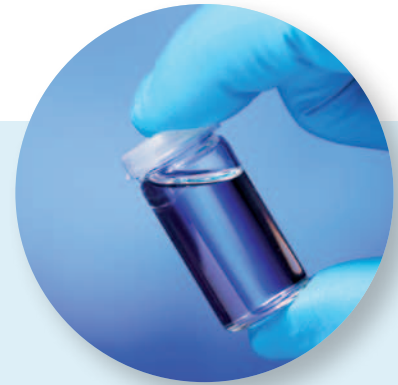


Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

Gerrit Borchard



FPH-Nummer: 1-1017995-12-2012-P12.5

Lernziele

- ▶ Sie wissen, wie therapeutische Proteine produziert und formuliert werden.
- ▶ Sie kennen die grundlegenden pharmakokinetischen Eigenschaften therapeutischer Proteine.
- ▶ Sie sind vertraut mit dem Zusammenhang zwischen Struktur, Wirksamkeit und Immunogenität von therapeutischen Proteinen.
- ▶ Sie sind mit der Nomenklatur und den Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper vertraut.
- ▶ Sie sind mit den Grundlagen der sachgerechten Lagerung und Anwendung von therapeutischen Proteinen vertraut.

Zusammenfassung

Durch die Entwicklung der Molekularbiologie, dem Wissen über genetische Grundlagen («Genomics») und der Proteinbiochemie («Proteomics») finden Protein Arzneimittel immer mehr Anwendung bei der Therapie schwerer Erkrankungen. Therapeutische Proteine unterscheiden sich von Arzneistoffen der chemischen Synthese in ihrem bedeutend grösseren Molekulargewicht, ihrer die Funktionalität bestimmenden Struktur, ihrem pharmakokinetischen Profil und ihrer potenziellen Immunogenität. Um die Sicherheit und die Effektivität von therapeutischen Proteinen zu gewährleisten, bedarf es der Entwicklung spezieller Herstellungs- und Formulierungsverfahren. Die Patientencompliance kann letztendlich durch Aufklärung über die spezifischen Faktoren bei der Therapie mit therapeutischen Proteinen erhöht werden.

Einleitung

Proteine, die überall im Organismus wichtige Aufgaben erfüllen, als Medikamente einzusetzen, ist ein faszinierender, wenn auch naheliegender Gedanke. Endogene Proteine, wie das Insulin, Wachstumsfaktoren oder Zytokine, sollten eine höhere Spezifität aufweisen und weniger unerwünschte pharmakologische Wirkungen auslösen als Arzneimittel der chemischen Synthese. Von diesen unterscheiden sich therapeutische Proteine in weitem Masse. Proteine bestehen aus einer Kette von Aminosäuren; jede einzelne dieser Aminosäuren wiederum weist etwa das Molekulargewicht von Salicylsäure auf. Die Grösse dieser Moleküle wird deutlich, wenn man bedenkt, dass ein Protein aus mehreren hundert Aminosäuren besteht. Das grösste menschliche Protein Titin (Filamentsystem in der Herz- und Skelettmuskulatur) besteht aus 30 000 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von ca. 3600 kDa.

Über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken determiniert die Peptidsequenz (Primärstruktur) die Ausbildung von Strukturelementen (Sekundärstruktur) und die räumliche Faltung des Proteins (Tertiärstruktur). Die korrekte Faltung sorgt für eine optimale Funktionalität des Proteins. Eine Veränderung, z. B. durch Auffaltung, würde zu einem Funktionsverlust, evtl. zu einer Aggregation und schliesslich zur Erkennung der geänderten Proteinstruktur als Antigen durch das Immunsystem führen.

Die Produktionsprozesse und Formulierungsmethoden von therapeutischen Proteinen sind darauf ausgelegt, deren native Form und korrekte Faltung zu erhalten.

Der Markt für therapeutische Proteine wird in den nächsten Jahren weiter wachsen [1]. Produkte wie Interferon-beta (Avonex®, Rebif®), Wachstumsfaktoren (Neupogen®, Tivagastim®) und monoklonale Antikörper (Humira®, Avastin®) finden sich immer häufiger auch in der Offizin. Um eine effiziente Therapie zu gewährleisten, bedarf es daher auch des Wissens des medizinischen Fachpersonals, des Apothekers und letztendlich des Patienten über die Besonderheiten der Anwendung von therapeutischen Proteinen.

Kleine Historie und Repetitorium der Molekularbiologie

Die Entschlüsselung des genetischen Codes durch den deutschen Biochemiker Heinrich Matthaei im Jahre 1961 an den *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, USA) war sicherlich einer der wichtigsten Momente in der Wissenschaftsgeschichte [2]. Matthaeis damaliger Chef, Nirenberg, erhielt für die gemeinsamen Arbeiten im Jahre 1968 den Nobelpreis. Voran gegangen waren solch epochale Ereignisse wie die Isolation der Desoxyribonukleinsäure (DNS oder engl. DNA) durch den in Basel geborenen

Chemiker Friedrich Miescher im Jahre 1869 [3], der Nachweis, dass die DNA Träger der Erbinformation ist durch Avery, McLeod und McCarthy (1944) [4] und letztendlich die Strukturaufklärung der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 [5]. Watson und Crick, zusammen mit Maurice Wilkins, erhielten dafür den Nobelpreis im Jahre 1962. Rosalind Franklin, britische Biophysikerin am King's College London, deren Daten ungefragterweise von Watson und Crick zur Entwicklung ihrer Theorie verwendet wurden, verstarb bereits im Jahr 1958, im Alter von nur 37 Jahren. Nur fünf Jahre nach Matthaei, im Jahre 1966, wurde die komplette Entschlüsselung des genetischen Codes bei einer Konferenz in Cold Spring Harbor (Long Island, New York) vorgelegt.

Bekannterweise besteht DNA aus zwei komplementären Ribonukleinsäuresträngen, die durch intramolekulare Wechselwirkungen die typische Doppelhelix bilden. Die Erkenntnis, dass in allen Organismen alle Bausteine eines jeden Proteins, die so genannten Aminosäuren, durch genau eine einfache Kombination von jeweils drei Nukleinsäuren bestimmt (kodiert) werden, war bahnbrechend. Das bedeutete schlussendlich, dass bei Kenntnis der Aminosäuresequenz eines Proteins auch die dazugehörige DNA-Sequenz bestimmt werden kann.

