der das Protein synthetisiert wird. So ist verständlich, dass zwei Proteine, die zwar von dem gleichen Gen kodiert, aber in unterschiedlichen Zellen synthetisiert werden, unterschiedlich modifiziert sein können.

■ Per definitionem modifiziert die Zelle, in der das Protein natürlicherweise synthetisiert wird, das Protein korrekt.

■ Demgegenüber können bakterielle Zellen, wie beispielsweise das sehr häufig zur Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzte Bakterium *Escherichia coli*, Proteine gar nicht glykosylieren. Unter

diesem Aspekt zeigt ein Blick auf die Liste der zugelassenen rekombinanten Arzneimittel, wie viele dieser Wirkstoffe nicht mit ihrem authentischen Gegenstück identisch sein können.

■ Die ebenfalls gerne als Produktionsstamm verwendete Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kann zwar Proteine glykosylieren. Allerdings weicht das Glykosylierungsmuster deutlich von jenem ab, das an entsprechende Proteine angehängt wird, wenn die Proteine in Säugerzellen synthetisiert werden.

■ Die größte Übereinstimmung mit dem authentischen Glykosylierungsmuster erhält man heute, wenn man die Proteine in einer von drei gut etablierten Zelllinien herstellt – der Baby-Hamster-Kidney-Zelle (BHK-Zellen), der Ovarialzelle des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) oder auch einer menschlichen Fibroblasten-Zelllinie. Das ist auch der Grund dafür, dass für die Herstellung der beiden Wirkstoffe, die ohne eine weitestgehend korrekte Glykosylierung inaktiv wären (Gerinnungsfaktor VIII und Erythropoietin), ausschließlich eine dieser Zelllinien als Produktionszellen verwendet werden.

Allerdings muss man anmerken, dass selbst die authentischen Zellen ein Protein nicht einheitlich modifizieren.

Es ist für viele rekombinante Wirkstoffe charakteristisch, dass sie nicht aus einer einzelnen Molekülspezies bestehen, sondern sich aus einer Gruppe ähnlicher Moleküle zusammensetzen. Für die Analytik – und damit auch für die Überwachung und die Arzneimittelsicherheit – war diese Tatsache eine sehr große Herausforderung.

Beispielsweise besitzt der **Gewebe-Plasminogenaktivator (tPA)** drei Aminosäurepositionen, die durch Oligosaccharide modifiziert werden können. Zwei dieser Positionen sind natürlicherweise immer, eine ist fakultativ modifiziert. Hinzu kommt, dass in dem Protein eine labile Stelle vorhanden ist, an der das Protein zum so genannten »Zweiketten-tPA« aufbrechen kann. Aus diesen Gründen besteht authentisches tPA aus mindestens vier verschiedenen Molekülen (Einketten-tPA mit zwei oder drei glykosylierten Positionen und Zweiketten-tPA mit den analogen Variationen). Für das rekombinante Produkt (Actilyse®) gilt das gleichermaßen, obwohl dieses Protein in CHO-Zellen und nicht in humanen Endothelzellen, dem Hauptbildungsort dieses Proteins, synthetisiert wird.

Noch komplizierter ist die Situation im Falle des **Gerinnungsfaktors VIII**. Die gentechnische Herstellung dieses Proteins war eine Meisterleistung, die gleich zweimal

nahezu zeitgleich geglückt ist. Das Protein ist mit über 2.330 Aminosäuren 40mal größer als Insulin. Es besitzt 25 mögliche Glykosylierungsstellen. Bei der Biosynthese des Gerinnungsfaktor-VIII-Moleküls entsteht zunächst ein einzelnes, sehr langes Protein. Dieses wird auf seinem Weg zur Cytoplasmamembran vielfach glykosyliert. Beim Austritt aus der Zelle wird das Protein dann jedoch mehrfach zerschnitten. Der vordere Teil variiert in seinem Molekulargewicht zwischen 200.000 bis 90.000. Der hintere Teil besitzt ein Molekulargewicht von ca. 80.000. Die verschiedenen großen vorderen Fragmente werden mit dem konstanten hinteren Fragment über Ca<sup>2+</sup>-Ionen zusammengehalten. Somit ist auch der Gerinnungsfaktor VIII – als natürliches Protein wie als rekombinantes Protein – ein komplexes Molekülgemisch. Erstaunlicherweise sind sowohl BHK-Zellen als auch CHO-Zellen in der Lage, die erforderlichen Modifikationen (Glykosylierung und spezifisches Zerschneiden des Primärproduktes) durchzuführen.

