

Polymerbasierte Implantate für die kontrollierte Freisetzung von Allergoid für die Allergen-Immuntherapie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anton Römer

Hamburg, 2023

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Regina Scherließ

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2024

Insanity is doing the same thing over and over and expecting different results.

Albert Einstein

Für meine Familie.

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder eines Patentschutzes lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Zielsetzung.....	3
2.	Theoretischer Hintergrund.....	4
2.1.	Grundlagen allergischer Erkrankungen	4
2.1.1.	Klassifizierung allergischer Erkrankungen.....	4
2.1.2.	Prävalenz allergischer Erkrankungen	5
2.1.3.	Immunologischer Mechanismus IgE-vermittelter Allergien.....	6
2.1.4.	Birkenpollenallergie	8
2.1.5.	Allergische Rhinitis	9
2.2.	Allergen-Immuntherapie	10
2.2.1.	Immunologischer Mechanismus der Allergen-Immuntherapie.....	10
2.2.2.	Applikationsformen.....	13
2.2.3.	Die Compliance Problematik	15
2.2.4.	Allergoid	16
2.3.	Kontrollierte Wirkstoffabgabesysteme	19
2.3.1.	Grundlagen	19
2.3.2.	Parenterale cDDS	21
2.3.3.	Bioabbaubare Polymere als Trägersystem für cDDS.....	22
2.3.4.	Poly-Lactid-co-Glycolid.....	23
2.4.	PLGA-basierte Implantate	26
2.4.1.	Grundlagen PLGA-basierter Implantate.....	26
2.4.2.	Schmelzextrusion.....	27
3.	Material und Methoden.....	31
3.1.	Materialien	31
3.1.1.	Birken-Allergoid.....	31
3.1.2.	Bioabbaubare Polymere.....	31
3.2.	Methoden	32

3.2.1.	Präparative Methoden	32
3.2.2.	Analytische Methoden	35
4.	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1.	Entwicklung eines Extrusionsprozesses für Birken-Allergoid Implantate.....	43
4.1.1.	Einleitung	43
4.1.2.	Thermische Analyse der Polymere	43
4.1.3.	Übertragung der thermischen Analyse auf den Extrusionsprozess	46
4.1.4.	Herstellungsprozess.....	46
4.1.5.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	48
4.1.6.	Allergoid-Charakterisierung	52
4.1.7.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	61
4.1.8.	Kapitelzusammenfassung	65
4.2.	Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate	66
4.2.1.	Einleitung und Herstellungsprozess	66
4.2.2.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	69
4.2.3.	Allergoid-Charakterisierung	72
4.2.4.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	79
4.2.5.	Kapitelzusammenfassung	85
4.3.	Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit 17,5-prozentiger Gesamtbeladung.....	86
4.3.1.	Einleitung und Herstellungsprozess	86
4.3.2.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	88
4.3.3.	Allergoid-Charakterisierung	91
4.3.4.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	99
4.3.5.	Kapitelzusammenfassung	101
4.4.	Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit Mg(OH) ₂ als pH-Stabilisator	102
4.4.1.	Einleitung und Herstellungsprozess	102
4.4.2.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	106
4.4.3.	Allergoid-Charakterisierung	109

4.4.4.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	116
4.4.5.	Kapitelzusammenfassung	125
4.5.	Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit weiteren pH-Stabilisatoren	125
4.5.1.	Einleitung und Herstellungsprozess	125
4.5.2.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	128
4.5.3.	Allergoid-Charakterisierung	131
4.5.4.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	142
4.5.5.	Kapitelzusammenfassung	146
4.6.	Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses für Trehalose-stabilisierte Birken- Allergoid Implantate mit Mg(OH) ₂	147
4.6.1.	Einleitung und Herstellungsprozess	147
4.6.2.	Morphologische Charakterisierung der Implantate	149
4.6.3.	Allergoid-Charakterisierung	154
4.6.4.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	162
4.6.5.	Kapitelzusammenfassung	165
4.7.	Abschließende Diskussion	166
4.7.1.	Herstellung PLGA-basierter mittels Schmelzextrusion.....	167
4.7.2.	Allergoid-Stabilität nach Schmelzextrusion.....	169
4.7.3.	In-vitro-Allergoid-Freisetzung	169
5.	Fazit und Ausblick	176
5.1.	Fazit	176
5.2.	Ausblick.....	178
5.2.1.	Extrusionsprozess	178
5.2.2.	Freisetzungsexperimente	178
5.2.3.	Formulierungsentwicklung.....	179
5.2.4.	Übertragung auf weitere Allergoid-Wirkstoffe.....	179
6.	Zusammenfassung.....	181
7.	Abstract (english version)	183
8.	Anhang.....	184

8.1. Puffer	184
8.2. Unterstützende Ergebnisse	186
8.3. Abkürzungen	192
8.4. Publikationsliste	196
9. Referenzen.....	197
10. Danksagung.....	213
11. Erklärung nach § 9 der Promotionsordnung	214

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung

Unser heutiges Verständnis von Allergien beschreibt eine unverhältnismäßig starke Überempfindlichkeit des Körpers gegenüber nicht pathogenen Stoffen [1]. Die Entwicklung einer Allergie beginnt häufig in den frühen Lebensjahren und ist als multifaktorieller Prozess beschrieben [2]. Mit schätzungsweise 30 Millionen Betroffenen kann in Deutschland mittlerweile von einer Volkskrankheit gesprochen werden [3]. Weltweit sind etwa 10–30 % aller Menschen von mindestens einer Allergie betroffen. Die am häufigsten auftretende Allergieform basiert dabei auf einem IgE-vermittelten Pathomechanismus [4–9]. Der Ausbildung solch einer Allergie ist eine Sensibilisierung mit einem Auslöserstoff, welcher auch als Allergen bezeichnet wird, vorangestellt [10]. Die Hauptquelle pflanzlicher Inhalationsallergene sind Pollen, welche vor allem in Mittel- und Nordeuropa auf Birkenpollen oder verwandten Arten der Ordnung *Fagales* basieren [11].

Die bislang einzige kausale Therapiemöglichkeit zur Behandlung IgE-vermittelter Allergien, wie allergische Rhinitis oder allergischem Asthma, ist die Allergen-Immuntherapie (AIT) [12, 13]. Dabei wird eine Remission der zugrundeliegenden Allergie, mindestens jedoch eine Verbesserung der Symptomatik, durch regelmäßige Konfrontation des Immunsystems des Patienten mit den allergieauslösenden Stoffen erzeugt. Die dabei verwendeten Allergene können in nativer oder chemisch modifizierter Form (Allergoid) vorliegen [14]. Die in Deutschland zugelassenen AIT-Therapeutika werden entweder über eine subkutane oder sublinguale Route über einen Zeitraum von mindestens drei bis fünf Jahren appliziert [15]. Die subkutane Immuntherapie (SCIT) erfolgt durch Injektion des Wirkstoffes in den seitlichen Oberarm in Intervallen von 4–8 Wochen, wohingegen bei der sublingualen Immuntherapie (SLIT) eine tägliche Einnahme von Tropfen oder Tabletten erfolgen muss [15, 16].

Einer der kritischsten Faktoren für den Nichterfolg der AIT ist die Therapietreue der Patienten [17]. Besonders die lange Therapiedauer und damit zusammenhängenden Umstände der Vielzahl an Applikationen stellen einen Hauptgrund für die geringe Therapietreue der AIT dar [18, 19].

Eine langanhaltende Wirkstoffkonzentration innerhalb des therapeutischen Bereiches ist jedoch besonders für die Behandlung chronischer Erkrankungen, für einen Therapieerfolg unerlässlich. Mit konventionellen Wirkstoffabgabesystemen wie Tabletten, Kapseln oder Lösungen wird häufig eine schnelle Wirkstofffreisetzung erzielt, was eine Mehrfachadministration des Arzneimittels erfordert [20]. Durch die Verwendung von Darreichungsformen mit einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung (*controlled Drug Delivery Systems* (cDDS)) kann ein konstanter Wirkstoffspiegel ohne Mehrfachadministration über

einen längeren Zeitraum aufrecht gehalten werden [21]. Durch die Verabreichung parenteraler cDDS über intramuskuläre oder subkutane Injektion wird ein vorübergehender Wirkstoffbolus in einer interstitiellen Umgebung erzeugt, aus dem eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung durch Absorption in die Blutgefäße oder Drainage in das Lymphsystem erzielt wird [22]. Zu den parenteralen cDDS können unter anderem Liposomen, Mikrosphären, Suspensionen, Gele, Emulsionen und Implantate gezählt werden [23].

Bioabbaubare Polymere sind als Trägersystem bei parenteralen cDDS in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Forschung getreten. Sie bieten den Vorteil, dass das Trägersystem im Körper vollständig abgebaut wird [20]. Das von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die parenterale Anwendung zugelassene, bioabbaubare Polymer Poly-Lactid-co-Glycolid (PLGA) zählt dabei zu den am intensivsten untersuchten Polymeren [24, 25].

PLGA kann als Grundlage diverser Trägersysteme wie Implantate, in-situ formende Gele, Mikropartikel oder Nanopartikel fungieren und durch verschiedene Herstellungsmethoden wie Koazervation, Sprühtrocknung, Doppalemulsion, Elektrosponning oder Schmelzextrusion (SME) prozessiert werden [26]. Bislang wurden von der FDA über 25 PLGA-basierte Medikamente für verschiedene Indikationen zugelassen [27].

Bei der SME werden polymere Materialien und Wirkstoffe bei kontrollierter Temperatur unter Druck in einem beheizten Extruderraum miteinander vermischt und durch eine formgebende Düse zu einem einheitlichen Produkt, wie zum Beispiel einem Implantat geformt [28]. Der Prozess erfolgt dabei kontinuierlich bei Prozesstemperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur (T_g) der eingesetzten Polymere, um eine Dispersion der Wirkstoffe in der Polymermatrix auf molekularer Ebene zu gewährleisten [29].

Eines der wichtigsten Faktoren, welche die Therapietreue der AIT beeinträchtigen, sind die Unannehmlichkeiten im Zusammenhang mit der hohen Anzahl an erforderlichen Applikationen für einen Therapieerfolg [19]. Durch Kombination von Kenntnissen auf dem Fachgebiet der Allergologie und pharmazeutischen Technologie soll in dieser Arbeit ein erster Versuch gestartet werden, eine neue Formulierung mit kontrollierter und kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung für die AIT zu erforschen und dadurch den Betroffenen den Zugang zu einer neuen, patientenfreundlicheren Therapieoption zu ermöglichen.

1.2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer innovativen, polymerbasierten Depotformulierung für die kontrollierte und kontinuierliche Langzeitfreisetzung von Birken-Allergoid über einen Zeitraum von 6–9 Monaten. Damit soll der Grundstein in der Entwicklung einer neuen, patientenfreundlicheren Applikationsform für die Allergen-Immuntherapie zur Behandlung IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen gelegt werden. Die Entwicklung erfolgt anhand zwei verschiedener PLGA-basierter Polymere sowie Birken-Allergoid, aus denen Implantate mittels SME hergestellt werden.

Es soll überprüft werden, ob die SME als Herstellungsmethode PLGA-basierter Birken-Allergoid Implantate geeignet ist. Dazu müssen geeignete Prozessparameter auf Basis der thermischen Charakteristika der verwendeten Polymere identifiziert werden. Ziel ist es, einen reproduzierbaren Extrusionsprozess zu entwickeln, der Implantate mit einer homogenen Morphologie und Allergoid-Beladung für verschiedene Formulierungszusammensetzungen erzeugt.

Ein Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung des Allergoids nach der Schmelzextrusion und Extraktion aus den Implantaten. Das Ziel dabei ist, ein Allergoid mit konservierten physikochemischen und immunologischen Eigenschaften aus den Implantaten zu extrahieren.

Das Erosionsverhalten der Implantate und die Allergoid-Freisetzung sollen während mehrwöchiger In-vitro-Studien unter physiologischen Bedingungen untersucht und das freigesetzte Allergoid hinsichtlich seiner Stabilität überprüft werden. Zudem soll die Formulierung durch Einsatz von Hilfsstoffen hinsichtlich der Allergoid-Stabilität und kumulativen Freisetzung optimiert werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Grundlagen allergischer Erkrankungen

2.1.1. Klassifizierung allergischer Erkrankungen

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 von Clemens von Pirquet (1874–1929) in einem Artikel der „Münchener Medizinischen Wochenschrift“ verwendet und war ein Resultat seiner Forschung im Bereich der Vakzinierung. Das Wort Allergie setzte er dabei aus den griechischen Wörtern *allos* (andere) und *ergon* (Wirkung) zusammen. Von Pirquet entdeckte nach wiederholten Injektionen desselben Impfstoffes stärkere Reaktionen an den Injektionsstellen. Der Begriff Allergie sollte dabei eine spezifisch veränderte Reaktivität des Organismus auf ein externes Agens beschreiben [30–32]. Unser heutiges Verständnis von Allergien ist eine unverhältnismäßig starke Überempfindlichkeit des Körpers gegenüber per se nicht pathogenen Stoffen, die über unterschiedliche Mechanismen zu einer Erkrankung führen können [1]. Voraussetzung für die Manifestation einer Allergie ist eine vorangegangene Sensibilisierung mit einem Auslöserstoff [10]. In Deutschland sind schätzungsweise 30 Millionen Menschen von einer allergischen Erkrankung betroffen, sodass mittlerweile von einer Volkskrankheit gesprochen werden kann [3]. 1963 wurde durch Coombs und Gell ein System zur Klassifizierung verschiedener Allergien entwickelt, welches heute noch die Basis des aktuellen Klassifizierungssystems bildet [33]. Die Klassifizierung unterteilt die verschiedenen allergischen Reaktionen in vier Hauptklassen mit entsprechenden Unterklassen. Die Einteilung wurde mittlerweile weiterentwickelt und unterteilt die jeweiligen Klassen dabei nach dem zugrunde liegenden immunologischen Mechanismus [34].

Tabelle 1 illustriert die verschiedenen Allergieklassen auf Basis ihres immunologischen Pathomechanismus mit Beispielen.

Tabelle 1 Klassifizierung allergischer Erkrankungen mit dem immunologischen Mechanismus und klinischen Endotypen. Adaptiert von Kay *et al.* [31]. ¹Immunglobulin E, ²Antigenpräsentierende Zelle, ³Immunglobulin G.

Klassifizierung		Immunologischer Mechanismus	Klinischer Endotyp
Typ I	Soforttyp	Aktivierung von Antigen präsentierenden Zellen (APC) über Antigenbindung durch IgE ¹ -Antikörper gebunden an FcR1-Rezeptoren an der Oberfläche von APCs ² mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin	Allergische Rhinitis Anaphylaktische Reaktionen Frühphase Allergischer Reaktionen
Typ II a	Zytotoxische Reaktion	IgG ³ -Antikörper reagieren mit Antigen auf Zelloberfläche mit Zytolyse oder zytotoxischer Reaktion	Medikamentenallergie Inkompatible Blut Transfusion Hämolytische Anämie
Typ II b	Zell - stimulierende Reaktion	IgG-Antikörper reagieren als Agonist oder Antagonist auf Rezeptoren der Zelloberfläche mit Stimulierung oder Veränderung der Zellfunktion	Chronische Urtikaria Graves Krankheit Myasthenie
Typ III	Arthus Typ	Antigen-Antikörper Komplex Überempfindlichkeitsreaktion im Mikrovaskulären System mit eosinophiler inflammatorischer Entzündung	Serum Krankheit Exogene allergische Alveolitis
Typ IV a	Verzögerter Typ	Verzögerte allergische Reaktion durch Antigenpräsentation an CD4+ Typ 1 T-Zellen mit inflammatorischer Entzündung	Kontaktdermatitis Rheumatische Arthritis
Typ IV b	Chronische Allergische Entzündung	Eosinophile Überempfindlichkeitsreaktion durch Antigen Präsentation an CD4+/CD8+ Typ 2 T-Zellen mit eosinophiler und basophiler inflammatorischer Entzündung	Chronisches Asthma Chronische allergische Rhinitis Atopisches Ekzem Spätreaktion allergischer Reaktionen
Typ IV c	Zytotoxische Gewebs-entzündung	Zytotoxische CD8+ T-Zellen reagieren mit Antigenen auf Zelloberfläche und initiieren Apoptose	Frühphase Diabetes Typ 1 Graft-versus-Host-Erkrankung

2.1.2. Prävalenz allergischer Erkrankungen

Die am häufigsten auftretende allergische Immunreaktion unterliegt der Klasse vom Typ I und gilt als klassische allergische Erkrankung mit bekannten Endotypen wie allergische Rhinitis (AR), allergisches Asthma oder atopische Dermatitis [34, 35]. Der Auslöserstoff wird als Allergen bezeichnet und ist durch eine spezielle Molekülstruktur definiert, welche spezifische IgE-Antikörper binden kann [1]. Die Prävalenz von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen (Typ I) hat in den letzten Jahrzehnten erheblich zugenommen [36]. Das Robert Koch-Institut zeigte in seiner Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1:2008–2011), dass mindestens 30 % aller Deutschen derzeit von einer IgE-

vermittelten Allergie betroffen sind. Die Haupterkrankungen waren dabei allergisches Asthma, allergische Rhinitis und atopische oder Kontaktdermatitis [37]. Diese hohe Prävalenz wurde vom Robert Koch-Institut in seiner Studie zur gesundheitlichen Lage von Erwachsenen in Deutschland (GEDA 2019–2020-EHIS) bestätigt [38]. Weitere Studien zeigten ähnliche Ergebnisse, sodass davon ausgegangen werden kann, dass 10–30 % der weltweiten Bevölkerung von mindestens einer allergischen Erkrankung betroffen sind [4–9]. Die Manifestation einer IgE-vermittelten allergischen Erkrankung ist ein multifaktorieller Prozess, welcher sowohl von genetischen als auch von umweltbedingten Faktoren abhängig ist [2]. Die Entwicklung einer Allergie erfolgt häufig in den ersten Lebensjahren der Betroffenen. Das Robert Koch-Institut zeigte in seiner Folgerhebungsstudie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS Welle 2: 2014–2017), dass 37,1 % aller Kinder (0–17 Jahre) in Deutschland gegen mindestens ein Inhalationsallergen sensibilisiert sind und 55,7 % aller Kinder in Deutschland eine Allergiebereitschaft für mindestens ein Allergen zeigen [6]. Das Auftreten von verschiedenen aufeinanderfolgenden allergischen Erkrankungen im Leben, welche gemeinsame genetische und umweltbedingte Faktoren aufweisen und ihre Manifestation gegenseitig begünstigen, wird als atopischer Verlauf bezeichnet [39, 40]. So entwickeln 74–81 % aller Kinder mit allergischem Asthma später auch eine AR. Der atopische Verlauf beginnt häufig mit der Entwicklung einer atopischen Dermatitis in den ersten Lebensjahren, welches die Integrationsstörung der Haut und damit die Sensibilisierung durch über die Haut aufgenommenen Allergenen begünstigt [41]. Zum Nachweis einer IgE-vermittelten allergischen Sensibilisierung werden neben einer fachlichen Anamnese überwiegend Hauttestungen eingesetzt. Dabei wird eine IgE-vermittelte Sofortreaktion durch das Einbringen von hochkonzentrierten Allergenextrakten unter die Haut provoziert [12].

2.1.3. Immunologischer Mechanismus IgE-vermittelter Allergien

Der immunologische Mechanismus der Entwicklung und Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie ist in eine Sensibilisierungsphase und eine Effektorphase unterteilt. Die Sensibilisierungsphase wird auch als Erstkontakt bezeichnet und bildet das Fundament zur Manifestation einer allergischen Erkrankung. Durch Integrationsstörungen des Epithels erfolgt eine erleichterte Penetration von Allergenen, bakteriellen Toxinen und Partikeln in die Schleimhaut [1]. Die Exposition von diesen Stoffen gegenüber einer gestörten Hautbarriere führt zur Freisetzung von Alarminen, welche die Aktivierung von unreifen dendritischen Zellen und lymphoiden Zellen begünstigt [42]. Nach dem Eindringen werden die Allergene von dendritischen Zellen gebunden und in die ableitenden Lymphknoten transportiert [43]. Die Bindung der Allergene erfolgt dabei über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 2 (MHC II), der auf der Oberfläche von APC's synthetisiert wird. In den Lymphknoten wird durch die Bindung naiver T-Zellen an die auf den MHC II-Komplexen präsentierten T-Zell-

Epitope die Ausdifferenzierung der naiven T-Zellen zu allergenspezifische T-Helferzellen (Th) vom Typ 2 induziert [9]. Diese Zellen sekretieren vermehrt Interleukine (IL) (IL-2, -4, -5, -10, -13, -17) und Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) [44]. Die Th 2-Zellen binden an naive B-Zellen und induzieren mittels IL-4 und IL-13 eine Reifung zur IgE-produzierenden allergenspezifischen Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen [42]. Dieser Prozess wird auch als Isotypenwechsel bezeichnet. Die Sensibilisierungsphase ist mit der erhöhten Freisetzung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern und deren Bindung an den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI auf der Oberfläche von Effektorzellen wie Mastzellen und Basophile abgeschlossen [1, 2].

In der Effektorphase kommt es bei erneuter Exposition des sensibilisierten Allergens zur Bindung von diesen an den allergenspezifischen IgE-Fc ϵ RI Komplex auf der Oberfläche von Basophilen und Mastzellen. Dies führt zur Aktivierung der Effektorzellen und der erhöhten Freisetzung von anaphylaktogenen Mediatoren, welche eine proinflammatorische Immunantwort bewirken, die tödlich verlaufen kann. Durch eine langanhaltende Allergenexposition kann eine Chronifizierung der allergischen Erkrankung ausgelöst werden [1].

Abbildung 1 illustriert den Ablauf der zuvor beschriebenen Prozesse.

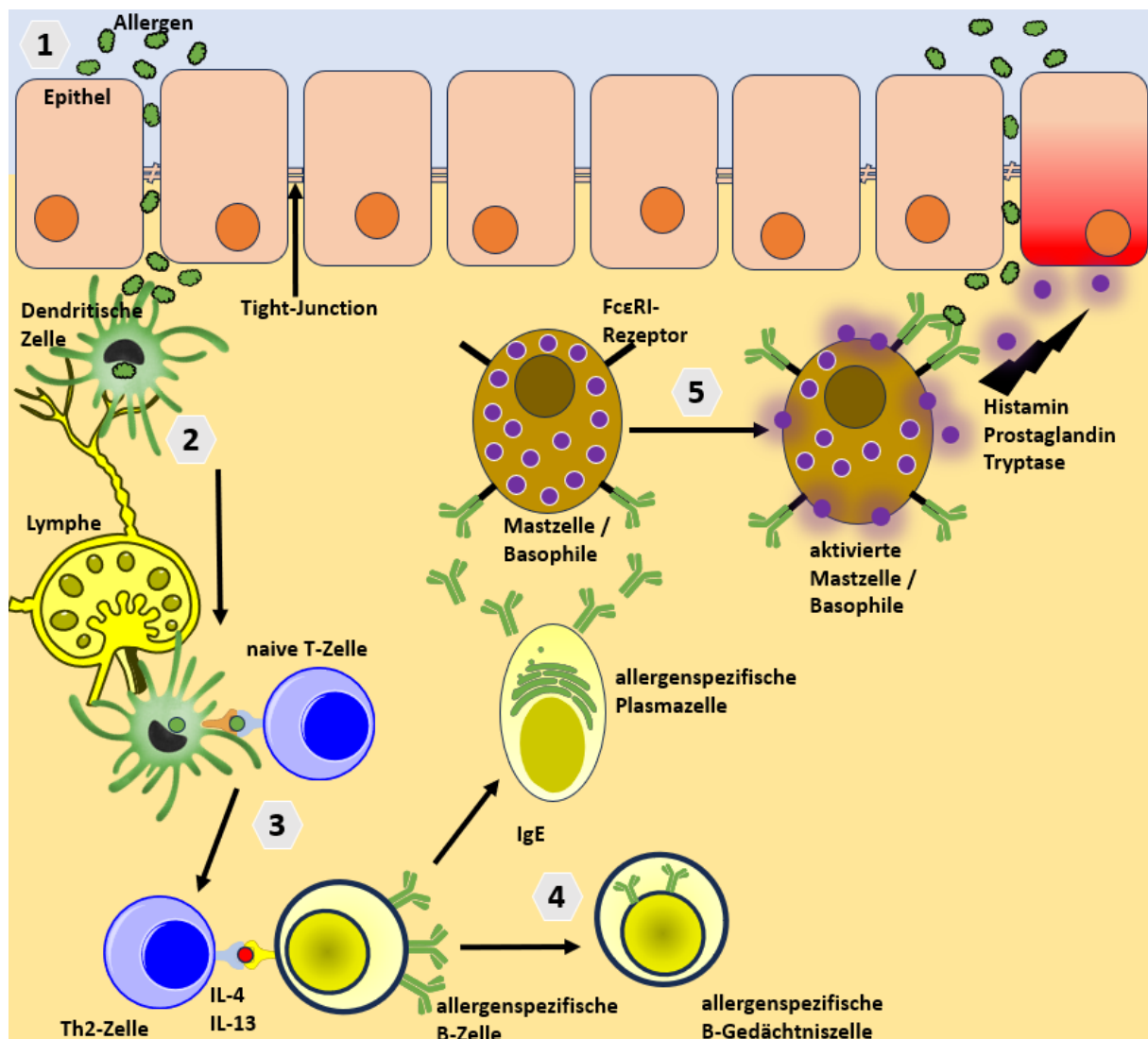


Abbildung 1 Immunologischer Mechanismus der Manifestation IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen und Reaktion unter Allergenexposition nach Sensibilisierung. Allergene penetrieren über eine gestörte Epithelbarriere in die Schleimhaut und werden von APCs aufgenommen (1). APCs migrieren in die Lymphknoten und präsentieren Allergene an naive T-Zellen über MHC II (2). Naive T-Zellen differenzieren zu allergenspezifischen Th2-Zellen (3). Allergenspezifische Th2-Zellen binden an naive B-Zellen und induzieren die Reifung zu allergenspezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen und B-Gedächtniszellen (4). Plasmazellen produzieren allergenspezifische IgE-Antikörper, welche an FcεRI-Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen binden (5). Bei erneutem Allergenkontakt werden die Effektorzellen aktiviert, was zur Freisetzung von anaphylaktogene Botenstoffe führt, die Entzündungsreaktionen auslösen. Adaptiert von Murphy *et al.* [43]

2.1.4. Birkenpollenallergie

Die Hauptquelle pflanzlicher Inhalationsallergene sind Pollen. In Mittel- und Nordeuropa basieren Baumpollenallergien zum größten Teil auf der Sensibilisierung gegenüber Allergenen aus Birkenpollen oder verwandten Arten der Ordnung *Fagales*. Das Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 gehört zur Klasse der *pathogenesis-related* protein

10 (PR-10) [11] und zählt mit einer Sensibilisierungsrate von 14,1 % der deutschen Bevölkerung zu den Hauptursachen der AR. Etwa 70 % aller Birkenallergiker zeigen eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber bestimmten Früchten, Gemüsesorten, Wurzeln und Nüssen. Diese Reaktion basiert auf einer IgE-Kreuzreaktivität, ausgelöst durch die Homologie von Bet v 1 mit bestimmten Aminosäuresequenzen in den genannten Nahrungsmitteln [45]. Poncet *et al.* Beschreiben in ihrem Update zum Pollen-Nahrungsmittel-Syndrom die strukturelle Ähnlichkeit von Bet v 1 und dem Hauptallergen in Sellerie (Api g 1) und Apfel (Mal d 1) [46] (Abbildung 2). Lebensmittelallergene sind im Allgemeinen nicht fähig, als primäre Sensibilisatoren zu fungieren, da die Proteinstrukturen häufig durch Proteasen im Verdauungstrakt zerstört werden. Beim oralen Allergiesyndrom (OAS) werden jene, dem Bet v 1 homologe, Proteinstrukturen von Bet v 1 spezifischen IgE-Antikörpern gebunden, was in einer allergischen Entzündungsreaktion endet [1, 47].

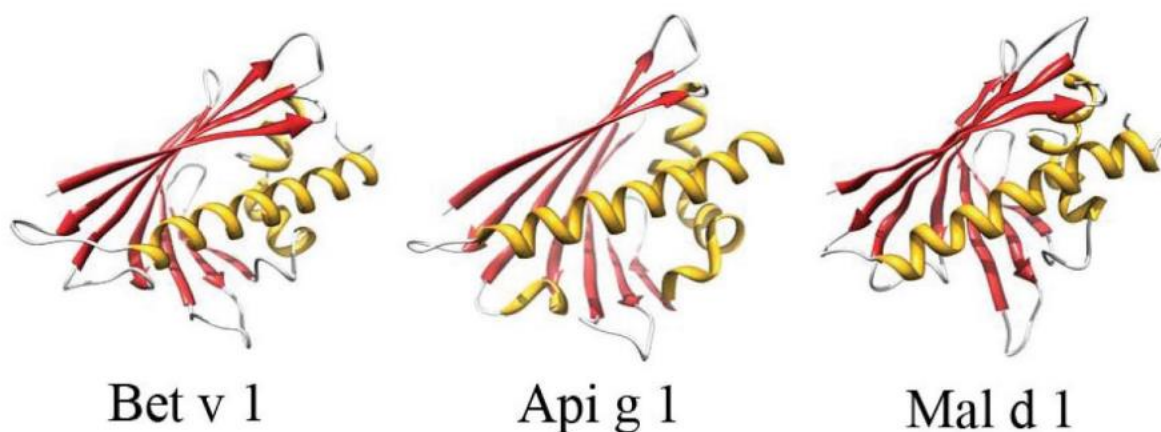


Abbildung 2 3D-Struktur der Hauptallergene Bet v 1 (Birkenpollen), Api g 1 (Sellerie) und Mal d 1 (Apfel). Bedingt durch die große Sequenzhomologie bilden alle drei Proteine ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die für die Kreuzreaktivität von Nahrungsmitteln mit Bet v 1 verantwortlich sind. Entnommen von Poncet *et al.* [46].

Eine signifikante Korrelation zwischen der Birkenpollenkonzentration in der Luft und der asthmabedingten Hospitalisierungsrate konnte nachgewiesen werden [48]. Die Birkenpollenkonzentration ist maßgeblich von meteorologischen Bedingungen wie Temperatur und Ozonkonzentration abhängig und könnte sich im Zuge des Klimawandels zusätzlich verändern.

2.1.5. Allergische Rhinitis

Die AR ist eine IgE-vermittelte Entzündung der nasalen Atemwege [10]. Weltweit sind schätzungsweise 400 Millionen Menschen von einer AR betroffen [49]. Zu den Symptomen können Rhinorrhoe, nasale Obstruktion, Nasenjucken, Niesen, aber auch eine Inflammation des Auges gezählt werden [50]. Die AR kann in eine Früh- und eine Spätphase unterteilt

werden. In der Frühphase migrieren nach Allergenexposition IgE-bindende Mastzellen in das Epithel der Nasenschleimhaut und erkennen die im Nasenschleim abgelagerten Allergene. Dies löst eine Mastzelldegranulation und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie Histamin, Tryptase, Chymase und Kininogenase aus. Die Sezernierung dieser Mediatoren führt zur Bildung von Schleimhautödemen und fördern eine erhöhte Wassersekretion. Zusätzlich werden sensorische Nerven stimuliert, wodurch Juckreiz und Niesen initiiert werden. Durch die erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt es in der Spätphase (sechs bis acht Stunden nach Allergenkontakt) zur Infiltration der Schleimhaut mit Eosinophilen, Neutrophilen und Basophilen. Die dadurch ausgelöste Inflammation kann das Epithel schädigen und die Erkrankung chronifizieren [51]. Mastzellen können durch eigens initiierte Hochregulierung ihrer FcεRI-Rezeptoren die laufende Entzündung zusätzlich noch verstärken [52]. Die zuvor beschriebenen Symptome können massive negative Auswirkungen auf die Lebensqualität der Betroffenen durch Beeinträchtigung des Schlafes und der Leistungsfähigkeit im Alltag haben [53]. Die AR kann abhängig von der Sensibilisierung des Betroffenen saisonal, ganzjährig als auch ganzjährig mit saisonaler Exazerbation auftreten. Die AR wird mittlerweile als Teil eines systemischen Entzündungsprozesses klassifiziert, welche häufig mit anderen entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, Rhinosinusitis und allergischer Bindehautentzündung koexistiert [49]. Durch die immunpathologische Ähnlichkeit der AR zu allergischem Asthma stehen diese beiden Erkrankungen unter der Theorie „Krankheit der vereinten Atemwege“ in direktem Zusammenhang miteinander [54, 55]. AR tritt bei etwa 75–85 % aller Asthmapatienten und nahezu 100 % aller Patienten mit allergischem Asthma auf, was einen bedeutenden Einfluss auf die Hospitalisierungsrate der Betroffenen und die medizinischen Gesamtkosten haben kann [56, 57]. Die spezifische Immuntherapie ist aktuell die einzige Behandlung, welche nicht nur den Krankheitsverlauf der AR verändern kann, sondern auch dem Risiko der Entwicklung von Asthma entgegenwirkt [49].

2.2. Allergen-Immuntherapie

2.2.1. Immunologischer Mechanismus der Allergen-Immuntherapie

Bereits 1903, drei Jahre vor der Prägung des Allergiebegriffes durch Piquet, konnte W.P. Dunbar die Bildung von sogenannten Antiseren in Tieren, die mit Pollenextrakten injiziert wurden, zeigen. 1911 veröffentlichte L. Noon die erste erfolgreiche klinische Immuntherapie-Studie, die er an Gräserpollen-Allergikern mit subkutan injizierten Gräserpollen-Extrakten durchgeführt, hatte und legte damit den Grundstein für die heutige Allergen-Immuntherapie [58–60]. Bis heute ist die AIT die einzige kausale Therapiemöglichkeit für die Behandlung IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen wie allergische Rhinitis oder allergischem Asthma [12, 13] und stellt eine kosteneffektivere Therapieoption als eine ausschließlich

symptomatisch wirksame Dauerbehandlung dar [61]. Anders als die symptomatische Behandlung greift die AIT in den zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus der allergischen Erkrankung ein und ermöglicht so eine langanhaltende Verbesserung oder komplette Remission der Allergie mit dem Potential, die Betroffenen präventiv vor der Entwicklung weiterer allergischer Folgeerkrankungen zu schützen [62, 63]. Bei der AIT wird das Immunsystem des Patienten in regelmäßigen Abständen mit dem zu behandelnden Allergen in nativer oder chemisch modifizierter Form (Allergoid) konfrontiert, um dadurch eine Immuntoleranz gegen das applizierte Allergen über den Behandlungszeitraum zu initiieren [14]. Der genaue immunologische Mechanismus der Toleranzentwicklung ist bislang nicht vollständig geklärt [64], jedoch wird von einer multifaktoriellen Beteiligung sowohl von humoralen als auch zellulären Änderungsprozessen während der Therapie ausgegangen [16]. Der immunologische Prozess der Toleranzentwicklung ist in verschiedene Phasen unterteilbar:

Die Frühphase der AIT ist durch eine Tachyphylaxie von Effektorzellen gekennzeichnet und kann bereits in den ersten Stunden nach Therapiebeginn durch In-vitro-Untersuchungen von Serumproben des Patienten nachgewiesen werden. Trotz hoher IgE-Serumspiegel zeigen Mastzellen und Basophile ein vermindertes Aktivierungspotential [14]. Novak *et al.* konnten eine sequenzielle Hochregulierung des Histamin-Rezeptors 2 und damit zusammenhängend eine abgeschwächte FcεRI-vermittelte Aktivierung und Mediatorfreisetzung von Basophilen in Serumproben von allergischen Probanden nach Beginn der AIT zeigen. Zusätzlich nahm die Gesamtkonzentration an Basophilen bereits sechs Stunden nach Beginn der AIT signifikant ab [65]. Des Weiteren führt die stetige Freisetzung geringer Mengen von pro-allergenischen Mediatoren, welche den Schwellenwert einer anaphylaktischen Immunreaktion unterschreiten, zu einer Erschöpfung dieser Effektorzellen und kann dadurch deren Aktivierungspotential reduzieren [14, 66].

Die zweite Phase der Therapie ist maßgeblich durch eine erhöhte Produktion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) gekennzeichnet, die als Antagonisten zu der bestehenden durch Th2-Zellen induzierten Immunantwort fungieren und die Produktion von Zytokinen peripherer Th2-Zellen gegen das jeweilige Antigen durch direkten Zellkontakt (T_{reg} -B-Zell Interaktion), aber auch durch Expression inhibitorischer Zytokine unterdrücken [14, 67]. Radulovic *et al.* identifizierten eine Zunahme an T_{reg} -Zellen in der Nasenschleimhaut von Patienten im Verlauf der AIT, was auf eine Beteiligung dieser Zellklasse bei der Toleranzentwicklung schließen lässt [68]. T_{reg} -Zellen induzieren die Expression von Interleukin-10 und dem *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) [69]. Beide Zytokine induzieren einen Wechsel der produzierten Immunglobulinklassen in B-Zellen hinsichtlich einer erhöhten Produktion von Immunglobulin A (IgA), IgG₁ und IgG₄, welche als blockierende Antikörper die Bindung von Allergenen am hochaffinen IgE-FcεRI Komplex auf der Oberfläche von

Effektorzellen verhindern [16]. Des Weiteren wird eine Verschiebung der Th2/Th1-Balance zu einer erhöhten Th1-Reaktion ausgelöst, die durch eine erhöhte Produktion von Interferon Gamma (IFN- γ) durch eine vermehrte Anzahl an Th1-Zellen detektierbar ist [70]. IFN- γ supprimiert die Th2-Antwort und induziert einen Klassenwechsel der B-Zellen hinsichtlich der Produktion von IgG-Antikörpern [62]. Kürzlich identifizierte regulatorische B-Zell-Populationen könnten einen zusätzlichen immunsuppressiven Effekt während der AIT durch Unterdrückung der CD⁴⁺-T-Zell-Proliferation und der erhöhten Expression von IgG₄ haben. Durch den Allergenkontakt in Abwesenheit einer Entzündungsreaktion bilden sich tolerogene dendritische Zellen (tolDCs), welche durch eine geringere MHC II Expression gekennzeichnet sind und die Differenzierung naiver T-Zellen in T_{reg}-Zellen sowie deren Proliferation fördern [71]. Zimmer *et al.* Zeigten diesbezüglich eine Hochregulierung von tolDC-Zellenmarkern bei Patienten, die klinisch auf die Behandlung ansprachen [72].

In der letzten Phase der Therapie etabliert sich eine langanhaltende Toleranz gegenüber dem therapierten Allergen. Dies ist im Wesentlichen auf einen Verlust allergenspezifischer T-Zell-Aktivität durch immunologische Ignoranz, mangelnde Reaktivität oder einer Depletion allergenspezifischer T-Zellen zurückzuführen [14]. Einen Anstieg der Th1/Th2- und T_{reg}/Th2-Balancen wurde von Wambre *et al.* In Patienten nach erfolgreicher AIT nachgewiesen [73]. Die Gesamthäufigkeit der allergenspezifischen T_{reg}/Th1-Zellen war jedoch im Vergleich zu den unbehandelten allergischen Probanden nicht signifikant erhöht. Die Theorie eines AIT induzierten permanenten Th1/Th2 Klassenwechsels könnte daher eher das Resultat einer Depletion von allergenspezifischen Th2-Gedächtniszellen sein. Möbs *et al.* Beschreiben diesbezüglich, dass die T_{reg}-Aktivität zwar für die Etablierung, nicht aber für eine Aufrechterhaltung der Allergietoleranz entscheidend sei und eher eine allgemein verringerte allergenspezifische T-Zell-Reaktion, die dem Pathomechanismus von gesunden, nicht allergischen Personen ähnelt und als entscheidender Faktor für die langfristige Aufrechterhaltung der Allergietoleranz fungieren könnte [74].

Zusammenfassend scheint der Prozess der Toleranzentwicklung ein Zusammenspiel verschiedener immunologischer Prozesse zu sein, deren Gewichtung noch nicht vollständig geklärt ist. Des Weiteren konnte bislang kein Biomarker für die Identifizierung einer erfolgreichen AIT gefunden werden [75].

Abbildung 3 illustriert einige der verschiedenen zuvor beschriebenen immunologischen Prozesse der Toleranzentwicklung unter AIT.

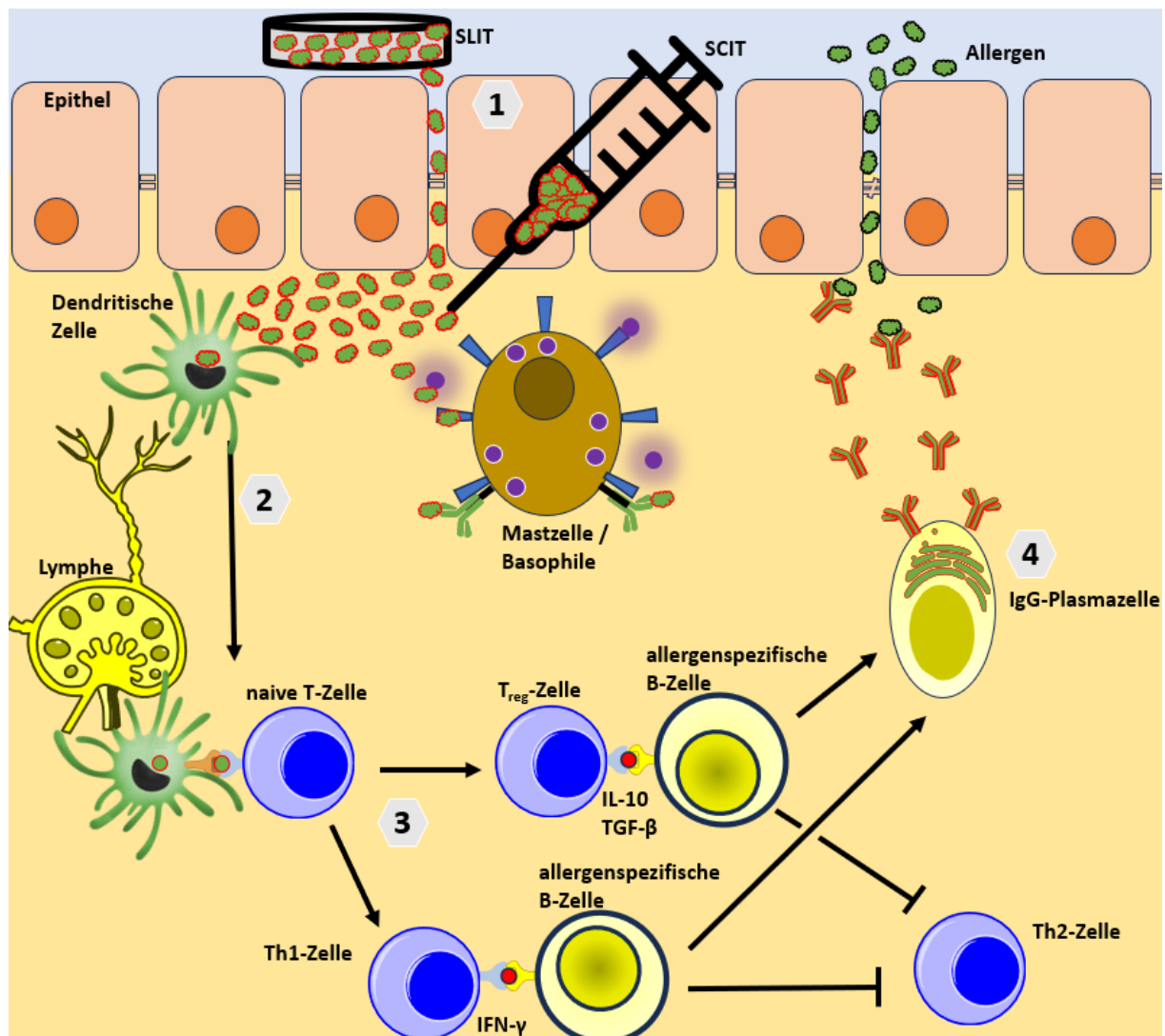


Abbildung 3 Darstellung immunologischer Mechanismen während der Toleranzinduktion unter AIT. Aufnahme von Therapieallergenen aus Therapeutika (Sublingualtabletten oder per Injektion) in das Endothel mit anschließender Tachyphylaxie von Effektorzellen (1). Aufnahme der Therapieallergene durch APC's und Transport in die Lymphknoten mit Präsentation an naive T-Helferzellen (2). Differenzierung zu Th1- und T_{reg}-Zellen und Bindung an allergenspezifische B-Zellen unter Sekretion immunsuppressiver Cytokine (3). Differenzierung von allergenspezifischen B-Zellen zu IgG₁/IgG₄/IgA sezernierenden Plasmazellen und Suppression oder Apoptose von allergenspezifischen Th2-Zellen (4).

2.2.2. Applikationsformen

In Deutschland zugelassene AIT-Präparate basieren entweder auf einer subkutanen (SCIT) oder sublingualen (SLIT) Applikationsroute. Eine erste Evaluierung über das Fortsetzen der Behandlung erfolgt in den meisten Fällen nach drei bis fünf Jahren [15]. In mehreren Studien konnte die Sicherheit, Wirksamkeit und Langzeiteffektivität zur Behandlung IgE-vermittelter Allergien für SCIT- und SLIT-Formulierungen bewiesen werden [76–84]. Weitere

Applikationsrouten, welche bislang keine gültige Zulassung besitzen und daher nur für die pharmazeutische Forschung interessant sind, administrieren die Wirkstoffe über eine epikutane (EPIT) [85], intradermale (IDIT) [86] oder intralymphatische (ILIT) [87] Route. Seit dem Inkrafttreten der Therapieallergenverordnung (2008) durch das Bundesinstitut für Gesundheit unterliegen Therapeutika, welche für die AIT in Deutschland vertrieben werden, der Zulassungspflicht nach dem Arzneimittelgesetz (AMG) § 35 [88].

2.2.2.1. SCIT

Die SCIT erfolgt durch subkutane Injektion von Allergenextrakten oder chemisch modifizierten Allergenen (Allergoide) für gewöhnlich in den seitlichen oder hinteren Teil des Armes. Die Verabreichung der Wirkstoffe trennt sich in eine Aufbau- und Erhaltungsphase. In der Aufbauphase wird dem Patienten die 1.000–10.000-fache Verdünnung der Dosis der Erhaltungsphase in steigenden Konzentrationen im Allgemeinen ein- bis dreimal pro Woche über mehrere Wochen injiziert (konventionelle Aufbauphase) [15]. Mittlerweile werden jedoch auch andere Therapieschemata wie Cluster-AIT (Erhaltungsdosis nach zwei bis vier Wochen) oder Rush-AIT und Ultra-Rush-AIT (Erhaltungsdosis nach ein bis zwei Tagen) angewendet [14]. Nach dem Erreichen der Erhaltungsdosis wird das Intervall der Injektionen auf vier bis acht Wochen gesetzt und für gewöhnlich für die Dauer des Behandlungszeitraumes fortgeführt. Dadurch, dass schwerwiegende systemische Reaktionen häufig innerhalb von 30 min nach Applikation auftreten, ist eine Verweildauer von 30 min des Patienten in der Ambulanzeinrichtung mit anschließender Bewertung des medizinischen Personals unabdingbar [15]. Während der Behandlung treten bei etwa 22 % der Patienten leichte bis mittelschwere systemische Reaktionen auf, die in seltenen Fällen zur Anaphylaxie führen. Die SCIT gilt jedoch als sichere Behandlungsmethode, wenn sie von geschultem Personal in dafür qualifizierten Ambulanzeinrichtungen durchgeführt wird [16]. Die Behandlung kann je nach der zugrunde liegenden Sensibilisierung des Patienten ganzjährig, präseasonal (vor Beginn der Pollensaison) oder kombiniert (vier bis sechs Monate vor und während der Saison) erfolgen [67].

2.2.2.2. SLIT

Bereits 1998 wurde die SLIT in einem Position-Paper der *World Health Organization* (WHO) als mögliche Alternative zu der bestehenden SCIT anerkannt, obwohl die bis dahin vorliegende Studienlage noch sehr begrenzt war [63]. Bei der SLIT werden täglich allergenhaltige Tabletten oder wässrige Allergenextrakte (Tropfen) durch den Patienten selbst unter die Zunge appliziert. Die klinische Wirksamkeit hängt maßgeblich von der Therapietreue des Patienten ab [16]. Die Gefahr einer systemischen Reaktion ist bei der SLIT deutlich geringer als bei der SCIT, jedoch nicht ausschließbar. Das Nebenwirkungsprofil ähnelt dabei sehr dem des Pollen-Nahrungsmittelsyndroms mit allergischen Reaktionen auf der Mundschleimhaut, welche besonders in den ersten Wochen nach Therapiebeginn

auftreten können [89]. Im Vergleich zur SCIT wird bei der SLIT die 50–100-fache Menge an Allergen für eine vergleichbare Wirksamkeit benötigt [90].

2.2.2.3. Adjuvantien

Im Kontext der AIT können Adjuvantien als nicht-immunogene Hilfsstoffe betrachtet werden, welche die therapeutische Wirkung oder das Sicherheitsprofil durch diverse Mechanismen verbessern können. In Deutschland sind derzeit vier Adjuvantien (Aluminiumsalze, mikrokristallines Tyrosin, Kalziumphosphat und Monophosphoryllipid A (MPL-A)) für AIT-Therapeutika zugelassen [16]. Aluminiumsalze bilden mit einem Anteil von etwa 75 % aller adjuvant basierten AIT-Präparate den Hauptanteil und werden ausschließlich in SCIT-Therapeutika angewendet [91]. Der Wirkmechanismus des Aluminiums besteht in der Bildung einer semi-Depotformulierung dadurch, dass die in Lösung befindenden Allergene an die Oberfläche von Aluminiumsalze adsorbieren, von denen sie nach Injektion nur langsam diffundieren, wodurch neben einer verlängerten Wirkung auch eine übermäßig starke systemische Reaktion unterbunden wird. Die Adsorption führt zusätzlich zur Bildung von Allergenpartikeln, die eine Phagozytose durch APCs erleichtern. Aluminiumsalze induzieren als Fremdkörper ebenfalls eine Entzündungsreaktion im Körper, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung von APCs an die Injektionsstelle verstärkt wird [92]. Trotz der angesehenen Sicherheit von Aluminium hinsichtlich lokalen und systemischen Nebenwirkungen konnte in den letzten Jahren eine Zunahme an Berichten über die chronische Toxizität, einschließlich des autoimmun/entzündliches Syndrom induziert durch Adjuvantien (ASIA), registriert werden [93]. Ein häufiger Kritikpunkt von Aluminium ist die schlechte Eliminationsrate aus dem Körper. Gajdanowicz *et al.* Berechneten diesbezüglich einen lebenslangen, akkumulierten Aluminiumgehalt von 0,24 mg unter einer dreijährigen AIT mit einem Allergenextrakt, der 0,5 mg Aluminium pro Dosis beinhaltet [94].

2.2.3. Die Compliance Problematik

Obwohl für die AIT klinische Wirksamkeit bewiesen wurde, zählt die Therapietreue der Patienten zu den kritischsten Faktoren für den Erfolg der Therapie. Die Daten aus einer Vielzahl an Studien, welche die Therapietreue von SCIT- und SLIT-Therapien untersuchten, zeigen ein sehr heterogenes Muster, was zum Teil damit zusammenhängen kann, dass es bislang kein standardisiertes Studienmodell zu der Bewertung der Therapietreue gibt [17]. Cox *et al.* Analysierten durch die Auswertung von 15 SCIT- und 10 SLIT-Studien zur Therapietreue, dass die Abbruchrate für SCIT zwischen 6–84 % und für SLIT zwischen 21–93 % liegt [95]. In einer groß angelegten Studie von Allergopharma GmbH wurden die personalisierten Verschreibungsdaten von 85.241 Kunden, die eine SCIT zwischen 2007 und 2011 erhielten, analysiert und auf deren Basis die Therapietreue ermittelt. Interessanterweise beendeten 60 % der Patienten die Mindestdauer von 3 Jahren, wenn sie ganzjährig behandelt wurden, im Vergleich zu 27 %, die nur eine präseasonale Therapie erhielten [96].

Die Gründe für einen Therapieabbruch sind vielfältig und können je nach Therapieschema differieren. Silvia *et al.* Dokumentierten in ihrer Studie zu Beweggründen für Therapieabbrüche, dass zu hohe Behandlungskosten für 59 % der Therapieabbrecher der Hauptgrund für die Beendigung der Therapie waren [97]. Für die SCIT können vor allem die Unannehmlichkeiten des Arztbesuches, der mindestens 30 min (Wartezeit nach Injektion) pro Besuch dauert, einen entscheidenden Einfluss auf die Therapietreue der Patienten haben. Mit Wartezeiten in der Ambulanzeinrichtung und Zeiten für An- und Abreise kann jedoch von einer deutlich höheren Zeitinvestition, die der Patient für die Therapie aufbringen muss, ausgegangen werden. Diese Umstände können zu Beeinträchtigungen von Sozial- als auch Berufsleben führen. Musa *et al.* Beschreiben als Hauptfaktor für einen Therapieabbruch die hohe Anzahl der Injektionen und die damit verbundenen Arztbesuche [18]. Dies ließ sich durch Caruso *et al.* Darin bestätigen, dass sich in ihrer Studie die Therapietreue durch eine verkürzte Aufbauphase verbessern ließ [19]. Lee *et al.* Zeigten einen altersbedingten Einfluss auf die Therapietreue der SCIT und vermuteten, dass besonders jüngere Patienten durch ein aktiveres Sozialleben eine geringere Bereitschaft zur Therapietreue aufbringen [98]. Im Vergleich zu der SLIT zeigte sich in mehreren Studien eine höhere Therapietreue für die SCIT, was möglicherweise auf die oft auftretenden oralen Nebenwirkungen bei der SLIT zurückzuführen ist [19, 99, 100].

2.2.4. Allergoid

Als Allergoidisierung wird die chemische Veränderung von Allergen-Extrakten bezeichnet. Sie wurde zur Erhöhung der Therapiesicherheit der SCIT bei gleichbleibender Wirksamkeit entwickelt. Die Modifizierung kann dabei mit unterschiedlichen Methoden, vor allem aber durch Inkubation mit Formaldehyd (Formallergoide) oder Glutaraldehyd (Glutarallergoide) induziert werden [101]. Die Verwendung von Formaldehyd für die Modifizierung nativer Allergenextrakte wurde bereits von Edgar B. Carter in einem US-Patent zur Detoxifizierung von Pollenextrakten 1935 beschrieben [102] und basierte auf der erfolgreichen Entwicklung eines detoxifizierten Diphtherie Toxins mittels Formaldehyd Behandlung durch Glenny und Hopkins von 1923 [103]. 1970 wurde der Prozess der Allergoidisierung von Marsh *et al.* In ihrer Studie an allergoidisierten Hauptallergenen der Roggenpollen erstmals immunologisch untersucht [104]. Dabei zeigten mit Formaldehyd behandelte Roggenpollenextrakte im Vergleich zu der nativen Variante eine deutlich verminderte Histaminfreisetzung in humanen allergensensibilisierten Leukozyten in-vitro, eine verminderte Hautreaktivität und eine Induktion blockierender Antikörper (IgG/IgA) gegen das Allergen in sensibilisierten Meerschweinchen.

Proteine, welche mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd behandelt werden, zeigen abhängig von ihrer Aminosäuresequenz eine Vielzahl an verschiedenen chemischen Modifikationen. In erster Instanz kommt es bei der Inkubation mit Formaldehyd zu einer reversiblen Bildung von

Methyloladdukten an primären Amino- und Thiolgruppen, welche teilweise durch Kondensation labile Schiff'sche Basen bilden. In zweiter Instanz bilden die reaktiven Schiff'sche Basen kovalente Querverbindungen mit mehreren Aminosäuren wie Arginin, Tyrosin oder Lysin. Zusätzlich können an N-Termini, 4-Imidazolidinone-Addukte über ein Schiff'sche-Base-Intermediat gebildet werden [105, 106]. Abbildung 4 illustriert die verschiedenen chemischen Prozesse während der Behandlung mit Formaldehyd.

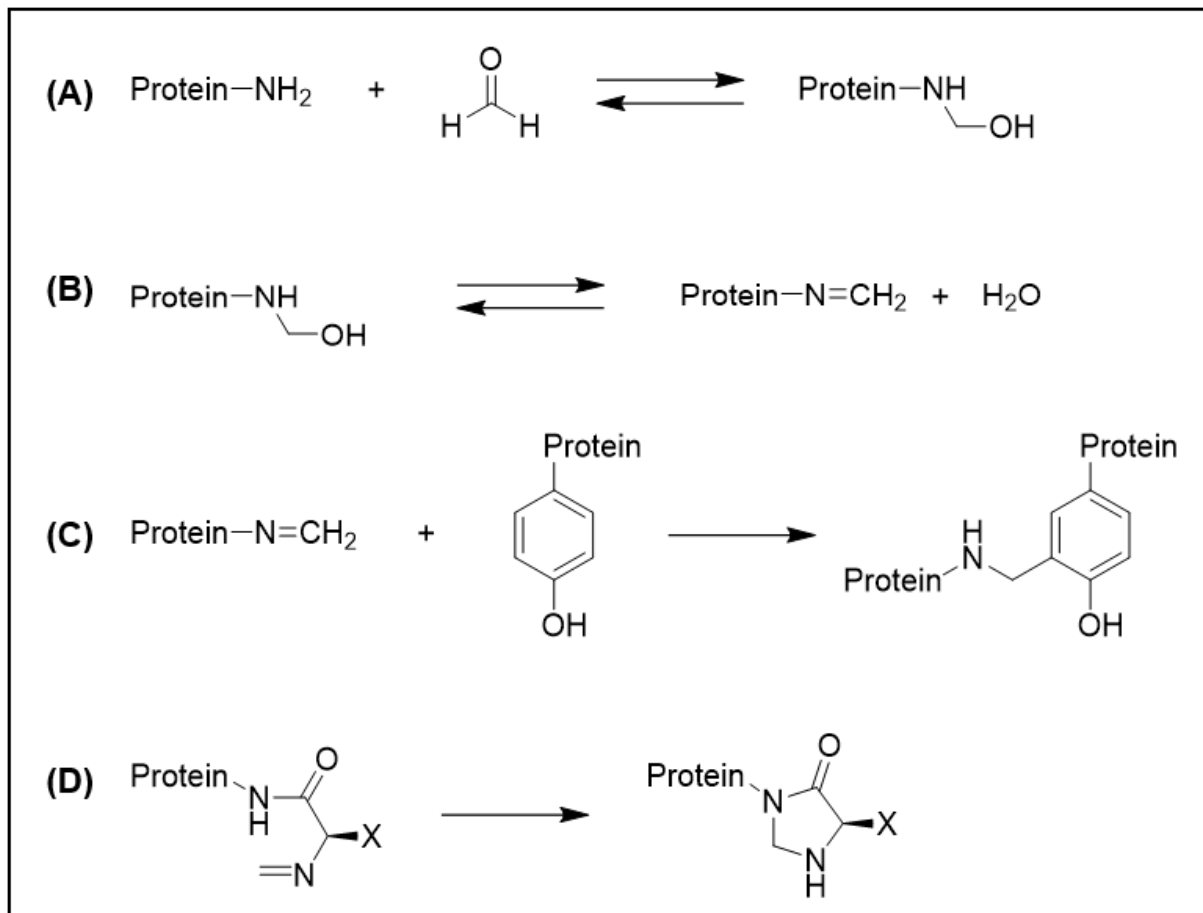


Abbildung 4 Chemischer Prozess von Proteinen unter Formaldehyd-Behandlung. Bildung von Methyloladdukten an primären Aminogruppen (A). Bildung von Schiff'schen-Basen durch Kondensation des Methyloladduktes (B). Quervernetzung der Schiff'schen-Base mit Aminosäureresten (hier Tyrosin) (C). Bildung von 4-Imidazolidinone-Addukten durch Bildung von Schiff'schen-Basen an N-terminalen Aminosäureresten (D). Adaptiert von Metz *et al.* [105].

Der Prozess der Modifizierung erzeugt dabei irreversible intra- und auch intermolekulare Querverbindungen (Polymerisation) des Proteins, wodurch spezifische IgE-Epitope des Allergens maskiert werden. Die dabei erzeugten Moleküle zeichnen sich durch eine geringere Allergenität (Fähigkeit IgE-Antikörper zu binden) bei Beibehaltung der Immunogenität (Fähigkeit T-Zell Epitope zu binden) aus [107]. Brehler *et al.* Zeigten in ihrer Studie an Birkenpollen-Formallergoid aus dem Produkt Allergovit® (Allergopharma GmbH), dass die Allergenität im Vergleich zu einem nativen Birkenpollenextrakt um das 100–1000-

fache niedriger war, die Immunogenität jedoch vergleichbar blieb [108]. Kahlert *et al.* Zeigten eine um das 10.000–40.000-fache Reduktion der In-vitro-Basophilenaktivierung von Gräserpollen-Formallergoid verglichen mit dem nativen Allergenextrakt, gemessen an der Expression von dem Prionenprotein CD203c auf Basophilen aus Serumproben von Gräserpollen-sensibilisierten Probanden [109]. In anderen Publikationen konnten ebenfalls eine verminderte Allergenität für weitere Allergoide bestätigt werden [110, 111]. Eine Allergoidisierung durch Glutaraldehyd führt, verglichen mit Formaldehyd, zu einer stärkeren Quervernetzung, da Glutaraldehyde zwei reaktive Aldehydgruppen besitzen [112]. Der folglich höhere Polymerisationsgrad führt zu einer stärkeren Reduzierung der Bindung von IgE-Antikörpern, jedoch auch zu einer verminderten Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren [113]. Henmar *et al.* Beschrieben, dass der Prozess der Allergoidisierung maßgeblich von der Konzentration der primären Amine und Thiolgruppen abhängig ist, sodass sich die chemische Quervernetzung nicht auf jedes Allergenmolekül im gleichen Maß auswirkt und daher weniger effizient für Allergene mit geringerem Anteil an primären Amin- und Thiolgruppe sein könnte [114].

Durch die reduzierte Allergenität sind Allergoide besonders für ein beschleunigtes Aufdosierungsschema geeignet und ermöglichen den Einsatz von höheren Allergenkonzentrationen in den Erhaltungsdosen [108, 115]. Trotz des theoretischen Vorteils des Allergoids, aufgrund der verminderten IgE-Bindungen zu einer höheren Therapiesicherheit zu führen, publizierte das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in ihrer Bewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen (2001), dass dafür bislang keine hinreichenden Daten aus der Praxis vorliegen und bei den untersuchten Allergenpräparaten auf Basis nativer Extrakte und Allergoide, das Risiko für schwere systemische unerwünschte Nebenwirkungen vergleichbar gewesen sei (native Extrakte: 0,002–0,0076 %; Allergoid: 0,001–0,005 %) [116]. Distler und Pappeldam kalkulierten jedoch bereits 2014 für Allergoide in dem Zeitraum von 2001 bis 2013 eine geringeren Wahrscheinlichkeit mit 0,00061 % für schwere systemische unerwünschte Nebenwirkungen [117].

Ein neuer Ansatz der Allergoidisierung unter Verzicht von Aldehyden verfolgt die selektive Substitution der ϵ -Aminogruppe von Lysin zu Ureido-Gruppen durch Kaliumcyanat (Carbamylierung). Dabei erfolgt eine Reduzierung der Allergenität bei Beibehaltung der ursprünglichen monomeren Struktur ohne Polymerisation [118]. Dies ermöglicht eine vereinfachte Absorption durch die orale Mukosa, wodurch ein Einsatz in einer SLIT-Formulierung möglich ist. Die Wirksamkeit und Sicherheit von carbamylierten monomeren Allergoiden konnte in mehreren Studien bewiesen werden und wird unter anderem von der Firma Lofarma S.p.A (Milano, Italien) als SLIT-Formulierung vertrieben [119–122].

Allergoide unterscheiden sich je nach Hersteller, Allergoidisierungsweise sowie den zugrundeliegenden nativen Proteinen [123]. Ein direkter Vergleich mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen und anderen Herstellern ist daher nur begrenzt möglich. Das PEI, die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) und das *Pharmacopoeia Europaea* (Ph. Eur.) empfehlen in ihren Leitfäden zur Qualitätssicherung von Allergen-Extrakten und Allergoiden die Verwendung von In-Haus-Referenzen zur Qualitätskontrolle produzierter Allergieprodukte [124–126].

2.3. Kontrollierte Wirkstoffabgabesysteme

2.3.1. Grundlagen

Besonders bei der Behandlung chronischer Erkrankungen ist für einen Therapieerfolg häufig eine langanhaltende Wirkstoffkonzentration innerhalb des therapeutischen Bereiches unerlässlich, welcher durch eine minimale effektive und eine maximale toxische Konzentration begrenzt ist. Konventionelle Wirkstoffabgabesysteme (Tabletten, Kapseln, Lösungen) initiieren oftmals eine schnelle Wirkstofffreisetzung mit einer kurzen Zeit im therapeutischen Bereich, was eine Mehrfachadministration des Arzneimittels erfordert und bei schnell absorbierten Wirkstoffen zu Über- oder Unterexpositionen führen könnte. Darreichungsformen, welche die Freisetzung verlängern, können die Wirkstoffkonzentration über einen längeren Zeitraum im therapeutischen Bereich halten und Episoden der Unterexposition oder Toxizität minimieren [20]. Darreichungsformen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung (cDDS) sind solche Systeme, bei denen ein konstanter Wirkstoffspiegel im entsprechenden Kompartiment über einen längeren Zeitraum durch eine spezifische Formulierung aufrechterhalten wird. Die Anwendung eines cDDS kann somit die Wirksamkeit erhöhen und die Administrationsrate vermindern und so die Therapietreue fördern, die Fluktuation der Wirkstoffkonzentration reduzieren und dadurch einer erhöhten Toxizität und Nebenwirkungen entgegenwirken und den Arzneistoff vor vorzeitigem physiologischem Abbau schützen. Basierend auf dem Mechanismus der Wirkstofffreisetzung können cDDS in verschiedene Klassen unterteilt werden (Tabelle 2) [21].

Tabelle 2 Klassifizierung von Darreichungsformen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung. Adaptiert von Adepu *et al.* [21].

Klassifizierung	Mechanismus
Auflösungskontrollierte Freisetzung	Wirkstoff entweder mit langsam löslicher Membran oder Matrize beschichtet bzw. verkapselt.
Diffusionskontrollierte Freisetzung	Wirkstoff in inerte, wasserunlöslicher Membran oder Matrize eingeschlossen und durch Diffusion freigesetzt.
Wasserpenetrationskontrollierte Freisetzung	Kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes durch osmotischen Druck oder Quellung.
Chemisch abbaukontrollierte Freisetzung	Biologischer Abbau der Matrix setzt Wirkstoff frei.

Abbildung 5 zeigt die pharmakokinetischen Kurven der Wirkstoffkonzentration eines Arzneimittels im Plasma über die Zeit eines konventionellen Wirkstoffabgabesystems und eines cDDS.

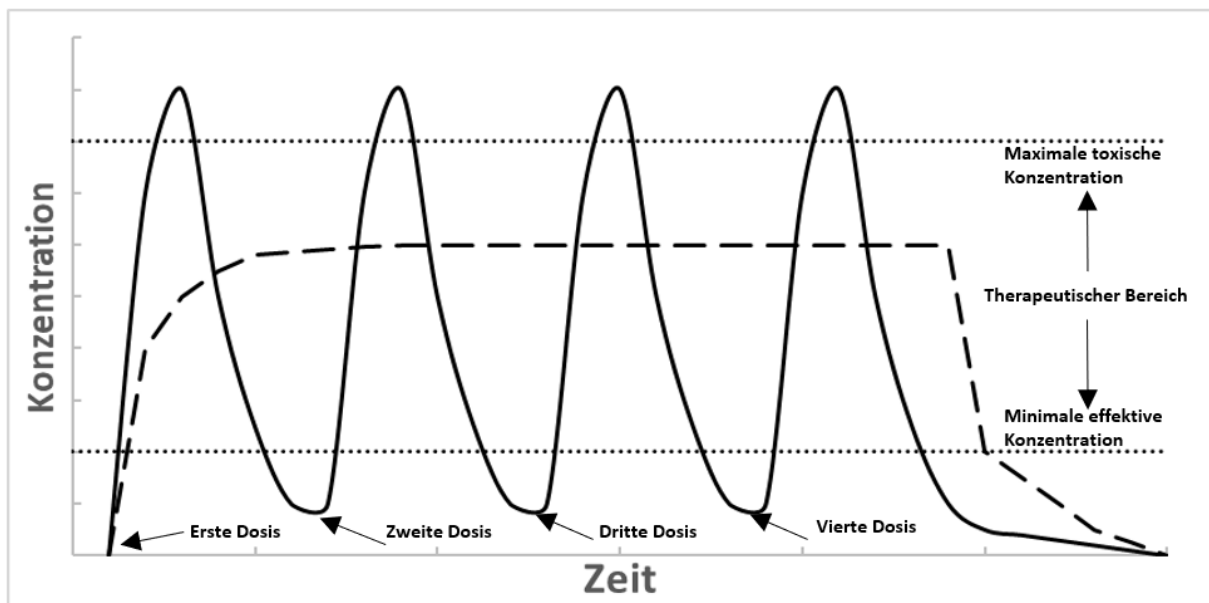


Abbildung 5 Typischer Verlauf der Wirkstoffkonzentration im Plasma bei einem konventionellen Wirkstoffabgabesystems (durchgehende Linie) und eines cDDS (gestrichelte Linie) mit Begrenzungen des therapeutischen Bereiches (gestrichelte Linie). Adaptiert von Adepu *et al.* [21].

Fortschritte auf dem Gebiet der Biologie und Biochemie führten in den letzten Jahrzehnten zu der Entwicklung einer Vielzahl an bioaktiven Peptiden und Proteinen. Solche Moleküle stellen jedoch mehrere Herausforderungen bei der Administrierung dar. Größe, Hydrophilie, geringere Permeabilität durch biologische Membranen, Anfälligkeit für enzymatischen Abbau und physikochemische Instabilität können problematische Eigenschaften sein. Diese Wirkstoffgruppe eignet sich besonders für cDDS, da sowohl die Peptid- und Proteininstabilität verbessert wird als auch die Arzneimittelaktivität nach Administrierung verlängert wird. Die

Bestandteile des cDDS sollten dabei biologisch abbaubar oder kompatibel, nicht immunogen, nicht toxisch und nach Möglichkeit von der FDA für die Anwendung am Menschen zugelassen sein. Für die Applikation von peptid- oder proteinhaltigen cDDS wurden in der Vergangenheit bereits verschiedene Administrationsrouten, wie oral, parenteral, nasal, bukkal, vaginal oder transdermal verwendet. Die am häufigsten verwendete Administrationsroute war dabei die parenterale Route [127, 128].

2.3.2. Parenterale cDDS

Die parenterale Administration ist die bevorzugte Wahl für viele Biopharmazeutika in Anbetracht der häufig beobachteten schlechten Bioverfügbarkeit nach oraler und gastrointestinaler Applikation und extensivem *First-Pass-Metabolismus*. Die parenterale Route kann sowohl für eine systemische als auch lokale Wirkung genutzt werden. Für die Entwicklung von parenteralen cDDS bedarf es Kenntnisse über die physikochemischen Eigenschaften des zu entwickelnden Systems, des Wirkstoffes sowie dessen pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, einschließlich seiner Toxizität. Zusätzlich müssen biologische Eigenschaften an der Injektionsstelle berücksichtigt werden, welche den Abtransport und die Aufnahme des Wirkstoffes beeinflussen könnten [22]. Die Verabreichung von parenteralen cDDS erfolgt dabei in der Regel über eine intramuskuläre oder subkutane Injektion. Dabei wird ein Wirkstoffbolus vorübergehend in einer interstitiellen Umgebung erzeugt und durch Absorption in die Blutgefäße oder Drainage in das Lymphsystem aus der Injektionsstelle eliminiert. Zu den parenteralen cDDS werden Liposomen, Mikrosphären, Suspensionen, Gele, Emulsionen und Implantate gezählt [23]. Tabelle 3 zeigt einige Beispiele für zugelassene parenterale cDDS-Produkte.