Bei der Proteinbiosynthese wird, nach Aufspaltung der Doppelhelix, die genetische Information eines bestimmten Genomabschnitts auf eine komplementäre Ribonukleinsäuresequenz, die so genannte Messenger-RNA (mRNA), übertragen. Dieser Prozess wird Transkription genannt. Die mRNA wandert dann zu den Ribosomen im Zytosol, wo unter Einbeziehung von Transfer-RNA (tRNA) während der Translation die Aminosäuren in der richtigen Abfolge zu dem entsprechenden Protein zusammengesetzt werden. Anschliessend können noch so genannte post-translationale Modifikationen des Proteins, z. B. die enzymatische Abspaltung eines Molekülteils (z. B. Präproinsulin -> Proinsulin -> Insulin) oder eine Glykosylierung, erfolgen. Diese Prozessabfolge – Transkription der genetischen Information im Zellkern und Translation in Proteine an den Ribosomen – wurde von Francis Crick als «Zentrales Dogma der Molekularbiologie» bezeichnet [6]. Nach diesem Dogma sind nur Übertragungen von DNA zu DNA (bei der Replikation des genetischen Materials während der Zellteilung), DNA zu RNA und RNA zu Protein erlaubt.

Die Hypothese, dass auch die Übertragung von RNA zu DNA möglich ist, wurde bereits 1964 von Howard Martin Temin (University of Wisconsin-Madison) formuliert. Temin fand heraus, dass bestimmte RNA-Viren, die so genannten Retroviren, die Fähigkeit besitzen, ihre RNA in das Genom der infizierten Wirtszelle zu integrieren, die Transkription also umzukehren. Retroviren nutzen so ihre Wirtszellen für die Replikation. Das dafür nötige Enzym, die Reverse Transkriptase, wurde von Temin und gleichzeitig und unabhängig von David Baltimore (*Massachusetts Institute of Technology*, MIT, Boston) entdeckt, wofür

Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

beide zusammen mit Renato Dulbecco den Nobelpreis im Jahre 1975 erhielten. Heute weiss man, dass das menschliche Genom zu etwa 8 % aus retroviraler DNA besteht [7], zurückzuführen auf Infektionen unserer evolutionären Ahnen und Urahnen. Später wurde bemerkt, dass die Reverse Transkriptase eine hohe Fehlerhäufigkeit bei der Übertragung der genetischen Information in das Wirtsgenom aufweist, was eine hohe Mutationsrate der replizierten Retroviren zur Folge hat und z. B. die Entwicklung eines Impfstoffes gegen das retrovirale HI-Virus so kompliziert macht.

Zwei weitere Enzymtypen, die Restriktionsendonukleasen und die Ligasen, sind bei der Herstellung therapeutischer Proteine von grosser Bedeutung. Die Entdeckung der Restriktionsenzyme, wofür der Schweizer Werner Arber zusammen mit seinen amerikanischen Kollegen Daniel Nathans und Hamilton Smith im Jahr 1978 den Nobelpreis erhielt, wird oft als Beginn der Entwicklung der Molekularbiologie bezeichnet. Ursprünglich aus Bakterien isoliert, vermögen diese Enzyme bakterielle DNA an bestimmten Stellen zu «schneiden», wobei DNA-Fragmente mit so genannten «klebrigen Enden» (*sticky ends*) entstehen. Diese Enden können dann durch den zweiten Enzymtyp, die Ligasen, wieder zusammengefügt werden. Durch die Verwendung beider Enzymtypen lassen sich so zirkuläre DNA-Moleküle, die so genannten Plasmide, mit der genetischen Information, z. B. für ein bestimmtes Protein, herstellen.

Der zweite Teil der Produktion, das so genannte *downstream processing*, umfasst die Isolation und Aufreinigung des Proteins aus dem Nährmedium, evtl. nach Aufspaltung der zellulären Bestandteile, in einer Abfolge mehrerer Schritte. Dabei muss auf die Abtrennung jeglicher fremder Bestandteile, wie z. B. zelluläre Proteine, geachtet werden, da diese beim Patienten unerwünschte Immunreaktionen hervorrufen können. Nach seiner Isolierung muss gewährleistet sein, dass das Protein seine native Faltung einnimmt, da eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur einen Wirkverlust und/oder eine erhöhte Immunogenität bedeuten kann.

Formulierung

Die Formulierung von therapeutischen Proteinen hat die Darstellung einer stabilen, im industriellen Massstab herzustellenden und applizierbaren Darreichungsform zum Ziel. Durch die Formulierung wird das Protein in seiner nativen Faltung stabilisiert, um so einen Wirkverlust zu vermeiden. Ebenso muss die Formulierung das Protein vor Aggregation, Aminosäure-Oxidation und/oder Deaminierung und Fragmentierung schützen. In der Regel werden therapeutische Proteine durch Injektion (subkutan, intramuskulär oder intravenös) appliziert, die Formulierungen müssen demnach die Anforderungen des Arzneibuches hinsichtlich der Herstellung von Injektionslösungen erfüllen. Die mukosale Applikation (nasal, pulmonal) stellt aufgrund der enzymatischen Aktivität in den Schleimhäuten, der eingeschränkten Penetration von Proteinarzneistoffen

Aspekte therapeutischer Proteine

Produktion

Die Plasmide werden in Wirtszellen, den so genannten Expressionssystemen, eingeschleust und in Bioreaktoren unter optimierten Bedingungen (Nährmedia, pH, Temperatur etc.) inkubiert. Relevante Teile der Plasmide werden abgelesen und die genetische Information in das entsprechende Protein übersetzt. Im Labor- wie im industriellen Massstab werden als Wirtszellen zur Herstellung therapeutischer Proteine zum grössten Teil Bakterienkulturen (*Escherichia coli*), aber auch zunehmend Säugetierzellen (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) oder Hefen (*Pichia pastoris*) eingesetzt. Unterschiede zwischen den Expressionssystemen bestehen bei der posttranslationalen Modifikation: Während mit CHO-Zellen produzierte Proteine humane Glykosylierungsmuster aufweisen, weichen diese bei der Produktion aus Hefen zum Teil stark ab. Bei mit Hilfe von *E. coli* hergestellten Proteinen fehlt die Glykosylierung komplett, weshalb Glykoproteine nicht mit Hilfe dieser Wirtszellen hergestellt werden können. Abhängig vom Expressionssystem wird das Protein entweder in das Nährmedium ausgeschieden, oder es liegt in intrazellulären Präzipitaten (*inclusion bodies*) vor. Dieser Teil der Produktion wird als *upstream processing* bezeichnet.

