



Absolutquantifizierung proteinischer Wirkstoffe

Quantitative Analyse von Mistel-Lektin I in Pflanzenextrakten für Phytopharmaka

Als Alternative zu Immunoassays können Proteine auch mit Massenspektrometrie zuverlässig quantifiziert werden. In manchen Fällen ist sie den Immunoassays sogar überlegen, wie die Quantifizierung von Mistel-Lektin I in phytopharmazeutischen Mistelextrakten belegt. Die Massenspektrometrie führt schneller zu Ergebnissen und schließt irreführende Kreuzreaktionen mit anderen Lektinen aus. Mit ihrer Spezifität und Sensitivität ist die Massenspektrometrie zur Proteinquantifizierung auch für Hersteller von Biopharmazeutika interessant.

Fast 1,2 Mrd. € setzten Deutschlands Apotheken im vergangenen Jahr mit rezeptfreien Phytopharmaka um. Gut 220 Mio. € davon entfielen auf Phytopharmaka, die von Ärzten verordnet wurden. Um zulassungs- und insbesondere auch erstattungsfähig zu sein, müssen Phytopharmaka die Vorgaben des aktuellen Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 2002) erfüllen. Für sog. standardisierte Extrakte ist dort festgeschrieben, dass der Hersteller sie auf einen definierten Gehalt einer wirksamen Leitsubstanz mit einer Abweichung von $\pm 5\%$ einstellen muss.

Massenspektrometrie – schnelle Alternative ohne Kreuzreaktionen

Handelt es sich bei den Leitsubstanzen um proteinische Substanzen, so werden derartige Analyseaufgaben im Allgemeinen mit Immunoassays bearbeitet. Doch es gibt auch Fälle, in denen Hersteller von Phytopharmaka auf Massenspektrometrie setzen. Die Vorteile der Massenspektrometrie gegenüber Immunoassays: Die Massenspektrometrie kann als Methode schneller etabliert werden, Quantifizierungen können somit kurzfristig durchgeführt werden. Die Antikörperentwicklung für einen Immunoassay nimmt dagegen gut fünf Monate oder länger in Anspruch. Zum anderen werden aufgrund der hohen Spezifität der Massenspektrometrie Kreuzreaktionen vermieden. Sie treten auf, wenn das Analysematerial Proteine mit sehr ähnlichen Epitopen enthält. Die naturge-

mäß hohe Selektivität von Antikörpern stößt dann an ihre Grenze. Das Risiko steigt, dass Antikörper an Strukturen binden, die nicht zum Zielmolekül gehören. Damit wächst die Gefahr, dass das Analyseergebnis falsch interpretiert wird.

Ähnlichkeit macht Analysen schwierig

Zu den phytotherapeutisch interessanten Substanzen zählen Mistel-Lektine (ML) aus Mistelextrakten. Die quantitative Analyse von Mistel-Lektinen ist jedoch eine Herausforderung, denn Misteln produzieren eine Vielzahl an homologen Mistellektinen (die Hauptmistel-Lektine sind ML I, ML II und ML III), die einander sehr ähnlich sind. Sowohl bei polyklonalen als auch bei monoklonalen Antikörpern verursachen sie starke Kreuzreaktionen. Eine zuverlässige Quantifizierung, die den Vorgaben der Arzneimittelzulassung entspricht, wird dadurch erheblich erschwert. Die Fa. biosyn. Arzneimittel, ein Pharmaunternehmen aus Fellbach bei Stuttgart, hat sich daher für die Massenspektrometrie entschieden, um eines seiner Produkte quantitativ analysieren zu lassen und diese

