

○ **Abb. 1.2** Schritte im Produktionsprozess eines rekombinanten Proteins. Nach Rais 2012

Zulassung eines rekombinanten Wirkstoffs sind alle Schritte eines solchen Produktionszyklus umfassend zu dokumentieren. Die Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs an rekombinant hergestellte Arzneistoffe werden auf ▶ Seite 7 näher fokussiert.

Verwendete Wirtsorganismen

Die für eine DNA-rekombinationstechnische Herstellung von Arzneistoffen genutzten Wirtsorganismen sind alle im gegenseitigen Vergleich mit bestimmten Vorteilen sowie Nachteilen assoziiert. Die wichtigsten Wirtszellarten sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden.

Bakterielle Wirtszellen. Insbesondere *E. coli* Zellen sind durch die vielfältigen Erfahrungen mit diesem sehr einfachen System hinsichtlich Transfektionsfähigkeit sowie Kultivierbarkeit mit hohen Produktausbeuten von großem Vorteil. Nachteilig jedoch ist, dass die bakterielle „Maschinerie“ zur Proteinherstellung gegenüber der in eukaryotischen Zellen deutlich einfacher ausgeprägt ist, sodass resultierende Proteine oftmals in ihrer Struktur nicht dem humanen Vorbild entsprechen. Dies betrifft insbesondere verschiedene Schritte der sog. **posttranslationalen Modifikation**, also

Veränderungen am synthetisierten Protein aufbauend auf einer fixierten Primärstruktur. Dies sind z.B. Glykosylierungsreaktionen, die von Bakterien grundsätzlich nicht durchgeführt werden können. Es muss also bei der Auswahl eines Wirt-Vektor-Systems beurteilt werden, inwieweit Glykosylierungen essentiell für die Funktion des betreffenden Proteins sind und ob diese nach Herstellung in *E. coli* noch nachträglich in seine Struktur einzufügen sind.

Hefezellen. Die Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind ebenfalls leicht zu kultivieren und sicher im Umgang, was zu guten Produktausbeuten führt. Posttranslationale Modifikationen können in Hefezellen erfolgen, aber oftmals sind auch hier die resultierenden Proteine nicht mit den humanen Vorbildern in ihrer dreidimensionalen Struktur identisch.

Säugetierzellen. Bei diesen wird insbesondere auf die Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) als eine experimentell leicht zu transfizierende Zelle zurückgegriffen. Als Säugetierzellen zeigen diese bei weitem nicht die Proliferationsraten von Bakterien- oder Hefezellen, daher ist die Kultivierung deutlich anspruchsvoller und aufwendiger. Dafür sind die Strukturen der Produkte einschließlich der

2

Anwendungsgebiete für Biologicals – ein Überblick

Prof. Dr. Martina Düfer

Biologicals werden heute in mehr als 20 Indikationsgebieten eingesetzt. Aufgrund des immer tieferen Wissens über Proteine mit Signalfunktion sowie der kontinuierlichen Weiterentwicklung und Optimierung der technischen Möglichkeiten ist damit zu rechnen, dass sich das Anwendungsspektrum für biopharmazeutisch hergestellte Arzneistoffe weiter ausdehnt.

Auf den Internetseiten des Wirtschaftsverbandes forschender Pharma-Unternehmen (vfa) stehen fortlaufende Listen der aktuell in Deutschland zugelassenen Biologicals und Biosimilars zu Verfügung. Im Folgenden findet sich ein strukturierter Überblick über die verschiedenen Einsatzgebiete dieser Arzneistoffe.

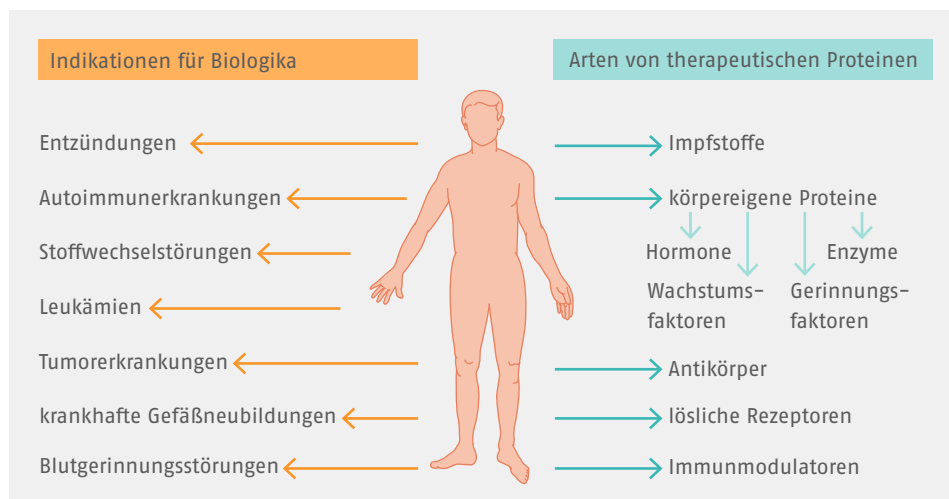
Darüber hinaus spielt die rekombinante Proteinherstellung natürlich auch in vielen anderen Bereichen eine wichtige Rolle. Beispiele hierfür sind die Lebensmittelproduktion, die Textilherstellung oder die Produktion von Detergenzien. Hier sind es in der Regel Enzyme, die durch gentechnische Veränderungen für das jeweilige Einsatzgebiet optimierte Eigenschaften erhalten.

Die Fülle der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe wird sich in den nächsten Jahren zusätzlich dadurch erweitern, dass der Patentschutz für immer mehr Originatorpräparate ausläuft. Wegen des großen Marktpotenzials der Biologika (► Kap. 1, ► Kap. 9) sind viele Unternehmen bestrebt, in diesem Bereich Biosimilars zu entwickeln.

Die Anwendungsgebiete für Biologika kann man vereinfacht drei Bereichen zuordnen:

- Impfstoffe (z. B. gegen Hepatitis-B oder humane Papillom-Viren),
- Arzneistoffe zum Ersatz körpereigener Proteine (z. B. Insulin, Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren),
- Arzneistoffe, die gezielt in pathologisch veränderte Signalwege eingreifen (z. B. Antirheumatika, Hemmstoffe der Angiogenese, viele Tumorthapeutika).