Tabelle 3 Verschiedene Arzneimittel mit Marktzulassung für die parenterale Applikation mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung. Adaptiert von Wang *et al.*, Shi und Li sowie Chaubal und Roseman [25, 129, 130].

Produkt, Firma	Wirkstoff	Formulierung, Route	Indikation
Doxil®, Johnson & Johnson	Doxorubicin	Liposomen, <i>i.v.</i>	Maligne Tumore
Eligard®, QLT	Leuprorelinacetat	In situ formendes Gel, <i>s.c.</i>	Prostatakrebs
Zoladex®, AstraZeneca	Goserelinacetat	Implantat, <i>s.c.</i>	Prostatakrebs und Brustkrebs
Sandostatin®, Novartis	Octreotid	Mikrosphäre, <i>s.c.</i> oder <i>i.v.</i>	Akromegalie und Magen-Darm Tumore

2.3.3. Bioabbaubare Polymere als Trägersystem für cDDS

In den letzten Jahrzehnten wurde ein zunehmender Fokus auf die Forschung und Entwicklung von bioabbaubaren Polymeren als Trägersystem für die Applikation biomedizinischer Wirkstoffe gelegt. Der Vorteil besteht vor allem darin, dass bioabbaubare Polymere im Körper degradieren, wodurch eine Entfernung des Trägersystems erspart bleibt. Dabei sollten die Polymere komplett vom Körper abbaubar, nicht toxisch und nicht immunogen sein. Des Weiteren sollten sie kompatibel mit dem verwendeten Wirkstoff sein und nicht mit dessen therapeutischer Wirkung interferieren [20]. Tabelle 4 zeigt einige Beispiele von bioabbaubaren Polymeren.

Tabelle 4 Beispiele für natürliche und synthetische bioabbaubare Polymere. Adaptiert von Siepmann *et al.* [20].

Natürliche bioabbaubare Polymere	Synthetische bioabbaubare Polymere
Proteine: Kollagen, Gelatine, Albumin, Elastin, Fibrin	Polyester: Poly-Glykolsäure, Poly-Milchsäure, Poly-Lactid-co-Glycolid, Poly-Caprolacton
Polysaccharide: Chitosan, Dextran, Alginate, Hyaluronsäure	Polyanhydride
	Polyurethane
	Polyorthoester

Die Hydrolyse des Polymergerüsts bildet in vielen Fällen den Hauptmechanismus des Abbaus synthetischer Polymere. Bestimmte hydrolytisch oder proteolytisch labile Bindungen im Polymergerüst ermöglichen dabei, dass Verbindungen wie Esterbindungen zwischen den einzelnen Monomeren und Oligomeren gespalten werden können, was zur Erosion oder Degradation des Polymergerüsts führt. Der Polymerabbau kann entweder über Oberflächenerosion, Bulkdegradation oder Bulkdegradation mit inkludierter Autokatalyse ablaufen (Abbildung 6). Bei der Oberflächenerosion werden Polymerfragmente aus der Oberfläche der Matrix ohne maßgebliche Veränderung des Anteils von Masse zu Volumen entfernt. Bei der Bulkdegradation hingegen nimmt der Anteil des im Träger verbleibenden Polymers über die Zeit ab, jedoch ohne Veränderung der physikalischen Größe. Anfallende Abbauprodukte können dabei den Prozess der Degradation autokatalysieren. Die Kristallinität, die Glasübergangstemperatur, das Molekulargewicht des Polymers sowie die Kapazität der Wasseraufnahme bilden entscheidende Faktoren für den Verlauf und die Intensität des Polymerabbaus [131, 132].

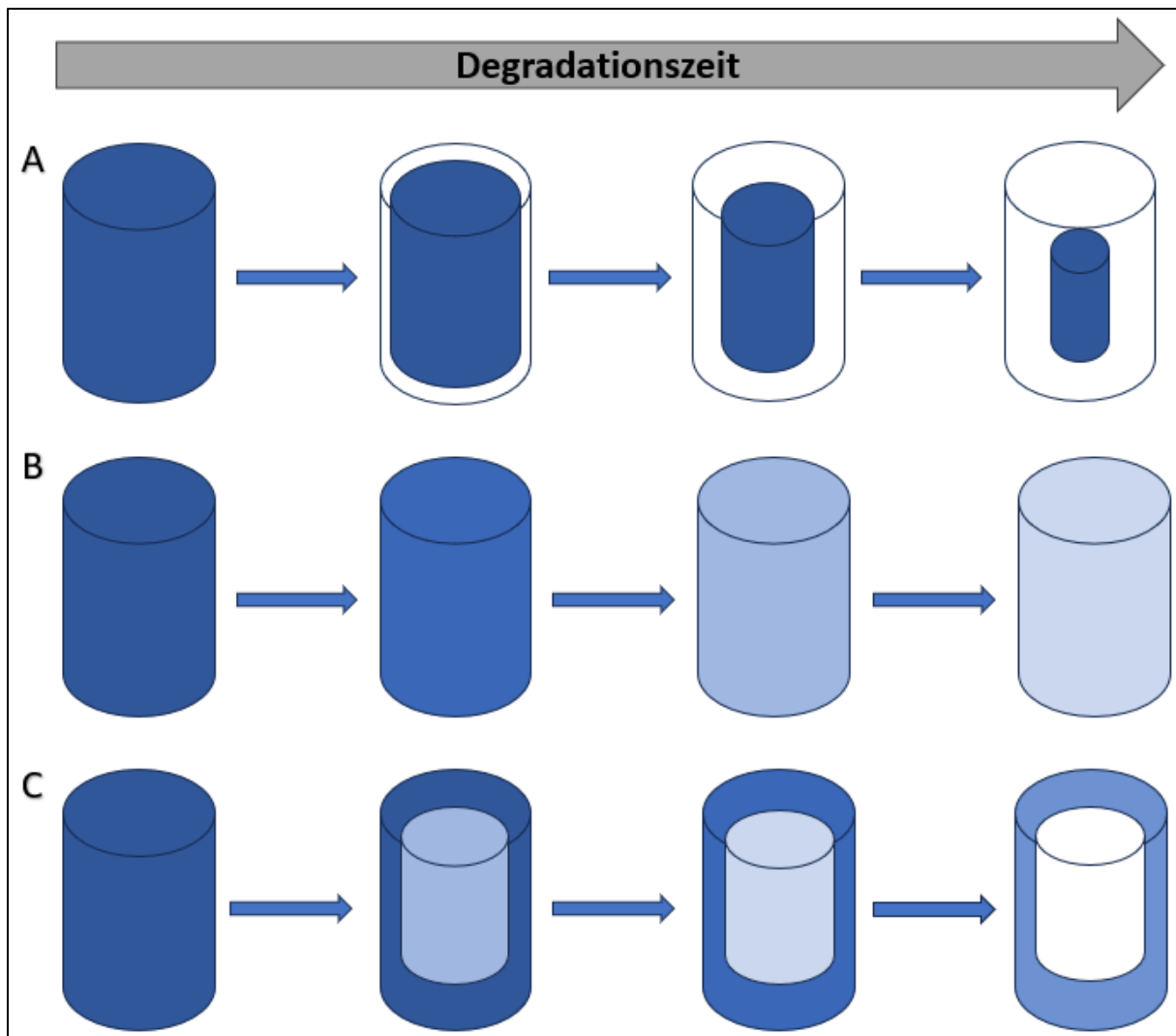


Abbildung 6 Verschiedene Arten des Polymerabbaus: Oberflächenerosion (A), Bulkdegradation (B) und Bulkdegradation mit inkludierter Autokatalyse mit erhöhter Polymererosion im Inneren der Polymermatrix (C).

2.3.4. Poly-Lactid-co-Glycolid

PLGA ist eines der wenigen von der FDA zugelassenen Polymere für die parenterale Applikation und zählt zu den am besten untersuchten Polymeren für die Entwicklung von Trägersystemen für Proteine und Peptide [24, 25]. PLGA ist ein Copolymer aus Polylactid (PLA) und Polyglycolid (PGA). Polylactid enthält einen asymmetrischen α -Kohlenstoff, wodurch dieses Polymer als Stereoisomer in der D-Form (D PLA) oder L-Form (L PLA) vorliegen kann. In der Regel liegt dieses racemische Gemisch in PLGA im gleichen Verhältnis (D,L PLA) vor, mit überwiegend amorphen Eigenschaften aufgrund der Irregularität in der Polymerkette. PGA besitzt hingegen eine hochkristalline Struktur aufgrund der Abwesenheit von Methylgruppen [24, 133]. PLGA kann sowohl durch Ringöffnungspolymerisation (ROP) der zyklischen Dimere Lactid und Glycolid in Gegenwart eines Katalysators (häufig Zinn (II)-ethylhexanoat) oder durch direkte Polykondensation (PK) von Milch- und Glykolsäure synthetisiert werden (Abbildung 7). Die ROP erzeugt dabei

PLGA-Polymere mit höheren Molekulargewichten als bei der PK, ist jedoch auch kostenaufwändig, da für die Dehydratisierung von Milch- und Glykolsäure zu Lactid und Glycolid, Lösungsmittel und Materialien verbraucht werden müssen [134–137].

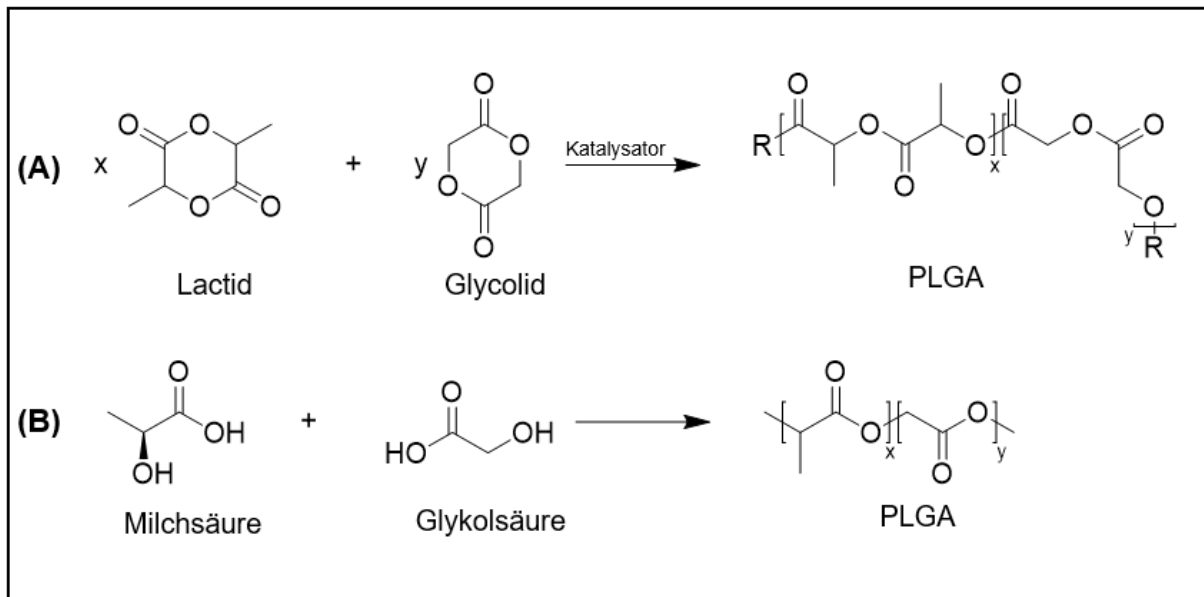


Abbildung 7 Polymerisation von PLGA. ROP von Lactid und Glycolid in Anwesenheit eines Katalysators (A) und PK von Milch- und Glykolsäure (B).

Im Allgemeinen wird PLGA im wässrigen Milieu als Bulkdegradation mit inkludierter Autokatalyse, durch Hydrolyse seiner Estergruppen abgebaut [138]. Der Abbau ist dabei im Inneren der Polymermatrix stärker als an der Oberfläche. Dies ist auf die Autokatalyse der Hydrolysereaktion durch die Anhäufung von Carbonsäurehydrolyseprodukten der abgebauten PLGA-Fragmente zurückzuführen, welche im Inneren der PLGA-Matrix eingeschlossen werden [139, 140]. Der Prozess des Polymerabbaus kann in vier Phasen unterteilt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5 Beschreibung der vier Phasen des PLGA-Abbaus. Adaptiert von Gentile *et al.* [138].

Phase	Beschreibung
Hydratation	Wasser dringt in amorphe Bereiche des Polymergerüsts ein, Unterbrechung von Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen.
Anfänglicher Abbau	Spaltung kovalenter Bindungen innerhalb der Polymermatrix führt zu einer messbaren Abnahme des Molekulargewichts, jedoch ohne Bildung löslicher Monomere.
Konstanter Abbau	Carboxylgruppen von abgespaltenen Oligomeren der Polymermatrix katalysieren den Abbauprozess weiter. Bildung löslicher Oligomere und Monomere.
Vollständige Auflösung	Oligomere und Monomere werden in (wasserlösliche) Milch- und Glykolsäure gespalten.

Nach der Polymerdegradation wird die gebildete Milch- und Glykolsäure über den Citratzyklus als Kohlenstoffdioxid und Wasser verstoffwechselt. Glykolsäure kann zusätzlich unverändert über die Niere ausgeschieden werden. Die Abbaugeschwindigkeit von PLGA kann durch das Verhältnis an Glycolid und Lactid beeinflusst werden. PLGA-Komplexe mit einem höheren Lactid-Anteil besitzen eine reduzierte Hydrophilie, aufgrund der hydrophob wirkenden Methylgruppe in den Lactid-Struktureinheiten. Durch die hydrophobe Methylgruppe wird der nukleophile Angriff des Wassermoleküls auf die Esterbindung sterisch behindert und verzögert somit die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Polymerkette [141]. Zusätzlich können die PLGA-Polymerkettenenden mit bestimmten funktionellen Gruppen verkappt werden (Endgruppenterminierung), wodurch das Abbauverhalten zusätzlich beeinflusst wird. In der Regel besitzt PLGA an den Polymerkettenenden freie Carbonsäuren, welche die Abbaureaktion zusätzlich autokatalysieren. Durch eine Endgruppenfunktionalisierung mit Ester-Einheiten kann der Autokatalyse entgegengewirkt und die Abbaugeschwindigkeit verlängert werden. Das Molekulargewicht, die Stereochemie, die physikochemischen Eigenschaften der inkorporierten Wirkstoffe und die Form des Trägersystems sind ebenfalls abbaubeeinflussende Faktoren [138, 142].

PLGA kann als Grundlage diverser Trägersysteme wie Implantate, In-situ-formende Gele, Mikropartikel oder Nanopartikel dienen und durch verschiedene Herstellungsmethoden wie Koazervation, Sprühtrocknung, Doppelemulsion, Elektrosponning oder Schmelzextrusion (SME) prozessiert werden [26]. Nach der Applikation von PLGA-basierten Trägersystemen kann es an der Applikationsstelle zu lokalen Gewebsreaktionen kommen. Diese Reaktionen gelten im Allgemeinen als mild, sodass PLGA als sicheres Material für makroskopische und mikroskopische cDDS gezählt werden kann [24]. Bislang wurden von der FDA über 25 auf PLGA basierende Medikamente zugelassen [27]. Darüber hinaus befinden sich zurzeit viele PLGA-basierte Präparate in präklinischen und klinischen Studien.

Auch für die Anwendung in der AIT wurden bereits PLGA-basierte Trägersystemen entwickelt und deren Wirkung auf Forschungsebene untersucht. Verschiedene Gruppen konnten dabei bereits immunmodulatorische In-vivo-Daten für allergenbeladene PLGA-Partikel oder In-vivo-formende Gele zeigen [143]. Cao *et al.* zeigten in ihrer Studie an mit Pollenextrakt des Beifußblättrigen Traubenkrautes (*Ambrosia Artemisiifolia*) sensibilisierten Mäusen, dass Injektionen von PLGA-Polyethylenglycol-Nanopartikeln, beladen mit dem rekombinant hergestellten Hauptallergen des Ambrosia-Pollens (Amb a 1), zu einer Abnahme des allergenspezifischen IgE-Serum-Spiegels führte und allergische Reaktionen inhibiert wurden [144].

2.4. PLGA-basierte Implantate

2.4.1. Grundlagen PLGA-basierter Implantate

Implantierbare Systeme zur Langzeitfreisetzung pharmazeutischer Wirkstoffe wurden bereits 1964 anhand implantierbaren Silikonkapseln von Folkman und David beschrieben [145]. Seitdem haben sich Implantate zu einem festen Bestandteil für Darreichungsformen mit einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung entwickelt, sodass Implantate mittlerweile für eine Vielzahl verschiedener Arzneimittelklassen an verschiedenen Implantationsorten über diverse Implantationstechniken verwendet werden können [146]. Die FDA definiert Implantate als Produkte, welche in eine chirurgische oder natürliche entstandene Höhle des menschlichen Körpers eingesetzt werden und dazu bestimmt sind, dort für einen Zeitraum von 30 Tagen oder länger zu verbleiben [147]. Ein bekanntes Beispiel für ein PLGA-basiertes Implantat ist Zoladex Depot[®], das bereits 1990 zugelassen wurde und für die Behandlung von Prostatakrebs, Mamakarzinom und Endometriose eingesetzt wird. Zoladex Depot[®] ist ein zylinderförmiges, PLGA-basiertes Implantat, welches nach subkutaner Applikation in die vordere Bauchwand je nach Stärke 3,6 mg oder 10,8 mg des Wirkstoffes Goserelin über einen Zeitraum von 1 Monat bzw. 3 Monate kontrolliert freisetzt [148, 149].

Die Freisetzung aus PLGA-basierten Implantaten kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Nach Applikation erfolgt häufig eine „Burst“-Phase mit erhöhter Wirkstofffreisetzung, welche mehrere Stunden oder Tage dauert, gefolgt von einer Induktionsphase, in welcher geringere Mengen des Polymers erodieren und nur geringe bis gar keine Wirkstoffmengen freigesetzt werden. In der letzten Phase (Erosionsphase) erfolgt eine kontinuierliche Erosion der Polymermatrix mit erhöhter Wirkstofffreisetzung. Die Phasen können je nach Wirkstoff, Hilfsmittelzusammensetzung und den physikochemischen Eigenschaften des PLGA in ihrer Dauer und Intensität variieren. Der Wirkstoff kann je nach Hydratisierung entweder gelöst in der Polymermatrix, dispergiert in einem nicht-polymeren festen Zustand oder gelöst bzw. gebunden in den wässrigen Poren der Polymermatrix vorliegen [150].

Implantate können entweder als feste Implantate appliziert werden oder alternativ kann eine *in-situ* Bildung des Implantats im Patienten angestrebt werden. In-situ-bildende Implantate werden als phasenempfindliche Implantate klassifiziert und haben den Vorteil gegenüber festen Implantaten, dass ein chirurgischer Eingriff nicht benötigt wird. Bei dieser Methode wird das Polymer (z.B. PLGA) mit dem Wirkstoff in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Benzylalkohol, Benzylbenzoat, N-Methyl-2-pyrrolidon, Glycofurol oder Triacetin gelöst und subkutan oder intramuskulär injiziert. In-vivo wird das Lösungsmittel vom Körper entfernt und durch Körperflüssigkeiten ersetzt, was ein Ausfallen des Polymers und die Bildung einer festen Gelmatrix zur Folge hat [151]. Nachteilig dabei ist vor allem der starke Bursteffekt nach Applikation und die nur bedingt vorhersehbare dreidimensionale Struktur des sich

bildenden Implantates. Solorio and Exner zeigten, dass die Gewebeumgebung einen signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur des In-situ-Implantates haben kann und der Bursteffekt dadurch verstärkt werden könnte [152].

Die Herstellung fester Implantate kann auf Grundlage von Polymerlösungen, Polymerschmelzen oder Polymerpulvern über diverse Herstellungsmethoden erfolgen, welche jeweils verschiedene Vor- und Nachteile besitzen (Abbildung 8).

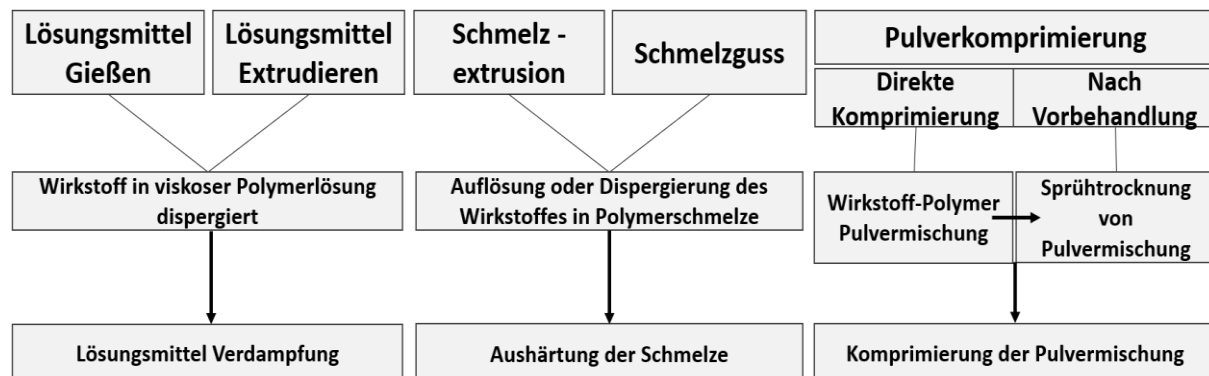


Abbildung 8 Gängige Herstellungsmethoden für feste Implantate. Adaptiert von Siepmann *et al.* [20].

2.4.2. Schmelzextrusion

Die SME hat ihren Ursprung in der Plastik- und Nahrungsmittelindustrie und wurde in den 1970ern in der pharmazeutischen Industrie als alternative Plattformtechnologie zu traditionellen Verfahren der Herstellung pharmazeutischer Darreichungsformen etabliert [29]. Die Hauptanwendung von SME besteht in der Dispergierung von pharmazeutischen Wirkstoffen in einer Matrix auf molekularer Ebene, um dabei feste Lösungen zu erzeugen. Die SME kann für verschiedene Anwendungen wie zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes, zur Modifizierung der Freisetzung des Wirkstoffes oder zur Maskierung des Geschmackes des Wirkstoffes genutzt werden [28]. Neben der Produktion von Implantaten kann die SME auch zur Herstellung oder als Teil des Herstellungsprozesses von Pellets, Granulaten, schnell oder verzögert freisetzenden Tabletten, schnell auflösenden oralen Systemen, transdermalen oder transmukosalen Systemen und transungualen Systemen fungieren [153].

Die Extrusion erfolgt in der Regel unter Verwendung eines Extruders, der aus einem feststehenden Zylinder, in dem sich eine (Einzelschneckenextruder), zwei (Doppelschneckenextruder) oder mehrere (Multischneckenextruder) gleich oder gegenläufig rotierende Förderschnecken befinden, einem Motor, der als Antriebseinheit fungiert und einer an das Ende des Extruderraumes angeschlossenen formgebenden Extruderdüse aufgebaut ist. Bei der SME werden polymere Materialien und Wirkstoffe bei kontrollierten Temperaturen und Druckbedingungen im Extruderraum miteinander vermischt und durch eine formgebende

Düse zu einem einheitlichen Produkt gedrückt (Abbildung 9) [28]. Der Prozess erfolgt dabei kontinuierlich mit Prozesstemperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur (T_g) der eingesetzten Polymere, um eine Dispersion der Wirkstoffe in der Polymermatrix auf molekularer Ebene zu gewährleisten [29]. Die Extruderschnecken können je nach Prozessanforderung auf verschiedene Weise angepasst werden. Sie können aus variablen Bausteinen bestehen, die sich in ihrer Funktion (Fördern oder Mischen) unterscheiden. Das Längen/Durchmesser-Verhältnis (L/D-Verhältnis) der Extruderschnecken liegt normalerweise zwischen 20:1 und 40:1 mm [28]. Abbildung 9 illustriert den Vorgang eines herkömmlichen Extrusionsprozesses mit einem Doppelschneckenextruder (Abbildung 9).

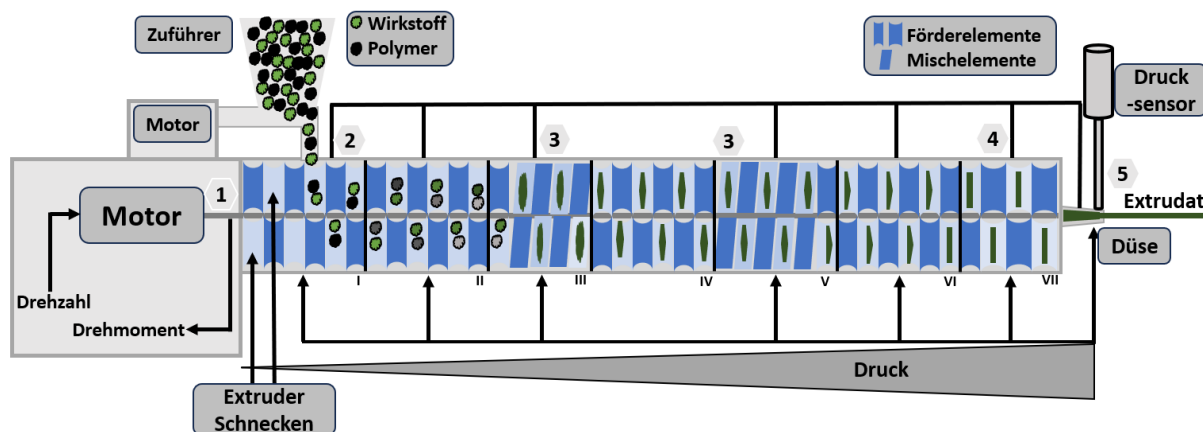


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Extrusionsprozesses. Abgebildet ist ein Doppelschneckenextruder mit sieben individuell beheizbaren Barrelzonen (röm.: 1–7). Der Motor fungiert als Antriebseinheit von zwei Förderschnecken mit Förder- und Mischelementen (1). Über einen motorbetriebenen Zuführer wird das Gemisch aus Polymer (schwarz) und Wirkstoff (grün) konstant in die Einzugszone des Extruders überführt (2). Das Material wird über die T_g des Polymers erhitzt und bei niedrigem Druck durch den Extruderraum mittels Förderer- und Mischelementen transportiert. In der Kompressionszone wird das Material durch Mischelemente homogenisiert und komprimiert, wodurch der Druck im Extruder steigt (3). Im letzten Abschnitt (Dosierzone) wird das extrudierte Produkt mit gleichmäßiger Förderrate in die Düse überführt (4). Das Material wird durch eine formgebende Düse gepresst. Durch den konstant hohen Druck in der Dosierzone wird ein gleichmäßig extrudiertes Produkt gewährleistet (5). Das Extrudat kann im Anschluss in Implantate geschnitten werden und durch Abkühlung aushärten [28]. Abbildung adaptiert von Patil *et al.*[29].

Der Prozess der SME hat sowohl Vor- als auch Nachteile gegenüber traditionellen Herstellungsverfahren (Tabelle 6). Einer der Hauptnachteile der SME ist die Belastung der Wirkstoffe durch die Prozessierung bei höheren Temperaturen. Dies suggeriert, dass die SME besonders für die Verarbeitung thermolabiler Stoffe wie Proteine nicht geeignet ist. Ghalanbor *et al.* untersuchten daher die Machbarkeit zur Herstellung von Protein (Lysozym)/PLGA Formulierungen durch SME mit einem besonderen Fokus auf der Proteinestabilität, dem Bursteffekt und der Vollständigkeit der Proteinfreisetzung. Die dabei verwendeten Prozesstemperaturen lagen zwischen 90–105 °C. In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die SME weder die Proteinintegrität noch die biologische Verfügbarkeit

von Lysozym negativ beeinflusste und dieses über einen Zeitraum von 60–80 Tagen vollständig aus PLGA-Implantaten freigesetzt wurde [154].

Tabelle 6 Vor- und Nachteile der SME. Adaptiert von Maniruzzaman *et al.* [28].

Vorteile	Nachteile
Erhöhung der Bioverfügbarkeit von hydrophoben Wirkstoffen	Teilweise hohe thermische Belastung für die Wirkstoffe
Lösungsmittelfreier Prozess	Hohe Scherkräfte könnten zu Belastungen der Wirkstoffe führen
Ökonomisch günstig durch reduzierte Prozesszeiten, weniger Prozessschritte und kontinuierlichen Betrieb	Hoher Energieaufwand
Herstellung diverser Darreichungsformen möglich	Limitierte Anzahl an Polymeren für den Einsatz bei geringeren Temperaturen verfügbar
Homogene Verteilung der Wirkstoffe auf molekularer Ebene	

In den letzten Jahren wurden zunehmend Produkte, welche mittels SME hergestellt werden, bei der FDA und der EMA eingereicht und zugelassen. Im Jahr 2016 wurde Probuphine® von der FDA für die Behandlung von Opioidabhängigkeit zugelassen. Dabei handelt es sich um vier subdermal applizierte Implantate, welche über einen Zeitraum von sechs Monaten Buprenorphin konstant freisetzen. Es ist aktuell das einzige verfügbare Produkt, welches nach einmaliger Applikation einen kontinuierlichen, schwankungsfreien Buprenorphin-Spiegel über sechs Monate im Patienten aufrechterhält und bietet gegenüber den herkömmlichen Therapieoptionen (Tabletten, Injektionen, Filme, Pflaster) vor allem eine verbesserte Therapietreue [155]. Anovera® wurde im Oktober 2018 als kombiniertes hormonelles Verhütungsmittel von der FDA zugelassen. In Form eines silikonhaltigen Vaginalringes ist es das erste wiederverwendbare Verhütungsmittel, welches vollständig von der Patientin selbst appliziert werden kann. Das Produkt gibt mit einem 21-Tage in / 7-Tage out Schema die Wirkstoffe Egesteronacetat und Ethinylestradiol für 13 Zyklen ab [156]. 2017 wurde das Produkt Maviret® (Mavyret® USA) von der EMA und der FDA für die Behandlung von chronischer Hepatitis C zugelassen. Die SME wird dabei zur Herstellung einer amorphen festen Dispersion angewendet, um die Adsorption der schlecht wasserlöslichen Wirkstoffe Glecaprevir und Pibrentasvir in-vivo zu erhöhen [157]. Das 2009 zugelassene Ozurdex® ist ein PLGA-basiertes Implantat für die intravitreale Freisetzung von Dexamethason über einen Zeitraum von vier bis sechs Monaten bei Makulaödemen oder Uveitis. Durch die bereits beschriebenen besonderen Eigenschaften des PLGA baut sich das Implantat in-vivo komplett selbst ab und ermöglicht nach einer minimal invasiven Applikation eine langanhaltende Wirkung [158]. Die kurze Aufzählung bekannter Produkte, welche über SME-

Prozesse hergestellt werden, veranschaulicht die Vielfältigkeit dieses Herstellungsprozesses für diverse Darreichungsformen sowie deren sich daraus ergebenden Vorteile.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Trehalose, Magnesiumhydroxid ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) und Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) und Natriumazid wurden von Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) erworben. Alle Puffersubstanzen und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, ebenfalls von Merck KgaA in analytischer Qualität erworben.

3.1.1. Birken-Allergoid

Es wurden drei Produktionschargen des Birken-Allergoids verwendet (Allergopharma GmbH und Co. KG, Reinbek, Deutschland). Tabelle 7 liefert einen Überblick über die Merkmale der verwendeten Allergoid-Chargen.

Tabelle 7 Verwendete Birken-Allergoid-Chargen.

Charge	W8003670	W8003765	W21066835
Herstellungsdatum	20.03.2018	05.07.2018	30.06.2021
Proteinstickstoffgehalt (PNU/mg)	10.256	9.793	9.455

3.1.2. Bioabbaubare Polymere

In dieser Arbeit wurden die Polymere Resomer RG 756 S und Resomer RG 504 H verwendet (Evonik Industrie AG, Essen, Deutschland). Die Polymere unterschieden sich hinsichtlich des Monomerverhältnisses, der inhärenten Viskosität, des Molekulargewichts und der Endgruppenterminierung (Tabelle 8).

Tabelle 8 Verwendete PLGA-Polymere. ¹Zu erwartender Abbauperiode laut Herstellerangabe (Evonik).

Name	Polymer	Monomer- verhältnis	Inhärente Viskosität	Molekular- gewicht	Polymer- ketten- Endgruppe	Abbau- zeitraum ¹	Charge
Resomer RG 756 S	Poly- D,L-Lactid- co- Glycolid	75 (Mol %) D,L-Lactid	0,5–0,7 (dL/g)	76.000– 115.000 (g/mol)	Ester	< 9 Monate	BCCB5929
		25 (Mol %) Glycolid					
Resomer RG 504 H	Poly- D,L-Lactid- co- Glycolid	50 (Mol %) D,L-Lactid	0,35–0,45 (dL/g)	53.100 (g/mol)	Carbon- säure	< 6 Monate	BCCC6288
		50 (Mol %) Glycolid					

3.2. Methoden

3.2.1. Präparative Methoden

Gefriertrocknung

Vor dem Mischen und der Extrusion der Polymere, Hilfsstoffe und des Wirkstoffes, wurden für Chargen mit Hilfsstoffen das Birken-Allergoid mit den verwendeten Hilfsstoffen abgewogen, in ca. 400 mL deionisiertem Wasser gelöst und mittels einer Gefriertrocknungsanlage (GT Alpha LSCplus; Christ, Osterode, Germany) nach Standardprozedur (Tabelle 9) gefriergetrocknet.

Tabelle 9 Gefriertrocknungsprozessschritte.

Phase	Prozedur
Gefrieren	Einfrieren des Produktes auf -45 °C für min. 4 h.
Haupttrocknung	Beladung der Anlage und Haupttrocknung bei $\leq 0,4$ mbar mit einer Temperaturrampe bis 20 °C . Nachdem sich die Produkttemperatur der Stellflächentemperatur angeglichen hat (ΔT max. 3 K), wurde die Haupttrocknung für min. 4 h fortgesetzt.
Nachtrocknung	Nachtrocknung mit einem Vakuum von $\leq 0,1$ mbar bei einer Stellflächentemperatur von 20 °C für 1 h.
Belüftung	Belüftung der Trocknungskammer mit Stickstoff und Entnahme des Lyophilisats

Herstellung der Vormischung

Um ein homogenes Vermischen von Polymer und den Feststoffen und ein konstantes Zuführen während der Extrusion zu ermöglichen, wurde das Polymer mit einer Handmühle zerkleinert. Vor der Extrusion wurde das Allergoid-(Hilfsstoff)-Lyophilisat und das Polymer mit einer Analysenwaage (Practum224-1S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) eingewogen und mittels eines Turbula Mixers (Typ T2C, Willy A. Bachofen AG, Basel, Schweiz) für 20 min bei einer Drehzahl von 42 rpm gemischt.

3.2.1.1. Extrusion mit Doppelschneckenextruder

Die Herstellung von Extrudaten wurde mit einem Doppelschneckenextruder (Pharma 11; Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Der verwendete Extruder hatte zwei horizontal gleichlaufende Extruderschnecken mit einem Schneckendurchmesser von jeweils 11 mm und einer Schneckenlänge von 440 mm (L/D -Verhältnis = 40). Für die Schneckenkonfiguration wurden Förder-, Misch- und Austragselemente verwendet und entsprechend der „Thermo Fisher SME-Standard-Schneckenkonfiguration“ angebracht (Abbildung 10) [159].

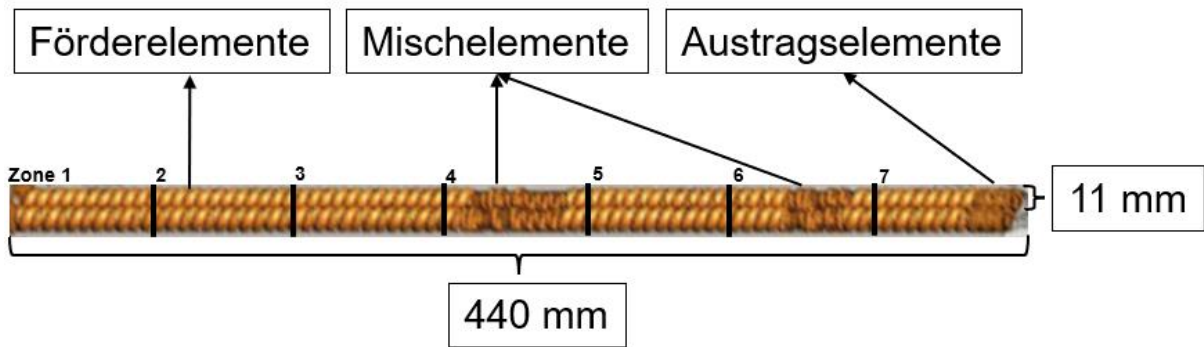


Abbildung 10 Schneckenschnellenkonfiguration nach Thermo Fisher SME-Standard-Schnellenkonfiguration. Entnommen aus Betriebsanleitung Pharma 11 Doppelschnellenextruder (Version 1.5, 2013) [159].

Am Ende des Extruderraumes wurde eine runde Düse mit einem Durchmesser von 2 mm installiert. Die Extruderdüse wurde über einen externen Heizstab temperiert. Druck und Temperatur im Düseninnenraum wurden über einen Drucksensor und einen Temperaturfühler bestimmt. Während der Extrusion wurde die Mischung manuell mit einem Spatel in den Extruder eingebracht. Zu Beginn des Extrusionsprozesses wurde mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 30 rpm (Vorgabe des Herstellers für Betrieb im Leerlauf) gearbeitet, welche nach etwa 5 min auf 50 rpm erhöht wurde. Der Extruder wurde über sieben individuell einstellbare, beheizbare Zonen temperiert. Entsprechend der verwendeten Polymere RG 504 H und RG 756 S wurden, aufbauend auf den Ergebnissen der thermischen Charakterisierung der Polymere (Kapitel 4.1.3), folgende Temperatureinstellungen gewählt (Tabelle 10).

Tabelle 10 Temperatureinstellung der Extruderzonen.

Polymer	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5	Zone 6	Zone 7	Düse
RG 504 H	70 °C	73 °C	75 °C	78 °C	82 °C	83 °C	86 °C	88 °C
RG 756 S	70 °C	75 °C	80 °C	83 °C	85 °C	88 °C	90 °C	92 °C

Nach der Extrusion wurden die Extrudate gewogen und das Verhältnis zur eingezogenen Masse an Polymergemisch berechnet (Ausbeute). Anschließend wurde das Extrudat mit einem Skalpell in 5 mm große Implantate geschnitten.

3.2.1.2. Hergestellte Chargen

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die produzierten Chargen und deren Zusammensetzung.

Tabelle 11 Chargenüberblick.

Charge	Polymer	Allergoid (m/m)/ Charge	Hilfsstoff 1 (m/m)	Hilfsstoff 2 (m/m)
504Plac	Resomer RG 504 H	--	--	--
504	RG 504 H	10 % / W8003670	--	--
504Tr	RG 504 H	10 % / W8003670	5 % Trehalose	--
504TrMg	RG 504 H	10 % / W8003765	5 % Trehalose	2,5 % Mg(OH) ₂
756Plac	RG 756 S	--	--	--
756	RG 756 S	10 % / W8003670	--	--
756Tr	RG 756 S	10 % / W8003670	5 % Trehalose	--
756Tr+	RG 756 S	10 % / W8003765	7,5 % Trehalose	--
756TrNa	RG 756 S	10 % / W8003765	5 % Trehalose	2,5 % NaCl
756TrMg(1)	RG 756 S	10 % / W8003765	5 % Trehalose	2,5 % Mg(OH) ₂
756TrMg(2)	RG 756 S	10 % / W8003765	5 % Trehalose	2,5 % Mg(OH) ₂
756TrMg(3)	RG 756 S	10 % / W21066835	5 % Trehalose	2,5 % Mg(OH) ₂
756TrCa	RG 756 S	10 % / W8003765	5 % Trehalose	2,5 % Ca(OH) ₂
756TrPh	RG 756 S	10 % / W21066835	5 % Trehalose	2,5 % Phosphatsalze 44,7 % Na ₂ HPO ₄ , 55,3 % NaH ₂ PO ₄

3.2.1.3. Methoden für die Extraktion des Allergoids aus Implantaten

Zur Extraktion des Allergoids aus den Implantaten wurden zwei verschiedene Methoden entwickelt. Während der Entwicklung wurden verschiedene Lösungsmittel (DMSO, Natronlauge, Ethanol, Acetonitril) für die Auflösung von PLGA-Implantaten getestet. Dabei zeigt lediglich Acetonitril zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Auflösbarkeit der Polymere. Die geeigneten Parameter für Temperatur, Schüttelfrequenz und Volumen des Lösungsmittels wurden empirisch ermittelt.

Extraktionsmethode 1: Proben für Allergoid-Quantifizierung

Das folgende Verfahren wurde für die Allergoid-Quantifizierung entwickelt. Implantate mit insgesamt 25 mg wurden in einem 5 ml Eppendorf Tube eingewogen und in 2 ml Acetonitril bei Raumtemperatur (RT) für 30 min im Thermo-Mixer bei 3.000 rpm (ThermoMixer C, Eppendorf) gelöst. Anschließend wurden 2 ml deionisiertes Wasser hinzugefügt und die

Suspension zunächst durch einen 0,45 µm-Spritzenaufsatz Filter (PVDF-Membran; Puradisc™, Cytiva, Marlborough, USA) und anschließend durch einen 0,22 µm-Spritzenaufsatzfilter (PVDF-Membran; Uniflo™, Cytiva) filtriert.

Extraktionsmethode 2: Proben für Allergoid-Charakterisierung

Die folgende Methode wurde verwendet, wenn eine physikochemische Charakterisierung von extrahiertem Allergoid durchgeführt werden sollte. Dabei wurde eine Probenmatrix ohne Acetonitril und gelöstes PLGA erzeugt. Nachdem die Implantate entsprechend Methode 1 in Acetonitril gelöst wurden, wurden die Proben bei 22.000 g für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5430 R Eppendorf, Hamburg, Germany). Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Allergoid-Pellet in 2 mL Acetonitril resuspendiert („Waschen“ des Pellets). Im Anschluss wurde der gesamte Waschprozess noch zweimal wiederholt. Das nach dem letzten Waschzyklus generierte Allergoid-Präzipitat wurde bei 50 °C für 15 min im geöffneten Eppendorf-Cup im Thermo-Mixer (ThermoMixer C, Eppendorf) getrocknet. Das getrocknete, extrahierte Allergoid wurde anschließend in deionisiertem Wasser gelöst und filtriert (0,22 µm-Spritzenvorsatzfilter, PVDF-Membran; Cytiva). Durch den mehrstufigen Waschprozess wurde bei dieser Methode ein Verlust des Allergoids von ca. 10 % beobachtet, sodass sich diese Methode nicht für eine Allergoid-Quantifizierung eignete.

3.2.2. Analytische Methoden

3.2.2.1. Thermische Charakterisierung der Polymere

Differentialkalorimetrie (DSC) wurde angewendet, um die Glasübergangstemperatur (T_g) für die verwendeten Polymere zu analysieren. Jeweils 10 mg einer Probe wurden in einen Aluminiumtiegel eingewogen, versiegelt und mit einer Temperaturrampe von 10 K/min von RT bis 413,15 K unter inertem Stickstoff mit einem DSC-Gerät (PYRIS Diamond; PekinElmer Inc., Waltham, USA) analysiert. Die Bestimmung der T_g erfolgte über den Wendepunkt der sigmoidalen Glasübergangskurve mittels der PYRIS Software (Version 9.0.2.0193, PekinElmer Inc.).

Um die Erweichungstemperatur der Polymere bei Kontakt mit einer beheizbaren Oberfläche zu bestimmen, wurde eine Kofler-Heizbank (Wagner & Muntz, München, Deutschland) verwendet. Entlang der Kofler-Heizbank mit steigenden Temperaturzonen von 50–200 °C wurde Polymermaterial platziert. Der Erweichungsgrad und die Textur der getesteten Polymere wurden in den verschiedenen Zonen unter Zuhilfenahme eines Holzspatels untersucht. Die Temperaturen, bei der erstmals eine Erweichung (erster Erweichungspunkt) und eine starke Erweichung (zweiter Erweichungspunkt) festgestellt wurden, wurden bestimmt.

Es erfolgte zudem eine mikroskopische Analyse der Polymere bei steigenden Temperaturen. Auf einen beheizbaren Objektträger wurde Polymermaterial platziert und bei einer Starttemperatur von 25 °C mit einer Temperaturrampe von 10 °C/min mit einem Mettler FP2 Moisture Balance Gerät (Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) kontinuierlich erwärmt. Die Veränderungen der Polymereigenschaften wurden mit einem VHX-500 Digitalmikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) beobachtet.

3.2.2.2. Rasterelektronenmikroskopie der Implantate

Die Morphologie der hergestellten Extrudatstücke (Implantate) wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops untersucht. Die Mantelflächen oder Querschnitte der Extrudate wurden mit einem adhäsiven Kleber auf Kohlenstoffbasis auf einen Probenhalter aus Aluminium aufgebracht. Vor der Messung wurde die Probe mit einer dünnen Goldschicht (BAL-Tec SCP 050 Sputter Coater; Leica Instruments, Wetzlar, Deutschland) überzogen. Anschließend wurde die Probe mit einem Rasterelektronenmikroskop (PhenomXL; Phenom-World BV, Eindhoven, Niederlande) bei einer Arbeitsspannung von 10 kV mittels Elektronenrückstreudetektor analysiert.

3.2.2.3. Gewichts- und Größenbestimmung der Implantate

Die Implantat-Masse wurde mit einer Analysenwaage (Practum224-1S, Satorius AG) bestimmt. Die Implantat-Länge und der -Durchmesser wurden mit einer Schieblehre (EDE GmbH, Wuppertal, Deutschland) bestimmt.

3.2.2.4. Allergoid-Gehaltbestimmung mittels BCA-Assay

Der Allergoid-Gehalt der Implantate wurde mittels einer kolorimetrischen Proteinquantifizierungsmethode (BCA-Assay; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. 25 µL der Probelösung oder eines Standards wurden mit 200 µL BCA-Lösung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Brand GmbH, Wertheim, Germany) vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption der Lösung in den Wells bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels eines Plattenlesegerätes (EL808; BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Der Allergoid-Gehalt wurde anhand einer Standardkurve (Konzentrationsbereich von 50–1.000 µL) bestimmt. Die Standardreihe wurde zuvor durch serielle Verdünnung einer Birken-Allergoid-Stammlösung (2.000 µg/mL) hergestellt.

3.2.2.5. Bestimmung der molekularen Masse und des hydrodynamischen Radius mittels Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde zur Bestimmung der molekularen Masse und des hydrodynamischen Radius (R_h) der Proben verwendet. Als Messsystem wurde eine Flüssigchromatographie-Anlage von Agilent Technologie (1200 Series, Waldbronn, Deutschland) und eine „Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule“ (GE

Healthcare Bio-Science, Deutschland) verwendet. Eluierende Proteine wurden bei 220 nm mittels eines UV-Detektors bestimmt. Als mobile Phase wurde ein 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 (Anhang, Kapitel 8.1) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Pro Lauf wurden 0,1 mL der Proben mit einer Konzentration von 1 mg/mL injiziert. Die molekulare Masse und der R_h -Wert wurden über Kalibrierkurven ermittelt, welche durch Analyse von fünf Referenzproteinen (Bio-Rad Gel Filtration Standards, BIO-RAD Laboratories, Kalifornien, USA) mit definierter molekularer Masse und R_h -Wert erstellt wurden. Die Referenzproben waren Thyroglobulin (670 kDa, 8,6 nm), Gamma-Globulin (158 kDa, 5,1 nm), Ovalbumin (44 kDa, 2,8 nm), Myoglobulin (17 kDa, 1,9 nm) und Vitamin-B12 (1,35 kDa, 0,9 nm). Die Auswertung wurde mit der OpenLab Data Analysis Software (Version 2.4, Agilent Technologie) durchgeführt. Ein Beispiel-Chromatogramm eines Standards ist dem Anhang beigelegt (Abbildung 81, Kapitel 8.2).

3.2.2.6. Sekundärstrukturanalyse mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Für die Sekundärstrukturanalyse des Allergoids wurde die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) mit einem Confocheck™ Tensor 27 Gerät (Bruker Optik GmbH, Leipzig, Deutschland) ausgerüstet mit einer Aquaspec Zelle (Bruker Optik GmbH) verwendet. Vor jeder Messung wurde eine Hintergrundmessung mit deionisiertem Wasser aufgenommen (Blank). Im Anschluss wurde die Zelle mit 0,1 mL Probe in einer Konzentration von 6 mg/mL beladen und ein Infrarotspektrum im Bereich von $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. Das erhaltene Spektrum wurde durch zwei verschiedene Auswertungsmethoden der Software OPUS 7.0 weiter prozessiert.

Methode 1: Sekundärstrukturanalyse

Das Spektrum einer Probe wurde mittels der Software OPUS 7.0 (Bruker Optik GmbH) mit den Spektren einer softwareinternen Datenbank von 50 verschiedenen Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur verglichen. Unter Verwendung der Regression der partiellen kleinsten Quadrate wurden dann von der Software die Werte für die α -Helix- und β -Faltblattanteile in der Probe kalkuliert.

Methode 2: Vergleich der Spektren zweiter Ableitung

Von den erzeugten Spektren der Proben wurden mittels der Software OPUS 7.0 die zweite Ableitung der Spektren im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande ($1710\text{--}1490\text{ cm}^{-1}$) berechnet und mit der zweiten Ableitung des Referenzspektrums verglichen. Als Referenzspektrum diente unbehandeltes Birken-Allergoid. Die Ähnlichkeit von Proben- und Referenzspektrum wurde durch die Software kalkuliert und als prozentualer Korrelationskoeffizient zwischen 0 % und 100 % angegeben. Auf diese Weise können bereits geringe Konformationsänderungen am Allergoid detektiert werden.

3.2.2.7. Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels nativer Isoelektrischer Fokussierung

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) wurde durch native isoelektrische Fokussierung (native IEF) durchgeführt. Dabei wurde ein fünfprozentiges Polyacrylamid-Fertiggel mit einem pH-Bereich von 3–10 (Novex, Thermo Fisher Scientific GmbH) und einem IEF-Marker (pH-Bereich: 3,6–9,4; Merck KGa) verwendet. Die Probelösung wurde vor der IEF unter Verwendung von „Pierce Polyacrylamide Spin Desalting Columns“ (Thermo Scientific GmbH) zu 20 mM Kochsalzlösung ausgetauscht. Es wurden 15 µL Probe mit einer Proteinkonzentration von 1.000 µg/mL pro Gel-Spur aufgetragen. Bei der Elektrophorese wurde die Spannung wie folgt angelegt: 60 min mit 100 V, 60 min mit 200 V, 30 min mit 500 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mittels Silberfärbung gefärbt und im Anschluss mit einem View-Pix 700 Scanner (Biosteep GmbH, Burkhardtendorf, Deutschland) gescannt. Der isoelektrische Punkt bzw. der Bereich, in dem das Allergoid auf den IEF-Gelen migrierte, wurde durch den Vergleich mit dem IEF-Marker bestimmt.

3.2.2.8. Bestimmung des hydrodynamischen Radius mittels dynamischer Lichtstreuung

Für die Bestimmung des R_h -Werts wurde neben der SEC (Kapitel 3.2.2.5) auch eine Methode basierend auf dynamischer Lichtstreuung (DLS) verwendet. Die Probelösung wurde mit einer Konzentration von 1 mg/mL in eine Einwegküvette überführt und mit einem DynaPro NanoStar Gerät (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Deutschland) mit einem Detektorwinkel von 90 ° vermessen. Pro Messung wurden zehn Datensätze mit einer Akquisitionszeit von fünf Sekunden aufgenommen. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Software Dynamics (Version 7.7, Wyatt).

3.2.2.9. Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität von Allergoid mittels ELISA

Die Immunogenität der Proben wurde mit einem spezifischen Enzymimmunoassay (ELISA) untersucht. Um die relative Potenz eines hypoallergenem Präparats zu bestimmen, wurde gemessen, inwieweit die Probe in Relation zu einer Allergoid-haltigen Referenz die Bindung von Allergoid-spezifischen polyklonalen IgG-Antikörpern das an einer festen Phase gebundene Testantigen (Allergoid) hemmen kann. Der Test basiert auf einem kompetitiven ELISA. Die Erhaltung der Immunogenität zeigt sich in einer hohen Bindungsfähigkeit der Proben gegenüber IgG-Antikörpern aus einem Kaninchenserum, das mit Allergoid immunisiert wurde.

Die Probelösung wurde dabei auf Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte aufgetragen, die zuvor mit 100 µL pro Well einer Birken-Allergoid-Referenz in einer Konzentration von 50 GPU/mL bei 2–8 °C über Nacht inkubiert wurde. Vor der Messung erfolgte eine Absättigung der 96-Mikrotiterplatte mit 200 µL pro Well einer Absättigungslösung. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte eine Reinigung der Platte mit einem Waschpuffer und

einem Plattenwaschgerät (BioTek). Die Startkonzentration der allergenhaltigen Ausgangsverdünnung der Verdünnungsreihe betrug für die Allergoid-Referenz 450 GPU/mL und für die Kontrollprobe 369,7 GPU/mL. Die Referenz- und Kontrollproben wurden am Messtag durch Lösen eines Lyophilisats, welches in definierter Masse in Fläschchen abgewogen wurde, hergestellt. Die zu testende Allergoid-Probe wurde zu einer Ausgangsverdünnung von 5 µg/mL aus einer 1000 µg/mL konzentrierten Probe mit Verdünnungspuffer vorverdünnt. Aus den zu vermessenden Proben wurde eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt und diese mit 50 µL pro Well auf die gewaschene 96-Well Platte übertragen. Anschließend wurden 50 µL des Kaninchen-Anti-Bet v Goid-Serums (BioGenes GmbH, Berlin, Deutschland) in die Wells der 96-Mikrotiterplatte pipettiert und auf einem Plattenschüttler inkubiert. Dabei konnten die IgG-Antikörper des Serums entweder das Referenz-Allergoid auf der festen Phase oder das Allergoid der Probelösung binden. Nach Entfernung der Probelösung wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierter sekundärer Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper an die IgG-Allergoid-Komplexe auf der festen Phase durch Inkubation der 96-Well Platte mit 100 µL pro Well des Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugats (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) gebunden. Im letzten Schritt wurde in den Wells der 96-Mikrotiterplatte enzymatisch durch Zugabe von 100 µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Interchim GmbH, Mannheim, Deutschland) ein farbiger Komplex erzeugt, der nach 15 min durch Zugabe von 100 µL pro Well 0,5 M Schwefelsäure (VWR) bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Plattenlesegerät quantifiziert wurde. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte dabei innerhalb von 30 min mit einem EL808-Plattenlesegerät (BioTek) und der MikroWin 2010 Software (V5.25, BioTek). Eine hohe Potenz des Allergoids zur Bindung von IgG zeigte sich in einer geringen Anzahl von IgG-Referenz-Allergoid-Komplexen auf der Platte. Der Grad der IgG-basierten Aktivität (IgG-Bindungskraft) wurde durch die Einheit „GPU/mg“ (IgG-basierte Potenzeinheit pro Milligramm) ausgedrückt. Pro 96-Mikrotiterplatte wurde jeweils eine Probe und Referenz als Triplikat, sowie eine Kontrollprobe (Birken-Allergoid bekannter GPU/mg) als Duplikat vermessen. Zusätzlich wurde auf jeder Platte ein uninhibierter Maximalwert (B0; ausschließlich Serum) und ein unspezifischer Nullwert (NSB, ausschließlich Puffer) erhoben.

Auswertalgorithmus

Die Datenpunkte innerhalb des pseudolinearen Bereichs wurden identifiziert ($20\% \leq \text{Hemmung} \leq 80\%$) und die linearen Regressionsgeraden für die Probe, die Referenz und die Kontrollprobe berechnet. Anschließend wurden, als Validitätsnachweis für die Analyse, die einzelnen Referenzproben, die getesteten Proben und die Kontrollproben auf Parallelität untereinander getestet. Wenn eine der Proben das Kriterium auf Parallelität nicht erfüllte, wurde die Analyse als ungültig betrachtet und das Experiment wiederholt. Für die Identifizierung von Ausreißern wurden folgende Algorithmen angewendet: Fehlerentfernung

auf Grundlage von Residuen, ihrer prozentualen Abweichung (10 %) vom Medianwert und des Dean-Dixon-Tests mit einem fünfprozentigen Signifikanzniveau. Nach der Entfernung von Ausreißern wurden die Daten auf einen Bereich zwischen 0 % und 100 % normalisiert und folgende Formel 1 angewendet um den %OD-NSB-Wert für jede optische Dichte zu berechnen:

$$\%OD_x - NSB = \frac{(OD_x(\text{Mittelwert}) - NSB(\text{Mittelwert}))}{(B0(\text{Mittelwert}) - NSB(\text{Mittelwert}))} \times 100$$

Formel 1 Bestimmung des %OD-NSB-Werts. OD = Optische Dichte, B0 = uninhibierter Maximalwert, NSB = Nullwert.

Die berechneten %OD-NSB-Werte wurden gefiltert, um nur diejenigen einzubeziehen die zwischen den Grenzwerten von 20–80 % lagen. In erster Instanz wurde die relative Allergene-Potenz (Prel_DF) als Verhältnis der Verdünnungsfaktoren von Probe und Referenz mittels linearer Regression berechnet, die zur halbmaximalen Hemmung führten. Die IgG-basierte Bindungskraft (GPU/mg) wurde im Anschluss mit folgender Formel 2 berechnet:

$$IgG_Bindungskraft \left[\frac{GPU}{mg} \right] (S) = Prel_{DF} \times IgG_B.Kraft_{vial} \left[\frac{GPU}{mg} \right] (R)$$

Formel 2 Bestimmung der IgG-Bindungskraft. R = Referenz, S = Probe, IgG-B.Kraft = IgG-Bindungskraft, DF = Verdünnungsfaktor, Prel_DF = relative Allergene-Potenz.

3.2.2.10. Bestimmung der IgE Bindungsaktivität mittels ELISA

Das Allergoid zeichnet sich durch eine geringe Potenz zur Bindung von IgE-Antikörpern in Seren von Allergikern aus, was auf die chemische Veränderung der IgE-bindenden Epitope während des Herstellungsprozesses zurückzuführen ist. Der IgE-Potenztest wird eingesetzt, um die geringen IgE-Bindungseigenschaften zu überprüfen und die Sicherheit der hergestellten Allergoid-Produkte zu gewährleisten. Die IgE-bindende Reaktivität der Proben wurde mit einem spezifisch entwickelten ELISA analysiert. Das Testprinzip ist vergleichbar mit dem IgG-Potenztest (3.2.2.9). Die Ausgangsverdünnung der seriellen Verdünnungsreihe betrug für die Allergoid-Referenz 129,1 PNU/mL und für die Kontrollprobe 132,6 PNU/mL. Die zu testende Allergoid-Probe wurde mit einer Ausgangsverdünnung von 1 mg/mL verwendet. Die Bindungsreaktivität wurde mit 100 µL pro Well eines Mensch-Anti-Birke-Poolserums (Allergopharma) von Allergikern, die gegen das zu bestimmende Allergen sensibilisiert waren, bestimmt. IgE-Antikörper aus diesem Pool konnten entweder an das auf der Platte immobilisierte Referenz-Allergoid oder an das freie Allergoid der Probelösung binden. Nach Inkubation wurden die an die Festphase gebundenen IgE-Antikörper mit 100 µL pro Well eines Anti-Mensch-IgE monoklonalen Antikörpers (Dianova) und

anschließend mit 50 µL pro Well eines Ziege-Anti-Maus-HRP Konjugats (Dianova GmbH) nachgewiesen. Die darauffolgenden Schritte, sowie der Auswertealgorithmus waren identisch zu der Methode aus Kapitel 3.2.2.9. Die Einheit „AA/mg“ („Allergenaktivität pro mg“) wurde verwendet, um den Grad der IgE-Bindungsfähigkeit (IgE-Bindungskraft) zu definieren. Formel 3 wurde für die Bestimmung der IgE-Bindungskraft verwendet.

$$IgE_Bindungskraft \left[\frac{AA}{mg} \right] (S) = Prel_{DF} \times IgE_B.Kraft_{vial} \left[\frac{AA}{mg} \right] (R)$$

Formel 3 Bestimmung IgE-Bindungskraft. R = Referenz, S = Probe, AA = Allergene-Aktivität, IgE B. Kraft = IgE-Bindungskraft, Prel_DF = relative Allergene-Potenz

3.2.2.11. Allergoid Freisetzung

Freisetzungsmethode 1:

Für die In-vitro-Freisetzung des Allergoids wurden Implantat-Aliquots von ca. 50 mg in 10R-Vials eingewogen und mit 5 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 37 °C in einem Wasserbad (GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland) bei 50 rpm inkubiert. Der Inkubationszeitraum betrug zwischen 25 und 40 Wochen. Pro Probenzug wurde 1 mL Probe entnommen und durch frische PBS ersetzt. Die gezogenen Proben wurden vor der Analyse durch einen 0,22 µm Filter (PVDF) filtriert. Nach Entnahme einer 8 h und einer 24 h Probe wurden die Proben wöchentlich gezogen. Von allen gezogenen Proben wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter (HandyLab 600, Xylem Analytics GmbH, Weilheim, Deutschland) und der Proteingehalt mittels BCA-Assay bestimmt. Des Weiteren wurde von einigen Proben zu definierten Zeitpunkten die IgG-Bindungsaktivität, mittels IgG-Potenztest, bestimmt.

Freisetzungsmethode 2:

Für eine Charge (756TrMg(1)) wurde eine weitere In-vitro-Freisetzungsmethode angewendet, um den Einfluss von Methode 1 auf die IgG-Bindungsaktivität und das Freisetzungsverhalten zu untersuchen. Bei Methode 2 wurden Implantat-Aliquotes von ca. 25 mg in 10R-Vials eingewogen und mit 2,5 mL PBS entsprechend Methode 1 inkubiert. Pro Probenzug wurde das gesamte FreisetzungsmEDIUM entnommen und durch 2,5 mL PBS ersetzt. Dadurch wurde eine Kumulation von freigesetztem Allergoid in der Probelösung über den Verlauf der In-vitro-Studie verhindert. Das nachfolgende analytische Vorgehen entsprach Methode 1.

Von einigen Chargen wurden die Proben nach Abschluss der In-vitro-Freisetzung gefriergetrocknet und die Restmasse an Implantat mit einer Analysenwaage bestimmt.

3.2.2.12. Statistische Auswertung

Alle Berechnungen, wenn nicht anders beschrieben, wurden mit der Software Microsoft Excel (Version 2306, Microsoft Corporation, Washington, Vereinigte Staaten) durchgeführt.

Mehrfachbestimmungen wurden als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) berechnet. Die Standardabweichung wird in Graphen als Fehlerbalken und im Text mit einem Symbol (\pm) dargestellt. Folgende Formeln wurden für die Berechnung des Mittelwerts (Formel 4) und der Standardabweichung (Formel 5) verwendet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Formel 4 Berechnung Mittelwert

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Formel 5 Berechnung Standardabweichung

4. Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Entwicklung und Optimierung einer PLGA-basierten Depotformulierung mit Birken-Allergoid werden in den folgenden Kapiteln beschrieben und diskutiert.

4.1. Entwicklung eines Extrusionsprozesses für Birken-Allergoid Implantate

4.1.1. Einleitung

Das Ziel des ersten Entwicklungsabschnittes war es, für jedes Polymer die niedrigste erforderliche Prozesstemperatur zu ermitteln und darauf basierend einen geeigneten Extrusionsprozess zu entwickeln, der einerseits die Verarbeitung des jeweiligen Polymers gewährleistet und andererseits die thermische Belastung für das verarbeitete Allergoid so gering wie möglich gehalten werden. Die Ergebnisse der thermischen Analyse wurden anschließend auf den Herstellungsprozess übertragen. Es wurden sowohl Placebo- als auch Verum-Chargen (10 % m/m Birken-Allergoid) auf Basis der Polymere RG 756 S und RG 504 H hergestellt und hinsichtlich ihrer Morphologie, des Einflusses der Herstellung auf die Allergoid-Stabilität und der In-vitro-Allergoid-Freisetzung untersucht.

4.1.2. Thermische Analyse der Polymere

Für die Identifizierung eines geeigneten Temperaturprofils für die Extrusion wurden die Polymere hinsichtlich ihrer Glasübergangstemperatur (T_g) und ihrer Verformbarkeit bei Kontakt mit einer beheizten Oberfläche analysiert. In der DSC-Analyse zeigte das Polymer RG 756 S mit 54,9 °C eine höhere T_g als das Polymer RG 504 H mit 51,4 °C. Dies ist auf das höhere Molekulargewicht des Polymers RG 756 S aufgrund des höheren Polymerisationsgrades zurückzuführen. Bei höheren Molekulargewichten nimmt die Konzentration der Kettenenden pro Volumeneinheit ab, was zu einem verringerten freien Volumen zwischen den Kettenenden und damit zu einer höheren T_g führt [160]. Ein weiterer Einfluss ist der Kristallisationsgrad des Polymers, der maßgeblich durch den Glykolsäureanteil und die Stereochemie der DL-Milchsäure beeinflusst wird [26].

Die Verformbarkeit der Polymere unter Temperatureinfluss wurde mittels einer Kofler-Heizbank (Temperaturbereich: 50–200 °C) untersucht. Ziel war es, die Polymertextur bei verschiedenen Temperaturen zu charakterisieren, um die spätere Verarbeitung des Polymers in den einzelnen Extruderzonen zu optimieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 11 dargestellt.

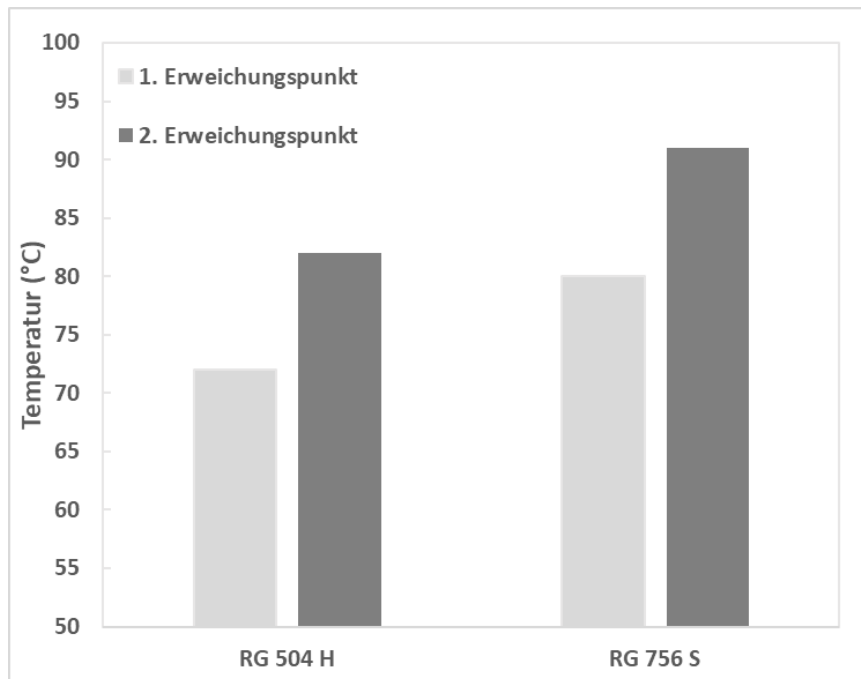


Abbildung 11 Ergebnisse der Analyse der Verformbarkeit mittels Kofler-Heizbank für die Polymere RG 756 S und RG 504 H. n = 1.

Eine erste Verformbarkeit wurde für das Polymer RG 504 H bei 72 °C und für das Polymer RG 756 S bei 80 °C bestimmt (erster Erweichungspunkt). Bei diesen Temperaturen konnte das jeweilige Polymer erstmals mit einem Holzspatel durch leichten Druck verformt werden. Bei 82 °C und 91 °C wurden die Polymere RG 504 H und RG 756 S stark erweicht (zweiter Erweichungspunkt).

Der Temperatureinfluss auf die Polymerstruktur wurde weiter untersucht, indem die Polymere auf einen beheizbaren Objektträger platziert und bei steigender Temperatur mikroskopisch analysiert wurden. Abbildung 12 zeigt die mikroskopische Beschaffenheit der Polymere RG 504 H und RG 756 S bei verschiedenen Temperaturen.

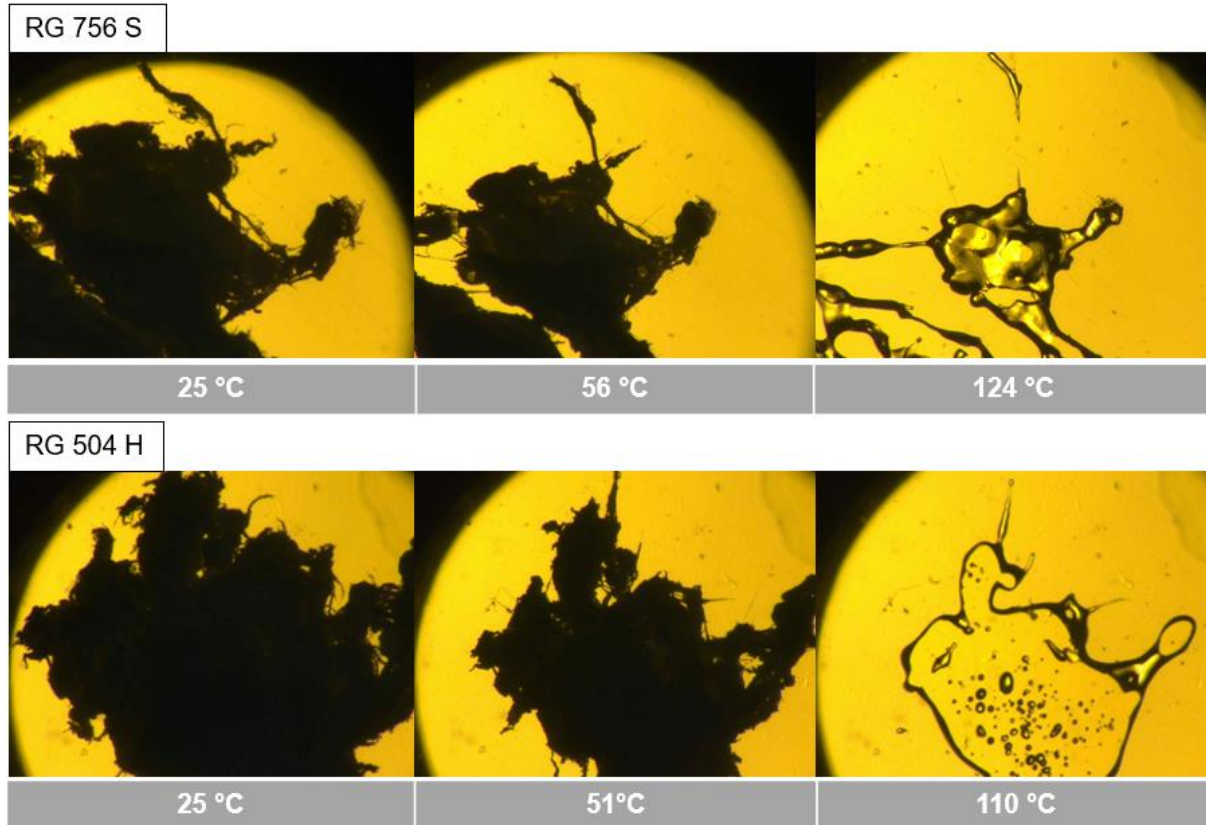


Abbildung 12 Mikroskopische Aufnahmen (MAG 30X) der Polymere RG 756 S und RG 504 H bei Kontakt mit einer beheizten Oberfläche.

