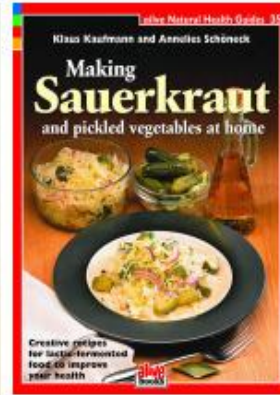


# **Nutzung der Biotechnologie zur Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen**

**Vortrag Axel Kleemann  
Materials valley  
22.April 2010**



# A variety of fermented foods and beverages produced by microbes



# Altbekannte Produkte der Biotechnologie

- Bier & Wein durch alkoholische Gärung mittels Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Essig (*Acetobacter*) ca. 200000 jato (bez. 100% Essigsäure)
- Käse, Joghurt, Sauerteig durch Milchsäurebakterien (*Lactobacillus*)
- Sauerkraut & saure Gurken (*Lactobacillus u.a.*) ca. 200000 jato (in D)
- Butanol & Aceton aus Melasse oder Stärke (*Clostridium acetobutylicum*)
- Citronensäure (*Aspergillus niger*) ca. 700000 jato
- Glutaminsäure (*Corynebacterium glutamicum*) > 800000 jato
- L-Lysin (*C. glutamicum*) ca. 3-400000 jato
- Waschmittel-Enzyme (Proteasen, Lipasen, Cellulasen)
- Penicillin (*Penicillium chrysogenum*)
- Cephalosporine (*Acremonium chrysogenum*)
- Zahlreiche andere Antibiotika
- Vitamine, z.B. Ascorbinsäure ca. 80000 jato

# Anwendungen der Biotechnologie

## Rote Biotechnologie

### Therapeut. Proteine

Impfstoffe (Vakzine)

Diagnostika

Gentherapie

### Antibiotika

Regenerative Medizin

Forensik

Arzneimittelforschung

## Grüne Biotechnologie

### Transgene Pflanzen

### Pflanzenzellkulturen

Biomasse-Erzeugung

„Genetische Pestizide“

## Weißer Biotechnologie

Lebensmittelenzyme

### Technische Enzyme

### Chemoenzymat. Verfahren

Biomasse-Umwandlung

## Graue Biotechnologie

Umweltsanierung

Kompostierung

## Blaue (marine) Biotechnologie

Aquakulturen

### Wirkstoffe aus dem Meer

Klebstoffe (Muscheln, Austern)

Lebensmittelzusatzstoffe u.a.

REICHSPATENTAMT  
PATENTSCHRIFT

№ 548 459

KLASSE 12q GRUPPE 32 / 81

12q K 77. 30

Tag der Bekanntmachung über die Erteilung des Patents: 24. März 1932

Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen a. Rh.,  
Dr. Gustav Hildebrandt und Dr. Wilfrid Klavehn in Mannheim

Verfahren zur Herstellung von 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol

Patentiert im Deutschen Reiche vom 9. April 1930 ab

Racemisches 1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol kann bereits nach verschiedenen Verfahren synthetisch hergestellt werden (vgl. z. B. Nagai u. Kanao, Annalen 5 470 [1929], S. 157; Patentschrift 469 782; Skita u. Keil, Ber. 62 [1929], S. 1142 ff.; Patentschrift 524 806).

Das racemische 1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol läßt sich nach bekannten Verfahren (vgl. Nagai u. Kanao, Annalen 10 470 [1929], S. 157; britische Patentschrift 297 385) in seine optischen Isomeren spalten. Das bei der Spaltung entstehende 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol ist 15 identisch mit dem natürlichen Ephedrin und wird neuerdings therapeutisch erfolgreich verwendet.

Bisher ist jedoch kein Verfahren bekannt geworden, nach welchem 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol auf unmittelbarem Wege 20 dargestellt werden kann.

Es wurde nun gefunden, daß man mit guten Ausbeuten unmittelbar zum 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol gelangt, wenn man links drehendes Phenylpropanolon (Neu- 25 berg, Biochem. Zeitschrift 115 [1921], S. 282 ff., und 128 [1922], S. 610 ff.) in Gegenwart von Methylamin der Reduktion unterwirft.

Die Bildung von 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol war keineswegs vorauszusehen, da bekanntlich Abwandlungen von optisch

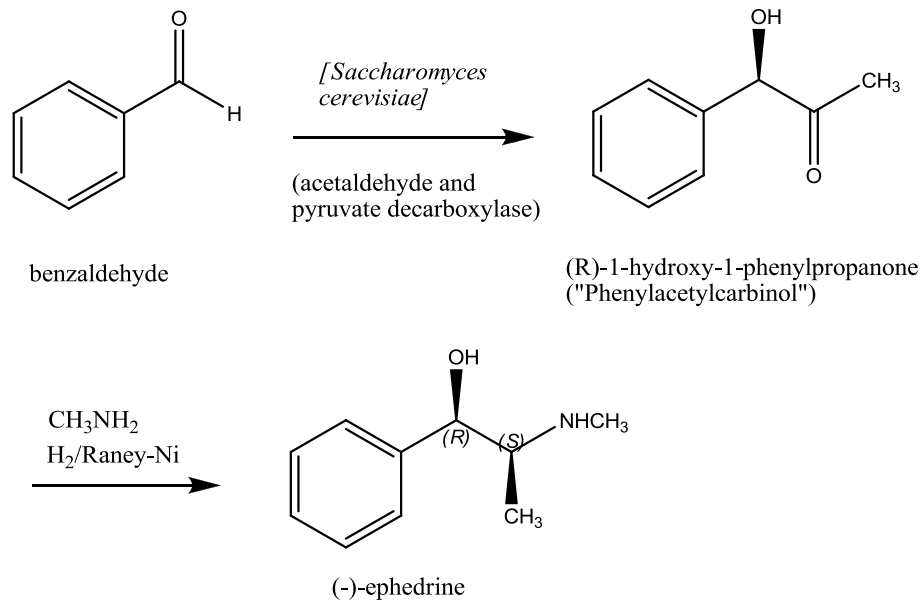
aktiven Verbindungen nicht notwendig zu Verbindungen von optisch gleicher Drehungsrichtung führen müssen, sondern ebensohäufig zu solchen der entgegengesetzten Drehungsrichtung führen können (so entsteht z. B. 1-Mandelsäure aus d-Benzaldehydcyanhydrin bei der Verseifung).

