

Organaktivitäten im Schüttelkolben: Rekombinante menschliche Enzyme für die Pharmaindustrie

Organ Function in Shake Flasks: Recombinant Human Enzymes for the Pharmaceutical Industry

Margit Winkler



Margit Winkler ist Senior Researcher am Austrian Centre of Industrial Biotechnology (acib GmbH) und Lektorin an der TU Graz. Der rote Faden in ihrer Forschung ist die Biokatalyse: Schon seit der Diplomarbeit beschäftigte sie sich mit Nitril-hydrolysierenden Enzymen, arbeitete während eines Postdoc-Aufenthalts in Schottland mit der Fluorinase und beschäftigt sich derzeit hauptsächlich mit Oxidoreduktasen.

Margit Winkler is senior researcher at the Austrian Centre of Industrial Biotechnology and lecturer at Graz University of Technology. Her research interest is focused on biocatalysis. Early experience in nitrile hydrolyzing enzymes was expanded by a post-doc year working on the fluorinase enzyme and, recently, several projects on oxidoreductases.

In Zusammenarbeit mit zwei Firmenpartnern entwickelt das Kompetenzzentrum acib einen neuen und verlässlichen Zugang zu authentischen Arzneimittelmetaboliten.

Die pharmazeutische Industrie entwickelt ständig neue Arzneimittelkandidaten, um die Behandlungsmöglichkeiten unserer Ärztinnen und Ärzte zu erweitern und Krankheiten effizient behandeln zu können bzw. um unsere Gesundheit zu verbessern. Was aber passiert mit pharmazeutischen Wirkstoffen im menschlichen Körper? Die Verbindungen entfalten einerseits ihre gewünschte Wirkung, andererseits werden sie metabolisiert, damit sie schneller ausgeschieden werden können. Neben Reduktasen/Dehydrogenasen und Hydrolasen kennt man derzeit fünf verschiedene oxidative Enzymklassen, die für die erste Stufe der Metabolisierung verantwortlich sein können: Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs), Flavin-Monooxygenasen (FMOs), Monoamin-Oxidasen (MAOs), Aldehyd-Oxidase (AO) und Xanthin-Oxidase (XO). Welches dieser Enzyme letztendlich einen bestimmten Wirkstoff metabolisiert, hängt hauptsächlich von der chemischen Struktur desselben ab. In den letzten Jahren hat sich die Forschung hauptsächlich mit der CYP-Familie beschäftigt. Vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit richtete sich auf die anderen vier Enzymklassen, auf die sogenannten nicht-CYP-metabolisierenden Enzyme (NCMEs). In Zusammenarbeit mit F. Hoffmann LaRoche und Novartis widmen wir uns derzeit diesen Enzymen. Das Projekt wird im K2-Zentrum acib bearbeitet, an dem die TU Graz ein wesentlicher Miteigentümer ist.

Im Zuge der Entwicklung eines neuen Wirkstoffs braucht man authentische Proben der potenziellen Metaboliten für Strukturaufklärung, Aktivitätstests und auch für die Beurteilung ihrer Toxizität *in vitro*. Früher mussten Chemikerinnen/Chemiker und Pharmakologinnen/Pharmakologen die Struk-

A collaboration between the competence centre acib and two company partners has led to a new and trustworthy approach to the production of authentic drug metabolites.

The pharmaceutical industry is constantly developing new drug candidates to expand the existing toolbox of doctors to restore or improve health. But what happens to the so-called active pharmaceutical ingredients (APIs) in human beings? The compounds are recognized as foreign to the body and, in addition to their desired function, they are metabolized in order to remove them from the system.

Today, besides reductases/dehydrogenases and hydrolases, five enzyme classes of oxidative enzymes are known to be responsible for the first step of this metabolization: cytochrome P450 enzymes (CYPs), flavin-monoxygenases (FMOs), monoamine oxidases (MAOs), aldehyde oxidase (AO) and xanthine oxidase (XO). Which enzyme is the main metabolizer is strongly dependent on the chemical structure of the compound. In recent years, the CYP family in particular has been the focus of research and has been extensively studied. Less attention has been paid to the so-called non-CYP drug metabolizing enzymes (NCMEs). These enzymes are the focus of a current collaboration with F. Hoffmann LaRoche and Novartis in the K2 center acib, where Graz University of Technology is a major stake holder.