Eine erste Volumenänderung wurde bei 51 °C (RG 504 H) und 56 °C (RG 756 S) beobachtet. Bei Temperaturen von 110 °C (RG 504 H) und 124 °C (RG 756 S) wurde dann eine transparente Schmelze erzeugt. Bei diesen Temperaturen liegen die Polymere in hochviskosem Zustand vor. Es wurde deutlich, dass bei solch hohen Prozesstemperaturen die Polymere aufgrund ihrer Schmelzeigenschaften nicht mehr von den Schnecken durch den Extruderraum hätten gefördert werden können. Die Ergebnisse der Polymeranalyse zur Verformbarkeit und der Mikroskopie bei Kontakt mit einer beheizten Oberfläche unterstützten die Ergebnisse der DSC-Analyse. Das Polymer RG 504 H zeigte auch bei diesen thermischen Untersuchungen eine niedrigere Verformungstemperatur als das Polymer RG 756 S.

4.1.3. Übertragung der thermischen Analyse auf den Extrusionsprozess

Auf Basis der thermischen Analyse der Polymere wurden polymerspezifische Temperaturprofile für die Einstellung der einzelnen Extruderzonen und der Extruderdüse abgeleitet (Tabelle 12).

Tabelle 12 Temperatureinstellung der Extruderzonen und der Extruderdüse.

Polymer	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5	Zone 6	Zone 7	Düse
RG 504 H	70 °C	73 °C	75 °C	78 °C	82 °C	83 °C	86 °C	88 °C
RG 756 S	70 °C	75 °C	80 °C	83 °C	85 °C	88 °C	90 °C	92 °C

Um Verstopfungen in der Einzugszone (Zone 1–2) zu vermeiden, wurde die Mindesttemperatur während der Extrusion ca. 15–20 °C höher als die T_g des jeweiligen Polymers gewählt. Da sich in der vierten Zone des Extruders die ersten Mischelemente im Schneckendesign (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 10) befanden, wurde bei der Temperatureinstellung für diese Zone bewusst eine höhere Temperatur als der zuvor bestimmte erste Erweichungspunkt der jeweiligen Polymere gewählt. Dies sollte eine gute Durchmischung der Polymere und nichtpolymeren Komponenten ermöglichen. Ein kritischer Punkt bei der Herstellung der Implantate war die Identifikation der optimalen Temperatur der Extruder-Düse, um den Maximaldruck von 100 bar nicht zu überschreiten. Die Temperatur des zweiten Erweichungspunktes wurde hierfür als gute Basis für die jeweiligen Polymere angesehen. Bezüglich der Temperaturstabilität des Birken-Allergoids liegen bisher nur Erfahrungen in flüssigen Formulierungen vor. Wald et al. zeigten mittels DLS-Analytik, dass in Wasser gelöstes Birken-Allergoid eine hohe Start-Temperatur für die Denaturierung bzw. Aggregation von ca. 90 °C besitzt, was auf die intra- und intermolekularen Quervernetzung durch die Allergoidisierung zurückgeführt wurde [161]. Zusätzlich wurde der Erhalt der IgG-Bindungsaktivität und der strukturellen Eigenschaften (SEC, FTIR-Analyse) für Birken-Allergoid, das 1 h bei 70 °C gestresst wurde, gezeigt. Es wurde davon ausgegangen, dass das lyophilisierte Allergoid eine noch etwas höhere Temperaturstabilität aufweisen könnte, sodass die Maximaltemperaturen der Extrusionsprozesse von 88 bzw. 92 °C eine hinreichende Allergoid-Stabilität ermöglichen sollten.

4.1.4. Herstellungsprozess

Die Zuführung des Extrusionsmaterials erfolgte manuell mit einem Spatel in den Extruderraum, wobei sich die Zuführrate aus der Materialaufnahme der Extruderschnecken mit den eingestellten Drehzahlen (Kapitel 3.2.1.1) ergab. Das Prozessende wurde bei Ausbleiben der Extrudatstrangbewegung an der Extruderdüse definiert. Die Chargengröße wurde, basierend auf dem in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) beobachteten

Materialverlust nach der Extrusion, festgelegt. Dies sollte sicherstellen, dass eine ausreichende Anzahl an Implantaten für die anschließenden analytischen Methoden hergestellt wurde.

Tabelle 13 zeigt die Prozessparameter der SME für die produzierten Chargen 504Plac, 504, 756 und 756Plac.

Tabelle 13 SME-Prozessparameter für die Chargen 504Plac, 504, 756Plac und 756. (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute). X = enthalten, -- = nicht enthalten.

Charge	504Plac	504	756Plac	756
Zusammensetzung				
RG 756 S	--	--	X	X
RG 504 H	X	X	--	--
10 % (m/m) Birken-Allergoid	--	X	--	X
Allergoid-Charge	--	W8003670	--	W8003670
SME-Prozessparameter				
Chargengröße (g)	4,3	5,0	4,9	5,0
Zuführrate (g/min)	0,12	0,25	0,15	0,33
Prozesszeit (min)	60	45	55	38
Maximaldruck (bar)	74	70	92	99
Ausbeute (%)	30,0	14,2	32,7	32,8

Für die Chargen 504Plac und 504 wurden Maximaldrücke von 74 und 70 bar in der Extruderdüse gemessen. Die Düsentemperatur war somit hoch genug, um das Polymer RG 504 H ausreichend zu erweichen. Bei den Chargen 756Plac und 756 wurden mit 92 und 99 bar höhere Maximaldrücke in der Extruderdüse gemessen. Dies wurde auf den geringen Abstand zwischen der Düsentemperatur (92 °C) und dem zweiten Erweichungspunkt (91 °C) für das Polymer dieser Charge (RG 756 S) zurückgeführt. Die Extrusion war dennoch bei allen Chargen ohne druckbedingte Warnabschaltung möglich. Nach der Produktion der Placebo-Chargen wurde die Zuführrate erhöht. Dadurch wurden die Prozesszeiten für die Chargen 504 und 756 um 15 min bzw. 17 min verringert (Tabelle 13). Für alle Chargen wurden nach der Extrusion Rückstände von ca. 3 g in der Extruderdüse beobachtet. Da diese Menge zum Füllen der Extruderdüse benötigt wurde, konnten mit den gegebenen Extruderbauteilen und der Chargengröße von 5 g keine höheren Ausbeuten erzielt werden.

Abbildung 13 zeigt die verwendeten Düsentteile sowie die Materialrückstände nach der Extrusion der Charge 756.

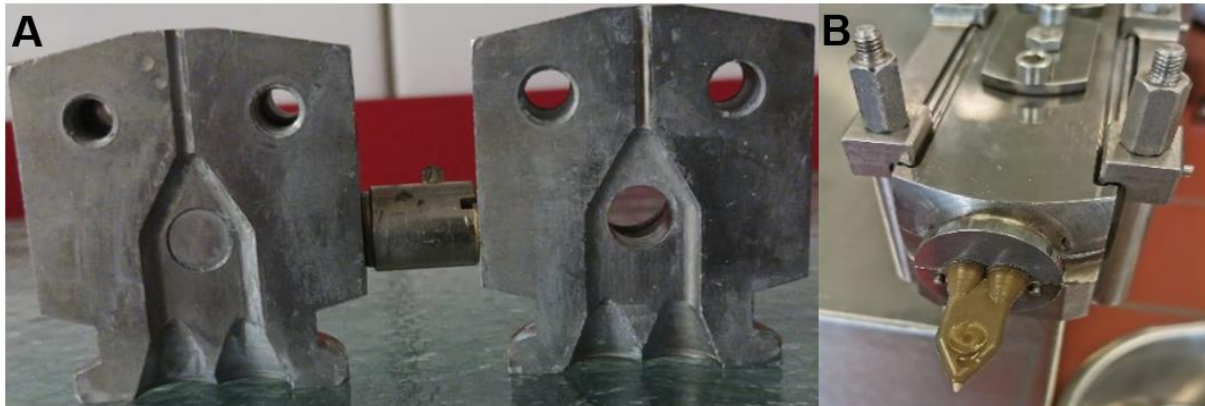


Abbildung 13 Düsenbauteile (A) und Materialrückstände (B) in der Extruderdüse nach Extrusion der Charge 756.

Für die Charge 504 wurde eine geringere Ausbeute (14,2 %) im Vergleich zu den anderen Chargen festgestellt. Bei dieser Charge wurden zusätzliche Rückstände von ca. 1 g an den Mischelementen der Extruderschnecken beobachtet, die auf einer zu starken Erweichung des Polymers der Charge 504 basieren könnte. Dies wurde bei der auf dem gleichen Polymer basierenden Charge 504Plac nicht festgestellt. Trotz der Größe des Extruders und der empfohlenen minimalen Chargengröße von 30 g (Handbuch Pharma 11 [159]) war eine Produktion mit einer Chargengröße von 5 g durchführbar. Dies ist auf die Selbstreinigungsfunktion des Doppelschneckenextruders zurückzuführen. Durch das Ineinandergreifen der benachbarten Schneckenwurzeln wird eine nahezu komplette Entleerung des Extruder-Innenraumes gewährleistet [29].

In diesem Kapitel konnte die erfolgreiche Übertragung der abgeleiteten polymerspezifischen Temperaturprofile auf die Extrusion gezeigt werden. Dabei wurde die thermische Belastung des Allergoids so gering wie möglich gehalten, jedoch bei ausreichend hohen Temperaturen extrudiert, um ein mögliches Verstopfen in der Einzugszone zu verhindern, eine homogene Durchmischung der Polymere und nichtpolymeren Komponenten zu gewährleisten und den Maximaldruck in der Extruderdüse nicht zu überschreiten.

4.1.5. Morphologische Charakterisierung der Implantate

Zur Beurteilung der Eignung des Herstellungsprozesses wurden die hergestellten Implantate morphologisch charakterisiert und die Allergoid-Beladung über das Extrudat bewertet. Ziel dieser Untersuchungen war es zu beurteilen, ob die SME mit den gewählten Prozessparametern homogene Implantate erzeugt. Dabei wurden stets Implantate aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats verwendet. Zur Beurteilung der Allergoid-Beladung im Extrudat wurde zunächst das Allergoid gemäß einer eigens für diesen Zweck entwickelten Extraktionsmethode (Extraktionsmethode 1) aus Implantaten zurückgewonnen. Die

Entwicklung der Extraktionsmethode 1 und deren Prozess ist in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Nachfolgend wurde der Allergoid-Gehalt in der Extraktionsprobe mittels des BCA-Assays bestimmt und schließlich mit der für die Implantate spezifisch berechneten zuvor eingesetzten Allergoid-Menge bilanziert. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser sowie die Berechnung der Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 504Plac, 504, 756Plac und 756.

Tabelle 14 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 504Plac, 504, 756Plac und 756. Angabe von MW \pm SD.

Parameter	504Plac	504	756Plac	756
Masse (mg) (n = 10)	31,1 (\pm 2,4)	26,3 (\pm 1,1)	25,6 (\pm 0,6)	26,8 (\pm 1,0)
Länge (mm) (n = 10)	4,8 (\pm 0,2)	5,2 (\pm 0,1)	5,1 (\pm 0,1)	5,2 (\pm 0,1)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,4 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,0)	2,0 (\pm 0,1)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	--	105,1 (\pm 1,7)	--	99,7 (\pm 1,7)

Die Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate ergab für alle Chargen vergleichbare Ergebnisse. Für die Charge 504Plac wurde eine Zunahme des Durchmessers nach Düsenaustritt festgestellt. Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,4 mm waren diese Implantate im Schnitt 20 % breiter als die der anderen drei Chargen mit einem Durchmesser von 2,0 mm. Dies könnte auf einen Barus-Effekt hindeuten, der durch die Kombination aus einer Vielzahl von Faktoren wie L/D-Verhältnis, Scherrate, Scherstress, Düsendruck und Temperatur im Extruder entstehen kann. Unter dem Einfluss von Dehnung, Scherung und Kompression während der Extrusion können sich vereinzelt Molekülketten entflechten oder umorientieren. Die dabei entstehenden Spannungen oder Dehnungen können während des Materialflusses nicht vollständig relaxieren, was nach Düsenaustritt zu einer elastischen Verformung des Extrudats führen kann [162].

Ein hoher Gehalt des Allergoids nahe dem Soll-Wert wurde für die Chargen 504 und 756 durch die vollständige Wiederfindung des Allergoids mit geringen Standardabweichungen nach Extraktion aus Implantaten aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats festgestellt (Tabelle 14). Dies lässt darauf schließen, dass die Viskosität der Polymere in den Zonen der Mischelemente ausreichend hoch war, um Polymer und Allergoid zu dispergieren. Geringfügige Abweichungen, hinsichtlich einem Allergoid-Gehalt über dem Sollwert können auf die Variabilität der Methode zur Gehaltsbestimmung (BCA-Assay) zurückgeführt werden.

Es konnte die Eignung der Allergoid-Extraktion mittels Polymer-Präzipitation (Freisetzungsmethode-1) durch die nahezu vollständige Wiederfindung des Allergoids aus den Implantaten nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von VE-H₂O konnte das Allergoid vollständig gelöst werden. Das dabei ausgefällte PLGA wurden durch die Doppelfiltration weitgehend aus der Probenmatrix entfernt, sodass sie nicht mit der Bestimmung des Allergoid-Gehalts interferierten. Ein Einfluss von Acetonitril und noch in der Probenmatrix vorhandenes PLGA auf den BCA-Assay konnte durch die Vermessung der Placebo-Implantate beider Polymere ausgeschlossen werden. In beiden Fällen wurden dabei vergleichbare Absorptionswerte wie bei den Leerwertmessungen festgestellt.

Um Veränderungen in der Mantelflächenbeschaffenheit der Implantate durch die verschiedenen PLGA-Qualitäten und den Einbau des Allergoids in die Polymermatrix festzustellen, wurde die nicht-geschnittene äußere Mantelfläche der hergestellten Implantate mittels REM analysiert (Abbildung 14).

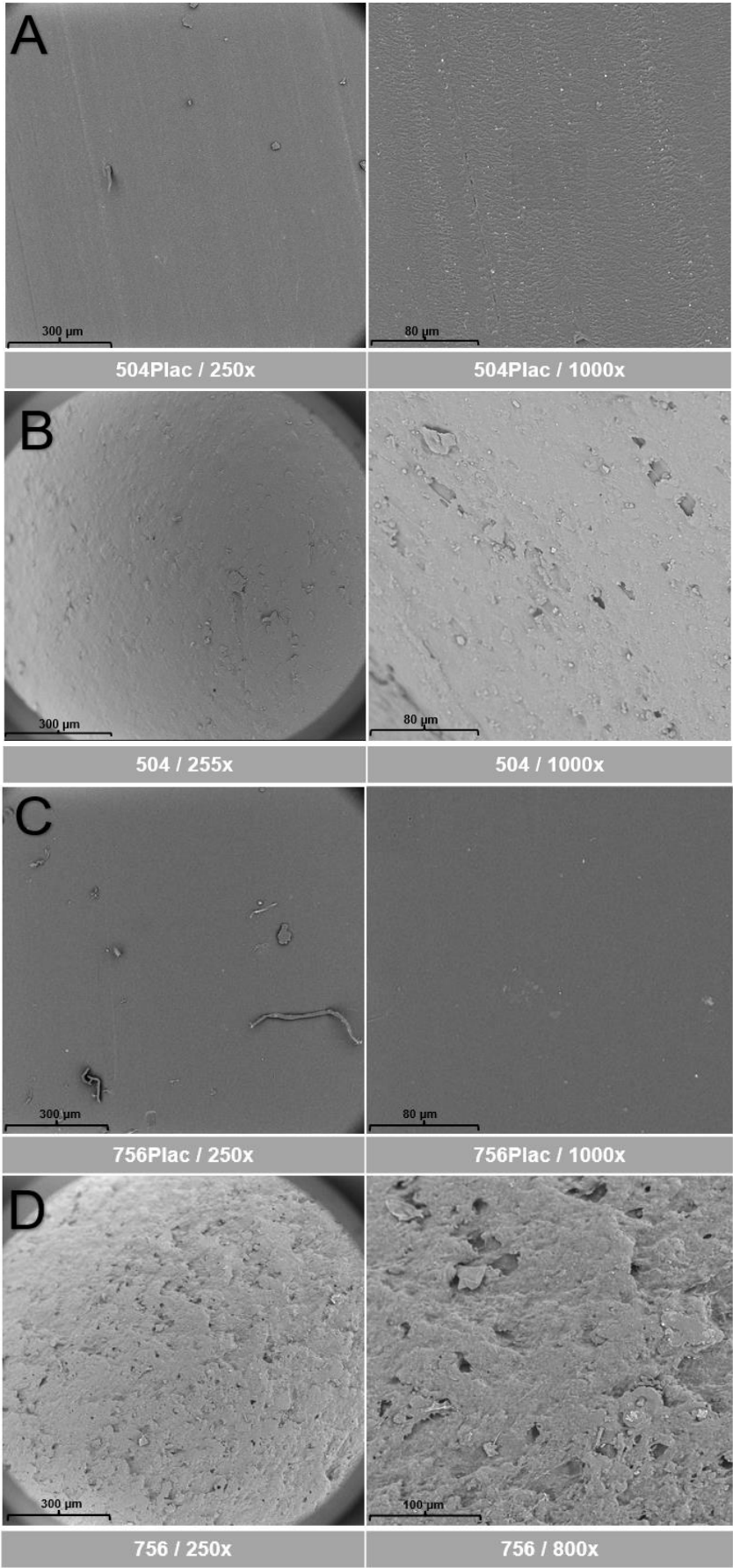


Abbildung 14 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 504Plac (A), 504 (B), 756Plac (C), und 756 (D).

Die REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelflächen der Placebo-Chargen zeigten eine glattere Mantelfläche als die Verum-Chargen. Bei 800-facher bzw. 1000-facher Vergrößerung konnten bei den Verum-Chargen partikuläre Strukturen (10–100 µm) detektiert werden, die auf das Allergoid hindeuten. Diese Strukturen waren gleichmäßig über den untersuchten Bereich verteilt und auf der Implantat-Mantelfläche der Placebo-Chargen nicht zu beobachten. Eine vergleichbare Feststellung zeigte die Studie von He *et al.* [163]. Die in dieser Studie hergestellten PLGA-PEG-Doxorubicin-Implantate unterschieden sich in der REM-Analyse von den Placebo-Chargen durch eine rauere Mantelfläche, was als homogene Verteilung des Wirkstoffs Doxorubicin interpretiert wurde. Durch REM-Aufnahmen der Polymer-Allergoid-Mischung der Charge 504 (vor Extrusion) können die partikulären Strukturen des Allergoids (10–100 µm) deutlich vom Polymer unterschieden werden (Abbildung 72, Kapitel 8.2). Beim Vergleich der Chargen 504 und 756 zeigte sich eine glattere Mantelfläche bei der Charge 504 (Abbildung 14). Dies könnte auf eine stärkere Erweichung des Polymers unter den gegebenen Prozesstemperaturen zurückzuführen sein und konnte bereits anhand des Düsendrucks während der Extrusion identifiziert werden. Bei der Bewertung der Makroporosität konnten bei allen untersuchten Chargen keine größeren Hohlräume oder stark unebene Strukturen, die ein ungleichmäßig geformtes Implantat darstellen würden, analysiert werden.

4.1.6. Allergoid-Charakterisierung

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, den Einfluss der Prozessbedingungen der Extrusion auf die Stabilität des Allergoids zu analysieren. Es wurde Allergoid gemäß der eigens entwickelten Extraktionsmethode 2 aus Implantaten extrahiert (siehe Kapitel 3.2.1.3) und nachfolgend physikochemisch und immunologisch untersucht, um die Aufrechterhaltung der Struktur und immunologischen Eigenschaften des Allergoids nach erfolgter Extrusion zu überprüfen. Als Referenzen dienten frisch gelöstes Allergoid (Referenz-1) und eine frisch gelöste Allergoid-Probe, die der Extraktionsprozedur unterzogen wurde (Referenz 2). Mit der Referenz-2 wurde der Einfluss der Extraktionsmethode auf die Allergoid-Stabilität und somit deren Eignung geprüft. Beide Referenzen wurden aus der für die Extrusion verwendeten Allergoid-Charge (W8003670) hergestellt.

4.1.6.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

Mit der DLS-Analyse wurde der hydrodynamische Radius (R_h) des Allergoids bestimmt. Eine Zunahme des R_h weist auf eine mangelnde Stabilität und die Bildung unerwünschter Aggregate hin. Neben dem Einfluss der Extrusion wurde auch der Einfluss der Extraktionsmethode auf die Allergoid-Stabilität untersucht.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der DLS-Analytik aufgeführt.

Tabelle 15 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 (n = 3) und 756 (n = 6) sowie der Referenz-1 (n = 3) und Referenz-2 (n = 3). Darstellung des mittleren R_h -Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW \pm SD.

Probe	Referenz-1	Referenz-2	504	756
Mittlerer R_h -Wert (nm)	2,3 (\pm 0,5)	2,2 (\pm 0,7)	2,3 (\pm 0,3)	2,8 (\pm 0,6)
Prozentualer Massenanteil (%)	94,3 (\pm 4,7)	93,7 (\pm 3,6)	96,3 (\pm 0,9)	86,7 (\pm 2,2)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	99,9 (\pm 0,2)	99,8 (\pm 0,2)	99,7 (\pm 0,5)	99,6 (\pm 0,1)

Die mit den Referenzproben vergleichbaren R_h -Werte des extrahierten Allergoids der Charge 504 mit zusätzlichen hohen Massen- und numerischen Anteilen deuten auf eine unveränderte Allergoid-Größe ohne Aggregatbildung hin, was durch einen Anstieg des mittleren R_h -Werts detektierbar gewesen wäre [164]. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756 wurde eine leichte Zunahme der Allergoid-Größe bei gleichzeitiger Abnahme des prozentualen Massenanteils festgestellt, was auf die Bildung sehr geringer Mengen an Aggregaten hindeutet. Diese Menge ist jedoch so unbedeutend, dass von keinem relevanten Einfluss der Extrusion auf die hydrodynamische Größe des Allergoids ausgegangen werden kann. Ein Einfluss der Extraktionsmethode auf den R_h -Wert des Allergoids konnte aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse der Referenz-1 (unbehandelt) und Referenz-2 (behandelt mit Extraktionsmethode 2) ausgeschlossen werden.

4.1.6.2. Bestimmung der molekularen Masse und des R_h -Werts mittels SEC-Analyse

Die Bestimmung der molekularen Masse mittels SEC-Analyse ist ein nützliches Verfahren zur Charakterisierung des Allergoids [165] und wird von der EMA in ihren Leitfäden für allergene Produkte (2008) empfohlen [126]. Die SEC-Analyse ermöglicht unter nativen Bedingungen eine Trennung von Proteinen nach dem hydrodynamischen Radius und wurde daher in dieser Arbeit verwendet, um strukturelle Veränderungen des Allergoids, einschließlich Aggregatbildungen, anhand von Veränderungen im Elutionsprofil zu untersuchen [123, 166]. Zusätzlich wurde durch Verwendung eines Proteinstandards die molekulare Masse und der R_h -Wert berechnet. Ein typisches Allergoid-Chromatogramm zeigt ein breites Elutionsprofil mit einer Verschiebung zu kürzeren Elutionszeiten im Vergleich zum korrespondierenden Allergenextrakt. Dies ist auf die intra- und intermolekulare Quervernetzungen während der Allergoidisierung und der damit verbundenen Größenzunahme einzelner Proteine zurückzuführen [123, 167, 168].

Abbildung 15 zeigt die Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus den Implantaten der Chargen 504 und 756 und der Referenzproben.

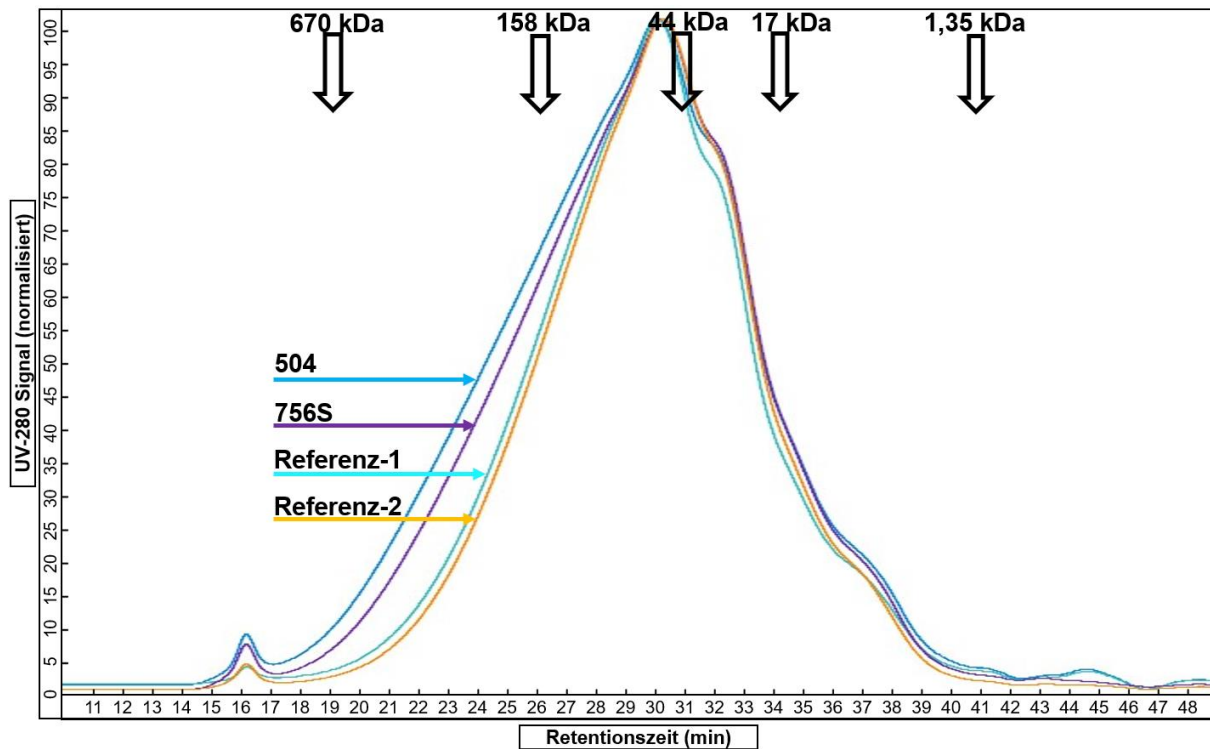


Abbildung 15 SEC-Chromatogramm des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1 und Referenz-2 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der Chromatogramme des extrahierten Allergoids der Chargen 504 und 756 mit den Referenzproben konnten Unterschiede hinsichtlich schneller eluierender hochmolekularer Proteinspezies und eines leicht erhöhten Aggregat-Peaks (Retentionszeit 16 min) festgestellt werden. Im Allgemeinen waren diese Unterschiede jedoch sehr gering, was darauf hindeutet, dass die Proteinstrukturen während der Extrusion und des Extraktionsprozesses weitestgehend erhalten blieben. Zur besseren Veranschaulichung ist in Abbildung 15 nur eine Probe pro Charge dargestellt. Die übrigen Chromatogramme sind dem Anhang beigelegt (Kapitel 8.2, Abbildung 73 und Abbildung 74).

Die Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts erfolgte auf den Retentionszeiten der Proteine mit der höchsten UV-Absorption (Hauptpeak im Chromatogramm). Die gezeigten Werte sind daher nur für diesen Teil aller eluierender Proteine gültig (Tabelle 16).

Tabelle 16 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 ($n = 3$) und 756 ($n = 6$) sowie der Referenz-1 ($n = 3$) und Referenz-2 ($n = 3$). Angabe von MW \pm SD.

Probe	Referenz-1	Referenz-2	504	756
Molekulare Masse (kDa)	46,0 ($\pm 0,3$)	44,3 ($\pm 0,7$)	45,9 ($\pm 0,1$)	45,9 ($\pm 0,1$)
R_h -Wert (nm)	3,0 ($\pm 0,0$)	3,0 ($\pm 0,0$)	3,0 ($\pm 0,0$)	3,0 ($\pm 0,0$)

Insgesamt waren die Werte für die molekulare Masse bei allen Proben sehr ähnlich und für den R_h -Wert sogar gleich. Die Ergebnisse der DLS-Analytik zeigten vergleichbare Werte für den R_h -Wert (Kapitel 4.1.6.1, Tabelle 15). Dies ist ein Hinweis auf eine unveränderte hydrodynamische Größe des Allergoids nach Extraktion aus den Implantaten. Ein Einfluss der Extraktionsmethode auf die strukturelle Integrität des Allergoids konnte aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der Referenz-2, die der Extraktionsmethode 2 unterzogen wurde, zu der unbehandelten Referenz-1 ausgeschlossen werden.

4.1.6.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels nativer IEF

Die native IEF wurde verwendet, um das extrahierte Allergoid im Vergleich zu den Referenzproben auf mögliche strukturelle Veränderungen hin zu untersuchen. Allergoide zeichnen sich durch eine Verschiebung zu sauren pI-Werten im Vergleich zu nativen Allergenextrakten aus, was auf die Modifikation positiv geladener Aminogruppen während der Allergoidisierung zurückzuführen ist [169]. Maasch *et al.* zeigten anhand von IEF-Untersuchungen eines Allergoids aus Pollen des Wiesenlieschgrases, dass sich das IEF-Bandenmuster auf einen Bereich von pI 3,0–5,6 beschränkt und somit als Modifikationskontrolle des Allergoids nach der Herstellung genutzt werden kann [170]. Die native IEF wird daher als Freigabekontrolle bei der Herstellung von Allergoid-basierten Allergieprodukten und für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt [124].

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der IEF-Analyse des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenzproben.

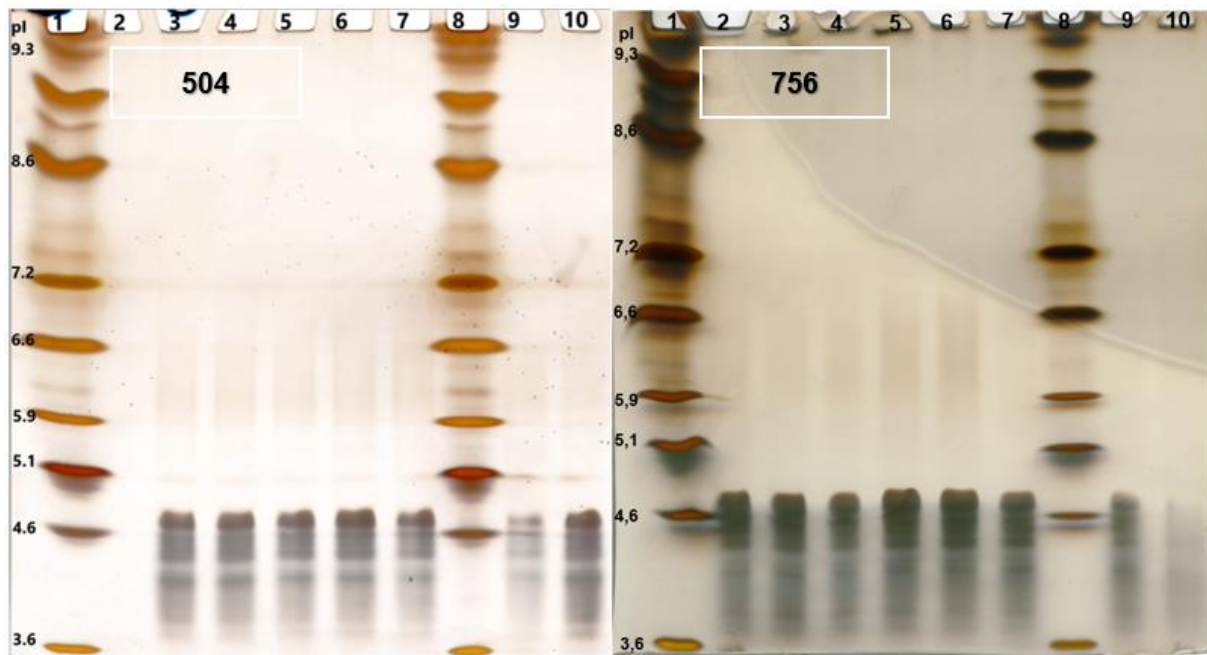


Abbildung 16 IEF-Gele, Proteindetektion mittels Silberfärbung. Links: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 504 (Spur 3–7, n = 5) mit der Referenz-1 (Spur 9, n = 1), Referenz-2 (Spur 10, n = 1) und dem Proteinmarker (Spur 1 und 8). Rechts: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 756 (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-1 (Spur 9, n = 1), Referenz-2 (Spur 10, n = 1) und dem Proteinmarker (Spur 1 und 8).

Das aus den Chargen 504 und 756 extrahierte Allergoid zeigte in beiden Fällen das charakteristische IEF-Bandenmuster der Referenz-1 und Referenz-2 mit Banden im Bereich von pI 3,6–5,1. Unerwünschte Konformationsänderungen während der Extrusion oder Extraktion hätten zu einer Veränderung der Oberflächenladung des Allergoids führen können, was auf nativen IEF-Gele durch Bandenverschiebungen nachweisbar gewesen wäre. Die IEF-Analyse zeigte, dass das Allergoid beider Verum-Chargen seine Oberflächenladung nicht veränderte, was auf eine unveränderte Struktur und das Fehlen von Desaminierungen oder Konformationsänderungen wie Entfaltungen, Degradation oder Reversion der Allergoidisierung hinweist. Darüber hinaus wurden keine Unterschiede zwischen den Referenzproben festgestellt, was einen Einfluss der Extraktionsmethode auf die Allergoid-Struktur, hinsichtlich der Oberflächenladung, ausschließt.

4.1.6.4. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Die FTIR-Sekundärstrukturanalyse wurde zur Überprüfung der Sekundärstruktur des Allergoids und zur Identifizierung von Aggregaten verwendet. Die Amid I-Schwingung ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) hängt stark von der Sekundärstruktur eines Proteins ab und macht den Bereich von $1700\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$ des FTIR-Spektrums besonders empfindlich für Konformationsänderungen [171]. Unerwünschte Strukturänderungen während der Extrusion

würden zu starken Absorptionsveränderung in diesem Bereich führen. Abbildung 17 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande für das extrahierte Allergoid der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1.

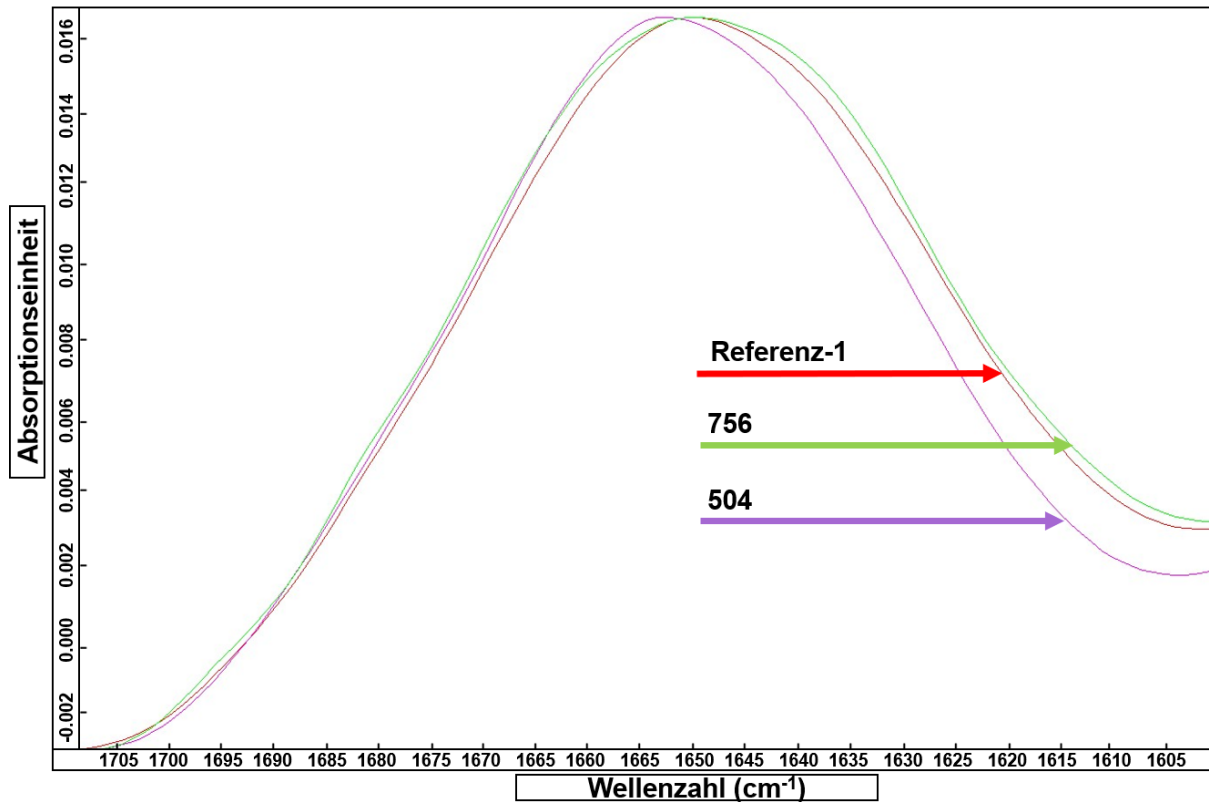


Abbildung 17 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1. n = 1.

Nach Gross *et al.* können mit der FTIR-Analyse vor allem kleine und kolloidale Aggregate anhand der β -Aggregation nachgewiesen werden, die durch intermolekulare Verbindung von β -Faltblattstrukturen verschiedener Proteinmoleküle entstehen. Dies äußert sich in einer Schulterbildung der Amid I-Bande im Bereich von 1640–1610 cm⁻¹ oder 1700–1670 cm⁻¹ [172]. Bei Betrachtung der Spektren konnte diese Schulterbildung bei keiner der durchgeführten Analysen beobachtet werden, was auf das Fehlen von Aggregaten schließen lässt (Abbildung 17). Für das Allergoid der Charge 504 wurde eine minimale Abnahme der Absorption im Bereich von 1605–1650 cm⁻¹ beobachtet, die auf geringfügige Veränderungen der Allergoid-Struktur zurückzuführen sein könnte.

Tabelle 17 zeigt die berechneten Sekundärstrukturanteile für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Charge 504, 756 und der Referenz-1. Zusätzlich wurde die zweite Ableitung des FTIR-Spektrums der Referenz-1 im Bereich von 1710–1490 cm⁻¹ mit dem des extrahierten Allergoids verglichen und ein prozentualer Korrelationskoeffizient berechnet, der die Übereinstimmung der verglichenen Spektren widerspiegelt. Die zweite Ableitung führt zu

einer Verstärkung von Unterschieden in den Spektren und eignet sich daher besser für einen Vergleich als die unprozessierten Spektren.

Tabelle 17 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 504 und 756 und der Referenz-1 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-1. n = 1.

Probe	Referenz-1	504	756
Gehalt α -Helix (%)	27,7	25,5	27,9
Gehalt β -Faltblatt (%)	21,2	16,0	21,2
Korrelationskoeffizient mit Referenz-1 (%)	--	93,7	93,1

Mit Hilfe der Sekundärstrukturanalyse konnte für das Allergoid, das aus der Charge 756 extrahiert wurde, vergleichbare α -Helix- und β -Faltblattanteile zur Referenz-1 analysiert werden. Für die Charge 504 wurde eine geringfügige Abnahme der β -Faltblattanteile beobachtet, was auf mögliche Veränderungen der Proteinstruktur zurückgeführt wurde und mit den Beobachtungen aus dem Spektrenvergleich übereinstimmt (Abbildung 17). Für das extrahierte Allergoid beider Verum-Chargen wurde ein hoher Korrelationskoeffizient mit der Referenz-1 berechnet und spiegelt die insgesamt hohe Ähnlichkeit der Spektren im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande mit der Referenz-1 wider (Tabelle 17). Mit Hilfe der FTIR-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des extrahierten Allergoids nur geringfügig beeinflusst wurde und keine Aggregatbildung vorlag. Erneut wurde festgestellt, dass die Extrusion nur einen geringen Einfluss auf die Allergoid-Struktur hatte.

4.1.6.5. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

Eine Veränderung (Zunahme oder Abnahme) der IgG-basierten Aktivität im Vergleich zu den Referenzproben würde auf die Exposition oder Maskierung von IgG-Epitopen aufgrund struktureller Veränderungen des Allergoids hindeuten. Eine Abnahme der IgG-basierten Aktivität infolge der Extrusion könnte eine verminderte Wirksamkeit des Allergoids zur Folge haben.

Die Ergebnisse der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1 und Referenz-2 sind in Abbildung 18 dargestellt.

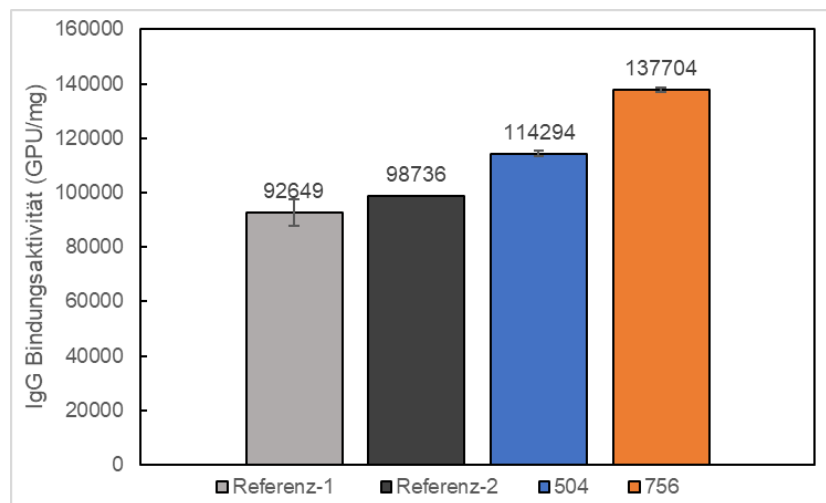


Abbildung 18 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 (n = 3) und 756 (n = 3) sowie der Referenz-1 (n = 3) und Referenz-2 (n = 1). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken).

In diesem Teil der Arbeit wies das extrahierte Allergoid der Chargen 504 und 756 eine erhöhte IgG-Bindungsaktivität im Vergleich zu den Referenzproben auf. Für das Allergoid der Charge 504 wurde ein geringerer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität im Vergleich zur Referenz-1 mit 23,4 % gemessen als für das extrahierte Allergoid der Charge 756 mit 48,6 %. Dieser Anstieg deutet in beiden Fällen auf strukturelle Veränderungen des Allergoids nach Extrusion hin, wodurch beispielweise die Exposition von IgG-Epitopen auf der Oberfläche dieser begünstigt wurde. Es ist jedoch zu beachten, dass ELISAs eine erhöhte methodenspezifische Variabilität aufweisen. In der Ph. Eur. werden daher für allergenhaltige Therapeutika bewusst Spezifikationsgrenzen von 50–150 % vorgegeben [173]. Wäre es infolge der Extrusion zu einer starken Degradation des Allergoids gekommen, wäre möglicherweise eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität detektiert worden. Der beobachtete Anstieg der IgG-Bindungsaktivität deutet eher auf eine partielle Strukturveränderung des Allergoids hin. Anhand der vergleichbaren Ergebnisse für die Referenzproben konnte gezeigt werden, dass die Extraktionsmethode keinen Einfluss auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids hatte.

4.1.6.6. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

Die Bestimmung der IgE-basierten Aktivität wurde als Methode zur Überprüfung der Beibehaltung der Allergoid-typischen reduzierten IgE-Bindungen eingesetzt, welche für die Vermeidung von IgE-vermittelten Nebenwirkungen bei der Therapie von entscheidender Bedeutung sind. Diese Methode wird auch in der Ph. Eur. und den Leitlinien der EMA als Freigabeuntersuchung nach der Herstellung von Allergoid-basierten Allergieprodukten

gefordert [125, 126]. Der Nachweis einer verminderten IgE-basierten Aktivität war daher ein kritischer Faktor bei der Entwicklung eines PLGA-basierten Allergoid-Implantats. Die Ergebnisse der Bestimmung der IgE-Bindungsaktivität des extrahierten Allergoids aus den Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1 und Referenz-2 sind in Abbildung 19 dargestellt.

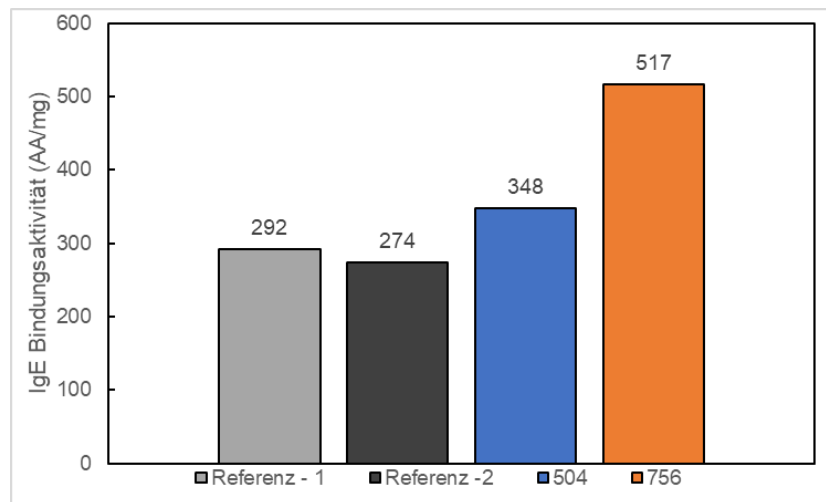


Abbildung 19 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504 und 756 sowie der Referenz-1 und Referenz-2. n = 1.

Bei allen Proben wurde, im Vergleich zu einem nativen Birken-Extrakt, eine allgemeine reduzierte IgE-Bindungsaktivität gemessen. Für das extrahierte Allergoid beider Verum-Chargen wurde jedoch ein prozentualer Anstieg der IgE-Bindungsaktivität von 19,2 % (Charge 504) und 77,1 % (Charge 756) im Vergleich zum Allergoid der Referenz-1 berechnet. Obwohl der Anstieg in beiden Fällen recht hoch erscheint und auf mögliche strukturelle Veränderungen durch die Extrusionsbedingungen zurückzuführen ist, blieb die IgE-Bindungsaktivität weiterhin deutlich unter der von nativen Allergenextrakten. Fiebig *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen an Allergoiden, dass diese eine um den Faktor 1000 geringere IgE-Bindungsaktivität aufweisen als die korrespondierenden nativen Allergenextrakte [111]. Es ist daher davon auszugehen, dass das extrahierte Allergoid nach der Extrusion noch im Sicherheitsprofil des Referenz-Allergoids lag. Ein Einfluss der Extraktionsmethode auf die IgE-Bindungsaktivität konnte ausgeschlossen werden.

4.1.6.7. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Bei der Analyse des extrahierten Allergoids aus den Chargen 504 und 756 konnte mit verschiedenen Methoden (SEC, DLS, native IEF, FTIR) eine gute Vergleichbarkeit mit den Referenzproben gezeigt werden. Trotz der potentiell proteinstabilisierenden Prozessbedingungen (Temperatur, Druck, Scherkraft) behielt das Allergoid nach Extrusion und Extraktion seine allgemeinen Allergoid-Charakteristika bei. Dies ist auf die erhöhte thermische Stabilität des Allergoids im Vergleich zu nativen Allergenextrakten zurückzuführen

[161]. Dennoch wurden bei der Bestimmung der IgG- und IgE-Bindungsaktivität Abweichungen von den Referenzproben gemessen, die auf Strukturveränderungen schließen lassen, aber sehr wahrscheinlich die therapeutische Wirkung und das Sicherheitsprofil nicht maßgeblich beeinflussen. Diese Unterschiede waren bei dem extrahierten Allergoid der Charge 504 geringer als bei dem der Charge 756 und könnten auf die milderen Prozessbedingungen (Temperatur) bei der Extrusion der Chargen auf Basis des Polymers RG 504 H zurückzuführen sein. Ein Einfluss der Extraktion auf die Allergoid-Stabilität konnte mit allen untersuchten Methoden durch die hohe Vergleichbarkeit zwischen den Referenzproben (Referenz-1 und Referenz-2) ausgeschlossen werden. Die Extraktion mittels Allergoid-Präzipitation kann daher als geeignetes Verfahren zur Herstellung einer Allergoid-haltigen Probenmatrix ohne Anwesenheit von Acetonitril oder PLGA dienen. Dies war von entscheidender Bedeutung, da das PLGA durch die Zugabe von VE-H₂O ausgefällt worden wäre, was bei der Extraktionsmethode 1 beobachtet wurde. Dadurch hätten diese höchstwahrscheinlich die Vielzahl der analytischen Methoden begrenzt.

4.1.7. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

In einem In-vitro-Versuchsaufbau wurde wöchentlich der freigesetzte Allergoid-Gehalt kumulativ auf die Gesamtmenge an Allergoid nach Implantat-Einwaage berechnet und der pH-Wert des Freisetzungsmediums bestimmt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und des pH-Werts für die Implantate der Verum-Chargen 504 und 756 sowie des pH-Werts für die Implantate der Placebo-Chargen 504Plac und 756Plac.

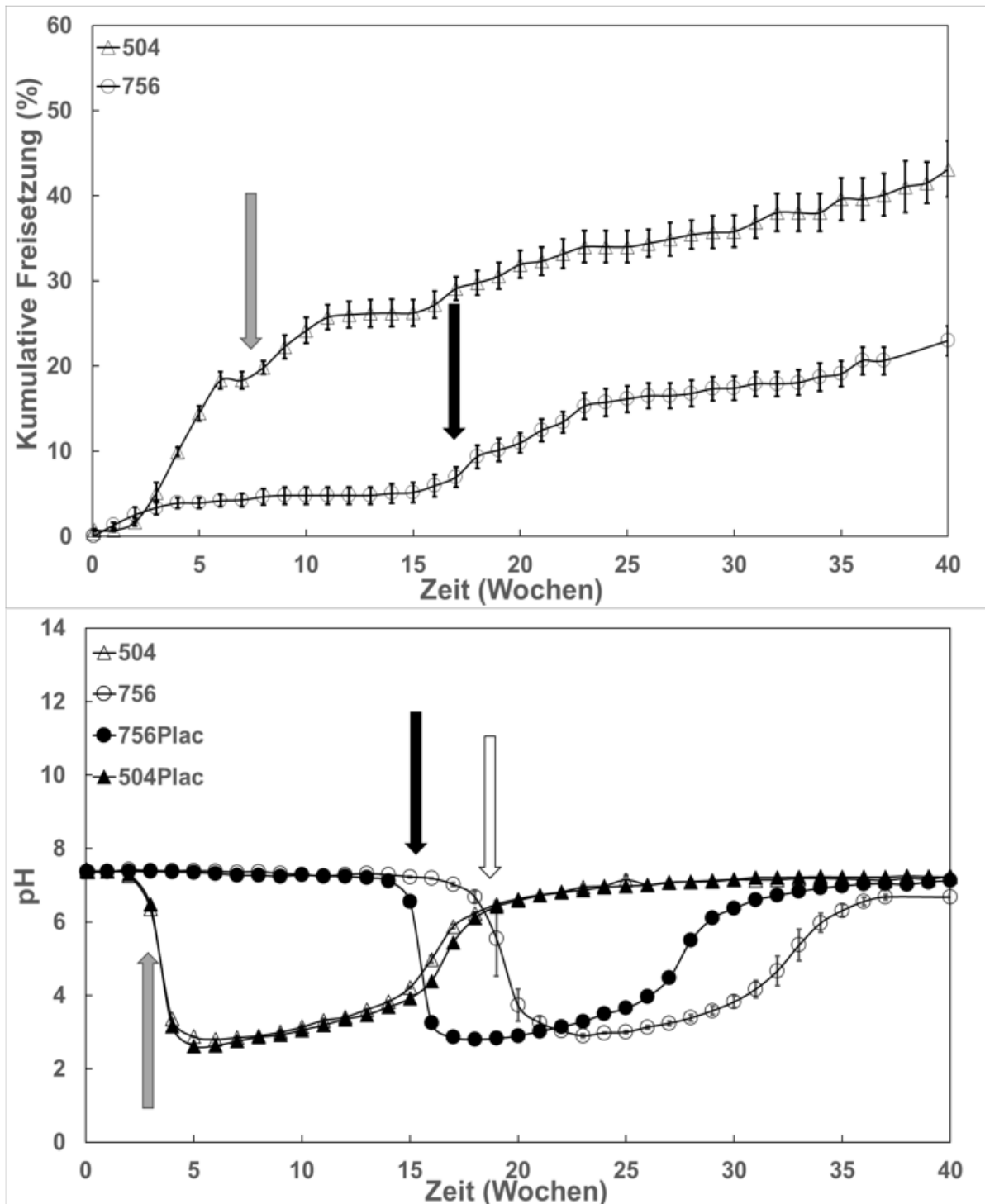


Abbildung 20 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Chargen 504 (n = 6) und 756 (n = 6) sowie 504Plac (n = 1) und 756Plac (n = 1). Besondere Ereignisse wie pH-Abfall durch Pfeile gekennzeichnet. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken).

Grundsätzlich zeigten die Proben beider Verum-Chargen eine kumulative Langzeitfreisetzung des Allergoids über einen Zeitraum von 40 Wochen mit geringen Standardabweichungen über den Freisetzungsverlauf (Abbildung 20, oben). Für die Proben der Charge 504 wurde der Beginn eines starken pH-Abfalls in Woche 3 beobachtet (Abbildung 20, unten, grauer Pfeil), der in Woche 6 bei einem pH-Wert von 2,8 endete. Der pH-Verlauf dieser Charge war identisch mit dem der Charge 504Plac. Ein pH-Abfall auf pH 2,9 wurde für die Proben der Charge 756 in Woche 23 festgestellt, beginnend um Woche 19 (Abbildung 20, unten, weißer Pfeil). Für die Charge 756Plac wurde ein früherer pH-Abfall (Woche 15, Abbildung 20, unten, schwarzer Pfeil) als für die Charge 756 gemessen. Dies könnte auf eine etwas intensivere Autokatalyse des Erosionsprozesses hindeuten. Durch die Einbettung des Allergoids in die Polymermatrix wird eine Porenbildung begünstigt, die den Abtransport von PLGA-Abbauprodukten in das Freisetzungsmilieu und einen Pufferaustausch fördert. Dies könnte den autokatalytischen Effekt der Polymerdegradation reduziert haben, was den späteren pH-Abfall bei den Proben der Charge 756 erklären würde. Für die Chargen auf Basis des Polymers RG 504 H wurde dieser Effekt nicht beobachtet, was möglicherweise auf dessen höherer Hydrophilie basiert, wodurch der porenbildende-Effekt auf eine Verzögerung der Polymererosion geringer war bzw. gänzlich ausblieb.

Die Proben der Charge 504 zeigten nach einer *lag*-Phase (Phase ohne oder mit geringer Freisetzung) von einer Woche einen deutlichen Anstieg der Freisetzungsrates. Zwischen den Wochen 2–6 wurde mit einer Freisetzungsrates von 3,5 % ($\pm 1,4$ %) insgesamt 13,7 % des Allergoids kumulativ freigesetzt. Danach sank diese Freisetzungsrates (Abbildung 20, oben, grauer Pfeil) unter 2 % und wurde lediglich in Woche 9 mit 2,4 % überschritten. Nach 40 Wochen wurde eine kumulative Gesamtfreisetzung von 43,1 % ($\pm 3,3$ %) ermittelt. Die Proben der Charge 756 zeigten eine längere *lag*-Phase von insgesamt 15 Wochen in der insgesamt nur 5,2 % kumulativ freigesetzt wurden. Ähnlich zu der Charge 504 wurde auch bei der Charge 756 ein Anstieg der wöchentlichen Freisetzung (Abbildung 20, oben, schwarzer Pfeil) erst mit dem pH-Abfall detektiert. Mit Ausnahme der Woche 18 wurden über den Zeitraum von 40 Wochen keine höheren wöchentlichen Freisetzungsrates von mehr als 2 % ermittelt. Zwischen den Wochen 16–23 wurden insgesamt 10,2 % kumulativ freigesetzt und eine kumulative Freisetzung nach 40 Wochen von 23,0 % ($\pm 1,8$ %) ermittelt. Beide Chargen zeigten eine unvollständige Freisetzung des Allergoids über einen Zeitraum von 40 Wochen, was verschiedene Ursachen haben kann. Möglicherweise könnte freigesetzten Allergoid abgebaut oder aggregiert sein, wodurch dieses nicht mehr durch den BCA-Assay erfasst werden konnte. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Allergoid schwerlösliche Verbindungen mit PLGA-Erosionsprodukten eingegangen ist (siehe unten).

Um die Allergoid-Stabilität genauer beurteilen zu können, wurde zu bestimmten Zeitpunkten (nach Woche 4, -8 und -12) von jeweils zwei Freisetzungsprouben die IgG-Bindungsaktivität gemessen und die relative Bindungsaktivität zur IgG-Bindungsaktivität des extrahierten Allergoid (Ausgangsaktivität, Kapitel 4.1.6.5) der jeweiligen Charge berechnet. Dabei wurde für die Proben der Chargen 504 und 756 in Woche 4 eine relative Bindungsaktivität von 4,3 % und 11,0 % gemessen. In Woche 8 wurde nur noch für die Proben der Charge 756 eine relative Bindungsaktivität mit 2 % gemessen. In Woche 12 wurden für beide Chargen keine IgG-Bindungsaktivitäten mehr festgestellt. Für die Proben der Charge 504 konnte somit ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Allergoid-Stabilität und dem niedrigen pH-Wert in der frühen Phase der In-vitro Studie gezeigt werden. Für die Proben der Charge 756 konnte eine etwas höhere, dennoch im Vergleich zur Ausgangsaktivität ebenfalls stark reduzierte IgG-Bindungsaktivität gemessen werden.

Die unterschiedlichen pH-Verläufe zwischen den Chargen 504/504Plac und 756/756Plac können auf die unterschiedlichen Polymereigenschaften der jeweiligen Chargen zurückgeführt werden [174]. Durch den erhöhten Polyglycolid-Anteil und der Carbonsäure-Endgruppe des Polymers RG 504 H (Charge 504, 504Plac) zeigte dieses Polymer eine deutlich frühere Polymererosion, gemessen am pH-Wert, im Vergleich zum Polymer RG 756 S (Charge 756, 756Plac). Weiterhin fördern Carbonsäuren die Hydrophilie des Polymers, was zu einer erhöhten Wasseraufnahme und damit zu einer verstärkten Hydrolyse und Porenbildung der Polymermatrix führt [140]. Dies würde die erhöhte Freisetzungsrare in den ersten Wochen der In-vitro-Studie der Charge 504 erklären. Bei den Proben der Chargen 756 und 756Plac lässt sich der spätere pH-Abfall und der damit verbundene Polymerabbau durch die verringerte Hydrophilie des Polymers RG 756 S aufgrund des höheren Polylactid-Anteils und der Ester-Endgruppe erklären [140, 174]. Dies könnte auch die Ursache für die verlängerte *lag*-Phase der Charge 756 sein, da die Freisetzung maßgeblich von der Wasserpenetration der Polymermatrix abhängig ist [175]. Bei dieser Charge wurde ein messbarer Anstieg der Freisetzungsrare erst mit dem Beginn der maximalen Polymererosion (pH-Abfall) festgestellt.

Nach der In-vitro-Studie wurden in allen Proben beider Verum-Chargen Restmengen an Implantaten identifiziert. Diese Restmengen wurden gefriergetrocknet, gewogen und als Prozentsatz der Einwaage der Implantate berechnet. Für die Proben der Chargen 504 und 756 wurde eine prozentuale Restmenge von 3,6 % ($\pm 1,5$ %) und 6,0 % ($\pm 0,4$ %) kalkuliert. Die Restmengen waren in Acetonitril unlöslich und könnten durch kovalente Bindung zwischen aggregiertem Allergoid und PLGA-Reaktionsprodukten entstanden sein. Bestärkt wird diese Theorie durch die In-vitro-Studie der Placebo-Chargen. Placebo-Implantate auf Basis der Polymere RG 504 H und RG 756 S zeigten über 40 Wochen eine vollständige Auflösung im Freisetzungsmidium. Ghalanbor *et al.* konnten in ihren Untersuchungen an

PLGA-basierten Implantaten die Bildung von Thioesterbindungen zwischen aggregierten Proteinen und PLGA-Reaktionsprodukten als mögliche Ursache für schwer lösliche Rückstände in Freisetzungsuntersuchungen in-vitro identifizieren [176].

Verschiedene Mechanismen könnten die Allergoid-Stabilität während der Freisetzung negativ beeinflusst haben, was zur Aggregation und damit zur unvollständigen Freisetzung des Allergoids führte. Eine der Hauptursachen für die unvollständige Freisetzung von Proteinen aus PLGA-basierten Trägersystemen ist die säureinduzierte Proteinaggregation durch die Ansäuerung innerhalb der Polymermatrix durch degradierte lösliche PLGA-Oligomere und -Monomere (Milch- und Glykolsäure) [154, 176, 177]. Dabei können lokale pH-Werte (Mikro-pH) von pH 2 auftreten [178]. Im Falle der durchgeführten In-vitro-Studie der Chargen 504 und 756 könnte die kumulierte Menge an sauren Abbauprodukten innerhalb der Polymermatrix die Freisetzung durch säureinduzierte Degradation negativ beeinflusst haben [179]. Zusätzlich könnte die erhöhte Mobilität des Allergoids innerhalb der Polymermatrix nach Kontakt mit dem Freisetzungsmedium die Bildung nicht-kovalenter Aggregate begünstigt haben [154]. Bei den Proben der Charge 504 führte der frühzeitige Abbau des Polymergerüsts zu einem ausgeprägten Porensystem im Implantat, wodurch das gelöste Allergoid die innere Matrix des Implantats leichter verlassen konnte und der Kontakt zwischen dem gelöstem Allergoid und den PLGA-Abbauprodukten vermindert wurde [176]. Darüber hinaus könnte die erhöhte Hydrophilie der Polymermatrix den Abfall des lokal beschränkten pH-Werts innerhalb der Polymermatrix durch einen erleichterten Abtransport saurer Abbauprodukte vermindert haben [180]. Dies wäre eine Erklärung für die zwar verminderte, aber bis zur 40. Woche anhaltende wöchentliche Freisetzungsrates. Bei den Proben der Charge 756 begünstigte die lange *lag*-Phase die Bildung von sauren Mikro-pH-Werten innerhalb der Polymermatrix. Infolgedessen könnte es zu einer verstärkten Wechselwirkung von PLGA-Abbauprodukten und gelöstem Allergoid innerhalb der Polymermatrix gekommen sein. Dies würde die verminderte Gesamtfreisetzung und die erhöhte Restmenge nach 40 Wochen erklären.

4.1.8. Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel konnte die erfolgreiche Entwicklung eines Extrusionsprozesses für die Polymere RG 504 H und RG 756 S mit einer Allergoid-Beladung von 10 % gezeigt werden. Der Herstellungsprozess führte zu morphologisch homogenen Implantaten, die einen Allergoid-Anteil im erwarteten Soll-Bereich zeigten. Zusätzlich wurden auch in der Allergoid-Analytik und der In-vitro-Freisetzung keine großen Abweichungen innerhalb der untersuchten Verum-Chargen festgestellt. Die Allergoid-Stabilität wurde nur geringfügig von den Prozessbedingungen der Extrusion beeinflusst, was auf eine erfolgreiche Einstellung der Prozessparameter hinweist. Das Allergoid zeigte dabei eine verhältnismäßig hohe Stabilität gegenüber den maximalen Prozesstemperaturen von 88–92 °C. Durch den Einsatz eines

proteinstabilisierenden Agens könnte das Allergoid zusätzlich vor Destabilisierungen während der Extrusion geschützt werden. In der In-vitro-Studie konnte für beide Verum-Chargen eine langfristige, wenn auch unvollständige Freisetzung des Allergoids gezeigt werden. In beiden Fällen waren die wöchentlichen Freisetzungsraten teilweise sehr gering und entsprachen nicht dem erwarteten Freisetzungsprofil der jeweiligen Polymere [24]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen einer säureinduzierten Degradation des Allergoids mit unvollständiger Freisetzung und abnehmender IgG-Bindungsaktivität, sowie der Bildung schwerlöslicher Polymer-Allergoid-Reste nach 40 Wochen festgestellt. Die Problematik der unvollständigen Freisetzung von Proteinen aus PLGA-basierten Implantaten aufgrund säurebedingter Proteindegradation wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [176, 180, 181]. Es ist daher der Einsatz von Hilfsstoffen erforderlich, um das Allergoid während der Freisetzung vor unerwünschten Degradierungsprozessen zu schützen. Für Chargen der Polymere RG 756 S wäre die Zugabe von Porenöffnern eine Möglichkeit, um eine erhöhte Freisetzung noch vor dem wesentlichen Polymerabbau zu ermöglichen. Für Chargen der Polymere RG 504 H wäre die Verwendung von puffernden Substanzen eine Möglichkeit, dem frühen pH-Abfall und der damit einsetzenden Polymererosion entgegenzuwirken.

4.2. Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate

4.2.1. Einleitung und Herstellungsprozess

Ziel dieses Entwicklungsabschnittes war es, die Optimierung der Allergoid-Stabilität während der Extrusion und der In-vitro-Freisetzung durch den Zusatz von Trehalose als proteinstabilisierendes Agens zu evaluieren. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit eine erhöhte Feststoffbeladung einen Einfluss auf die In-vitro-Freisetzung durch Porenbildung in der Polymermatrix hat. Das Allergoid wurde vor der Extrusion mit Trehalose in VE-H₂O gelöst und lyophilisiert (Kapitel 3.2.1.1.). Dies sollte einen möglichst direkten Kontakt zwischen dem Allergoid und den Trehalose-Molekülen ermöglichen.

In einem Vorversuch wurde die prozentuale Wiederfindung des Allergoids nach Lyophilisierung bestimmt. Dabei wurde eine prozentuale Wiederfindung von 103,5 % ($\pm 1,5$ %, n = 6) ermittelt. Um die Stabilität des Allergoids im lyophilisierten Zustand mit und ohne Trehalose-Zusatz gegenüber Temperaturstress zu untersuchen, wurden Proben beider Lyophilisate bei 80 °C für 1 h gestresst und nach Rücklösen in Wasser mit ungestressten Proben beider Lyophilisate mittels SEC untersucht. Damit sollte zum einen untersucht werden, ob die Lyophilisierung zu einer Destabilisierung des Allergoids führte und zum anderen, ob Trehalose einen protektiven Effekt auf das Allergoid unter Temperaturstress besitzt.

In Abbildung 21 sind die Chromatogramme der jeweils ungestressten und gestressten Birken-Allergoid-Trehalose-Probe und Birken-Allergoid-Probe dargestellt.

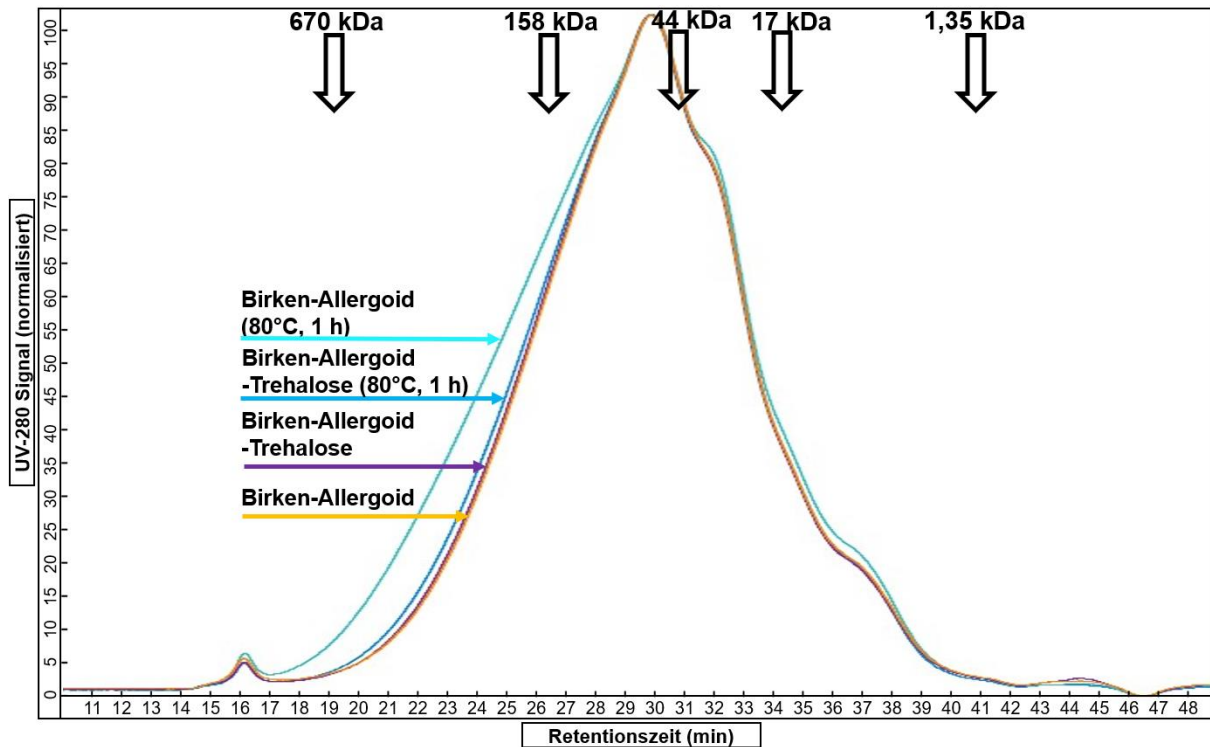


Abbildung 21 SEC-Chromatogramm der ungestressten Birken-Allergoid-Probe und der ungestressten Birken-Allergoid-Trehalose-Probe sowie der gestressten Birken-Allergoid-Probe (80 °C, 1 h) und gestressten Birken-Allergoid-Trehalose-Probe (80 °C, 1 h) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards. n = 1

Der Vergleich der Chromatogramme zeigte, dass die Lyophilisierung des Allergoids mit Trehalose keinen negativen Einfluss auf dessen Stabilität hatte. Die Chromatogramme der ungestressten Birken-Allergoid-Trehalose-Probe und der ungestressten Birken-Allergoid-Probe waren identisch. Darüber hinaus konnte eine protektive Wirkung der Trehalose auf das Allergoid im festen Zustand anhand des Chromatogramms der gestressten Birken-Allergoid-Trehalose-Probe beobachtet werden. Das Chromatogramm dieser Probe unterschied sich nur geringfügig von den ungestressten Referenzproben, während das Chromatogramm der gestressten Birken-Allergoid-Probe die Bildung schneller eluierender hochmolekularer Proteinspezies im Bereich der Retentionszeiten 18–29 min zeigte. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf eine mögliche Stabilisierung des Allergoids durch Trehalose während der Extrusion.

Um diese Hypothese zu bestätigen und gleichzeitig den Einfluss von Trehalose als Porenöffner und Proteindestabilisator während der In-vitro-Freisetzung zu untersuchen, wurden für die Polymere RG 504 H und RG 756 S jeweils eine Implantat-Charge mit dem Birken-

Allergoid-Trehalose-Lyophilisat hergestellt. Tabelle 18 zeigt die Prozessparameter der Extrusion für die produzierten Chargen 504Tr und 756Tr.

Tabelle 18 SME-Prozessparameter für die Chargen 504Tr und 756Tr. (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute).