Ein weiteres, für die Medizin wichtiges Gebiet, sind rekombinante Proteine, die als Diagnostika verwendet werden (z. B. Antikörper gegen Tumormarker oder zur Bestimmung von Hormonkonzentrationen). Der letztgenannte Bereich unterscheidet sich insofern von den anderen Gruppen, dass sie *ex vivo*, also außerhalb des Organismus, zum Einsatz kommen und daher keines der aufwändigen Zulassungsverfahren durchlaufen müssen. Die Abgrenzungen zwischen den Gruppen sind nicht immer eindeutig zu treffen. Beispielsweise dient Humaninsulin bei Patienten mit Typ-1-Diabetes mellitus dem Ersatz des vom Körper überhaupt nicht mehr produzierten Hormons. Insulin-Analoga gehen jedoch über einen reinen Ersatz hinaus, da die veränderten



● **Abb. 2.1** Einteilung der Biologika: wichtige Targets und Krankheiten

pharmakokinetischen Eigenschaften auch zu veränderten Wirkprofilen führen (► Kap. 3).

In den folgenden Abschnitten sind die derzeit auf dem Markt verfügbaren Biologicals, untergliedert nach ihrem wichtigsten Anwendungsgebiet oder Gruppenkennzeichen, erläutert. Auf Diagnostika wird nicht weiter eingegangen, da es sich hierbei nicht um Therapeutika handelt.

Biologicals als Impfstoffe

Schon seit jeher nimmt die Produktion von Impfstoffen eine Sonderstellung auf dem Arzneimittelmarkt ein. Zum einen ist das zu verarbeitende Material in bestimmten Stadien der Produktionskette infektiös, zum anderen bestehen die Ausgangsmaterialien aus Anteilen oder Flüssigkeiten lebender Organismen. Dies bringt besondere Anforderungen hinsichtlich der Arzneimittelsicherheit und der Qualitätskontrolle mit sich. Rekombinante Verfahren werden inzwischen auch bei der Impfstoffherstellung eingesetzt. Damit lassen sich beispielsweise Probleme, die durch Verunreinigungen des aus dem Wirtsorganismus gewonnenen Materials entstehen (Allergenität, ungewollte Übertragung von Viren etc.), verhindern.

In Deutschland sind momentan folgende, mittels Rekombinationstechnik hergestellte, Impfstoffe zugelassen:

Hepatitis-A/B-(rDNA)-Impfstoff. Produzierende Wirtsorganismen sind Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* und *Hansenula polymorpha*). Die Gruppe der rekombinant hergestellten Hepatitis-Impfstoffe gliedert sich in verschiedene Kombinationen:

- Impfstoff gegen Hepatitis A/B (Twinrix[®], GlaxoSmithKline),
- nur gegen Hepatitis B gerichteter Impfstoff (Fendrix[®], GlaxoSmithKline, HBVAXPRO[®], Sanofi Pasteur MSD),
- Kombinationsimpfstoff, bei dem die gegen Hepatitis B gerichtete Komponente rekombinant hergestellt wird (Hepatitis B/Diphtherie/Keuchhusten/Polio/Hämophilus influenzae b: Infanrix hexa[®], GlaxoSmithKline, Hexyon[®], Sanofi Pasteur).

Pneumokokken-Konjugat-Impfstoff (Synflorix[®]). GlaxoSmithKline. In *Escherichia coli* werden 10 unterschiedliche Pneumokokkenpolysaccharide, entsprechend den Serotypen 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F und 23F produziert. Diese Kombination umfasst die häufigsten in Europa vorkommenden durch Pneumokokken verursachten Erkrankungen.

Impfstoff gegen humane Papillom-Viren (Cervarix[®]). GlaxoSmithKline. In der Insektenzelllinie Hi-5-Rix4446 wird das Virusstrukturprotein L1 der Virenstämme HPV (humane Papillom-Viren) 16 und HPV 18 rekombinant hergestellt. Diese beiden Virustypen gelten von den über 100 bekannten Papillom-Viren als Hochrisiko-Stämme für die Entwicklung eines Cervixkarzinoms.

Orale Cholera-Impfstoff (Dukoral[®]). GlaxoSmithKline. Für diesen Impfstoff wird die B-Untereinheit des Cholera-toxins (rCTB) in *Vibrio cholerae* produziert.

Impfstoff gegen Meningokokken B (Bexsero[®]). GlaxoSmithKline. Der Impfstoff besteht aus den zwei Fusionsproteinen Neisseria-Heparin-bindendes Antigen (NHBA) und Faktor-H-bindendes Protein (fHbp) sowie dem Neisserien-Adhäsion A (NadA). Die drei Proteine werden in *Escherichia coli* produziert. Zudem sind im Impfstoff noch Vesikel enthalten, die das als Antigen wirkende Protein Porin-A (PorA P4.1) in der äußeren Membran tragen.

Ein ganz anderer Indikationsbereich eröffnet sich, wenn man den Gedanken verfolgt, die Impfstrategie gegen körpereigene, fehlgesteuerte Tumorzellen einzusetzen. Der Forschungsansatz Tumorzellen durch eine Art Vakzinierung zu bekämpfen ist schon alt, hat aber bisher keinen durchschlagenden Erfolg verzeichnen können. Von den verschiedenen Möglichkeiten, eine gerichtete Immunantwort auszulösen, hat es bisher nur das T-Zell-aktivierende Fusionsprotein Sipuleucel-T zur Marktreife gebracht.

Sipuleucel-T (Provenge[®]). Dendreon. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein der Prostata-spezifischen sauren Phosphatase (PAP) und dem humanen Glykoprotein GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Werden mit diesem Protein vom Patienten entnommene Immunzellen *ex vivo* ca. 2 Tage lang inkubiert, entwickeln sich gegen PAP gerichtete T-Zellen. Da über 90% der Tumorzellen bei einem Prostatakarzinom PAP-positiv sind, kann bei Rückinfusion der induzierten T-Zellen eine gezielte Immunantwort gegen entartete Zellen einsetzen. Im September 2013 wurde Sipuleucel zur Behandlung von Patienten mit metastasierendem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom zugelassen, das IQWiG bescheinigte schließlich einen „Hinweis auf Zusatznutzen“. Aus nicht näher erläuterten Gründen hat der Hersteller Anfang 2015 die Rücknahme der Zulassung veranlasst.