In the course of the drug development process, it is routinely necessary to prepare drug metabolites which resemble exactly the structure of the metabolites produced by the human body. These metabolites are needed for structural elucidation, activity tests and also for *in vitro* toxicology assessment. In the past, pharmacologists and chemists predicted potential metabolites of a new drug and were then often forced to synthesize them by complicated multi-step routes. This was

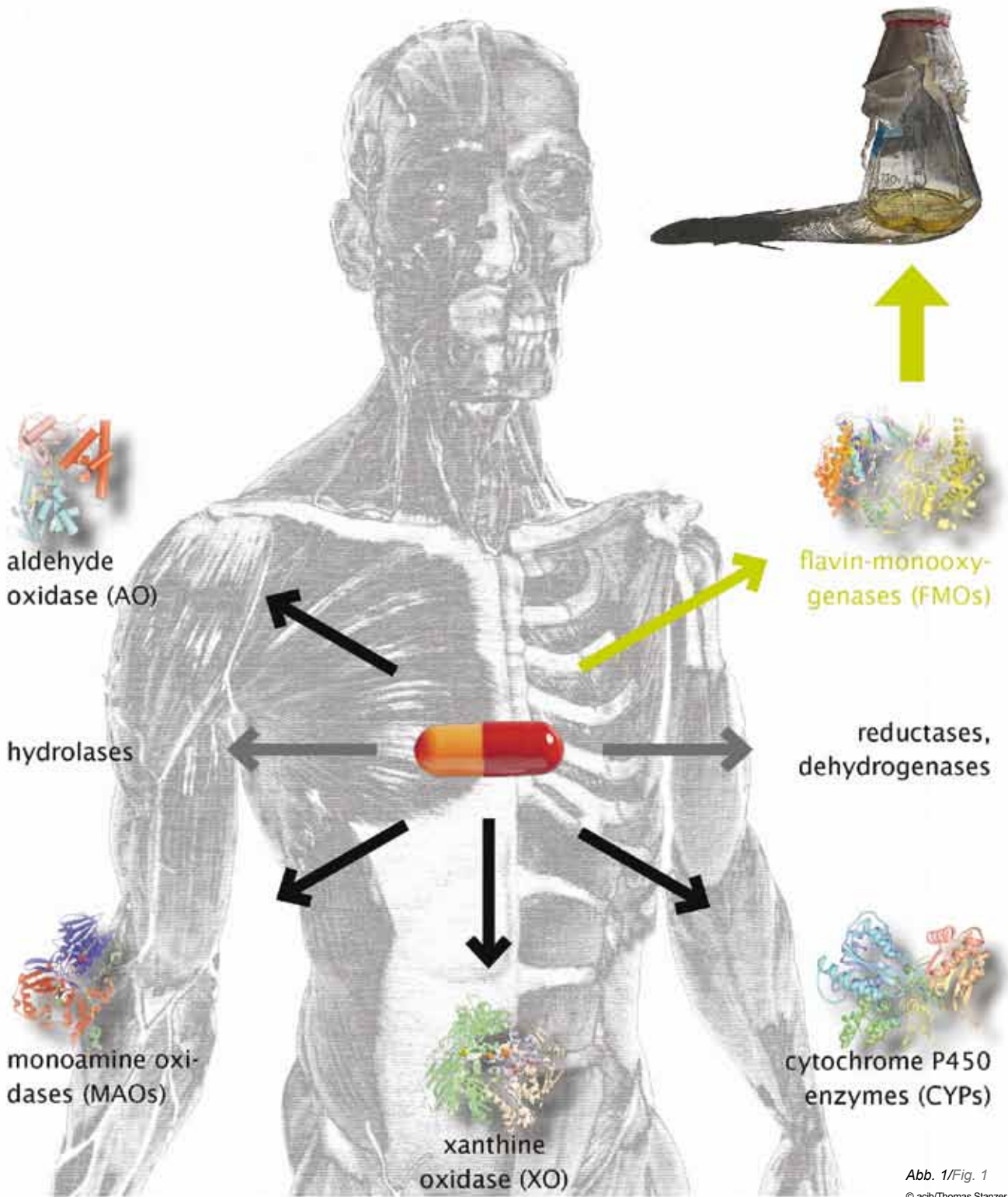


Abb. 1/ Fig. 1
© acib/Thomas Stanzer

tur der möglichen Metaboliten vorhersagen. Für die Herstellung der entsprechenden Verbindungen mit klassischen chemischen Methoden brauchte man häufig vielstufige – d. h. zeitintensive und teure – Syntheserouten. Im schlimmsten Fall stimmte die vorhergesagte Struktur nicht mit dem menschlichen Metabolit überein – wenn man doch nur den menschlichen Metabolismus im Reagenzglas nachstellen könnte!