Charge	504Tr	756Tr
Zusammensetzung		
RG 756 S	--	X
RG 504 H	X	--
10 % (m/m) Birken-Allergoid	X	X
5 % (m/m) Trehalose	X	X
Allergoid-Charge	W8003670	W8003670
SME-Prozessparameter		
Chargengröße (g)	5	5
Zuführrate (g/min)	0,24	0,20
Prozesszeit (min)	45	54
Maximaldruck (bar)	80	Nicht bestimmt
Ausbeute (%)	25,2	31,9

Die Herstellung der Implantat-Chargen 504Tr und 756Tr verlief in beiden Fällen erfolgreich. Die Zuführrate und die Prozesszeit war für die Charge 504Tr vergleichbar mit denen der Charge 504 (Tabelle 13, Kapitel 4.1.4). Allerdings war der Maximaldruck der Extruderdüse bei der Charge 504Tr um 10 bar höher als bei der Charge 504. Zusätzlich wurde weniger Material an den Mischelementen identifiziert, wodurch eine höhere Ausbeute mit 25,2 % gemessen wurde (Tabelle 18). Dies könnte durch die höhere Gesamtbeladung entstanden sein. Bei der Charge 756Tr kam es während der Extrusion zu einem Ausfall des Drucksensors. Daher wurde mit einer niedrigeren Drehzahl (30 rpm) und einer leicht erhöhten Düsentemperatur (95 °C) gearbeitet, um den maximalen Düsendruck der Extruderdüse nicht zu überschreiten. Dadurch verlängerte sich die Prozesszeit um 16 min im Vergleich zur Charge 756 (Tabelle 13, Kapitel 4.1.4). Die Ausbeute der Chargen 756Tr war vergleichbar mit der Charge 756 und deutet unter Berücksichtigung des Materialverlustes beim Befüllen der Extruderdüse darauf hin, dass eine optimale Förderung des Extrusionsmaterials durch den Extruderraum erreicht wurde.

4.2.2. Morphologische Charakterisierung der Implantate

Die morphologische Charakterisierung der Implantate und die Bestimmung der Allergoid-Wiederfindung nach Extrusion sollte die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.5 verifizieren und den Einfluss der höheren Gesamtbeladung auf die morphologischen Charakteristika der Implantate untersuchen. Dabei wurden stets Implantate aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats verwendet. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser der Implantate sowie die Berechnung der Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr.

Tabelle 19 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 504Tr und 756Tr. Angabe von MW \pm SD.

Parameter	504Tr	756Tr
Masse (mg) (n = 10)	26,5 (\pm 0,9)	24,9 (\pm 0,7)
Länge (mm) (n = 10)	5,1 (\pm 0,2)	5,1 (\pm 0,1)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,2 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,1)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	103,5 (\pm 3,3)	99,6 (\pm 2,4)

Die Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate ergab für die Chargen 504Tr und 756Tr vergleichbare Ergebnisse wie für die Chargen 504 und 756 (Kapitel 4.1.5, Tabelle 14). Für die Charge 504Tr wurde eine Zunahme des Durchmessers von 10 % nach Düsenaustritt beobachtet, was auf den bereits beschriebenen Barus-Effekt zurückzuführen ist. Die Berechnung der Allergoid-Wiederfindung aus einzelnen Implantaten ergab eine vollständige Rückgewinnung des Allergoids für beide Chargen (Tabelle 19). Eine Beladung des Allergoids im erwarteten Bereich wurde durch die hohe Allergoid-Wiederfindung aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats mit geringen Standardabweichungen somit bestätigt.

Um die Mantelflächenbeschaffenheit der Implantate der Chargen 504Tr und 756Tr zu bewerten, wurden diese mittels REM analysiert (Abbildung 22).

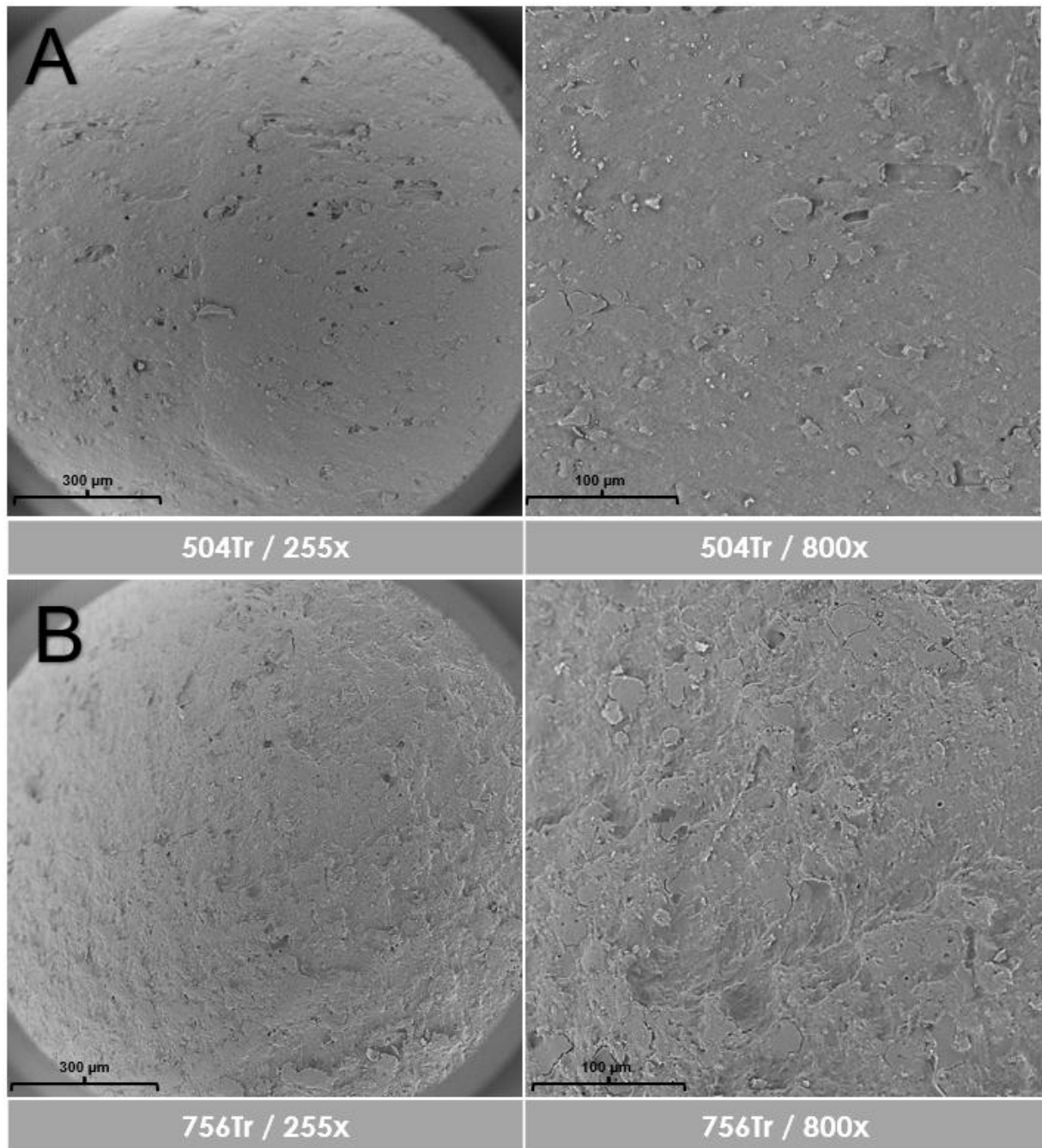


Abbildung 22 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 504Tr (A) und 756Tr (B).

Beim Vergleich der beiden Chargen konnte eine geringfügig glattere Mantelfläche für Implantate des Polymers RG 504 H (504Tr) im Vergleich zu den Implantaten des Polymers RG 756 S (756Tr) festgestellt werden. Dieser Unterschied konnte, wie bereits in Kapitel 4.1.5 beschrieben, auf eine stärkere Erweichung des Polymers RG 504 H zurückgeführt werden. Durch die Erhöhung der Düsentemperatur auf 95 °C während der Extrusion der Charge 756Tr wurden für Implantate dieser Charge eine glattere Mantelfläche als bei der Charge 756

erzeugt (Abbildung 14, Kapitel 4.1.5). Für beide Chargen (504Tr und 756Tr) konnten partikuläre Strukturen bei 800-facher Vergrößerung nachgewiesen werden (Abbildung 22). Bei der Beurteilung der Makroporosität wurden bei beiden untersuchten Chargen keine größeren Hohlräume oder stark unregelmäßige Strukturen festgestellt, sodass von einem gleichmäßig geformten Implantat ausgegangen werden kann. Eine zusätzliche Veränderung der Implantat-Mantelfläche durch die Gesamtbeladung mit Trehalose konnte nicht festgestellt werden. Dies könnte auf eine gute Verarbeitung von Trehalose und Allergoid hindeuten.

Für eine zusätzliche Bewertung der Implantat-Morphologie, wurde die innere Beschaffenheit von Implantat-Querschnitten der Chargen 504Tr und 756Tr mittels REM-Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

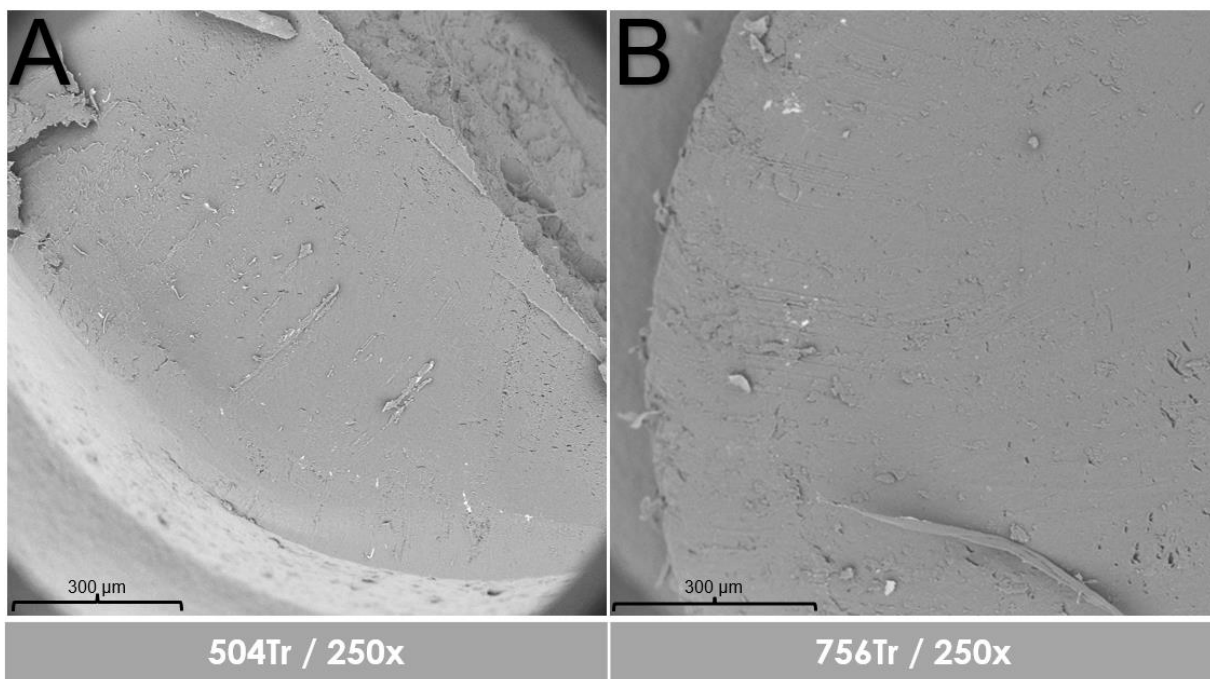


Abbildung 23 REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte von Proben der Chargen 504Tr und 756Tr.

Die REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte zeigten für die Chargen 504Tr und 756Tr eine hohe Homogenität hinsichtlich einer vergleichbar geringen inneren Porosität und dem Fehlen größerer Hohlräume oder unregelmäßig geformter Strukturen.

Anhand der morphologischen Charakterisierung der Implantate konnte die erfolgreiche Herstellung von Birken-Allergoid beladenen PLGA-Implantaten mit einer zusätzlichen Beladung von 5 % Trehalose gezeigt werden. Trotz der höheren Gesamtbeladung von 15 % war die Herstellung mit den gegebenen Prozesseinstellungen erfolgreich.

4.2.3. Allergoid-Charakterisierung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung beschrieben, die an dem Allergoid aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr durchgeführt wurde. Dabei sollte die Hypothese überprüft werden, dass Trehalose während der Extrusion eine protektive Wirkung auf das Allergoid ausübt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Extraktionsmethode 2 keinen Einfluss auf die Allergoid-Stabilität hat (Kapitel 4.1.6), wird auf die Darstellung von Referenz-2 in diesem Kapitel verzichtet. Ein Einfluss der Lyophilisierung auf die Allergoid-Stabilität konnte bisher nur durch die SEC-Analyse im Vorversuch ausgeschlossen werden. Diese Hypothese sollte durch die Analyse des frisch gelösten Birken-Allergoid-Trehalose-Lyophilisats (Referenz-3) verifiziert werden.

4.2.3.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

Mit Hilfe der DLS-Analytik wurde der hydrodynamische Radius (R_h) des Allergoids vor und nach Extrusion bestimmt und zusätzlich der Einfluss der Lyophilisierung mit Trehalose auf die hydrodynamische Größe des Allergoids überprüft (Tabelle 20).

Tabelle 20 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr (n = 6) und 756Tr (n = 6) sowie der Referenz-1 (n = 3) und Referenz-3 (n = 6). Darstellung des mittleren R_h -Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW \pm SD.

Probe	Referenz-1	Referenz-3	504Tr	756Tr
Mittlerer R_h -Wert (nm)	2,3 (\pm 0,5)	2,3 (\pm 0,4)	1,7 (\pm 0,3)	2,0 (\pm 0,3)
Prozentualer Massenanteil (%)	94,3 (\pm 4,7)	94,7 (\pm 2,6)	95,4 (\pm 3,8)	99,6 (\pm 2,6)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	99,9 (\pm 0,2)	99,9 (\pm 0,3)	99,9 (\pm 0,5)	99,9 (\pm 0,2)

Einen Einfluss auf den R_h -Wert durch die Lyophilisierung konnte aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse der Referenzproben ausgeschlossen werden. Für die Proben der Chargen 504Tr und 756Tr konnten ebenfalls vergleichbare Ergebnisse zu den Referenzproben gemessen werden. Die hierbei gemessenen niedrigen R_h -Werte mit entsprechend hohen prozentualen Massen- und numerischen Anteilen deuten auf das Fehlen größerer Aggregate hin, was bereits in Kapitel 4.1.6.1 für die Proben der Chargen 504 und 756 gezeigt werden konnte.

4.2.3.2. Bestimmung der molekularen Masse und R_h -Wert mittels SEC-Analyse

Mit der SEC-Analyse wurde untersucht, ob die im Vorversuch aufgestellte Hypothese einer besseren Temperaturstabilisierung des Allergoids durch Trehalose bestätigt werden konnte.

In Abbildung 24 sind die Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3 dargestellt.

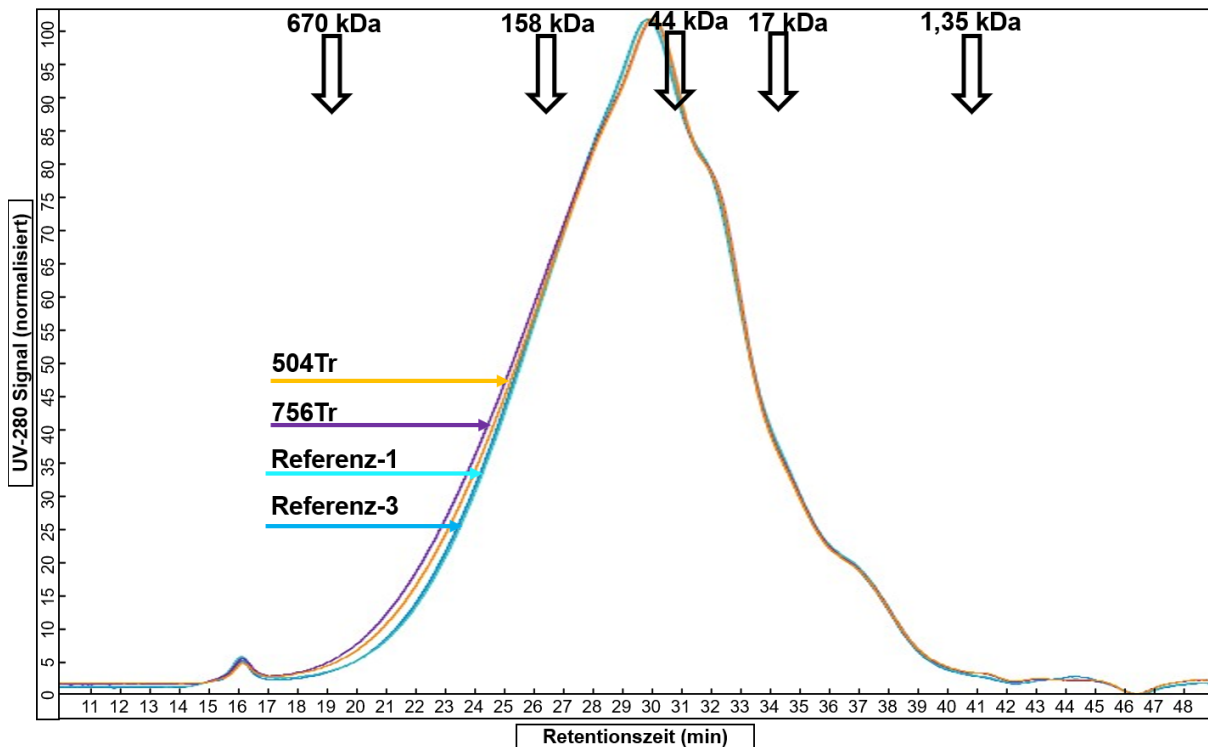


Abbildung 24 SEC-Chromatogramm des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der Chromatogramme des extrahierten Allergoids der Chargen 504Tr und 756Tr mit den Referenzproben konnten sehr ähnliche Elutionsprofile festgestellt werden. Diese waren deutlich vergleichbarer mit den Referenzproben als die der Chargen 504 und 756 ohne Trehalose (Kapitel 4.1.6.2, Abbildung 15). Damit konnte die Hypothese der Allergoid-Stabilisierung durch Trehalose während der Extrusion bestätigt werden. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur eine Probe pro Charge exemplarisch in Abbildung 24 dargestellt und die restlichen Chromatogramme dem Anhang beigefügt (Kapitel 8.2, Abbildung 75 und Abbildung 76).

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3 dargestellt.

Tabelle 21 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr (n = 6) und 756Tr (n = 6) sowie der Referenz-1 (n = 3) und Referenz-3 (n = 3). Angabe von MW \pm SD.

Probe	Referenz-1	Referenz-3	504Tr	756Tr
Molekulare Masse (kDa)	46,0 (\pm 0,3)	47,7 (\pm 0,9)	46,4 (\pm 0,2)	46,3 (\pm 0,2)
R_h -Wert (nm)	3,0 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)	3,0 (\pm 0,0)	3,0 (\pm 0,0)

Die Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts ergab für alle Proben vergleichbare Ergebnisse. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die hydrodynamische Größe des Allergoids unter den Prozessbedingungen erhalten blieb. Mit dieser Methode konnten die Ergebnisse der DLS-Analytik unterstützt werden.

4.2.3.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels native IEF

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der IEF-Analyse für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenzproben dargestellt.

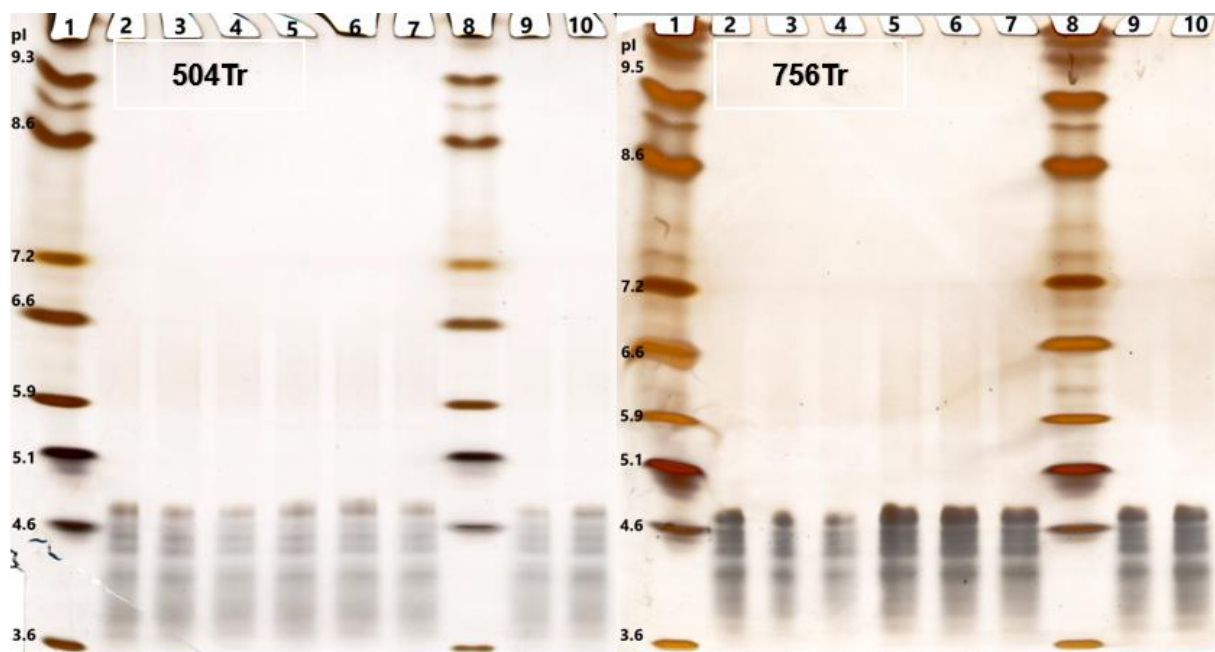


Abbildung 25 IEF-Gele, Proteindetektion mittels Silberfärbung. Links: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 504Tr (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-1 (Spur 9, n = 1), Referenz-3 (Spur 10, n = 1) und dem Proteinmarker (Spur 1 und 8). Rechts: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 756Tr (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-1 (Spur 9, n = 1), Referenz-3 (Spur 10, n = 1) und dem Proteinmarker (Spur 1 und 8).

In diesem Teil der Arbeit zeigte das aus den Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr extrahierte Allergoid das gleiche IEF-Bandenmuster der Referenz-1 und Referenz-3 mit Banden im Bereich von pI 3,6–5,1. Durch die IEF-Analyse konnte für beide Chargen gezeigt werden, dass die Oberflächenladung des Allergoids durch die Extrusion nicht verändert wurde. Zusätzlich konnte durch die Vergleichbarkeit der Referenzproben belegt werden, dass die Lyophilisierung mit Trehalose keinen Einfluss auf die Allergoid-Struktur hatte.

4.2.3.4. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Abbildung 26 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1.

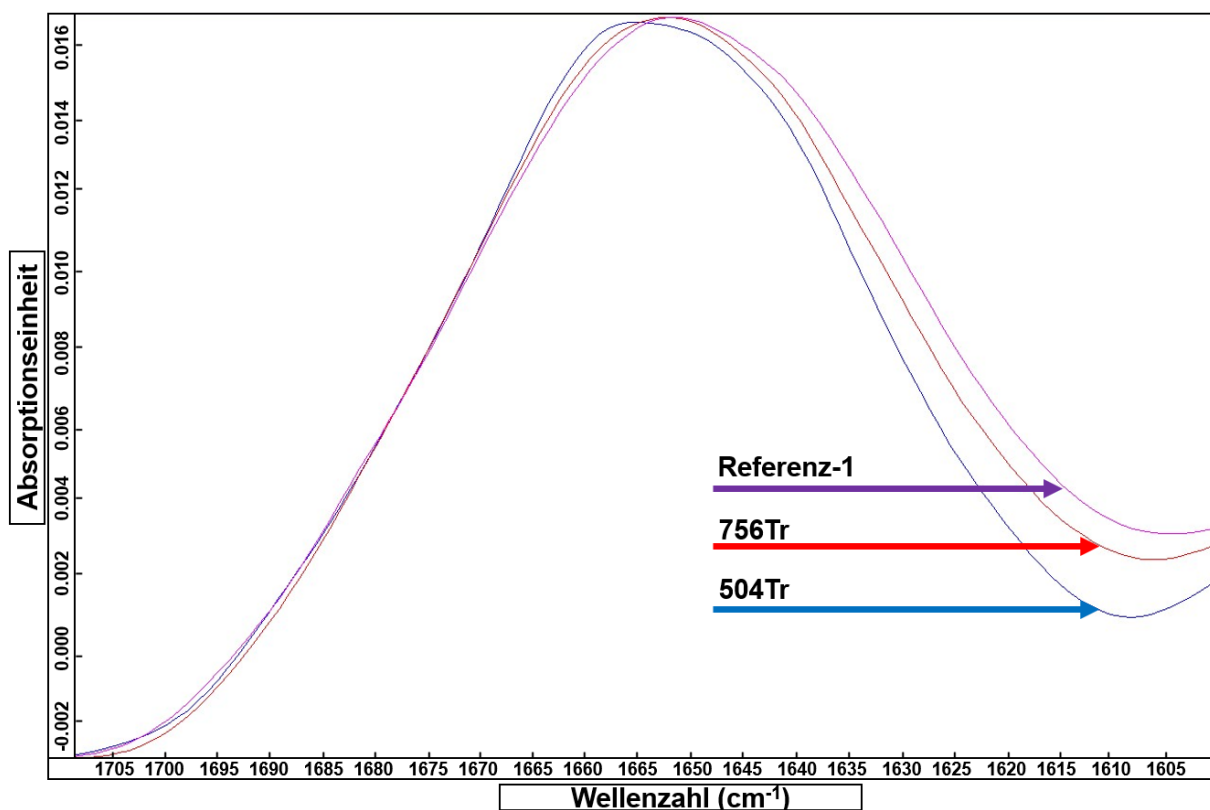


Abbildung 26 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1. $n = 1$.

Bei genauerer Betrachtung der Amid I-Bande der gemessenen Proben konnte keine Schulterbildung im Bereich von $1640\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$ und $1700\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ detektiert werden, was auf das Fehlen von β -Aggregation hinweist. Für das Allergoid der Charge 504Tr wurde ein minimaler Absorptionsabfall im Bereich von $1650\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$ beobachtet, der auf geringfügige Veränderungen in der Proteinstruktur zurückgeführt wurde.

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile und des Korrelationskoeffizienten mit der Referenz-1 dargestellt.

Tabelle 22 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr und der Referenz-1 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-1. n = 1.

Probe	Referenz-1	504Tr	756Tr
Gehalt α -Helix (%)	27,7	24,6	26,5
Gehalt β -Faltblatt (%)	21,2	16,9	18,1
Korrelationskoeffizient mit Referenz-1 (%)	--	91,0	95,0

Mit der FTIR-Analyse konnten für alle Proben vergleichbare Sekundärstrukturanteile berechnet werden. Die dabei festgestellten Unterschiede der Chargen 504Tr und 756Tr mit der Referenz-1, hinsichtlich einer Abnahme der β -Faltblattstrukturen, weisen auf nur geringfügige strukturelle Veränderungen des Allergoids hin. Darüber hinaus wurde für das Allergoid aus beiden Chargen eine hohe Übereinstimmung der Spektren im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande mit der Referenz-1 berechnet. Es wurde gezeigt, dass die Extrusion nur einen geringfügigen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Allergoids hatte. Auch die Bildung von kolloidalen Aggregaten konnte für alle untersuchten Proben ausgeschlossen werden. Ein erhöhter Erhalt der Sekundärstrukturanteile des Allergoids durch Trehalose konnte mit dieser Methode im Vergleich zu den Ergebnissen der Chargen 504 und 756 jedoch nicht nachgewiesen werden (Kapitel 4.1.6.4, Tabelle 17).

4.2.3.5. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

In Kapitel 4.1.6 wurden bei den Bestimmungen der IgG- und IgE-Bindungsaktivität für das Allergoid der Verum-Chargen deutliche Unterschiede zu den Referenzproben festgestellt. Diese Methoden waren daher für die Bewertung der Trehalose als Allergoid-Stabilisator von besonderem Interesse.

In Abbildung 27 sind die Messungen der IgG-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3 dargestellt.

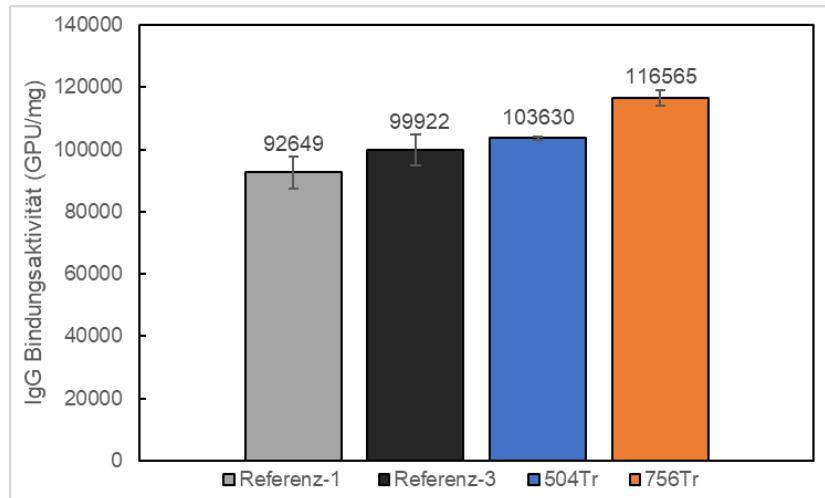


Abbildung 27 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Das extrahierte Allergoid der Chargen 504Tr und 756Tr zeigte im Vergleich zu den gemessenen Referenzproben eine erhöhte IgG-Bindungsaktivität. Die Erhöhung war bei der Charge des Polymers RG 756 S (756Tr) höher als bei der Charge des Polymers RG 504 H (504Tr), was auf die niedrigeren Prozesstemperaturen während der Extrusion der Charge 504Tr zurückgeführt wurde. Für das extrahierte Allergoid der Charge 504Tr wurde ein prozentualer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 11,9 % im Vergleich zur Referenz-1 errechnet. Dieser Anstieg war 11,5 % geringer als bei dem extrahierten Allergoid der Charge 504 (Kapitel 4.1.6.5). Für das extrahierte Allergoid der Charge 756Tr wurde ein prozentualer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 25,8 % im Vergleich zur Referenz-1 gemessen, der um 22,8 % geringer war als bei dem extrahierten Allergoid der Charge 756 (Kapitel 4.1.6.5). Für beide Chargen dieses Kapitels konnte anhand der IgG-Bindungsaktivität ein stabilisierender Effekt auf das Allergoid durch Trehalose während der Extrusion nachgewiesen werden. Die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids blieb dabei grundsätzlich erhalten, mit nur geringfügigen Veränderungen hinsichtlich der Exposition von IgG-Epitopen. Beim Vergleich der Referenzproben wurde ein prozentualer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 7,9 % für Referenz-3 im Vergleich zu Referenz-1 berechnet. Unter Berücksichtigung der methodenspezifischen Variabilität kann ein Einfluss der Lyophilisierung auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids ausgeschlossen werden.

4.2.3.6. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

Die Ergebnisse der Messung der IgE-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3 sind in Abbildung 28 dargestellt.

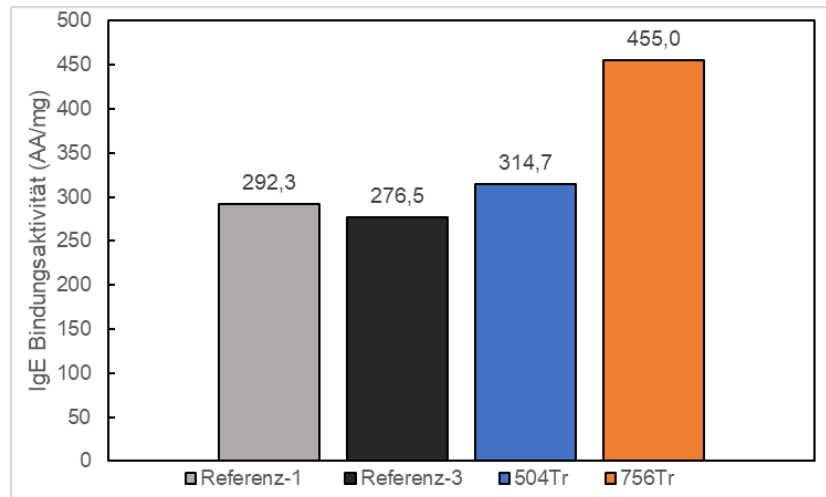


Abbildung 28 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504Tr und 756Tr sowie der Referenz-1 und Referenz-3. n = 1.

Alle Proben wiesen eine allgemeine reduzierte IgE-basierte Aktivität auf. Bei dem extrahierten Allergoid der Chargen 504Tr und 756Tr wurde im Vergleich zur Referenz-1 ein Anstieg der IgE-basierten Aktivität von 7,7 % und 55,7 % festgestellt. Der geringere Anstieg der Charge 504Tr im Vergleich zur Charge 756Tr kann auf die milderen Prozesstemperaturen während der Extrusion zurückgeführt werden. Wie bereits bei der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität festgestellt wurde, zeigte sich auch bei dieser Methode, beim Vergleich mit den Ergebnissen der Chargen aus Kapitel 4.1.6.6, eine Stabilisierung des Allergoids während der Extrusion durch den Zusatz von Trehalose. Trotz des relativ hohen Anstiegs der IgE-basierten Aktivität von über 50 % für das extrahierte Allergoid der Charge 756Tr, kann aufgrund der bereits beschriebenen stark reduzierten IgE-basierten Aktivität von Allergoiden im Vergleich zu nativen Allergenextrakten auch für diese Charge weiterhin von einer Allergoid-typischen reduzierten Menge an IgE-Epitopen ausgegangen werden [111]. Durch die hohe Vergleichbarkeit der Referenzproben kann angenommen werden, dass die Lyophilisierung keine Auswirkung auf die IgE-Bindungsaktivität des Allergoids hatte (Abbildung 28).

4.2.3.7. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Durch die Allergoid-Charakterisierung wurde eine hohe Vergleichbarkeit zwischen dem Allergoid der Chargen 504Tr und 756Tr mit den Referenzproben festgestellt. In einem Vorversuch wurde bereits ein stabilisierender Effekt der Trehalose auf das Allergoid im lyophilisierten Zustand unter der Exposition höherer Temperaturen analysiert. In diesem

Kapitel wurde dies für das Allergoid nach Extrusion vor allem durch die SEC-Methode sowie den Bestimmungen der IgG- und IgE-Bindungsaktivität bestätigt. Obwohl bei diesen Methoden, insbesondere bei den Proben der Charge 756Tr, geringfügige Unterschiede zu den Referenzproben beobachtet wurden, waren diese im Vergleich zu den Proben der Trehalose-freien Formulierungen deutlich reduziert. Rajagopal *et al.* zeigten ebenfalls einen proteinstabilisierenden Effekt durch Trehalose anhand sprühgetrockneter Trehalose-BSA-Partikel, die mit PLGA extrudiert wurden [182]. Zudem wurde dabei ein positiver Effekt auf die In-vitro-Freisetzung von BSA gezeigt, welche maßgeblich von der BSA-Aggregation abhängig war. Die Stabilisierung von Proteinen durch Trehalose während der Gefriertrocknung und unter hohen Temperaturen in Lösung ist weitgehend bekannt und wurde bereits mehrfach beschrieben [183–186]. Im Allgemeinen dient Trehalose an getrockneten Proteinen dabei als Ersatz für Wasser [185]. Dieser Effekt wird auch als Wasserersatz-Hypothese bezeichnet. Während des Trocknungsprozesses von Proteinen oder bei der Exposition gegenüber erhöhten Temperaturen können Wasserstoffbrückenbindungen verloren gehen. Dabei kann sich das Verhältnis zwischen ungefaltetem und nativem Protein hinsichtlich der reaktiveren ungefalteten Variante verschieben, was zu chemischen Abbauprozessen und Aggregation führen kann. Die Hydroxylgruppen der Trehalose unterdrücken diesen Prozess, indem sie an der Oberfläche von Proteinen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und somit zur Erhaltung der nativen Proteinstruktur beitragen [187]. Dies könnte auch in diesem Teil der Arbeit zur Optimierung der Allergoid-Stabilität geführt haben.

4.2.4. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

Da in Kapitel 4.1.7 ein deutlicher Abfall der IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid festgestellt wurde, wurde in diesem Entwicklungsabschnitts zunächst der Einfluss verschiedener Faktoren, die nicht mit der Polymererosion zusammenhängen, auf die Allergoid-Stabilität und die Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität geprüft. Dabei wurde der Einfluss der In-vitro-Temperatur (37 °C) auf die Stabilität von gelöstem und in PLGA immobilisiertem Allergoid sowie der Einfluss von gelösten PLGA-Erosionsprodukten auf die Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität mittels ELISA untersucht.

Um den Einfluss der In-vitro-Temperatur auf die Allergoid-Stabilität zu untersuchen, wurden jeweils zwei Implantate der Charge 756Tr mit oder ohne Freisetzungsmittel für acht Wochen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Allergoid aus den Implantaten extrahiert und die IgG-Bindungsaktivität bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass bei dem Allergoid aus inkubierten Implantaten ohne Freisetzungsmittel ein Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 13,0 % im Vergleich zur Referenzprobe (Allergoid nach Extrusion) zu verzeichnen war. Für das extrahierte Allergoid aus Implantaten, die in 5 mL Freisetzungsmittel inkubiert wurden, wurde eine prozentuale Abnahme der IgG-

Bindungsaktivität von 52,8 % zur Referenzprobe berechnet. Ungelöstes Birken-Allergoid zeigte somit einen Erhalt seiner IgG-Bindungs epitope nach 8 Wochen Inkubation bei 37 °C, wohingegen für gelöstes bzw. teilweise gelöstes Birken-Allergoid ein Abfall zu verzeichnen war. Dies ist unter anderem auf die höhere Stabilität von Proteinen im festen Zustand im Vergleich zu in Lösung befindlichen Proteinen zurückzuführen [187]. Zusätzlich könnte die Bildung saurer Mikro-pH-Werte im Inneren der Polymermatrix während der Inkubation zu einer säureinduzierten Allergoid-Degradation geführt haben.

Um den Einfluss der In-vitro-Bedingungen auf das freigesetzte Allergoid im FreisetzungsmEDIUM zu untersuchen, wurden 5 mL frisch gelöstes Birken-Allergoid in einer Konzentration von 2 mg/mL bei 37 °C für 20 Wochen inkubiert. Als Lösungsmittel diente der für die In-vitro-Studie verwendete Phosphatpuffer. Alle vier Wochen wurde 1 mL der Probelösung entnommen und durch 1 mL frisch hergestellte Birken-Allergoid-Lösung ersetzt. Von den entnommenen Proben wurde die IgG-Bindungsaktivität gemessen und dann, bezogen auf die IgG-Bindungsaktivität des frischen Allergoids (Ausgangsaktivität), die relative Aktivität kalkuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von inkubierten Birken-Allergoid-Proben in Relation zur Ausgangsaktivität. n = 1.

Relative IgG-Bindungsaktivität					
Woche	4	8	12	16	20
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	51,1	48,9	64,1	56,6	55,6

Die Bestimmung der relativen Bindungsaktivität der inkubierten Allergoid-Probe ergab bereits in Woche 4 einen deutlichen Abfall auf 51,1 %. Dieser Wert blieb über einen Zeitraum von 20 Wochen konstant. Das frische Allergoid, das alle vier Wochen der Probelösung hinzugefügt wurde, machte nur 1/5 der Gesamtkonzentration der inkubierten Probelösung aus. Bei einer stetigen Allergoid-Destabilisierung wäre es zu einem konstanten Abfall der Bindungsaktivität gekommen. Dennoch konnte ein Zusammenhang zwischen der Temperatur in-vitro und thermisch induzierter Allergoid-Instabilität gezeigt werden. Die thermisch induzierte Proteinentfaltung kann zu den am häufigsten auftretenden Ursachen von Instabilitäten biopharmazeutischer Therapeutika gezählt werden [188]. Dieser Einfluss muss daher bei der Beurteilung von freigesetztem Allergoid berücksichtigt werden.

Zur Überprüfung, ob PLGA-Abbauprodukte die Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität mittels ELISA beeinflussen, wurden drei Implantate der Charge 756Plac in 5 mL FreisetzungsmEDIUM bei 37 °C für acht Wochen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das

Freisetzungsmedium entnommen und daraus drei Birken-Allergoid-Proben mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Von diesen Proben wurde die IgG-Bindungsaktivität bestimmt und relativ zur Bindungsaktivität einer Referenzprobe (frisch gelöste Birken-Allergoid in VE-H₂O) berechnet. Dabei wurde eine relative Bindungsaktivität von 104,0 % ($\pm 6,8$ %) berechnet. Einen Einfluss von löslichen PLGA-Oligo- und -Monomeren auf den ELISA wurde somit ausgeschlossen.

Der folgende Abschnitt präsentiert und diskutiert die Ergebnisse der In-vitro-Freisetzung der Chargen 504Tr und 756Tr. Dabei wurde insbesondere der Einfluss von Trehalose als Porenöffner und Proteinstabilisator auf das Freisetzungsverhalten und die Stabilität des freigesetzten Allergoids untersucht.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und des pH-Werts für die Implantate der Chargen 504Tr und 756Tr.

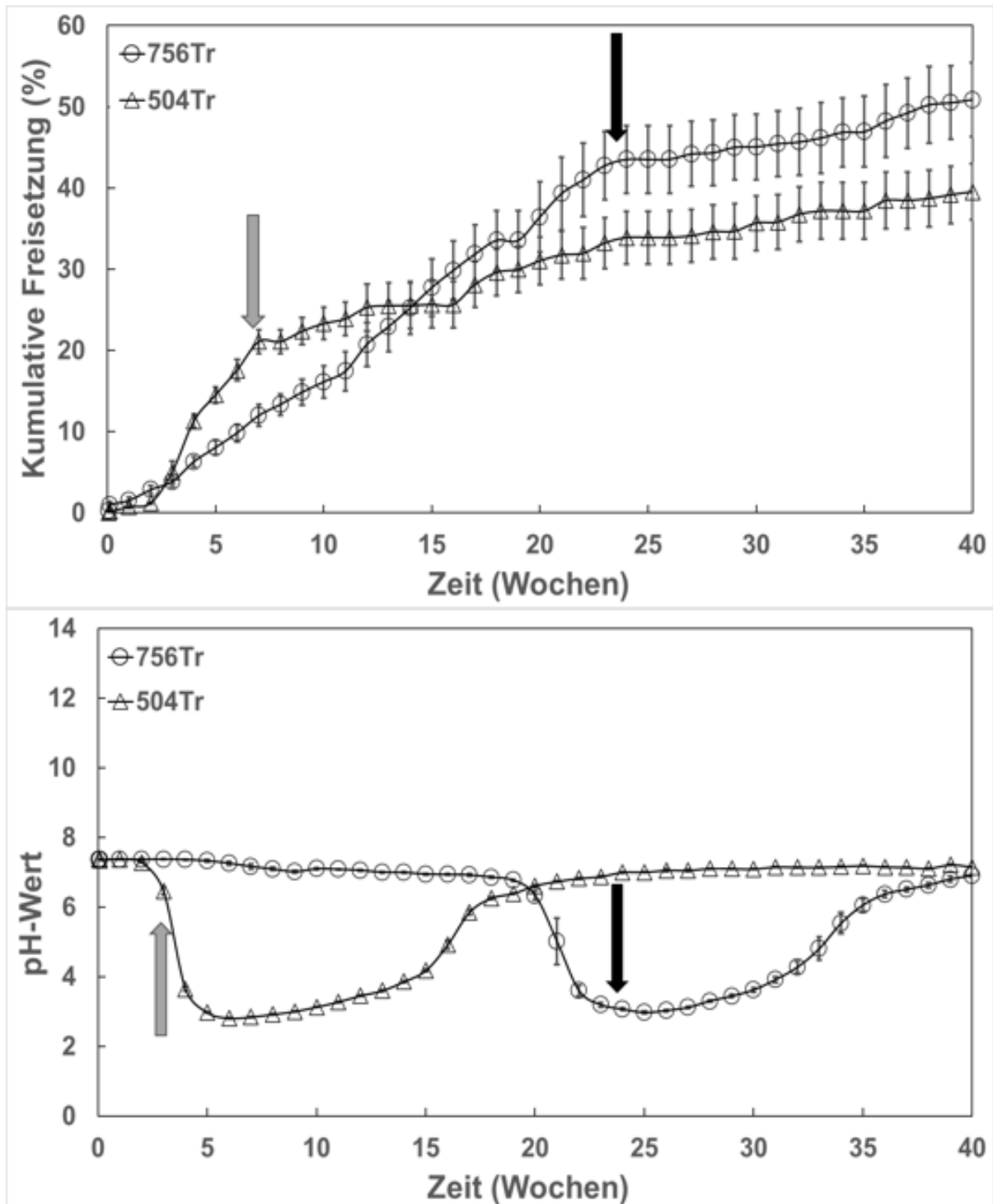


Abbildung 29 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmittel für Proben der Chargen 504Tr und 756Tr. Besondere Ereignisse wie pH-Abfall durch Pfeile gekennzeichnet. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Für beide Chargen wurde eine kumulative Langzeitfreisetzung des Allergoids über einen Zeitraum von 40 Wochen beobachtet (Abbildung 29, oben). Der unterschiedliche pH-Wert-

Verlauf der Chargen 756Tr und 504Tr lässt sich auf die in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Polymereigenschaften der Polymere RG 504 H und RG 756 S zurückführen. In den ersten sieben Wochen der In-vitro-Studie wurde aus den Implantaten der Charge 504Tr und 756Tr kumulativ 21,1 % und 10,5 % Allergoid freigesetzt. Die höhere Freisetzung der Charge 504Tr in den ersten Wochen könnte auf der früheren Polymererosion des Polymers RG 504 H basieren.

Der pH-Verlauf und die kumulative Freisetzung war für die Proben der Charge 504Tr nahezu identisch zu denen der Charge 504 (Abbildung 20, Kapitel 4.1.7). Der Beginn des starken pH-Abfalls wurde auch hier in Woche 3 beobachtet (Abbildung 29, grauer Pfeil, unten). Nach 40 Wochen wurde eine kumulative Gesamtfreisetzung von 39,5 % ($\pm 3,5$ %) gemessen. Ähnlich zu den Proben der Charge 504 sank auch bei den Proben der Charge 504Tr die wöchentliche Freisetzungsrates nach sieben Wochen unter zwei Prozent (Abbildung 29, grauer Pfeil, oben) und wurde lediglich in Woche 17 mit 2,5 % überschritten. Die Verwendung von Trehalose hatte für diese Charge keinen Einfluss auf die Freisetzungsrates des Allergoids. Es ist möglich, dass der frühe pH-Abfall die Allergoid-Freisetzung trotz der Trehalose entscheidend beeinflusst hat.

Um die Stabilität des freigesetzten Allergoids genauer beurteilen zu können, wurde zu bestimmten Zeitpunkten von bestimmten Freisetzungspunkten die IgG-Bindungsaktivität gemessen und anschließend die relative Bindungsaktivität zur IgG-Bindungsaktivität des extrahierten Allergoid (Ausgangsaktivität) dieser Charge berechnet (Tabelle 24).

Tabelle 24 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 504Tr in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW, n = 2.

Relative IgG-Bindungsaktivität					
Woche	4	8	12	16	20
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	11,7	0,0	0,0	0,0	0,0

In Woche 4 wurde für die Proben der Charge 504Tr eine relative Bindungsaktivität von 11,7 % berechnet. Diese lag 7,5 % über der relativen Bindungsaktivität der Freisetzungspunkte der Charge 504 aus Woche 4. Für die darauffolgenden Proben (nach pH-Abfall) konnten keine IgG-Bindungsaktivitäten mehr gemessen werden. Für die Proben der Charge 504Tr konnte ein Zusammenhang zwischen der Allergoid-Stabilität und dem starken pH-Abfall in der frühen Phase der Freisetzungstudie gezeigt werden. Nach 40 Wochen wurden schwerlösliche Implantat-Restmengen von 6,0 % ($\pm 0,4$) für die Implantate dieser Charge gemessen. Diese waren 2,4 % höher als bei der Charge 504 und deuten ebenfalls

auf die Bildung von schwerlöslichen Aggregaten aus Allergoid und PLGA-Abbauprodukten hin. Eine Stabilisierung des Allergoids während der In-vitro-Freisetzung durch Trehalose konnte für diese Charge nicht beobachtet werden.

Die Proben der Charge 756Tr (Abbildung 29) zeigten über den Zeitraum der Freisetzungsstudie eine deutlich höhere Freisetzungsrates als die Proben der Charge 756 (Abbildung 20, Kapitel 4.1.7). Zwischen den Wochen 2–24 wurde eine wöchentliche Freisetzungsrates von 1,9 % ($\pm 0,7$ %) bestimmt. Mit dem pH-Abfall um Woche 21 veränderte sich auch die Freisetzungsrates in Woche 24 (Abbildung 29, schwarzer Pfeil). In den folgenden zehn Wochen (Woche 24–34) wurden nur 4,1 % kumulativ bei einem durchschnittlichen pH-Wert von pH 3,74 ($\pm 0,99$) freigesetzt, was auf eine säureinduzierte Aggregation des Allergoids durch die kumulierenden PLGA-Abbauprodukte hinweist. Für die Proben der Charge 756Tr wurde eine kumulative Gesamtfreisetzung von 50,8 % ($\pm 4,6$ %) nach 40 Wochen bestimmt, was im Vergleich zu den Proben der Charge 756 eine Steigerung von 27,9 % darstellt.

Die Ergebnisse der relativen Bindungsaktivität zur Ausgangsaktivität (extrahiertes Allergoid) von ausgewählten Freisetzungspalten der Charge 756TrMg(1) sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 756Tr in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW, n = 2.

Relative IgG-Bindungsaktivität						
Woche	4	8	12	16	20	24
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	27,1	17,1	14,4	15,5	7,4	0,0

Bei der Berechnung der relativen Bindungsaktivität konnte für die Proben der Charge 756Tr bis zum pH-Abfall eine abfallende, jedoch vorhandene IgG-Bindungsaktivität gemessen werden. Von Woche 4 bis 20 wurde eine relative Bindungsaktivität zwischen 27,1 % und 7,4 % berechnet. Im Gegensatz zur Charge 504Tr konnte bei dieser Charge ein stabilisierender Effekt durch Trehalose auf das Allergoid beobachtet werden. Allerdings war auch für diese Charge die Bindungsaktivität im Verlauf der In-Vitro-Studie reduziert und abfallend, was auf eine Degradation des Allergoids durch die In-vitro-Bedingungen und die Anhäufung von PLGA-Abbauprodukten mit der Bildung eines niedrigen Mikro-pH-Klimas innerhalb der Polymermatrix zurückzuführen war. Nach 40 Wochen wurden bei der Charge 756Tr schwerlösliche Implantat-Restmengen von 4,5 % ($\pm 0,1$ %), bezogen auf die initial eingesetzte Implantat-Masse, gemessen. Diese waren 1,5 % geringer als bei den Proben der

Charge 756, stehen jedoch nicht im gleichen Verhältnis zu der Gesamtfreisetzung des Allergoids.

In diesem Teil der Arbeit konnte für das Polymer RG 756 S gezeigt werden, dass die zusätzliche Beladung mit Trehalose die Bildung eines Porensystems innerhalb der PLGA-Matrix begünstigt, was zu einer frühzeitigen und langanhaltend konstanten Allergoid-Freisetzung führt. Bei der Charge 756Tr wurde eine höhere Menge der Allergoid-Beladung noch vor dem pH-Abfall und dem Maximum der Polymererosion freigesetzt. Die Verwendung von Trehalose als Porenöffner wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für diverse PLGA-basierte Abgabesysteme untersucht. Li *et al.* zeigten in ihrer Studie an PLGA-basierten Mikropartikeln mit dem Polypeptid α O-Conotoxin GeXIVA eine Steigerung der kumulativen In-vitro-Freisetzung durch die Verarbeitung mit Trehalose, was auf die Bildung eines ausgeprägten Porensystems innerhalb der Mikropartikel zurückgeführt wurde [189]. Zusätzlich wurde eine Stabilisierung des Proteins durch Trehalose während der In-vitro-Freisetzung gezeigt. Zhao *et al.* untersuchten den Einfluss von Trehalose auf die Freisetzung von Levonorgestrel aus PLGA-basierten Mikronadeln [190]. Hierbei wurde durch den Zusatz von Trehalose nicht nur eine höhere Freisetzung gezeigt, sondern auch eine schnellere Erosion der PLGA-Matrix aufgrund der höheren Porosität. Zu beachten ist, dass in beiden genannten Studien der Anteil an Trehalose erheblich höher war als der hier verwendete Anteil. In Bezug auf die von Zhao *et al.* beschriebene beschleunigte Erosion, wurde in dieser Studie ein gegenteiliger Effekt festgestellt. Durch die Erhöhung der Gesamtbeladung wurde der Zeitpunkt des pH-Abfalls, der als Zeitpunkt der maximalen Polymererosion angesehen wurde, verschoben. In Kapitel 4.1.7 wurde für die Chargen 756Plac und 756 der Beginn des pH-Abfalls in Woche 15 bzw. -19 beobachtet. In dieser Studie verschob sich dieser durch die zusätzliche Trehalose-Beladung auf Woche 21. Dies bestätigt die Hypothese, dass eine erhöhte Porenbildung in der Polymermatrix zu einem besseren Abfluss von PLGA-Abbauprodukten und einem erhöhten Pufferaustausch führt, was wiederum der Autokatalyse im Inneren der Polymermatrix entgegenwirkt. Die Verschiebung des Polymerabbaus ist ein bekannter Mechanismus, der die Proteinfreisetzung aus PLGA-basierten Abgabesystemen fördert [191].

4.2.5. Kapitelzusammenfassung

In diesem Entwicklungsabschnitt wurde erfolgreich gezeigt, dass der entwickelte Extrusionsprozess auch für Formulierungen mit höherer Gesamtbeladung umgesetzt werden kann. Die Lyophilisierung von Wirkstoff und Hilfsstoff vor der Extrusion zeigte keinen destabilisierenden Einfluss auf das Allergoid. Der Herstellungsprozess erzeugte morphologisch homogene Implantate mit einem Allergoid-Anteil nah dem Soll-Wert über das gesamte Extrudat. Außerdem konnte ein stabilisierender Effekt auf das Allergoid während der Extrusion durch eine Trehalose-Beladung von 5 % gezeigt werden. Beide Chargen zeigten

eine Langzeitfreisetzung des Allergoids über einen Zeitraum von 40 Wochen. Das Erosionsverhalten der Polymere war vergleichbar zu den Chargen aus Kapitel 4.1.7. Für die Charge 504Tr wurde kein Effekt von Trehalose auf das Erosionsverhalten des Polymers, die Freisetzung des Allergoids und die Allergoid-Stabilität während der Freisetzung festgestellt. Für den ausbleibenden Effekt wurde der frühzeitige Abbau des Polymers mit der Anhäufung von PLGA-Abbauprodukten und dem damit zusammenhängenden stark niedrigen pH-Wert als mögliche Ursache bewertet. Für die Charge 756Tr konnte durch Trehalose die Bildung einer ausgeprägten Porenmatrix erzeugt werden, wodurch deutlich höhere Freisetzungsraten bis zum Beginn des pH-Abfalls detektiert wurden. Zusätzlich wurde eine erhöhte IgG-Bindungsaktivität im Vergleich zu den Proben der Charge 756 über den Verlauf der In-vitro-Freisetzung detektiert. Allerdings zeigte sich auch in dieser Studie das Problem der unvollständigen Freisetzung sowie der Bildung eines schwer löslichen Rückstands aus Allergoid und PLGA-Abbauprodukten. Die weitere Erhöhung der Gesamtbeladung stellt für Implantate auf Basis des Polymers RG 756 S eine zusätzliche Möglichkeit dar, das Porensystem der PLGA-Matrix zu verstärken und somit die Freisetzung des Allergoids zu erhöhen. Eine Implementierung von puffernden Substanzen könnte beim Polymer RG 504 H dem anfänglichen pH-Abfall entgegenwirken und dadurch die Stabilität und Freisetzung des Allergoids optimieren.

4.3. Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit 17,5-prozentiger Gesamtbeladung

4.3.1. Einleitung und Herstellungsprozess

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer Gesamtbeladung von 17,5 % auf die Umsetzung des Herstellungsprozesses und die Allergoid-Freisetzung für das Polymer RG 756 S untersucht. Dazu wurden neben der Beladung von 10 % Allergoid und 5 % Trehalose, zusätzlich 2,5 % Trehalose oder Natriumchlorid verwendet und folgende Zielsetzungen betrachtet:

- Die Übertragung des Herstellungsprozesses für Formulierungen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 %.
- Die Optimierung der Allergoid-Stabilität durch die Erhöhung des Trehalose-Gehalts.
- Der Einfluss einer höheren Gesamtbeladung auf die In-vitro-Freisetzung des Allergoids und die Polymererosion.

Da ausschließlich für die Charge 756Tr (Polymer RG 756 S) in Kapitel 4.2.4 eine deutlich höhere Freisetzungsraten durch die Erhöhung der Gesamtbeladung im Vergleich zur Charge 756 beobachtet wurde, wurde in diesem Teil der Arbeit ausschließlich mit diesem Polymer

gearbeitet. Mit der Verwendung von NaCl wurde geprüft, ob ein möglicher Einfluss auf die Freisetzungsrates durch eine höhere Beladung auch vom Hilfsstoff abhängig ist. Wie im Methodenteil bereits beschrieben, wurden die Hilfsstoffe und der Wirkstoff vor der Extrusion in VE-H₂O gelöst und lyophilisiert. In einem Vorversuch wurde die prozentuale Allergoid-Wiederfindung nach Lyophilisierung analysiert. Die Bestimmung des Allergoid-Gehalts ergab für das Allergoid-Trehalose- und das Allergoid-Trehalose-NaCl-Lyophilisat eine prozentuale Wiederfindung von 96,2 % ($\pm 2,2$ %, n = 3) bzw. 98,0 % ($\pm 1,7$ %, n = 3).

Aus den hergestellten Lyophilisaten wurde jeweils eine Implantat-Charge mit dem Polymer RG 756 S hergestellt. Tabelle 26 zeigt die Prozessparameter der Extrusion für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa.

Tabelle 26 SME-Prozessparameter für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa. (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute).

Charge	756Tr+	756TrNa
Zusammensetzung		
RG 756 S	X	X
10 % (m/m) Birken-Allergoid	X	X
5 % (m/m) Trehalose	--	X
7,5 % (m/m) Trehalose	X	--
2,5 % (m/m) NaCl	--	X
Allergoid-Charge	W8003765	W8003765
SME-Prozessparameter		
Chargengröße (g)	4,9	4,9
Zuführrate (g/min)	0,76	0,80
Prozesszeit (min)	19	20
Maximaldruck (bar)	96	93
Ausbeute (%)	30,6	28,6

Die Extrusion wurde erfolgreich für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa durchgeführt. Beide Chargen zeigten dabei deutlich verkürzte Prozesszeiten von ca. 20 min im Vergleich zu den vorherigen Chargen durch eine Erhöhung der Zuführrate von 0,33 g/min (756) auf 0,76 g/min (756Tr+) bzw. 0,80 g/min (756TrNa). Die Ausbeute und der Maximaldruck an der Extruderdüse waren vergleichbar zu den bisher produzierten Chargen des Polymers RG 756 S. Trotz der Erhöhung der Zuführrate war die Extrusion ohne druckbedingte

Warnabschaltung möglich. Nach der Extrusion wurden keine Rückstände an den Schneckenbauteilen festgestellt, was auf eine optimale Förderung des extrudierten Materials schließen lässt.

4.3.2. Morphologische Charakterisierung der Implantate

Zur Beurteilung des Herstellungsprozesses wurden die Implantate morphologisch charakterisiert und die Allergoid-Verteilung im Extrudat bewertet. Das Ziel dieser Analyse war es, den Einfluss einer höheren Gesamtbeladung und einer schnelleren Zuführrate während der Extrusion auf die morphologischen Eigenschaften der Implantate zu untersuchen. Dabei wurden stets Implantate aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats verwendet. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate sowie die Berechnung der Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa.

Tabelle 27 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 756Tr+ und 756TrNa. Angabe von MW \pm SD.

Parameter	756Tr+	756TrNa
Masse (mg) (n = 10)	28,0 (\pm 0,1)	28,3 (\pm 1,0)
Länge (mm) (n = 10)	5,6 (\pm 0,2)	5,5 (\pm 0,2)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,0 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,1)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	107,7 (\pm 3,9)	105,2 (\pm 3,3)

Im Vergleich zu den bisher produzierten Verum-Chargen wurden für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa bei der Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser, Implantate mit höherer Länge festgestellt, was auch zu einer erhöhten Masse der Implantate führte. Für die Implantate der Chargen 756, 756Tr, 756Tr+ und 756TrNa wurde ein vergleichbares Massen-Längen-Verhältnis von 5,3 mg/mm, 4,9 mg/mm, 5,0 mg/mm und 5,1 mg/mm kalkuliert. Die variable Länge der Implantate ist auf den manuellen Schneideprozess zurückzuführen und könnte bei einer Maßstabsvergrößerung des Herstellungsprozesses durch die Etablierung einer automatisierten Schneideeinheit umgangen werden. Dies ermöglicht über den Extrusionsprozess ein kontinuierliches Schneiden des Extrudats nach Düsenaustritt, was zu einer höheren morphologischen Homogenität zwischen verschiedenen Chargen führt [192]. Bei der Berechnung der Allergoid-Wiederfindung einzelner Implantate wurden mit niedrigen Standardabweichungen die vollständige Rückgewinnung des Allergoids für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa berechnet (Tabelle 27).

Mit der REM-Analyse der Mantelfläche der hergestellten Implantate 756Tr+ und 756TrNa wurde die Mantelflächenbeschaffenheit der Implantate untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 30 dargestellt.

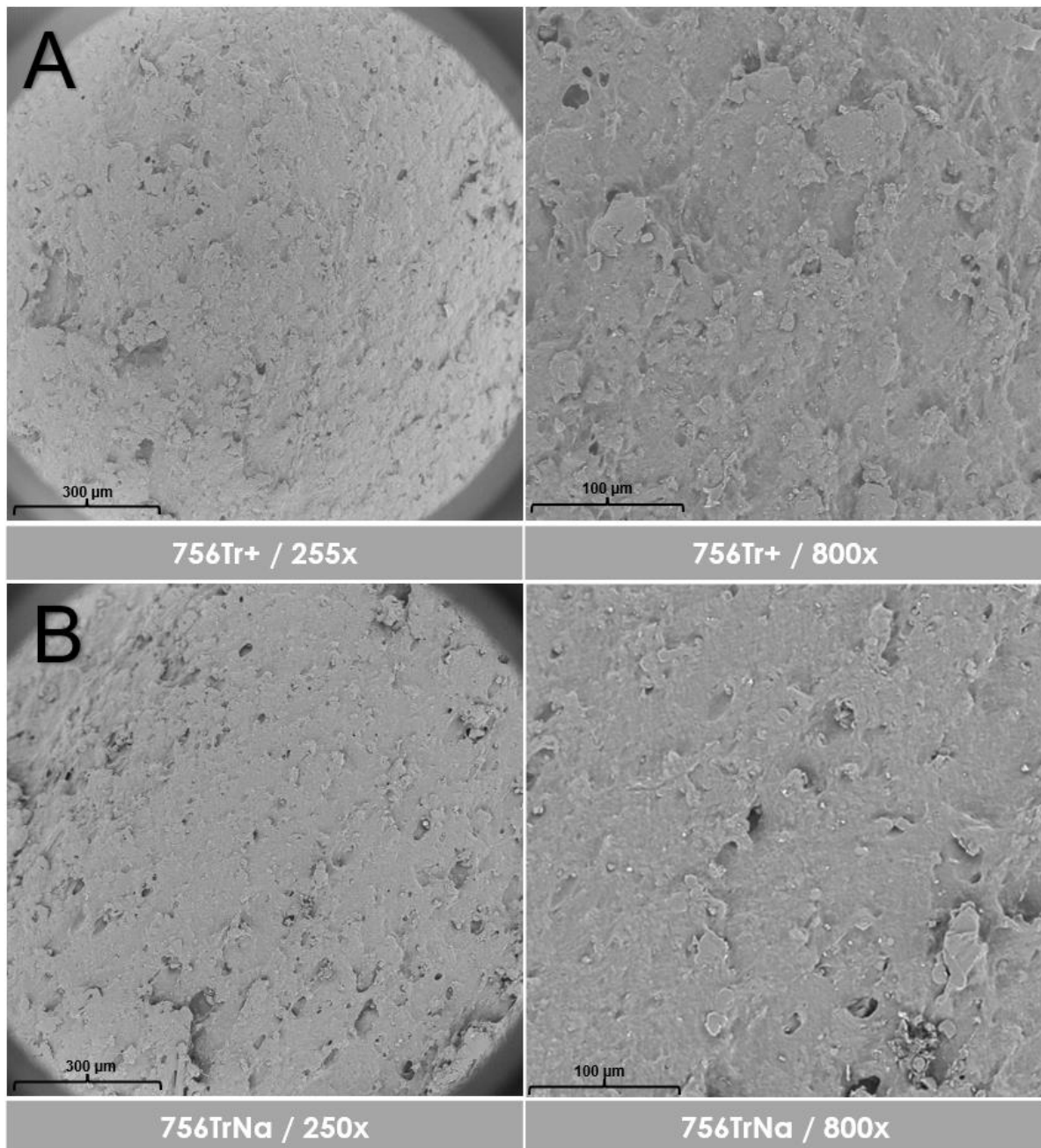


Abbildung 30 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 756Tr+ (A) und 756TrNa (B).

Die Mantelflächen der Implantate beider Chargen zeigten vergleichbare Eigenschaften. Bei beiden Chargen konnten gleichmäßig verteilte partikuläre Strukturen bei 800-facher Vergrößerung detektiert werden. Bei der Überprüfung der Makroporosität wurden in beiden Fällen vereinzelte unebene Strukturen sowie kleinere Hohlräume festgestellt. Diese Strukturen verteilten sich jedoch gleichmäßig über den analysierten Bereich. Möglicherweise

erzeugte die höhere Gesamtbeladung ein stärkeres Porensystem innerhalb der Polymermatrix.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Querschnitte der Implantate der Chargen 756Tr+ und 756TrNa mittels REM untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 31 dargestellt.

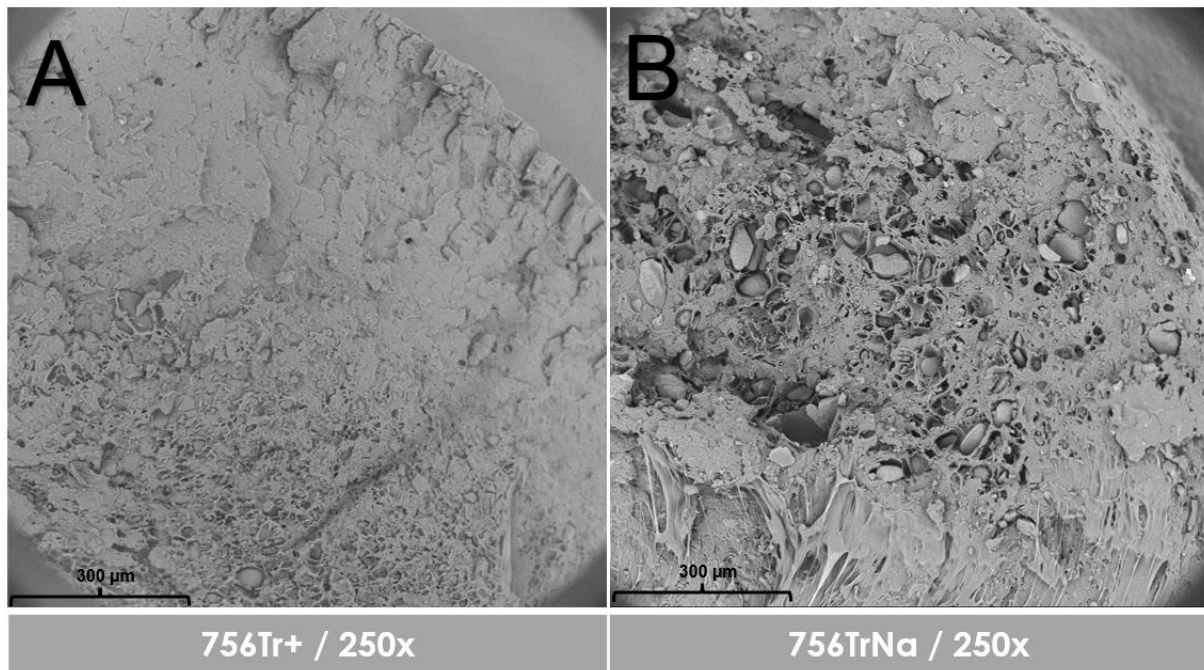


Abbildung 31 REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte von Proben der Chargen 756Tr+ (A) und 756TrNa (B).

Bei der REM-Analyse der Implantat-Querschnitte wurde festgestellt, dass die Probe der Charge 756TrNa im Vergleich zur Charge 756Tr+ eine höhere Porosität der inneren Polymermatrix aufweist. Besonders auffällig war dabei die Verteilung größerer Partikel im gesamten untersuchten Bereich. Beim Implantat-Querschnitt der Charge 756Tr+ wurden ebenfalls unebene Strukturen sowie kleinere Hohlräume beobachtet, allerdings in geringerem Ausmaß als bei der Charge 756TrNa. In beiden Fällen unterschied sich die innere Implantat-Struktur deutlich von denen der Charge 756Tr (Abbildung 23, Kapitel 4.2.2). Dies könnte neben der höheren Gesamtbeladung auch auf die schnellere Zuführrate bei der SME dieser Chargen zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass eine zu schnelle Zuführrate einer ausreichenden Erweichung des Polymers entgegengewirkt, wodurch die Verarbeitung der Hilfsstoffe und des Wirkstoffes in der Polymermatrix unzureichend ist.

In diesem Entwicklungsabschnitt wurde die erfolgreiche Herstellung von PLGA-basierten Implantaten mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % gezeigt. Die Implantate zeigten über das hergestellte Extrudat einen Allergoid-Gehalt nahe dem Soll-Wert. Für beide Chargen wurde jedoch eine hohe Porosität der inneren Polymermatrix mit der Verteilung größerer Partikel

beobachtet, was auf die schnellere Zuführtrate zurückgeführt wurde. Diese Merkmale waren vor allem in der Charge 756TrNa ersichtlich und könnten durch die Beladung mit NaCl noch verstärkt worden sein.

4.3.3. Allergoid-Charakterisierung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung beschrieben, die an dem extrahierten Allergoid der Chargen 756Tr+ und 756TrNa durchgeführt wurde. Da bereits ein stabilisierender Effekt der Trehalose auf das Allergoid während der Extrusion in Kapitel 4.2 gezeigt werden konnte, wurde in diesem Teil der Arbeit die Optimierung dieses Effekts durch die Erhöhung der Trehalose-Beladung untersucht. Zudem wurde der Einfluss der kürzeren Prozesszeiten auf die Allergoid-Stabilität überprüft. Da für die hergestellten Chargen in diesem Kapitel eine neue Birken-Allergoid-Charge (W8003765) verwendet wurde, wurden die Ergebnisse mit dieser Allergoid-Charge verglichen (Referenz-4).

4.3.3.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der DLS-Analytik dargestellt.

Tabelle 28 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4. Darstellung des mittleren R_h -Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW \pm SD, n = 3.

