

# Pharmazeutische Biologie

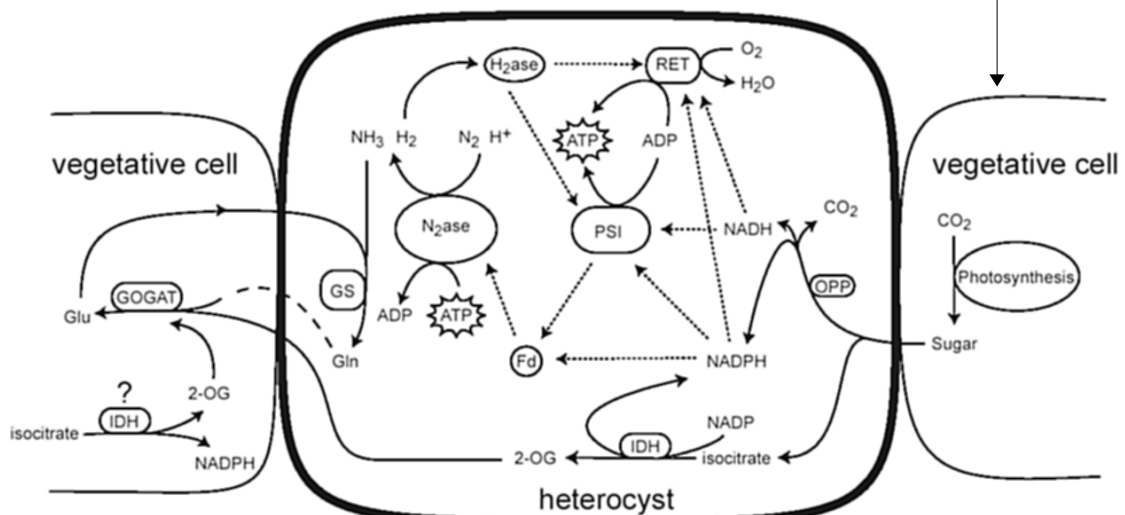
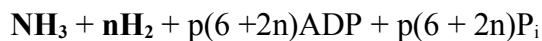
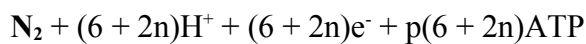
## Biotechnologie

### Vorteile der Biotechnologie

- Biotechnologische Herstellungsverfahren gleichen zunächst den „Eintopfreaktionen“ im Rahmen chemischer Synthesen. Aufgrund der hohen Spezifität der angewandten Verfahren erhält man jedoch kaum bis gar keine Nebenprodukte; ein Aspekt der bei chemischen Synthesen selten realisiert werden kann.
- Auch unter Umweltgesichtspunkten haben biotechnologische Verfahren der klassischen Synthese einiges voraus. So lassen sich erneuerbare Energien wie Sonnenlicht und Biomasse direkt einsetzen und das Arbeiten in wässrigem Milieu bei Raumtemperatur ist der sogenannten *green chemistry* bei weitem überlegen.
- Hinzukommt, dass eine biotechnologische Herstellung unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten oft die einzige Lösung darstellt.

### Anwendungsbereiche der Biotechnologie

- Technik, Energiegewinnung
- Alkoholgewinnung aus Zuckerrohr respektive Zuckerrüben
- Wasserstoffgewinnung durch Blaualgen der Gattung *Nostocales*



- Biodiesel- und Ethanolgewinnung aus Rapsöl. Rapsöl kann verseift und anschließend erneut verestert werden um Biodiesel zu gewinnen. Vergärt man hingegen das Rapsöl so erhält man Ethanol, der zu Essigsäure, Acetaldehyd oder Ethylen weiterverarbeitet werden kann.
- Nahrungsmittelindustrie
  - Einsatz von Hydrolasen aus *Aspergillus niger* zur Verflüssigung von Zuckerrüben.
  - Hemmung der Desaturase in Raps durch Antisense-DNA zur Margarinegewinnung.