Wir streben es an, diese Vision in die Tat umzusetzen: Wir arbeiten daran, eine ganze Palette

not only very time consuming but also expensive and sometimes it turned out that the predicted structures were not the desired metabolites. How ingenious would it be to mimic human metabolism in a test-tube?

We set out to explore the possibility of using human non-CYP drug metabolizing enzymes *in vitro* by creating a collection of these enzymes in an inexpensive microbial host such as *E. coli*. The ultimate goal is to have each human metabolizing enzyme as a catalyst ready from the shelf (or

Abb. 1: Was passiert mit pharmazeutischen Wirkstoffen im menschlichen Körper?

Fig. 1: What happens to the so-called active pharmaceutical ingredients (APIs) in human beings?



© acib/Thomas Stanzer

Literatur/References:

Steven Hanlon, Andrea Camattari, Sandra Abad, Anton Glieder, Beat Wirz, Matthias Kittelmann, Stephan Lütz, Margit Winkler; Expression of Recombinant Human Flavin Monooxygenase and Moclobemide N-oxide Synthesis on Multi-mg Scale. *Chem. Commun.* 2012.

nicht-CYP-metabolisierender Enzyme in günstigen mikrobiellen Systemen – wie z. B. *E. coli* – verfügbar zu machen. Das große Ziel ist es, jedes einzelne Enzym aus dem menschlichen Metabolismus (Phase 1) als einfaches Reagens zur Verfügung zu haben, sodass man damit beispielsweise spezielle Funktionen der menschlichen Leber simulieren kann. Die Pharmaindustrie hätte mit dieser „künstlichen Leber“ die Möglichkeit, neue Wirkstoffkandidaten mit allen potenziellen metabolischen Enzymen zu testen und in einer sehr frühen Entwicklungsphase zu wissen, welche Produkte entstehen und welche Enzyme hauptsächlich für deren Entstehung verantwortlich sind. Mit dieser Information und den richtigen Enzymen wäre es dann ein Kinderspiel, genügend Material der richtigen Metabolite für weitere Tests herzustellen.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir die Gene der NCME-Proteine in Standardvektoren für die Expression in *E. coli* BL21 kloniert und die Zellen transformiert. Das Expressionslevel wurde nach der Anzucht dieser Zellen mittels Gel-Elektrophorese visualisiert. Während einige wenige Enzyme nicht nachgewiesen werden konnten, waren andere in ausreichender Menge vorhanden und zeigten – was natürlich essenziell ist – auch Aktivität für die Oxidation von Testsubstraten.

Viel interessanter als Testsubstrate sind klarerweise echte Wirkstoffe wie zum Beispiel Moclo-

freezer). Single functions of, for example, a human liver would be in each tube and a collection of tubes could be seen as an artificial human liver. Thus, pharmaceutical companies would be able to subject a new drug candidate to all potential metabolizing enzymes at a very early stage of development and to identify which metabolites arise and which enzymes produce them. In a subsequent step, the same enzymes could be used for the production of these metabolites on a preparative scale in order to have access to sufficient metabolite for structural characterization and toxicology studies.

We cloned the genes coding for the desired proteins into a standard *E. coli* vector and transformed them into *E. coli* BL21. After cultivation of the cells, the protein expression was visualized by gel electrophoresis. Although not all of the desired proteins could be detected, some of them showed good expression and, more importantly, good activity for the oxidation of test substrates. Much more interesting than test substrates are, however, real drugs such as, for example, a compound named moclobemide. Moclobemide is a monoamine oxidase A (MAO-A) inhibitor, which is routinely prescribed for depression under names such as Aurorix® or Manerix. Moclobemide's major metabolic pathways include aromatic hydroxylation, C-oxidation, deamination and N-oxidation. The latter was ascribed to FMO activity (see

Abb. 2: FMO katalysiert die N-Oxidation von Moclobemide.

Fig. 2: FMO catalyzed N-oxidation of moclobemide.