Probe	Referenz-4	756Tr+	756TrNa
Mittlerer R_h -Wert (nm)	1,6 (\pm 0,3)	1,7 (\pm 0,8)	2,0 (\pm 0,5)
Prozentualer Massenanteil (%)	99,5 (\pm 0,5)	99,3 (\pm 0,4)	93,5 (\pm 4,3)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	100 (\pm 0,0)	100 (\pm 0,0)	99,8 (\pm 0,2)

Bei der Bestimmung des mittleren R_h -Werts wurden für das extrahierte Allergoid der Chargen 756Tr+ und 756TrNa vergleichbare Ergebnisse mit der Referenz-4 festgestellt. Die niedrigen R_h -Werte mit hohen prozentualen Massen- und numerischen Anteilen deuten auf das Fehlen von größeren Aggregaten hin und bestätigen den Erhalt der hydrodynamischen Größe des Allergoids nach SME hin. Mit einem mittleren R_h -Wert von 1,6 nm lag die Referenz-4 im Größenbereich der Referenz-1 (2,3 nm).

4.3.3.2. Bestimmung der molekularen Masse und R_h -Wert mittels SEC-Analyse

Die SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sind in Abbildung 32 dargestellt.

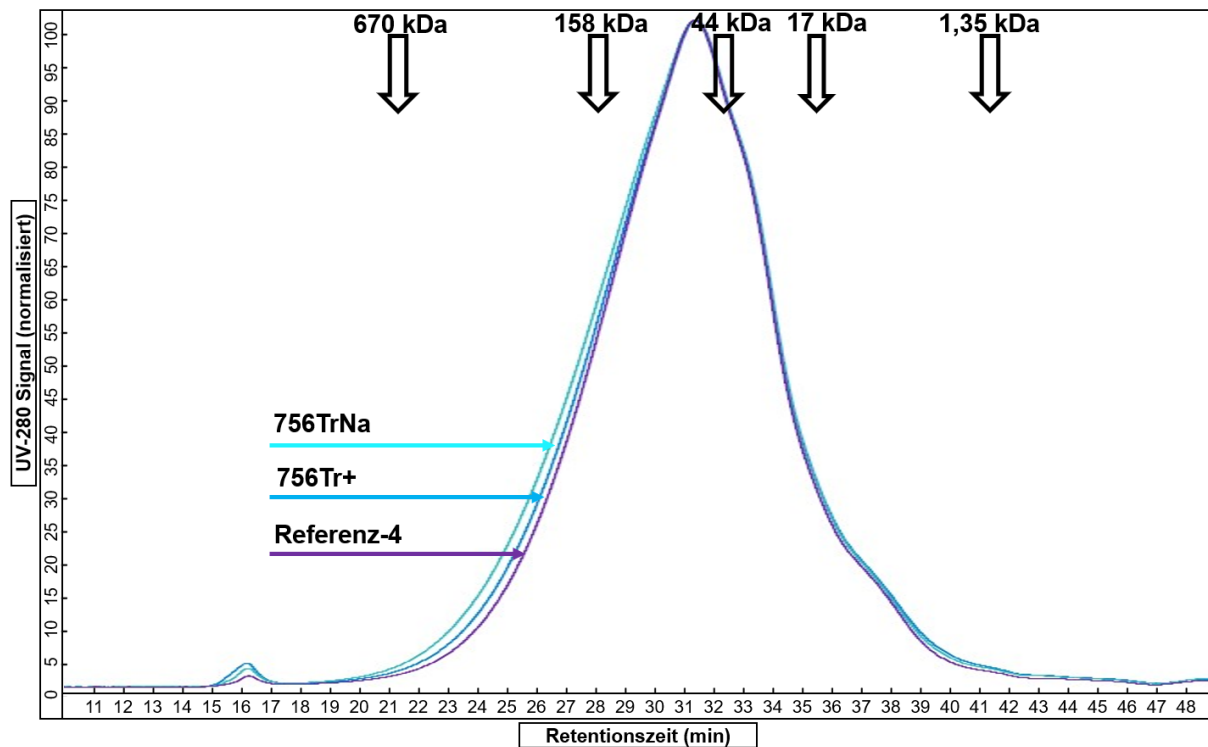


Abbildung 32 SEC-Chromatogramm des extrahierten Allergoids aus den Implantaten der Chargen 756TrNa und 756Tr+ sowie der Referenz-4 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus den Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa mit der Referenz-4 wurden lediglich minimale Unterschiede im Bereich der Retentionszeiten von 22–30 min festgestellt. Diese waren vergleichbar mit denen der Charge 756Tr (Kapitel 4.2.3.2, Abbildung 24) und lassen einen nahezu vollständigen Erhalt der Allergoid-Struktur vermuten. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur eine Probe pro Charge exemplarisch in Abbildung 32 dargestellt und die restlichen Chromatogramme dem Anhang beigefügt (Kapitel 8.2, Abbildung 77 und Abbildung 78).

Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus den Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4.

Tabelle 29 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4. Angabe von MW \pm SD, n = 3.

Probe	Referenz-4	756Tr+	756TrNa
Molekulare Masse (kDa)	47,0 (\pm 0,2)	46,5 (\pm 0,2)	46,9 (\pm 0,1)
R_h -Wert (nm)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)

Bei der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts wurden für alle Proben nahezu gleiche Ergebnisse erzielt, was für einen Erhalt der hydrodynamischen Größe und der molekularen Masse des extrahierten Allergoids spricht. Beim Vergleich der Retentionszeiten des Hauptpeaks der in dieser Studie vermessenen Allergoide mit denen aus Kapitel 4.1.6.2 und -4.2.3.2 konnte eine Verschiebung der Chromatogramme hinsichtlich eines später eluierenden Hauptpeaks detektiert werden. Diese Verschiebung wurde jedoch auch bei dem gemessenen SEC-Standard detektiert, sodass von einem methodenspezifischen Einfluss ausgegangen werden kann (Kapitel 8.2, Abbildung 82).

4.3.3.3. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Abbildung 33 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich 1700–1600 cm^{-1} für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4.

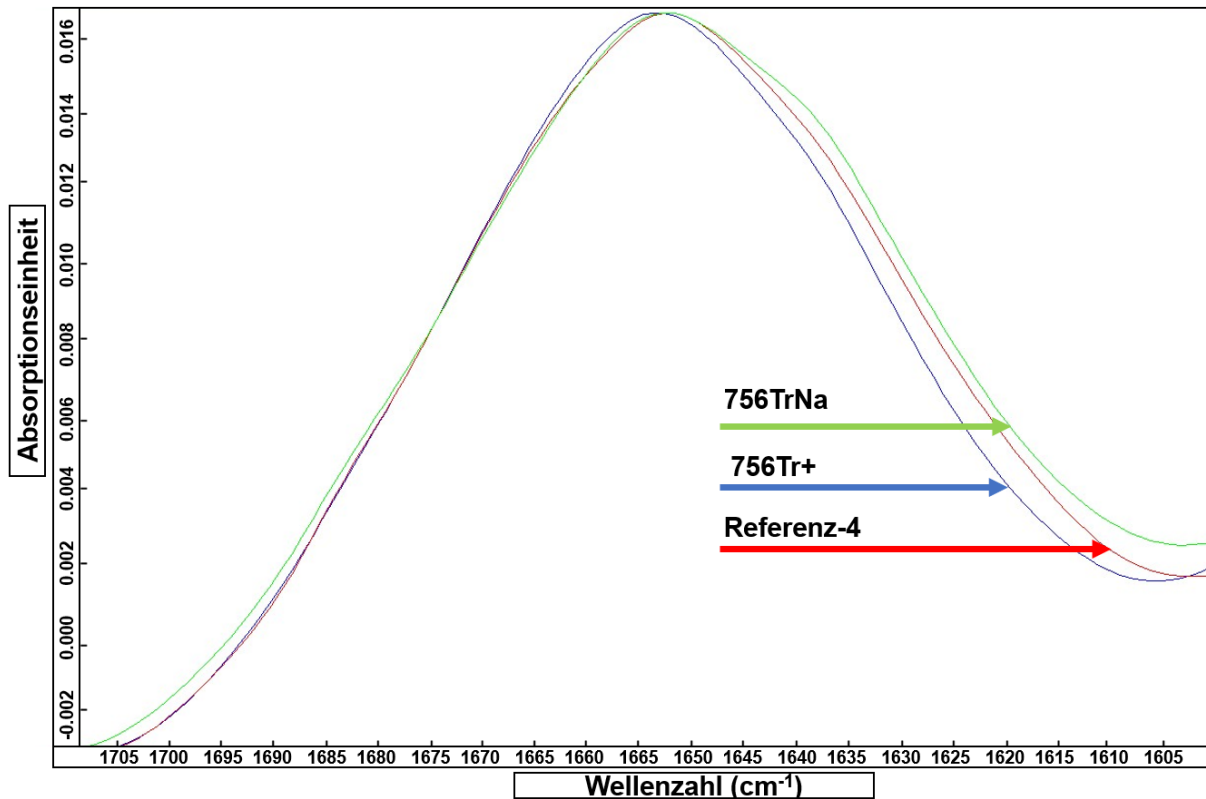


Abbildung 33 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4. n = 1.

Bei der Betrachtung des Spektrums im Bereich der Amid I-Bande wurde bei keiner Probe eine Schulterbildung analysiert, was auf das Fehlen von β -Aggregationen schließen lässt. Grundsätzlich waren die Spektren sehr vergleichbar untereinander und mit dem der Charge 756Tr (Abbildung 26, Kapitel 4.3.3.3) ebenfalls vergleichbar.

In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile und des Korrelationskoeffizienten mit Referenz-4 dargestellt.

Tabelle 30 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa und der Referenz-4 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-4. n = 1

Probe	Referenz-4	756Tr+	756TrNa
Gehalt α -Helix (%)	25,9	28,0	24,2
Gehalt β -Faltblatt (%)	19,1	18,2	14,6
Korrelationskoeffizient mit Referenz-4 (%)	--	93,1	93,6

Für das extrahierte Allergoid der Chargen 756Tr+ und 756TrNa zeigte sich im Vergleich zur Referenz-4 ein weitestgehender Erhalt der α -Helix- und β -Faltblattstrukturanteile. Zudem wurde durch den berechneten Korrelationskoeffizienten eine hohe Übereinstimmung im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande zwischen dem extrahierten Allergoid der Chargen und der Referenzprobe festgestellt. Mit dieser Methode wurde nur ein geringfügiger Einfluss der Extrusion auf die Sekundärstrukturanteile der Proben analysiert. Eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse durch die höhere Zuführtrate während der Extrusion oder die erhöhte Trehalose-Beladung wurde jedoch nicht beobachtet. Allerdings ließen sich mit dieser Methode bei allen bisher vermessenen Proben hohe Vergleichbarkeiten zu den Referenzproben feststellen.

4.3.3.4. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

Da eine Abweichung der Stabilität des extrahierten Allergoids im Vergleich mit den Referenzen durch die IgG- und IgE-Bindungsaktivität bislang gut beurteilt werden konnte, sind diese Methoden besonders geeignet, um den Einfluss einer höheren Trehalose-Beladung und der kürzeren Verweildauer des Allergoids im Extruder auf die Allergoid-Stabilität zu prüfen.

In Abbildung 34 sind die Messungen der IgG-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4 dargestellt.

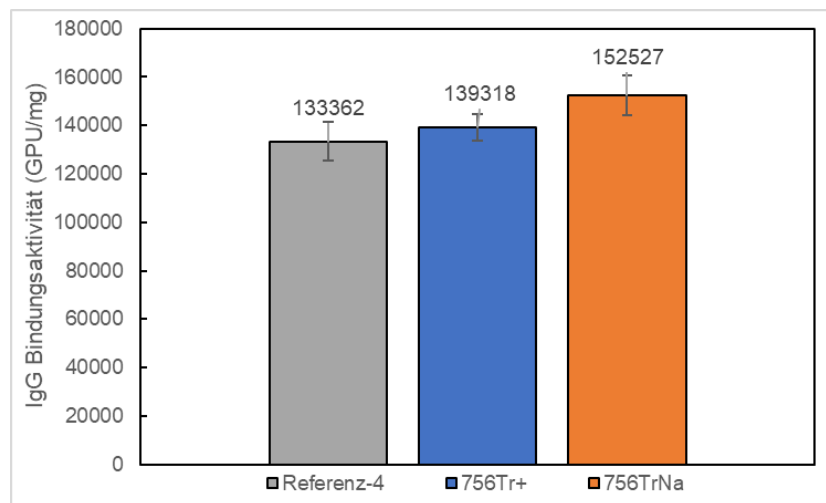


Abbildung 34 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Bei der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität konnte für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa vergleichbare Ergebnisse mit der Referenz-4 detektiert werden. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756Tr+ wurde ein prozentualer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 4,5 % im Vergleich zur Referenz-4 gemessen, sodass von einem kompletten Erhalt der IgG-spezifischen Epitope ausgegangen werden kann. Beim Vergleich des extrahierten Allergoids der Charge 756TrNa mit der Referenz-4 wurde ein prozentualer Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 14,4 % bestimmt, was auf einen minimalen Einfluss der Extrusion auf die Exposition von IgG-Bindungsepitope hindeutet. Der prozentuale Anstieg der IgG-basierten Aktivität war beim Allergoid der Charge 756TrNa etwa zehn Prozent höher als beim Allergoid der Charge 756Tr+. Dies könnte auf eine bessere Stabilisierung des Allergoids der Charge 756Tr+ während der Extrusion durch die höhere Trehalose-Beladung zurückgeführt werden. Grundsätzlich wurde in dieser Studie eine bessere Erhaltung der IgG-Epitope auf dem Allergoid beider Chargen im Vergleich zur Charge 756Tr (+25,8 %) gezeigt. Möglicherweise wurde dies durch die schnellere Zuführrate erreicht, die zu einer geringeren thermischen Belastung des Allergoids im Extruder führte. Beim Vergleich von Referenz-1 (92.649 GPU/mg) mit Referenz-4 (133.362 GPU/mg) wurde eine deutlich höhere IgG-Bindungsaktivität für die Referenz-4 bestimmt, was auf eine chargenspezifische Variabilität zurückgeführt wurde. Der Vergleich verschiedener Implantat-Chargen erfolgte daher anhand der Abweichung zur korrespondierenden Referenzprobe.

4.3.3.5. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

Die Ergebnisse der Messung der IgE-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4 sind in Abbildung 35 dargestellt.

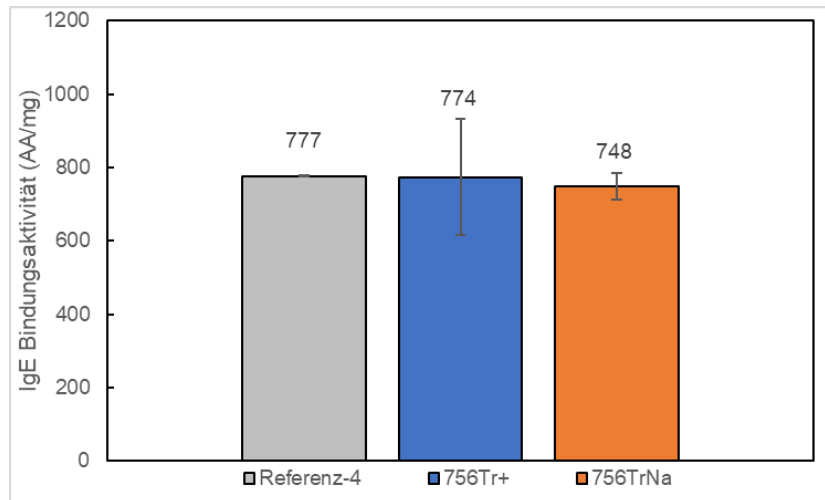


Abbildung 35 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa sowie der Referenz-4. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Die Bestimmung der IgE-basierten Aktivität ergab vergleichbare Werte für das Allergoid der Chargen 756Tr+ und 756TrNa mit der Referenz-4. Ein Einfluss der Extrusion auf die IgE-basierte Aktivität des Allergoids wurde für beide Chargen ausgeschlossen. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756Tr wurde eine Zunahme der IgE-basierten Aktivität von 55,7 % im Vergleich zur Referenz-1 berechnet (Kapitel 4.2.3.6). Die hier gezeigte Verbesserung könnte auf die Reduzierung der thermischen Belastung des Allergoids während der Extrusion, bedingt durch eine schnellere Zuführrate und der kürzeren Verweildauer im Extruder, zurückzuführen sein. Für die Proben der Referenz-4 (777 AA/mg) wurde eine höhere IgE-basierte Aktivität im Vergleich zu der Referenz-1 (292 AA/mg) detektiert. Mit dieser Messung wurde die Variabilität hinsichtlich der IgE-Bindungs epitope zwischen den einzelnen Birken-Allergoid-Chargen verdeutlicht.

4.3.3.6. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Die Allergoid-Analytik zeigte, dass die Beladung mit 7,5 % Trehalose oder 5 % Trehalose und 2,5 % NaCl die Stabilität des Allergoids über den Extrusionsprozess erhält. Zudem führte eine kürzere Prozesszeit zu einer Zunahme der Allergoid-Stabilität. Eine deutliche Verbesserung der Allergoid-Stabilität durch eine höhere Trehalose-Beladung wurde lediglich bei der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität beobachtet. Möglicherweise ist der proteinstabilisierende Effekt der Trehalose bei einer Beladung von 5–7,5 % gesättigt. Eine konzentrationsabhängige Stabilisierung von Proteinen im festen Zustand gegenüber thermischer Belastung durch Trehalose wurde bereits von Rajagopal *et al.* gezeigt [182,

183]. In ihren Studien zeigte das sprühgetrocknete Fragment-Antikörper 2 (Fab2) eine verminderte Aggregation nach Sprühtrocknung durch Trehalose, die ab einem molaren Trehalose/Protein Verhältnis von 124 mol/mol gesättigt war. Teilweise konnte dies auch in der vorliegenden Studie durch die hohe Vergleichbarkeit der Allergoid-Stabilität zwischen den Chargen 756Tr+ (Trehalose/Allergoid: 110 mol/mol) und 756TrNa (Trehalose/Allergoid: 73 mol/mol) gezeigt werden.

4.3.4. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

Der Fokus dieser Freisetzungsstudie lag besonders auf dem Einfluss einer höheren Gesamtbeladung auf das Freisetzungsverhalten des Allergoids aus den Implantaten. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und des pH-Werts für die Implantate der Chargen 756Tr+ und 756TrNa dargestellt.

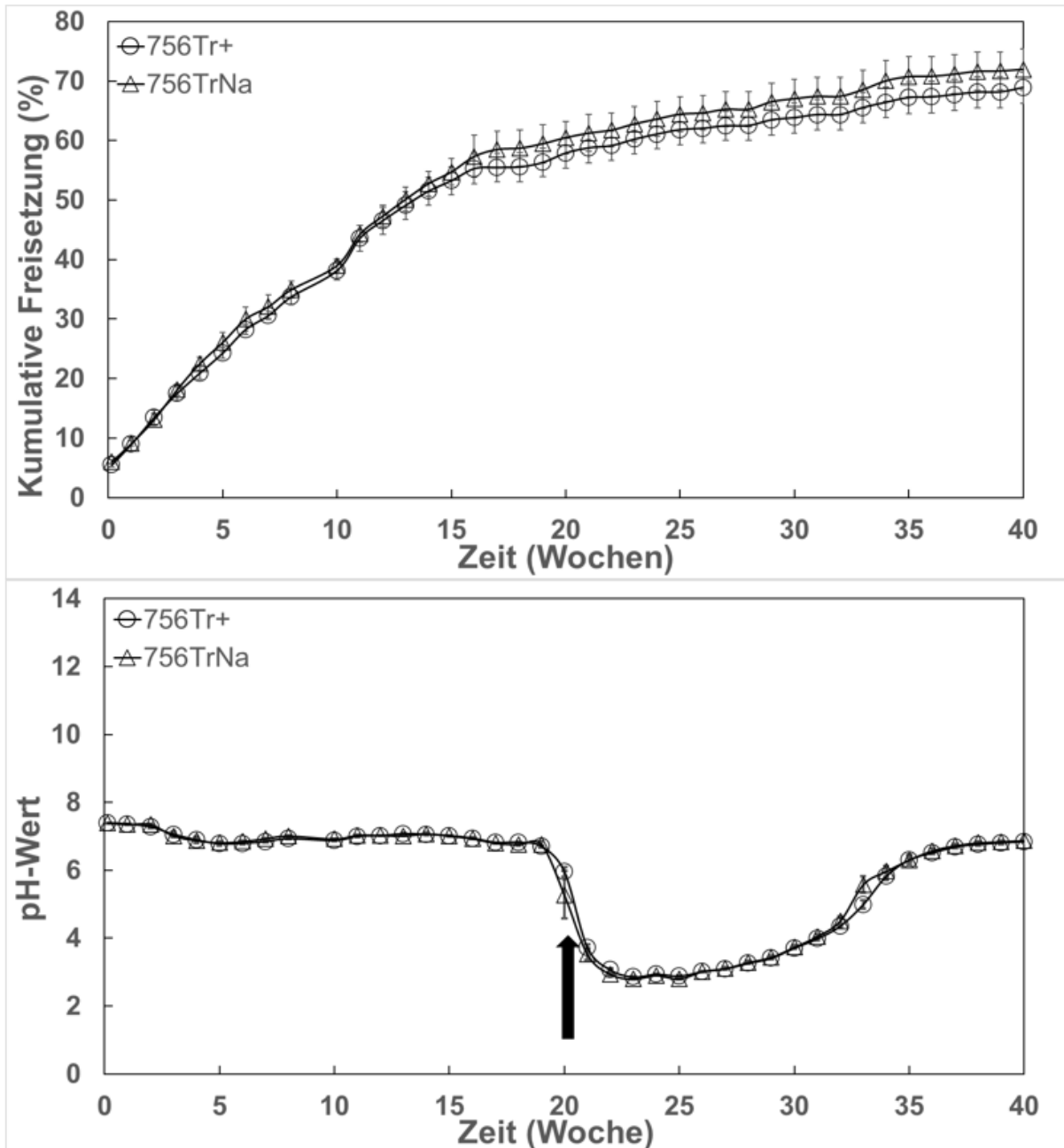


Abbildung 36 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Chargen 504Tr+ und 756TrNa. Pfeil zeigt pH-Abfall. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

In diesem Teil der Arbeit wurde eine kumulative Langzeitfreisetzung des Allergoids aus Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa über einen Zeitraum von 40 Wochen

nachgewiesen. Der Freisetzungsverlauf und der pH-Wert über den Zeitraum der In-vitro-Freisetzung waren für beide Chargen nahezu gleich. Trotz der nachgewiesenen höheren Porosität der Charge 756TrNa im Vergleich zur Charge 756Tr+ (Abbildung 31, Kapitel 4.3.2) hatte dies keinen zusätzlichen Effekt auf den Verlauf der Polymererosion und die In-vitro-Freisetzung.

Beide Chargen zeigten eine erhöhte Initialfreisetzung, bei der nach einer Woche insgesamt 9,0 % ($\pm 1,1$ %) und 9,1 % ($\pm 0,43$ %) aus den Implantaten der Chargen 756Tr+ und 756TrNa freigesetzt wurden (Abbildung 36). Die Initialfreisetzung nach einer Woche war somit deutlich höher im Vergleich zur Charge 756Tr mit 1,5 % ($\pm 0,38$ %) (Kapitel 4.2.4). Für die Proben der Charge 756Tr+ und 756TrNa wurde zwischen Woche 2–16 eine erhöhte wöchentliche Freisetzungsrates von 3,3 % ($\pm 1,0$ %) und 3,4 % ($\pm 1,0$ %) und eine kumulative Freisetzung in diesem Zeitraum von 46,3 % und 48,2 % festgestellt. In den darauffolgenden Wochen (17–40) verringerten sich diese Freisetzungsrates auf jeweils 0,6 % ($\pm 0,4$ %). Die Veränderung war somit früher als der um Woche 20 eintretende pH-Abfall (Abbildung 36, schwarzer Pfeil). Im Gegensatz dazu wurde für die Charge 756Tr eine geringe, jedoch um acht Wochen länger andauernde erhöhte Freisetzungsrates mit 1,9 % ($\pm 0,7$ %) pro Woche festgestellt (Woche 2–23). Für alle drei Chargen wurden ab dem pH-Abfall bis zum Studienende annähernd identische kumulative Freisetzungen mit 11,6 % (756Tr), 11,0 % (756Tr+) und 11,5 % (756TrNa) berechnet, sodass sich für die höhere Gesamtbeladung vor allem ein Effekt auf die Allergoid-Freisetzung in der ersten Hälfte der In-Vitro-Studie zeigte.

Die kumulative Freisetzung nach 40 Wochen war für die Proben der Charge 756Tr+ und 756TrNa mit 68,9 % ($\pm 2,7$ %) und 72,0 % ($\pm 3,5$ %) deutlich höher als bei der Charge 756Tr mit 50,8 %. Am Ende der In-vitro-Freisetzung wurden für die Chargen 756Tr+ und 756TrNa Implantat-Reste von 3,7 % ($\pm 0,4$ %) und 3,9 % ($\pm 0,4$ %) bezogen auf die Implantat-Einwaage festgestellt. Diese waren geringer als bei den vorherigen Chargen des Polymers RG 756 S. Die Problematik der unvollständigen Freisetzung und der Bildung eines schwer löslichen Rückstands aus Allergoid und PLGA-Abbauprodukten zeigte sich jedoch auch in dieser Studie.

Die höhere Gesamtbeladung hatte in dieser Studie keinen Einfluss auf den Zeitpunkt der maximalen Polymererosion, was durch den vergleichbaren pH-Abfall um Woche 20 mit der Charge 756Tr (Abbildung 29, Kapitel 4.2.4) festgestellt wurde. Die Hypothese, dass durch die Ausbildung eines stärkeren Porensystems die Polymererosion verzögert wird, konnte nicht festgestellt werden. Ein entsprechender Effekt wurde beispielweise von Klose *et al.* an Lidocain-haltigen PLGA-Mikropartikeln gezeigt [193].

In dieser Studie zeigten beide Chargen ein vergleichbares Freisetzungsverhalten. Die Initialfreisetzung beider Chargen beeinflusste dabei maßgeblich die Gesamtfreisetzung. Ein

ähnlicher Effekt wurde von Alae et al. anhand von PLA-basierten Levonorgestrel Implantaten mit NaCl gezeigt [194]. In der genannten Studie wurde der Unterschied in der Gesamtfreisetzung durch NaCl lediglich durch die initial freigesetzte Menge beeinflusst. Diese Beobachtung unterstützt die in diesem Kapitel gezeigten Einflüsse auf die Wirkstofffreisetzung. Allerdings wurde in der hier durchgeführten Freisetzungsstudie durch die höhere Gesamtbeladung, neben einer höheren Initialfreisetzung, auch eine höhere wöchentliche Freisetzungsrates beobachtet. Die dabei freigesetzten Mengen an Allergoid lagen deutlich über denen der bisherigen Chargen. Die höhere Gesamtbeladung führte in beiden Fällen zu einem hohen Porensystem innerhalb der Polymermatrix. Dies ermöglichte eine schnellere Penetration und einen höheren Austausch des Freisetzungsmittels, wodurch das Allergoid weniger von Degradation und Präzipitation durch anfallende PLGA-Abbauprodukte betroffen war. Dies begünstigte die höhere Freisetzungsrates. Die Zeit, in der das Allergoid konstant in höheren Konzentrationen aus den Implantaten freigesetzt wurde, war im Vergleich zu Implantaten mit einer geringeren Gesamtbeladung (Charge 756Tr) jedoch verkürzt. Es kann daher hypothesiert werden, dass eine höhere Porosität zu einer Erhöhung der Gesamtfreisetzung führt, die Dauer der konstant erhöhten Freisetzungsrates sich jedoch verkürzen kann. Nach der 15. Woche der In-vitro-Studie könnte das abfallende Konzentrationsgefälle, zwischen dem in der inneren Polymermatrix befindlichen Allergoid und dem freigesetzten Allergoid im äußeren Medium, durch die anfänglich hohen Freisetzungsrates zu einer Reduzierung der Allergoid-Diffusion aus den Implantaten geführt haben. Möglicherweise hätte ein kompletter Austausch des Mediums diesem Effekt entgegengewirkt. Bassand et al. konnten diesbezüglich für PLGA-basierte Ibuprofen-Implantate eine höhere Freisetzung bei einem vollständigen Pufferaustausch in-vitro zeigen [195]. Die Leitlinien der FIP („*Federation Internationale Pharmaceutique*“) und der AAPS („*Association of Pharmaceutical Scientists*“) empfehlen beispielsweise die Verwendung von Durchflussapparaturen für In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen von neuartigen/besonderen Darreichungsformen, um einen konstanten Abtransport von Freisetzungsmitteln zu gewährleisten [196].

4.3.5. Kapitelzusammenfassung

In diesem Entwicklungsabschnitt konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Extrusion für Chargen mit einer höheren Gesamtbeladung (17,5 %) und schnelleren Zuführraten möglich ist. Der Herstellungsprozess erzeugte Implantate mit Allergoid-Anteilen nahe dem Soll-Wert. Jedoch wurde eine stark poröse innere Struktur mit größeren Feststoffpartikeln festgestellt, was auf eine inhomogene Vermischung von polymeren und nichtpolymeren Komponenten hindeutet. Das Allergoid aus den Implantaten der Chargen dieses Kapitels unterschied sich von denen in Kapitel 4.1 und 4.2 hinsichtlich einer besseren Erhaltung der allgemeinen physikochemischen und immunologischen Eigenschaften des Allergoids. Dies lässt sich auf

die kürzere Extrusionsdauer und der damit zusammenhängenden kürzeren Verweildauer des Allergoids im Extruder zurückführen. Ein zusätzlicher stabilisierender Effekt auf das Allergoid durch eine höhere Trehalose-Beladung zeigte sich in diesem Teil der Arbeit nur bei der Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität. In der In-vitro-Freisetzung wurde ein Zusammenhang zwischen einer höheren Hilfsstoffbeladung und einer erhöhten Gesamtfreisetzung gezeigt, unabhängig von den Hilfsstoffeigenschaften. Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss der Freisetzungsmethodik auf den vorzeitigen Abfall der hohen wöchentlichen Freisetzungsraten festgestellt. Eine unvollständige Freisetzung mit der Bildung von schwerlöslichen Rückständen, bestehend aus Allergoid und PLGA-Abbauprodukten, zeigte sich auch in dieser Studie. Da jedoch für die Chargen dieses Kapitels die bisher höchsten Freisetzungsraten ermittelt wurden, wurde in den folgenden Experimenten eine Gesamtbeladung von 17,5 % beibehalten.

4.4. Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit $Mg(OH)_2$ als pH-Stabilisator

4.4.1. Einleitung und Herstellungsprozess

In diesem Entwicklungsabschnitt wurde der Einfluss von $Mg(OH)_2$ als pH-Stabilisator während der In-vitro-Freisetzung untersucht. Es wurden Implantat-Chargen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % für die Polymere RG 504 H und RG 756 S hergestellt. Dafür wurden den Formulierungen neben 10 % Allergoid und 5 % Trehalose, 2,5 % $Mg(OH)_2$ zugesetzt. Folgende Fragestellungen wurden dabei untersucht:

- Die Durchführbarkeit der Extrusion mit $Mg(OH)_2$ als Hilfsstoff und dessen Einfluss auf die Allergoid-Stabilität während der Lyophilisierung und Extrusion.
- Der Einfluss von $Mg(OH)_2$ in der ausgewählten Konzentration auf die Polymererosion und die In-vitro-Freisetzung des Allergoids.
- Die Optimierung der Allergoid-Stabilität in-vitro durch $Mg(OH)_2$.

Die Hilfsstoffe und der Wirkstoff wurden vor der Extrusion in VE- H_2O gelöst und lyophilisiert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von $Mg(OH)_2$ in Wasser wurde der Hilfsstoff als Suspension lyophilisiert [197]. In einem Vorversuch wurde die prozentuale Allergoid-Wiederfindung und die Allergoid-Stabilität nach Lyophilisierung analysiert, um zu prüfen, ob ein Lyophilisat mit einer homogenen Allergoid- und Hilfsstoffverteilung erzeugt wurde und ob der Prozess einen Einfluss auf die Allergoid-Stabilität hatte.

Bei der Bestimmung des Allergoid-Gehalts wurde für das Allergoid-Trehalose- $Mg(OH)_2$ -Lyophilisat eine prozentuale Wiederfindung von 101,7 % ($\pm 1,6$ %, $n = 3$) bestimmt. Der pH-Wert der Proben betrug pH 9,8 ($\pm 0,1$) und lag somit höher als der pH-Wert einer reinen

Birken-Allergoid-Probe (pH 7,6). Daraus lässt sich auf das Vorhandensein von $Mg(OH)_2$ im Lyophilisat schließen. Die Allergoid-Stabilität nach Lyophilisierung wurde anhand der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA, nativer IEF und SEC beurteilt. Die Bestimmung der IgG-basierten Aktivität ergab für die Proben des Allergoid-Trehalose- $Mg(OH)_2$ -Lyophilisats eine Bindungsaktivität von 124.591 GPU/mg (\pm 3.699 GPU/mg, n = 3). Damit wichen die Proben um weniger als 1 % von der vermessenden Referenz-4 mit 125.361 GPU/mg (n = 1) ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Lyophilisierung keinen Einfluss auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids hatte.

Mit der Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels nativer IEF wurde untersucht, ob die Lyophilisierung einen Einfluss auf die Oberflächenladung des Allergoids hatte. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt.

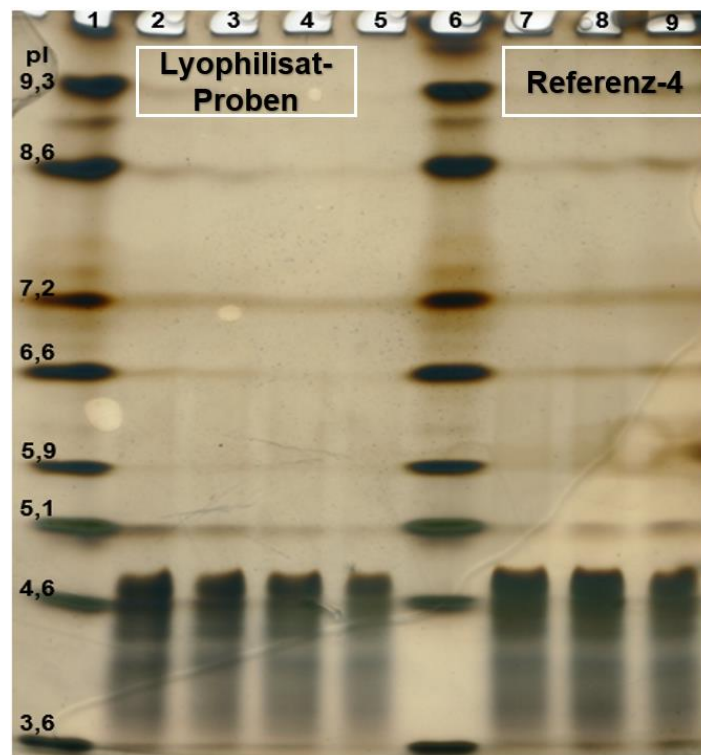


Abbildung 37 IEF-Gel, Proteindetektion mittels Silberfärbung für Proben des Allergoid-Trehalose- $Mg(OH)_2$ -Lyophilisats (Spur 2–5, n = 4), Referenz-4 (Spur 7–9, n = 3) und dem Proteinmarker (Spur 1 und -6).

Die Proben des hergestellten Allergoid-Trehalose- $Mg(OH)_2$ -Lyophilisats zeigten alle das typische IEF-Bandenmuster der korrespondierenden Referenz-4 mit pI's im Bereich von 3,6–5,1. Die Oberflächenladung des Allergoids wurde somit durch die Lyophilisierung nicht beeinflusst.

Die SEC-Analyse wurde in diesem Vorversuch eingesetzt, um mögliche strukturelle Veränderungen des Allergoids oder Aggregatbildungen durch Veränderungen im Elutionsprofil zu erkennen.

Die erzeugten Chromatogramme der Allergoid-Trehalose-Mg(OH)₂-Lyophilisat-Proben sowie der Referenz-4 sind in Abbildung 38 dargestellt.

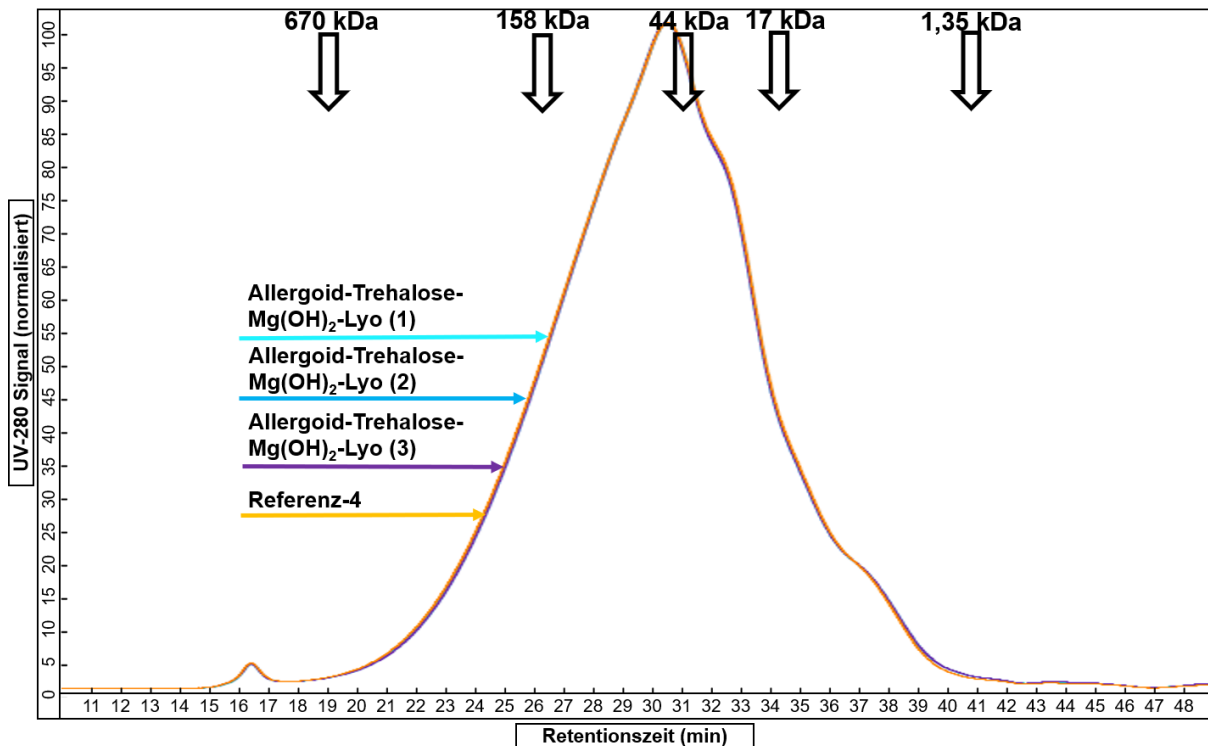


Abbildung 38 SEC-Chromatogramme des gelösten Allergoid-Trehalose-Mg(OH)₂-Lyophilisats sowie der Referenz-4 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Die erzeugten Chromatogramme des Allergoid-Trehalose-Mg(OH)₂-Lyophilisats waren mit dem Chromatogramm der Referenz-4 identisch (Abbildung 38). Anhand der SEC-Analytik wurde gezeigt, dass die Allergoid-Integrität durch die Lyophilisierung nicht verändert wurde.

In dem Vorversuch konnte mit verschiedenen Methoden (Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität, native IEF und SEC) nachgewiesen werden, dass der erhöhte pH-Wert der Suspension und die Lyophilisierung keinen Einfluss auf die Allergoid-Stabilität haben. Um diese Ergebnisse auch für das Allergoid nach Extrusion zu überprüfen und den Einfluss von Mg(OH)₂ als pH-Stabilisator in der In-vitro-Studie zu untersuchen, wurde aus dem Allergoid-Trehalose-Mg(OH)₂-Lyophilisat jeweils eine Implantat-Charge für die Polymere RG 504 H und RG 756 S hergestellt.

Die Prozessparameter der Extrusion der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 SME-Prozessparameter für die Chargen 504TrMg und 756TrMg(1). (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute).

Charge	504TrMg	756TrMg(1)
Zusammensetzung		
RG 756 S	--	X
RG 504 H	X	--
10 % (m/m) Birken-Allergoid	X	X
5 % (m/m) Trehalose	X	X
2,5 % (m/m) Mg(OH) ₂	X	X
Allergoid-Charge	W8003765	W8003765
SME-Prozessparameter		
Chargengröße (g)	4,9	5,0
Zuführrate (g/min)	0,54	0,56
Prozesszeit (min)	30	26
Maximaldruck (bar)	86	95
Ausbeute (%)	30,6	30,0

Die Extrusion verlief in beiden Fällen erfolgreich. Dabei wurde für die Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) eine Prozesszeit von 30 min bei einem Maximaldruck von 86 bar bzw. eine Prozesszeit von 26 min bei einem Maximaldruck von 95 bar gemessen. Die Prozesszeiten waren aufgrund der verringerten Zuführrate im Vergleich zu den Chargen 756Tr+ und 756TrNa aus Kapitel 4.3.1 um 7 bzw. 11 min verlängert. Der Maximaldruck der Charge 504TrMg war im Vergleich zu der Charge 504Tr aus Kapitel 4.2.1 um 6 bar höher, was auf die schnellere Zuführrate im Vergleich zu dieser Charge und der höheren Gesamtbeladung zurückgeführt wurde. Dadurch erhöhte sich die Ausbeute im Vergleich zu den anderen Chargen des Polymers RG 504 H. Der Maximaldruck der Charge 756TrMg(1) war vergleichbar mit dem der bisher produzierten Chargen des Polymers RG 756 S. Die Ausbeute der beiden Chargen dieses Kapitels war ebenfalls vergleichbar mit den bisher produzierten Chargen. Unter der Berücksichtigung, dass ca. 3 g des Materials zum Befüllen der Extruderdüse benötigt wurden, kann in beiden Fällen davon ausgegangen werden, dass das Material optimal durch den Extruderraum gefördert wurde.

4.4.2. Morphologische Charakterisierung der Implantate

In diesem Teil der Arbeit wurde die morphologische Charakterisierung der Implantate zur Beurteilung des Herstellungsprozesses der eingesetzten Formulierungen verwendet. Dabei wurden stets Implantate aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats verwendet. In Kapitel 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass der Herstellungsprozess morphologisch homogene Implantate mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % für das Polymer RG 756 S erzeugt. Die Hilfsstoffe, die für die Lyophilisierung verwendet wurden, waren anders als in diesem Kapitel gut in Wasser löslich. Die Beurteilung der Beladung von $Mg(OH)_2$ in der Polymermatrix der Implantate war daher von besonderem Interesse. Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate sowie die Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1).

Tabelle 32 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1). Angabe von MW \pm SD.

Parameter	504TrMg	756TrMg(1)
Masse (mg) (n = 10)	27,9 (\pm 1,1)	26,5 (\pm 0,8)
Länge (mm) (n = 10)	5,4 (\pm 0,2)	5,3 (\pm 0,2)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,0 (\pm 0,0)	2,0 (\pm 0,00)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	101,4 (\pm 1,6)	102,2 (\pm 1,0)

Die Bestimmung der Masse, Länge und Durchmesser der Implantate der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) ergab für beide Chargen vergleichbare Ergebnisse. Obwohl bei der Charge 504TrMg der bislang höchste Düsendruck bei der Verarbeitung des Polymers RG 504 H gemessen wurde, konnte der in Kapitel 4.1.4 und 4.2.2 beschriebene Barus-Effekt nicht festgestellt werden. Möglicherweise hat genau dies oder die höhere Gesamtbeladung diesem Effekt entgegengewirkt. Das Massen-/Längen-Verhältnis der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) war mit 5,2 mg/mm und 5,0 mg/mm vergleichbar zu den bisherigen Chargen. Die Berechnung der Allergoid-Wiederfindung aus einzelnen Implantaten ergab für die Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) eine Rückgewinnung des Allergoids nahe dem Soll-Wert mit niedrigen Standardabweichungen. Wäre es zu einer Entmischung von $Mg(OH)_2$ während oder vor der Extrusion gekommen, wäre dies möglicherweise anhand eines Allergoid-Gehalts über dem Sollwert messbar gewesen.

Durch die REM-Analyse der Mantelfläche der hergestellten Implantate 504TrMg und 756TrMg(1) wurde die Mantelflächenbeschaffenheit der Implantate bewertet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 39 dargestellt.

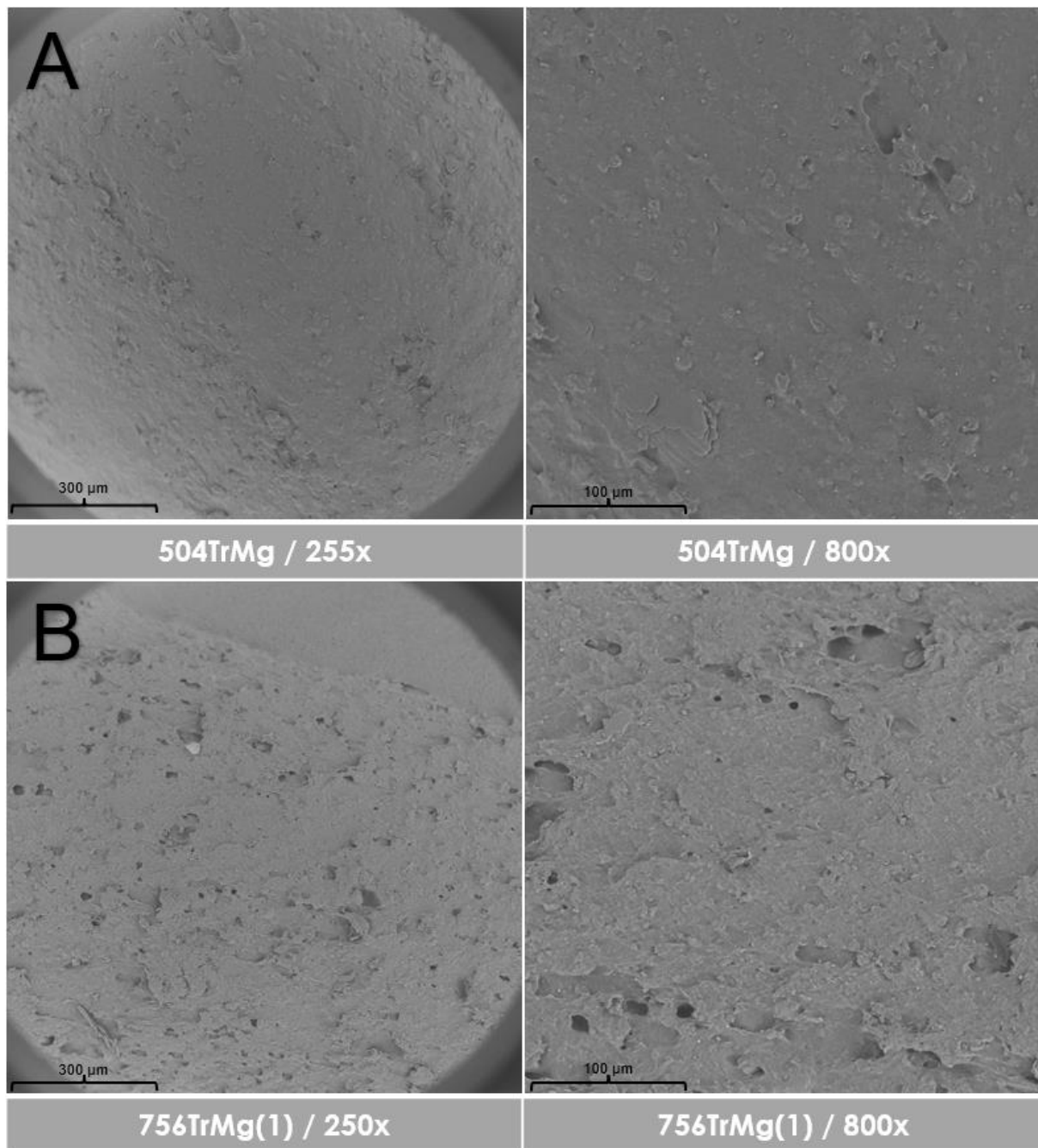


Abbildung 39 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 504TrMg (A) und 756TrMg(1) (B).

Die Mantelflächenanalyse der Implantate der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) ergab für die Charge des Polymers RG 504 H (504TrMg), eine leicht glattere Mantelfläche als für die Charge des Polymers RG 756 S (756TrMg(1)). Dies lässt sich auf die bessere Erweichung des Polymers RG 504 H bei den verwendeten Prozesstemperaturen zurückführen, was bereits in Kapitel 4.1.5 und 4.2.2 beschrieben wurde. Für die Charge 756TrMg(1) wurde eine

vergleichbare Mantelflächenstruktur wie bei den Chargen 756Tr+ und 756TrNa beobachtet (Kapitel 4.3.2). Bei beiden Chargen dieses Kapitels wurde die Verteilung von partikulären Strukturen auf dem untersuchten Implantat beobachtet, die bei 800-facher Vergrößerung detektierbar waren (Abbildung 39). Diese stellen eine homogene Verteilung der Beladung im untersuchten Bereich dar.

Zur Bewertung der inneren Morphologie, wurden Implantat-Querschnitte der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) mittels REM-Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt.

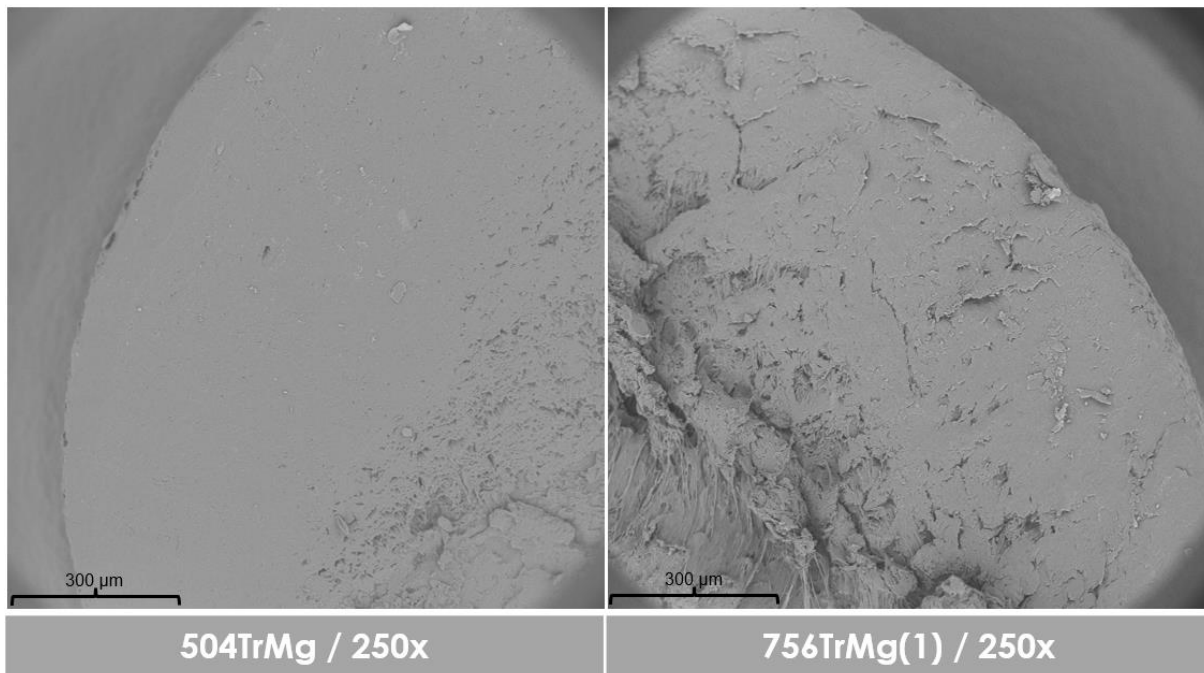


Abbildung 40 REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte von Proben der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1).

Die REM-Aufnahme des Implantat-Querschnittes der Charge 504TrMg zeigte eine ähnlich geringe innere Porosität wie Charge 504Tr (Abbildung 23, Kapitel 4.2.2). Für die Charge 756TrMg(1) wurde das Vorhandensein größerer Hohlräume oder stark unebener Strukturen, wie es bei den Chargen 756Tr+ und 756TrNa (Kapitel 4.3.2, Abbildung 31) beobachtet wurde, nicht festgestellt. Dies kann auf die niedrigere Zuführrate und damit längere Verweilzeit im Extruder zurückgeführt werden. Dennoch erschien die innere Struktur des Implantat-Querschnittes der Charge 756TrMg(1) poröser und unebener im Vergleich zur Charge 504TrMg (Abbildung 40), was auf der bereits beschriebenen, besseren Erweichung des Polymers RG 504 H unter den gegebenen Prozesstemperaturen basiert. Die deutlich erkennbaren unebenen Strukturen im unteren Teil des Implantat-Querschnittes der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) entstanden womöglich durch die Probenvorbereitung.

In diesem Entwicklungsabschnitt wurde die erfolgreiche Herstellung von Birken-Allergoid Implantaten mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % und dem Zusatz von Trehalose und

Mg(OH)₂ für die Polymere RG 504 H und RG 756 S nachgewiesen. Die Extrusion erzeugte dabei morphologisch homogene Implantate mit einheitlicher Mantelflächenbeschaffenheit und einem Allergoid-Anteil nahe dem Soll-Gehalt. Für beide Chargen konnte eine geringe Porosität der inneren und äußeren Polymermatrix festgestellt werden, was auf eine optimale Erweichung des Polymers schließen lässt. Dies ermöglichte eine vollständige Einarbeitung der Hilfsstoffe und des Wirkstoffs in die Polymermatrix.

4.4.3. Allergoid-Charakterisierung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung von extrahiertem Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) beschrieben. Diese Studie diente der Beurteilung der Allergoid-Stabilität nach Extrusion. In dem Vorversuch wurde ein Einfluss der Lyophilisierung auf die Allergoid-Stabilität ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung wurden durch den Vergleich mit der Referenz-4 bewertet.

4.4.3.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

In Tabelle 33 sind die Ergebnisse zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius mittels DLS-Analytik dargestellt.

Tabelle 33 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg (n = 6) und 756TrMg(1) (n = 6) sowie der Referenz-4 (n = 3). Darstellung des mittleren R_h-Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW ± SD.

Probe	Referenz-4	504TrMg	756TrMg(1)
Mittlerer R _h -Wert (nm)	1,6 (± 0,3)	1,9 (± 0,4)	1,7 (± 0,5)
Prozentualer Massenanteil (%)	99,5 (± 0,5)	97,5 (± 1,6)	95,2 (± 1,2)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	100 (± 0,0)	100 (± 0,0)	99,9 (± 0,0)

Für die Proben der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) konnten vergleichbare Ergebnisse zur Referenz-4 bezüglich des mittleren Rh-Werts festgestellt werden. Die dabei gemessenen niedrigen R_h-Werte mit hohen prozentualen Massen- und numerischen Anteilen deuten auf eine unveränderte Allergoid-Größe und das Fehlen von löslichen Aggregaten hin. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der Charge 756Tr+ und 756TrNa (Tabelle 28, Kapitel 4.3.3.1).

4.4.3.2. Bestimmung der molekularen Masse und R_h-Wert mittels SEC-Analyse

Die erzeugten Chromatogramme der SEC-Analytik sind für die Proben der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) in Abbildung 41 bzw. Abbildung 42 dargestellt. Da die Untersuchungen der

einzelnen Chargen in separaten SEC-Läufen durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse der entsprechenden Chargen in eigenen Abbildungen aufgeführt.

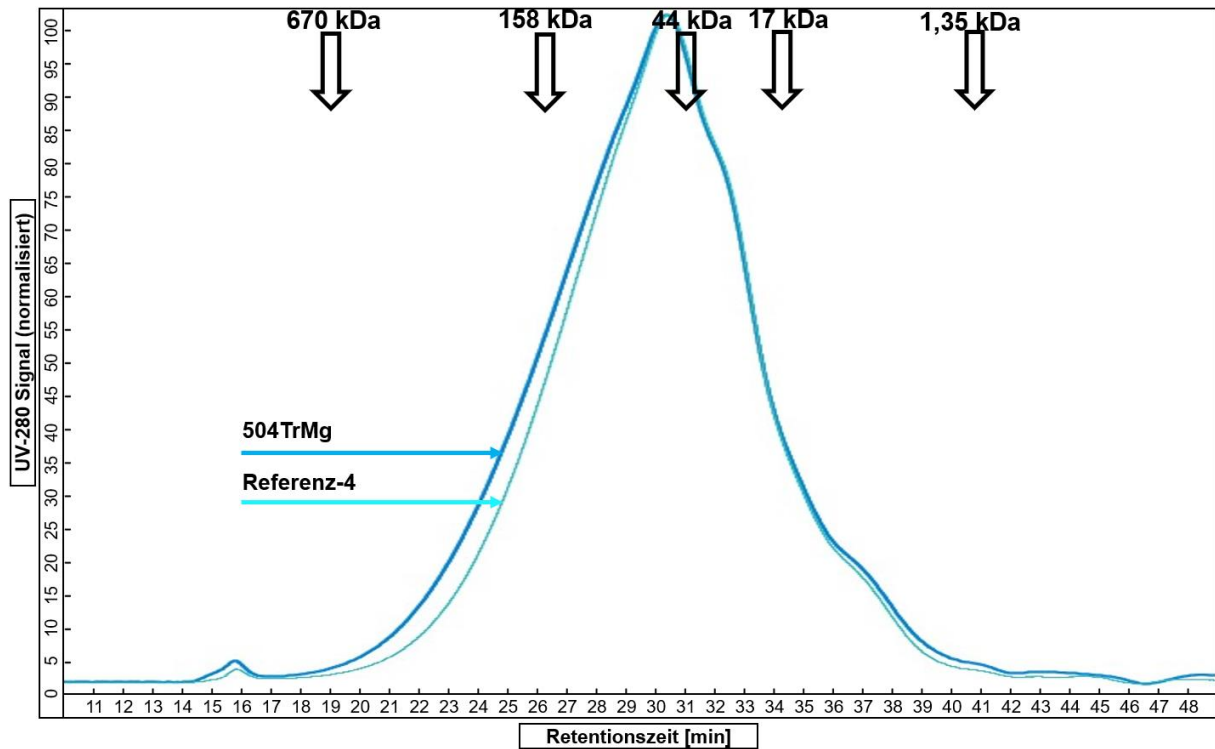


Abbildung 41 SEC-Chromatogramm des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 504TrMg sowie der Referenz-4 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

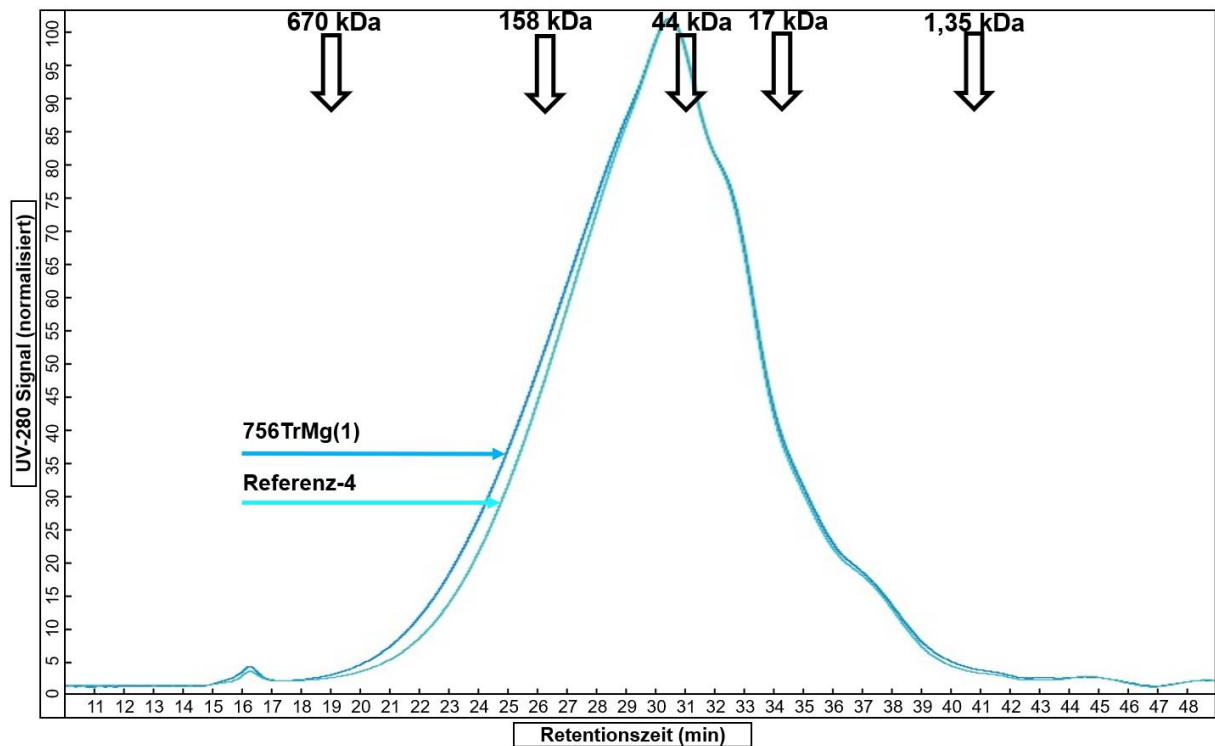


Abbildung 42 SEC-Chromatogramm des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(1) sowie der Referenz-4 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 504TrMg (Abbildung 41) und 756TrMg(1) (Abbildung 42) konnten lediglich minimale Unterschiede im Bereich der Retentionszeiten von 20–29 min zu der Referenz-4 festgestellt werden, was für den Erhalt der Allergoid-Struktur nach Extrusion spricht. Trotz der höheren Prozesstemperaturen während der Extrusion der Charge 756TrMg(1), zeigte das extrahierte Allergoid dieser Charge ein vergleichbares SEC-Chromatogramm zu der Charge 504TrMg. Dies begründet sich auf der stabilisierenden Wirkung von Trehalose auf das Allergoid gegenüber der erhöhten Temperatur während der SME. Die Chromatogramme der Proben der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) waren vergleichbar zu den Chromatogrammen der Chargen aus Kapitel 4.2.3.2 und Kapitel 4.3.3.2. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur eine Probe pro Charge exemplarisch in Abbildung 41 bzw. Abbildung 42 dargestellt und die restlichen Chromatogramme dem Anhang beigefügt (Kapitel 8.2, Abbildung 79 und Abbildung 80).

Tabelle 34 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) und der Referenzprobe Referenz-4.

Tabelle 34 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg (n = 6) und 756Trmg(1) (n = 6) sowie Referenz-4 (n = 3). Angabe von MW \pm SD. ¹SEC-Lauf 1, ²SEC-Lauf 2.

Probe	Referenz-4 ¹	504TrMg ¹	Referenz-4 ²	756TrMg(1) ²
Molekulare Masse (kDa)	45,6 (\pm 0,1)	45,9 (\pm 0,2)	45,9 (\pm 0,1)	46,5 (\pm 0,4)
R_h -Wert (nm)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)

Für alle Proben wurden vergleichbare Ergebnisse bei der Berechnung der molekularen Masse und sogar identische Werte für den R_h -Wert festgestellt. Ein Erhalt der hydrodynamischen Größe und der molekularen Masse nach Extrusion konnte für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) bestimmt werden und bestätigt den mittels DLS-Analytik gezeigten Erhalt des R_h -Werts des Allergoids.

4.4.3.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels native IEF

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der IEF-Analyse für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sowie der Referenz-4 dargestellt.

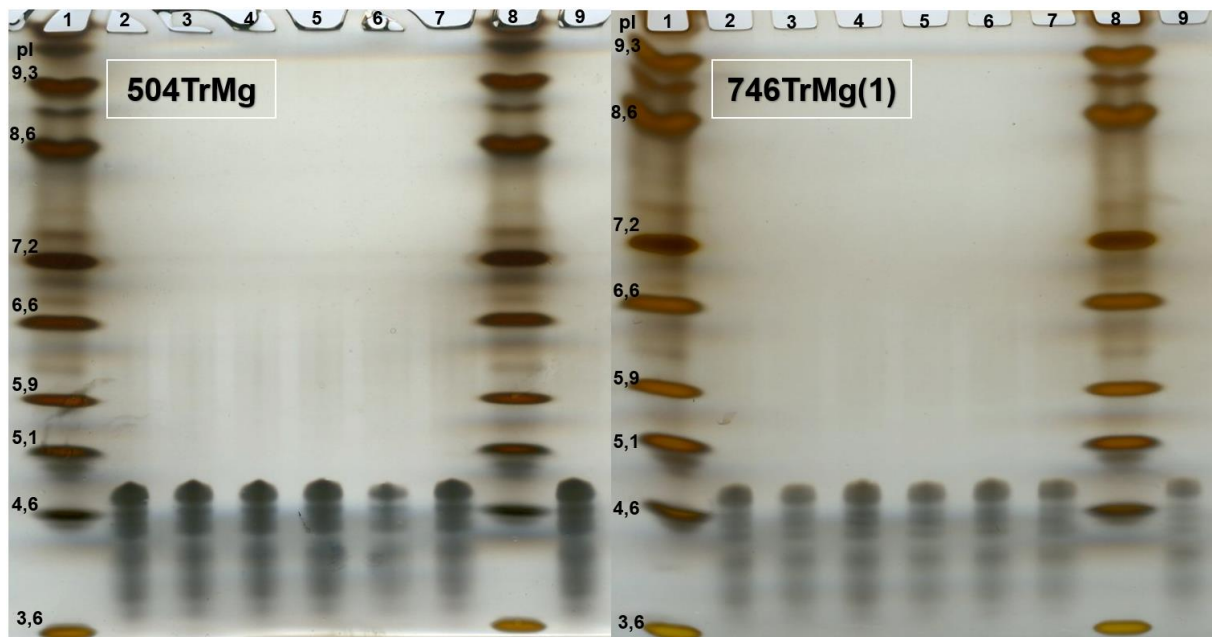


Abbildung 43 IEF-Gele, Proteindetektion mittels Silberfärbung. Links: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 504TrMg (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-4 (Spur 9, n = 1) sowie dem Proteinmarker (Spur 1 und 8). Rechts: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(1) (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-4 (Spur 9, n = 1) sowie dem Proteinmarker (Spur 1 und 8).

Das extrahierte Allergoid der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) zeigte das typische IEF-Bandenmuster der Referenz-4 mit Banden im Bereich von pI 3,6–5,1. Mit der IEF-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Extrusion keinen Einfluss auf die Oberflächenladung des Allergoids hat und von einem Erhalt oberflächenladungsspezifischer Strukturen, wie positiv geladene Aminogruppen, ausgegangen werden kann.

4.4.3.4. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Abbildung 44 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sowie der Referenz-4.

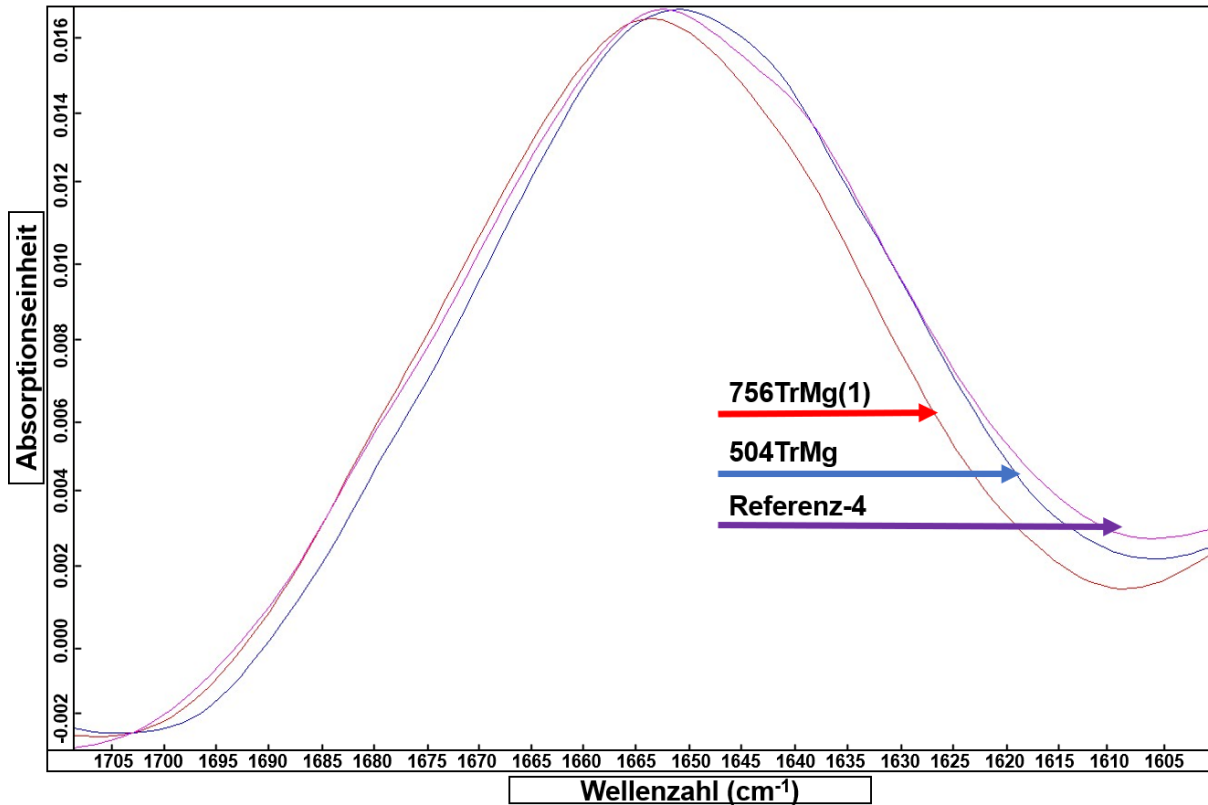


Abbildung 44 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sowie der Referenz-4. $n = 1$.

Beim Vergleich der Spektren wurde eine geringfügige Absorptionsabnahme für die Probe der Chargen 504TrMg im Bereich von $1700\text{--}1665\text{ cm}^{-1}$ und 756TrMg(1) im Bereich von $1650\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$ festgestellt. In beiden Fällen deutet dies auf geringfügige strukturelle Veränderungen des Allergoids nach Extrusion hin. Die Entstehung von β -Aggregation wurde aufgrund des Fehlens von Schulterbildungen im Bereich der Amid I-Bande ausgeschlossen.

In Tabelle 35 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile und des Korrelationskoeffizienten mit Referenz-4 dargestellt.

Tabelle 35 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) und der Referenz-4 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-4. n = 1.

Probe	Referenz-4	504TrMg	756TrMg(1)
Gehalt α -Helix (%)	25,9	30,2	22,1
Gehalt β -Faltblatt (%)	19,1	21,1	14,6
Korrelationskoeffizient mit Referenz-4 (%)	--	93,4	89,1

Die Berechnung des α -Helix- und β -Faltblattgehalts ergab für das extrahierte Allergoid der Charge 504TrMg nur geringfügige Unterschiede zu der Referenz-4. Diese zeigten sich in einer Erhöhung der α -Helixstrukturanteile. Zusätzlich wurde ein hoher Korrelationskoeffizient mit der Referenz-4 berechnet. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(1) wurde eine leichte Abnahme des α -Helix- und β -Faltblattgehalts sowie ein verringerter Korrelationskoeffizient beim Vergleich mit der Referenz-4 festgestellt. In beiden Fällen könnte dies auf eine geringfügige Veränderung des Allergoids durch den Herstellungsprozess hindeuten. Der allgemeine Erhalt der Allergoid-spezifischen Sekundärstrukturanteile konnte jedoch für beide Chargen weitestgehend gezeigt werden.