Pipeline: zellbasierte Tumorimpfstoffe

Die Idee der Tumorzellimpfung kann neben der oben beschriebenen Methode noch durch viele andere Verfahren erreicht werden. Da autologe Techniken teuer und aufwändig sind, wird versucht Tumorzelllinien genetisch so zu verändern, dass sie selbst keine negativen Effekte im Körper auslösen, aber an ihrer Oberfläche bestimmte Markerproteine exprimieren. Diese allogenen, also nicht von der erkrankten Person selbst stammenden, Zellen werden dem Patienten verabreicht und sollen das Immunsystem so aktivieren, dass auch die körpereigenen Tumorzellen als fremd erkannt werden. Die Besonderheit ist, dass an der Membranoberfläche der vorab modifizierten Tumorzellen nicht nur ein, sondern mehrere tumorassoziierte Antigene exprimiert werden können. Daher ist eine Adaptation des Systems durch Mutationen weniger wahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit

5

Biologicals zur Unterdrückung der Angiogenese

Prof. Dr. Martina Düfer

Angiogenese beschreibt den Prozess der Neubildung von Gefäßen. Während der Embryonalphase entstehen ab Woche drei die ersten Blutgefäße, nach und nach entwickeln sich Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Bindegewebe. Aus einem zunächst kapillären System entsteht ein komplexes Netzwerk. Beim Erwachsenen ist die Neubildung von Blutgefäßen an besondere Situationen geknüpft und in der Regel regional begrenzt, wie z. B. die zyklusabhängige Proliferation des Endometriums, die Ausbildung eines plazentaren Blutkreislaufs während der Schwangerschaft oder Gefäßveränderungen im Rahmen eines Wundheilungsprozesses. Gefäßneubildung kann aber auch pathologische Prozesse unterstützen. Als Angiogenesehemmer wirkende Biologika spielen eine wichtige Rolle in der Tumorthherapie sowie bei krankhaften Veränderungen der Gefäßbildung im Auge.

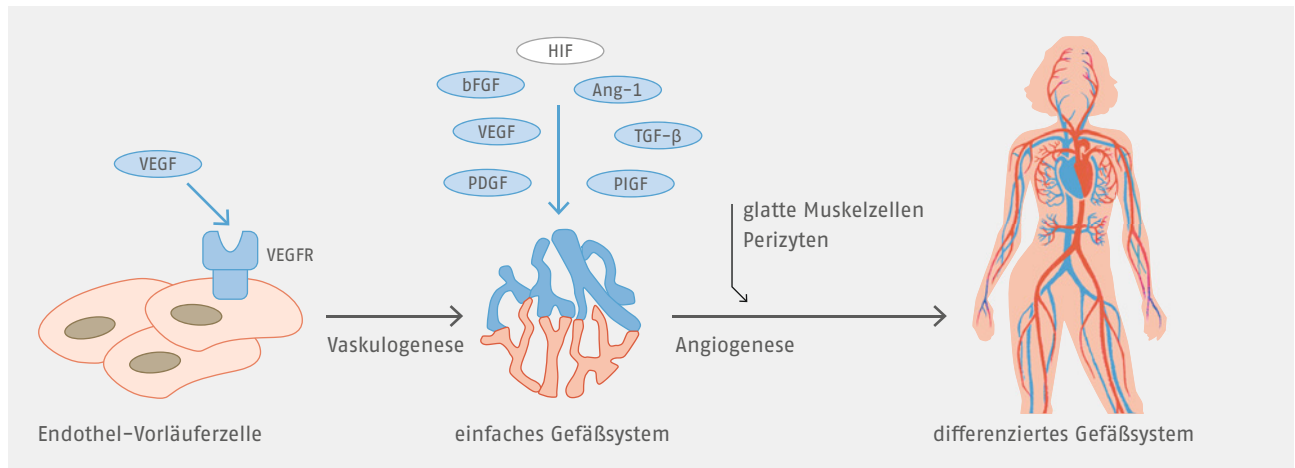
Grundprinzipien der Angiogenese

Bei der Gefäßneubildung werden Ausstülpungen des Endothels, das Durchbrechen der bestehenden Gefäßwand und die Ausreifung zu einem neuen Gefäßzweig durch viele Faktoren gesteuert. Hierzu gehören endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) sowie Faktoren zum enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix (Matrix-Metalloproteasen, Cathepsine uvm.).

Für die Stimulierung der Gefäßneubildung ist häufig ein Mangel an Sauerstoff der entscheidende Faktor. In Zellen, in denen Sauerstoffmangel herrscht, steigt die Konzentration des Hypoxie-induzierten Faktors HIF- α (*hypoxia-inducible factor α*). HIF- α und HIF- β sind Transkriptionsfaktoren, welche die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*, oft auch nur als VEGF bezeichnet) anregen. Beide HIFs werden normalerweise konstant gebildet, da HIF- α aber bei physiologischer intrazellulärer Sauerstoffkonzentration schnell abgebaut wird, entsteht kein Transkriptionskomplex, der mit der DNA interagieren könnte. Bei Hypoxie ändert sich dies. Die intrazelluläre HIF- α -Konzentration steigt und nach Translokation des HIF- α/β -Komplexes in den Kern wird der für VEGF-A codierende DNA-Abschnitt vermehrt abgelesen. Freigesetzter VEGF-A bindet an VEGF-Rezeptoren, die z. B. an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert sind. Von den drei bekannten VEGF-Rezeptoren ist für die Angiogenese vor allem der Rezeptor-Subtyp VEGFR-1 von Bedeutung.

Die VEGF-Familie umfasst beim Menschen fünf Glykoproteine. Neben dem bereits erwähnten VEGF-A sind noch VEGF-B, -C und -D sowie PlGF (*placental growth factor*) bekannt. Von VEGF-A werden durch alternatives Splicing oder partielle Proteolyse mehrere Subtypen unterschiedlicher Länge gebildet (z. B. VEGF-165, das in der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration eine Rolle spielt). VEGFs binden als Dimere mit unterschiedlicher Affinität an ihre Rezeptoren (VEGFR-1, -2 und -3): VEGF-A bindet an VEGFR-1 und -2, VEGF-B und auch PlGF binden nur an VEGFR-1, VEGF-C und -D binden nur an VEGFR-3. Durch Anlagerung an extrazelluläre Domänen der membranständigen Rezeptorproteine wird deren Dimerisierung induziert. Dadurch erhält der Rezeptor eine Tyrosinkinaseaktivität und kann Auto- oder Heterophosphorylierungen durchführen (► Seite 29). Von den über VEGF/VEGFR-vermittelten Signalwegen sind für die Angio- und Vaskulogenese vor allem VEGFR-2 vermittelte Prozesse zuständig. VEGFR-3 spielt für die Lymphangiogenese eine wichtige Rolle.

Weitere Wachstumsfaktoren, welche die Blutgefäß- und teilweise auch die Lymphgefäßbildung fördern, sind: der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF-2 (*fibroblast growth factor 2* oder auch als bFGF, *basic fibroblast growth factor*, bezeichnet), der aus Bindegewebszellen stammende HGF (*hepatocyte growth factor*), der plättchenaktivierende Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*) und der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor β*) (◉ Abb. 5.1). Die Integrität eines bestehenden Blutgefäßes wird über das Glykoprotein Angiopoietin-1 aufrechterhalten. Neben o.g. Wachstumsfaktoren haben auch Interleukine, z. B. IL-8 (syn. CXCL8), pro-angiogenetische Wirkungen.