Kasten 1

Lösung oder Gefriertrocknung?

Im Hinblick auf potenzielle physikalische und chemische Abbauprozesse ergibt die Gefriertrocknung in der Regel stabilere Formulierungen therapeutischer Proteine. Die verbundenen Nachteile gegenüber der Lösung sind der Bedarf von zusätzlichen Prozessen bei der Produktion wie auch bei der Rekonstitution der Formulierung unmittelbar vor der Anwendung. Beide Prozesse sind nicht nur kostenintensiv, sondern stellen auch mögliche Fehlerquellen dar, welche die Wirksamkeit des Arzneistoffes herabsetzen oder gänzlich eliminieren können. Gerade bei der Rekonstitution muss sich peinlich genau an die beschriebene Prozedur gehalten werden, um eine Aggregation des Proteins zu vermeiden [8]. Flüssige Darreichungsformen sind dagegen einfacher zu produzieren und sofort verwendbar, weisen allerdings typischerweise eine geringere Stabilität und Haltbarkeit auf.

Tabelle 1

Hilfsstoffe und ihre Funktion bei der Formulierung therapeutischer Proteine

Hilfsstoff	Funktion	Beispiele
Puffer	pH-Einstellung	Histidin-, Citrat-, Succinat-, Acetat- oder Phosphatpuffer
Zucker	Tonizität, Stabilisierung, Füllstoff	Sukrose, Trehalose
Polyalkohole	Tonizität, Stabilisierung, Füllstoff	Mannitol, Sorbitol
Salze	Tonizität, Füllstoff	Natriumchlorid
Aminosäuren	Tonizität, Stabilisierung, Füllstoff	Glycin, Arginin, Leucin, Prolin
Surfactants	Stabilisierung	Polysorbat 20 und 80
Konservierungsmittel	Konservierung	Benzylalkohol
Antioxidanzien	Stabilisierung	Methionin, Benzylalkohol

und der daraus folgenden Variabilität der zu erreichenden Plasmaspiegel keine günstige Alternative zur Injektion dar. Faktoren, welche die Formulierungsstrategie von therapeutischen Proteinen determinieren, sind:

- ▶ Die Darreichungsform (wässrige Lösung oder gefriergetrocknetes Pulver zur Rekonstitution)
- ▶ Dosis, und damit Konzentration des Proteins in der Formulierung
- ▶ pH, Osmolalität und Tonizität
- ▶ Art, Qualität und Menge der verwendeten Hilfsstoffe
- ▶ Art und Qualität der Primärpackmittel (Glasvials, Fertigspritzen etc.)

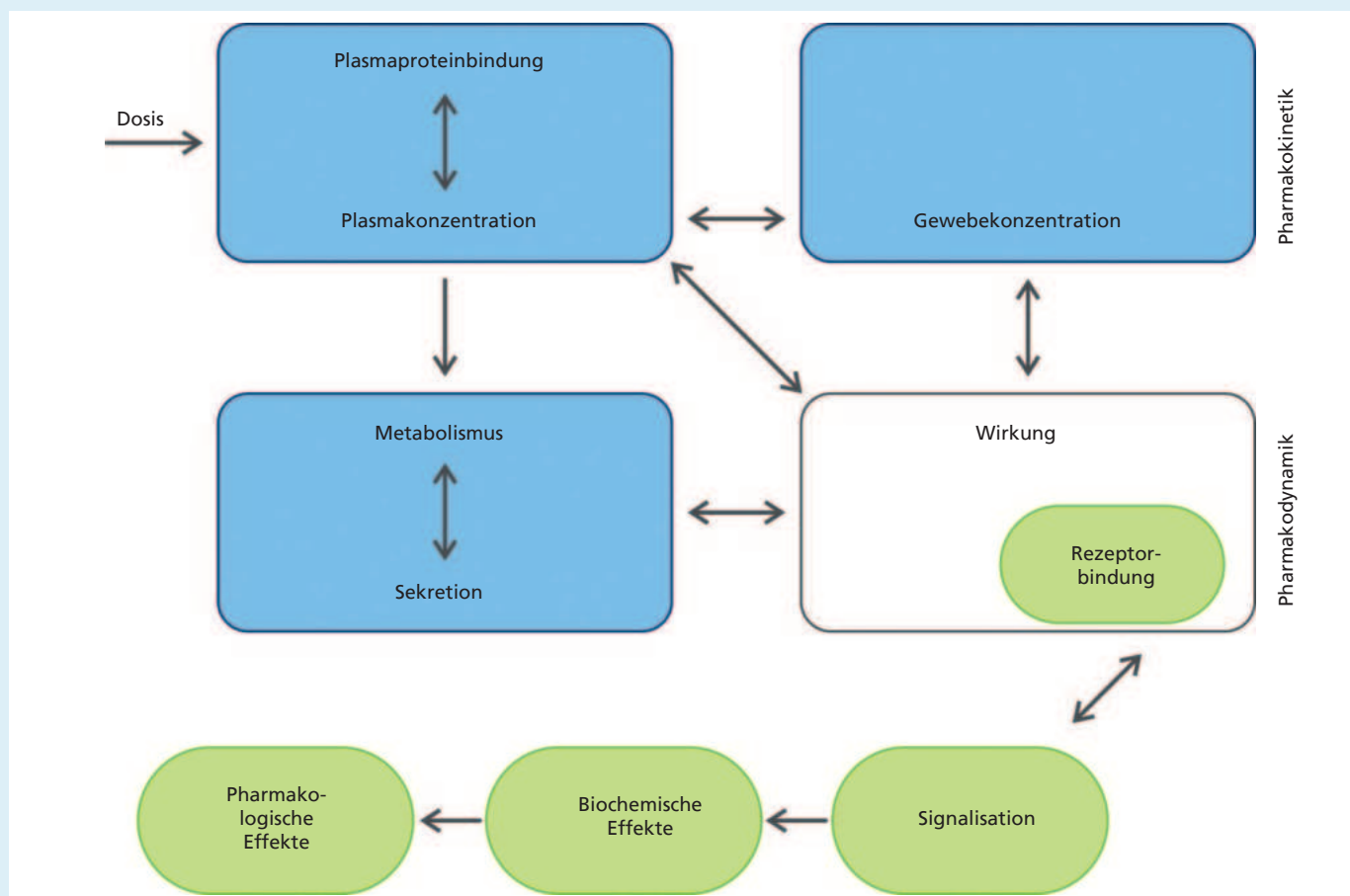


Abbildung 1
Pharmakokinetik und Pharmakodynamik therapeutischer Proteine.

Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

Typische, in Proteinformulierungen verwendete Hilfsstoffe und deren Funktion werden in Tabelle 1 beschrieben. Bei der Auswahl der Hilfsstoffe muss sehr auf deren Qualität geachtet werden. So können in Polysorbaten vorhandene Verunreinigungen mit Peroxiden oder Metallionen zu Oxidationen des Proteinarzneistoffes führen. Ausserdem sollten generell reduzierende Zucker wie Laktose oder Glukose (z. B. auch in Lösungen zur Rekonstitution gefriergetrockneter Proteine) vermieden werden, da es im Zuge von Maillard-Reaktionen zur Modifikation des Proteins kommen kann. Bei gefriergetrockneten Formulierungen kann Azetatpuffer nicht verwendet werden, da es bei der Lyophilisierung über die Verdampfung der Essigsäure zu einer Verschiebung des pH-Wertes kommt.

Pharmakokinetik

Abbildung 1 zeigt den Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik therapeutischer Proteine. Proteinarzneistoffe werden in der Regel als Injektionen oder Infusionen parenteral appliziert, wobei häufig nach subkutaner (s.c.) Gabe eine reduzierte Bioverfügbarkeit gemessen wird. Als Beispiele seien für Interferon-beta Bioverfügbarkeiten von 50 % und für therapeutische Antikörper von ca. 60 % nach s.c. Applikation genannt. Diese nicht vollständige Bioverfügbarkeit s.c. applizierter Proteine wird auf deren Aggregation und anschliessende Endozytose durch Immunzellen und/oder die enzymatische Degradation an der Injektionsstelle zurückgeführt.

Insbesondere für Interferon-beta-1b (IFN-beta-1b) werden häufig entzündliche Reaktionen an der Injektionsstelle festgestellt. IFN-beta-1b wird in *E. coli* hergestellt, ist also nicht glykosyliert und neigt daher zur Bildung von Aggregaten nach subkutaner Injektion. Diese Aggregate werden vom Immunsystem des Patienten als fremd («immunogen») erkannt und durch Phagozytose eliminiert. Gleichzeitig kommt es zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern, wodurch die Wirksamkeit des therapeutischen Proteins stark herabgesetzt oder gänzlich unterbunden wird (Kasten 3).

Bei manchen Patienten können neutralisierende Antikörper gegen ein therapeutisches Protein bereits vor Therapiebeginn vorliegen. Für die Detektion dieser so genannten «*pre-existing neutralising anti-drug antibodies* (ADA)», welche die Effektivität der Therapie herabsetzen oder gar gänzlich unterbinden, wird die Verwendung von so genannten «*Companion Diagnostics*» [9] mehr und mehr in Erwägung gezogen. Diese können im Sinne des Konzeptes der personalisierten Medizin helfen, die für bestimmte Patienten geeignete Therapie auszuwählen, um so zu einer besseren Patientenversorgung und gleichzeitig einer Reduktion der sehr hohen Kosten der Therapie mit Proteinarzneistoffen zu gelangen. Vor kurzem wurden zwei solcher Companion Diagnostics, allerdings für kleinmolekulare Wirkstoffe, von der FDA zugelassen. Dabei

Kasten 2

Praktische Hinweise im Umgang mit therapeutischen Arzneimitteln

Die sachgerechte Lagerung, Rekonstitution (von gefriergetrockneten Produkten) und Verdünnung/Mischung (von Lösungen) von Proteinen dient der Erhaltung ihrer Aktivität und der Vermeidung von Aggregaten. Man sollte sich daher stets peinlich genau an die Angaben in den Packungsbeilagen halten. Lösungen von Proteinen müssen im Kühlschrank bei 4–8°C gelagert werden, ein Einfrieren würde sich ebenso wie das Erwärmen der Lösungen vor Injektion desaströs auf die Stabilität des Arzneistoffes auswirken. Die Lösungen sollten dabei vor Licht geschützt aufbewahrt werden, um die Photooxidation der Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Tyrosin und damit eine Auffaltung des Proteins zu verhindern. Bei der Rekonstitution von Lyophilisaten sollte das Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke) langsam und an der Wandung des Behältnisses zugeführt werden, um Schaumbildung zu verhindern. Anschliessendes starkes Schütteln führt zur Aggregatbildung und muss daher vermieden werden, stattdessen sollte die Lösung langsam etwa 30 Sekunden geschwenkt werden. Die Verwendung des in der Fachinformation vorgeschriebenen Rekonstitutionsmittels ist essenziell, um die Wirksamkeit des Proteinarzneistoffes zu gewährleisten. So führt z. B. die Verwendung von 5%iger Glukoselösung bei Herceptin® (Trastuzumab) zur Aggregation des Proteins.

handelt es sich um Diagnostik-Kits für die Präparate Zelboraf® (Vemurafenib, Therapie des Melanoms) und Xalkori® (Crizotinib, Therapie von nichtkleinzelligem Lungenkarzinom). Für die Antikörper Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) gibt es *Companion Diagnostics* auf das Vorliegen eines KRAS Wildtyp-Gens. Für Herceptin (Trastuzumab®) muss mit Hilfe eines Diagnostik-Kits auf eine Überexpression von HER2 getestet werden. Es darf erwartet werden, dass in Zukunft noch mehr solcher Diagnostik-Kits für therapeutische Proteine angeboten werden.

Die für die Wirkung zur Verfügung stehende Konzentration wird durch die Plasmaproteinbindung, die Metabolisierung sowie die Verteilung des Proteins im Gewebe beeinflusst. Proteine haben in der Regel eine geringe Plasmaproteinbindung und deshalb ein kleines Verteilungsvolumen, welches in etwa dem Blutvolumen (ca. 3–8 l) entspricht. Dieses kann allerdings durch rezeptorvermittelte Endozytose um das entsprechende intrazelluläre Volumen erhöht werden. Das Verhältnis von Gewebe- zu

Plasmakonzentration z. B. von monoklonalen Antikörpern liegt typischerweise zwischen 1:10 und 1:2.

