

Untersuchungen zur Charakterisierung und Standardisierung von Allergenextrakten aus Milbenkulturen

Allergenextrakte zur Diagnostik und Therapie werden im deutschen Arzneimittelgesetz als Arzneimittel klassifiziert und unterliegen somit den entsprechenden Qualitätskriterien. Bei Arzneizubereitungen mit und ohne wirksamkeits-bestimmenden Substanzen ist der gesamte Anteil des „Extraktes“ maßgebend und auch qualitätsbestimmend, d.h. eine Normierung auf nur einen Inhaltsstoff kann somit nicht erfolgen.

Das Fehlen nationaler und internationaler Standards bedingt große Qualitätsunterschiede zwischen den Präparaten verschiedener Hersteller und erfordert so eine komplexe und aufwendige Qualitätssicherung. Qualität ist bei der Herstellung von Allergenextrakten kein wohl definierter, allgemein anerkannter und geprüfter Zustand, sondern eine individuelle Interpretation des Herstellers.

Als einzige Vorgabe zur Qualitätssicherung und -erreichung wird daher gefordert, dass Herstellungs- und Kontrollmethoden nach dem jeweiligen „Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis“ angewandt werden müssen. Eine *in-vivo* Hauttestung zur biologischen Aktivität ist nur bei der erstmaligen Zulassung des Präparates vorgeschrieben, die nachfolgende Chargenkontrolle erfolgt *in-vitro*.

In Ermangelung verbindlicher nationaler und/oder internationaler Vorgaben zur Allergenstandardisierung und Qualitätskontrolle werden Extrakte hinsichtlich ihrer globalen Aktivität

- auf biologischer Basis (Histaminäquivalent im Pricktest), und
- durch eine *in-vitro*-Methodik (z.B. EAST-Inhibition oder Histamiliberation) eingeschätzt.

Die Standardisierung der Allergenstandards anhand biologischer Einheiten ist sinnvoll, da sie die Summe aller individuellen Aktivitäten repräsentieren. Allerdings sind keinerlei Rückschlüsse auf individuelle Allergenkonzentrationen möglich, so dass eine hohe Aktivität u.U. auch ohne Majorallergene zustande kommen kann.

Betrachtet man die allergene Aktivität eines Allergenextraktes als die Summe einzelner Komponenten, wobei jede Komponente bzw. jedes Allergen einen individuellen Beitrag liefert, so bekommt die Bestimmung von Einzelallergenen und die Zuordnung individueller spezifischer Aktivitäten eine neue Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck u.a. Untersuchungen

- zum schonenden Aufschluss von Milbenkulturen,
- zur physikalisch-chemischen Charakterisierung,
- zur funktionellen Aktivität des Extraktes sowie
- zur Fragmentierung und Struktur der allergenen Komponenten unternommen.

Objekt der Untersuchungen waren Kulturen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* verschiedener Hersteller und eine Kultur der Vorratsmilbe *Lepidoglyphus destructor*.

Ergebnisse

Milbenreinkulturen als auch mit Kulturmedien versetzte Kulturen waren zur Charakterisierung geeignet. Unterschiede zwischen den verwendeten Aufschlussmedien Cocas'-Lösung und Ammoniumhydrogencarbonat wurden nicht festgestellt. Der Zusatz von Polyethylenglykol führte zu qualitativen Veränderungen im Extrakt, deren Bewertung allerdings noch weiterer Untersuchungen bedarf. Die Dialyse zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten ist

aufgrund erhöhter Fragmentierung und latenter Proteaseaktivität der Milbenextrakte zu vermeiden. Eine verbesserte Lagerfähigkeit der Extrakte konnte durch eine Lyophilisation erreicht werden. Diese führte zu einer Verschiebung des Fragmentierungsmusters hin zu niedermolekularen Fragmenten, andererseits konnte ein Allergenspektrum über den gesamten Molekulargewichtsbereich in der spezifischen IgE-Bestimmung durch Inkubation mit Patientenseren erhalten werden.

Gegenüber einer präparativen Isolierung durch Ammoniumsulfatfällung (Cohnsche Fraktionierung) zeigten sich die Extraktproteine stabil, DNS-Fragmente konnten nicht ausgefällt werden. Das erhaltene Verhältnis der Majorallergene Der p 1 und Der p 2 zueinander bestätigte für alle Extrakte aus *D. pteronyssinus* Kulturen die Klassifizierung als „Purified Body“-Kultur.

Die durchgeführte Ausschlusschromatographie erlaubte eine schnelle Bestimmung der im Extrakt vorhandenen scheinbaren Molekulargewichtsfractionen sowie eine Einschätzung der Veränderungen durch vorhergehende Aufbereitungsschritte wie z.B. eine Dialyse oder die Lyophilisation.

Qualitative Veränderungen im Proteinspektrum konnten durch die SDS-PAGE und die IEF dokumentiert werden.

Die Reaktionen der Extrakte beider Milbenspezies gegenüber den Patientenseren entsprachen bis auf wenige Ausnahmen der Literatur. Eine aus der Taxonomie heraus erklärbare Verschiedenheit der beiden Milbenspezies konnte im Immunoblot deutlich herausgearbeitet werden. Die in der Literatur aufgezeigte Bindungsfrequenz für Der p 1 in Patientenseren von ~80 % konnte nicht bestätigt werden.

Die Proteaseaktivitätsbestimmung der Lyophilisate mittels Casein-Zymogramm zeigte unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche und herkunfts-spezifische Gesamtaktivitäten den Ursprungskulturen (Europa vs. Australien) der Spezies *D. pteronyssinus* auf. Ob es sich hierbei um in der Ursprungskultur begründete Unterschiede oder um produktionstechnische Effekte wie z.B. durch Gefriertrocknung handelte, konnte nicht zugeordnet werden.

Die MALDI-TOF-Massenspektroskopie konnte als hoch effektives Analyseverfahren erstmals auf komplexe Milbenextrakte angewandt werden. Ergebnisse durchgeführter Immunreaktionen sowie chromatographischer und elektrophoretischer Trennverfahren konnten im Detail bestätigt und zugeordnet werden.