• **Abb. 5.1** Angiogenese: schematischer Ablauf und regulierende Faktoren

Definitionen

Folgende Begriffe sind bei der Gefäßneubildung zu unterscheiden:

Vaskulogenese beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen ausgehend von zirkulierenden Angioblasten, die sich zu Endothelzellen differenzieren. Vaskulogenese findet während der Embryonalentwicklung statt. Ein erstes primitives Gefäßsystem entsteht noch, bevor das Herz zu schlagen beginnt.

Als **Angiogenese** bezeichnet man die Bildung von neuen Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen. Sie setzt beim sich entwickelnden Organismus mit Beginn der Blutzirkulation ein. Sauerstoffmangel stimuliert die Angiogenese, nicht durchblutete Gefäße werden zurückgebildet. Im Blut zirkulierende Vorläuferzellen können ebenfalls beteiligt sein. **Perizyten** und glatte Muskelzellen wandern zum Endothel und aus dem zunächst einfachen Gefäßsystem wird ein komplexes Netzwerk, differenziert in Kapillaren, Arterien und Venen (•Abb. 5.1). Im adulten Organismus spielt Angiogenese vor allem bei krankhaften Prozessen eine Rolle, von denen in diesem Kapitel Tumor- und Augenerkrankungen von besonderer Bedeutung sind.

Die Bildung von Lymphgefäßen wird als **Lymphangiogenese** bezeichnet und beginnt in der Embryonalphase in engem Zusammenhang mit der Vaskulogenese. Lymphgefäße entstehen vermutlich aus Aussprossungen der Embryonalvenen. Später sind lymphatisches und venöses System nur noch an wenigen Stellen im Kontakt, z. B. an der Schlüsselbeinvene, in Leber und Niere. Über die Mechanismen, die zur Bildung neuer Lymphgefäße beim Erwachsenen führen, ist wenig bekannt. Bei Tumorerkrankungen ist die pathologische Lymphangiogenese ein wichtiger Faktor für die Metastasierung über Lymphknoten und Lymphgefäße.

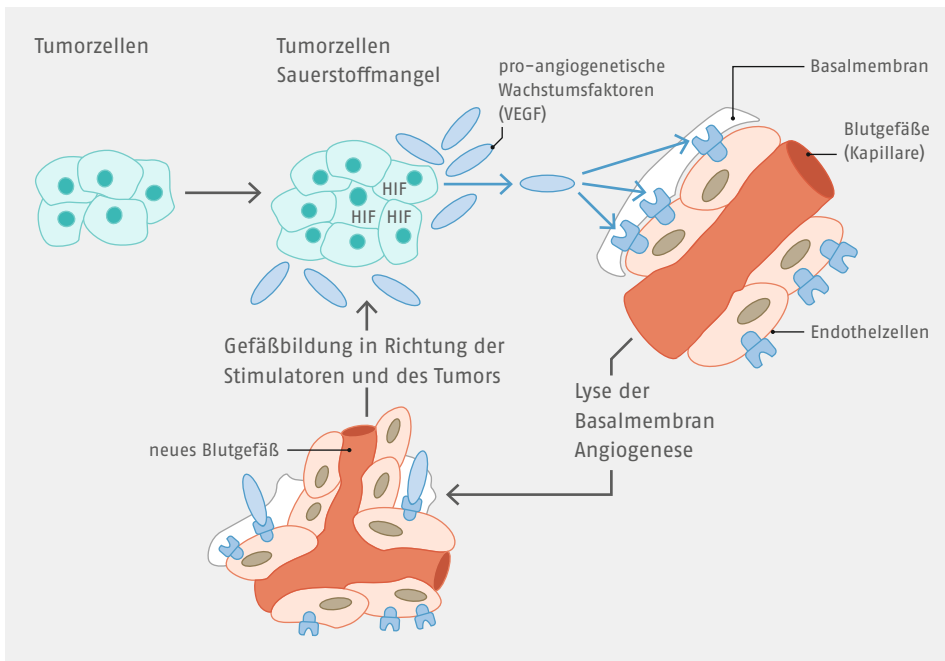
Angiogenese bei krankhaften Prozessen

Blutgefäße stellen die Gewebeversorgung sicher, daher wird bei zahlreichen Erkrankungen, die mit einer Umstrukturierung von Gewebe verbunden sind, auch das Wachstum von Gefäßen initiiert. Prinzipiell ist diese Tatsache an sich nichts Negatives. So ist beispielsweise die Bildung von Kollateralfäßen bei Herzerkrankungen eine sehr sinnvolle Reaktion des Körpers: Sind Koronargefäße durch arteriosklerotische Prozesse so verändert, dass die kardiale Sauerstoffversorgung nicht mehr ausreichend ist, bilden sich innerhalb der größeren Koronararterien Umgehungskreisläufe, sogenannte Kollateralen. Genau genommen spricht man hier nicht von Angiogenese, sondern von Arteriogenese, da es sich um arterielle Gefäße handelt. Auch im Zuge der Umstrukturierung nach einem Myokardinfarkt können solche Kollateralen entstehen. Sie bewirken im Idealfall trotz massiver Schäden eine ausreichende Versorgung des Herzmuskels, sind also positive Schutzmechanismen des Körpers. Allerdings wird durch die Neovaskularisierung häufig nicht wie gewünscht, die durch die Grunderkrankung gestörte Funktionalität eines Zellverbands wiederhergestellt, sondern das betroffene Organ wird funktionell noch weiter eingeschränkt.

Im Folgenden werden wichtige Erkrankungen vorgestellt, bei denen die Neubildung von Gefäßen und der Einsatz von anti-angiogenetisch wirksamen Biologicals eine entscheidende Rolle spielen.

Angiogenese bei Tumorerkrankungen

Die Entdeckung, dass Tumore ihre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherstellen, indem sie Angiogenese-induzierende Signalmoleküle freisetzen, leitete einen revolutionären Fortschritt in der Tumorthherapie ein. Schon Anfang der 70er Jahre wurde postuliert, dass Tumore ab einer Größe von über 2 Millimetern Anschluss an das Gefäßsystem brauchen, um sich zu versorgen und weiter zu wachsen, weil Dif-



● **Abb. 5.2** Tumor-induzierte Angiogenese

fusionsprozesse alleine nicht mehr ausreichen. Analog zu den oben beschriebenen Mechanismen, führt Hypoxie in der Tumorzelle zur Ausschüttung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF-A, PDGF oder FGF-2 (●Abb.5.2). Infolge dessen entsteht ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren, wobei die wachstumsanregenden Stimuli überwiegen. Dies löst in den angrenzenden Gefäßen Angiogenese aus. Die neu gebildeten Blutgefäße dringen letztendlich ins Tumorgewebe ein und dieses wird wieder adäquat versorgt. Lösen sich nun Tumorzellen ab und wandern ins Gefäßsystem ein, ist das Risiko für eine Metastasenbildung extrem hoch. Von einer Blockade der Angiogenese lässt sich also erhoffen, dass die Tumorproliferation gehemmt und die Metastasierungsfahr verringert wird.