Ferner ist hervorzuheben, daß in der vorliegenden Erfindung eine asymmetrische Synthese vorliegt, bei welcher wiederum nicht vorauszusehen war, welche von den möglichen Konfigurationen entstehen würde. Es stand zu erwarten, daß sowohl d- oder l- oder dl-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol als auch d- oder l- oder dl-Pseudo-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol oder endlich ein Gemisch von mehreren dieser Komponenten entstehen würde. Daß bei der Reduktionskondensation des 1-Phenylpropanolons mit Methylamin fast ausschließlich 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol entsteht, war daher durchaus überraschend. 40

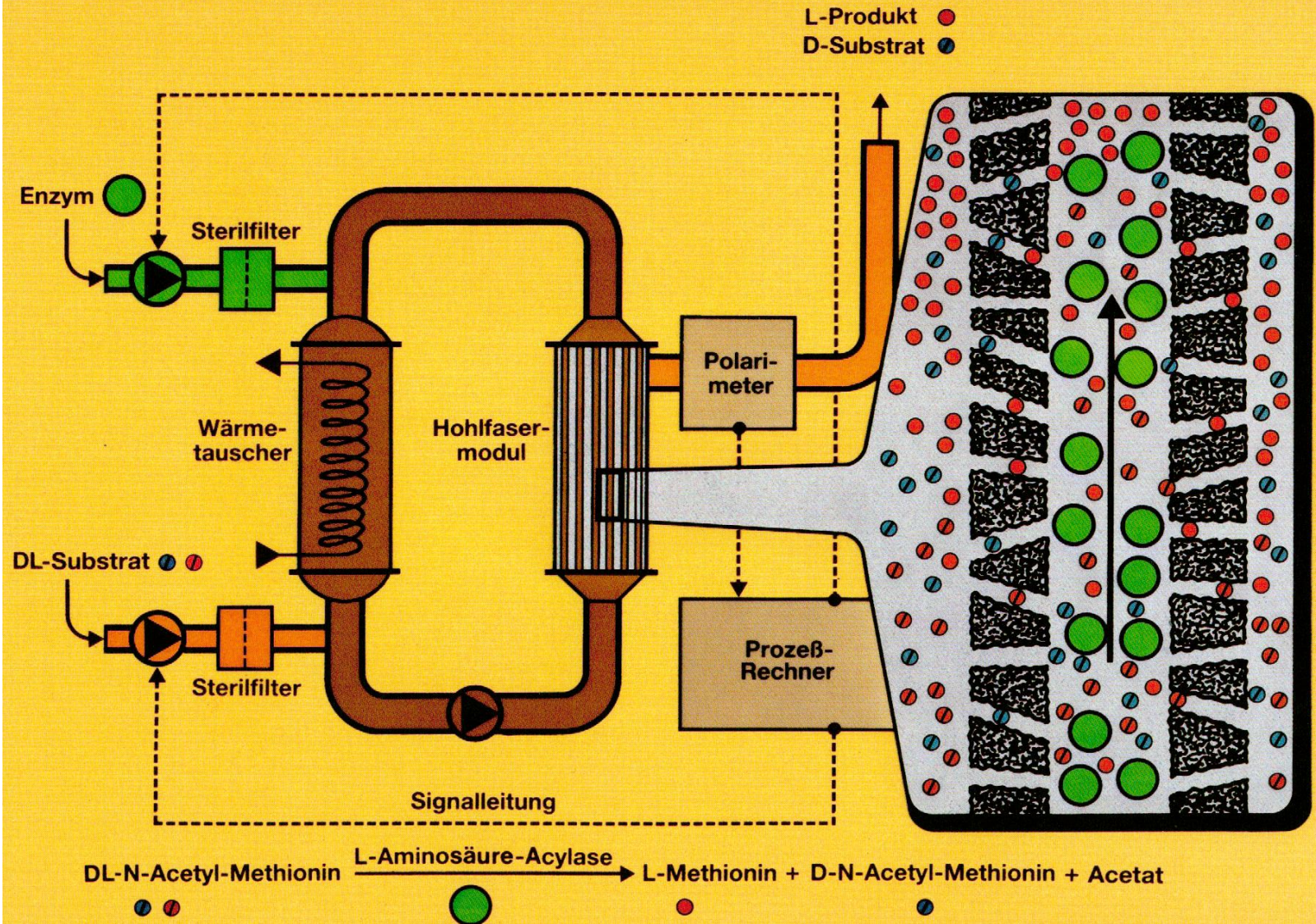
Die Erhaltung der optischen Aktivität war auch deswegen überraschend, weil auf Grund der Nebergerschen Beobachtung (Biochem. Zeitschrift 128 [1922], S. 613) 1-Phenylpropanolon sich bereits in verdünnt alkalischer Lösung in kurzer Zeit racemisiert. Da bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung die Reduktion in alkalischer Lösung stattfindet, war vorwiegend mit der Bildung von racemischen Basen zu rechnen. 50 60

# Ephedrine process of Knoll AG

[DRP 548 459; prior.1930]



# Membranreaktor: Enzymatische Racematentrennung





# Biotechnologie und Gentechnik: Definitionen

- **Biotechnologie:**
- Einsatz biologischer Systeme im Rahmen technischer Prozesse und industrieller Produktionen
  
- **Gentechnologie (Gentechnik):**
- Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Änderung der genetischen Eigenschaften von Organismen.
- Man spricht auch von „rekombinanter DNA-Technologie“, weil damit Erbinformationen **gezielt** re- bzw. neukombiniert werden können.

