

BIOTECHNOLOGIE IN DER PHARMAINDUSTRIE

# Unterschiede zwischen klassischer Analytik und Bioanalytik

Der Biotechnologie-Trend der Pharmaindustrie ist weiter ungebrochen. Biologische Wirkstoffe sind im Gegensatz zu den klassischen chemischen Arzneimittelwirkstoffen meist komplexe, hochmolekulare Strukturen wie Proteine oder Oligonukleotide. Entsprechend sind die Analysemethoden zur Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung von Biomolekülen deutlich verschieden von der klassischen Analytik relativ kleiner organischer Verbindungen.

MARTIN KNAUF\*

**D**er Einsatz der Biotechnologie bei der Entwicklung neuer Medikamente ist nicht mehr wegzudenken. Dies gilt nicht nur für biologische Wirkstoffe. Auch bei der Erforschung und Entwicklung chemischer Präparate werden gentechnische Verfahren zu irgendeinem Zeitpunkt eingesetzt. Der Verkauf von Medikamenten aus biotechnologischer Herstellung war 2011 in der Schweiz zirka achtmal höher als noch vor zehn Jahren. Diese Medikamente helfen heute, Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Multiple Sklerose oder Diabetes erfolgreich zu behandeln. Aber auch wer gesund ist, hat sehr wahrscheinlich bereits einmal ein Biopharmazeutikum genutzt. Denn zu diesen zählen auch Impfstoffe, wie sie schon bei Säuglingen und Kleinkindern zur Grundimmunisierung angewendet werden.

## Herstellung von Biomolekülen

Die Herstellung von biologischen Wirkstoffen geschieht heute fast ausschliesslich durch Anwendung gentechnischer Methoden. Produziert werden Proteine (inklusive monoklonaler Antikörper) und Nucleinsäuren (DNA, RNA wie Antisense-RNA, sowie Antisense-Oligonukleotide). Proteine werden heute in technisch hoch entwickelten Bioreaktoren mithilfe von tierischen oder pflanzlichen Organismen hergestellt. Dies können Mikroorganismen (z. B. rekombinante *Escherichia coli* oder Hefekulturen), Zelllinien von Säugetieren sowie von Pflanzen sein. Dabei wird die für das gewünschte Produkt codierende DNA mithilfe eines Plasmids oder viralen Vektors in den Mikroorganismus oder die Zelllinie eingeführt. Die DNA wird exprimiert und das gewünschte Produkt wird dann durch Extraktion und Reinigung gewonnen.

Alle so hergestellten therapeutischen Produkte müssen in Europa der Monografie «DNA-rekombinationstechnisch hergestellte



Bioanalytische Methoden nehmen im Angebot moderner Dienstleistungslaboratorien einen zunehmend grossen Stellenwert ein. (Bild: UFAG)

Produkte» des Europäischen Arzneibuches genügen. Aus der Monografie ergibt sich, dass das biotechnologisch erzeugte Produkt durch den gesamten Herstellungsprozess charakterisiert sein muss. Nicht nur die Frage nach der chemischen Identität und Reinheit ist entscheidend, sondern auch die Definition des biologischen Produktionssystems ist relevant für die Identität des therapeutischen Proteins. Die Analysemethoden zur Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung von Biomolekülen sind deutlich verschieden von denen der klassischen Analytik relativ kleiner organischer Verbindungen. Dies hat zu einem eigenen Zweig in der Analytik geführt, der Bioanalytik.

#### Besonderheit von Biomolekülen

Proteine und Peptide bestehen aus Ketten von Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Sequenz der Aminosäuren legt die sogenannte Primärstruktur fest. Reguläre Strukturelemente innerhalb einer Polypeptidkette wie  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt bilden die Sekundär-

struktur, während die komplette dreidimensionale Struktur der Gesamtkette die Tertiärstruktur darstellt. Besteht ein Protein aus mehreren Polypeptidketten, die miteinander z.B. über Disulfid-Brücken verknüpft sind, spricht man von der Quartärstruktur. Auch nicht-peptische Komponenten wie Metalle, Lipid- oder Kohlenhydrat-Bausteine können zu dieser beitragen.