## Einsatz und Gewinnung von Enzymen

- *Invertasen* dienen zur Spaltung von Saccharose in Fructose und Glucose. Die so gewonnene Glucose ist von vielfacher medizinischer und pharmazeutischer Bedeutung:
  - Therapie hypoglykämischer Schockzustände
  - Bestandteil parenteraler Ernährung
  - Osmodiuretikum
  - Galenischer Hilfsstoff
- *Amylasen* werden ebenfalls zur Glucosegewinnung genutzt. Bei Einsatz von  $\alpha$ -Amylase, einer Endoamylase, erhält man zunächst ein Gemisch aus Glucose, Dextrinen – nicht zu verwechseln mit Dextranen, einem Überbegriff für chemisch nicht definierte Stärkepolymere – und Oligosacchariden, die anschließend durch  $\gamma$ -Amylase, eine Exoamylase, vollständig abgebaut werden können.
  - Man gewinnt  $\alpha$ -Amylase mithilfe von *Bacillus subtilis* oder *Bacillus mesenterius*. Diese Bakterien exportieren  $\alpha$ -Amylase in ihre Umgebung um dort vorhandene Stärke zu resorptionsfähiger Glucose abzubauen. Es konnte gezeigt werden, dass die für  $\alpha$ -Amylase codierende mRNA außerordentlich stabil ist. So wurde unter Einfluß von Actinomycin D, einem interkalierenden Antibiotikum, jegliche Proteinbiosynthese gestoppt. Lediglich  $\alpha$ -Amylase wurde weiterhin translatiert. Eine Negativkontrolle erfolgt durch Gabe von Chloramphenicol, das direkt in die Proteinbiosynthese eingreift und somit auch die Synthese von  $\alpha$ -Amylase stoppt. Über die Regulationsmechanismen weiß man, dass es durch Bindung von cAMP an ein sogenanntes CAP-Protein und anschließende Bindung an den Promotor des  $\alpha$ -Amylase Gens zur Expression der entsprechenden mRNA kommt. Erhöhte Glucosespiegel verringern die cAMP-Konzentration und damit die Expression von  $\alpha$ -Amylase.
- $\beta$ -Lactamasen werden aus *Bacillus licheniformis* gewonnen und dienen zur Therapie anaphylaktischer Reaktionen bei Penicillin-Allergien.
- *Penicillinacylase* ist von großer Bedeutung für die semisynthetische Herstellung von Penicillinen. Die Penicillinacylase erlaubt es biotechnologisch gewonnene Penicilline zu Deacylieren. Die so erhaltene 4-Aminopenicillansäure kann dann zu synthetischen Derivaten umgesetzt werden. Man gewinnt Penicillinacylase in *Escherichia coli* durch Gabe von Phenyllessigsäure, einem Induktor der Penicillinacylaseexpression.

## Optimierung von Enzymen

## Stabilisierung und Immobilisierung von Enzymen

- Während kostengünstige Enzyme wie  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Amylasen nur einmal verwendet und meist durch Präzipitation aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, stabilisiert und immobilisiert man teure Enzyme um sie wiederverwenden zu können.
  - *Möglichkeiten der Stabilisation*
    - Substratstabilisation.
    - Organische Lösungsmittel.
    - Anorganische Salze in geringer Konzentration (Gefahr des Aussalzens!).
    - Polytyrosinisierung oder -glycinisierung durch Einbau repetitiver UAU respektive GGU-Codons in den codierenden Gensequenzen.
  - *Möglichkeiten der Immobilisation*
    - Bindung über freie funktionelle Gruppen an einen festen *support*, z.B. Carmellose.

• Carboxylgruppen	<i>Asparaginsäure</i>	<i>Asp</i>
• Aminogruppen	<i>Lysin</i>	<i>Lys</i>
• Sulfhydrylgruppen	<i>Cystein</i>	<i>Cys</i>
• Hydroxygruppen	<i>Serin, Tyrosin</i>	<i>Ser, Tyr</i>
    - Bindung durch negative Überschlußladung der Enzymoberfläche an positiv geladenen *support*. Insbesondere säulenchromatographische Verfahren, bei denen die Säule mit immobilisiertem Enzym gepackt ist, mit Substrat beschickt wird und das gewünschte Produkt eluiert.
    - Quervernetzung einzelner Enzyme mit Glutaraldehyd führt zu höhermolekularen Strukturen wobei das aktive Zentrum nicht in Mitleidenschaft gezogen werden darf.
    - Einschluß der Enzyme in Gele, z.B. Polyacrylamidgele.
    - Einschluß der Enzyme in Membranen, die den Ein- und Austritt niedermolekularer Verbindungen zulassen.
  - *Beispiele*
    - Polymergebundene D-Xylulose-Isomerasen werden genutzt um Glucose in Fructose umzuwandeln, da diese eine höhere Süßkraft besitzt.
    - Immobilisierte Galactosidasen werden zur Lactosespaltung in Glucose und Galactose genutzt.
    - Racemische Gemische von Aminosäuren können durch eine Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae* getrennt werden. Hierzu acetyliert man zunächst die Aminosäuren, von den anschließend ausschließlich die L-Form gespalten wird. Erneutes Racemisieren der verbliebenen N-Acetyl-R-Aminosäuren und anschließende Hydrolyse der L-Form ermöglicht ein sukzessives Gewinnen dieses Enantiomers.
    - Die bei Myokardinfarkten zur Ionensubstitution genutzte Asparaginsäure wird durch gelfizierte Zellen von *Escherichia coli* gewonnen, die die als Substrat angebotene Fumarsäure hierzu umsetzen.