Strukturell wesentlich einheitlicher sind hingegen die Wirkstoffe, die in *E. coli* hergestellt werden. Zum Teil hat man sogar die Aminosäuresequenz durch Korrektur auf der Genebene verändert, um einheitlichere und besser isolierbare Produkte zu erhalten. Dies ist z. B. der Fall beim **Proleukin®** (Aldesleukin, IL-2) und beim **Betaferon** (Interferon beta-1b), bei denen man jeweils einmal die Aminosäure **Betrachtet man Präklinik, Phase I und Phase II, so macht der Anteil der rekombinanten Wirkstoffe mehr als 25 % aus.**

re Cystein gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht hat. Dadurch wird verhindert, dass sich in der *E. coli*-Zelle falsche Disulfidbrücken bilden, was eine Inaktivierung des Wirkstoffs zur Folge hätte. Ein hohes Maß von Authentizität sollte man bei denjenigen Wirkstoffen fordern, die über einen langen Zeitraum im Rahmen einer Substitutionstherapie einge-

setzt werden. Dies gilt beispielsweise für **Somatropin** und für den **Gerinnungsfaktor VIII**. Für die genannten Wirkstoffe ist diese Forderung bei allen zugelassenen Präparaten auch tatsächlich weitestgehend erfüllt. Hier gibt es allerdings auch Ausnahmen Muteine. Die modifizierten Insuline, die ein deutlich verbessertes pharmakokinetisches Profil gegenüber dem authentischen Molekül besitzen, werden trotz der gezielt eingesetzten Protein-Modifikationen nach heutigem Wissen sehr gut vertragen. Im Falle der Insulin-Variante lispro beispielsweise wurden am Ende der B-Kette zwei Aminosäuren (die Aminosäuren Pro28 und Lys29) vertauscht (Abb. 1). Dadurch wird verhindert, dass sich Insulin-Hexamere bilden, aus denen die wirksamen Monomere erst verzögert freigesetzt werden. Somit handelt es sich bei lispro (Humalog®) um ein sehr schnell wirkendes Insulinderivat, das bei einem bestimmten Patientenkollektiv sicherlich vorteilhaft eingesetzt werden kann.

Wirkstoff	Produktionszelle	Anwendung
<b>Wachstumsfaktoren</b>		
Epoetin alfa	CHO	Blutarmut
Epoetin beta	CHO	
Epoetin delta	Hum. Fibrosarcoma Zelle	
Darbepoetin alfa	CHO-K1	
Becaplermin	<i>S. cerevisiae</i>	
Diboterminalfa	CHO	Knochenwachstum
Eptoterminalfa	CHO	
Palifermin	<i>E. coli</i>	Schleimhautläsionen
Filgrastim	<i>E. coli</i>	Tumorthherapie/ Wachstumsfaktoren für Granulozyten
Lenograstim	CHO	
Pegfilgrastim	<i>E. coli</i>	
<b>Antikörper</b>		
Omalizumab	CHO	Allergie
Efalizumab	CHO	Psoriasis
Alefacept	CHO	
Infliximab	SP0/2	Rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa
Adalimumab	CHO	
Etanercept	CHO	
Abciximab	Murin-humane Hybridomazelle	
Palivizumab	Myelomzelle NSO	Passive Immunisierung gegen RSV
Natalizumab	Murine Zelllinie	Multiple Sklerose
Basiliximab	Myelomzelle	Transplantat-Abstoßungsprophylaxe
Daclizumab	NSO-Myelomzelle	
Alemtuzumab	CHO	Tumorthherapie
Bevacizumab	CHO	
Cetuximab	Säugerzelle SP2/0	
Ibritumomab Tiuxetan	CHO	
Rituximab	CHO	
Trastuzumab	CHO	