4.4.3.5. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

In Abbildung 45 sind die Messungen der IgG-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sowie der Referenz-4 dargestellt.

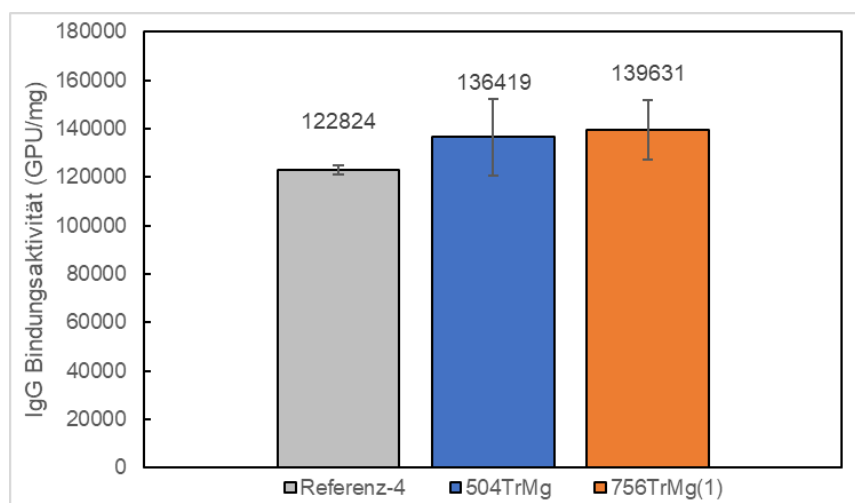


Abbildung 45 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) sowie der Referenz-4. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Für das extrahierte Allergoid der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) wurden bei der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität vergleichbare Bindungsaktivitäten mit der Referenz-4 festgestellt. Für die Charge 504TrMg wurde ein prozentualer Anstieg von 11,1 % im Verhältnis zur Referenz-4 berechnet. Für die Charge 756TrMg(1) betrug der Anstieg 13,7 %. In beiden Fällen wurde jedoch auch eine höhere Standardabweichung festgestellt. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(1) war die Abweichung von der Referenzprobe im Vergleich zu der Charge 756Tr+ (4,5 %, Kapitel 4.3.3.4) höher. Die geringere Trehalose-Beladung könnte das Allergoid während der Extrusion weniger geschützt haben, was zur Exposition von IgG-Epitopen führte. Ein Einfluss der längeren Extrusionsdauer der Charge 756TrMg(1) (26 min) wurde aufgrund der hohen Vergleichbarkeit zu der Charge 756TrNa (20 min) aus Kapitel 4.3.3.4 ausgeschlossen. Ein Einfluss der Lyophilisierung auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids wurde in einem Vorversuch ebenfalls ausgeschlossen. Grundsätzlich kann aufgrund der Variabilität des ELISAs von einem Erhalt der IgG-Bindungsaktivität für das Allergoid der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) ausgegangen werden. Für die Referenz-4 konnte in dieser Studie ein vergleichbares Ergebnis zu der in Kapitel 4.3.3.4 vermessenden Referenz-4 gezeigt werden. Die Abweichung zwischen den Proben betrug 8,2 %.

4.4.3.6. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die IgE-Bindungsaktivität nur geringfügig von der Extrusion für Formulierungen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % beeinflusst wurde (Kapitel 4.3.3.5). Da in dieser Studie jedoch eine andere Formulierungszusammensetzung verwendet und länger extrudiert wurde, wurde diese Methode zur Überprüfung dieser Einflüsse auf die IgE-Bindungsaktivität verwendet. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

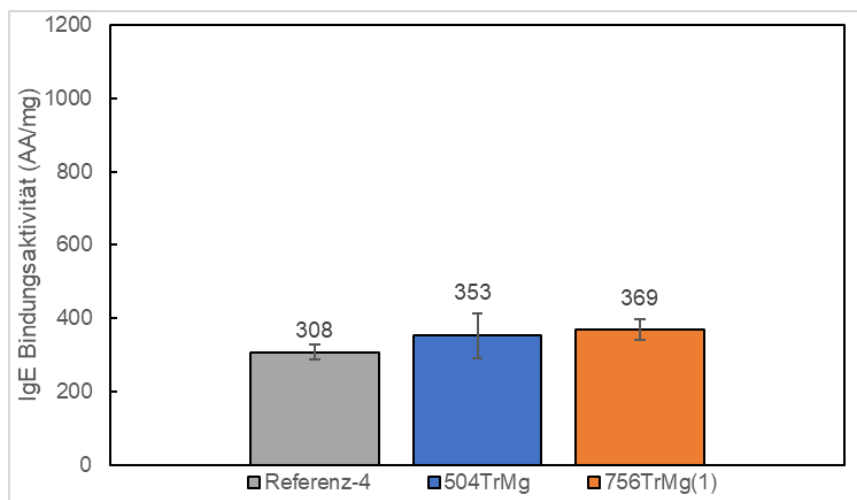


Abbildung 46 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 504TrMg (n = 6) und 756TrMg(1) (n = 6) sowie der Referenz-4 (n = 3). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken).

Alle gemessenen Proben zeigten untereinander vergleichbare Ergebnisse. Für das aus den Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) extrahierte Allergoid wurde eine prozentuale Abweichung von der Referenz-4 von 14,6 % und 19,9 % berechnet. In beiden Fällen deuten diese Ergebnisse auf geringfügige strukturelle Veränderungen des Allergoids hin. Die im Vergleich zu den Chargen 756Tr+ und 756TrNa längeren Prozesszeiten könnten diese Veränderungen, die mit der Exposition von IgE-Epitopen einhergingen, beeinflusst haben. Grundsätzlich kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die generell reduzierte IgE-Bindungsaktivität des Allergoids auch in beiden Chargen dieses Kapitels erhalten blieb. Beim Vergleich der Referenz-4 aus diesem Kapitel mit den Werten der Referenz-4 aus Kapitel 4.3.3.5 wurden deutlich niedrigere Aktivitätswerte gemessen. Dies ist auf einem Wechsel des Primärantikörpers vor der Messung der Proben aus Kapitel 4.3.3.5 zurückzuführen.

4.4.3.7. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Mit der Allergoid-Analytik konnte in diesem Kapitel eine hohe Vergleichbarkeit zwischen der Referenzprobe und dem extrahiertem Allergoid aus den Implantaten der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) gezeigt werden. Generell konnte mit allen Methoden ein grundsätzlicher Erhalt der Allergoid-spezifischen Eigenschaften nach Extrusion für Formulierungen mit Trehalose und $Mg(OH)_2$ sowie den Polymeren RG 504 H bzw. RG 756 S gezeigt werden. Bei den Bestimmungen der Bindungsaktivitäten sowie der Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR wurden nur geringfügige Einflüsse auf die Allergoid-Integrität durch die Extrusion beobachtet, was möglicherweise auf die geringere Trehalose-Beladung und die längeren Prozesszeiten zurückgeführt werden kann.

4.4.4. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der In-vitro-Freisetzung der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) dargestellt und diskutiert. In Kapitel 4.1.7 und Kapitel 4.2.4 wurde eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität für das Allergoid im Verlauf der In-vitro-Freisetzung beobachtet, die auf die Bildung eines sauren pH-Werts zurückgeführt wurde. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, eine Pufferung innerhalb der Polymermatrix durch $Mg(OH)_2$ während des Polymerabbaus und der Bildung von PLGA-Abbauprodukten zu bewirken. Hierzu wurde die Allergoid-Stabilität anhand des Parameters IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Freisetzung untersucht.

In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und des pH-Werts für die Implantate der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) dargestellt.

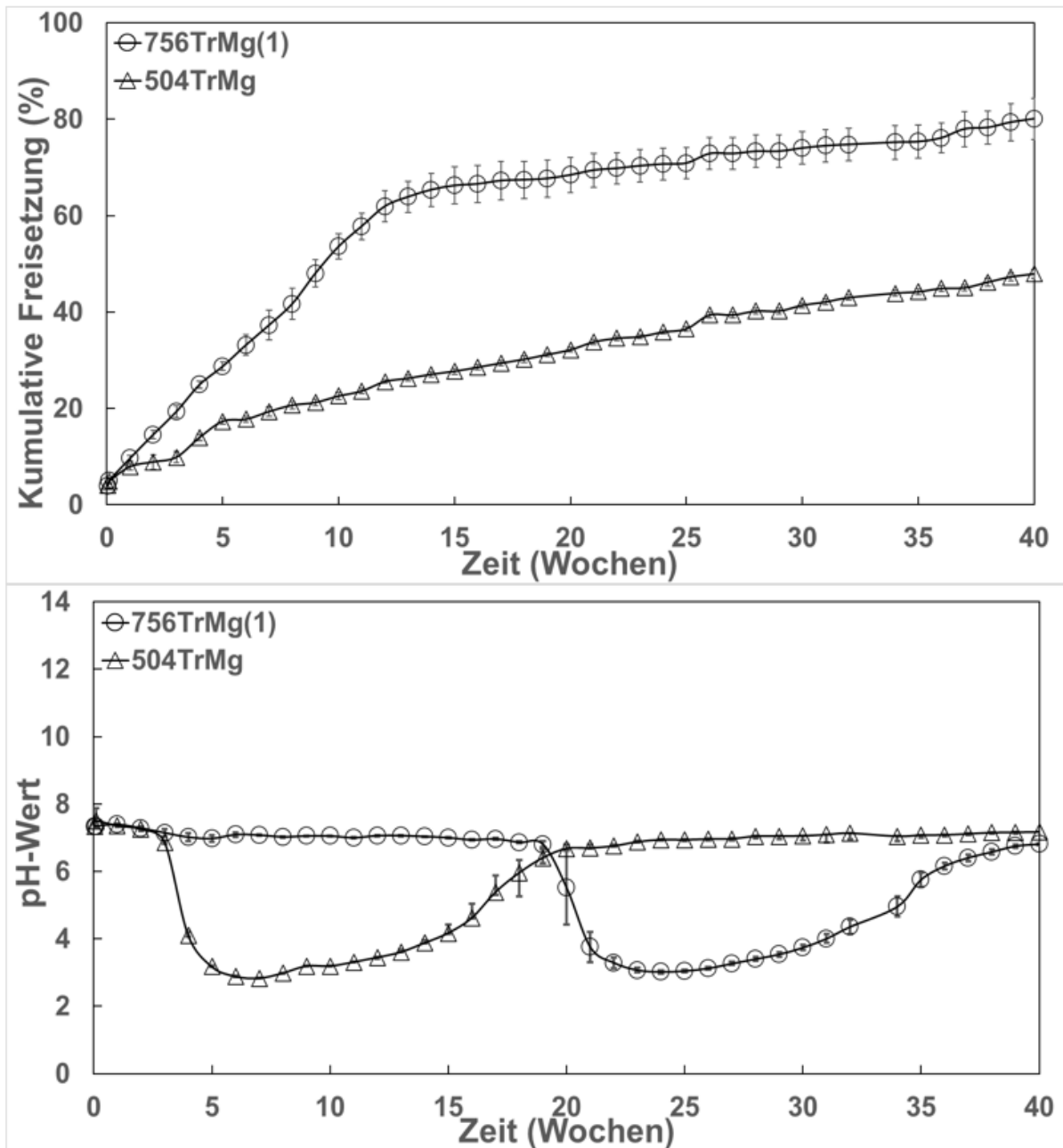


Abbildung 47 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Chargen 504TrMg und 756TrMg(1). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

In dieser Untersuchung konnte für die Chargen 504TrMg und 756TrMg(1) eine Langzeitfreisetzung des Allergoids über einen Zeitraum von 40 Wochen beobachtet werden. Für die Charge 756TrMg(1) wurde ein Einfluss der Gesamtbeladung und der Hilfsstoffzusammensetzung auf das Freisetzungsverhalten der Implantate festgestellt. Für die Charge 504TrMg war dies nicht bzw. nur geringfügig der Fall. Der unterschiedliche pH-

Verlauf der beiden Chargen wurde auf die in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Eigenschaften der jeweiligen Polymere zurückgeführt. Im folgenden Abschnitt werden die Chargen einzeln beschrieben und mit den korrespondierenden Chargen aus den vorangegangenen Kapiteln verglichen.

Charge 504TrMg:

In Abbildung 48 sind die Freisetzungsverläufe und pH-Werte im Freisetzungsmedium für die Chargen 504, 504Tr und 504TrMg dargestellt.

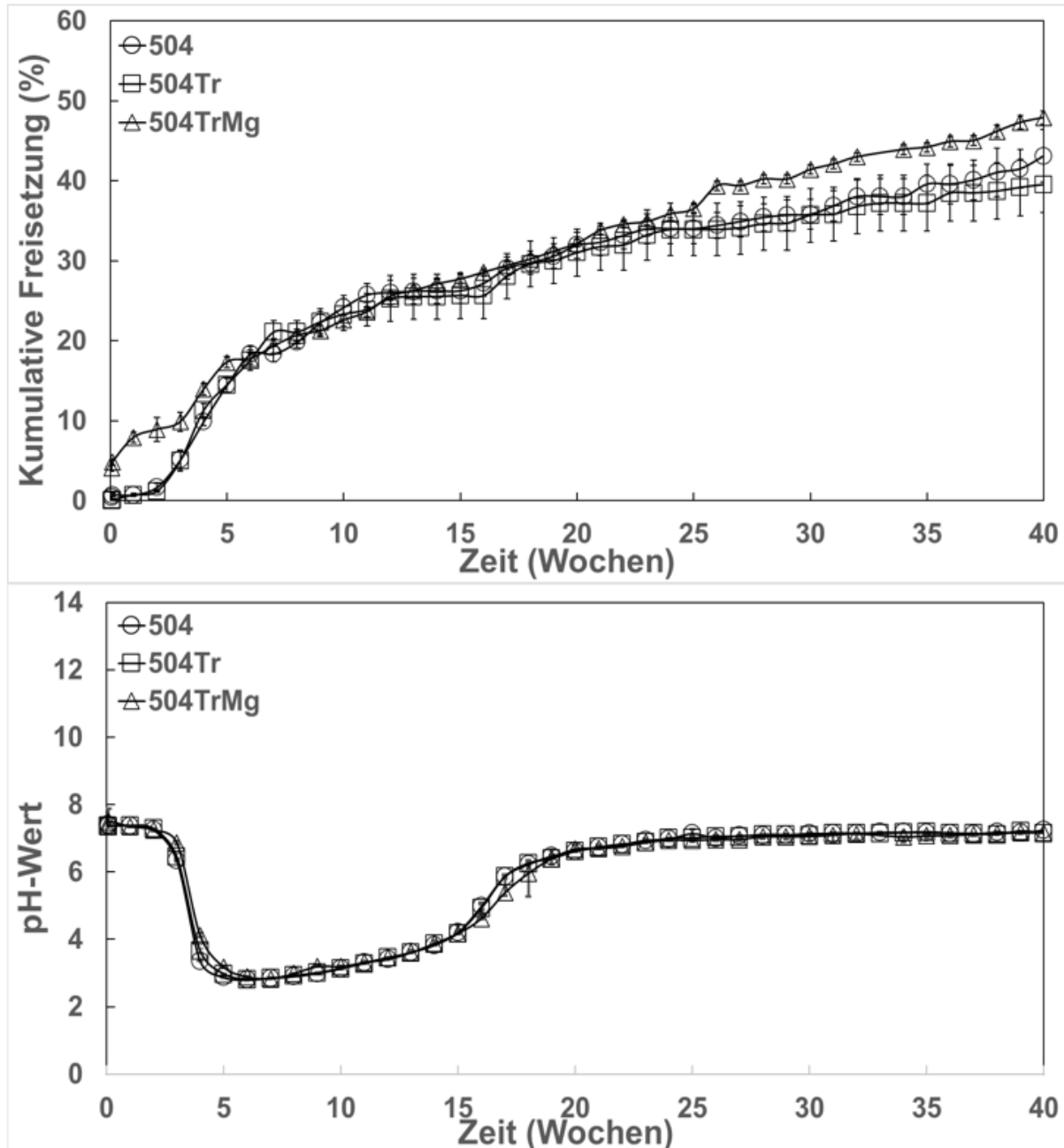


Abbildung 48 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Chargen 504TrMg, 504Tr und 504. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Der Freisetzungsverlauf der Implantate der Charge 504TrMg war zwischen Woche 5–25 nahezu gleich im Vergleich mit denen des Polymers RG 504 H aus den Kapiteln 4.1.7 und - 4.2.4. Trotz der unterschiedlichen Gesamtbeladung wiesen alle drei Chargen untereinander vergleichbare pH-Wert-Verläufe auf. Bei der Charge 504TrMg wurde der Beginn des pH-Abfalls ebenfalls in Woche 4 detektiert. Die zusätzliche Beladung mit $Mg(OH)_2$ hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert und die daraus resultierende Polymererosion. Der Hauptunterschied zwischen dieser Charge und den Chargen 504 und 504Tr war eine Initialfreisetzung innerhalb der ersten Woche der Freisetzungsstudie von 7,9 % im Vergleich zu jeweils 0,7 %, was auf die höhere Gesamtbeladung zurückgeführt werden kann. Dies wurde bereits in Kapitel 4.3.4, jedoch für Chargen des Polymers RG 756 S (756Tr+ und 756TrNa) gezeigt und konnte in dieser Studie ebenfalls für das Polymer RG 504 H beobachtet werden. Die durch die Initialfreisetzung in Woche 1 freigesetzte Menge an Allergoid der Charge 504TrMg wurde bei den Chargen 504 und 504Tr durch eine höhere wöchentliche Freisetzung in den anschließenden Wochen ausgeglichen. Nach 6 Wochen wurde für die Chargen 504, 504Tr und 504TrMg eine kumulative Freisetzung von 18,3 %, 17,6 % und 17,8 % berechnet. Die nach 40 Wochen berechnete Gesamtfreisetzung von 47,9 % ($\pm 0,9$ %) der Charge 504TrMg war um 8,4 % bzw. 4,8 % höher als bei den Chargen 504Tr und 504. Dies könnte auf einen geringen Einfluss einer höheren Gesamtbelastung auf die Bildung eines Porensystems während der Freisetzung zurückzuführen sein. Die nach 40 Wochen berechnete prozentuale Implantat-Restmenge für die Proben der Charge 504TrMg war mit 5,7 % ($\pm 1,2$ %) vergleichbar zu den Proben der Charge 504Tr mit 6 %.

Um die Stabilität des freigesetzten Allergoids genauer beurteilen zu können, wurde zu bestimmten Zeitpunkten von ausgewählten Freisetzungsproben die IgG-Bindungsaktivität gemessen und anschließend die relative Bindungsaktivität zum extrahierten Allergoid (Ausgangaktivität) dieser Charge berechnet (Tabelle 36).

Tabelle 36 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 504TrMg in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW \pm SD, n = 3.

Relative IgG-Bindungsaktivität				
Woche	4	8	12	16
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	3,6 ($\pm 0,3$)	0,0	0,0	0,0

Für die Proben der Chargen 504TrMg wurde lediglich in Woche 4 mit 3,6 % ($\pm 0,3$ %) eine relative Bindungsaktivität festgestellt. Zu späteren Zeitpunkten waren IgG-Bindungsaktivitäten nicht mehr nachweisbar. Eine starke Abnahme der IgG-Bindungsaktivität

wurde bereits für die Chargen 504 und 504Tr beobachtet (Kapitel 4.1.7 und Kapitel 4.2.4). Für das Polymer RG 504 H konnte kein Effekt auf die Stabilisierung des freigesetzten Allergoids durch eine Beladung mit Trehalose und $Mg(OH)_2$ nachgewiesen werden. Alle bisher hergestellten Chargen des Polymers RG 504 H zeigten vergleichbare Freisetzungs- und pH-Wert-Verläufe (Abbildung 48). Der starke pH-Abfall zu Beginn der In-vitro-Freisetzung (Woche 4) könnte einen frühzeitig destabilisierenden Effekt auf das Allergoid gehabt haben, wodurch die Allergoid-Freisetzung maßgeblich beeinflusst wurde. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das Polymer RG 504 H nicht für eine Depotformulierung von säurelabilen Wirkstoffen geeignet ist oder eine deutlich höhere Beladung mit Hilfsstoffen für einen entsprechenden Effekt benötigt wird.

Anders als in dieser Studie konnten Zhu *et al.* für BSA-beladene PLGA-Mikrozylinder einen Effekt auf die Polymererosion, den pH-Wert des Freisetzungsmediums und die In-vitro-Freisetzung durch eine Beladung mit 3 % $Mg(OH)_2$ zeigen [198]. Eine Übertragung der Ergebnisse auf die Anwendung bei Birken-Allergoid und dem Polymer RG 504 H war in dieser Studie nicht nachweisbar. Das von Zhu *et al.* verwendete PLGA wies den gleichen Lactid/Glycolid-Anteil (50:50) wie das RG 504 H auf. Als Herstellungsverfahren wurde jedoch die Lösungsmittlextrusion verwendet. Duque *et al.* verwendeten in ihrer Studie an PLGA (50:50)-basierten Ovalbumin (OVA)-Implantaten eine deutlich höhere $Mg(OH)_2$ -Beladung als in dieser Studie [181]. Ein entsprechender Effekt auf die Gesamtfreisetzung in-vitro konnte erst ab einer $Mg(OH)_2$ -Beladung von 25 % nachgewiesen werden. Der pH-Verlauf über die In-vitro-Studie wurde durch $Mg(OH)_2$ dabei nur geringfügig verändert. Zusätzlich waren unvollständige OVA-Freisetzungen durch OVA-Aggregate in allen untersuchten $Mg(OH)_2$ -Formulierungen nachweisbar. Im Gegensatz zu Zhu *et al.* wurde bei Duquet *et al.* die SME zur Herstellung der Implantate verwendet [181, 198]. Die Herstellungsmethode könnte daher einen Einfluss auf die Wirkung von $Mg(OH)_2$ als pH-stabilisierenden Hilfsstoff gehabt haben. Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Empfindlichkeit der verwendeten Proteine gegenüber den gegebenen Stressfaktoren unterscheiden kann [177].

Charge 756TrMg(1):

In Abbildung 49 sind die Freisetzungsverläufe und der pH-Wert im FreisetzungsmEDIUM für die Chargen 756Tr+, 756TrNa und 756TrMg(1) dargestellt.

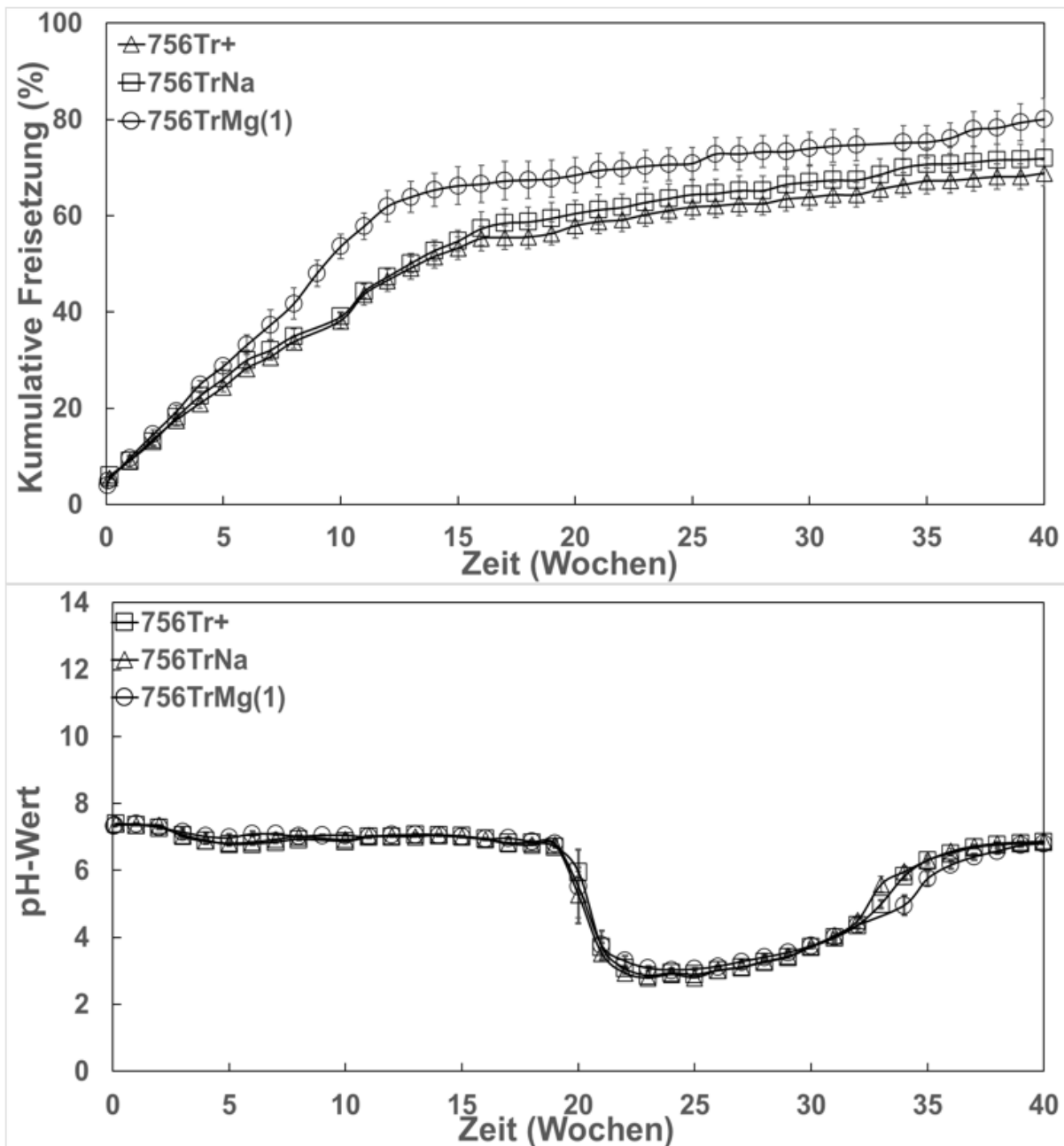


Abbildung 49 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im FreisetzungsmEDIUM für Proben der Chargen 756Tr+, 756TrNa und 756TrMg(1). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Die Initialfreisetzung nach einer Woche war für die Proben der Charge 756TrMg(1) mit 9,6 % (\pm 0,6 %) vergleichbar mit den Chargen 756Tr+ (9,0 %) und 756TrNa (9,1 %). In den Wochen 2–15 wurde bei der Charge 756TrMg(1) eine höhere wöchentliche Freisetzungsrates von 4,0 % (\pm 1,5 %) im Vergleich zu den beiden Chargen aus Kapitel 4.3.4 (3,4 % bzw. 3,3 %)

festgestellt. Außerdem wurde eine höhere kumulative Freisetzung von 56 % nach 15 Wochen beobachtet. Die kumulativ freigesetzte Menge nach dem pH-Abfall in Woche 21 bis zum Ende der In-vitro-Freisetzung in Woche 40, war für die Charge 756TrMg(1) mit 11,6 % vergleichbar zu den Chargen 756Tr+ und 756TrNa. Für die Charge 756TrMg(1) wurde eine kumulative Freisetzung nach 40 Wochen von 80,1 % ($\pm 4,3$ %) gemessen (Abbildung 49), die um 11,2 % bzw. 8,1 % höher war als bei den Chargen 756Tr+ und 756TrNa. Nach 40 Wochen wurden bei der Charge 756TrMg(1) schwerlösliche Implantat-Rückstände identifiziert. Diese bildeten mit 1,2 % ($\pm 0,4$ %) die insgesamt niedrigsten gemessenen Implantat-Rückstände aller Chargen. Ein Effekt auf den pH-Verlauf und die damit verbundene Polymererosion durch die Beladung mit $Mg(OH)_2$ konnte jedoch in diesem Teil der Arbeit nicht beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Stabilität des freigesetzten Allergoids der Charge 756TrMg(1) wurde von den Freisetzungspuren die IgG-Bindungsaktivität bestimmt. Die Ergebnisse der relativen Bindungsaktivität zur Ausgangsaktivität (extrahiertes Allergoid) sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(1) in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW \pm SD, n = 6.

Relative IgG-Bindungsaktivität						
Woche	1	4	8	12	16	20
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	47,3 ($\pm 6,6$)	18,9 ($\pm 0,5$)	19,9 ($\pm 0,9$)	13,9 ($\pm 1,4$)	8,2 ($\pm 0,4$)	4,8 ($\pm 0,2$)

Die Berechnung der relativen Bindungsaktivität war für die Proben der Charge 756TrMg(1) hinsichtlich der Abnahme der relativen Bindungsaktivität im Verlauf der In-Vitro-Freisetzung vergleichbar mit den Proben der Charge 756Tr (Tabelle 25, Kapitel 4.2.4). Nach der 20. Woche war der Proteingehalt der Probelösung für eine exakte Durchführung des ELISAs zu gering. Die von Zhu *et al.* aufgestellte Hypothese einer abnehmenden Proteinstabilisierung durch die Neutralisierung des Mikro-pH-Klimas innerhalb der Polymermatrix durch $Mg(OH)_2$ konnte in dieser Untersuchung nur durch die höhere Freisetzung bestätigt werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde in den oben genannten Studien von Zhu *et al.* und Duque *et al.* während der Freisetzung ein vollständiger Pufferaustausch durchgeführt [181, 198]. Um diese Freisetzungsbedingungen zu reproduzieren, wurde eine weitere In-vitro-Studie (Methode 2) für Implantate der Charge 756TrMg(1) durchgeführt. Das Ziel bestand darin, den Einfluss der Freisetzungsmethoden auf die In-vitro-Freisetzung und die Allergoid-Stabilität zu untersuchen. Bassand *et al.* haben diesbezüglich bereits einen Effekt auf eine

höhere Freisetzungsrates für PLGA-basierte Trägersysteme beschrieben [195]. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und relativen Bindungsaktivität sowie des pH-Werts für die Implantate der Charge 756TrMg(1) mit der Freisetzungsmethode 2 dargestellt.

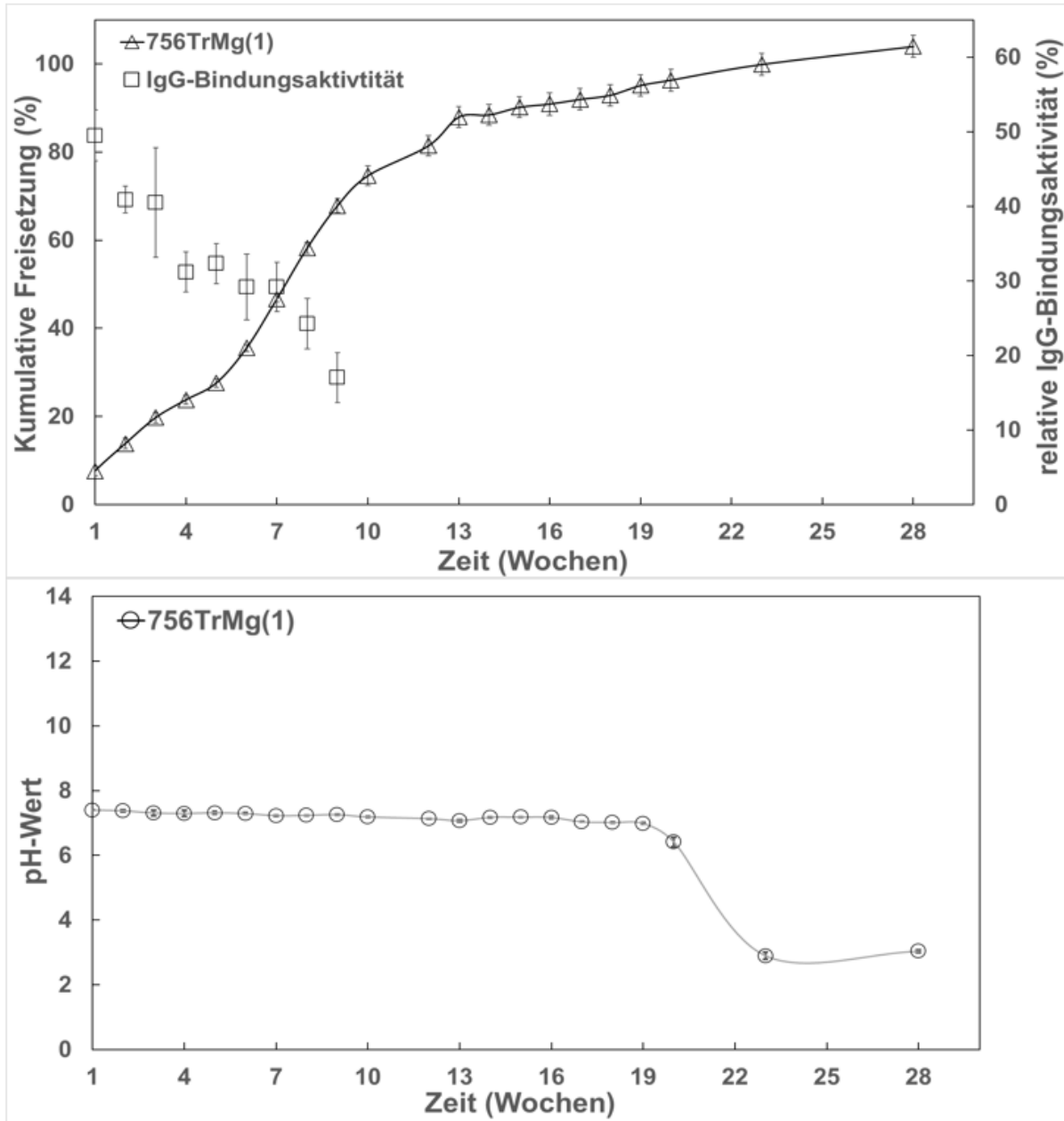


Abbildung 50 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Charge 756TrMg(1) sowie die Bestimmung der postexperimentellen relativen Bindungsaktivität. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Für die Proben der Charge 756TrMg(1) konnte mit der Freisetzungsmethode 2 eine Langzeitfreisetzung des Allergoids mit einer höheren wöchentlichen Freisetzungsrates im Vergleich zur Freisetzungsmethode 1 gemessen werden. Nach 15 Wochen wurden bereits 90,1 % des Allergoids freigesetzt und nach 28 Wochen eine vollständige Allergoid-

Freisetzung festgestellt. Diese war noch vor dem pH-Abfall und dem daraus resultierenden Höhepunkt des Polymerabbaus erreicht worden. Die Freisetzung erfolgte dabei in zwei Phasen. Im Durchschnitt wurden während der ersten Phase (Woche 1–13) 7,3 % (\pm 2,3 %) des Allergoids pro Woche aus den Implantaten freigesetzt. Ab der 14. Woche (Phase 2) fiel diese Rate auf 1,2 % (\pm 0,5 %) für den restlichen Freisetzungsverlauf bis zur 28. Woche. Der Verlauf des pH-Werts war über den Zeitraum der In-vitro-Studie identisch zu den Ergebnissen von Freisetzungsmethode 1 (Abbildung 47). Ein Einfluss von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ auf die Polymererosion wurde mit dieser Freisetzungsmethode nicht nachgewiesen.

Die Bestimmung der IgG-Bindungsaktivität erfolgte während der Freisetzungsmethode 2 in den Wochen 1–9. Dabei konnte ähnlich zu den Ergebnissen der Freisetzungsmethode 1 (Tabelle 37) eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Freisetzung beobachtet werden. Hätte eine starke Allergoid-Destabilisierung infolge eines abfallenden Mikro-pH-Werts zur Bildung von Allergoid-Aggregaten größer als 0,22 μm geführt, wären diese durch das Filtermaterial während der Probenpräparation zurückgehalten worden und im Proteingehaltsbestimmungsverfahren (BCA-Assay) nicht nachweisbar gewesen. Nach 28 Wochen wurde eine prozentuale Restmenge an Implantaten von 3,3 % (\pm 0,2 %) detektiert. Anders als bei allen bisherigen Restmengen waren diese komplett in Acetonitril löslich, was auf die vollständige Allergoid-Freisetzung zurückgeführt werden kann und die Abwesenheit von schwerlöslichen Rückständen aus degradiertem Allergoid und PLGA-Abbauprodukten bestätigt. Dennoch lässt die Abnahme der IgG-Bindungsaktivität auf strukturelle Veränderungen des Allergoids schließen, die auf das Mikro-pH-Klima in der Polymermatrix und die Freisetzungsbedingungen zurückgeführt werden können. Ein Effekt der Freisetzungstemperatur von 37 °C auf das gelöste Allergoid wurde in Kapitel 4.2.4 beschrieben.

In diesem Entwicklungsabschnitt konnte mit zwei verschiedenen Freisetzungsmethoden eine erhöhte Freisetzung durch den Zusatz von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ für die Implantate des Polymers RG 756 S gezeigt werden. Ob dieser Effekt aufgrund der Neutralisierung des Mikro-pH-Werts innerhalb der Polymermatrix zur Stabilisierung des Allergoids führte, konnte aufgrund vergleichbarer IgG-Bindungsaktivitäten für das freigesetzte Allergoid zu den Chargen ohne $\text{Mg}(\text{OH})_2$ nur eingeschränkt bestätigt werden. Jedoch deutet die erhöhte Freisetzung auf eine Verminderung der Allergoid-Aggregation hin. Die Bildung eines stärkeren Porensystems innerhalb der Polymermatrix ist aufgrund der schlechten Löslichkeit von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ im wässrigen Milieu zweifelhaft [197]. Der von Bassand *et al.* beschriebene Effekt einer höheren Freisetzung durch einen kompletten Pufferaustausch bei In-vitro-Freisetzungsforschungen von PLGA-basierten Trägersystemen konnte in dieser Studie ebenfalls beobachtet werden [195].

4.4.5. Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Herstellung von PLGA-basierten Allergoid-Implantaten mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % und der Verwendung von 2,5 % $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und 5 % Trehalose gezeigt. Der Prozess erzeugte dabei Implantate mit homogener Morphologie und nahezu vollständig reproduzierbaren Allergoid-Anteilen. Die Allergoid-Stabilität wurde durch den Herstellungsprozess nur minimal beeinflusst, sodass von einem allgemeinen Erhalt der Allergoid-Charakteristika ausgegangen werden kann. Zudem wurde in einem Vorversuch festgestellt, dass die Lyophilisierung des Allergoids unter Zusatz von Trehalose und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ keinen Einfluss auf das Allergoid hatte. Für die Implantate der Charge 756TrMg(1) konnte eine erhöhte Freisetzung mit geringeren Implantat-Resten nach 40 Wochen durch die $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Beladung festgestellt werden. Dabei wurde auch ein Einfluss der Freisetzungsmethode auf die In-vitro-Freisetzung gezeigt und für die Freisetzungsmethode 2 sogar eine vollständige Allergoid-Freisetzung nach 28 Wochen beobachtet. Dennoch wurde über den Verlauf der In-vitro-Studie kein protektiver Effekt auf den Erhalt der IgG-Bindungsaktivitäten des freigesetzten Allergoids durch die Neutralisierung eines Mikro-pH-Klimas innerhalb der Polymermatrix durch $\text{Mg}(\text{OH})_2$ analysiert. Dies könnte sowohl auf der schlechten Löslichkeit vor der Lyophilisierung als auch auf dem geringen prozentualen Anteil von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in der Formulierung zurückzuführen sein. Möglicherweise könnten besser wasserlösliche, basische Zusätze einen entsprechenden Effekt erzielen. Für das Polymer RG 504 H wurde kein Effekt durch die Hilfsstoffbeladung beobachtet. Aufgrund der früh einsetzenden Polymererosion und des stark sauren pH-Werts wurde mit den getesteten Formulierungen festgestellt, dass dieses Polymer ungeeignet für die langfristige Freisetzung des Allergoids ist.

4.5. Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit weiteren pH-Stabilisatoren

4.5.1. Einleitung und Herstellungsprozess

In Kapitel 4.4.4 konnte ein Effekt auf die Allergoid-Freisetzung durch den Zusatz von 2,5 % $\text{Mg}(\text{OH})_2$ zum Polymer RG 756 S gezeigt werden. Ein Abfall der IgG-Bindungsaktivität wurde über den Verlauf der Freisetzungsstudie dennoch beobachtet. Im Rahmen dieser Studie wurde das Ziel verfolgt mittels von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder einer Phosphatsalzmischung, bestehend aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 , die Allergoid-Stabilität während der Freisetzung zu optimieren. Die Phosphatsalze wurden dabei in einem Verhältnis eingesetzt, um bei pH 7,4 zu puffern (44,7 % (m/m) Na_2HPO_4 , 55,3 % (m/m) NaH_2PO_4).

Die Hilfsstoffe und der Wirkstoff wurden vor der Extrusion in VE-H₂O gelöst und lyophilisiert. Im Gegensatz zu Mg(OH)₂ lösten sich die Hilfsstoffe dieses Kapitels vollständig. In einem Vorversuch wurde von den hergestellten Lyophilisaten die prozentuale Wiederfindung des Allergoids und IgG-Bindungsaktivität untersucht. Für das Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂- und das Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisat wurde eine prozentuale Allergoid-Wiederfindung von 101,8 % (± 3,4 %, n = 3) und 104,5 % (± 0,1 %, n = 3) bestimmt. Für die Proben des Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats wurde kein Einfluss auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids durch die Lyophilisierung festgestellt. Die Proben wiesen nach wieder Auflösen einen pH-Wert von 7,34 (± 0,03, n = 3) und eine relative IgG-Bindungsaktivität zur Referenzprobe (reines Birken-Allergoid) von 95,9 % (± 3,2 %, n = 3) auf. Für die Proben des Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂-Lyophilisats, wurde mit einem Wert von 83,0 % (± 6,4 %, n = 3) eine verminderte relative IgG-Bindungsaktivität gemessen. Die Allergoid-Stabilität dieses Lyophilisats wurde zusätzlich über die IgE-Bindungsaktivität untersucht. Dabei wurde eine relative IgE-Bindungsaktivität zur Referenzprobe von 56,4 % (± 7,0 %, n = 3) festgestellt. Die Destabilisierung des Allergoids könnte auf dem hohen pH-Wert des rekonstruierten Lyophilisats von pH 12,21 (± 0,10, n = 3) basieren.

Aus beiden Lyophilisaten wurde mittels SME jeweils eine Implantat-Charge mit dem Polymer RG 756 S hergestellt. Die Prozessparameter der Extrusion für die produzierten Chargen 756TrCa und 756TrPh sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38 SME-Prozessparameter für die Chargen 756TrCa und 756TrPh. (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute).

Charge	756TrCa	756TrPh
Zusammensetzung		
RG 756 S	X	X
10 % (m/m) Birken-Allergoid	X	X
5 % (m/m) Trehalose	X	X
2,5 % (m/m) Ca(OH) ₂	X	--
2,5 % (m/m) Phosphatsalze 44,7 % (m/m) Na ₂ HPO ₄ 55,3 % (m/m) NaH ₂ PO ₄	--	X
Allergoid-Charge	W21066835	W21066835
SME-Prozessparameter		
Chargengröße (g)	4,9	5,0
Zuführrate (g/min)	0,44	0,54
Prozesszeit (min)	27	23
Maximaldruck (bar)	95	98
Ausbeute (%)	32,7	32,0

Die Herstellung von Implantaten mittels SME konnte für die Chargen 756TrCa und 756TrPh erfolgreich durchgeführt werden. Die SME-Prozessparameter waren für beide Chargen allgemein vergleichbar zu denen des Polymers RG 756 S aus Kapitel 4.3.1 und Kapitel 4.4.1. Es wurde eine höhere Variabilität der Zuführraten und den resultierenden Prozesszeiten festgestellt (Tabelle 38). Aufgrund der Chargengröße war es nicht möglich eine automatisierte Zuführungseinheit zu verwenden, die bei einer Maßstabsvergrößerung des Herstellungsprozesses eine gleichbleibend konstante Zuführrate ermöglicht hätte [199]. Die manuelle Zuführung in den Extruder wurde je nach Aufnahme des Materials angepasst und konnte daher zwischen den Chargen abweichen. Unter Berücksichtigung des Materialverlustes beim Befüllen der Extruderdüse lässt sich aus den Ausbeuten der Chargen 756TrCa und 756TrPh mit 32,7 % bzw. 32,0 % darauf schließen, dass eine optimale Materialförderung durch den Extruderraum erfolgte.

4.5.2. Morphologische Charakterisierung der Implantate

Das Ziel der morphologischen Charakterisierung der Implantate war es, den Einfluss der neu eingeführten Hilfsstoffe auf die Allergoid-Beladung sowie die morphologischen Charakteristiken der Implantate zu untersuchen. Es wurden stets Implantate aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats verwendet. Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate sowie die Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh.

Tabelle 39 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 756TrCa und 756TrPh. Angabe von MW \pm SD.

Parameter	756TrCa	756TrPh
Masse (mg) (n = 10)	27,7 (\pm 1,2)	27,7 (\pm 0,8)
Länge (mm) (n = 10)	5,1 (\pm 0,2)	5,2 (\pm 0,1)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,0 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,1)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	97,9 (\pm 2,6)	101,9 (\pm 5,3)

Die Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate ergab für beide Chargen nahezu gleiche Resultate. Zusätzlich wurde ein vergleichbares Massen-/Längen-Verhältnis der Implantate der Chargen 756TrCa und 756TrPh mit 5,4 mg/mm und 5,3 mg/mm berechnet. Eine vollständige Allergoid-Rückgewinnung aus den Implantaten beider Chargen konnte mit niedrigen Standardabweichungen erzielt werden, was auf ein Allergoid-Anteil nahe dem Soll-Wert schließen lässt. Für die Proben der Charge 756TrCa wurden bei der Extraktion mit VE-H₂O Präzipitate festgestellt. Nach Filtration ergab sich dabei eine Allergoid-Wiederfindung von 24,6 % (\pm 6,2 %, n = 6). Eine aggregatfreie Probelösung konnte durch die Verwendung einer 20-fach konzentrierten PBS-Stammlösung (pH 7,4) (Kapitel 8.1) für die Extraktionsmethode 2 (Kapitel 3.2.1.3) erzeugt werden. Durch die Verwendung eines konzentrierten Phosphatpuffers für die Extraktion, könnte das Allergoid vor Präzipitationsprozessen geschützt gewesen sein. Durch Bindung von Phosphat-Ionen an die Oberfläche des Allergoids wurde dessen Oberflächenladung herabgesetzt und das Interaktionspotenzial zueinander vermindert [200]. Zusätzlich könnte eine pH-Pufferung bei pH 7,4 eine alkalisch induzierte Destabilisierung des Allergoids während der Extraktion verhindert haben. Anhand der Extraktion konnte für das Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrCa gezeigt werden, dass eine Destabilisierung des Allergoids durch die Extrusion stattgefunden hat.

Zur Bewertung der Mantelflächenbeschaffenheit der Implantate beider Chargen wurden diese mittels der REM-Analyse untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 51 dargestellt.

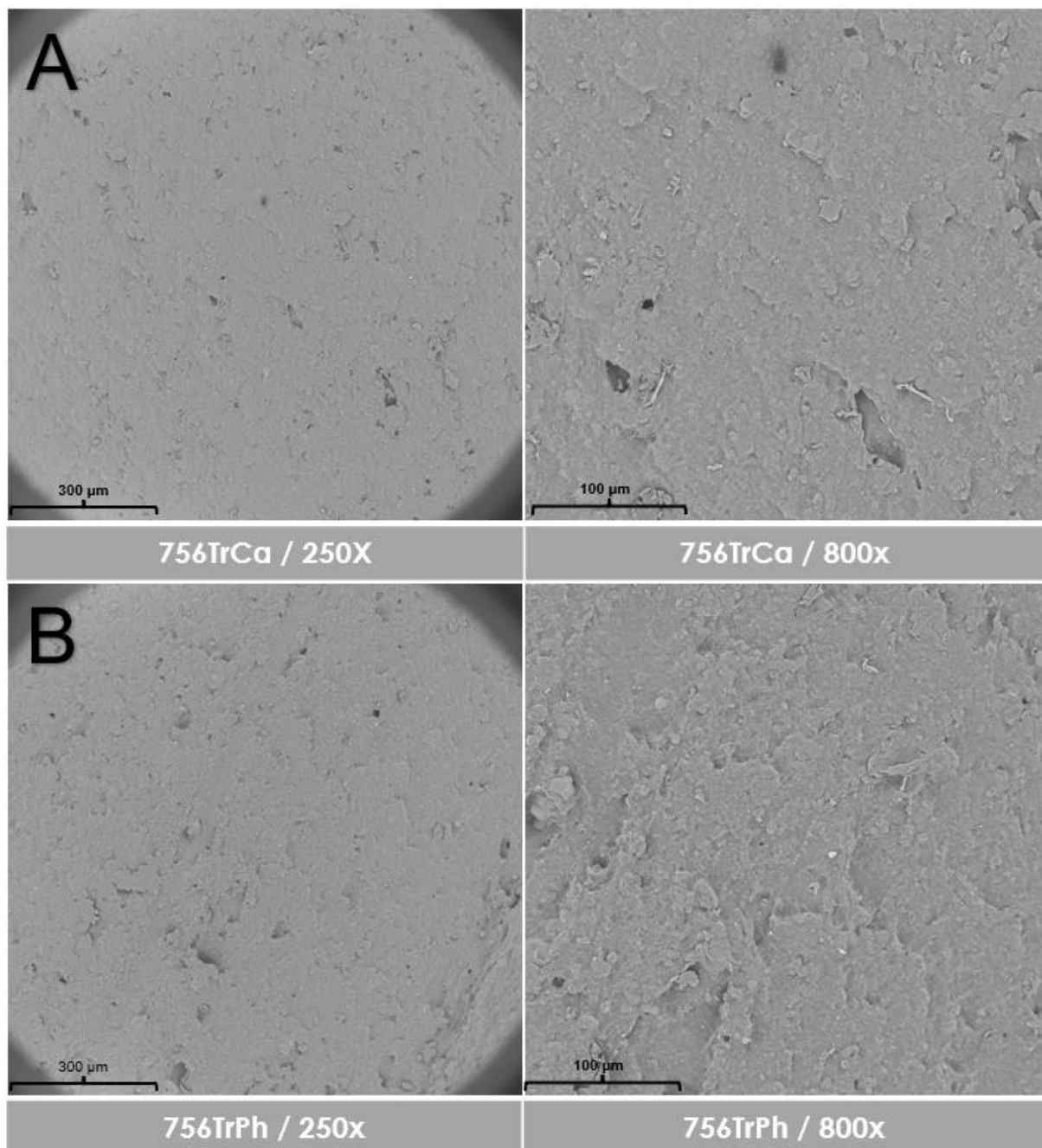


Abbildung 51 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 756TrCa (A) und 756TrPh (B).

Durch die REM-Analyse der Implantat-Mantelflächen wurde eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie zur der Charge 756TrMg(1) festgestellt (Kapitel 4.4.2, Abbildung 39). Zusätzlich wurden keine größeren Hohlräume oder stark unebene Strukturen detektiert, die auf ein ungleichmäßig geformtes Implantat hindeuten würden (Abbildung 51). Für beide Chargen dieses Kapitels wurden gleichmäßig verteilte

partikuläre Strukturen bei 800-facher Vergrößerung detektiert, was auf die homogene Verteilung der Beladung im untersuchten Bereich schließen lässt.

Zur Bewertung der inneren Porosität der Implantate der Chargen 756TrCa und 756TrPh wurden Implantat-Querschnitte mittels REM-Analyse untersucht (Abbildung 52).

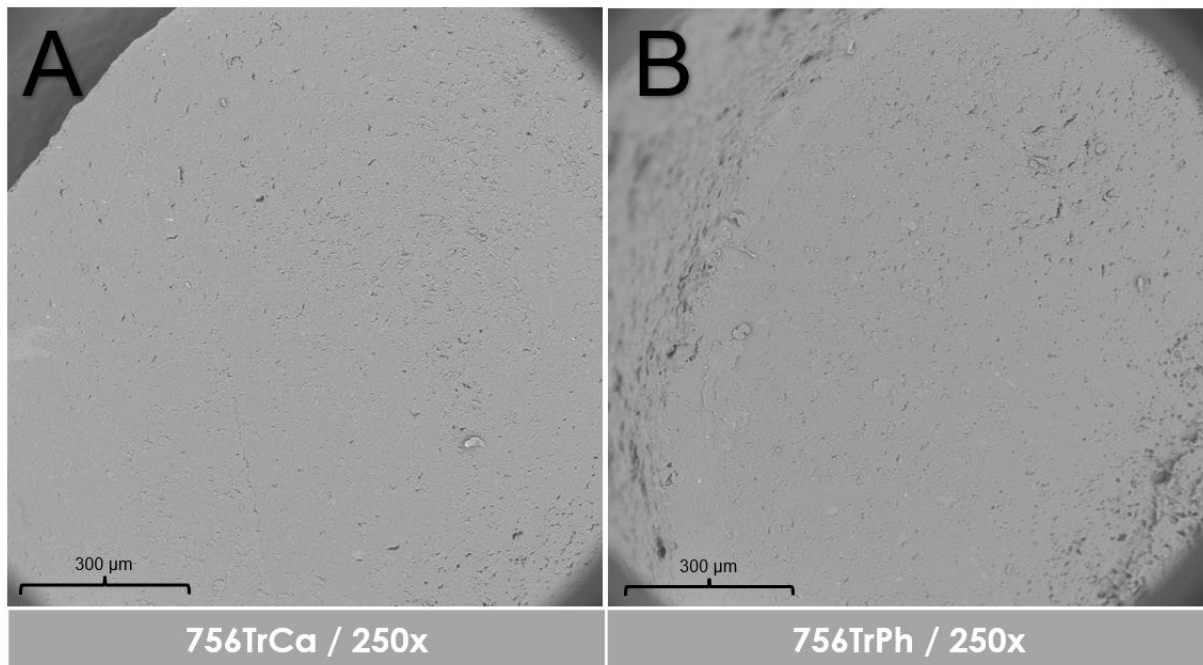


Abbildung 52 REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte von Proben der Chargen 756TrCa (A) 756TrPh (B).

Die REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte der Chargen 756TrCa und 756TrPh zeigten eine glatte innere Struktur mit vereinzelten kleinen Poren. In beiden Fällen deuten die Ergebnisse auf eine ideale Erweichung des Polymers hin, was auch eine gute Homogenisierung der Hilfsstoffe und des Wirkstoffes ermöglicht haben könnte. Im Vergleich zu der Probe der Charge 756TrMg(1) (Kapitel 4.4.2, Abbildung 39) wurde eine geringere innere Porosität für die Chargen 756TrCa und 756TrPh festgestellt. Dies könnte auf eine verbesserte Erweichung des Polymers durch die leicht reduzierten Zuführraten und der damit verbundenen längeren Verweildauer des Materials im Extruder zurückzuführen sein.

Mit der morphologischen Charakterisierung der Implantate konnte die erfolgreiche Herstellung von Birken-Allergoid-Implantate mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % und dem Zusatz von Phosphatsalzen gezeigt werden. Die Extrusion erzeugte dabei morphologisch homogene Implantate mit einer einheitlichen Mantelflächenbeschaffenheit und einer geringen inneren Porosität sowie einem Allergoid-Gehalt nahe dem Soll-Wert. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrCa konnte die Extrusion erfolgreich durchgeführt und dabei morphologisch homogene Implantate erzeugt werden. Jedoch wurde eine deutliche Destabilisierung des Allergoids durch die präparative Lyophilisierung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ vor der Extrusion festgestellt.

4.5.3. Allergoid-Charakterisierung

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung von extrahiertem Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh dargestellt. Nach der Lyophilisierung wurde ein Erhalt der IgG-Bindungsaktivität für das Allergoid des Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats (756TrPh) nachgewiesen. Für das Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂-Lyophilisat wurde eine deutliche Destabilisierung des Allergoids nach Lyophilisierung durch die Bestimmung der IgG/IgE-Bindungsaktivität gezeigt. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, für die Charge 756TrPh den Erhalt der Allergoid-Charakteristika nach Extrusion zu beurteilen. Für die Charge 756TrCa wurde geprüft, ob die Allergoid-Stabilität durch die Extrusion zusätzlich beeinflusst wurde, da die strukturelle Veränderung des Allergoids nach Lyophilisierung möglicherweise zu einer Abnahme der natürlichen Stabilität des Allergoids gegenüber thermischer Belastung führte. Während der morphologischen Charakterisierung wurde bereits eine Allergoid-Aggregation unter Verwendung der Extraktionsmethode 2 mit VE-H₂O für die Proben der Charge 756TrCa festgestellt. Dies wurde unter der Verwendung von Extraktionsmethode 1 nicht beobachtet. Die nach Extraktion erzeugte Probelösung war klar und frei von sichtbaren Feststoffpartikeln. Für die in diesem Teil der Arbeit verwendete Birken-Allergoid-Charge (W21066835) wurde eine neue Referenzprobe (Referenz-5) etabliert.

4.5.3.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der DLS-Analytik dargestellt.

Tabelle 40 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie der Referenz-5. Darstellung des mittleren R_h-Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW ± SD, n = 3.

Probe	Referenz-5	756TrCa	756TrPh
Mittlerer R _h -Wert (nm)	1,4 (± 0,1)	3,0 (± 0,8)	2,2 (± 0,5)
Prozentualer Massenanteil (%)	99,5 (± 0,1)	99,4 (± 0,3)	98,9 (± 0,2)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	100,0 (± 0,0)	100,0 (± 0,0)	100,0 (± 0,0)

Bei der Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS wurde für das extrahierte Allergoid aus der Charge 756TrPh ein geringfügig größerer R_h-Wert im Vergleich zur Referenz-5 festgestellt. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrCa war die Zunahme des R_h-Werts mit 3,0 nm deutlich höher. Dies könnte auf eine Destabilisierung des Allergoids hindeuten, die bereits nach der Lyophilisation festgestellt wurde. Eine Aggregation des Allergoids hätte jedoch zu deutlich höheren R_h-Werten geführt, mit Größen im µm-

Bereich [201]. Der hohe prozentuale Massen- und numerische Anteil beider Chargen deuten auf eine einheitliche Allergoid-Größe und die Abwesenheit von größeren Aggregaten nach Extrusion hin.

4.5.3.2. Bestimmung der molekularen Masse und R_h -Wert mittels SEC-Analyse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der SEC-Analyse für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrCa und 756TrPh beschrieben. Zu besserer Veranschaulichung werden die Ergebnisse der einzelnen Chargen in getrennten Abbildungen dargestellt.

Zusätzlich zum extrahierten Allergoid aus der Charge 756TrCa wurde mittels SEC-Analyse auch das Allergoid aus dem entsprechenden Lyophilisat, das mit und ohne Extraktionsmethode 2 behandelt wurde, untersucht. Dadurch sollte der Einfluss der Extrusion von der Lyophilisierung bzw. Extraktion abgegrenzt werden. Die erzeugten Chromatogramme für die Proben der Charge 756TrCa sowie den Referenzproben sind in Abbildung 53 dargestellt.

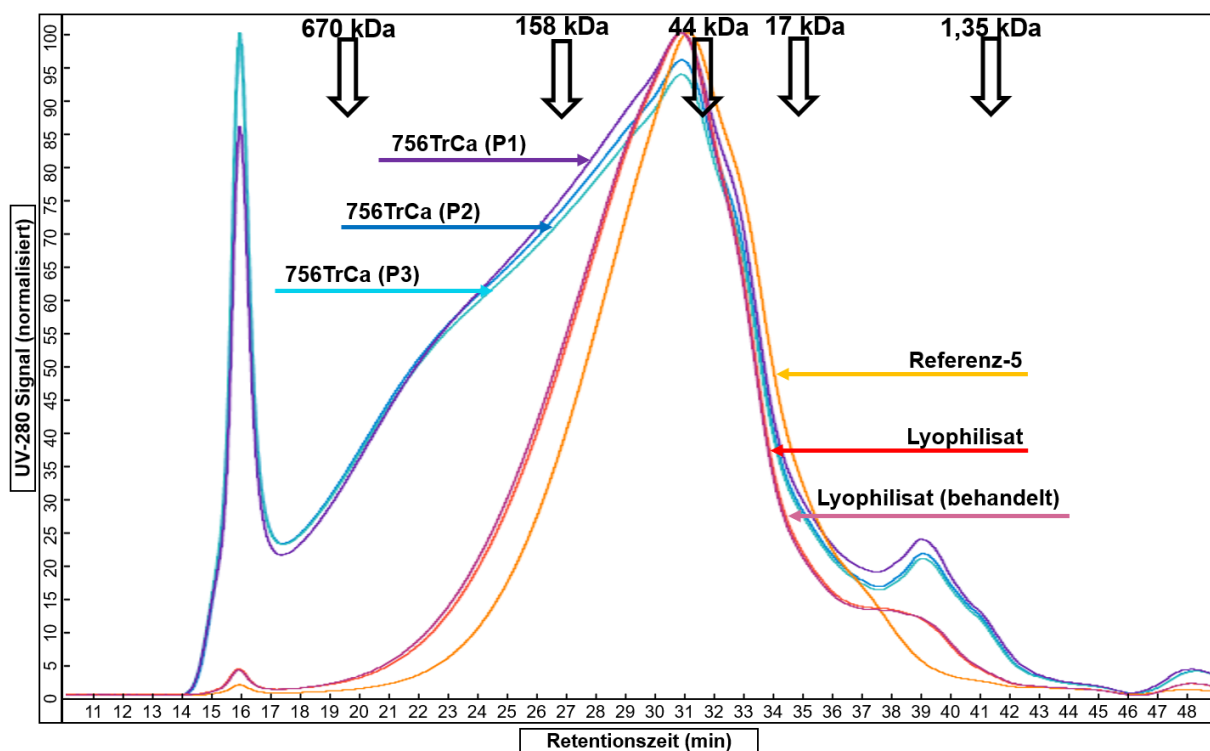


Abbildung 53 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrCa, der Referenz-5 sowie das Allergoid des Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂-Lyophilisats (mit und ohne Extraktionsmethode 2 behandelt) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Das aus den Implantaten der Charge 756TrCa extrahierte Allergoid wies ein deutlich abweichendes Elutionsprofil im Vergleich zur Referenz-5 und den Lyophilisat-Proben auf. Dabei wurde für das extrahierte Allergoid die Bildung schneller eluierender hochmolekularer Proteinspezies (Retentionszeit 18–30 min) und ein deutlicher Aggregat-Peak (Retentionszeit

16 min) festgestellt. Diese Beobachtungen lassen sich auf die Bildung von Aggregaten zurückführen, die weniger oder gar nicht mit der SEC-Säule interagierten. Darüber hinaus wurde bei allen Proben der Charge 756TrCa ein erhöhter Peak bei einer Retentionszeit von 39 min festgestellt, der möglicherweise auf eine Reversion der Allergoidisierung und die Bildung kleinerer Proteinspezies hinweist. Der Vergleich der Lyophilisatproben (behandelt und unbehandelt) mit der Referenz-5 zeigte eine Verschiebung des SEC-Chromatogramms hinsichtlich schneller eluierender hochmolekularer Proteinspezies sowie die Bildung einer Schulter bei einer Retentionszeit von 39 min, was auf vereinzelte Veränderungen in der Struktur des Allergoids schließen lässt. Ein Einfluss der Extraktionsmethode auf das Analyseergebnis konnte ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der SEC-Analyse unterstützen die Hypothese, dass das Allergoid durch die Vorbelastung der Lyophilisierung weniger temperaturstabil war und unter den Bedingungen des Herstellungsprozesses partiell aggregierte. Da Allergoide immer aus einem Proteingemisch verschiedener natürlicher Allergene bestehen, könnten bestimmte Proteinspezies stärker von der Aggregation bzw. Destabilisierung betroffen gewesen sein, was den Teilerhalt des SEC-Chromatogramms und die geringfügige Verschiebung des Hauptpeaks erklären würde.

In Abbildung 54 sind die SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids der Charge 756TrPh sowie der Referenz-5 dargestellt.

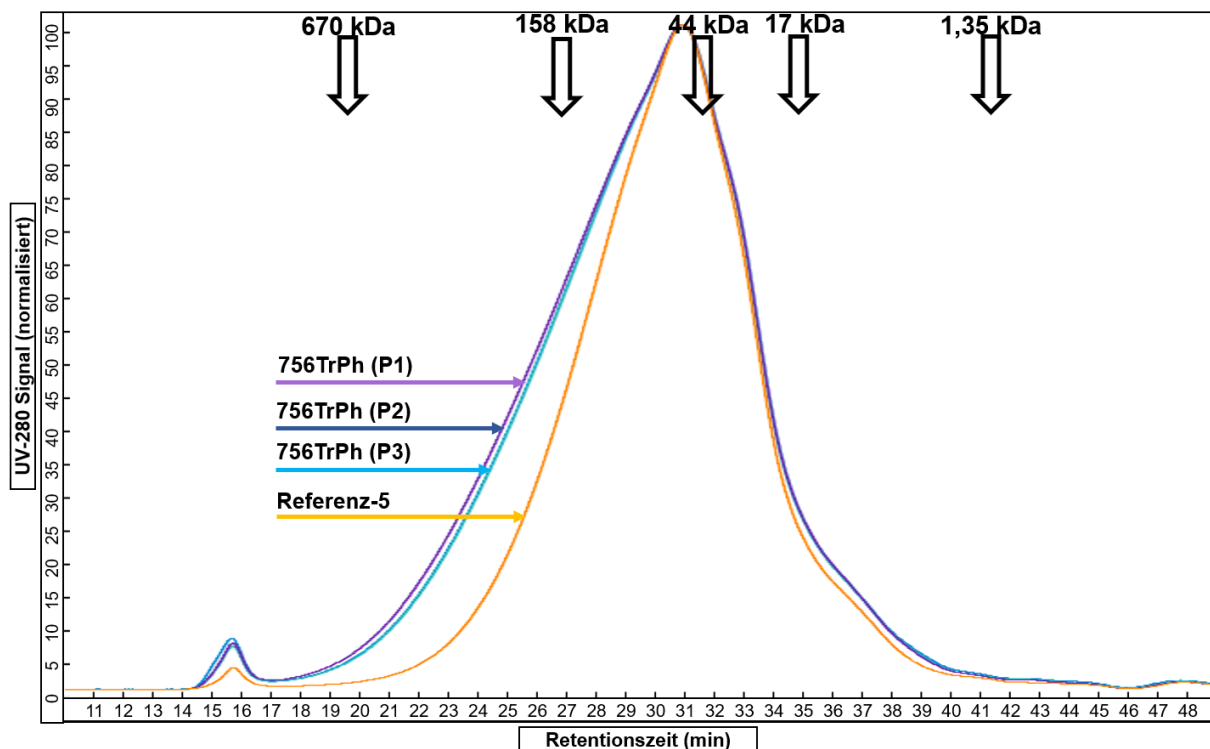


Abbildung 54 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrPh sowie der Referenz-5 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrPh wurden Unterschiede zur Referenz-5 im Bereich der Retentionszeiten von 16–29 min sowie kleine Aggregatpeaks (Retentionszeit 16 min) festgestellt. Diese Unterschiede lassen mögliche Veränderungen in der Struktur des Allergoids durch die Extrusionsbedingungen vermuten. Interessanterweise waren die Veränderungen im SEC-Chromatogramm der Proben dieser Chargen trotz der vermeintlichen Stabilisierung durch Trehalose vergleichbar mit den Ergebnissen von Charge 756 ohne Trehalose (Kapitel 4.1.6.2, Abbildung 15) und könnten auf einer chargenspezifischen Variabilität basieren.

Tabelle 41 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh und der Referenz-5.

Tabelle 41 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh und der Referenz-5. Angabe von MW \pm SD, n = 3.

Probe	Referenz-5	756TrCa	756TrPh
Molekulare Masse (kDa)	45,7 (\pm 0,1)	49,9 (\pm 0,1)	45,9 (\pm 0,1)
R_h -Wert (nm)	3,0 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)	3,1 (\pm 0,0)

Bei der Bestimmung der molekularen Masse und des R_h -Werts ergab sich für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrCa im Vergleich zur Referenz-5 eine höhere molekulare Masse. Zur Bestimmung wurden lediglich die Retentionszeiten des Hauptpeaks (Retentionszeit 31 min) herangezogen, daher berücksichtigen die Ergebnisse die deutlich erkennbare Aggregatbildung (Retentionszeit 16 min) nicht (Abbildung 54). Die Proben der Charge 756TrPh zeigten vergleichbare Ergebnisse bezüglich der molekularen Masse und des R_h -Werts, verglichen mit der Referenz-5. Daraus kann geschlossen werden, dass die hydrodynamische Größe des Allergoids dieser Charge nach Extrusion erhalten blieb.

4.5.3.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels native IEF

In Abbildung 55 sind die Ergebnisse der durchgeführten IEF-Analyse mit extrahiertem Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh dargestellt.

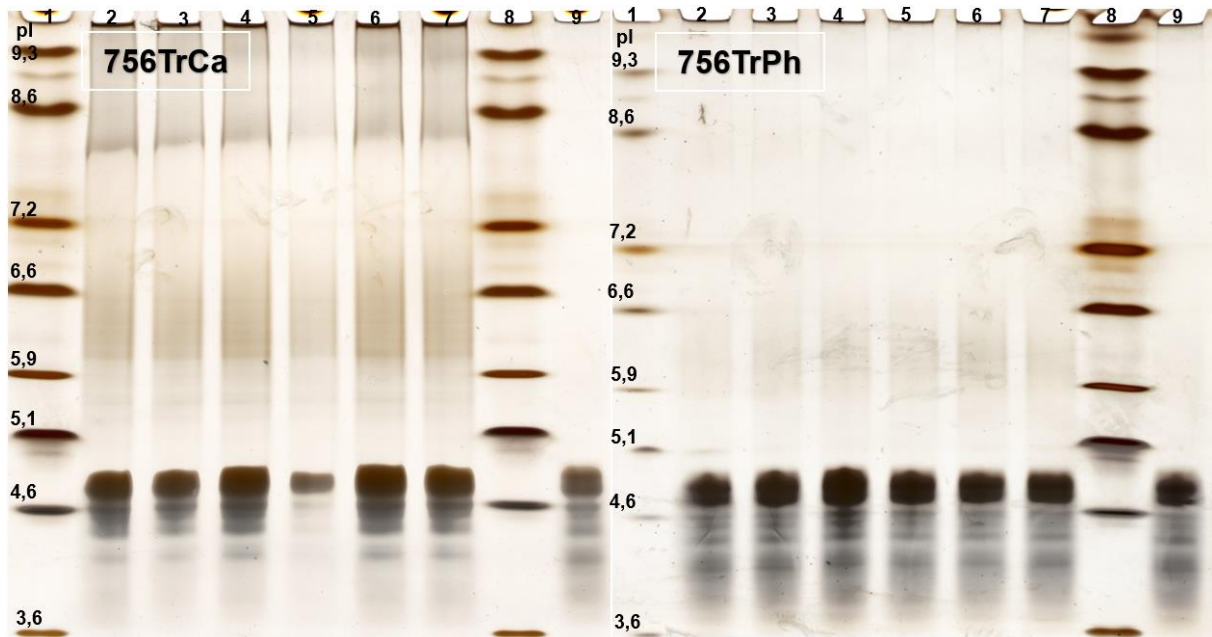


Abbildung 55 IEF-Gele, Proteindetektion mittels Silberfärbung. Links: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrCa (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-5 (Spur 9, n = 1) sowie dem Proteinmarker (Spur 1 und 8). Rechts: Extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrPh (Spur 2–7, n = 6) mit der Referenz-5 (Spur 9, n = 1) sowie dem Proteinmarker (Spur 1 und 8).