## **Nutzung der Biotechnologie zur Herstellung von APIs**

**Biopharmaceuticals: Blutfaktoren, Hormone, Antikörper, ...**

**APIs mikrobiellen Ursprungs: Antibiotika, sonst. Wirkstoffe (z.B. Lovastatin, Aminosäuren, Vitamine, ...)**

**Biotechnologisches Methodenarsenal:**

**Bakterien (E.coli, ...)**

**Fungi (Streptomyceten, ...)**

**Hefen (Saccharomyces cerevisiae, ...)**

**Säugetierzellkulturen (CHO, ...)**

**Insektenzellkulturen**

**Transgene Tiere**

**Transgene Pflanzen**

**Pflanzliche Zellkulturen**

**Enzyme (Chemoenzymatische Verfahren)**

## **Antibiotika mikrobiellen Ursprungs**

**Betalactame (Penicilline, Cephalosporine, Monobactame, Clavulansäure, Thienamycin)**

**Tetracycline (Chlortetracyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, ...)**

**Aminoglykoside (Streptomycin, Tobramycin, Neomycine, Gentamycin, Lincomycin, ...)**

**Chloramphenicol**

**Makrolide (Erythromycine, Sirolimus, Tacrolimus, ...)**

**Glykopeptide (Vancomycin, Teicoplanin, ...)**

**Lipopeptide (Daptomycin, ...)**

**Griseofulvin**

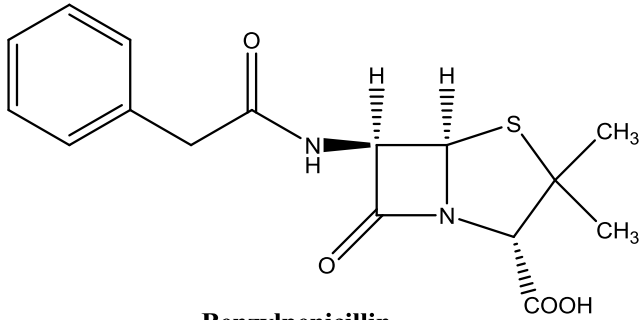
**Cyclosporin**

**Rifamycine**

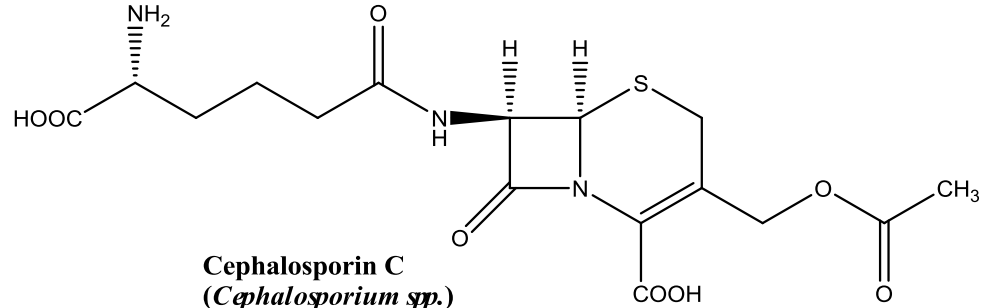
**Polyene (Nystatin)**

**Anthracycline (Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, ...)**

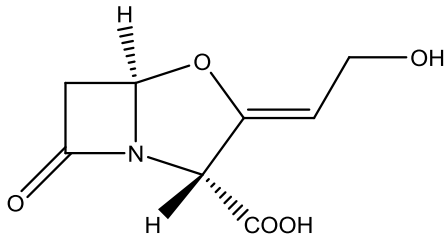
# $\beta$ -Lactam-Antibiotika



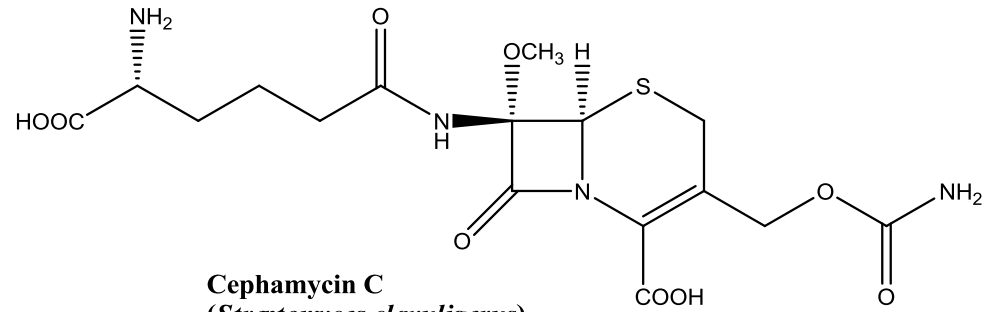
**Benzylpenicillin**  
(*Penicillium chrysogenum*)



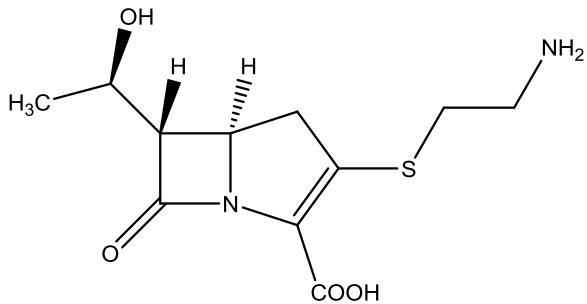
**Cephalosporin C**  
(*Cephalosporium spp.*)



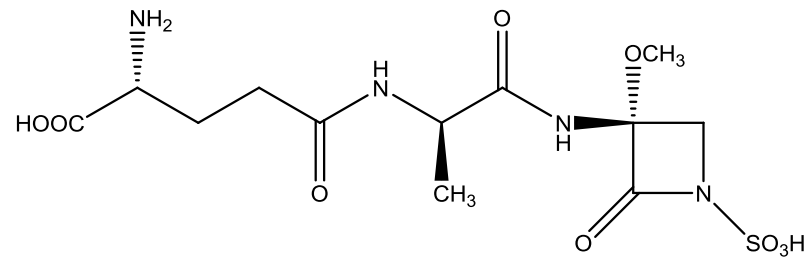
**Clavulansäure**  
(*Streptomyces clavuligerus*)