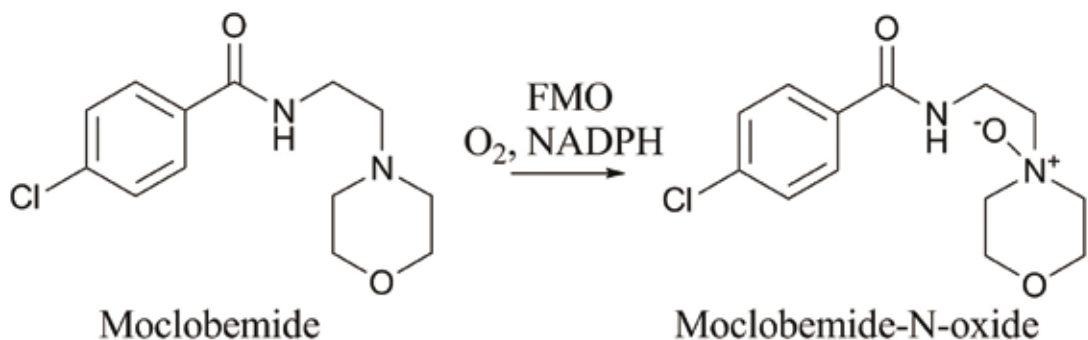




Abb. 3/ Fig. 3

© acib/Thomas Stanzer

bemid. Diese Verbindung ist ein Monoamin-Oxidase-A-Inhibitor (MAO-A) und wird unter dem Namen Aurorix® oder Manerix routinemäßig Patientinnen und Patienten mit Depressionen verschrieben. Moclobemid wird im Körper über verschiedene Wege metabolisiert: aromatische Hydroxylierung, C-Oxidation, Deaminierung und N-Oxidation. Letztere Aktivität hat man FMOs zugeschrieben (Abbildung 2). Laut Literatur sei hFMO3 jene Isoform, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die N-Oxidation von Moclobemid katalysiert, da auch Benzylamin (ein anderer Wirkstoff) in menschlichen Leber-Mikrosomen hauptsächlich von hFMO3 oxidiert würde. Auch unsere Ergebnisse zeigten den hFMO3-Stamm als vielversprechend für die Herstellung größerer Mengen von Moclobemid-N-Oxid.

Als „Proof of Concept“ hat unser Unternehmenspartner Roche jenen Stamm im 100L-Maßstab angezüchtet, der rekombinantes humanes FMO3 enthält. Die Biomasse wurde dann verwendet, um 100 mg Moclobemid zu Moclobemid-N-Oxid umzusetzen. Dazu verwendeten wir 50 g Biomasse. Anschließend wurde das Produkt bei unserem zweiten Unternehmenspartner Novartis isoliert, gereinigt und charakterisiert. Bis heute ist dies das erste Beispiel für die Herstellung eines Arzneimittelmetaboliten (65 mg Moclobemid-N-Oxid) im Multi-Milligramm-Bereich durch Verwendung einer rekombinanten humanen Flavin-abhängigen Monooxygenase.

In naher Zukunft widmen wir uns in Graz in erster Linie dem Ausbau der bestehenden Stammsammlung. Unsere Unternehmenspartner testen bereits die bestehenden Stämme an neuen Wirkstoffkandidaten; die Natur dieser Verbindungen wird verständlicherweise vor uns und voneinander geheim gehalten. Die Pharmaindustrie ist sehr wettbewerbsintensiv und jenseits unserer Kooperation sind F. Hoffmann LaRoche und Novartis harte Konkurrenten.

Fig. 2), and hFMO3 was postulated to be the most likely isoform responsible for this activity due to strong correlation with benzydamine oxidation activity in human liver microsomes – all this was known from literature. A screening for moclobemide oxidation of our new strains indeed revealed hFMO3 as the most promising strain for moclobemide-N-oxide preparation.

As a proof of concept, our company partner Roche produced the microbial strain that contains recombinant human FMO3 on the 100L scale. Biomass was then used to metabolize moclobemide. To this end we used 50g of biomass to convert 100 mg of moclobemide. Subsequently, the product was isolated, purified and characterized in the laboratories of our second company partner Novartis. Finally, we obtained 65 mg of the desired metabolite. To date, this is the first example of a multi-mg preparation of a drug metabolite using a recombinant human flavin monooxygenase.

In the near future, the team in Graz will mainly expand the existing strain collection. Our company partners are already using the strains to metabolize new drug candidates. The nature of these compounds is understandably a company secret since the companies themselves are operating in a very competitive field. Beyond the boundaries of our collaboration, F. Hoffmann LaRoche and Novartis are, after all, competitors.



Abb. 3: Schüttelkolben für die Produktion rekombinanter humaner Enzyme.

Fig. 3: Shake flask for the cultivation of recombinant human Enzymes.

Das Forschungsprojekt wird im Rahmen des FFG-Förderprogramms COMET vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung, Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie, der Steirische Wirtschaftsförderung (SFG), der Standortagentur Tirol und der Technologieagentur der Stadt Wien (ZIT) unterstützt.

This work has been supported by the Federal Ministry of Science and Research, the Federal Ministry of Transport, Innovation and Technology, the Styrian Business Promotion Agency (SFG), the Standort Agentur Tyrol and the Technology Promotion Agency of the City of Vienna.