Durch die IEF-Analyse wurde für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrPh das charakteristische IEF-Bandenmuster der Referenz-5 mit Banden im Bereich von pI 3,6–5,1 nachgewiesen. Das Allergoid dieser Charge wurde in seiner Oberflächenladung und Allergoidisierung durch den Herstellungsprozess nicht verändert. Für alle Proben der Charge 756TrCa wurden zusätzliche Banden in einem Bereich von pI 9,3–7,2 detektiert. Dies begründet sich wahrscheinlich auf der Entfaltung und Degradation des Allergoids, welches durch Konformationsänderung in der Ausbildung basischer Strukturen begünstigt wurde. Zusätzlich kann vermutet werden, dass aufgrund der reduzierten Bandenintensität im Bereich von pI 3,6–4,6, besonders Proteinkomponenten des Allergoids mit einer sauren Oberflächenladung durch den Herstellungsprozess beeinflusst wurden. Mit der IEF-Analyse konnte mit den Proben der Charge 756TrCa erstmals ein IEF-Bandenmuster eines stark destabilisierten Allergoids gezeigt werden, das auch als Referenz für bisherige und zukünftige IEF-Bestimmungen dienen kann. Bei einer Probe (Spur 5) der Charge 756TrCa wurde eine verminderte Bandenfärbung festgestellt (Abbildung 55), was jedoch auf einen Methodenfehler zurückgeführt werden konnte. Die mit der SEC-Analyse festgestellten deutlichen Unterschiede zwischen den Proben des extrahierten Allergoids der Charge 756TrCa und der Referenz-5 wurden mit der IEF-Analyse ebenfalls beobachtet.

4.5.3.4. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Abbildung 56 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich 1700–1600 cm^{-1} für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie der Referenz-5.

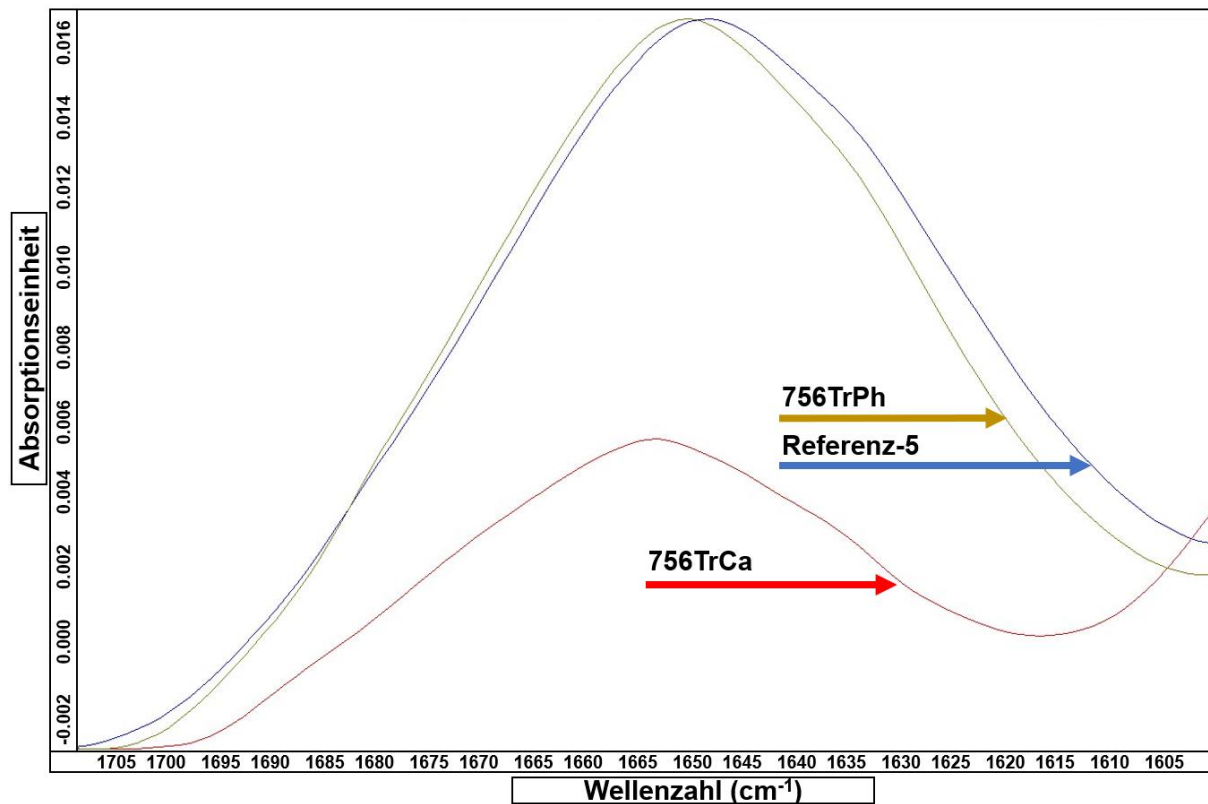


Abbildung 56 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie der Referenz-5. n = 1.

Bei der Betrachtung der Spektren im Bereich der Amid I-Bande wurden vergleichbare Ergebnisse für die Probe der Charge 756TrPh und der Referenz-5 festgestellt. Zusätzlich wurden keine Schulterbildungen beobachtet, die auf eine β -Aggregation hätte schließen können. Die minimale Absorptionsabnahme im Bereich von 1645–1605 cm^{-1} deutet auf geringfügige Strukturveränderungen hin. Für die Probe der Charge 756TrCa konnte eine deutliche Abnahme der Absorption im Bereich der Amid I-Bande festgestellt werden. Dies lässt auf eine deutliche Veränderung der Allergoid-Struktur schließen.

In Tabelle 42 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile und des Korrelationskoeffizienten mit Referenz-5 dargestellt.

Tabelle 42 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh und der Referenz-5 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-5. n = 1.

Probe	Referenz-5	756TrCa	756TrPh
Gehalt α -Helix (%)	26,6	23,9	23,8
Gehalt β -Faltblatt (%)	19,4	0,0	14,3
Korrelationskoeffizient mit Referenz-5 (%)	--	50,8	93,3

Mit der FTIR-Analyse wurde für die Probe der Charge 756TrPh eine geringfügige Abnahme des α -Helix- und β -Faltblattgehalts im Vergleich zur Referenz-5 detektiert, was auf vereinzelte Strukturveränderungen des Allergoids hindeutet. Des Weiteren wurde eine hohe Übereinstimmung zwischen den Spektren im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande ermittelt, die durch einen Korrelationskoeffizienten von über 90 % ausgedrückt wird. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrCa wurde eine geringfügige Abnahme der α -Helixanteile und der vollständige Verlust der β -Faltblattanteile festgestellt. Der Korrelationskoeffizient des Spektrums der Probe war zudem um 50 % gegenüber der Referenz-5 verringert. Dies könnte auf einer starken Allergoid-Aggregation basieren, die durch chemische oder thermische Denaturierung verursacht wurde [202].

Um lediglich den Einfluss der Lyophilisierung auf das Allergoid beider Chargen zu untersuchen, wurde eine Probe beider Lyophilisate mittels FTIR-Analyse untersucht und mit der Referenzprobe verglichen.

Abbildung 57 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich von 1700–1600 cm^{-1} für die Probe des Allergoid-Trehalose- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - und Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats sowie der Referenz-5.

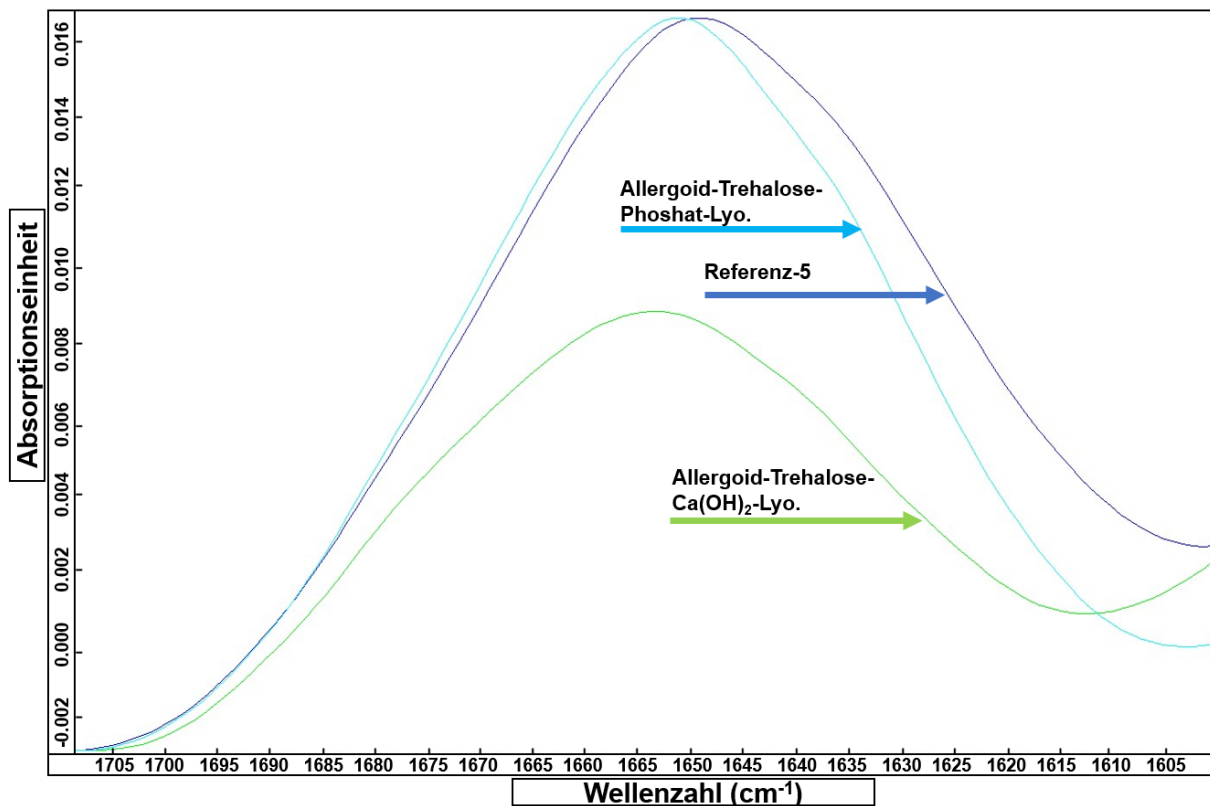


Abbildung 57 FTIR-Spektrum im Bereich der Amid I-Bande des Allergoid-Trehalose- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - und Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats Proben sowie der Referenz-5.

Beim Vergleich des Spektrums des Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats mit der Referenz-5 konnten geringfügige Unterschiede detektiert werden. Eine Absorptionsabnahme im Bereich von 1645–1605 cm^{-1} wurde bereits beim extrahierten Allergoid der Charge 756TrPh beobachtet. In beiden Fällen deutet dies auf geringfügige Strukturveränderungen am Allergoid hin. Dass diese Destabilisierung des Allergoids für die Probe der Charge 756TrPh während der Extrusion entstand, konnte mit dieser Untersuchung ausgeschlossen werden. Die geringfügigen Abweichungen zu der Referenz-5 entstanden möglicherweise durch die Lyophilisierung. Das Spektrum des Allergoid-Trehalose- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lyophilisats zeigte im Bereich der Amid I-Bande, wie bereits bei der Probe des extrahierten Allergoids der Charge 756TrCa, eine deutliche Reduzierung der Absorption. Diese war im Vergleich zu dem extrahierten Allergoid aus Implantaten dieser Charge jedoch weniger ausgeprägt.

In Tabelle 43 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile der Lyophilisate und deren Korrelationskoeffizienten mit der Referenz-5 dargestellt.

Tabelle 43 Sekundärstrukturanteile des Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂- und Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisats und der Referenz-5 sowie deren Korrelationskoeffizient. n = 1.

Probe	Referenz-5	Allergoid-Trehalose-Ca(OH) ₂ -Lyophilisat	Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisat
Gehalt α-Helix (%)	26,6	17,2	25,0
Gehalt β-Faltblatt (%)	19,4	5,3	13,8
Korrelationskoeffizient mit Referenz-5 (%)	--	68,0	93,0

Das Allergoid-Trehalose-Phosphat-Lyophilisat wies im Vergleich zur Referenz-5 einen vergleichbaren α-Helix- und leicht reduzierten β-Faltblattgehalt auf. Darüber hinaus wurde eine hohe Übereinstimmung des Spektrums im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande mit der Referenz-5 berechnet. Dies wurde auch für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrPh festgestellt. Das Allergoid-Trehalose-Ca(OH)₂-Lyophilisat wies im Vergleich zu der Referenz-5 eine deutliche Reduktion des α-Helix- und β-Faltblattgehalts auf. Dies lässt auf eine verstärkte Strukturveränderung und Aggregation des Allergoids schließen. Beim Vergleich des extrahierten Allergoids der Charge 756TrCa mit dem Lyophilisat konnte eine zusätzliche Abnahme des Korrelationskoeffizienten um 16,8 % für das extrahierte Allergoid festgestellt werden. Die Ergebnisse und die Beobachtung aus dem Spektrenvergleich unterstützten die Hypothese, dass das Allergoid der Charge 756TrCa destabilisiert in der Extrusion verwendet wurde. Diese Destabilisierung wurde jedoch im Verlauf der Extrusion weiter verstärkt.

4.5.3.5. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

Bereits in einem Vorversuch dieses Kapitels (4.5.1) wurde eine verringerte IgG-Bindungsaktivität für das Lyophilisat der Charge 756TrCa festgestellt. Mit der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität des extrahierten Allergoids wurde überprüft, ob diese Abnahme durch die Extrusion zusätzlich verstärkt wurde.

In Abbildung 58 sind die Messungen der IgG-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie der Referenz-5 dargestellt.

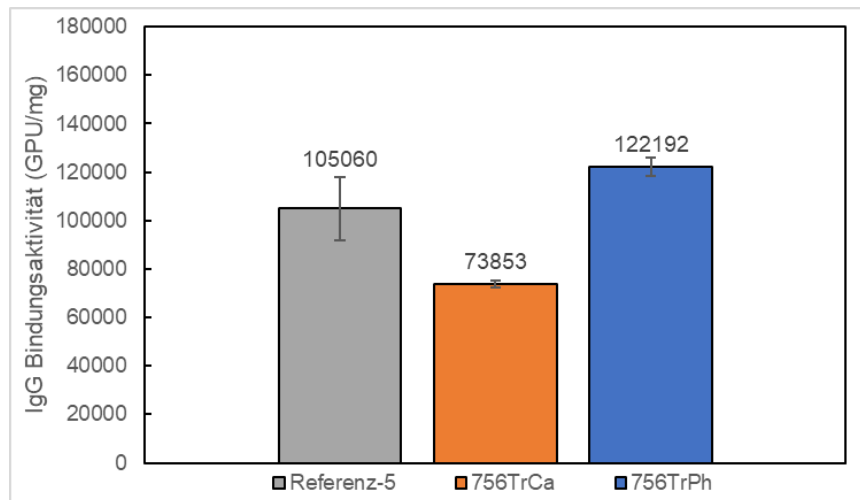


Abbildung 58 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie der Referenz-5. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Mit der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität wurde für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrCa eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität von 30 % im Vergleich zu der Referenz-5 berechnet (Abbildung 58). Eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität von 17 % im Vergleich zur Referenz-5 konnte bereits für das Lyophilisat dieser Charge festgestellt werden. In beiden Fällen weist dies auf einen Verlust von IgG-bindenden Allergoid-Strukturen hin. Für die Proben der Charge 756TrPh wurde ein Anstieg der IgG-Bindungsaktivität von 16 % im Vergleich zu der Referenz detektiert und deutet auf vereinzelte strukturelle Veränderungen mit der Exposition von IgG-Epitopen am Allergoid hin. Grundsätzlich kann jedoch von einem allgemeinen Erhalt der IgG-Bindungsaktivität für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrPh ausgegangen werden. Die IgG-Bindungsaktivität der Referenz-5 (105.060 GPU/mg) war mit der Referenz-1 (92.649 GPU/mg) und Referenz-4 (133.362 GPU/mg) vergleichbar.

4.5.3.6. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

In Abbildung 59 sind die Ergebnisse der Bestimmung der IgE-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrCa und 756TrPh sowie die Referenz-5 dargestellt.

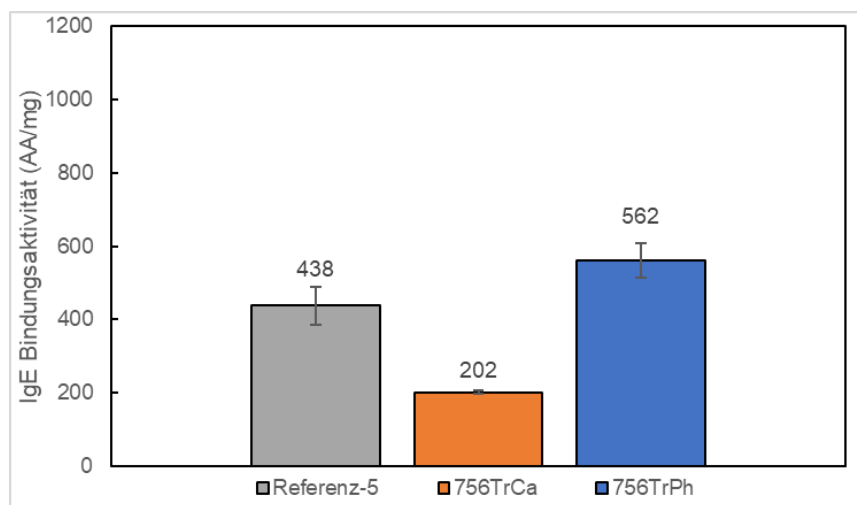


Abbildung 59 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa (n = 6) und 756TrPh (n = 6) sowie der Referenz-5 (n = 3). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken).

Für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrCa wurde eine Abnahme der IgE-Bindungsaktivität von 53,8 % im Vergleich zur Referenz-5 berechnet. Die Destabilisierung des Allergoids durch die Extrusion konnte in dieser Studie durch eine zusätzliche Abnahme der IgE-Bindungsaktivität von ca. 10 % im Vergleich zur Lyophilisat-Probe dieser Charge gezeigt werden (Kapitel 4.5.1). Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrPh wurde eine Zunahme der IgE-Bindungsaktivität zu der Referenzprobe von 28,5 % gemessen, was auf Strukturveränderungen am Allergoid hindeutet. Die IgE-Bindungsaktivität der Referenz-5 lag mit 438 AA/mg im Bereich der Referenz-1 (292 AA/mg) und Referenz-4 (777 AA/mg bzw. 308 AA/mg). Die Abweichungen können auf eine Variabilität der einzelnen Allergoid-Chargen und des ELISAs zurückgeführt werden.

4.5.3.7. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Das extrahierte Allergoid der Charge 756TrPh wies geringfügige Unterschiede zur Referenzprobe auf, die auf strukturelle Veränderungen des Allergoids zurückzuführen sind. Die Unterschiede waren besonders bei der SEC-Analyse und der Bestimmung der IgG- und IgE-Bindungsaktivität höher im Vergleich mit den bereits getesteten Formulierungen mit einer Gesamtbelastung von 17,5 %. Möglicherweise beruht dies auf einer chargenspezifischen Variabilität. Eine weitere Erklärung wäre, dass das Allergoid durch den Prozess der Lyophilisierung bereits destabilisiert wurde. Dies wurde mittels FTIR-Strukturanalyse am verwendeten Lyophilisat festgestellt, stand jedoch im Widerspruch zu der unveränderten IgG-Bindungsaktivität. Während der Lyophilisierung könnte es zu einem selektiven Ausfall von einzelnen Phosphatkomponenten gekommen sein, die zu einer pH-Wert-Verschiebung in

den sauren Bereich und zur Destabilisierung des Allergoids führten. Pikal-Cleland *et al.* konnten diesbezüglich einen destabilisierenden Effekt auf Proteine, die in Phosphatpuffer lyophilisiert wurden, zeigen [203]. Die Verwendung von Trehalose könnte dabei als Stabilisator fungiert haben, was die geringfügigen Veränderungen und den allgemeinen Erhalt der Allergoid-spezifischen Charakteristika erklären würde.

Das extrahierte Allergoid aus den Implantaten der Charge 756TrCa wies in der SEC-Analyse eine deutliche Veränderung der Allergoid-Struktur mit Aggregatbildung auf. Die IEF-Analyse ergab einen partiellen Verlust des ursprünglichen Allergoidisierungsprofils und die FTIR-Analyse zeigte einen vollständigen Verlust der β -Faltblattstrukturen. Auch wurde erstmals ein deutlicher Abfall der IgG- und IgE-Bindungsaktivität für extrahiertes Allergoid aus Implantaten beobachtet. Grundsätzlich wurde mit allen durchgeführten Methoden Ergebnisse generiert, die ein stark verändertes Allergoid nach Extrusion zeigen. Mit der SEC-Analytik, FTIR-Strukturanalyse und der Bestimmung der IgG- und IgE-Bindungsaktivität wurde bereits eine Destabilisierung des Allergoids durch die Lyophilisierung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ festgestellt. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine alkalische Vorbelastung des Allergoids zu einer Verminderung seiner natürlichen thermischen Stabilität führt, wodurch die Extrusion einen verstärkten Einfluss auf das Allergoid hat. Möglicherweise basiert dies auf einer Reversion der Allergoid-typischen inter- und intramolekularen Quervernetzungen.

4.5.4. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Freisetzung und Stabilität des Allergoids durch Neutralisierung der während der Polymererosion anfallenden Säuren zu optimieren. Im vorherigen Kapitel konnte für den verwendeten Hilfsstoff $\text{Mg}(\text{OH})_2$ zwar eine Erhöhung der Allergoid-Freisetzung festgestellt werden, jedoch kein Einfluss auf den Zeitpunkt der maximalen Polymererosion oder die IgG-Bindungsaktivität des freigesetzten Allergoids während der In-vitro-Studie (Kapitel 4.4.4). Die Untersuchung des Einflusses einer stärkeren Base wurde mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ durchgeführt. Für die Phosphatsalze wurde eine Pufferung auf pH 7,4 durch Bildung eines Puffersystems innerhalb der Polymermatrix angestrebt.

In Abbildung 60 sind die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung und des pH-Werts für die Implantate der Chargen 756TrCa und 756TrPh dargestellt.

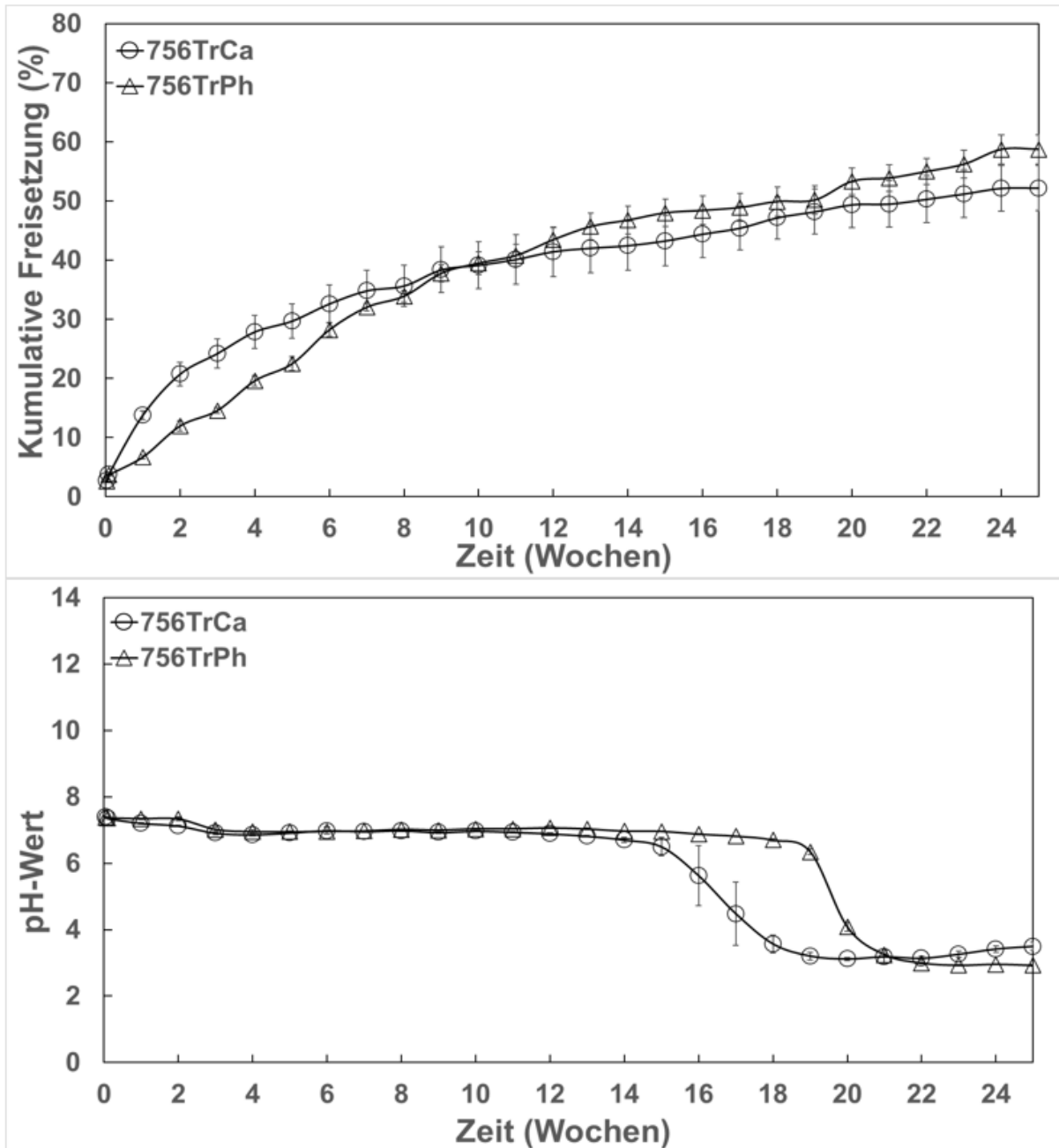


Abbildung 60 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmittel für Proben der Chargen 756TrCa und 756TrPh. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Für die Chargen 756TrCa und 756TrPh wurde in dieser Studie eine Langzeitfreisetzung des Allergoids aus den Implantaten über einen Zeitraum von 25 Wochen festgestellt. Es wurden Unterschiede für den Freisetzungsverlauf sowie den pH-Wert während der In-vitro-Studie zwischen den Chargen festgestellt. Die Initialfreisetzung nach einer Woche war für die Charge 756TrPh mit 6,7 % (\pm 0,4 %) die niedrigste, die bisher für Implantate mit einer

Gesamtbeladung von 17,5 % gemessen wurde. Möglicherweise hat die Verwendung von Phosphatsalzen im Vergleich zu anderen Formulierungen zu einer geringeren Ausbildung eines Porensystems im Implantat geführt. Die REM-Analyse der Implantate-Querschnitte dieser Charge ergab bereits eine geringfügige innere Porosität (Abbildung 52, Kapitel 4.5.2). Grundsätzlich war der Verlauf der In-vitro-Freisetzung über 25 Wochen für die Implantate der Charge 756TrPh vergleichbar zu den Chargen 756TrNa und 756Tr+ (Kapitel 4.3.4) mit einer Gesamtbeladung von 17,5 %. Der pH-Abfall um Woche 20 war ebenfalls identisch zu diesen Chargen. Für die Charge 756TrPh wurde keine Auswirkung auf den pH-Wert und den Zeitpunkt der maximalen Polymererosion durch die Bildung eines Phosphatpuffers im Inneren der Polymermatrix festgestellt. Möglicherweise war die Konzentration der Phosphatsalze im Implantat für den gewünschten Effekt zu niedrig.

Für die Proben der Charge 756TrCa wurde die bislang höchste Initialfreisetzung nach einer Woche mit einer freigesetzten kumulativen Menge von 13,8 % ($\pm 0,8$ %) festgestellt (Abbildung 60). Nach Woche 9 wurden bis zum Ende der Freisetzungsstudie keine wöchentlichen Freisetzungsraten von mehr als 2 % berechnet. Interessanterweise begann der pH-Abfall und der damit zusammenhängende Zeitpunkt der maximalen Polymererosion bereits in Woche 16. Dies wurde bislang nur bei der Placebo-Charge 756Plac beobachtet (Kapitel 4.1.7) und stellt einen Widerspruch zur aufgestellten Hypothese dar, dass ein basisch wirkender Zusatz der Ansäuerung innerhalb der Polymermatrix entgegenwirkt und dadurch den Beginn der Polymererosion verzögert. Machatschek *et al.* beschreiben, dass ein saurer Mikro-pH-Wert im Inneren der Polymermatrix keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Erosionsverhalten PLGA-basierter Trägersysteme hat [204]. Zusätzlich konnte dabei festgestellt werden, dass eine Erhöhung des pH-Werts jedoch zu einer deutlich beschleunigten PLGA-Degradation führt. Dies würde den in dieser Studie festgestellten früheren Zeitpunkt der maximalen Polymererosion (pH-Abfall) für die Proben der Charge 756TrCa erklären, da durch die Beladung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es möglicherweise zu einer vorübergehenden starken Erhöhung des pH-Werts innerhalb der Polymermatrix kam. Mit Zunahme des Polymerabbaus könnte es zu einer erhöhten Interaktion von destabilisiertem Allergoid und PLGA-Abbauprodukten gekommen sein, was die Abnahme der Freisetzungsrates über den Verlauf der In-vitro-Freisetzung erklären würde.

Nach 25 Wochen wurde eine kumulative Gesamtfreisetzung von 52,2 % ($\pm 3,9$ %) und 58,8 % ($\pm 2,5$ %) für die Implantate der Chargen 756TrCa und 756TrPh berechnet. Für die Charge 756TrPh wurde im Vergleich zur Charge 756TrCa eine höhere Gesamtfreisetzung detektiert, welche vergleichbar mit den Proben der Chargen 756Tr+ (61,8 %) und 756TrNa (64,4 %), jedoch um 12,1 % geringer als bei der Charge 756TrMg(1) (70,9 %) war.

Um zu untersuchen, ob die Phosphatsalze durch Pufferwirkung im Inneren der Polymermatrix einer Allergoid-Destabilisierung während der Polymererosion entgegenwirken, wurde die IgG-Bindungsaktivität der Freisetzungsprouben der Charge 756TrPh gemessen und die relative Bindungsaktivität zur Ausgangsaktivität (extrahiertes Allergoid) dieser Charge bestimmt (Tabelle 44).

Tabelle 44 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrPh in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW \pm SD, n = 6.

Relative IgG-Bindungsaktivität					
Woche	2	3	4	7	10
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	33,4 (\pm 6,4)	22,9 (\pm 3,9)	20,0 (\pm 4,3)	5,8 (\pm 3,0)	4,1 (\pm 1,6)

Im Verlauf der Freisetzungsstudie wurde eine Abnahme der IgG-bindenden Epitope auf dem freigesetzten Allergoid festgestellt. Diese Abnahme war vergleichbar mit der Charge 756TrMg(1) bis Woche 7 (Tabelle 37, Kapitel 4.4.4), danach jedoch stärker ausgeprägt. Folglich lässt sich nur ein minimaler Effekt durch eine Pufferung feststellen. Möglicherweise war die gewählte Beladung der Phosphatsalze mit 2,5 % für einen entsprechenden Effekt zu niedrig. Die Stabilisierung von gelösten Proteinen mittels Phosphatpuffern ist bereits mehrfach publiziert worden [200, 205]. Die Verwendung von Phosphatsalzen zur Proteinstabilisierung in PLGA-basierten Implantaten wurde bislang aber nicht untersucht. Die Freisetzungsstudie wurde nach 25 Wochen beendet, da keine Optimierung durch eine Phosphatsalz-Formulierung im Vergleich zu der Charge 756TrMg(1) detektiert wurde.

In Tabelle 45 sind die Ergebnisse der relativen Bindungsaktivität zur Ausgangsaktivität (extrahiertes Allergoid) für die Freisetzungsprouben der Charge 756TrCa dargestellt.

Tabelle 45 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrCa in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW \pm SD, n = 6.

Relative IgG-Bindungsaktivität					
Woche	2	3	4	7	10
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	55,3 (\pm 10,6)	37,8 (\pm 6,5)	33,1 (\pm 7,2)	9,6 (\pm 4,9)	6,8 (\pm 2,6)

Im Verlauf der In-vitro-Studie wurde bei allen gemessenen Proben eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität über den untersuchten Zeitraum festgestellt. Dabei wurden höhere relative Bindungsaktivitäten im Vergleich zu den Proben der Charge 756TrPh gemessen (Tabelle 44).

Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die IgG-Bindungsaktivität des extrahierten Allergoids der Charge 756TrCa bereits deutlich vermindert war. Die Freisetzungsstudie wurde nach 25 Wochen beendet, da im Vergleich zur Charge 756TrMg(1) keine Verbesserung durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ festgestellt werden konnte.

In diesem Teil der Arbeit konnte die Langzeitfreisetzung des Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrCa und 756TrPh über einen Zeitraum von 25 Wochen detektiert werden. In beiden Fällen nahm die IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Studie ab, was darauf hindeutet, dass eine Stabilisierung des Allergoids während der In-vitro-Freisetzung nicht oder nur geringfügig stattfand. Der Freisetzungsverlauf war für die Proben der Charge 756TrPh vergleichbar mit den Chargen aus Kapitel 4.3.4, jedoch der Formulierung mit $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Kapitel 4.4.4) hinsichtlich der Gesamtfreisetzung unterlegen. Für die Proben der Charge 756TrCa wurde eine anfänglich erhöhte Freisetzung und eine frühzeitige Polymererosion festgestellt. Dies lässt sich auf die alkalische Katalyse des Polymerabbaus zurückführen.

4.5.5. Kapitelzusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde die erfolgreiche Herstellung von PLGA-basierten Implantaten mit einer Gesamtbeladung von 17,5 %, welche 2,5 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder Phosphatsalze beinhalteten, gezeigt. In beiden Fällen erzeugte die Extrusion in morphologisch homogene Implantate mit einer Allergoid-Beladung im erwarteten Bereich. Zusätzlich wurde eine geringe innere Porosität für beide Chargen festgestellt, was auf die geringeren Zuführraten im Vergleich zu den Chargen aus Kapitel 4.3.4 zurückgeführt werden konnte.

Das Allergoid der Charge 756TrPh wurde vom Herstellungsprozess in seiner Stabilität geringfügig verändert, jedoch stärker als dies bei Formulierungen der Allergoid-Charge W8003765 (756Tr+, 756TrNa, 756TrMg(1)) der Fall war. Dies wurde auf eine verringerte Variabilität der Allergoid-Charge oder eine Vorbelastung des Allergoids durch die Lyophilisierung mit Phosphatsalzen zurückgeführt. Der Verlauf der Freisetzung sowie das Erosionsverhalten des Polymers war mit den Chargen aus Kapitel 4.3.4 vergleichbar. Eine Stabilisierung des Allergoids, während der In-vitro-Freisetzung, konnte für die Phosphat-Formulierung nur in geringem Maße gezeigt werden. Möglicherweise war die Konzentration der verwendeten Phosphatsalze und damit die Stärke des entstehenden Puffersystems nicht ausreichend hoch, um einen entsprechenden Effekt zu erzielen.

Für die Charge 756TrCa wurde in einem Vorversuch mit dem verwendeten Lyophilisat eine Destabilisierung des Allergoids durch die Lyophilisierung beobachtet. Bei der Analyse des extrahierten Allergoids aus Implantaten dieser Charge wurde festgestellt, dass eine alkalische Vorbelastung des Allergoids, dessen natürliche Temperaturstabilität reduziert und anfälliger für eine thermische Belastung während der Extrusion macht. Um die Qualität des

Allergoids nach der Extrusion zu gewährleisten, sollten daher vorrangige Prozessschritte vermieden werden, die zu stark alkalischen Bedingungen führen. Während der In-vitro-Studie konnte eine beschleunigte Polymererosion für das Polymer RG 756 S analysiert werden, was auf die Bildung eines alkalischen pH-Werts innerhalb der Polymermatrix zurückgeführt wurde. Dies könnte auch einen destabilisierenden Einfluss auf das Allergoid gehabt haben, wodurch der IgG-Abfall über den Zeitraum der Freisetzungsstudie und die verminderte Allergoid-Freisetzung erklärbar gewesen wäre. Zhu *et al.* konnten eine erhöhte Bildung kovalent gebundener BSA-Aggregate in PLGA-Implantaten mit einer $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beladung von 3 % zeigen, was auf die Bildung eines alkalischen Mikro-pH-Werts zurückgeführt wurde [198].

4.6. Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses für Trehalose-stabilisierte Birken-Allergoid Implantate mit $\text{Mg}(\text{OH})_2$

4.6.1. Einleitung und Herstellungsprozess

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses anhand der Formulierungszusammensetzung der Charge 756TrMg(1) zu untersuchen, da mit dieser Charge die höchste kumulative Freisetzung nach 40 Wochen gemessen wurde (Kapitel 4.4.4) und sich somit als potenzielle Basis-Formulierung für eine Weiterentwicklung erwies. Es wurden zwei Implantat-Chargen (756TrMg(2) und 756TrMg(3)) basierend auf dem Polymer RG 756 S mit einer Gesamtbeladung von 17,5 %, bestehend aus 10 % Birken-Allergoid, 5 % Trehalose und 2,5 % $\text{Mg}(\text{OH})_2$ hergestellt. Für die Charge 756TrMg(2) wurde das in Kapitel 4.4 hergestellte Allergoid-Trehalose- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Lyophilisat (Lyophilisat-1) verwendet. Für die Charge 756TrMg(3) wurde ein neues Allergoid-Trehalose- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Lyophilisat (Lyophilisat-2) basierend auf der Allergoid-Charge W21066835 hergestellt. In diesem Kapitel wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Die Reproduzierbarkeit der Extrusion und die sich daraus resultierenden Ergebnisse für die Implantat- und Allergoid-Analytik sowie die In-vitro-Freisetzung.
- Der Einfluss verschiedener Birken-Allergoid-Chargen auf die Ergebnisse für Allergoid-Charakterisierung und In-vitro-Freisetzung.

Für das Lyophilisat-1 wurde eine vollständige Beibehaltung der typischen Allergoid-Charakteristika gezeigt (Kapitel 4.4.1). In einem Vorversuch wurde die prozentuale Wiederfindung und IgG-Bindungsaktivität des Allergoids aus Lyophilisat-2 untersucht. Dabei

wurde eine prozentuale Allergoid-Wiederfindung von 104,4 % ($\pm 1,8$ %, n = 3) berechnet. Der pH-Wert der Proben betrug pH 9,4 ($\pm 0,1$, n = 3) und war damit vergleichbar mit dem von Lyophilisat-1 (pH 9,8). Die Bestimmung der IgG-basierten Aktivität ergab für das Allergoid aus Lyophilisat-2 eine Bindungsaktivität von 100.266 GPU/mg (± 2.789 GPU/mg, n = 3). Dabei wurde eine Abweichung von weniger als 5 % von der Referenz-5 (105.060 GPU/mg (± 13.026 GPU/mg, n = 3)) berechnet. Für das Allergoid aus Lyophilisat-2 konnte somit eine vollständige Allergoid-Wiederfindung und der Erhalt der IgG-Bindungsaktivität gezeigt werden.

Um die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses und die Stabilität der Allergoid-Chargen mit gleicher Formulierungszusammensetzung zu untersuchen, wurden Implantat-Chargen mit den Lyophilisaten und dem Polymer RG 756 S hergestellt und charakterisiert. Die Prozessparameter für die Extrusion der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sind in Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 46 SME-Prozessparameter für die Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3). (Chargengröße, Zuführrate, Prozesszeit, Maximaldruck und Ausbeute).

Charge	756TrMg(2)	756TrMg(3)
Zusammensetzung		
RG 756 S	X	X
10 % (m/m) Birken-Allergoid	X	X
5 % (m/m) Trehalose	X	X
2,5 % (m/m) Mg(OH) ₂	X	X
Lyophilisat-Charge	1	2
Allergoid-Charge	W8003765	W21066835
SME-Prozessparameter		
Chargengröße (g)	5,0	4,9
Zuführrate (g/min)	0,40	0,40
Prozesszeit (min)	29	28
Maximaldruck (bar)	94	93
Ausbeute (%)	30,0	30,6

Die Extrusion der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) wurde erfolgreich durchgeführt. Bei der manuellen Zuführung des Extrusionsmaterials konnten für beide Chargen gleiche Zuführraten von 0,4 g/min erreicht werden, was zu fast gleichen Prozesszeiten von 29 min

bzw. 28 min führte. Die Prozessparameter beider Chargen waren nahezu identisch und bis auf die Zuführrate mit denen der Charge 756TrMg(1) (0,56 g/min) vergleichbar (Kapitel 4.4.1). Unter der Berücksichtigung des Materialverlustes für die Befüllung der Extruderdüse kann mit den ermittelten Ausbeuten beider Chargen von einem optimalen Durchsatz des zu extrudierenden Materials ausgegangen werden.

4.6.2. Morphologische Charakterisierung der Implantate

Um die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozess zu beurteilen, wurden die Implantate der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften untersucht. In Kapitel 4.4.2 wurde gezeigt, dass für die Charge 756TrMg(1) Implantate mit homogener Morphologie und einem Allergoid-Anteil nahe dem Soll-Wert (in allen getesteten Abschnitten) hergestellt wurden. Dies galt es mit der morphologischen Charakterisierung für die Chargen dieses Kapitels zu verifizieren. Es wurden stets Implantate aus unterschiedlichen Abschnitten des Extrudats (erster/zweiter Abschnitt) verwendet. Tabelle 47 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Masse, Länge und Durchmesser der Implantate sowie die Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion aus den Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3).

Tabelle 47 Bestimmung von Masse, Länge, Durchmesser und Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion für Implantate der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3). Angabe von MW \pm SD.

Parameter	756TrMg(2)	756TrMg(3)
Masse (mg) (n = 10)	28,6 (\pm 1,2)	27,5 (\pm 0,9)
Länge (mm) (n = 10)	5,5 (\pm 0,2)	5,2 (\pm 0,2)
Durchmesser (mm) (n = 10)	2,0 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,0)
Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion (%) (n = 6)	101,8 (\pm 8,4)	105,0 (\pm 3,7)

Bezüglich der Masse, Länge und Durchmesser der Implantate der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) wurden vergleichbare Werte bestimmt. Die geringfügig höhere Masse der Implantate der Charge 756TrMg(2) im Vergleich zur Charge 756TrMg(3) wurde auf die größere Länge der Implantate zurückgeführt. Das Massen-/Längen-Verhältnis war für die Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mit 5,2 mg/mm und 5,3 mg/mm nahezu gleich und mit dem der Charge 756TrMg(1) (5,0 mg/mm) vergleichbar. Die Bestimmung der Allergoid-Wiederfindung der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) ergab die vollständige Rückgewinnung des Allergoids aus den Implantaten. Allerdings wurde für die Charge 756TrMg(2) eine erhöhte Standardabweichung errechnet. Dabei wurden für die Implantate

aus dem ersten Abschnitt des Extrudats ein Allergoid-Gehalt unter dem Sollwert mit 93,7 % ($\pm 5,0$ %, $n = 3$) und für die Implantate aus dem zweiten Abschnitt des Extrudats ein Allergoid-Gehalt über dem Sollwert mit 107,2 % ($\pm 4,5$ %) festgestellt. Dies deutet auf einen inhomogenen Anteil des Allergoids in der Formulierung hin. Bestärkt wird diese Hypothese durch Materialrückstände, die in den ersten Zonen des Extruders nach der Extrusion identifiziert wurden (Abbildung 61).



Abbildung 61 Aufnahme des unteren Extruderbauteils nach Extrusion der Charge 756TrMg(2).

Diese Rückstände könnten auf die bereits beschriebene schlechte Löslichkeit des $\text{Mg}(\text{OH})_2$ vor der Lyophilisierung zurückzuführen sein, wodurch dieses möglicherweise nicht optimal zwischen den Allergoid-Molekülen verteilt war, sondern als feines Pulver im Lyophilisat verteilt vorlag. Sowohl das verwendete Polymer als auch das Allergoid-Lyophilisat besaßen nach Zerkleinerung bzw. Lyophilisierung eine sehr niedrige Schüttdichte (Abbildung 62).

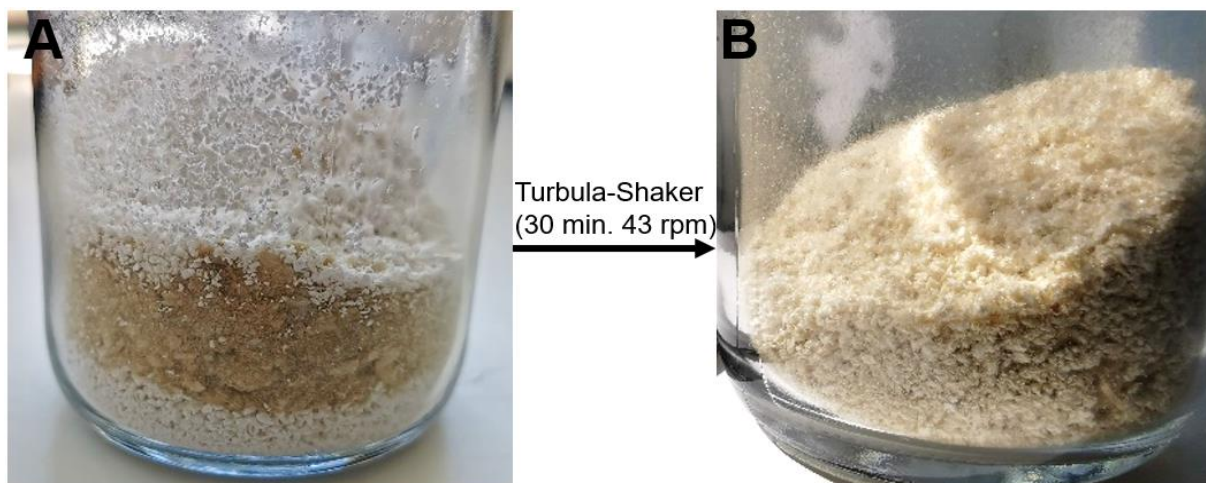


Abbildung 62 Polymer-Lyophilisat-Mischung nach Einwaage (A) und nach Mischen (B) vor der Extrusion der Charge 756TrMg(2).

Dieser Umstand könnte einen Entmischungsvorgang begünstigt haben. Eine unzureichende Erweichung des Materials vor der ersten Mischzone könnte dazu geführt haben, dass $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Pulver unter die Fördererlemente im Extruderraum fiel. Dies würde den über dem Sollwert liegenden Allergoid-Gehalt für die Implantate des zweiten Abschnitts des Extrudats erklären. Möglicherweise hat aber auch die verlängerte Standzeit des Lyophilisats, das drei Monate vor der Extrusion dieser Charge hergestellt wurde, eine Entmischung von Allergoid und Hilfsstoffe begünstigt.

Für die Implantate aus dem ersten und zweiten Abschnitt des Extrudats der Charge 756TrMg(3) wurde eine Allergoid-Wiederfindung nach Extraktion von 105,4 % ($\pm 3,5$ %, $n = 3$) bzw. 104,5 % ($\pm 3,8$ %, $n = 3$) ermittelt. Darüber hinaus wurden keine Rückstände im Extruder nach der Extrusion festgestellt. Die vollständige Allergoid-Rückgewinnung mit niedriger Standardabweichung für die Charge 756TrMg(3) zeigen einen Allergoid-Anteil nahe dem Soll-Wert für die getesteten Abschnitte.

Mit der REM-Analyse wurde die Mantelfläche der hergestellten Implantate 756TrMg(2) und 756TrMg(3) analysiert und dessen Mantelflächenbeschaffenheit bewertet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 63 dargestellt.

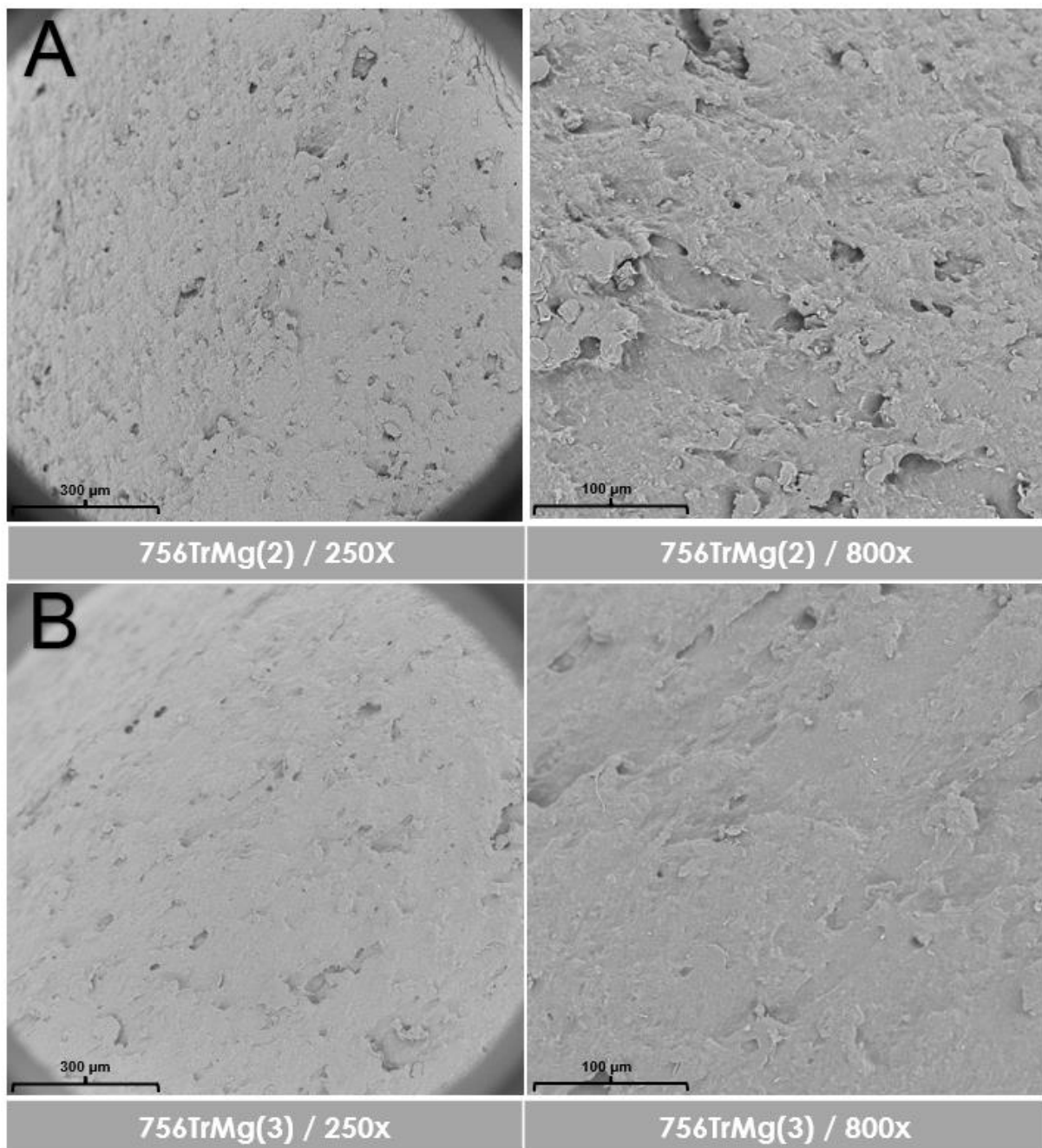


Abbildung 63 REM-Aufnahmen der Implantat-Mantelfläche von Proben der Chargen 756TrMg(2) (A) und 756TrMg(3) (B).

Die Mantelflächenanalyse der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) ergab vergleichbare Ergebnisse. Es wurden keine größeren Hohlräume oder stark unebene Strukturen identifiziert, die auf ein inhomogen geformtes Implantat schließen lassen. Für beide Chargen dieses Kapitels wurden bei einer 800-fachen Vergrößerung gleichmäßig verteilte partikuläre Strukturen auf dem Implantat beobachtet. Dadurch lässt sich auf eine gleichmäßige

Verteilung der Beladung in der Polymermatrix des untersuchten Bereiches schließen (Abbildung 63). Im Allgemeinen waren die Ergebnisse der REM-Analyse vergleichbar zur Charge 756TrMg(1) (Abbildung 39, Kapitel 4.4.2).

Um die innere Morphologie der Implantate zu untersuchen und mit der Charge 756TrMg(1) zu vergleichen, wurden Implantat-Querschnitte der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mittels REM-Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 64 dargestellt. Zusätzlich wurde die REM-Aufnahme der Charge 756TrMg(1) der Abbildung beigelegt.

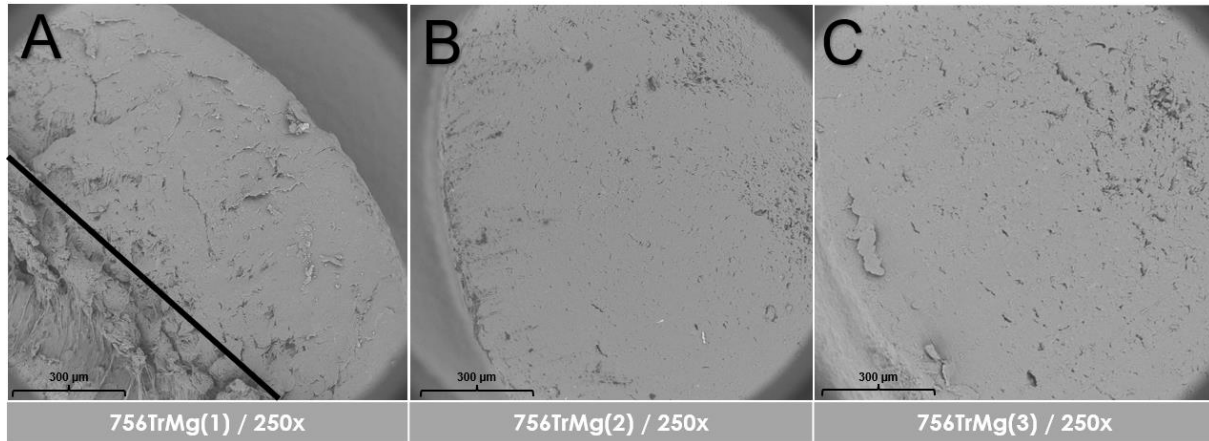


Abbildung 64 REM-Aufnahmen der Implantat-Querschnitte von Proben der Chargen 756TrMg(1) (A), 756TrMg(2) (B) und 756TrMg(3) (C).

Die REM-Analyse der Implantat-Querschnitte der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) ergab eine vergleichbare innere Struktur der Polymermatrix. In beiden Querschnitten wurden vermehrt kleinere Poren identifiziert. Beim Vergleich mit dem unbeschädigten Teil des Implantat-Querschnitts (oberhalb der Trennlinie) der Charge 756TrMg(1) wurde eine stärker uneben geformte innere Struktur für die Charge 756TrMg(1) festgestellt, was auf die schnellere Zuführrate bei der Herstellung dieser Charge zurückgeführt wurde. In keinem der dargestellten Implantat-Querschnitte wurden größere Hohlräume wie bei den Chargen 756Tr+ und 756TrNa (Abbildung 31, Kapitel 4.3.2) beobachtet. Dies spricht für eine ausreichend gute Erweichung des Polymers während der Extrusion.

In diesem Teil der Arbeit konnten die Ergebnisse der morphologischen Charakterisierung der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) teilweise zu denen der Charge 756TrMg(1) reproduziert werden. Die Extrusion erzeugte morphologisch homogene Implantate mit einheitlicher Mantelflächenbeschaffenheit und inneren Polymerstruktur. Bei der Charge 756TrMg(3) wurde ein Allergoid-Gehalt nahe dem Sollwert detektiert. Für die Charge 756TrMg(2) wurde hingegen eine inhomogene Beladung des Allergoids über das hergestellte Extrudat ermittelt, was auf ein mögliches entmischen von Allergoid oder Hilfsstoffe zurückgeführt wurde. Die Differenz der Allergoid-Wiederfindung zwischen dem ersten und zweiten Extrudatabschnitt dieser Charge betrug 13,5 %.

4.6.3. Allergoid-Charakterisierung

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Allergoid-Charakterisierung vom extrahierten Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) dargestellt. Mit der Allergoid-Charakterisierung wurde in diesem Kapitel neben der Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses auch der Einfluss unterschiedlicher Allergoid-Chargen auf die Allergoid-Stabilität untersucht. In Kapitel 4.5 wurde bereits eine mögliche Chargenvariabilität festgestellt. Da die produzierten Chargen in diesem Kapitel auf zwei verschiedenen Allergoid-Chargen basierten, wurden die zwei Referenzproben Referenz-4 (W8003675) und Referenz-5 (W21066835) verwendet.

4.6.3.1. Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Allergoids mittels DLS

In Tabelle 48 sind die Ergebnisse der DLS-Analytik dargestellt.

Tabelle 48 Ergebnisse der DLS-Analytik des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5. Darstellung des mittleren R_h -Werts mit den entsprechenden prozentualen Massen- und numerischen Anteilen. Angabe von MW \pm SD, n = 3.

Probe	Referenz-4	756TrMg(2)	Referenz-5	756TrMg(3)
Mittlerer R_h -Wert (nm)	1,6 (\pm 0,3)	1,3 (\pm 0,1)	1,4 (\pm 0,1)	1,6 (\pm 0,3)
Prozentualer Massenanteil (%)	99,5 (\pm 0,5)	98,1 (\pm 0,7)	99,5 (\pm 0,1)	99,7 (\pm 0,1)
Prozentualer numerischer Anteil (%)	100 (\pm 0,0)	99,9 (\pm 0,1)	100 (\pm 0,0)	100 (\pm 0,0)

Bei der Bestimmung des mittleren R_h -Werts wurden für die Proben der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) vergleichbare Ergebnisse mit den Referenzproben detektiert. Die niedrigen R_h -Werte mit jeweils hohen prozentualen Massen- und numerischen Anteilen zeigen einen Erhalt der Allergoid-Größe und die Abwesenheit von Allergoid-Aggregaten. Die Ergebnisse waren mit denen der Charge 756TrMg(1) mit 1,7 nm (\pm 0,5 nm) vergleichbar (Kapitel 4.4.3.1).

4.6.3.2. Bestimmung der molekularen Masse und R_h -Wert mittels SEC-Analyse

In Abbildung 65 sind die SEC-Chromatogramme des extrahiertem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(2) mit der Referenz-4 dargestellt.

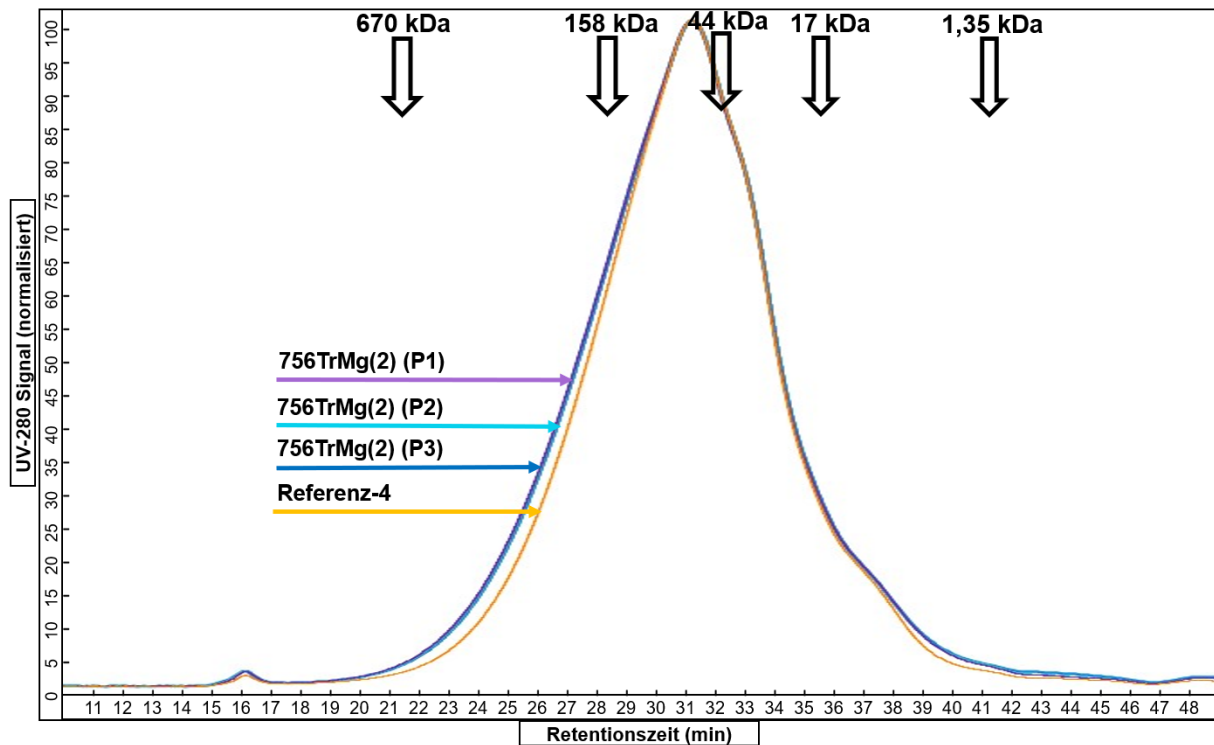


Abbildung 65 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(2) sowie der Referenz-4 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Bei den Chromatogrammen des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(2) wurden nur minimale Unterschiede zur Referenz-4 im Bereich der Retentionszeit von 21–29 min festgestellt. Dies konnte ebenfalls für die Proben der Charge 756TrMg(1) (Kapitel 4.4.3.2, Abbildung 42) gezeigt werden. In beiden Fällen deutet dieses auf einen Erhalt der Allergoid-Struktur und die Abwesenheit von Aggregaten nach Extrusion hin.

In Abbildung 66 sind die SEC-Chromatogramme des extrahiertem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(3) mit der Referenz-5 dargestellt.

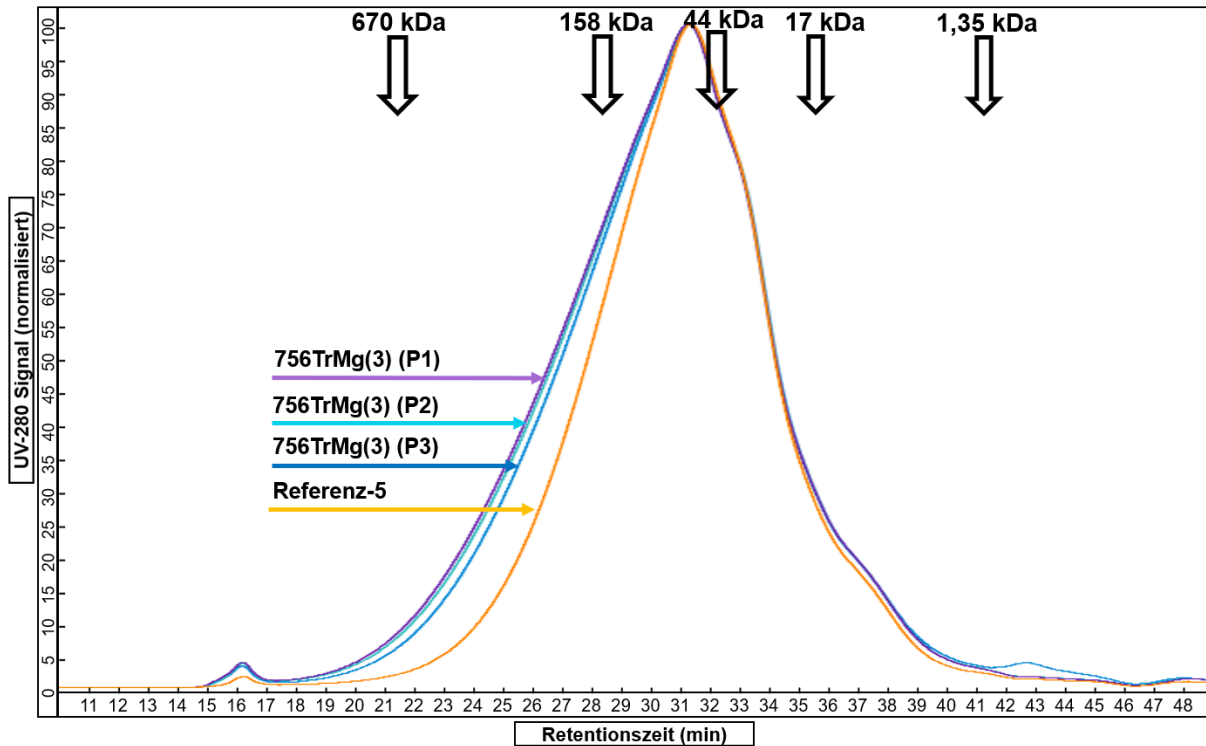


Abbildung 66 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(3) sowie der Referenz-5 mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

Beim Vergleich der SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(3) mit der Referenz-5 wurden Unterschiede hinsichtlich der Bildung schneller eluierender hochmolekularer Proteinspezies im Bereich der Retentionszeit von 16–29 min beobachtet. Dies könnte möglicherweise auf einer Variabilität der Allergoid-Charge W21066835 basieren und wurde bereits für das Allergoid der Charge 756TrPh in Kapitel 4.5.3.2 festgestellt (Abbildung 54).

Tabelle 49 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie den Referenzproben Referenz-4 und Referenz-5.

Tabelle 49 Ergebnisse der Berechnung der molekularen Masse und des R_h -Werts des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5. Angabe von $MW \pm SD$, $n = 3$.

Probe	Referenz-4	756TrMg(2)	Referenz-5	756TrMg(3)
Molekulare Masse (kDa)	47,0 ($\pm 0,2$)	46,8 ($\pm 0,2$)	45,7 ($\pm 0,1$)	46,5 ($\pm 0,2$)
R_h -Wert (nm)	3,1 ($\pm 0,0$)	3,1 ($\pm 0,0$)	3,0 ($\pm 0,0$)	3,1 ($\pm 0,0$)

Für alle Proben wurden vergleichbare Werte für die molekulare Masse und den R_h -Werte bestimmt. Diese waren vergleichbar zu den Ergebnissen der Charge 756TrMg(1) (46,5 kDa, 3,1 nm). Es kann somit bei allen drei Chargen von einem Erhalt der hydrodynamischen Größe und der molekularen Masse des Allergoids nach Extrusion ausgegangen werden.

4.6.3.3. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR

Abbildung 67 zeigt das FTIR-Spektrum der Amid I-Bande im Bereich $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5.

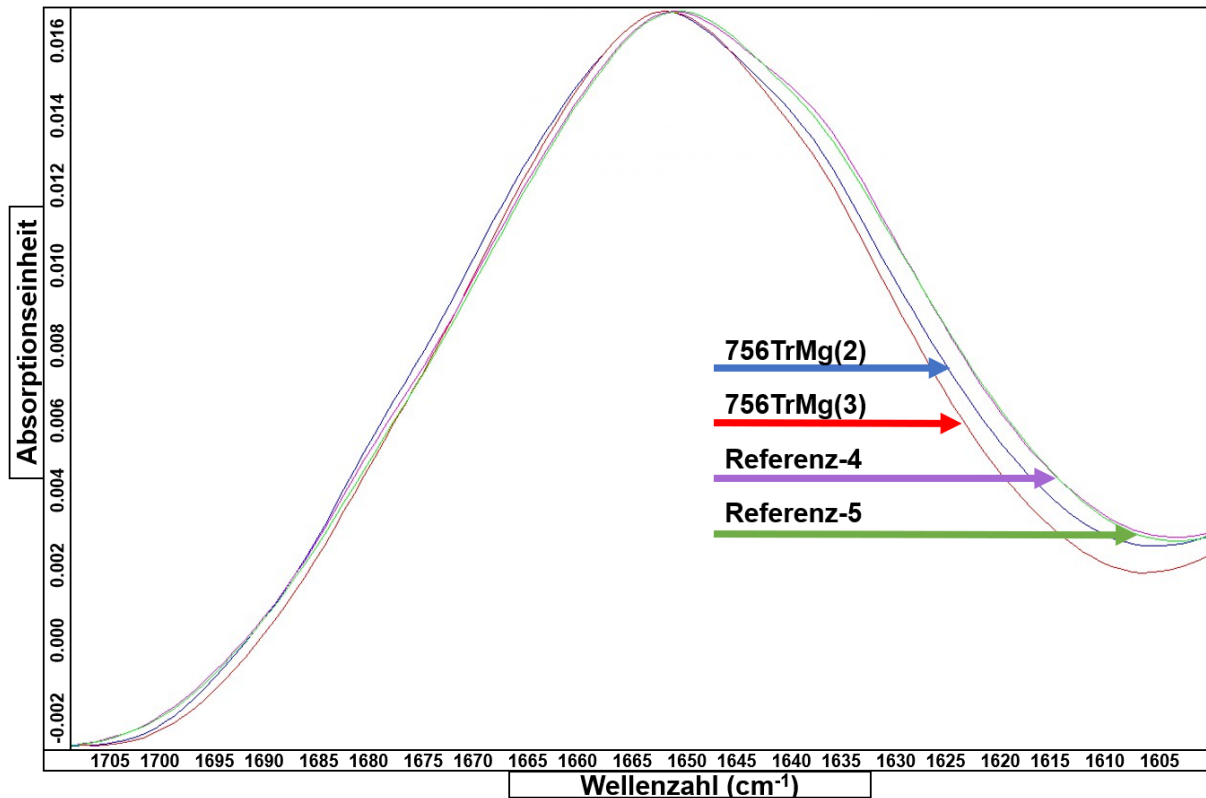


Abbildung 67 FTIR-Spektrum der Amid I-Bande des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5. $n = 1$.

Beim Vergleich der Spektren des Allergoids der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mit den korrespondierenden Referenzproben wurden nur geringfügige Unterschiede festgestellt. In beiden Fällen wurde eine minimale Abnahme der Absorption im Bereich von $1645\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$ festgestellt und könnte das Resultat einzelner Strukturveränderungen nach Extrusion sein. Diese Abnahme war für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(3) höher als für die Charge 756TrMg(2). Für beide Chargen wurde die Bildung von β -Aggregaten durch das Fehlen von Schulterbildungen im Spektrum ausgeschlossen. Das Spektrum der Referenz-4 war zum Spektrum der Referenz-5 gleich.

In Tabelle 50 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile und der Korrelationskoeffizienten zwischen dem extrahierten Allergoid der Charge 756TrMg(2) mit der Referenz-4 und dem extrahierten Allergoid der Charge 756TrMg(3) mit der Referenz-5 dargestellt.

Tabelle 50 Sekundärstrukturanteile für extrahiertes Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) und der Referenz-4 und Referenz-5 sowie deren Korrelationskoeffizient mit der Referenz-4 bzw. Referenz-5. n = 1.

Probe	Referenz-4	756TrMg(2)	Referenz-5	756TrMg(3)
Gehalt α -Helix (%)	25,8	23,9	26,6	22,0
Gehalt β -Faltblatt (%)	19,1	15,3	19,4	13,5
Korrelationskoeffizient mit Referenz-4/-5 (%)	--	94,0	--	92,0

Bei der Berechnung der Sekundärstrukturanteile wurden für beide Chargen verminderte α -Helix- und β -Faltblattanteile im Vergleich zu den korrespondierenden Referenzproben gemessen. Die Abnahme könnte in beiden Fällen auf vereinzelte Strukturveränderungen hindeuten, die durch die Prozessbedingungen der Extrusion ausgelöst wurden. Der Abfall des β -Faltblattgehalts war für die Probe der Charge 756TrMg(3) mit 5,9 % geringfügig höher im Vergleich zu den Proben der Chargen 756TrMg(1) und 756TrMg(2) mit 4,5 % bzw. 3,8 % und könnte auf einer chargenspezifischen Variabilität basieren. Die Referenzproben Referenz-4 und Referenz-5 zeigten jedoch eine hohe Vergleichbarkeit der Spektren und Sekundärstrukturanteile zueinander.

4.6.3.4. Bestimmung der IgG-basierten Aktivität mittels ELISA

Einen Einfluss auf die IgG-Bindungsaktivität des Allergoids durch die Lyophilisierung konnte bereits in den Vorversuchen ausgeschlossen werden (Kapitel 4.4.1 und Kapitel 4.6.1). In Abbildung 68 sind die Ergebnisse der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5 dargestellt.