**Cephamycin C**  
(*Streptomyces clavuligerus*)

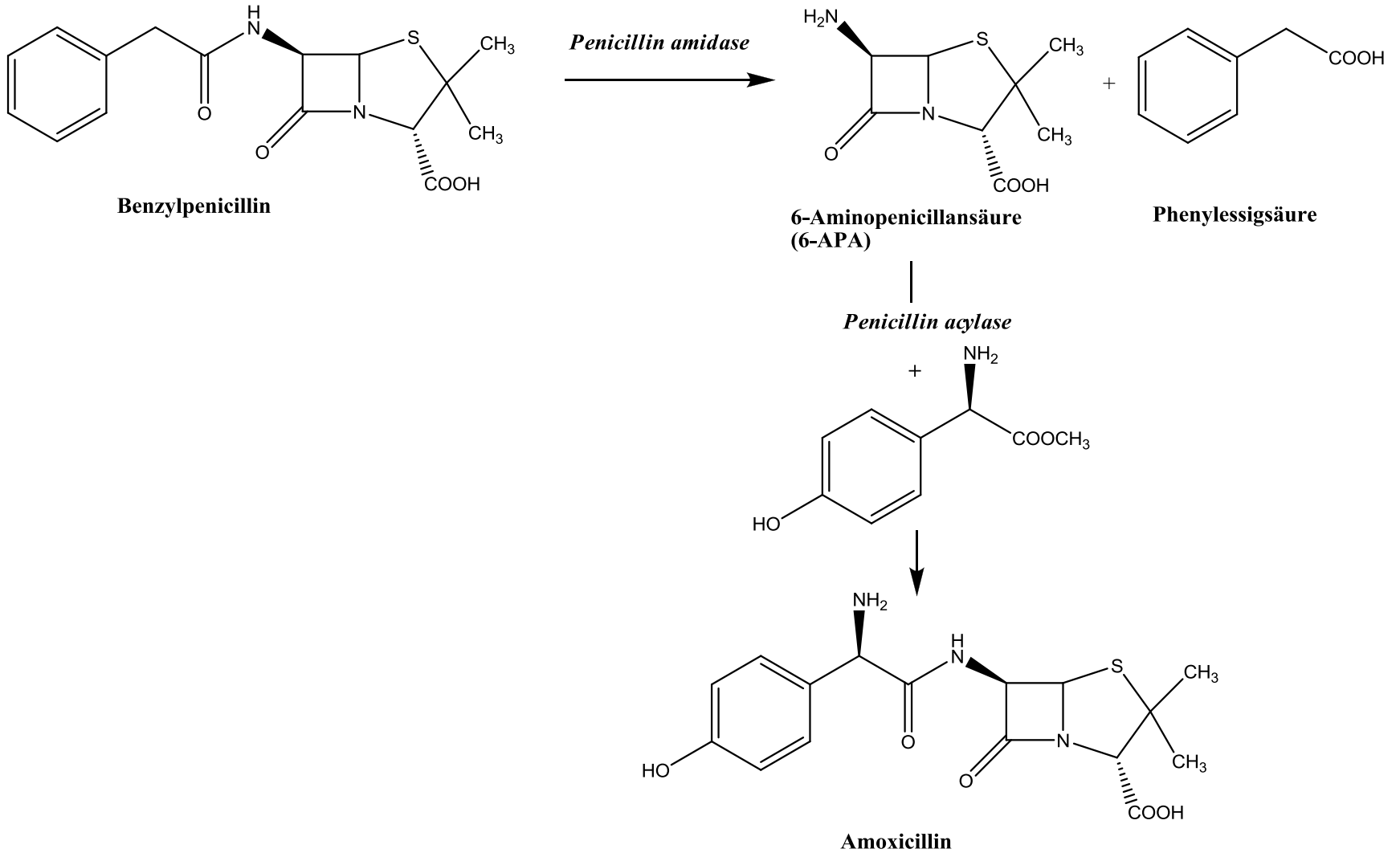


**Thienamycin**  
(*Streptomyces cattleya*)



**Sulfazecin**  
(*Pseudomonas acidophila*)

# Enzymatische Reaktionen mit Penicillinen



# Pharmakodynamische Wirkstoffe aus Mikroorganismen

Ergotamin, Ergometrin, Ergotoxin [*Claviceps purpurea*]

Statine (Mevastatin, Lovastatin [*Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Monascus ruber*, *Aspergillus terreus*])

Acarbose [*Actinoplanes spp.*]


Streptokinase [*Streptococci strains*]

Botulinum Toxin A [*Clostridium botulinum*]

# Erstes Insulin in Deutschland ab Nov.1923

Das Pankreas-Insel-Extrakt  
**INSULIN**

**Hoechst**



The advertisement features a central illustration of several boxes and vials of insulin. A prominent white box contains ten small glass vials with metal caps. Below it are three black boxes of varying sizes, each labeled 'INSULIN HOECHST'. The largest black box in the foreground is labeled '60 INTERNATIONALE EINHEITEN 600/1'. The boxes are arranged on a dark, angular base. To the right of the boxes are the Bayer logo (a circle with 'BAYER' written vertically) and the M&B logo (a circle with 'M&B' written vertically).