Die Metabolisierung von Proteinarzneistoffen verläuft nach denselben Mechanismen und unter Einbeziehung derselben Enzymsysteme (Glykosidasen, Endo-/Exopeptidasen) ab wie für endogene oder Nahrungsproteine. Die Proteine werden dabei zu Di- und Tripeptiden und Aminosäuren gespalten, welche der Neusynthese endogener Proteine zugeführt werden. Im Gegensatz zum Metabolismus von kleinmolekularen Arzneistoffen der chemischen Synthese entsteht eine Vielzahl inaktiver, nichttoxischer Metaboliten.

Die Metabolisierung und Elimination von Proteinarzneistoffen erfolgt über die Leber und die Nieren, wobei das Molekulargewicht des Proteins eine Rolle bei der Gewichtung beider Eliminationswege spielt. Kleine Proteine (< 65 kDa) werden glomerulär filtriert und im Lumen der

proximalen Tubuli durch teils membranständige Enzymsysteme hydrolysiert. Die Hydrolyseprodukte werden durch spezifische Peptidtransporter aus dem Lumen absorbiert und der systemischen Zirkulation zugeführt. Die Proteinkonzentration beim gesunden Menschen ist auf Grund dieser Mechanismen äusserst gering.

In der Leber werden Proteine über rezeptorvermittelte Endozytose in die Hepatozyten, Kupfferzellen und Endothelzellen aufgenommen und dort metabolisiert. Für die Endozytose von Proteinen geeignete Rezeptoren sind z. B. der Asialoglykoproteinrezeptor (Glykoproteine, z. B. Asialo-Erythropoietin), der Mannose-Rezeptor (Glykoproteine) oder der LDL-Rezeptor (Lipoproteine).

Die Eliminierung eines therapeutischen Proteins kann aber auch an seine Pharmakodynamik gekoppelt sein. So stimuliert z. B. Filgrastim (Granulozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor, G-CSF), ein Wachstumsfaktor, die Diffe-

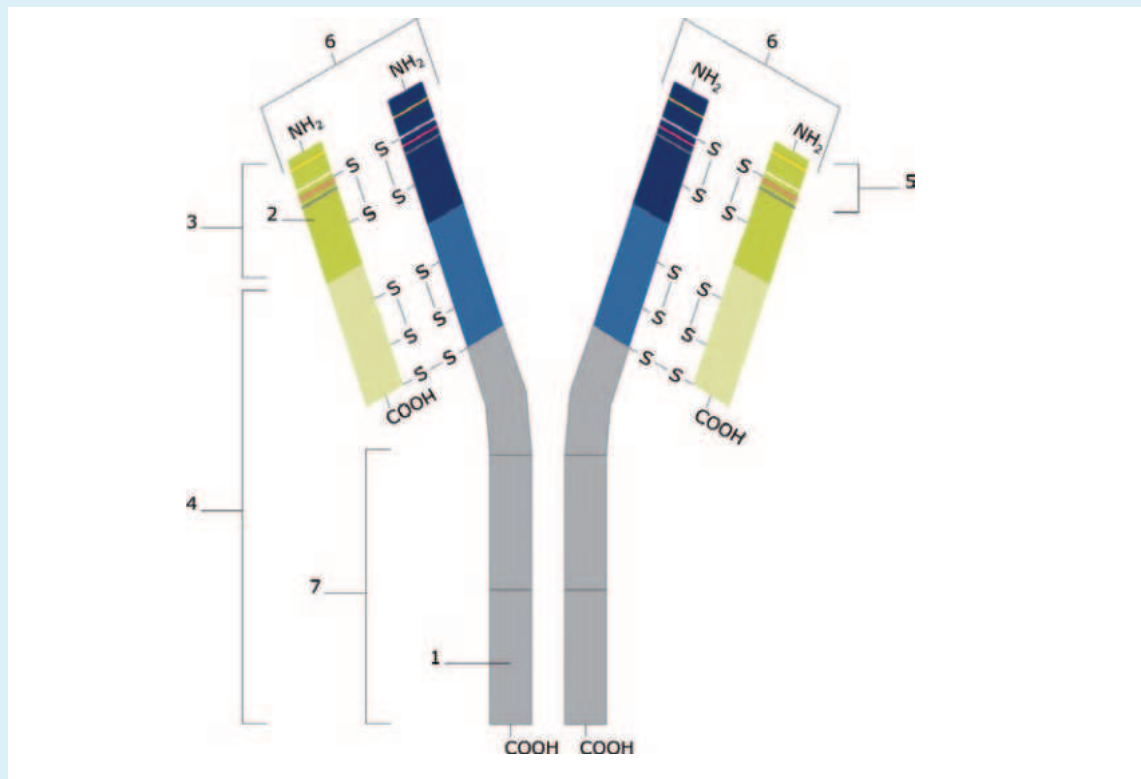


Abbildung 2

Struktur eines Immunglobulin-G-Antikörpers.

Ein Antikörper ist aus zwei identischen schweren Ketten (1) und zwei identischen leichten Ketten (2) aufgebaut, welche über Disulfid-Brücken miteinander zu einer ypsilonförmigen Struktur verbunden sind. Jede Kette besteht aus einer variablen (3) und einer konstanten Region (4). Die variablen Domänen enthalten die CDR (*Complementary determining region*) (5) und bilden gemeinsam die Antigen-Erkennungsstelle Fab (6). Über das Fc-Fragment (7) kann der Antikörper mit dem Immunsystem interagieren.

Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

renzierung von Stammzellen im Knochenmark zu neutrophilen Granulozyten. Filgrastim wird daher zur Rekonstitution des Immunsystems bei immunsupprimierten Patienten, z. B. in Folge einer Chemotherapie nichtmyeloider Tumoren, eingesetzt. Die Therapie mit Filgrastim hat aber nicht nur die Vermehrung der Granulozyten zur Folge, sondern auch eine erhöhte Expression der spezifischen Rezeptoren für diesen Arzneistoff durch die Granulozyten. In einer Art Feedback-Mechanismus löst so der pharmakologische Effekt gleichzeitig die Elimination des Arzneistoffes aus. Das Resultat ist ein nichtlineares pharmakokinetisches Profil, determiniert durch die Kombination eines passiven, nichtsättigbaren Eliminationsprozesses (glomeruläre Filtration in der Niere) und eines aktiven, sättigbaren Eliminationsprozesses (rezeptorvermittelte Endozytose) durch die neutrophilen Granulozyten.