Gefäßneubildung bei Erkrankungen des Auges

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die Hauptursache für schwere Einbußen der Sehschärfe bei Älteren. Vor dem Glaukom und der diabetischen Retinopathie werden durch die AMD die meisten Neuerblindungen ausgelöst. Kennzeichnend ist die im Zentrum des Gesichtsfelds beginnende Abnahme des Sehvermögens. Da die Erkrankung langsam und schmerzfrei verläuft, wird sie selten in frühen Stadien diagnostiziert. Ursache sind Ablagerungen (Drusen) in der Pigmentschicht unter der Netzhaut, sodass Gewebeveränderungen entstehen. Dies führt unter anderem dazu, dass im Bereich der Makula (*Macula lutea*, gelber Fleck, Stelle des schärfsten Sehens) die Pigmentschicht immer weiter verändert wird. Steht eine Gewebeatrophie im Vordergrund, spricht man von einer **trockenen AMD**. Diese ist momentan nicht kausal therapierbar. Bei einer weiteren Form der AMD bilden sich unter der Netz-

haut neue Gefäße, die unkontrolliert wachsen und nicht stabil sind. Man bezeichnet dies als **choroidale Neovaskularisation (CNV)**, da die Angiogenese von der Aderhaut (*Choroidea*) ausgeht. Da aus diesen Blutgefäßen Flüssigkeit austritt, was zur Bildung von Ödemen unterhalb der Netzhaut führt, wird diese Krankheitsform auch als **feuchte, exsudative oder neovaskuläre AMD** bezeichnet. Die Therapie mit Angiogenesehemmern ist bei der feuchten AMD heutzutage die Option erster Wahl.

Diabetische Retinopathie

Die bei einer schlechten Blutzucker-Einstellung entstehende Folgeerkrankung ist eine langsam fortschreitende, nicht entzündliche Veränderung der Netzhaut. Bei Personen im erwerbsfähigen Alter ist sie die häufigste Erblindungsursache. Es sind mehrere Faktoren für die Netzhautschädigung bekannt: so wird in den die retinalen Blutgefäße umgebenden Perizyten Glucose bei einem Überangebot zu Sorbitol und Fruktose metabolisiert. Als Folge steigt osmotisch bedingt die Wasseraufnahme und die Zellen werden in ihrer Funktion gestört. Glucose und andere reduzierende Zucker können mit Proteinen intra- und extrazellulär (Basalmembranen der Kapillaren!) reagieren (nicht-enzymatische Glykierung) und es entstehen sog. AGEs (*advanced glycation endproducts*), welche die Funktion der betroffenen Struktur einschränken. Außerdem entsteht in den Zellen aus der Glykolyse durch den gesteigerten Substratumsatz vermehrt Diacylglycerol. Über die nachgeschaltete Aktivierung der Proteinkinase C ändert sich die Zellproliferation und es wird unter anderem auch die Bildung von VEGF-A und TGF- β stimuliert. Schlussendlich wird die Kapillarstruktur der Netzhaut zerstört, es können Ödeme und eine unstrukturierte Gefäßneubildung entstehen. Verschiedene Formen der Erkrankung sind: die **nicht-proliferierende diabetische Retinopathie** ohne Makulaödem, die **proliferative diabeti-**

sche **Retinopathie**, bei der die Neovaskularisierung ein charakteristisches diagnostisches Merkmal ist und das **diabetische Makulaödem**, bei dem vor allem die zentrale Sehschärfe betroffen ist. Bei Letzterem sind neben der Laserkoagulation auch Angiogenesehemmer indiziert.

Neben den gerade beschriebenen Krankheitsbildern könnten sich die Einsatzmöglichkeiten für anti-angiogenetische Biologicals künftig noch erweitern. Man weiß, dass auch bei entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises Angiogenese einen negativen Einfluss hat. Die Gelenkfunktion wird bei **rheumatoider Arthritis** unter dem Einfluss von Entzündungsfaktoren durch Bindegewebswucherungen der Gelenkinnenhaut (Synovialis) stark beeinträchtigt (Pannusbildung). Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein sehr früher histologischer Befund, der das Entzündungsgeschehen in der Synovia fördert. Die erhöhte Gefäßdichte scheint unter anderem dazu beizutragen, dass Entzündungszellen die betroffene Region infiltrieren.

Gegen VEGF gerichtete Angiogenesehemmer

Die wichtigste Strategie, um den Prozess der Angiogenese aufzuhalten, besteht in einem Eingriff in die durch VEGF vermittelten Signalwege, da VEGF in alle Phasen der Gefäßneubildung involviert ist. Es werden zwei grundsätzliche Ansätze angewandt: eine Blockade der VEGF-Rezeptoren (v. a. VEGFR-2) durch Substanzen ohne intrinsische (d. h. ohne eigene stimulatorische) Aktivität, z. B. **Ramucirumab**, oder ein Abfangen von VEGF durch andere Bindungspartner und damit einhergehend die Inaktivierung des Wachstumsfaktors. Um VEGF abzufangen wurden monoklonale Antikörper entwickelt, z. B. **Bevacizumab** und **Ranibizumab**, VEGF-Rezeptorfragmente, z. B. **Aflibercept**, oder mit VEGF interagierende RNA-Oligonukleotide, sog. Aptamere wie **Pegaptanib**. Schlussendlich unterbleibt bei allen Verfahren die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren, sodass der wachstumsfördernde Reiz an den Endothelzellen unterdrückt wird.

UPDATE

Einen Hinweis, wie die Arzneistoffe mit dem VEGF-Signalweg interagieren, gibt die INN-Nomenklatur (► Kap. 1).

- Bevacizumab, Ranibizumab: Endung „-zumab“ für humanisierte monoklonale Antikörper,
- Ramucirumab: Endung „-umab“ für humane monoklonale Antikörper,
- Aflibercept: Endung „-cept“ für Rezeptorfragment,
- Pegaptanib: Namensbestandteil „-apta-“ für Aptamer.