Hormone			
Insulin human	<i>E. coli</i>	Diabetes	
Insulin human	<i>S. cerevisiae</i>		
Inhalatives Insulin human	<i>E. coli</i>		
Insulin lispro	<i>E. coli</i>		
Insulin aspart	<i>S. cerevisiae</i>		
Insulin glulisin	<i>E. coli</i>		
Insulin glargin	<i>E. coli</i>		
Insulin detemir	<i>S. cerevisiae</i>		
Glucagon	<i>S. cerevisiae</i>		Hypoglykämie
Follitropin alfa	CHO		In vitro-Fertilisation
Follitropin-beta	CHO-K1		
Lutropin alfa	CHO		
Choriogonadotropin alfa	CHO		
Nebenschilddrüsen-Hormon	<i>E. coli</i>	Osteoporose-Prophylaxe	
Teriparatide	<i>E. coli</i>		
Lachscalcitonin	<i>E. coli</i>	Knochenschwund	
Thyrotropin alfa	CHO		
Somatropin	<i>E. coli</i>	Wachstumsstörung/Kleinwuchs	
Somatropin	<i>S. cerevisiae</i>		
<b>Enzyme</b>			
Alteplase (tPA)	CHO	Thrombose, Schlaganfall	
Retepase	<i>E. coli</i>		
Tenecteplase	CHO		
Antithrombin III	Ziege	ATIII-Mangel	
Dornase alfa	CHO	Mukoviszidose	
Imiglucerase	CHO	Lysosomale Speicherkrankheiten	
Agalsidase alfa	Hum. Fibrosarcoma Zelle		
Agalsidase beta	CHO		
Laronidase	CHO		
Idursulfatase	Hum. Fibrosarcoma Zelle		
Galsulfase	CHO		
Alglucosidase alfa	CHO		
Rasburicase	<i>S. cerevisiae</i>		Tumorthherapie



Ein weiteres Mutein (ein bewusst modifiziertes humanes Protein) ist die als Wirkstoff in dem Präparat **Cerezyme**<sup>®</sup> enthaltene Imiglucerase, eine Variante der  $\beta$ -Glucocerebrosidase. Hierbei handelt es sich um das einzige Produkt unter den rekombinanten Wirkstoffen, das sein Ziel intrazellulär findet. Das bedeutet, der Wirkstoff muss so beschaffen sein, dass er nicht nur die richtige Zelle findet, sondern auch in diese Zelle aufgenommen werden kann. Die Zielzelle für die  $\beta$ -Glucocerebrosidase ist der Makrophage, der bei Patienten, die an der Gaucher-Krankheit leiden, große Mengen an Glucocerebrosiden akkumuliert, da das ab-

bauende Enzym defekt ist. Als man diesen Patienten  $\beta$ -Glucocerebrosidase applizierte, stellte man fest, dass das Enzym vorwiegend in die Leberzellen, nicht jedoch in die phagozytierenden Zellen aufgenommen wurde, so dass kaum eine Besserung der klinischen Symptomatik erreicht werden konnte. Die Kenntnis, dass Makrophagen Mannose-Rezeptoren auf der Oberfläche besitzen, führte zu dem Konzept, die Zuckermodifikationen des Glykoproteins  $\beta$ -Glucocerebrosidase durch drei zuckerabbauende Enzyme derart zu modifizieren, dass die terminalen Zuckerbausteine der modifizierten Glykoproteine jetzt Mannosen waren (Abb. 2).