Antikörper

Monoklonale Antikörper stellen heute die wichtigste Gruppe therapeutischer Proteine dar. Der Ausdruck «Antikörper» findet zum ersten Mal 1891 in einem Text von Paul Ehrlich Erwähnung [11], nachdem Behring und Kitasato die Wirkung von Antikörpern bereits 1890 beschrieben hatten [12]. 1923 konnten Heidelberger und Avery nachweisen, dass Antikörper Proteine sind [13], und 1940 gelang der Beweis der von Ehrlich aufgestellten Schlüssel-Schloss-Hypothese der Interaktion von Liganden und Rezeptoren durch Linus Pauling [14]. Nachdem Astrid Fagraeus 1948 feststellte, dass B-Zellen für die Produktion von Antikörpern verantwortlich sind [15], klärten Edelman und Porter 1960 schliesslich deren Struktur auf [16]. Heute nehmen monoklonale Antikörper einen wichtigen Teil der therapeutischen Proteine ein. Allein in den Jahren 1990 bis 2009 wurden über 500 klinische Studien mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, davon mehr als die Hälfte auf dem Gebiet der Krebstherapie.

Die Struktur eines Antikörpers vom Typ Immunglobulin G (IgG) ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Antikörper bestehen aus zwei schweren Proteinketten (*heavy chain*, HC), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede schwere Kette ist wiederum mit einer leichten Kette (*light chain*, LC) verbunden. Das Fab-Fragment ist für die spezifische Antigenbindung verantwortlich, über das Fc-Fragment bindet der Antikörper an den Fc-Rezeptor, der wiederum von Immunzellen exprimiert wird. Des Weiteren verfügt der Antikörper über eine konstante Region, sozusagen das Grundgerüst (*Scaffold*), und eine Region variabler Aminosäuresequenzen, welche die Antigenpezifität des Antikörpers determinieren (CDR, *complementary determining regions*).

Monoklonale Antikörper können z. B. mit Hilfe der Hybridomatechnologie dargestellt werden [17]. Dabei werden Mäuse mit dem Antigen geimpft und anschliessend die

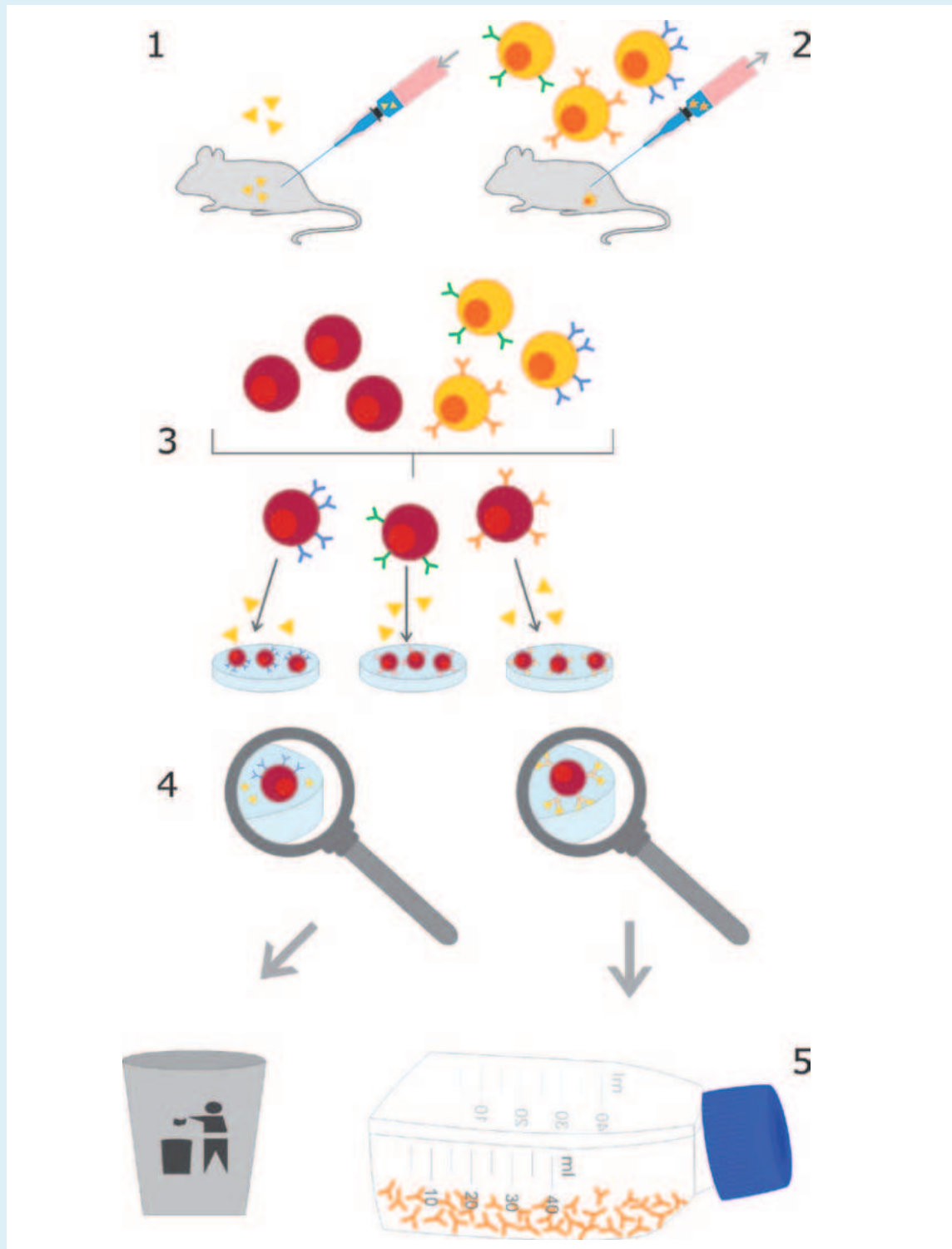
Antikörper produzierenden B-Zellen isoliert. Diese werden mit Krebszellen (Myelomazellen) fusioniert und die so entstandenen immortalisierten Antikörper produzierenden Zellen mit dem Antigen in Kontakt gebracht. Auf diese Weise lassen sich die Hybridomazellklone isolieren, welche die gesuchten antigenspezifischen Antikörper produzieren. Unter optimierten Bedingungen lassen sich Hybridomazellen auch für die industrielle Herstellung von Antikörpern verwenden. Die so erhaltenen Antikörper weisen eine murine Struktur auf und könnten bei Applikation am Menschen daher Immunreaktionen hervorrufen. Um dies zu vermeiden, wurden im Laufe der Zeit Antikörper mit mehr und mehr humaner Struktur entwickelt. Die Nomenklatur spiegelt dies und den Angriffsort des jeweiligen Antikörpers wieder (Kasten 4).