Bevacizumab (Avastin®). Genentech/Roche. Der humanisierte monoklonale IgG₁-Antikörper richtet sich gegen

VEGF-A (◉ Abb. 5.3 A). Er wird aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen und besteht zu 93 % aus humanen und zu 7 % aus murinen Sequenzen. Letztere umfassen die CDR-Regionen des variablen Teils. Bevacizumab wurde 2004 als erster Angiogenesehemmer überhaupt zugelassen. Die Indikation der Erstzulassung (metastasierendes Kolonkarzinom) wurde nach und nach auf viele weitere Tumorentitäten erweitert (► Seite 39). Völlig zu Recht gilt das Konzept der Angiogenesehemmung auch heute noch als bedeutsamer und innovativer Fortschritt in der Tumorthherapie. Bevacizumab wird auch „off label“ bei altersbedingter feuchter Makuladegeneration (AMD) und bei Makulaödem eingesetzt (► Seite 40, 42).

Ranibizumab (Lucentis®). Entwicklung durch die Roche-Tochterfirma Genentech, weltweite Vermarktung mit Ausnahme Nordamerikas durch Novartis. Bei Ranibizumab handelt es sich nicht um einen kompletten Antikörper, sondern um ein humanisiertes monoklonales Antikörperfragment. Es wurde ausgehend von Bevacizumab entwickelt, richtet sich also ebenfalls gegen VEGF-A und bindet alle Isoformen dieses Wachstumsfaktors (◉ Abb. 5.3 B). Der Fc-Teil des Antikörpers wurde eliminiert, das verbleibende Fab-Teilstück besteht aus einer 214 Aminosäuren langen leichten Kette, die C-terminal über eine Disulfidbrücke an eine aus 231 Aminosäuren aufgebaute schwere Kette gebunden ist. Die Synthese des nicht glykosylierten Proteins erfolgt gentechnisch in *Escherichia coli*. Das affinitätsgereifte IgG₁-Antikörperfragment, das sich im Fab-Teil in 6 Aminosäuren von seinem Vorgänger Bevacizumab unterscheidet, hemmt die durch VEGF induzierte Proliferation des Endothels etwa 10- bis 20-mal stärker als Bevacizumab. Seit 2007 ist Ranibizumab zur Therapie der feuchten AMD, seit 2011 auch zur Behandlung der diabetischen Retinopathie mit Makulaödem zugelassen (► Seite 40–42).

Aflibercept (Eylea®, Zaltrap®). Bayer HealthCare bzw. Sanofi. Das Fusionsprotein besteht aus den extrazellulären Bindungsdomänen der Rezeptoren VEGFR-1 und -2, die an das Fc-Fragment von IgG₁ gekoppelt wurden. Als eine Art löslicher Rezeptor bindet es VEGF-A mit höherer Affinität als die beiden Antikörper, es wird auch als *VEGF-Trap* (VEGF-Fänger) bezeichnet. Zusätzlich werden auch VEGF-B und PlGF inaktiviert (◉ Abb. 5.3 E). Das glykosylierte Protein wird in CHO-Säugerzellen hergestellt. Die Erstzulassung in Europa wurde 2012 zur Therapie der feuchten AMD erteilt, 2014 folgte die Indikation Makulaödem. Seit 2013 ist Aflibercept auch bei metastasierendem Kolorektalkarzinom einsetzbar (► Seite 40–42).

Ramucirumab (Cyramza®). Eli Lilly. Der humane monoklonale IgG₁-Antikörper richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne von VEGFR-2, wodurch dieser nicht mehr mit den verschiedenen VEGFs interagieren kann (◉ Abb. 5.3 D). Er bindet mit deutlich höherer Affinität an den Rezeptor ($K_D = 50 \text{ pM}$) als dessen physiologische Liganden. Produziert wird Ramucirumab in der murinen Myelomzelllinie NS/0. 2015 wurde Ramucirumab in Europa als erster Angiogenesehemmer zur Therapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms

universelle Strategie, die Entzündung zu blockieren. Dies wird auf ▶ Seite 52 beschrieben.

3. Während die beiden erstgenannten Strategien auf Ebene der angeborenen Immunabwehr agieren, erweist sich die **Hemmung der Lymphozytenaktivierung und -differenzierung** als Teil des adaptiven Immunsystems als weitere therapeutische Option. Diese immunologisch therapeutische antientzündliche Strategie wird in ▶ Kap. 7 näher erläutert.

Anmerkung. In diesem Kapitel werden die Wirkstoffe entsprechend ihres Wirkmechanismus gegliedert und nicht anhand ihrer Indikationen. Eine Übersicht über die Indikationen der einzelnen Wirkstoffe befindet sich dann am Ende dieses Kapitels.

Die Hemmung von Zytokinen als therapeutische Strategie

Zytokine sind regulatorische Proteine, die in Proliferation und Differenzierung von Zellen in vielfältiger Art eingreifen. Von der strukturell und funktionell vorgenommenen Einteilung der Zytokine in 5 Familien sind im Zusammenhang mit Entzündungen insbesondere die **Interleukine**, die **Chemokine**, die **Tumornekrosefaktoren** sowie die **Interferone** von Bedeutung.

Interleukine sind Zytokine, die regulatorisch in die **Lymphozytenaktivierung** eingreifen. Es sind über 70 Interleukine bekannt, die sich in einem Gleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischen Mediatoren befinden. Die wichtigsten proinflammatorischen Interleukine sind IL-1, IL-6, IL-12, IL-17 und IL-23, antiinflammatorisch wirksam sind IL-10 sowie der IL-1-Rezeptorantagonist. Beim Auftreten eines Entzündungsstimulus kommt es zu einer überschießenden Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die zwischen den Leukozyten ein kommunikatives Netzwerk der lokalen Entzündungsprogression induzieren.

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist massiv an dieser Kommunikation beteiligt. Insbesondere von Makrophagen sezerniert aktiviert er rezeptorvermittelt die Lymphozytenaktivierung und -proliferation.

Chemokine wirken im Zusammenhang mit Entzündungen „chemotaktisch“, d. h. räumlich steuernd auf die Leukozytenbewegung in das Gewebe entlang eines Gradienten dieser Mediatoren. Chemokine werden bisher im engeren Sinn der Entzündungstherapie nicht therapeutisch adressiert.

Interferone sind Mediatoren, die als Reaktion auf z. B. virale Infektionen von unterschiedlichen Zellen sezerniert werden und so ein Spektrum antiinflammatorischer oder antiproliferativer Effekte entfalten. Der therapeutische Einsatz von Interferonen ist in ▶ Kap. 2 beschrieben und wird ebenfalls im Zusammenhang mit der MS-Therapie auf ▶ Seite 54 ausgeführt.

Die Hemmung des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Als ein zentraler Mediator in einer Vielzahl von pathologischen Entzündungsreaktionen wird TNF- α seit nahezu zwei Jahrzehnten als Target betrachtet, um durch dessen funktionelle Blockade systemisch hemmend in den Entzündungsfortgang einzugreifen. Nachfolgend werden die fünf Wirkstoffe (TNF- α -Hemmer) vorgestellt, die auf dem Arzneimittelmarkt existieren.