Die dreidimensionale Struktur eines aktiven Proteins ist genau definiert und essentiell für dessen Funktion. Sie ist nur innerhalb eines definierten Bereichs von chemischen und physikalischen Parametern thermodynamisch stabil. Änderungen von Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke können ein Protein denaturieren. Das Protein verliert dann seine Aktivität. Die Denaturierung kann permanent oder reversibel sein.

Die dreidimensionale Struktur von DNA und RNA ist wie bei den Proteinen ebenfalls nur innerhalb definierter physikalischer und chemischer Grenzen stabil. Änderungen können auch hier zu einer reversiblen oder permanenten Denaturierung führen. Die Struktur,

Grösse und die «Empfindlichkeit» von Biomolekülen sind somit der Grund, dass klassische analytische Methoden nicht oder nur bedingt zur Analyse anwendbar sind.

#### Analytik von Biomolekülen

Die analytische Chemie hat verschiedene Fragestellungen zu lösen. Man könnte diese grob in vier Kategorien unterteilen:

- Qualitative Analyse einer Mischung von Verbindungen (qualitative Zusammensetzung, Nachweis, Reinheit)
- Qualitative Analyse einer reinen Verbindung (Identifikation)
- Quantitative Analyse einer bestimmten Verbindung in einer Mischung (selektive Quantifizierung, Gehalt, Reinheit)
- Strukturaufklärung einer reinen Verbindung (Bestimmung der Konstitution, Konfiguration, Konformation)

Eine Vielzahl von analytischen Methoden in der klassischen Analytik erledigen diese Aufgaben. Zur qualitativen und quantitativen Analytik von Mischungen werden heute standardmässig chromatographische Metho-

Besuchen Sie  
das  
Labor der Zukunft

presented by  
Fraunhofer IBMT

KOSTENLOSER EINTRITT

15. & 16. MAI 2013 - BEAULIEU - LAUSANNE

# LABOTEC Suisse 2013

DIE MESSE FÜR DIE PHARMAZEUTISCHE UND  
CHEMISCHE INDUSTRIE & DEN LEBENSMITTELSEKTOR

Mit attraktivem Messe-  
angebot von SBB RailAway

 SBB CFF FFS RailAway-Kombi



easyFairs®

Registrieren Sie Ihren Besuch kostenlos auf [www.easyFairs.com/LABOTEC SUISSE](http://www.easyFairs.com/LABOTEC SUISSE)

Analytische Aufgabe	Klassische Analytik Kleine Moleküle	Bioanalytik DNA/RNA	Bioanalytik Proteine
Qualitative Analyse einer Mischung von Verbindungen	Gas-Chromatographie (GC) Flüssigchromatographie (HPLC, UPLC)	Kapillar-Elektrophorese Gel-Elektrophorese 2D-Gel-Elektrophorese	MALDI-TOF-MS Gel-Elektrophorese Isoelektrische Fokussierung (IEF) 2D-Gel-Elektrophorese
Qualitative Analyse einer reinen Verbindung	Massenspektrometrie NMR	PCR DNA Arrays	Aminosäurezusammensetzung Tryptischer Verdau mit anschliessender Gel-Elektrophorese MALDI-TOF-MS ESI-MS
Quantitative Analyse einer bestimmten Verbindung in einer Mischung	Gas-Chromatographie (GC) Flüssigchromatographie (HPLC, UPLC) chemisch	Kapillar-Elektrophorese Real-Time PCR DNA Array Biosensor	Bioassay (z.B. ELISA, RIA) Biosensor
Strukturaufklärung einer reinen Verbindung	NMR Massenspektrometrie Infrarot-Spektroskopie Röntgenkristallographie	DNA-Sequenzierung NMR Röntgenkristallographie Elektronenmikroskopie	Aminosäure-Sequenzierung NMR Röntgenkristallographie Elektronenmikroskopie