Kasten 3

Immunogenität therapeutischer Proteine

Die Immunogenität ist ein sehr wichtiger Faktor bei der Therapie mit Proteinarzneistoffen. Man nimmt heute an, dass praktisch alle rekombinanten Proteine, humanen Ursprungs oder nicht, Immunreaktionen auslösen. Die genauen Ursachen hierfür sind unbekannt, man vermutet aber, dass verschiedene Faktoren wichtig sind. Zu diesen gehören produktbezogene Faktoren wie die Mikroheterogenität der Proteinstruktur (siehe Abschnitt: Biosimilars), Verunreinigungen und das Vorhandensein von Aggregaten. Therapiebezogene Faktoren umfassen die Applikationsroute und -frequenz, die applizierte Dosis, die Therapiedauer, den Immunstatus des Patienten sowie etwaige Komedikationen.

Eine Methode, um die Immunogenität von Proteinarzneistoffen zumindest zu verringern, ist die so genannte «PEGylierung», d. h. die kovalente Bindung ein oder mehrerer Polyethylenglykolkoleküle an das Protein. Hierdurch werden zum einen etwaige antigene Epitope maskiert, zum anderen die Löslichkeit des Proteins durch das stark hydrophile Polymer erhöht und so die Aggregationsneigung reduziert. Es stellt sich ausserdem ein pharmakokinetischer Effekt ein: Durch das höhere Molekulargewicht wird die glomeruläre Filtration des PEGylierten Proteins in der Niere reduziert. Zusammen mit der erhöhten enzymatischen Stabilität und der erniedrigten Elimination durch Phagozyten weisen PEGylierte Proteine deshalb eine höhere Halbwertszeit als nicht-PEGylierte Proteine auf. Dies ermöglicht eine Reduktion der Applikationsfrequenz und Dosis dieser Moleküle. Es befinden sich bereits mehrere PEGylierte Proteinarzneistoffe wie Pegintron® oder Pegasys® auf dem Markt [10].

**Abbildung 3**

Schematische Darstellung der Antikörperproduktion mittels Hybridomatechnologie.

(1) Infektion der Maus mit einem Antigen und (2) Entnahme der Antikörper produzierenden B-Zellen. (3) Fusion mit Krebszellen. (4) Isolation des geeigneten Klon durch erneuten Antigen-Kontakt. (5) Antikörperproduktion.

Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

Aufgrund ihrer Struktur haben Antikörper zwei Wirkmechanismen. Das beim Brustkrebs eingesetzte Herceptin® (Trastuzumab) bindet zum einen über sein Fab-Fragment an den von Brustkrebszellen exprimierten Rezeptor für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (HER *human epidermal growth factor 2*). Die Interaktion von HER2 mit seinem Rezeptor wird somit kompetitiv gehemmt und das Tumorwachstum verzögert. Zum anderen wird das an den HER2-Rezeptor gebundene Herceptin® über das Fc-Fragment an NK-Zellen (*natural killer cells*) gebunden. NK-Zellen sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und können mit Antikörpern «dekorierte» Krebszellen erkennen. Die über den Fc-Rezeptor vermittelte, als *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) bezeichnete Interaktion löst die Apoptose und Zytolyse der betroffenen Krebszelle aus.

Die durch Antikörper ausgelösten Nebenwirkungen sind teilweise in ihrer Wirkweise begründet. So wurde Anfang des Jahrhunderts vom Aufflammen einer latenten Tuberkuloseinfektion bei Patienten berichtet, die mit antiinflammatorisch wirkenden Antikörperpräparaten (Remicade®, Enbrel®, Humira®) behandelt wurden. Alle drei Präparate sind zugelassen für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen wie z. B. der rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn. Ihr Wirkungsmechanismus beruht auf der Bindung an das inflammatorische Zytokin TNF-alpha, dessen Elimination so beschleunigt wird. TNF-alpha ist allerdings auch in der Eindämmung der latenten Tuberkulose involviert, eine Blockade und erhöhte Elimination des Zytokins resultierten folglich in einer Exazerbation der Infektion. Die am Markt befindlichen Antikörper sind letztendlich nicht die von Paul Ehrlich erträumten «magischen Kugeln» [18], die ihr Ziel, und nur dieses, automatisch finden. Das hat damit zu tun, dass von Antikörpern in der Krebstherapie erkannte antigene Strukturen (z. B. Rezeptoren) eben nicht nur im Tumor, sondern auch in gesundem Gewebe vorhanden sind. Deshalb sind Bestrebungen im Gange, die Spezifität von Antikörpern zu erhöhen und die Interaktion mit dem Immunsystem weiter zu verbessern. Zu den neuen Entwicklungen auf diesem Gebiet gehören bispezifische Antikörper, die gleichzeitig zwei unterschiedliche Targets erkennen und binden können, oder Antikörper-Toxin-Konjugate, die ein effektiveres Abtöten der Zielzelle erlauben sollen.

Kasten 4

Nomenklatur monoklonaler Antikörper

Die Bezeichnungen monoklonaler Antikörper bestehen aus mehreren Teilen:

- 1) Präfix (variabel)
 - t(u)-: verschiedene Tumoren
 - l(i)-: Immunsystem
 - s(o)-: Knochen
 - c(i)-: kardiovaskuläres System
 - k(i)-: Interleukine
- 2) Zielort
 - om-: murin
 - xi-: chimär
 - zu-: humanisiert
 - um-: human
- 3) Struktur
 - om-: murin
 - xi-: chimär
 - zu-: humanisiert
 - um-: human
- 4) Suffix
 - mab: monoclonal antibody

Auf -omab endende Namen bezeichnen vollständig murine Antikörper (z. B. Ibritumomab, Zevalin®), die Endung -ximab bezeichnet chimäre Antikörper (z. B. Cetuximab, Erbitux®), bei denen nur noch die variable Region eine murine Struktur aufweist. Humanisierte Antikörper weisen nur noch murine CDR-Regionen auf und enden auf -zumab (z. B. Trastuzumab, Herceptin®), und vollständig humane Antikörper enden auf -umab (z. B. Adalimumab, Humira®).