Infliximab (Remicade®)

Mit Infliximab kam bereits 1999 der erste Wirkstoff zur Blockade des TNF- α auf den Arzneimittelmarkt. Infliximab ist ein chimärer (murin/humaner) IgG₁-Antikörper gegen TNF- α , der in murinen Hybridomzellen hergestellt wird. Der Erstzulassung zur Therapie des Morbus Crohn folgten zeitlich schnell Indikationserweiterungen zur Therapie der RA, Psoriasis, Psoriatischen Arthritis, Spondylitis Ankylosans sowie Colitis Ulcerosa (wie auch bei Morbus Crohn für Kinder älter als 6 Jahre zugelassen), jeweils in Kombination mit MTX, wenn die jeweilige Standardtherapie nicht ausreichend ist.

Dosierung. Infliximab wird als intravenöse Infusion über ca. 2 Stunden in Kombination mit MTX in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht bei RA (bei den anderen Erkrankungen 5 mg/kg) zu Therapiebeginn, sowie nach 2 und 6 Wochen verabreicht; das folgende Applikationsintervall beträgt dann 8 Wochen.

Nebenwirkungen und Kontraindikationen der TNF- α -Blockade

Die Blockade des TNF- α als zentrales Zytokin verursacht eine Immunsuppression der Patienten. Damit einhergehend sind vielfältige **Vorsichtsmaßnahmen, Überwachungen und Kontraindikationen** zu berücksichtigen. Daher ist bei der Anwendung von Infliximab wie auch den anderen TNF- α -Inhibitoren folgendes zu beachten:

Nebenwirkungen. Infusionsbedingte (anaphylaktische) Reaktionen, erhöhte Infektanfälligkeit (insbesondere des Respirationstrakts, besonderes Augenmerk wird auf Tuberkulose gelegt), Reaktivierung von viralen Infekten, invasive Pilzinfektionen, Bildung von Autoantikörpern, eine beschriebene Lymphom-anfälligkeit ist aufgrund der geringen Fallzahlen nicht signifikant zu bewerten.

Kontraindikationen. Aktive Infekte, Tuberkulose sowie andere immunsuppressive Therapien sind klare Kontraindikationen, schwere bis mittelschwere Herzinsuffizienz schließen ebenfalls eine Therapie aus.

Seit 2015 existieren mit Remsina® und Inflectra® zwei Biosimilars des Remicade® auf dem europäischen Arzneimittelmarkt. Nähe Hintergründe zu den beiden Präparaten in ▶ Kap. 9.



● **Abb. 6.2** Gelenkentzündung bei Rheumatoider Arthritis.
©hriana/fotolia.com

Adalimumab (Humira®)

Adalimumab ist ein humaner IgG₁-Antikörper gegen TNF- α , der seit 2003 (Abbvie) zur Therapie der RA zugelassen ist. Adalimumab wird in CHO-Zellen generiert. Ähnlich dem Infliximab folgten auch für Adalimumab vielfältige Indikationserweiterungen, sodass der Antikörper u. a. auch zur Therapie der Psoriasis, Psoriasis Arthritis, ankylosierende Spondylitis, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn (Patienten ab 6 Jahre), polyartikuläre juvenile Arthritis (ab 4 Jahre) sowie Acne inversa zugelassen ist. Anders als Infliximab kann wegen des geringeren immunogenen Potenzials des humanen Antikörpers dieser auch als Monotherapie verwendet werden.

Dosierung. Adalimumab wird als subkutane Injektion von 40 mg im 2-wöchigen Abstand appliziert.

Nebenwirkungen. Die oben genannten Einschränkungen durch Immunsuppression der Patienten sind zu beachten. Trotz des Vorliegens einer rein humanen Proteinstruktur sind auch unter Therapie mit Adalimumab Autoantikörperbildungen beschrieben, die bei ca. 30 % der Patienten zu einem Wirkungsverlust in der Therapie führen.

Adalimumab ist Statistiken zufolge 2014 und auch prognostiziert für die Folgejahre **weltweit das umsatzstärkste Arzneimittel!**

Etanercept (Enbrel®)

Etanercept ist ein weiteres TNF- α -bindendes rekombinantes Protein, aber im Gegensatz zu den zwei Erstgenannten kein Antikörper. Etanercept ist ein Dimer eines chimären Proteins, welches aus der extrazellulären Ligandbindungsdomäne des humanen TNF- α -Rezeptors-2 und der Fc-Domäne eines humanen IgG₁ besteht. Etanercept kann somit zwei Moleküle TNF- α binden, unterscheidet sich aber in zweierlei Hinsicht von den vorherigen Antikörpern: es bindet nur freies, aber nicht membranär gebundenes TNF- α ; Etanercept kann auch Lymphotoxin-A (TNF- β) binden. Dies führt zu leichten Abwandlungen im Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Die Zulassung (Wyeth) erfolgte bereits 2000 zur Therapie der RA bei Versagen der Standardtherapie, Indika-

tionserweiterungen zur Therapie der ankylosierenden Spondylitis, Psoriasis (ab 6 Jahre), Psoriasis Arthritis sowie der juvenilen idiopathischen Polyarthritits (ab 2 Jahre) folgten, jeweils in Kombination mit MTX.

Dosierung. Etanercept wird subkutan in einer Dosierung von 25 mg 2-mal wöchentlich appliziert.

Nebenwirkungen. Etanercept wird im Vergleich zu den anderen Antikörperpräparaten der TNF- α -Blockade als gut verträglich eingeschätzt, die resultierende Immunsuppression erfordert aber auch die o. g. Vorsichtsmaßnahmen und Berücksichtigung von Kontraindikationen.

Etanercept ist in der Rangfolge der umsatzstärksten Arzneimittel weltweit an Position 3!

Mit Benepali® hat im Januar 2016 das erste der verschiedenen, in Entwicklung befindlichen Biosimilars des Enbrel® die Zulassung in Europa erhalten (► Kap. 9).

Golimumab (Simponi®)

Golimumab ist ein humaner IgG₁-Antikörper gegen TNF- α , der in einer murinen Hybridom-Zelllinie hergestellt wird. Golimumab erhielt 2009 (Centocor B. V.) die Zulassung zur Therapie der RA in Kombination mit MTX, weitere Zulassungen existieren zur Therapie der ankylosierenden Spondylitis, der Psoriasis Arthritis sowie Colitis Ulcerosa.

Dosierung. Golimumab wird in einer Dosierung von 50 mg 1-mal monatlich subkutan durch eine Fertigspritze kombiniert mit einem Autoinjektor durch die Patienten selbst verabreicht.