**BAYER**

**M&B**

**IG-FARBENINDUSTRIE AKTIENGESELLSCHAFT**  
PHARMAZ.-WISS. ABTEILUNG „Bayer-Meister-Lucius“  
LEVERKUSEN A/RH.

*gedruckt: Januar 1929*

# Humaninsulin

## Insulin human

**A-Kette**

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

**B-Kette**

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

*Carboxypeptidase*

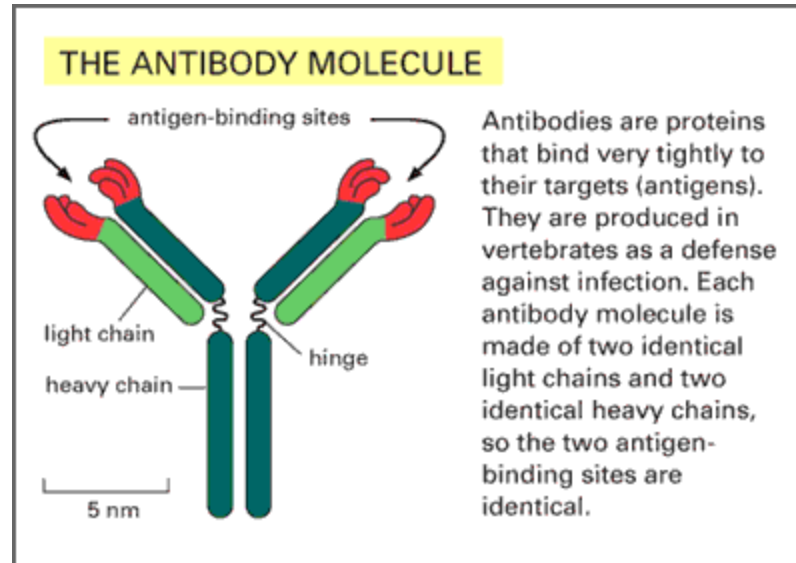




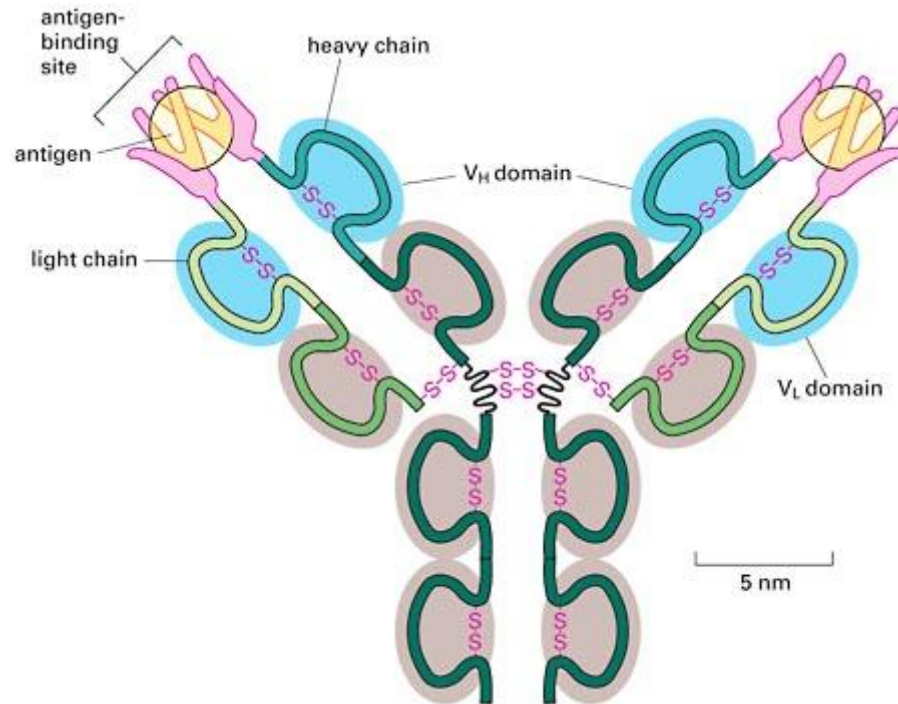
# Beispiele für Biopharmaka

- **Humaninsulin (rec.): Diabetes [Erstausbietung 1982 in USA durch Lilly]**
- **EPO =Erythropoetin; Darbepoetin: renale Anämie bei Niereninsuffizienz**
- **Somatropin (hGH), Wachstumshormon: Kleinwuchs bei Kindern**
- **Interferon beta: Multiple Sklerose**
- **Alteplase, Reteplase: Fibrinolytika bei Herzinfarkt, Lungenembolie und Schlaganfall**
- **Blutgerinnungs-Faktor VIII: Hämophilie**
- **CSF; Lenograstim, Filgrastim: Neutropenie z.B. bei Chemotherapie**
- **Etanercept (Enbrel), Adalimumab (Humira), Infliximab (Remicade): Rheumatoide Arthritis**
- **Monoklonale Antikörper: Bevacizumab (Avastin), Cetuximab (Erbix), Trastuzumab (Herceptin): Krebserkrankungen**

# Antikörper



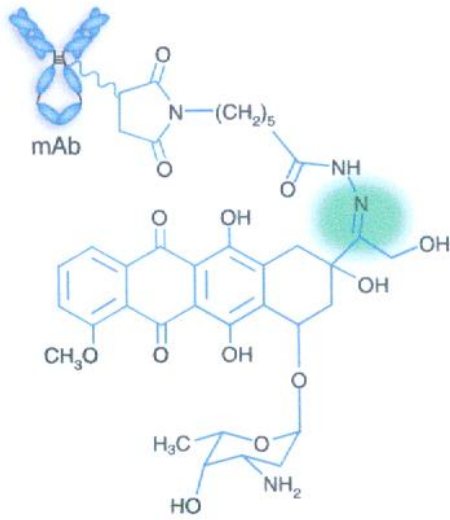
# Antikörper-Struktur (schematisch)



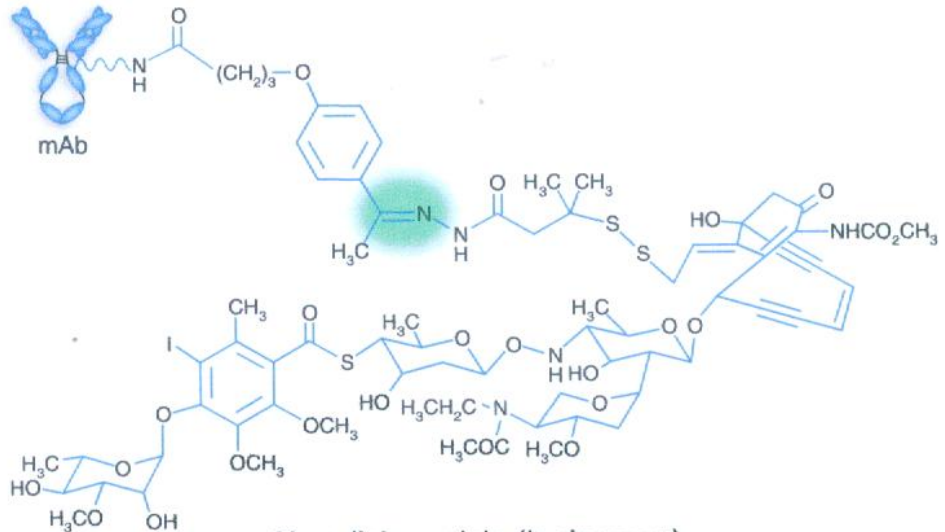
# Antikörper-Wirkstoff-Konjugate



# Immunoconjugates



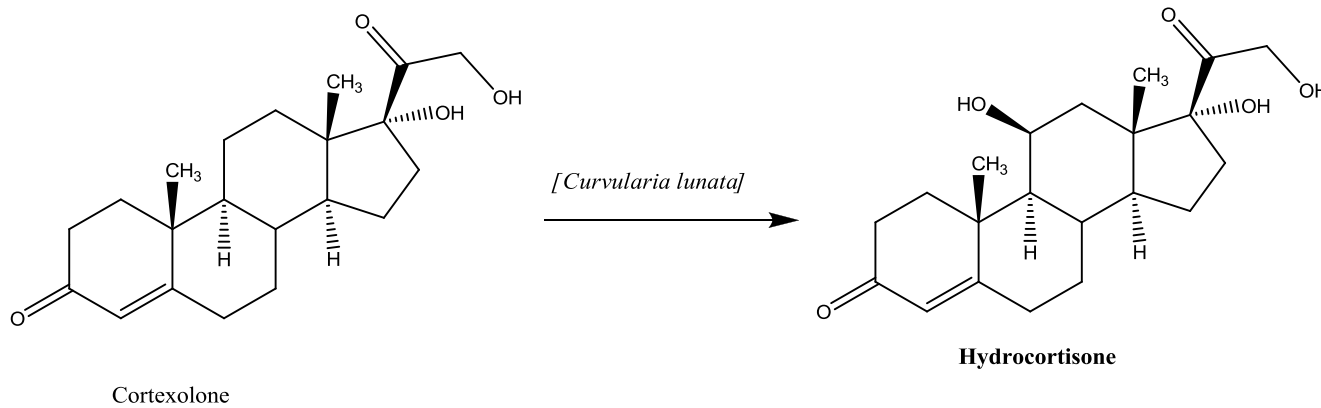
mAb-doxorubicin (hydrazone)