Biosimilars

Die Entwicklung neuer Arzneimittel ist ein langer und kostenintensiver Prozess, und nur ein geringer Prozentsatz der in der klinischen Entwicklung befindlichen Kandidaten wird zugelassen. Vor diesem Hintergrund erscheint die Herstellung von Generika von bereits zugelassenen Arzneimitteln nicht zuletzt als finanziell attraktiv. Die Zulassung von Generika erfolgt bei Proteintherapeutika wie auch bei chemisch synthetisierten Arzneimitteln nach Ablauf des Patentschutzes des Originalpräparates. In den letzten Jahren lief der Patentschutz einiger therapeutischer Proteine aus, sodass auch in diesem Bereich die Herstellung von «Follow-up Biologics» unternommen wurde. Allerdings wurde sehr bald erkannt, dass sich therapeutische Proteine grundlegend von kleinenmolekularen Arzneistoffen unterscheiden.

Up- und downstream-Verfahren sind sehr komplizierte Prozesse, die für jedes Protein spezifisch und durch den Produzenten optimiert sind. Eine Veränderung der Produktionsbedingungen, z. B. durch Wechsel der Nährmedien oder des Zellklons, oder sogar nur des Produktionsstandortes, kann zu strukturellen Veränderungen des Proteins führen, welche sich negativ auf dessen Wirksamkeit und Sicherheit auswirken können: *Der Prozess ist das Produkt*. Aufgrund der komplizierten Struktur von Proteinen kann ein Produkt, das durch zwei auch nur

geringfügig unterschiedliche Prozesse hergestellt wird, niemals identisch sein. Da die Einzelheiten des Produktionsprozesses weitgehend nur dem Produzenten bekannt sind, lässt sich ein therapeutisches Protein auch nicht «kopieren», also als Generikum herstellen. Hinzu kommt, dass mögliche durch einen Produktionsprozess dargestellte Proteinvariationen (Mikroheterogenität) mannigfaltig sind. So können sich z. B. beim t-PA (*tissue plasminogen factor*) 10⁹ verschiedene Varianten ergeben (Georg-Burkhard Kresse, Roche).

Bei den Nachahmerprodukten therapeutischer Proteine wird daher auch von «Biosimilars», und eben nicht von «Biogenerika» gesprochen. Sowohl die europäische Arzneimittelbehörde (EMA) als schliesslich auch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) haben sich diese Definition zu Eigen gemacht. In Europa unterliegt die Zulassung von Biosimilars strikten Regeln. Zwar han-

delt es sich im Vergleich zu Originalprodukten um ein vereinfachtes Verfahren, dennoch muss das Dossier die Dokumentation der Phasen I und III und einen 5-jährigen Risk Management Plan für die Phase IV (Pharmakovigilanz) umfassen. Die klinischen Studien müssen als Vergleichsubstanz ein Originalprodukt mit demselben Inhaltsstoff verwenden. Darüber hinaus muss das Biosimilar dieselbe pharmazeutische Darreichungsform, Dosis, Applikationsroute und Indikation aufweisen wie das zum Vergleich herangezogene Originalprodukt. In der Schweiz hat sich die Swissmedic der Regelung der EMA angeschlossen. Auf dem europäischen Markt sind zurzeit etwa ein Dutzend Biosimilars zugelassen (Tabelle 2).

Angesichts des zuvor beschriebenen Interesses an monoklonalen Antikörpern verwundert es nicht, dass auch Biosimilars dieser Stoffklasse sich in der aktuellen Entwicklung befinden.

Tabelle 2

Auf dem europäischen Markt befindliche Biosimilars (Stand 2011)

Biosimilar	Hersteller	Zulassungsdatum	Zugelassen in	
			Schweiz	Deutschland
Inhaltsstoff: Epoetin alfa				
Abseamed®	Medice Arzneimittel	08/2007	X	X
Binocrit®	Sandoz	08/2007	X	
Epoetin alfa Hexal®	Hexal Biotech	08/2007		X
Inhaltsstoff: Epoetin zeta				
Retacrit®	Hospira	12/2007		X
Silapo®	STADA	12/2007		X
Inhaltsstoff: G-CSF (Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor)				
Biograstim®	CT Arzneimittel	09/2008		X
Filgrastim Hexal®	Hexal Biotech	02/2009		X
Nivestim™	Hospira Enterprises	06/2010		X
Ratiograstim	Ratiopharm	09/2008		X
Tevagrastim®	Teva	09/2008		X
Zarzio®	Sandoz	02/2009	X	
Inhaltsstoff: Somatotropin				
Omnitrope®	Sandoz	04/2006	X	X

Therapeutische Proteine: Zurück zur Natur?

Fazit

Die Anwendung von therapeutischen Proteinen kann gesehen werden als die Ausnutzung von Mechanismen, welche die Natur uns vorgegeben hat. Dabei haben wir aber auch lernen müssen, dass die durch Proteine gesteuerten Prozesse sehr komplex und grösstenteils redundant sind. Um zu einer rationalen und effizienten Anwendung von Proteinarzneistoffen in der Therapie schwerer Erkrankungen zu gelangen, bedarf es eines tiefen Verständnisses der Struktur von Proteinen und ihrer Wechselwirkungen mit biologischen Systemen. Von einer ausreichenden Beschreibung dieser Sachverhalte und deren Umsetzung in therapeutische Konzepte sind wir allerdings noch weit entfernt. Oder wie Paracelsus es ausdrückte [19]: «Die Natur ist die Erz-Chemikerin, und wir müssen ihr nacheifern, sonst sind wir nur Küchenschlampen.»

Literatur

Das komplette Literaturverzeichnis finden Sie auf www.online-academy.ch



Gerrit Borchard

Prof. Dr. phil. nat. Gerrit Borchard (geb. 1963); 1985-1989 Pharmaziestudium an der Universität Frankfurt am Main; 1990-1993 Dissertation an der Universität Frankfurt und der University of Kansas (Lawrence, KS, USA); 1994-1995 Post-doc an der Universität Leiden (Niederlande); 1995-1997 Hochschulassistent an der Universität des Saarlandes; 1998-2002 Assistenzprofessur am Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) der Universität Leiden; 2002-2003 Tenured Associate Professor am LACDR; 2003-2005 Vice President Research, Enzon Pharmaceuticals, Inc. (Piscataway, NJ, USA); seit 2005 Professor für Biopharmazeutische Wissenschaften an der Universität Genf und Wissenschaftlicher Direktor des Centre Pharmapeptides in Archamps (Frankreich).

Prof. Dr. Gerrit Borchard
Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne (EPGL)
Université de Genève
30, quai Ernest Ansermet
1211 Genève
gerrit.borchard@unige.ch