## „Molecular Pharming“ – Enzymgewinnung aus höheren Organismen

- Da eine Expression in Bakterien keine posttranslationale Modifikation – Sulfatierung, Phosphorylierung, Prenylierung, Glykosidierung, Einführung von Fettsäuren oder Proteolyse – zuläßt, werden bestimmte Enzyme aus transgenen Pflanzen, Tieren oder Zellkulturen gewonnen.
- Posttranslationale Modifikationen haben meist keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität eines Enzyms, aber regulatorische und immunologische Eigenschaften werden hierüber vermittelt.
- Zu den aus transgenen Tieren gewonnenen Enzymen zählen die Blutgerinnungsfaktoren 8 und 9, der Plasminogenaktivator und das  $\alpha_1$ -Antitrypsin. Der Plasminogenaktivator katalysiert die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, das auch Fibrinolysin genannt wird und die Auflösung von Blutgerinnseln bewerkstelligt.
- Ein häufig genutztes Expressionssystem sind Säugetiere, die die gewünschte Substanz über die Milch ausscheiden. Hierzu markiert man das durch polythymidinylung geschützte Gen mit einem speziellen Milchdrüsenpromotor, der später die Expression des Zielproteins ausschließlich in den Milchdrüsen ermöglicht. Injeziert man dieses lineare Genfragment aus Gründen der Größe in den männlichen Kern einer Oocyte im Pronucleus-Stadium, so wird es in ein beliebiges Gen eingebaut. Nachdem die beiden Kerne der Oocyte im Pronucleus-Stadium verschmolzen sind, implantiert man die Zygote in ein durch Kopulation mit vasktomierten Männchen pseudoschwangeres Muttertier und erhält in der ersten Generation zunächst heterozygoten Nachwuchs. Durch Rückkreuzung bekommt man gemäß den Mendelschen Regeln nach zwei weiteren Generationen homozygote Tiere, die dem Gendosisseffekt nach am meisten des gewünschten Enzyms über die Milch sezernieren.

## Herstellung rekombinanter Arzneimittel mit Säugerzellen oder Mikroorganismen

- 2002 waren von circa 50000 Arzneimitteln nur 80 rekombinant hergestellt und besaßen bereits einen Marktanteil von 8%.
- Als Expressionssysteme kommen im Fall von Säugerzellen sogenannte BHK- (*baby hamster kidney*) oder CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) zum Einsatz.
- Bei den hergestellten Arzneimitteln handelt es sich in erster Linie um Proteine:
  - *LH*                      Luteinisierendes Hormon
  - *FSH*                     Follikelstimulierendes Hormon
- Man nutzt LH und FSH um bei einer Frau unnatürlich viele Oocyten heranreifen zu lassen. Diese können anschließend entnommen und für eine „*in vitro*“-Befruchtung genutzt werden.
- Alternativ läßt sich FSH auch aus dem Urin postmenopausaler Frauen gewinnen, da dieser verhältnismäßig hohe Konzentrationen enthält, aber insbesondere basisches FSH, das mit O-Acetylneuraminsäure konjugiert und dadurch stärker wirksam ist, wird mit hoher Reinheit aus Säugerzelllinien gewonnen.
- Blutgerinnungsfaktor VIII
  - Das zunächst gewonnen Transkript wird anschließend proteolytisch gespalten und teilweise abgebaut. Die einzelnen Ketten werden durch Calciumionen, die  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäurereste miteinander verbinden, zusammengehalten. Vitamin K ist ein wichtiger Cofaktor bei der Carboxylierung der Glutaminsäure zur  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure.