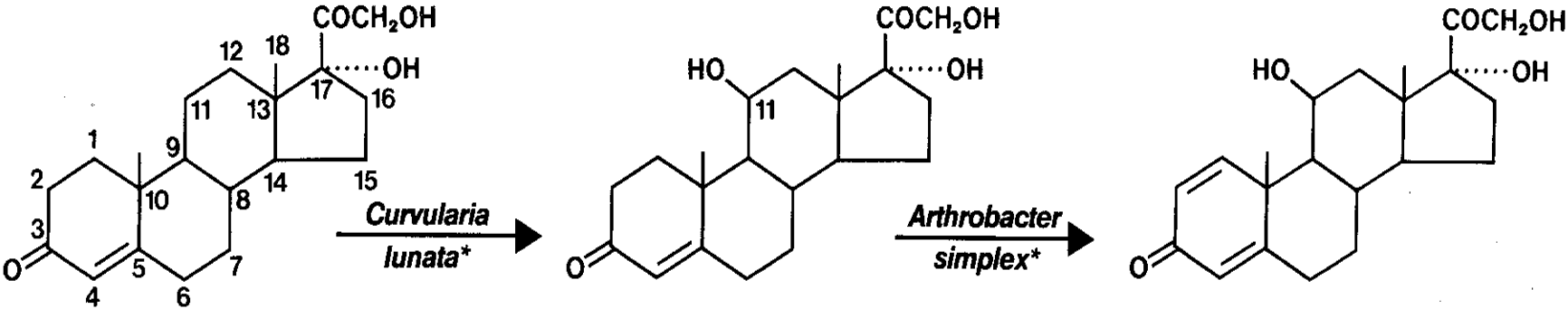
mAb-calicheamicin (hydrazone)

# 11 $\beta$ -Hydroxylation in steroids

[US 2 649 401; Upjohn, 1950]



# Cortison-Synthese: Beispiel einer Steroid-Transformation



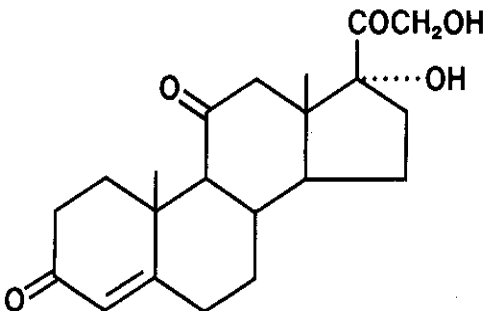
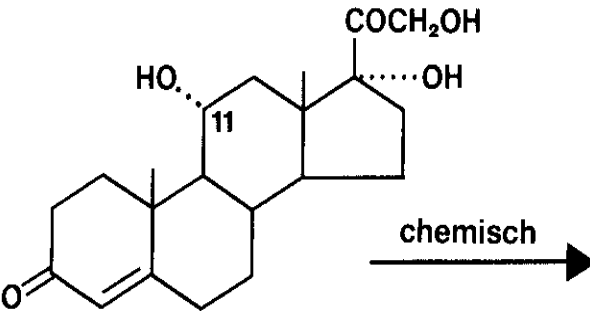
Substanz S  
(17-Hydroxyprogesteron)

Hydrocortison (11β)