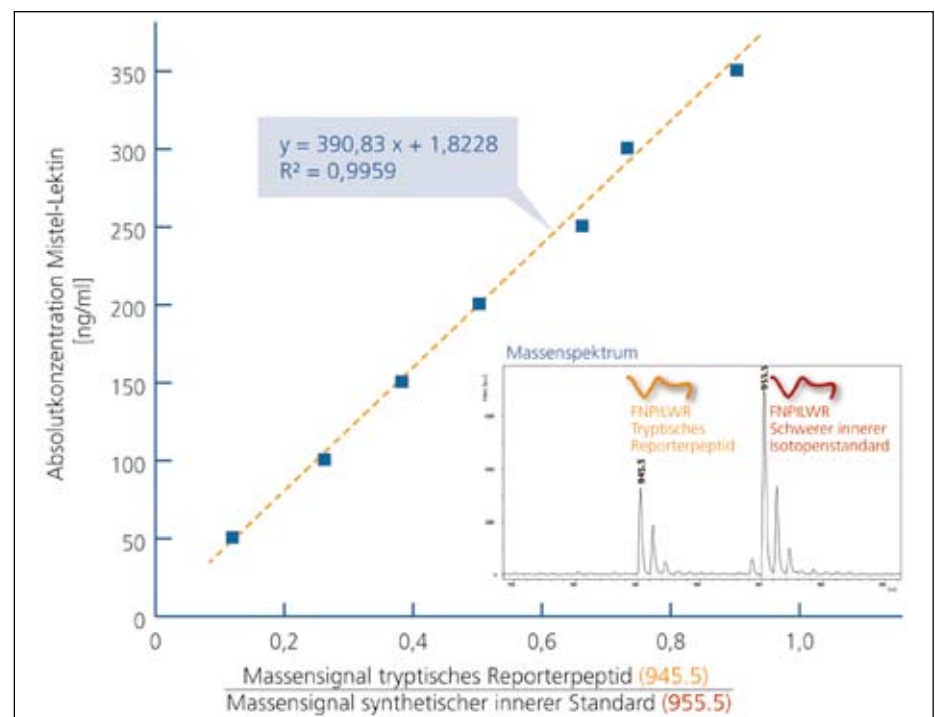


Abb. 1: Massenspektrometrie eines Mistel-Lektin-I-Standards: anhand des Massenunterschieds von zehn Dalton können Reporterpeptid und innerer Standard voneinander unterschieden werden. Die Kalibriergerade zeigt, dass sogar eine Peptid-Konzentration von nur 50 ng/ml noch erfasst werden kann. Linearität besteht zwischen 50 ng/ml und 350 ng/ml.

Methode künftig für die Qualitätskontrolle einzusetzen. Es handelt sich um einen Mistelextrakt mit Mistel-Lektin I als Leitsubstanz.

Mistel-Lektin I ist ein Glykoprotein, bestehend aus einer 245 Aminosäuren langen A-Kette mit einer Glykosylierungsstelle, und einer 264 Aminosäuren langen B-Kette mit drei Glykosylierungsstellen. Bei den meisten der 25 Isotypen von Mistel-Lektin I sind die beiden Einheiten über eine Disulfidbrücke verknüpft.

Trypsinverdau, Reporterpeptid und Kalibrierung

Die quantitativen Analysen führte die Fa. Panatecs, Tübingen, durch. Zunächst wurden die Proteine des Mistelextrakts und somit auch die Typ-I-Lektine mit Trypsin in Peptide gespalten. Der Trypsinverdau ist ein Prozessschritt, der die Exaktheit der Analyse maßgeblich beeinflusst. Nur wenn alle Typ-I-Lektine quantitativ in Peptide zerlegt wurden, kann der Lektin-I-Gehalt genau bestimmt werden.

Anschließend wird ein interner Standard hergestellt. Als Vorlage für den internen Standard ist nur ein Peptid geeignet, das allein aus der Leitsubstanz Mistel-Lektin I stammt, also nicht zugleich Fragment eines anderen Mistelproteins ist. Die Aminosäuresequenz dieses Reporterpeptids wird im hergestellten inneren Standard exakt nachgebaut. Somit verhalten sich beide Peptide bei nachfolgenden Chromatographieschritten gleich.

Es konnte ein geeignetes Reporterpeptid identifiziert werden, seine Sequenz ist FNPILWR. Bei der Herstellung des internen Standards wurde ein Peptid generiert, das insgesamt zehn Isotopenaustausche von ^{13}C und ^{15}N aufweist. Das interne Standard-Peptid hatte nun eine Masse von 955,5 Dalton gegenüber 945,5 Dalton des Reporterpeptids. Interner Standard und Reporterpeptid lassen sich damit massenspektrometrisch eindeutig unterscheiden. Bei allen weiteren Schritten des Analyseprozesses gehen sie aufgrund ihrer identischen chemisch-physikalischen Eigenschaften jedoch Hand in Hand.