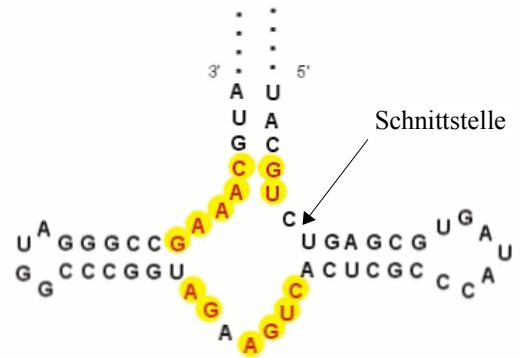
- Hirudin
  - Das zur Blutverdünnung und Behandlung von Hämorrhoidalleiden eingesetzte und ursprünglich aus *Hirudo medicinalis* gewonnene Hirudin wird heutzutage unter Einsatz des Pilzes *Acremonium chrysogenum* hergestellt. Hierzu wurde um den starken Promotor dieses Gens auszunutzen das Isopenicillin-N-Synthase-Gen gegen die Hirudinsequenz ausgetauscht und durch eine spezielle Signalsequenz die Exkretion des Hirudins gewährleistet. Die infolge der nicht stattfindenden Modifizierung fehlende Sulfatierung des rekombinanten Hirudins macht bei topischer Applikation keine Probleme.

## Nukleinsäuren in der Therapie

- Kommt es durch Mutation einzelner Basen oder aber auch durch größere Gendefekte zur Expression eines pathogenen Gentranskriptes so kann auf DNA-, aber auch auf RNA-Ebene eingegriffen werden. Hierbei lassen sich alle Prozesse von der Transkription über das Capping bis hin zur Polyadenylierung stören, vorausgesetzt, dass sich die eingesetzten Oligonukleotide spezifisch an die Substratnukleinsäuresequenz anlagern. In Bezug auf die Substratspezifität ist anzumerken, dass innerhalb der Fülle von  $3,5 \cdot 10^9$  Basenpaaren des humanen Genoms ein 16mer-Oligonukleotid statistisch betrachtet nur einmal vorkommt und dass eine Abweichung von einer Aminosäure innerhalb der Sequenz bereit zu einer 500fach niedrigeren Affinität führt.
- Während die Biosynthese der Nukleinsäuren, sei es DNA oder RNA, über das 3'-Ende der Ribose respektive Desoxyribose verläuft, verlängert man in der chemischen Synthese das 5'-Ende.
- Mögliche Therapieformen
  - *Antisense Nukleotide*
    - Durch Einsatz von *Antisense RNA*, also RNA-Oligonukleotiden die eine zur pathogenen Zielstruktur komplementäre Sequenz aufweisen, kann die Zielstruktur komplexiert und eine Translation zum pathogenen Faktor verhindert werden.
    - Um retrovirale Infektionen therapieren zu können nutzt man neuerdings auch sogenannte *Antisense DNA*. Retroviren besitzen neben der *reversen Transkriptase* noch eine *RNAse II*, deren natürliche Funktion die Befreiung des durch reverse Transkriptase erzeugten RNA/DNA-Heterodimers von der viralen RNA ist, damit nach erneuter DNA-Synthese eine doppelsträngige DNA des viralen Genoms in die Wirtszelle eingebaut werden kann. Ebendiese RNAse II macht man sich bei der Verwendung von Antisense DNA zunutze, da es nach Anlagerung des Oligonukleotids an die virale RNA zu einem Abbau derselben durch das virale Enzym kommt.
  - *Interfering RNA*
    - Unter dem Begriff interfering RNA, die kurz auch als *iRNA* oder *dsRNA* bezeichnet wird, versteht man doppelsträngige RNA-Stücke. Diese werden nach der Applikation von einem *Dicer* genannten Enzym in kleinere Stücke mit einer Länge von 22 Nukleotiden zerschnitten und zusammen mit weiteren Enzymen zu einem sogenannten RISC, *RNA-induced silencing complex*, zusammengesetzt. Dieser Komplex aus Enzymen und RNA bindet anschließend an DNA- oder mRNA-Abschnitte, die dadurch abgeschaltet werden.
    - Ein zur Zeit auf dem Markt befindliches Arzneimittel, das diesen Weg beschreitet, ist *Vitravene*<sup>®</sup>, das bei Zytomegalie-Patienten zur Behandlung einer Infektion der Augen genutzt wird. Hierzu muss die dsRNA in den Bulbus injiziert werden, ein Eingriff, der eine Reihe an Nebenwirkungen mit sich bringt.

- *Ribozyme*

- Der Begriff Ribozyme steht als Oberbegriff für eine Klasse katalytisch aktiver RNA-Fragmente. Unter ihnen haben die sogenannten *Hammerhead-Ribozyme* Bekanntheit erlangt, da sie in der Lage sind komplementäre RNA-Stränge an spezifischen Stellen zu hydrolysieren.