Prednisolon

*Aspergillus  
ochraceus\**

chemisch



chemisch

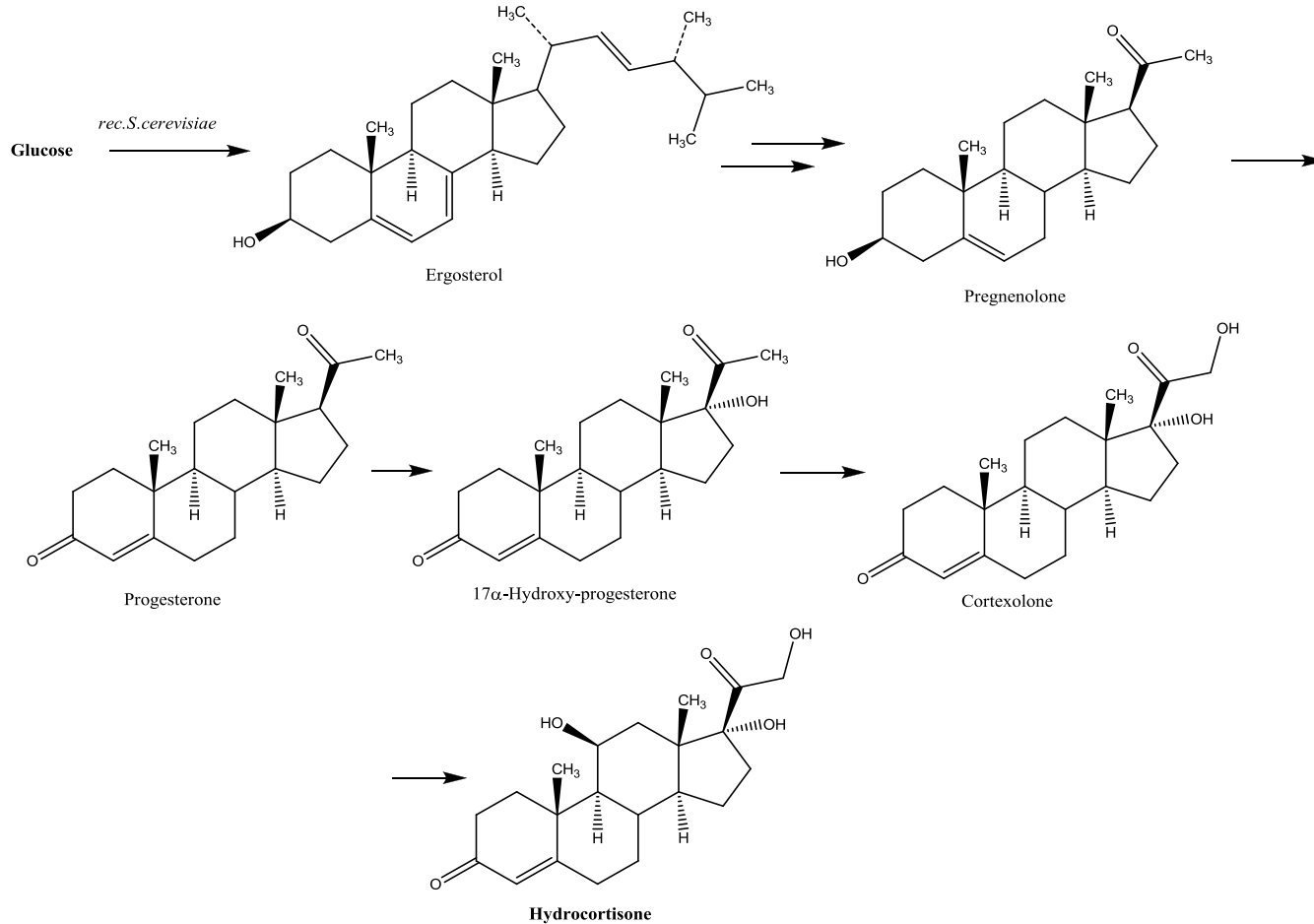
Cortison

11-epi-Hydrocortison (11α)

\* = Mikroorganismus mit  
entsprechender Spezifität

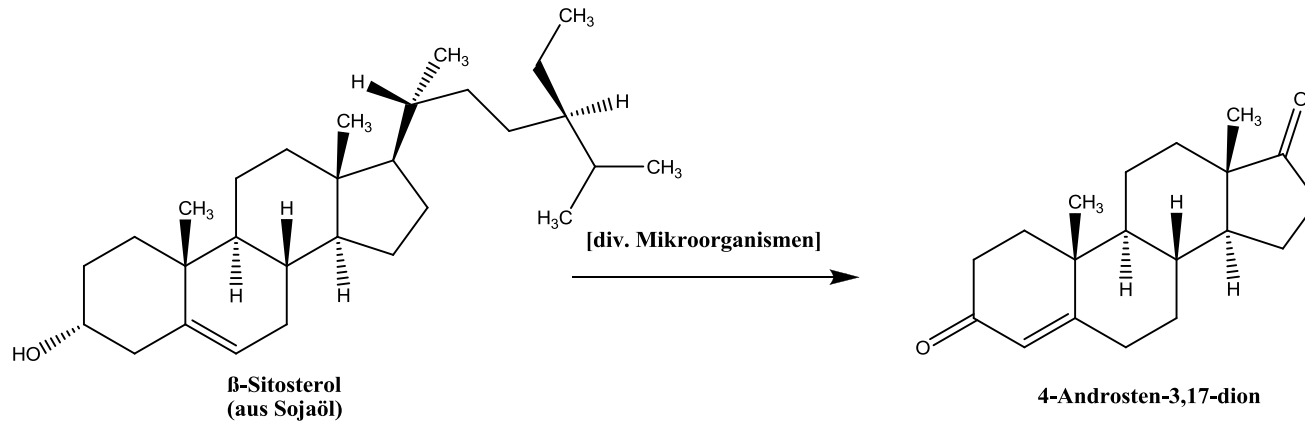
# Steroid process by fermentation of *rec.S.cerevisiae* (Hoechst AG)

[US 6 503 749; US 6 171 836]



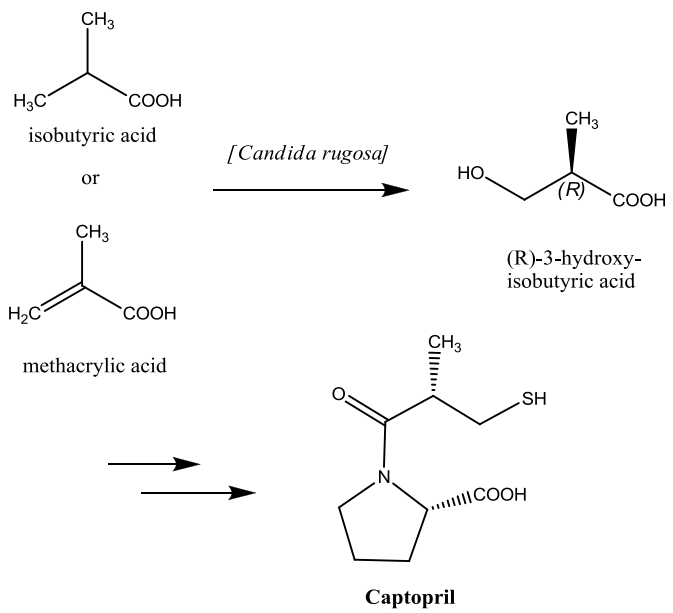


# Mikrobiolog. Seitenkettenabbau von $\beta$ -Sitosterol



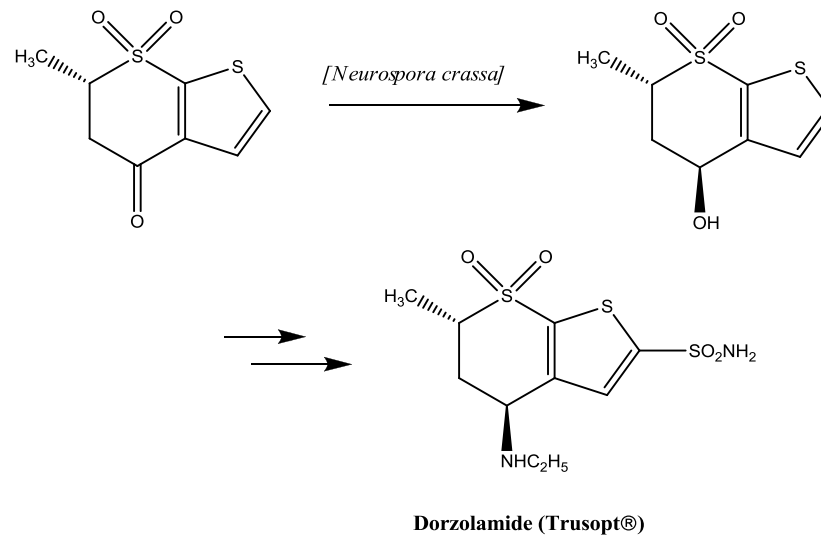
# Captopril intermediate

[US 4 310 635 and 4 460 780 (Kanegafuji)]