Tabelle 1: Exemplarischer Vergleich der typischen Methoden der klassischen Analytik mit denen der Bioanalytik

den wie Gas- und Flüssigchromatographie mit unterschiedlichen Detektoren eingesetzt. Zur Identifikation und Strukturaufklärung von reinen Substanzen werden meist spektroskopische Methoden wie NMR, MS, IR, UV und Röntgenkristallographie angewendet. Bei biologischen Molekülen geraten diese Methoden wegen des hohen Molekulargewichts und der bedingten Stabilität an ihre Grenzen. Methoden, die diese Umstände berücksichtigten, wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt und verbessert. Allen voran die elektrophoretischen Methoden. Die ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese mit und ohne Denaturierung, die Kapillar-Elektrophorese, die isoelektrische Fokussierung sowie die damit verbundenen Blotting-Techniken sind heute Standard.

Proteine sowie DNA und RNA bestehen aus einer grossen Zahl von Monomeren, die miteinander verknüpft sind. Von daher ist die Bestimmung der Sequenz ein neuer Parameter, der für die Charakterisierung eines Biomoleküls enorm wichtig ist. Methoden hierfür wurden entwickelt und soweit optimiert, dass heute Laborgeräte diese Analy-

sen automatisch im «High-Throughput» ausführen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die analytischen Fragestellungen und einen Vergleich der häufig verwendeten Methoden in der klassischen Analytik und der Bioanalytik. Die Liste ist nicht vollständig, macht aber den Unterschied deutlich.

Um den gesetzlichen Anforderungen zu entsprechen, dass ein biotechnologisches Produkt während des gesamten Herstellprozesses charakterisiert und kontrolliert werden muss, haben Hersteller von Biopharmazeutika entsprechende bioanalytische Fachabteilungen etabliert. Zudem haben sich in den vergangenen Jahren auf Bioanalytik spezialisierte Labors entwickelt und bieten

#### ORIGINALPUBLIKATIONEN

Interpharma, «Pharma Markt Schweiz 2012», Basel, Interpharma, 2012  
VFA, «Biopharmazeutika Hightech im Dienst der Patienten», Berlin, Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., 2010  
Europäische Pharmakopöe 7. Ausgabe, Allg. Monographie 7.0/0784 «DNA-rekombinationstechnisch hergestellte Produkte», EDQM, 2011  
Manz, Andreas; Pamme, Nicole; Iossifidis, Dimitri; «Bioanalytical Chemistry», Chapter 1, Imperial College Press, 2004

ihre Dienstleistungen an. Die Tatsache, dass biologische Wirkstoffe und Präparate heute und in Zukunft zum Standard in der Medizin zählen, führt dazu, dass immer mehr «klassische» analytische Dienstleistungslaboratorien bioanalytische Methoden und Verfahren in ihr Portfolio aufnehmen.

#### UFAG bietet Bioanalytik an

Die UFAG LABORATORIEN haben bioanalytische Methoden für Proteine etabliert. Zum Portfolio zählen u.a. elektrophoretische Methoden wie SDS-PAGE, IEF und 2D-Kombinationen davon, Blotting-Techniken sowie die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung. Mit der nötigen Infrastruktur und Know-how werden Beratung und Analytik angeboten. ■

\*ZUM AUTOR  
Dr. Martin Knauf  
Leiter Marketing & Verkauf  
UFAG LABORATORIEN AG  
CH-6210 Sursee  
Kontakt: info@ufag-laboratorien.ch



- Schauglasarmaturen
- Leuchten und Kamerasysteme
- LED-Technik
- Für den Ex-Bereich

**angenstein**  
Technik für die Zukunft

Angenstein AG, CH-4147 Aesch

LICHT UND SICHT FÜR VERFAHRENSTECHNISCHE PROZESSE



T +41 (0)61 756 11 11  
F +41 (0)61 756 11 04

info@angenstein.ch  
www.angenstein.ch