- *Tripelhelixbildner*

- Neben der bekannten Doppelhelix kann die DNA in Abschnitten, die sich durch repetitive Purin- respektive Pyrimidinsequenzen von etwa 15 – 20 Basenpaaren Länge auszeichnen, auch in einer sogenannten Tripelhelix vorliegen. Man kann daher bei einer bekannten repetitiven Purinsequenz durch einen weiteren Pyrimidinstrang die Ausbildung einer nicht ablesbaren Tripelhelix verursachen. Die hierbei vorliegende Basenpaarung wird auch als *Hogsteen-Basenpaarung* bezeichnet.

## Antikörpertechnologien

- Am Beispiel einer Krebstherapie sollen im Folgenden die Vorteile moderner Antikörpertechnologien aufgezeigt werden. In Kombination mit den klassischen Therapierichtungen der Chirurgie, der Strahlentherapie und der Chemotherapie bieten moderne Antikörpertechnologien den Vorteil einer wesentlich selektiveren Strategie bei der nicht alle sich schnell teilenden Zellen zerstört werden.
- Da die Angiogenese im Rahmen des Tumorwachstums spiralförmig verläuft, kommt es im Inneren des Tumors zu einem deutlich verlangsamten Blutfluß, was mit einer lokalen Sauerstoffunterversorgung einhergeht. Die Folge ist, dass im Rahmen einer Strahlentherapie weniger Sauerstoffradikale gebildet werden und dass das infolge der anaeroben Energiegewinnung saure Milieu viele Zytostatika in ihrer Stabilität negativ beeinflusst. Hinzukommt, dass im Inneren des Tumors kein lymphatisches System besteht und dass Chemotherapeutika durch den Abfluß von Gewebswasser aus dem Tumorgewebe herausgespült werden.
- *Herstellung von Antikörpern*
  - Zunächst einmal unterscheidet man *polyklonale* und *monoklonale* Antikörper. Polyklonale Antikörper binden an alle Epitope eines Antigens und sind genau genommen immer eine Mischung mehrerer monoklonaler Antikörper, die ihrerseits nur ein spezifisches Epitop des Antigens erkennen. Aufgrund ihrer Spezifität nutzt man in der Regel monoklonale Antikörper, deren Gewinnung im Folgenden beschrieben werden soll.
  - Nachdem man eine Maus mit dem Zielantigen infiziert und ihr einige Zeit zur Produktion von Antikörpern gegeben, hat entnimmt man ihr die Milz und stellt daraus ein sogenanntes Milzhomogenat her. Aus diesem Milzhomogenat gewinnt man anschließend einzelne Milzzellen, die nur einen einzelnen Antikörper enthalten.
  - Durch Fusion mit Myelomzellen erhält man sogenannte Hybridomzellen, die nun ebenfalls die „Unsterblichkeit“ der Krebszellen besitzen und gleichzeitig die gewünschten Antikörper produzieren. Durch Zellkultur lassen sich nun *murine* Antikörper gewinnen.

- Um eine Immunreaktion gegen die murinen Antikörper zu verhindern tauscht man noch die konstanten Kettenanteile gegen die humanen Analoga und erhält auf diese Weise *chimäre* Antikörper. Werden zusätzlich die Fragmente zwischen den hypervariablen Abschnitten gegen humane Sequenzen ausgetauscht, so spricht man von *humanisierten* Antikörpern.
- Um die Pharmakokinetik der gewonnenen Antikörper zu verbessern können auch sogenannte scF<sub>v</sub> hergestellt werden. Diese *single chain antibody variable region fragments* bestehen aus den antigenbindenden Domänen der leichten und schweren Kette, die über einen Linker aus 15 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Die Länge des Linkers ist hierbei entscheidend, da sie für die Bindung des scF<sub>v</sub> an das Epitop des Antigens mitverantwortlich ist.
- Durch Kombination von Antikörpern mit weiteren Wirkprinzipien lässt sich die hohe Spezifität der Antikörper ausnutzen. So können neue Chemotherapeutika durch Kopplung an Toxine hergestellt werden oder auch Enzyme lassen sich an Antikörper binden. So gewonnene Abzyme sind in der Lage verabreichte Prodrugs lokal im Tumor in ihre Wirkform zu überführen. Auch die Radiotherapie nutzt moderne Antikörpertechnologien, indem sie Radionuklide wie Technetium, Yttrium oder Rhenium über kovalent gebundene Chelatoren gezielt in den Tumor bringt. Ein Beispiel ist Zevalin<sup>®</sup>, das wegen seiner spezifischen Bindung an CD20 von Lymphoblasten bei nonHodgkin Lymphomen eingesetzt wird.