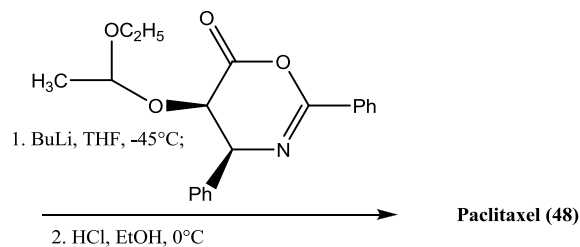
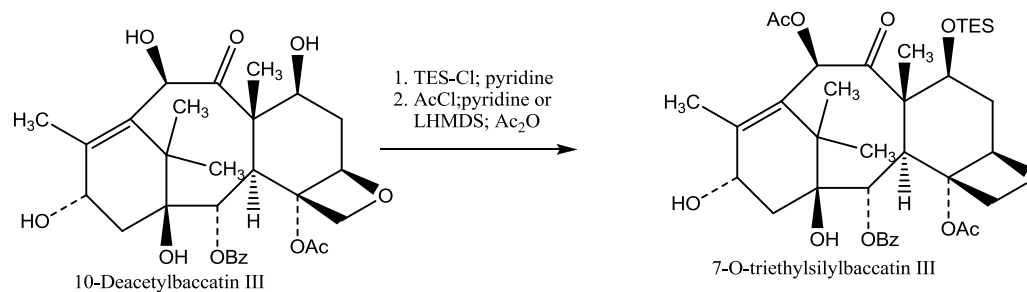


# Intermediate for Dorzolamide

[US 5 580 764; Zeneca]



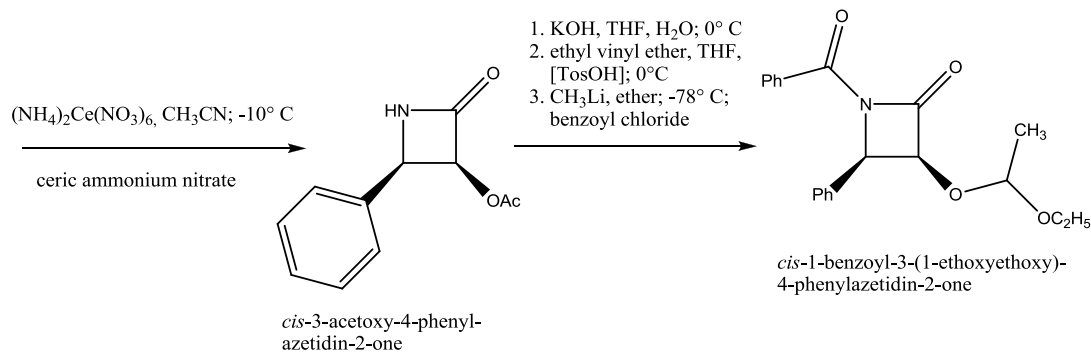
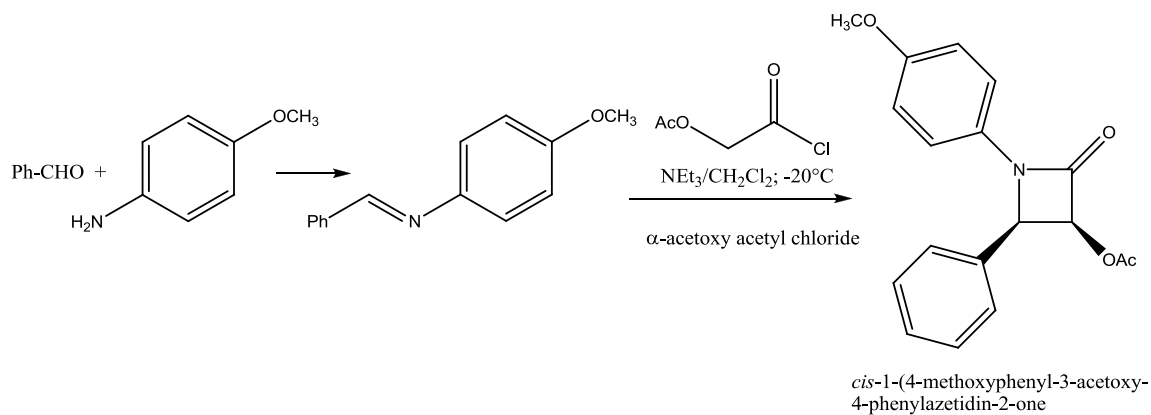
# Paclitaxel (Taxol) Semisynthesis I



(-)-cis-2,4-diphenyl-5-(1-ethoxyethoxy)-  
4,5-dihydro-1,3-oxazin-6-one = **A**

TES- = triethylsilyl  
LHMDS = lithium hexamethyldisilazide

# Paclitaxel (Taxol) Semisynthesis II



1. THF, KOH, H<sub>2</sub>O
2. HCl
3. KO<sup>t</sup>Bu, THF;
4. CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, THF

$\longrightarrow$  A

# Paclitaxel (Taxol) production

- (1) Natural source: bark of Pacific yew tree [*Taxus brevifolia*]**
- (2) Semisynthetically starting with 10-deacetylbaccatin [from needles of *Taxus baccata* ]**
- (3) Natural source: plant cell fermentation (PCF) technology [e.g. with cells from *Taxus chinensis* ], developed by Phyton Biotech , carried out at their plant in Ahrensburg/Germany  
US 5 407 816 (Phyton; US-prior. 1992)  
US 7 264 951 (Phyton; US-prior. 1992)**
- (4) Alternative natural source possible: by culturing Fungi strains [*Taxomyces-Andreanae* or *Nodulisporium sylviforine*]**

# Markt für Enzyme

**Weltweiter Markt ca. \$ 2 Milliarden**

**davon ca.**

**50% für Lebensmittel & Getränke,**

**35% für Wasch- und Reinigungsmittel,**

**5-10% für Textilindustrie,**

**5% für Feinchemikalien & Arzneistoffe**

**> 50% der Enzyme werden mit Hilfe von gentechnisch veränderten  
Mikroorganismen hergestellt**

# **Ausblick / Künftige Schwerpunkte**

- **Gezielte enzymatische Glykosylierungen**
- **Ausbeutesteigerung bei Biopharmaka-Produktion**
- **Einsatz von Einweg-Reaktionssystemen**
- **Verstärkter Einsatz von Pflanzenzellkulturen**