Mengenverhältnis konstant

Die Probenaufarbeitung für die Massenspektrometrie muss sicherstellen, dass keine weiteren Peptide vorhanden sind, die die gleichen Molekülmassen besitzen wie die Reporter- oder die Standardpeptide. Die Erfahrung zeigt, dass selbst bei komplexen Gemischen die Komponenten nach einer zweidimensionalen Chromatographie ausreichend separiert vorliegen. Selbst mehrere

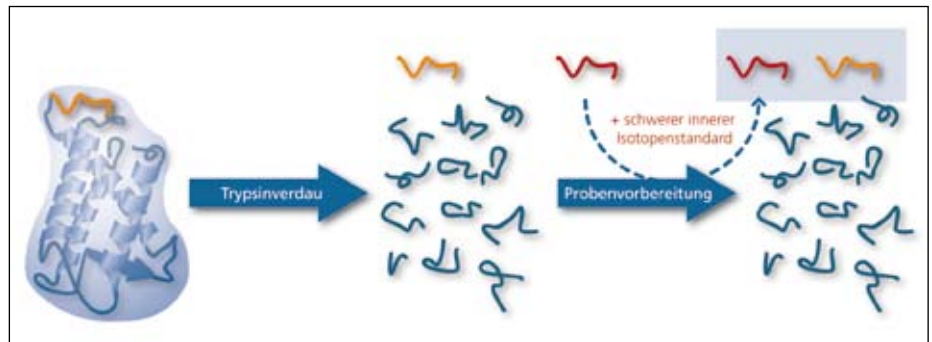


Abb. 2: Für die Massenspektrometrie wird das zu messende Protein enzymatisch vollständig in Peptide zerlegt. Unter den Peptiden wird ein Reporterpeptid (orange) identifiziert, das nur im Zielprotein vorkommt. Dieses wird als schwerer innerer Standard (rot) nachgebaut und dabei mit ^{13}C und ^{15}N Isotopen markiert.

Chromatographieschritte würden die Zuverlässigkeit der Methode nicht gefährden. Da das Elutionsverhalten von Standard- und Reporterpeptid identisch ist, bleiben deren Konzentrationsverhältnisse auch bei Mengenverlusten erhalten.

Zur Kalibrierung wurden bekannte Mengen des Reporterpeptids, die durch quantitativen Verdau eines Mistel-Lektin I Standards generiert wurden, und des Standardpeptids massenspektrometrisch erfasst, die Peakflächen aus den Messungen ins Verhältnis gesetzt und der Konzentration des Reporterpeptids gegenübergestellt. Daraus lässt sich eine lineare Beziehung ableiten, die später in der Probenmessung Auskunft über die Konzentration der Leitsubstanz Mistel-Lektin I gibt.

Das Verfahren erwies sich als sehr sensitiv und hochspezifisch. Obwohl sich in einem Mistelextrakt viele phytochemische Verbindungen befinden und allein schon die Lektin-Typen II und III potenzielle Störfaktoren sein können, lieferte die Methode stets zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse. Selbst Mistel-Lektin I-Konzentrationen von 50 ng/ml ließen sich erfassen.

Geeignet auch für biotechnologisch hergestellte Proteine

Die vorgestellte Methode eignet sich nicht nur für die quantitative Analyse von proteinhaltigen Pflanzenextrakten. Auch für die Entwicklung und klinische Prüfung von Biopharmazeutika ist die Massenspektrometrie eine Methode mit Potenzial. So lässt sie zum Beispiel Aussagen zur Pharmakokinetik von proteinischen Wirkstoffen zu. Sie kann die Konzentration von Biopharmazeutika, Biosimilars und deren Abbauprodukten im Blut zuverlässig und mit hoher Empfindlichkeit analysieren. In der biotechnologischen Produktion kann das Verfahren eingesetzt werden, um



Abb. 3: Misteln enthalten unter anderem Mistel-Lektin I, das als wirksame Leitsubstanz in pflanzlichen Arzneimitteln dient (Foto: biosyn Arzneimittel).

Konzentration und Qualität von Peptiden und Proteinen direkt im Produktionsmedium oder nach Zellaufschluss zu bestimmen. Seine rasche Verfügbarkeit und seine hohe Sensitivität machen es attraktiv für alle Entwickler und Hersteller, die am schnell wachsenden Markt der Biotechmedikamente aktiv sind.

Autoren: Dr. Thomas Flad, Dr. Gerold Schwarz (jeweils Panatecs, Tübingen), Dr. Thomas Stiefel (Biosyn Arzneimittel, Fellbach)

KONTAKT

Dr. Thomas Flad
Panatecs GmbH
Tübingen
Tel.: 07071/92058-0
info@panatecs.com
www.panatecs.com