Nebenwirkungen. Es gelten die genannten Aspekte der immunsuppressiven Wirkung des Antikörpers hinsichtlich unerwünschter Wirkungen und Kontraindikationen.

Certolizumab Pegol (Cimzia®)

Mit Certolizumab Pegol existiert ein weiterer TNF- α -Antagonist, der für die Therapie der RA bei Versagen der Standardbehandlung in Kombination mit MTX seit 2009

eine Zulassung besitzt (UCB Pharma). Certolizumab Pegol ist ein in *E. coli* gebildetes humanisiertes Antigen-bindendes (Fab-)Fragment eines TNF- α -Antikörpers, welches zur Verlängerung seiner Zirkulationszeit mit einer Polyethylenglykolkette verbunden ist. Hintergrund dieser strukturellen Vereinfachung eines Antikörpers durch Umgehung des Fc-Bereichs ist die zu erwartende verminderte Komplementaktivierung sowie reduzierte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität. In der Schweiz sowie den USA ist Certolizumab Pegol auch zur Therapie des Morbus Crohn zugelassen.

Dosierung. Certolizumab Pegol wird als subkutane Injektion im 2-wöchigen Abstand in einer Dosierung von 400 mg, ab der dritten Gabe 200 mg verabreicht.

Nebenwirkungen. Auch mit der vereinfachten Antikörperstruktur unterscheidet sich Certolizumab Pegol nicht deutlich in Wirkung und Nebenwirkung zu den anderen TNF- α -Antagonisten, sodass die o. g. Aussagen zu Nebenwirkungen und Kontraindikationen gleichermaßen gelten.

Zusammengefasst

Die TNF- α -Antagonisten haben mit ihrer frühen Marktpräsenz die Pharmakotherapie pathologischer Entzündungen revolutioniert und damit auch beispielhaft das gesamte Gebiet der rekombinanten Proteinwirkstoffe in die öffentliche Aufmerksamkeit gerückt. Der therapeutische und auch kommerzielle Erfolg dieser Strategie zeichnet sich auch dadurch ab, dass sich unter den fünf weltweit erfolgreichsten Arzneimitteln drei TNF- α -Antagonisten befinden.

Die 5 TNF- α -Antagonisten unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit und in ihrem Nebenwirkungspotenzial nicht deutlich voneinander.

UPDATE

Mit der Anwendung der TNF- α -Antikörper zum „Wegfangen“ des überschießenden TNF- α werden die Patienten ja faktisch „passiv immunisiert“. Eine neuere Idee verfolgt nun die Strategie, durch Immunisierung der Patienten mit einem wirkungslosen aber immunogenen TNF- α -Derivat eine eigene TNF- α -Antikörperbildung zu induzieren. Ziel ist es, dass die Patienten ihre eigenen Antikörper entsprechend der TNF- α -„Last“ ausbilden und damit nicht nur die dauerhaften und teuren Antikörperapplikationen entfallen, sondern auch keine immunologischen Konsequenzen durch körperfremde Proteine zu befürchten sind. Unter der Bezeichnung TNF-Kinoid hat die französische Firma NEOVASC mit einem strukturell abgewandelten TNF- α -Proteinassoziat bereits erfolgreich Immunisierungen in einer Phase-IIb-Studie mit 140 therapieresistenten RA-Patienten durchgeführt.

PRAXISBEISPIEL

Obwohl die Apotheker nicht in die Therapie mit TNF- α -Blockern eingreifen dürfen, ergeben sich für die Beratung der Patienten mit einer solchen Therapie in der Apotheke vielfältige Ansatzpunkte. Auf Ebene der Arzneimittelmetabolisierungs-Interaktion sind durch den Proteincharakter der Wirkstoffe aber kaum Wechselwirkungen zu beachten.

Durch die resultierende Immunsuppression der Patienten gilt aber der Selbstmedikation der Patienten besondere Aufmerksamkeit. Insbesondere für die Reiseberatung muss die Immunsuppression berücksichtigt werden, und so auf Gefahren durch Infektionen mit bakteriellen (Tuberkulose!) oder parasitären Erregern gesondert hingewiesen werden. Impfungen mit Totimpfstoffen gelten in der Regel für diese Patienten als komplikationslos, Impfungen mit Lebendimpfstoffen müssen in Abwägung durch den behandelnden Arzt erfolgen.

Die Hemmung von Interleukinen Anakinra (Kineret®); Hemmung IL-1

Interleukin-1 ist ein für verschiedene pathologische Entzündungsreaktionen entscheidender Mediator, sodass sich die frühen Strategien zur pharmakologischen Hemmung neben TNF- α auch auf IL-1 fokussierten. Daher wurde bereits 2002 mit Anakinra ein, in *E. coli* hergestellter rekombinanter **IL-1-Rezeptorantagonist** zur Therapie der RA (in Kombination mit MTX) zugelassen. Als löslicher Rezeptorantagonist bindet Anakinra IL-1, löst damit aber im Gegensatz zu membranären IL-1-Rezeptoren keine Entzündungssignale aus. Damit wird faktisch ein analoges Wirkprinzip des „Wegfangens“ der Zytokine wie bei den vorab genannten oder nachfolgenden Antikörperpräparaten besprochen. Anakinra aber besitzt heutzutage wegen seiner Compliance (tägliche Applikation von 100 mg subkutan) **keine Bedeutung für die RA-Therapie** mehr! Der Vergleich dieser täglich notwendigen Applikation dieses Proteins mit dem minimal 2-wöchigen Applikationsintervall von therapeutischen Antikörpern bringt die Vorteile und das große Potenzial der Antikörper als rekombinante Wirkstoffe eindringlich vor Augen.

Ustekinumab (Stelara®); Hemmung IL-12 und IL-23

Ustekinumab ist ein **humaner Antikörper**, der sowohl IL-12 als auch IL-23 bindet. Seit 2009 ist Ustekinumab zur Therapie von Patienten (ab dem 12. Lebensjahr) mit mittelschwerer oder schwerer Plaque Psoriasis zugelassen, wenn eine systemische Standardtherapie nicht erfolgreich ist. Seit 2013 kann der Antikörper auch als Monotherapie oder mit MTX kombiniert zur Therapie der psoriatischen Arthritis Erwachsener eingesetzt werden. Die Blockade von IL-12 und IL-23 hemmt die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung und trifft somit eine bedeutende pathologische Kaskade der Psoriasis-Erkrankung. Studien zeigten eine Wirkungsüberlegenheit gegenüber Etanercept.

Dosierung. Ustekinumab wird als subkutane Injektion in einer Dosierung von 45 mg zu Beginn der Therapie 2-mal im