In der Tat konnte dadurch der Durchbruch erzielt werden, denn nun wurde das Protein effektiv von Makrophagen aufgenommen. Imiglucerase repräsentiert also einen Wirkstoff, der zunächst nahezu naturidentisch in CHO-Zellen produziert wird. Dann wird dieser Wirkstoff aber biochemisch durch Glucosidasen »verfremdet«, und erst in dieser Form wirkt er als Substitutionstherapeutikum.

### Biologische Sicherheit

Rekombinante Antikörper sind die Shooting-Stars der rekombinanten Wirkstoffe. Sie sind Ziel umfangreicher Modifikation, da sie

fast ausnahmslos initial aus Mäusen isoliert werden. Um sie sicher therapeutisch einsetzen zu können, werden gentechnisch »humanisiert«. Das bedeutet, dass man möglichst große Bereiche dieser Maus-Antikörper an die Struktur humaner Antikörper anpasst. Nur die Bereiche, die für die Antigenerkennung und damit für die Spezifität verantwortlich sind, werden so belassen, wie die Antikörper ursprünglich isoliert wurden. Dadurch wird die Verträglichkeit deutlich erhöht, ohne Spezifität einzubüßen.

Man kann resümieren, dass alle rekombinanten Wirkstoffe durch einen extrem hohen Sicherheitsstandard imponieren. Dies gilt nicht nur für die biologische Sicherheit der rekombinanten Wirkstoffe im Vergleich zu Konzentraten aus humanen Quellen. Katastrophen wie die Kontamination von Gerinnungsfaktor-VIII-Präparaten mit HIV, HBV oder HCV bzw. von Somatropin-Präparaten mit Erregern der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sind bei rekombinanten Präparaten ausgeschlossen. Dies gilt auch für Kontaminationen und Verunreinigungen aus den Produktionszellen oder aus dem Medium. Derartige Verunreinigungen und Kontaminationen sind bestenfalls in Spuren vorhanden, die sich in der Regel nur theoretisch errechnen, nicht aber konkret nachweisen lassen. Dies ist die wichtigste Konsequenz der oben bereits erwähnten produkt-spezifischen Herstellungsprozesse, wie sie die Arzneibücher und damit auch die Aufsichtsbehörden heute zu Recht fordern.

Anschrift der Autoren:

Dr. Ilse Zündorf und  
Univ.-Prof. Dr. Theodor Dinger  
Kontakt: Institut für Pharmazeutische Biologie,  
Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Biozentrum, Max-von-Laue 9,  
60438 Frankfurt am Main,  
Tel. 069-79829650, Fax 069-79829662,  
Dinger@em.uni-frankfurt.de

Inhibitoren/ Rezeptorantagonisten		
Desirudin	<i>S. cerevisiae</i>	Thrombose- Prophylaxe
Lepirudin	<i>S. cerevisiae</i>	
Anakinra	<i>E. coli</i>	Rheumatoide Arthritis
Pegvisomant	<i>E. coli</i>	Wachstumsstörung/ Akromegalie
Gerinnungsfaktoren		
Eptacog alfa	BHK	Gerinnungs- störungen
Faktor VIII	BHK	
Faktor VIII	CHO	
Morocotocog alfa	CHO	
Octocog alfa	CHO	
Nonacog alpha	CHO	
Zytokine		
Interferon alfa-2a	<i>E. coli</i>	Tumorthherapie/Virale Infektionen
Interferon alfa-2b	<i>E. coli</i>	
Peginterferon alfa-2a	<i>E. coli</i>	Hepatitis B/C- Infektionen
Peginterferon alfa-2b	<i>E. coli</i>	
Interferon beta-1a	CHO	Multiple Sklerose
Interferon beta-1b	<i>E. coli</i>	
Interferon gamma	<i>E. coli</i>	
Aldesleukin	<i>E. coli</i>	Tumorthherapie
Tasonermin	<i>E. coli</i>	
Drotrecogin alfa	HEK293	Sepsis

Tabelle 1