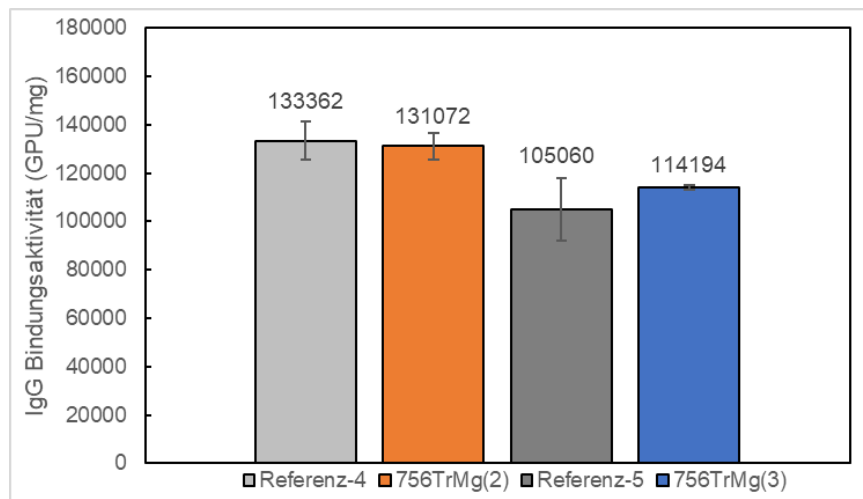


Abbildung 68 IgG-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Bei der Bestimmung der IgG-basierten Aktivität konnten für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) vergleichbare Ergebnisse zu der korrespondierenden Referenzprobe detektiert werden. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(2) wurde ein Abfall der IgG-Bindungsaktivität von 1,7 % im Vergleich zur Referenz-4 und für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(3) ein Anstieg von 8,7 % im Vergleich zur Referenz-5 festgestellt. Es kann von einem Erhalt bzw. minimale Veränderungen der IgG-Bindungs epitope auf dem extrahierten Allergoid beider Chargen ausgegangen werden. Generell war der Unterschied zu den Referenzproben für alle Formulierungen mit $Mg(OH)_2$ geringfügig, was auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Herstellung für diese Formulierung hindeutet. Die unterschiedlichen IgG-Bindungsaktivitäten zwischen den Referenzproben wurden auf eine chargenspezifische Variabilität zurückgeführt.

4.6.3.5. Bestimmung der IgE-basierten Aktivität mittels ELISA

In Abbildung 69 sind die Ergebnisse der Bestimmung der IgE-Bindungsaktivität für das extrahierte Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5 dargestellt.

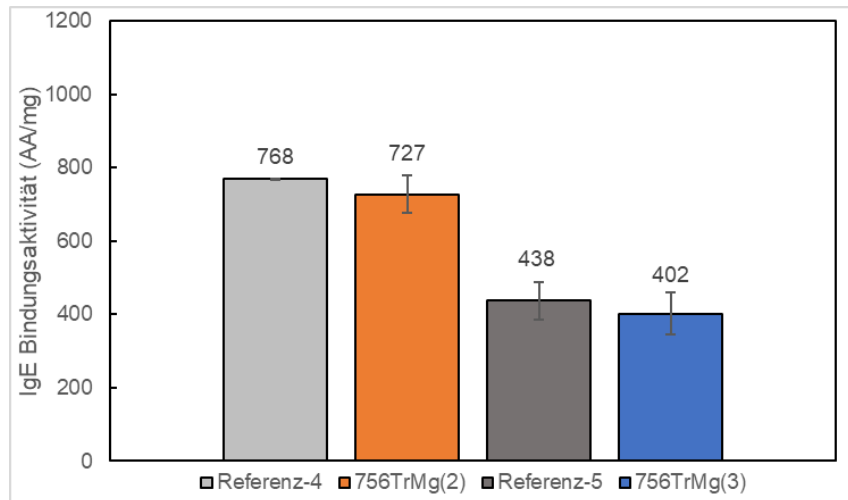


Abbildung 69 IgE-basierte Aktivität des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) sowie der Referenz-4 und Referenz-5. Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 3.

Bei den Proben der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) wurde ein geringfügiger Abfall der IgE-Bindungsaktivität von 5,4 % bzw. 8,2 % im Vergleich zur entsprechenden Referenzprobe berechnet. In beiden Fällen kann von einem hohen Erhalt IgE-bindender Strukturen ausgegangen werden. Die Abweichung von der Referenzprobe war für beide Chargen geringer im Vergleich zu den Proben der Charge 756TrMg(1), bei denen ein Anstieg der IgE-Bindungsaktivität von 19,9 % festgestellt wurde (Kapitel 4.4.3.5, Abbildung 45). Unter Berücksichtigung der Variabilität des ELISA und der generell stark reduzierten IgE-Bindungsaktivitäten von Allergoiden im Vergleich zu nativen Allergenextrakten kann jedoch für alle drei Proben von der Aufrechterhaltung der niedrigen IgE-Bindungen ausgegangen werden. Beim Vergleich der IgE-Bindungsaktivität der Referenz-4 (768 AA/mg) dieses Kapitels mit den Ergebnissen der Referenz-4 (308 AA/mg) aus Kapitel 4.4.3.6 wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Diese basieren wahrscheinlich auf einem Wechsel des Sekundärantikörpers des ELISA's vor der Messung der hier dargestellten Proben.

4.6.3.6. Fazit Allergoid-Charakterisierung

Mit der Allergoid-Analytik der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) wurden mit allen Methoden hohe Vergleichbarkeiten zwischen dem extrahierten Allergoid und den korrespondierenden Referenzproben festgestellt. Anhand der SEC-Analytik konnte eine geringfügig höhere Veränderung der Allergoid-Struktur nach SME für die Charge 756TrMg(3) (Allergoid-Charge: W21066835) im Vergleich zur Charge 756TrMg(2) (Allergoid-Charge: W8003675) festgestellt werden. Die Ergebnisse der anderen Methoden wiesen

jedoch auf eine gleiche Stabilität des Allergoids unter den Prozessbedingungen hin, sodass die Hypothese einer chargenspezifischen Variabilität abschließend nicht vollständig geklärt werden konnte. Da Allergoide aus chemisch modifizierten Proteinen bestehen, die aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden, können in einzelnen Chargen verschiedene Proteingruppen stärker vertreten sein [206]. Dadurch kann es zu einer leichten Variation zwischen den Chargen kommen.

Die hohe Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse der Allergoid-Charakterisierung der drei Chargen 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3) zeigt die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses hinsichtlich der Allergoid-Stabilität.

4.6.4. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

In Kapitel 4.4.4 wurde für die Charge 756TrMg(1) die bislang höchste Gesamtfreisetzung nach 40 Wochen mit 80,1 % (Freisetzungsmethode 1) gemessen. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Gesamtfreisetzung sowie den Freisetzungsverlauf der Charge 756TrMg(1) für die Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) zu reproduzieren.

In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der wöchentlichen kumulativen Freisetzung (oben) und des pH-Werts (unten) für die Implantate der Chargen 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3) dargestellt.

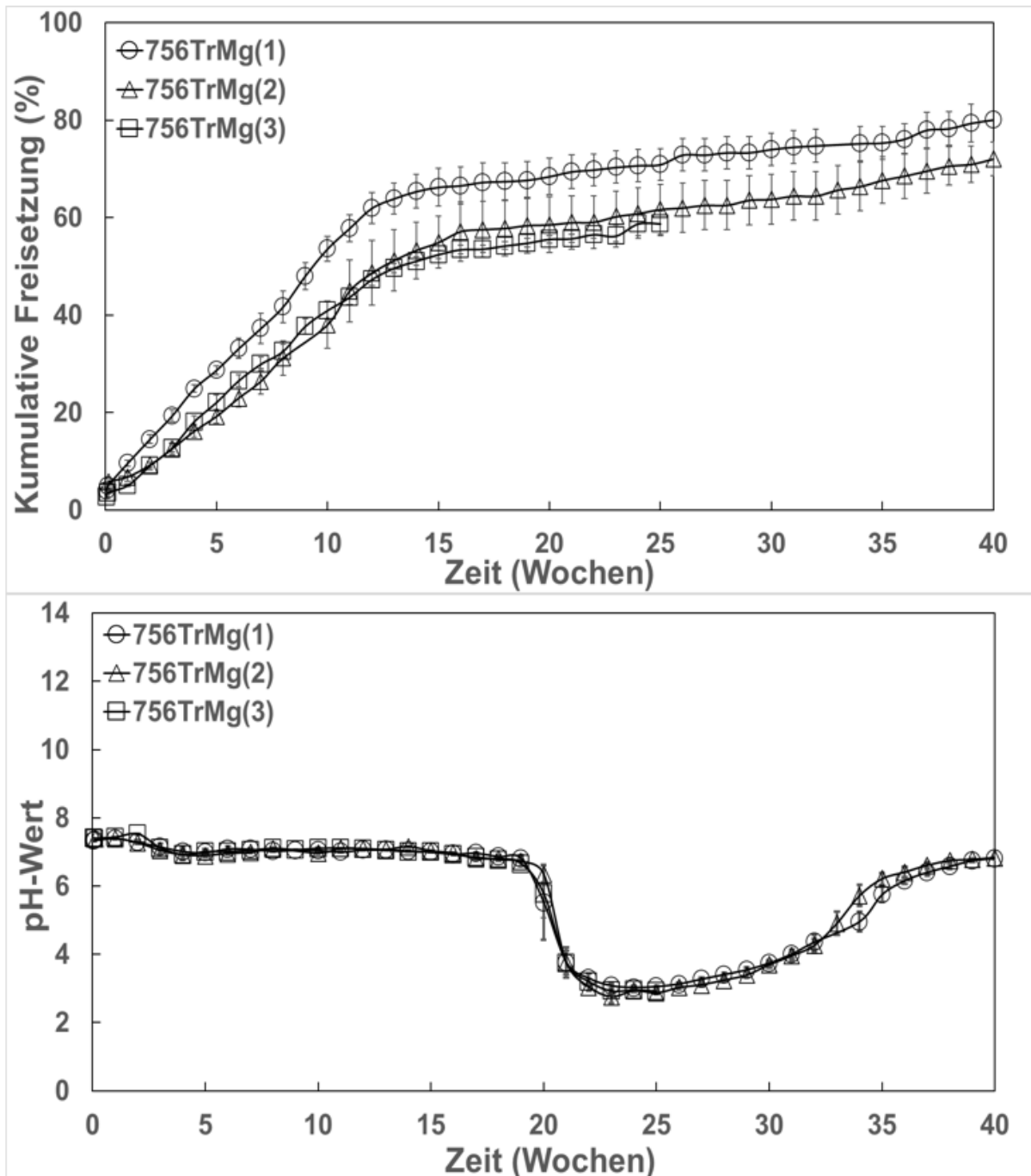


Abbildung 70 Bestimmung der kumulativen Allergoid-Freisetzung aus Implantaten und pH-Wert im Freisetzungsmedium für Proben der Chargen 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

In diesem Teil der Arbeit konnte für die Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) eine Langzeitfreisetzung des Allergoids aus den Implantaten über einen Zeitraum von 40 Wochen

(756TrMg(2)) bzw. 25 Wochen (756TrMg(3)) nachgewiesen werden. Dies wurde bereits für die Charge 756TrMg(1) in Kapitel 4.4.4 festgestellt.

Die initial freigesetzte Menge an Allergoid war für die Charge 756TrMg(1) mit 9,6 % ($\pm 0,6$ %) höher im Vergleich zu den Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mit 6,7 % ($\pm 0,9$ %) bzw. 5,1 % ($\pm 0,3$ %) und könnte mit der geringeren inneren Porosität dieser Chargen zusammenhängen. In den Wochen 2–15 wurde aus den Implantaten der Chargen 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mit einer wöchentlichen Freisetzungsrate von 4,0 % ($\pm 1,5$ %), 3,4 ($\pm 1,7$ %) und 3,4 ($\pm 1,2$ %) insgesamt 56,6 %, 50,4 % und 47,4 % der Allergoid-Beladung kumulativ freigesetzt. Nach Woche 15 wurde bis zum Ende der In-vitro-Studie eine reduzierte wöchentliche Freisetzungsrate mit 0,6 % ($\pm 0,5$ %), 0,7 ($\pm 0,5$ %) und 0,8 ($\pm 0,7$ %) für diese Chargen detektiert. Nach 25 Wochen wurde eine kumulative Freisetzung für die Chargen 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3) von 70,9 % ($\pm 3,3$ %), 61,7 % ($\pm 5,1$ %) und 58,8 % ($\pm 2,5$ %) kalkuliert. Der prozentuale Unterschied der Gesamtfreisetzung nach 40 Wochen zwischen den Chargen 756TrMg(1) und 756TrMg(2) betrug 8,0 %. Für alle drei Chargen wurden vergleichbare Freisetzungsverläufe jedoch mit leicht unterschiedlichen Gesamtfreisetzungen gemessen. Die hohe Gesamtfreisetzung der Charge 756TrMg(1) konnte jedoch trotz ähnlicher Freisetzungsverläufe nicht vollständig reproduziert werden. Möglicherweise basierte dies auf der leicht höheren inneren Porosität der Implantate der Charge 756TrMg(1) (Abbildung 64 Kapitel 4.6.2). Der Verlauf des pH-Werts über den Zeitraum der In-vitro-Studie und der Zeitpunkt der maximalen Polymererosion (Woche 23) war für alle drei Chargen identisch.

Für die Implantate der Charge 756TrMg(2) wurde eine erhöhte Standardabweichung für die Ergebnisse der Allergoid-Freisetzung berechnet (Abbildung 70). Ähnlich wie bei den Ergebnissen der Allergoid-Rückgewinnung nach Extrusion (Kapitel 4.6.2) wurde auch in der Freisetzungstudie ein Unterschied zwischen den Implantaten aus dem ersten und zweiten Extrudatabschnitt festgestellt. Unter Einkalkulierung der Abweichung im Allergoid-Gehalt für die Implantate aus dem ersten bzw. zweiten Extrudatabschnitt wurde eine Gesamtfreisetzung für die Implantate aus dem ersten Abschnitt von 68,9 % ($\pm 0,3$ %, $n = 3$) und für die Implantate aus dem zweiten Abschnitt von 75,2 % ($\pm 2,3$ %, $n = 3$) festgestellt. Dies kann auf der Bildung eines höheren bzw. verminderten Porensystems für Implantate mit einer höheren bzw. verminderten Allergoid- oder Hilfsstoffbeladung zurückgeführt werden. Die nach 40 Wochen festgestellte prozentuale Implantat-Restmenge von 2,5 % ($\pm 0,3$ %) war für diese Charge höher als bei der Charge 756TrMg(1) mit 1,2 % ($\pm 0,4$ %). Dies basiert womöglich auf der geringeren kumulativen Gesamtfreisetzung des Allergoids nach 40 Wochen und der damit zusammenhängenden höheren Bildung von schwerlöslichen Resten aus Allergoid und PLGA-Abbauprodukten.

Um die Stabilität des freigesetzten Allergoids in der untersuchten Formulierung auch für die Allergoid-Charge W21066835 beurteilen zu können, wurde von den Freisetzungspunkten der Charge 756TrMg(3) die IgG-Bindungsaktivität gemessen und anschließend die relative Bindungsaktivität zu Ausgangaktivität (extrahiertes Allergoid) dieser Charge berechnet (Tabelle 51).

Tabelle 51 Postexperimentelle prozentuale IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid aus Implantaten der Charge 756TrMg(3) in Relation zur Ausgangsaktivität. Angabe von MW \pm SD, n = 6.

Relative IgG-Bindungsaktivität					
Woche	2	3	4	7	10
Relative IgG-Bindungsaktivität (%)	32,4 (\pm 3,3)	35,8 (\pm 4,8)	21,3 (\pm 1,9)	15,6 (\pm 1,8)	13,9 (\pm 1,7)

Für die Proben der Charge 756TrMg(3) wurde ein Abfall der IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Studie beobachtet. Der Abfall war dabei vergleichbar zu der Charge 756TrMg(1) (Tabelle 37, Kapitel 4.4.4) und lässt sich auf eine Destabilisierung des Allergoids durch das gebildete Mikro-pH-Klima und die In-vitro-Bedingungen zurückführen.

Die hohe Gesamtfreisetzung der Charge 756TrMg(1) (Kapitel 4.4.4) konnte für die in diesem Kapitel hergestellten Chargen nicht vollständig reproduziert werden. Für die Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) könnte die geringe innere Porosität die Allergoid-Freisetzung verringert haben. Zusätzlich wurde für die Charge 756TrMg(2) eine inhomogene Allergoid-Beladung der Extrudats festgestellt. Dies wurde auch während der In-vitro-Studie für diese Charge beobachtet und könnte einen entscheidenden Einfluss auf die kumulative Gesamtfreisetzung nach 40 Wochen gehabt haben. Für die Charge 756TrMg(3) wurde die geringste kumulative Gesamtfreisetzung nach 25 Wochen für diese Formulierung gemessen. Diese war ebenfalls niedriger im Vergleich zu den Chargen 756TrNa und 756Tr+ (Kapitel 4.3.4), jedoch vergleichbar zu der Freisetzung der Charge 756TrPh (Kapitel 4.5.4), die auf derselben Allergoid Charge (W21066835) basierte. Möglicherweise hat die verwendete Allergoid-Charge einen Einfluss auf die Gesamtfreisetzung. Eine Erklärung wäre eine chargenspezifische Variabilität der Allergoid-Stabilität während der In-vitro-Freisetzung, die zu einer stärkeren Aggregation und der Bildung schwerlöslicher PLGA-Allergoid-Verbindungen geführt haben könnte.

4.6.5. Kapitelzusammenfassung

In diesem Entwicklungsabschnitt konnte die Herstellung von PLGA-basierten Allergoid-Implantaten mit einer Gesamtbeladung von 17,5 %, bestehend aus Birken-Allergoid, Trehalose und Mg(OH)₂, für das Polymer RG 756 S erfolgreich gezeigt und verifiziert

werden. Die Extrusion war im Falle der hergestellten Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) erfolgreich und erzeugte morphologisch homogene Implantate. Für die Charge 756TrMg(2) wurde jedoch eine inhomogene Allergoid-Beladung über das hergestellte Extrudat identifiziert. Dies konnte auf visuell sichtbare Rückstände in den ersten Zonen des Extruders zurückgeführt werden. Eine Charakterisierung dieser Rückstände wurde nicht durchgeführt und hätte möglicherweise einen Rückschluss auf die Identität und die Menge dieses Rückstands geliefert.

Mit der Allergoid-Analytik wurde für das extrahierte Allergoid der Chargen 756TrMg(2) und 756TrMg(3) eine hohe Vergleichbarkeit zu den Referenzproben festgestellt, sodass nur von einem geringfügigen Einfluss auf die Allergoid-Stabilität durch die Bedingungen der Extrusion ausgegangen werden kann. Für das extrahierte Allergoid der Charge 756TrMg(3) wurde mit der SEC-Analytik jedoch eine stärkere Abweichung von der Referenzprobe im Vergleich zu den Chargen 756TrMg(1) und 756TrMg(2) festgestellt. Der Erhalt der allgemeinen Allergoid-Charakteristika mit der Abwesenheit von Allergoid-Aggregation konnte jedoch für alle Chargen gezeigt werden.

Für die Proben der Charge 756TrMg(2) und 756TrMg(3) wurde eine vergleichbare, jedoch verringerte Allergoid-Freisetzung über den Verlauf der Freisetzungsstudie im Vergleich zu den Proben der Charge 756TrMg(1) detektiert. Dieser Unterschied könnte bei den Proben der Charge 756TrMg(2) mit einer inhomogenen Allergoid-Beladung und bei der Charge 756TrMg(3) mit einer chargenspezifischen Variabilität zusammenhängen. In beiden Fällen könnte jedoch auch die innere Porosität dieser Chargen einen Einfluss auf die Allergoid-Freisetzung gehabt haben. Für die Proben der Charge 756TrMg(3) wurde ein Abfall der IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Studie beobachtet. Dieser war zu den Bindungsaktivitäten der Freisetzungsproben der Charge 756TrMg(1) vergleichbar. Im Allgemeinen waren die Ergebnisse aus Implantat- und Allergoid-Analytik sowie der In-vitro-Studie für die drei Formulierungen vergleichbar, was für eine hohe Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses spricht.

4.7. Abschließende Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer innovativen, polymerbasierten Depotformulierung für die kontrollierte Langzeitfreisetzung von Birken-Allergoid für die Therapie der Birkenpollenallergie. Der Fokus lag dabei auf der Entwicklung einer stabilisierenden Implantat-Formulierung und der Festlegung geeigneter Prozessparameter für die SME von Allergoid-beladenen PLGA-basierten Implantaten. Es wurden verschiedene Formulierungen mit variierenden Gesamtbeladungen und Hilfsstoffzusammensetzungen hergestellt und hinsichtlich der resultierenden Implantat-Charakteristika, Allergoid-Stabilität und -Freisetzung untersucht. Das folgende Kapitel fasst die Meilensteine dieser Entwicklung

zusammen und stellt sie in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext, um ein umfassendes Fazit dieser Arbeit zu ermöglichen.

4.7.1. Herstellung PLGA-basierter mittels Schmelzextrusion

In dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Herstellung von Implantaten auf Basis der PLGA-Polymere RG 756 S und RG 504 H durch SME mit einem 11-mm-Doppelschneckenextruder gezeigt. Mit Hilfe der thermischen Charakterisierung der Polymere RG 504 H und RG 756 S wurden polymerspezifische Temperaturprofile für die Extrusion entwickelt. Dabei wurde die thermische Belastung für das Allergoid so gering wie möglich gehalten, jedoch bei ausreichend hohen Temperaturen extrudiert, um zum einen den Druck in der Extruderdüse im zulässigen Bereich halten zu können und zum anderen eine homogene Dispergierung von Polymer, Wirkstoff und Hilfsstoffen zu gewährleisten. Die Extrusion als Herstellungsverfahren für PLGA-basierte Implantate konnte für alle untersuchten Formulierungen mit einer minimalen Chargengröße von 5 g erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund des Leervolumens der Extruderdüse wurde bei den zwölf Verum-Chargen ein hoher Materialverlust von mindestens 3 g festgestellt und eine durchschnittliche Ausbeute von 29,1 % pro Charge ermittelt. Eine Prozessoptimierung mit dem Ziel höhere Ausbeuten zu generieren, wäre durch die Verwendung größerer Ansatzmengen, aufgrund des konstanten Leervolumens der Extruderdüse zu erreichen. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit und des zur Verfügung stehenden Materials nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung anderer Extruderdüsen mit geringerem inneren Leervolumen. Zusätzlich könnten kleinere Extrudergrößen von bis zu 5 mm verwendet werden, die sich für die Verarbeitung von Chargen ≤ 5 g eignen [207]. Cossé *et al.* zeigten in ihrer Studie die erfolgreiche Herstellung von BSA-beladenen PLGA-Implantaten mittels 5-mm-Doppelschneckenextruder mit einer Chargengröße von 3 g [180]. Diese Extrudergröße wird insbesondere für die Erprobung verschiedener Formulierungen durch eine Maßstabsverkleinerung des Herstellungsprozesses mit minimalem Materialverlust eingesetzt. Eine spätere Skalierung für größere Entwicklungschargen wäre jedoch mit einem 11-mm-Extruder einfacher umzusetzen, da im pharmazeutischen Maßstab häufig Extruder mit deutlich größeren Schneckendurchmessern von 50–60 mm verwendet werden [28]. Eine weitere Möglichkeit für das *Screening* verschiedener Formulierungen wäre der Einsatz des Vakuumpressverfahrens (engl.: *Vacuum Compression Molding*). Die Vergleichbarkeit dieser Methode mit der SME mittels 11-mm-Doppelschneckenextruder (Pharma 11; Thermo Fisher) konnte bereits von Shadambikar *et al.* gezeigt werden [208]. Auch wurde in dieser Studie die verlustfreie Herstellung verschiedener Formulierungen auf Basis verschiedener Polymere mit einer Chargengröße von 167 mg und 500 mg durchgeführt. Jedoch mussten dabei höhere Prozesstemperaturen von durchschnittlich 20 °C im Vergleich zur SME verwendet werden. Für die Herstellung von Kleinstansätzen kann eine manuelle Extrusion durch eine Spritze

nach Inkubation in einem externen Heizofen durchgeführt werden [181, 209, 210]. Beide Verfahren bilden den Extrusionsprozess jedoch nur bedingt ab, da kein mechanisches Vermischen während der Herstellung stattfindet.

Das manuelle Schneiden des Extrudats führte zu Implantaten mit einem reproduzierbaren Massen-/Längen-Verhältnis (5,2 mg/mm). Die geringfügige Variation durch manuelles Schneiden könnte durch die Verwendung eines automatisierten Schneideprozesses weiter verringert werden [192].

Die innere Morphologie der Implantate wurde maßgeblich durch die Gesamtbeladung und Zuführrate beeinflusst. Besonders bei den Chargen 756Tr+ und 765TrNa, welche mit der höchsten Zuführrate von 0,76–0,80 g/min extrudiert wurden, kam es zu einer vermehrten Porenbildung im Extrudat. Wang *et al.* zeigten einen Einfluss der Temperatur, Schneckengeschwindigkeit und Gesamtbeladung auf die Mantelflächenbeschaffenheit und innere Morphologie von PLGA-basierten Haloperidol-Implantaten, was sich auch auf die Freisetzungseigenschaften auswirkte [211]. Die Automatisierung des Zuführens würde bei einer Maßstabsvergrößerung des Herstellungsprozesses die Variabilität der Zuführrate verringern oder sogar gänzlich ausschließen [199].

Die Allergoid-Gehaltsbestimmung von Implantaten aus verschiedenen Abschnitten des Extrudats ergab bei allen Chargen, mit Ausnahme der Charge 756TrMg(2), eine vollständige und über alle Abschnitte vergleichbare Rückgewinnung des Allergoids. Unerwünschte Entmischung während der Extrusion bzw. des Zuführens des Extrusionsmaterials, die zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Beladung führen und unter anderem von Chamberlain *et al.* beschrieben wurde, wurden für die Chargen dieser Arbeit, mit Ausnahme der Charge 756TrMg(2), nicht beobachtet [212]. Chamberlain *et al.* testeten verschiedene Zuführmethoden und fanden heraus, dass die Extrusion von zuvor schmelzextrudierten Granulaten aus Wirkstoff und Polymer zu Extrudaten mit der homogensten Verteilung des Wirkstoffs führen. Diese präparative Methode eignet sich daher besonders für Polymere und Wirkstoffe mit niedriger Schüttdichte, wie solche, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Der Einsatz vorab hergestellter schmelzextrudierter Granulate aus Wirkstoff, Hilfsstoffen und Polymer könnte bei der Extrusion von PLGA-basierten Birken-Allergoid-Implantaten eine zusätzliche Option für den Produktionsprozess darstellen, insbesondere um die Homogenität der Allergoid- und Hilfsstoff-Verteilung bei größeren Extrusionsmaßstäben zu gewährleisten. Allerdings ist zu beachten, dass ein solcher zweifacher Extrusionsprozess mit einer thermischen Vorbelastung des Wirkstoffs einhergeht und somit die Allergoid-Stabilität negativ beeinflusst werden könnte.

4.7.2. Allergoid-Stabilität nach Schmelzextrusion

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Extraktion des Allergoids aus den Implantaten für dessen Quantifizierung und physikochemische bzw. immunologische Charakterisierung erfolgreich entwickelt. Die Eignung der Allergoid-Extraktion mittels Polymer-Präzipitation (Extraktionsmethode 1) für die Allergoid-Quantifizierung konnte empirisch durch die nahezu vollständige Wiederfindung des Allergoids aus den Implantaten nachgewiesen werden. Für die Allergoid-Extraktion mittels Allergoid-Präzipitation (Extraktionsmethode 2) wurde ein Einfluss auf die Allergoid-Stabilität aufgrund der hohen Vergleichbarkeit zwischen Allergoid, welches der Extraktionsmethode 2 unterzogen wurde und unbehandeltem Allergoid, ausgeschlossen. Dies war ein entscheidender Entwicklungsschritt dieser Arbeit, da dadurch die Durchführung einer Vielzahl analytischer Verfahren ermöglicht wurde.

Bei der Untersuchung der Allergoid-Stabilität nach Extrusion wurde für keine der hergestellten Chargen, mit Ausnahme der Charge 756TrCa, eine massive Veränderung des Wirkstoffes (Degradation, Aggregatbildung, Abnahme der Allergoid-spezifischen IgG- und IgE-Bindungsaktivität und Reversion der Allergoidisierung) festgestellt. Dies ist auf die vergleichsweise hohe thermische Stabilität des Allergoids zurückzuführen [161]. Dennoch wurden strukturelle Veränderungen des Allergoids festgestellt, insbesondere in den SEC-Chromatogrammen und den Bestimmungen der IgG- und IgE-Bindungsaktivitäten durch den Vergleich mit den korrespondierenden Referenzproben, die dem SME-Prozess nicht unterzogen wurden. Diese strukturellen Veränderungen konnten durch den Zusatz von Trehalose als proteinstabilisierendes Agens deutlich verringert werden. Dabei wurde eine mögliche konzentrationsabhängige Sättigung dieses Effekts bei einer Trehalose-Beladung von 7,5 % festgestellt. Die Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen durch Trehalose, auch während der Extrusion, wurde bereits beschrieben [182–185] und in dieser Arbeit erstmals für ein Birken-Allergoid gezeigt. Für das Allergoid der Charge 756TrCa wurde nach der Lyophilisierung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine Destabilisierung des Allergoids festgestellt, was zu einer Abnahme der thermischen Stabilität und Degradation des Wirkstoffes nach Extrusion führte. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Verwendung von stark basisch wirkenden Substanzen wie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ für PLGA-Formulierungen mit Birken-Allergoid, die eine präparative Lyophilisierung des Wirkstoffes und der Hilfsstoffe vor der Extrusion beinhalten, ungeeignet ist.

4.7.3. In-vitro-Allergoid-Freisetzung

In dieser Arbeit konnte eine Langzeitfreisetzung des Allergoids aus Implantaten in-vitro, abhängig von Versuchsaufbau und Implantat-Formulierung, von bis zu 40 Wochen nachgewiesen werden. Die unterschiedlich ablaufende Polymererosion der Polymere RG 504 H und RG 756 S basiert auf den Unterschieden in Molekulargewicht, Lactid/Glycolid-

Anteil und Endgruppen, was zu unterschiedlichen Freisetzungsverläufen des Allergoids führte.

Für die unterschiedlich formulierten Chargen basierend auf dem Polymer RG 504 H wurden stets vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Erosionsverhaltens, des Freisetzungsverlaufes und der kumulativ freigesetzten Menge an Allergoid beobachtet. Aus den Chargen 504, 504Tr und 504TrMg wurde nach 40 Wochen eine kumulative Freisetzung des Allergoids von 43,1 %, 39,5 % und 47,9 % festgestellt. Durch den Einsatz der Hilfsstoffe Trehalose und $Mg(OH)_2$ konnten keine höheren kumulativen Freisetzungen erreicht werden. Höchstwahrscheinlich beruht die unvollständige Freisetzung auf dem starken pH-Abfall in Woche 4. Durch die säurebedingte Degradation des Allergoids aggregierte dieses oder formte schwerlösliche Verbindungen mit PLGA-Erosionsprodukten [179].

Die IgG-Bindungsaktivität war bei allen freigesetzten Proben der Chargen des Polymers RG 504 H nach dem pH-Abfall nicht mehr oder nur noch geringfügig detektierbar, was die Destabilisierung des Allergoids durch das entstandene stark saure pH-Milieu belegt. Ein Zusammenhang zwischen einer unvollständigen Freisetzung und dem pH-Abfall im FreisetzungsmEDIUM, der den maximalen Polymerabbau von sauren Monomeren darstellt, wurde bereits von Duque *et al.* in ihrer Studie an PLGA-basierten OVA-Implantaten beschrieben [181]. Das in dieser Studie verwendete Polymer ähnelte dem Polymer RG 504 H hinsichtlich des Lactid- und Glycolid-Anteils (50:50) und zeigte ebenfalls einen starken pH-Abfall in der frühen Phase der Freisetzungsstudie (Woche 7–14), wodurch die OVA-Freisetzung vorzeitig gehemmt wurde. Sophocleous *et al.* zeigten in ihrer Studie eine rasche Wechselwirkung zwischen Peptiden und den Carbonsäure-Endgruppen des Polymers RG 504 H, wenn diese mobilisiert werden [213]. Dieses hohe Interaktionspotential zwischen Carbonsäure-Endgruppen und Allergoid könnte sich in den Freisetzungsuntersuchungen negativ auf die Stabilität des freigesetzten Allergoids ausgewirkt haben. Aus diesen Gründen wurde das Polymer RG 504 H im Vergleich zum Polymer RG 756 S als weniger geeignet für die Langzeitfreisetzung von Birken-Allergoid eingestuft, obwohl es während der SME aufgrund seiner niedrigeren Erweichungstemperatur besser verarbeitet wurde. Eine chargenspezifische Variabilität der Polymere konnte ausgeschlossen werden, da für die jeweiligen Formulierungen identische Polymer-Chargen verwendet wurden.

Für das Polymer RG 756 S wurden die Einflüsse verschiedener Parameter, wie Beladung, Hilfsstoffzusammensetzung und Freisetzungsmethode auf die In-vitro-Freisetzung des Allergoids gezeigt. In Abbildung 71 sind die Freisetzungskurven aller Chargen basierend auf dem Polymer RG 756 S dargestellt.

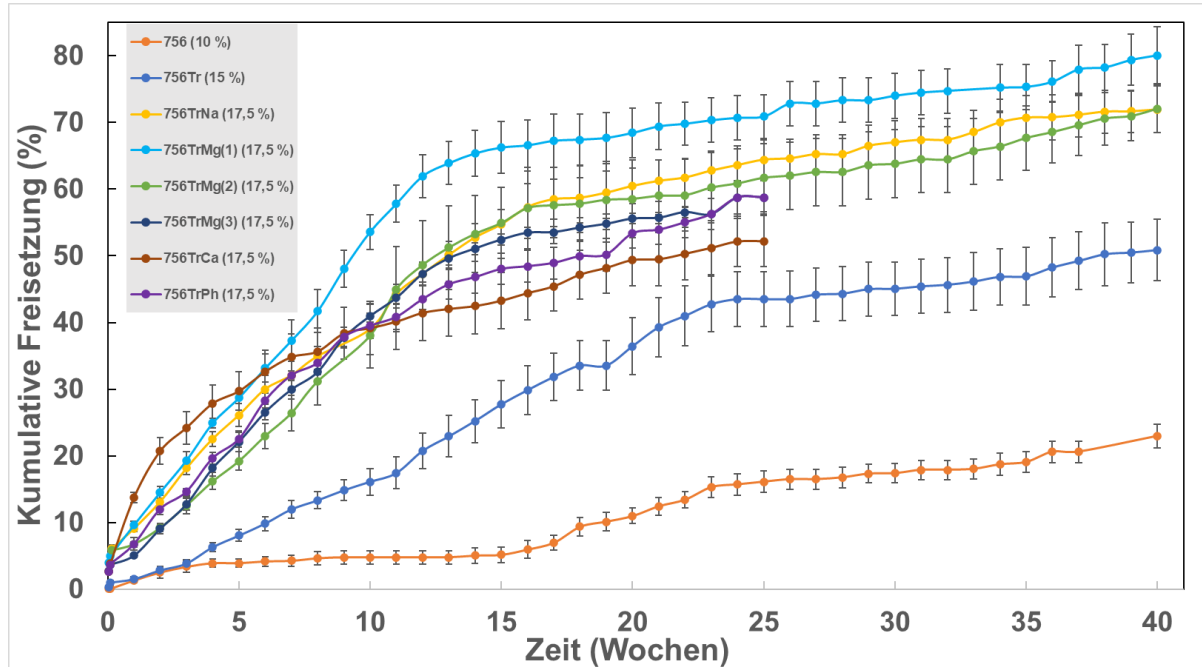


Abbildung 71 Kumulative Freisetzung aus Implantaten für Proben der Charge 756, 756Tr, 756Tr+, 756TrNa, 756TrCa, 756TrPh, 756TrMg(1), 756TrMg(2) und 756TrMg(3) mit Angabe der jeweiligen Gesamtbeladung (%). Angabe von MW \pm SD (Fehlerbalken), n = 6.

Bei allen Chargen, ausgenommen Charge 756, war eine erste Phase mit einer erhöhten Freisetzung und eine zweite Phase mit einer verringerten Freisetzung zu beobachten, wobei die Freisetzungsraten innerhalb einer Phase konstant waren. In einigen Studien mit PLGA-basierten Trägersystemen kann die Freisetzung von einem Großteil der Wirkstoff-Beladung (über 50 %) formulierungsabhängig in einem kurzen Zeitabschnitt (eine Woche) festgestellt werden [181, 214]. Dies wurde in dieser Arbeit für keine der Formulierungen des Polymers RG 756 S beobachtet. Dies ist ein wichtiger Parameter, um das erforderliche dosisabhängige Sicherheitsprofil für die AIT zu gewährleisten [215].

Bei der Charge 756Tr wurde eine deutlich höhere Freisetzungsraten durch die zusätzliche Beladung mit 5 % Trehalose (Gesamtbeladung von 15 %) im Vergleich zur Charge 756 (ohne Trehalose) nachgewiesen. Dies basierte auf der Ausbildung von Poren im Polymer in-vitro, die eine erleichterte Freisetzung ermöglichen. Die Wirkung von Trehalose als Porenbildner während der In-vitro-Freisetzung und die damit verbundenen höheren Freisetzungsraten in PLGA-basierten Trägersystemen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt [189, 190] und hier erstmals bei der Allergoid-Freisetzung für mit SME-hergestellten PLGA-basierten Implantaten beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen

einer höheren Gesamtbeladung und einer höheren kumulativen Freisetzung wurde grundsätzlich für alle Formulierungen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % gezeigt, da diese sich hinsichtlich der gesamt freigesetzten Menge an Allergoid von denen mit einer geringeren Gesamtbeladung unterschieden.

Neben einer erhöhten Freisetzungsrates zeigten alle Chargen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % auch eine Initialfreisetzung in der ersten Woche der In-vitro-Studie. Die Dauer der Freisetzung mit einer erhöhten konstanten Rate war bei diesen Chargen im Vergleich zur Charge 756Tr (15 % Gesamtbeladung) jedoch verkürzt, was auf eine mögliche Verringerung der diffusionsgesteuerten Allergoid-Freisetzung durch Porenbildung im Implantat zurückgeführt wurde. Der Effekt einer höheren Gesamtbeladung auf die Ausbildung eines Porensystems innerhalb der Polymermatrix sollte in Folgeexperimenten durch REM-Analysen von Implantaten von bestimmten Inkubationszeitpunkten genauer überprüft werden.

Die In-vitro-Freisetzungsdaten können als Basis für eine erste Bewertung der Eignung für eine zukünftige therapeutische Anwendung fungieren. Die grundsätzliche Möglichkeit, die hier getesteten Formulierungen für die AIT einzusetzen, werden anhand folgenden Beispiels diskutiert.

Nach dem Therapieschema der Fachinformation des sich auf dem Markt befindlichen AIT-Therapeutikums „Allergovit Birke“ (Allergopharma), das ebenfalls Birken-Allergoid als Wirkstoff enthält (adsorbiert an Aluminiumhydroxid), wird in der Erhaltungsphase der Therapie dem Patienten alle 4–8 Wochen eine maximale Dosis von 6000 therapeutischen Einheiten (TE) s.c. injiziert [216]. Dies entspricht einer hypothetischen Dosis von 750–1500 TE/Woche. Die Implantate der Charge 756Tr zeigten eine konstante wöchentliche Freisetzungsrates in-vitro zwischen den Wochen 2–23 von 1,9 %. Der daraus berechnete Gehalt an therapeutischen Einheiten betrug in diesem Zeitraum 1475 TE/Woche. Damit liegt die wöchentliche Freisetzung in diesem Zeitraum im Bereich der hypothetisch gegebenen Dosis an Allergoid des etablierten Marktproduktes „Allergovit Birke“. Bei der Charge 756TrMg(1) erfolgte die In-vitro-Freisetzung des Allergoids zwischen den Wochen 2–15 mit einer konstanten wöchentlichen Freisetzungsrates von 4 %, was einer wöchentlich freigesetzten Menge von 3238 TE/Woche und damit etwas mehr als dem Dreifachen der hypothetischen wöchentlichen Dosis entsprach. Ausgehend von 1125 TE/Woche läge die optimale Beladung des Implantats mit einer Masse von 27,2 mg (Mittelwert aller Chargen) bei 5,5 % Birken-Allergoid, wenn sich dieses über 40 Wochen mit einer konstanten Freisetzungsrates von 2,5 % pro Woche vollständig abbaut. Eine Erhöhung der Allergoid-Beladung wäre aus Sicht der hier dargestellten Berechnung der theoretisch abgegebenen Menge an therapeutischen Einheiten in-vivo nicht sinnvoll. In dieser Arbeit wurde jedoch bewusst eine höhere Allergoid-Beladung gewählt, da eine spätere Reduktion der

Wirkstoffbeladung als risikoärmer für den Erhalt der Implantat-Eigenschaften angesehen wurde als eine nachträgliche Erhöhung, zumal eine geringere Wirkstoffbeladung eine höhere Gesamtfreisetzung fördern kann, da dies eine Übersättigung der Wirkstofflösung im Inneren des Implantats verhindert, was bereits von Zlomke *et al.* gezeigt wurde [175]. Durch die Reduktion der Allergoid-Beladung kann die Beladung der Hilfsstoffe erhöht werden, ohne dabei einen kritischen Schwellenwert (engl: *percolation threshold*) zu erreichen, bei dem die Freisetzung nicht mehr maßgeblich durch die Polymererosion gesteuert wird [217]. Die in dieser Arbeit festgestellten hohen Freisetzungsraten für Formulierungen mit einer Gesamtbeladung von 17,5 % bieten Grund zur Annahme, dass der Schwellenwert naheliegt und dieser für das Polymer RG 756 S bei einer Erhöhung der Beladung höchstwahrscheinlich überschritten werden würde. Es gibt keine allgemeingültigen Angaben für den *percolation threshold* von PLGA, da dieser von den spezifischen Eigenschaften des Polymers (Lactid/Glycolid-Anteil, Endgruppenterminierung) und der Formulierungszusammensetzung abhängig ist. In zukünftigen Experimenten könnte dieser durch die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit analysiert werden [218].

Unter Verwendung der Freisetzungsmethode 2, bei der das Freisetzungsmittel komplett und nicht wie bei Freisetzungsmethode 1 nur partiell ausgetauscht wurde, konnte für die Charge 756TrMg(1) eine deutlich höhere Freisetzungsrate und eine vollständige Allergoid-Freisetzung nach 28 Wochen gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aller anderen Freisetzungsstudien waren die Implantat-Reste durch die Veränderung der Methodik am Ende der Freisetzungsstudie vollständig in Acetonitril löslich, was das Fehlen schwerlöslicher Verbindungen aus degradiertem Allergoid und PLGA-Erosionsprodukten belegt. Der konstante Abtransport von freigesetztem Wirkstoff bewirkt ein hohes Konzentrationsgefälle zwischen der inneren Polymermatrix und dem äußeren Medium. Dies führt zu einer höheren Diffusionsrate des Wirkstoffes aus der Polymermatrix. Eine Erhöhung der Freisetzung durch einen kompletten Austausch im Vergleich zu einem partiellen Austausch wurde von Bassand *et al.* in ihrer Studie an Ibuprofen-haltigen PLGA-Implantaten beschrieben [195].

Ein partieller Austausch scheint jedoch für In-vitro-Freisetzungs-Untersuchungen geeigneter zu sein als ein vollständiger Austausch. Bei letzterem kann das vollständige Abpipettieren zu einer Schädigung der Implantat-Struktur führen. Solche Schädigungen wurden in Vorversuchen im Rahmen dieser Arbeit unter der Verwendung von Freisetzungsmethode 2 beobachtet (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde daher bewusst primär die Freisetzungsmethode 1 mit partiellem Austausch des Mediums verwendet.

Die FIP/AAPS-Richtlinien für Freisetzungsuntersuchungen spezieller Darreichungsformen empfehlen die Verwendung von Durchflussapparaturen für In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen mit Implantaten, da diese einen kontinuierlichen Abtransport

des Wirkstoffes abbilden können und besonders zur Nachbildung von In-vivo-Bedingungen geeignet sind, da in-vivo der Wirkstoff für gewöhnlich schnell aus der unmittelbaren Umgebung der Applikationsstelle entfernt wird [196, 219]. Ein Nachteil der Durchflussapparatur ist das hohe Volumen des Freisetzungsmediums. Zusätzlich findet bei einem kontinuierlichen Wechsel des Freisetzungsmediums keine Aufkonzentration des Wirkstoffes statt, sodass die Wirkstoff-Konzentration für einige Analysen nicht mehr ausreichend hoch ist. Daher ist die experimentelle Freisetzungsmethodik, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, für das *Screening* von Freisetzungsverläufen gut geeignet.

Die Stabilität des Allergoids nach der Freisetzung wurde in dieser Arbeit unter anderem anhand seiner Aktivität zur Bindung von IgG-Antikörpern aus Seren von Kaninchen untersucht, welche zuvor mit Birken-Allergoid immunisiert wurden. Eine gleich hohe IgG-Bindungsaktivität des freigesetzten Allergoids und des als Referenz im Test mitgeführten unbehandelten Allergoids stellt einen Erhalt der IgG-Bindungsepitope für das freigesetzte Allergoid dar, was letztlich den Erhalt der dreidimensionalen Struktur dieser Bereiche der Allergoid-Oberfläche beweist.

Bei allen untersuchten Chargen wurde eine Abnahme der IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der Freisetzung gemessen, was auf eine Destabilisierung des Allergoids zurückgeführt werden kann. Die Hauptursache für eine Destabilisierung von Proteinen während der Freisetzung aus PLGA-Trägersystemen ist häufig ein pH-Abfall innerhalb der sich zersetzenden PLGA-Matrix (Mikro-pH), was zu Protein-Protein- oder auch Protein-PLGA-Wechselwirkungen führen kann [176, 177]. Neben diesem Einfluss führten jedoch auch die Freisetzungsbedingungen (Temperatur, Standzeit) zu einem Abfall der IgG-Bindungsaktivität von freigesetztem Allergoid, welche jedoch nicht das gesamte Ausmaß des gemessenen Abfalls der IgG-Bindungsaktivität ausmachten. Die wurde durch die zwanzigwöchige Inkubation einer reinen allergoidhaltigen Probelösung gezeigt.

Bei dem freigesetzten Allergoid aus Implantaten der Charge 756Tr wurde durch die zusätzliche Beladung mit 5 % Trehalose eine geringere Abnahme der IgG-Bindungsaktivität über den Verlauf der In-vitro-Studie im Vergleich zur Charge 756 ohne Trehalose beobachtet. Dies könnte einerseits auf die proteinstabilisierende Wirkung von Trehalose zurückzuführen sein, wodurch das Allergoid weniger anfällig für Degradation durch Mikro-pH und Freisetzungsbedingungen war [185]. Zum anderen könnte Trehalose aufgrund seiner hohen Hydrophilie als porogenes Agens während der In-vitro-Freisetzung gewirkt haben, was zu einer erhöhten Ausbildung von Poren führte [186, 189]. Eine erhöhte Porosität der Polymermatrix kann den Säuregehalt innerhalb der Matrix durch den verstärkten Ausfluss von sauren Erosionsprodukten reduzieren und damit die Wirkstoffstabilität erhöhen, was bereits von Cossé *et al.* beschrieben wurde [180]. Die Gewichtung dieser beiden Effekte wurde in dieser Arbeit nicht geklärt.

Die Zugabe eines pH-Stabilisators bewirkte keinen verzögerten Polymerabbau zu sauren Monomeren, was anhand der vergleichbaren pH-Wert-Verläufe der Verum-Chargen, mit Ausnahme von 756TrCa, gezeigt wurde. Im Falle der Charge 756TrCa wurde eine alkalisch induzierte beschleunigte Degradation der Polymermatrix beobachtet, was bereits von Machatschek *et al.* beschrieben wurde [204]. Die von Zhu *et al.* gezeigte Aufrechterhaltung des pH-Werts und der verzögerte Polymerabbau durch das Entgegenwirken der säureinduzierten Autokatalyse durch die Beladung PLGA-basierter BSA-Implantate mit 3 % Mg(OH)₂ wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet [198]. Das verwendete Herstellungsverfahren könnte dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit dieses Effekts gehabt haben. Die von Zhu *et al.* verwendete Lösungsmittlextrusion könnte im Vergleich zu der in dieser Arbeit angewendeten SME zu einer besseren Verteilung des puffernden Hilfsstoffes und damit zu einer Vermeidung von sauren Mikro-pH-Werten innerhalb der Polymermatrix geführt haben.

Bei der Weiterentwicklung der hier vorgestellten Implantat-Formulierungen sollten neben den in dieser Arbeit eingesetzten weitere puffernde Hilfsstoffe getestet werden oder deren Anteil in der Formulierung erhöht werden, um einen pH-Abfall innerhalb der Polymermatrix zu vermeiden.

5. Fazit und Ausblick

5.1. Fazit

In dieser Arbeit wurden erste Entwicklungsschritte einer polymerbasierten Depotformulierung (Implantat) für die kontrollierte Langzeitfreisetzung von Birken-Allergoid über 6–9 Monate für eine neue innovative Therapieform der Birkenpollenallergie beschrieben.

Die SME erwies sich dabei als geeignetes Verfahren zur Herstellung von Birken-Allergoid beladenen Implantaten, basierend auf den Polymeren RG 504 H und RG 756 S mit und ohne Hilfsstoffzusatz. Durch eine umfangreiche thermische Charakterisierung der Polymere konnten bestimmte Parameter wie die Glasübergangstemperatur (DSC), Verformbarkeits- und Schmelztemperaturen (Kofler-Heizbank, Thermisch-kontrollierte Mikroskopie) erfolgreich für die Einstellung von polymerspezifischen Temperaturprofilen der Extruderzonen und Extruderdüse des verwendeten Doppelschneckenextruders genutzt werden. Bei nahezu allen hergestellten Implantat-Chargen mit unterschiedlichen Formulierungszusammensetzungen konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie eine gleichmäßige Beschaffenheit der Mantelfläche bzw. Querschnitte einzelner Implantate sowie einem Allergoid-Anteil nahe dem Soll-Gehalt über das ganze Extrudat belegt werden. Für die Überprüfung der Allergoid-Beladung und der physikochemischen und immunologischen Eigenschaften des Allergoids nach Extrusion wurden in dieser Arbeit zwei spezifische Extraktionsmethoden entwickelt, um das Allergoid aus den PLGA-Implantaten zu extrahieren. Beide Methoden bildeten die Grundlage für den Nachweis der Allergoid-Beladung im Extrudat bzw. für die Beurteilung der Allergoid-Stabilität nach Extrusion. Letzterer Punkt war von besonderem Interesse, da der Erhalt der strukturellen Integrität des Allergoids bei den hohen Prozesstemperaturen von 70–95 °C nicht selbstverständlich war und mit Protein-Denaturierung und -Aggregation gerechnet werden musste.

Das Allergoid zeigte bereits ohne den Zusatz von Hilfsstoffen eine gute Stabilität gegenüber den Prozessbedingungen der Extrusion, was mit einem breiten Portfolio an analytischen Methoden zur Bestimmung der hydrodynamischen Größe und molekularen Masse (DLS, SEC), Infrarot-spektralen Eigenschaften (FTIR), isoelektrischem Punkt (Native IEF) und IgE- und IgG-Bindungsaktivität (ELISA) an extrahiertem Allergoid erfolgreich überprüft wurde. Diese Stabilität konnte durch den Einsatz von Trehalose als proteinstabilisierendes Agens jedoch noch deutlich erhöht werden.

Bei den In-vitro-Freisetzungsexperimenten wurde festgestellt, dass Implantate basierend auf dem Polymer RG 504 H bezüglich des Erosionsverhaltens und des Freisetzungsverlaufes denen des Polymers RG 756 S unterlegen waren, sodass die Entwicklung bestimmter Formulierungszusammensetzungen alleinig mit dem Polymer RG 756 S fortgeführt wurde.

Für das Polymer RG 756 S konnte der Einfluss verschiedener Hilfsstoffe und Hilfsstoffbeladungen auf das Erosionsverhalten des Polymers und das Freisetzungsverhalten des Allergoids festgestellt werden. Durch die Erhöhung der Hilfsstoffbeladung auf insgesamt 17,5 % konnten deutlich höhere Freisetzungsraten in-vitro, durch die Ausbildung eines Porensystems in der Polymermatrix erzielt werden. Schließlich wurde mit der Hilfsstoffkombination aus $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (pH-Stabilisator) und Trehalose (Proteinstabilisator) eine Formulierung hergestellt, die abhängig von der Freisetzungsmethode eine vollständige Allergoid-Freisetzung bzw. kumulative Freisetzung von insgesamt 80 % erreichte. Die Reproduzierbarkeit der Herstellung einer solchen Formulierung wurde anhand des Vergleiches dreier konsekutiv hergestellter Chargen mit gutem Erfolg überprüft. Die Analyse der Allergoid-Stabilität bewies bei allen drei Chargen den Erhalt der Allergoid-typischen Charakteristika nach der thermisch belastenden Extrusion. Zusätzlich zeigten die Chargen den Vorteil der Gesamtbeladung von 17,5 % bezüglich der kumulativen Freisetzung im Vergleich zu Formulierungen mit einer geringeren Hilfsstoffbeladung. Die Ergebnisse der Freisetzungsstudie erschienen jedoch noch verbesserungsfähig, da die Ausbildung eines sauren mikro-pH-Werts im Inneren der Polymermatrix während der Polymererosion und ein pH-Abfall im Freisetzungsmedium auf pH 2–3 um Woche 22 nicht vollständig verhindert wurde. Hierfür wurden weitere Formulierungen mit basischen ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) und puffernden ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) Hilfsstoffen getestet, jedoch keine Optimierung der Allergoid-Stabilität und kumulativen Freisetzung des Allergoids im Vergleich zu $\text{Mg}(\text{OH})_2$ festgestellt.

Zusammenfassend wurde mit der Formulierung auf Basis des Polymers RG 756 S mit einer Beladung von 10 % Allergoid, 5 % Trehalose und 2,5 % $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eine Formulierung gefunden, die sowohl bezüglich der Herstellbarkeit durch die SME, der Beschaffenheit der Implantate, der Allergoid-Stabilität nach der SME und der Allergoid-Freisetzung eine hervorragende Basis für eine Weiterentwicklung bietet.

Angesichts der weltweiten Zunahme von Allergien, den bisher etablierten Therapieoptionen und der damit zusammenhängenden Compliance-Problematik sowie der weitverbreiteten Verwendung von Aluminiumsalzen in SCIT-Therapeutika unterstreicht diese Arbeit das Potential der Entwicklung einer Depotformulierung für die Allergen-Immuntherapie.

5.2. Ausblick

Im Folgenden wird ein kurzer Ausblick über weitere mögliche Entwicklungsschritte auf Basis der vorliegenden Arbeit gegeben.

5.2.1. Extrusionsprozess

Die Größe des Extruders und das Leervolumen der Extruderdüse schränkte die Anzahl an möglichen Formulierungen aufgrund der Mindestchargengröße und den damit verbundenen hohen Materialverbrauch ein. Die Maßstabsverkleinerung des Prozesses mit angepasstem Equipment, könnte einen höheren Durchsatz an Chargen und die Untersuchung vielfältiger Formulierungszusammensetzungen ermöglichen.

Durch den Einsatz einer automatisierten Zuführeinheit könnte die Kontinuität der Zuführrate erhöht und somit die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses verbessert werden. Dies gilt für jede Art der Automatisierung bis hin zum automatisierten Schneiden des Extrudats anstelle eines manuellen Schneidens mittels Skalpells wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Durch die Herstellung und anschließende Verwendung von Schmelzgranulaten für die SME, bestehend aus Polymer und Allergoid-(Hilfsstoff)-Lyophilisat anstelle der direkten Verwendung einzelner Komponenten für die Extrusion, könnte eine bessere Dispergierung und Fließfähigkeit dieser und damit noch bessere Homogenität der Implantate erreicht werden. Allerdings sollte der Einfluss der zusätzlichen thermischen Belastung durch den hinzukommenden Prozessschritt zur Granulatherstellung auf das Allergoid überprüft werden.

5.2.2. Freisetzungsexperimente

Für eine realistischere Darstellung von In-vivo-Bedingungen sollten In-Vitro-Freisetzungsexperimente zusätzlich mit einem kontinuierlichen Wechsel des Freisetzungsmediums durchgeführt werden und nicht ausschließlich mit einem partiellen oder vollständigen Austausch des Mediums zu festgelegten Zeitpunkten.

Für die immunologische Charakterisierung des freigesetzten Allergoids sollten neben den in dieser Arbeit verwendeten IgG-basierten Antikörper-Bindungstests (ELISA) in den nächsten Entwicklungsschritten auch zellbasierte analytische Verfahren eingesetzt werden, um eine bessere Bewertung der In-vivo-Wirkung des freigesetzten Allergoids zu ermöglichen. Eine Möglichkeit besteht darin, das freigesetzte Allergoid mittels T-Zell-Proliferation zu untersuchen. Dabei würde immunologisch aktives freigesetztes Allergoid T-Zellen, die mit unbehandeltem Allergoid kultiviert wurden, zur Proliferation anregen [220]. Die Messung der CD203c-Expression basophiler Zellen nach Kahlert *et al.* wäre eine Möglichkeit, die hypoallergenischen Eigenschaften des freigesetzten Allergoids nachzuweisen [109]. Dies könnte ein wichtiger Faktor für eine erste Beurteilung der Sicherheit einer Therapie mit einem PLGA-

basierten Birken-Allergoid-Implantats sein. Vorversuche wurden diesbezüglich bereits mit extrahiertem Allergoid aus Implantaten einzelner Chargen durchgeführt und zeigten hohe Vergleichbarkeit mit den Referenzproben (Daten nicht gezeigt). Um schließlich die klinische Relevanz der entwickelten Depotformulierungen beurteilen zu können, sollten In-vivo-Studien mit Birkenpollen sensibilisierten Testobjekten durchgeführt werden, um neben der Wirksamkeit auch die Sicherheit weiter überprüfen zu können.

5.2.3. Formulierungsentwicklung

Die generierten Ergebnisse dieser Arbeit lieferten Hinweise darauf, dass die Vermeidung eines sauren Mikro-pH-Klimas im Inneren des Implantates ein essenzieller Faktor für die Stabilität des freigesetzten Allergoids sein könnte. Die zusätzliche Beladung mit 2,5 % des basisch wirkenden Hilfsstoffes $Mg(OH)_2$ zeigte diesbezüglich einen positiven Effekt. Eine Erhöhung der Beladung von $Mg(OH)_2$ könnte durch die Unterdrückung eines sauren Mikro-pH-Klimas nicht nur die Stabilität des freigesetzten Allergoids optimieren, sondern auch das Erosionsverhalten des Polymers hinsichtlich einer späteren maximalen Polymererosion, durch Verringerung der säureinduzierten autokatalytischen Polymerdegradation, verschieben, was die kumulative Freisetzung zusätzlich erhöhen könnte. Daher sollte in zukünftigen Formulierungsentwicklungen die Variation der $Mg(OH)_2$ -Beladung berücksichtigt werden.

Darüber hinaus könnte als alternative Herstellungsmethode die Lösungsmittelextrusion getestet werden, um eine noch bessere Verteilung von $Mg(OH)_2$ in der Polymermatrix und damit eine stärkere Wirkung dieses Hilfsstoffes während der In-vitro-Freisetzung zu erreichen. Des Weiteren könnten andere basische Hilfsstoffe (Magnesiumcarbonat, Zinkcarbonat) auf deren puffernde Wirkung untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Formulierungsoptimierung liegt auch in der Veränderung der Wirkstoffbeladung des Implantats. Eine Verringerung der Wirkstoffbeladung könnte dabei eine höhere Gesamtfreisetzung ermöglichen. Zusätzlich wäre der Einsatz höherer Hilfsstoff-Beladungen möglich ohne dabei einen kritischen Schwellenwert an Gesamtbladung (*percolation threshold*) zu überschreiten.

5.2.4. Übertragung auf weitere Allergoid-Wirkstoffe

Mit hoher Priorität sollte die Rohstoffquelle des Allergoid-Wirkstoffes (hier Birkenpollen) variiert werden, um zu überprüfen, ob PLGA-Implantate eine Plattform-Technologie für eine neuartige Therapie der Allergiebehandlung darstellen können. Anstelle des Birken-Allergoids könnte Milben-Allergoid, welches aus dem Extrakt der aufgereinigten Körper von Hausstaubmilben allergoidisiert wird, eingesetzt werden, um Implantate für die Therapie der Hausstaub-Allergie zu entwickeln. Alternativ wäre auch ein allergoidisierter Gräserpollen-Extrakt eine Möglichkeit die Theorie einer Plattform-Technologie weiter zu erforschen. Die

Implantate sollten zunächst mit der hier gefundenen Basis-Formulierung mit dem Polymer RG 756 S und einer Beladung von 10 % Allergoid, 5 % Trehalose und 2,5 % Mg(OH)₂ hergestellt und anschließend produktspezifisch weiterentwickelt werden.

6. Zusammenfassung

Bei der Allergen-Immuntherapie (AIT) wird eine Remission der Allergie durch regelmäßige Applikation von allergieauslösenden Substanzen (Allergene) in nativer oder chemischer modifizierter Form (Allergoid) erreicht. Obwohl es sich dabei um die einzige kausale Behandlungsoption handelt, sind die lange Therapiedauer von mindestens 3–5 Jahren und die Vielzahl der Applikationen wesentliche Gründe für die unzureichende Therapietreue der AIT.

Die Entwicklung eines subkutanen Implantats, das mit einem Allergoid-Wirkstoff beladen ist, stellt eine neue und innovative Applikationsform für die kontrollierte Freisetzung des Allergoids dar, was zu anhaltenden Wirkstoffspiegeln über mehrere Monate mit einer minimalen Anzahl an Applikationen führen kann.

In dieser Arbeit wurden erstmalig Implantate auf Basis des bioabbaubaren Polymers Poly-Lactid-co-Glycolid (PLGA) für die kontrollierte Langzeitfreisetzung von Birken-Allergoid entwickelt. Es wurden verschiedene Implantat-Formulierungen basierend auf den PLGA-Polymeren RG 504 H und RG 756 S durch Schmelzextrusion (SME) mittels Doppelschneckenextruder hergestellt. Nach Etablierung geeigneter Temperaturprofil für die SME, durch thermische Charakterisierung der Polymere, wurden Implantate mit einer Allergoid-Beladung von 10 % sowie weiterer Hilfsstoffe mit 5–7,5 % Beladung hergestellt. Die REM-Analyse der Implantate und die quantitative Bestimmung der Allergoid-Beladung im Extrudat bestätigten die erfolgreiche Umsetzung des Verfahrens. Für die Gehaltsbestimmung und die physikochemische bzw. immunologische Analyse des Allergoids aus den Implantaten wurden spezifische Extraktionsmethoden entwickelt und erfolgreich eingesetzt.

Die strukturelle Integrität des Allergoids in den verschiedenen Implantat-Formulierungen wurde durch die kombinierte Auswertung verschiedener physikochemischer Methoden wie FTIR, SEC, DLS und IEF untersucht, während der Erhalt der immunologischen Eigenschaften durch die Bestimmung der IgG- bzw. IgE-Bindungsaktivität (ELISA) überprüft wurde. Das Allergoid zeigte eine hohe Stabilität gegenüber den hohen Prozesstemperaturen von bis zu 95 °C, die durch den Zusatz eines proteinstabilisierenden Agens (Trehalose) weiter verbessert wurde.

In-vitro-Freisetzungsexperimente zeigten eine Langzeitfreisetzung des Allergoids aus PLGA-basierten Implantaten von bis zu 40 Wochen. Es wurden polymer- und formulierungsabhängige Einflüsse auf das Erosionsverhalten des Polymers und das Freisetzungsverhalten des Allergoids beobachtet, wobei eine Formulierung basierend auf dem Polymer RG 756 S mit einer Beladung von 10 % Birken-Allergoid, 5 % Trehalose und 2,5 % Mg(OH)₂ zu Implantaten mit der höchsten kumulativen Freisetzung führten. Da die In-

in vitro-Freisetzungsbedingungen die Stabilität des Allergoids beeinflussten, sollten sich zukünftige Entwicklungsaktivitäten auf die Optimierung der Formulierung konzentrieren, um eine stabilisierende Umgebung für das Allergoid zu schaffen.

Die vorgestellten Ergebnisse könnten als Grundlage für die Entwicklung einer Plattformtechnologie für die zukünftige Behandlung von IgE-vermittelten Allergien dienen.

7. Abstract (english version)

In allergen immunotherapy (AIT) allergy remission is achieved through regular application of allergy-triggering substances (allergens), either in their native or chemically modified form (allergoids). Despite being the only causal treatment option, the duration of AIT of at least 3–5 years with numerous administrations, is a major factor contributing to low adherence to AIT.

The development of a subcutaneous implant loaded with an allergoid represents a new and innovative route of administration for controlled release of the allergoid, resulting in sustained drug levels over several months with minimized applications.

The presented work reports the development of implants based on the biodegradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) for a controlled long-term release of birch allergoid. Various implant formulations based on the PLGA polymers RG 504 H and RG 756 S were manufactured by hot melt extrusion using a twin-screw extruder. After establishment of suitable temperature profiles for the melt extrusion, by thermal characterisation, implants with a drug load of 10 % birch allergoid and further excipients in a range of 5-7.5 % were produced. Characterisation of the implants by scanning electron microscopy and quantitative determination of the allergoid within the extrudate confirmed the successful implementation of the process. Specific extraction methods were developed and successfully applied for the quantification and physicochemical- as well as immunological analysis of the allergoid from the implants.

The structural integrity of the allergoid in the various implant formulations was investigated by combined evaluation of different physicochemical methods, including FTIR, SEC, DLS and IEF, while the preservation of the immunological properties was analysed by determination of IgG- or IgE-binding activity. The allergoid showed high stability towards the high process temperatures of up to 95°C which was further improved by the inclusion of a protein-stabilising agent (trehalose).

In-vitro release experiments demonstrated a long-term release of the allergoid from PLGA-based implants for up to 40 weeks. Polymer- and formulation-dependent influences on the erosion behaviour of the polymer and the release of the allergoid were observed, whereby a formulation based on the polymer RG 756 S with 10 % birch allergoid, 5 % trehalose and 2.5 % Mg(OH)₂ resulted in implants with the highest cumulative release. As the in-vitro release conditions influenced the Allergoid stability, future development activities should focus on optimizing the formulation to accommodate a stabilising environment.

The presented results could serve as a base to develop a platform technology for the future treatment of IgE-mediated allergies.

8. Anhang

8.1. Puffer

Coating-Puffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 3,18 g Na_2CO_3 und 5,86 g NaHCO_3 eingewogen und ad 2 L VE- H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde im Anschluss überprüft (pH 9–10).

20 x PBS (20-fach konzentrierte PBS-Stammlösung)

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 580 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 40 g KH_2PO_4 , 40 g KCl und 1600 g NaCl eingewogen und ad 10 L VE- H_2O gelöst.

1 x PBS

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 1 mL 20 x PBS-Stammlösung ad 20 mL VE- H_2O verdünnt.

Waschpuffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 500 mL 20 x PBS-Stammlösung und 5 g Tween20 eingewogen und ad 5 L VE- H_2O verdünnt.

Absättigungspuffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 50 mL 20 x PBS, 10 g BSA und 0,5 g Tween20 eingewogen und ad 1,0 L VE- H_2O gelöst.

Verdünnungspuffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 100 mL 20 x PBS, 2,0 g BSA und 1,0 g Tween20 eingewogen und ad 2,0 L VE- H_2O gelöst.

1 M Tris/HCl Puffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 60,56 g Tromethamin und 40 mL Salzsäure (32 %) eingewogen und ad 500 mL VE- H_2O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt.

SEC-Laufpuffer

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 40 mL 1 M Tris/HCl, 5 M NaCl und 5 mL Natriumazid (5%) ad 2 L VE- H_2O verdünnt und mit Salzsäure (HCl) (32%) auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,22 μm Filter filtriert.

10 x PBS (Freisetzungspuffer)

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,4 g KH_2PO_4 , 80,1 g NaCl , 2,0 g KCl und 20 mL Natriumazid (5%) ad 2 L VE- H_2O gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,22 μm Filter filtriert.

1 x PBS (Freisetzungspuffer)

In einer sauberen Gewindeflasche wurden 100 mL 10 x PBS-Freisetzungspuffer ad 1 L VE- H_2O verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit HCl (32%) auf pH 7,4 eingestellt und durch einen 0,22 μm Filter filtriert.

8.2. Unterstützende Ergebnisse

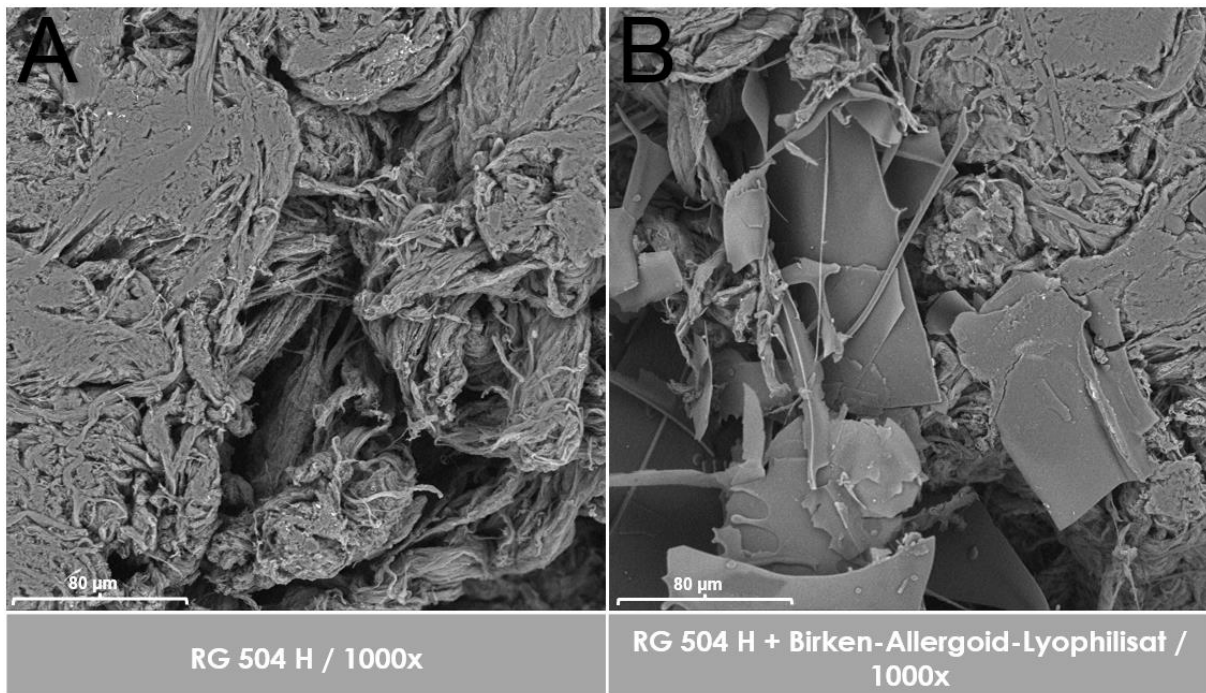


Abbildung 72 REM-Aufnahmen des Polymers RG 504 H (A) und der Polymer-Allergoid-Lyophilisat-Mischung vor der Extrusion (B).

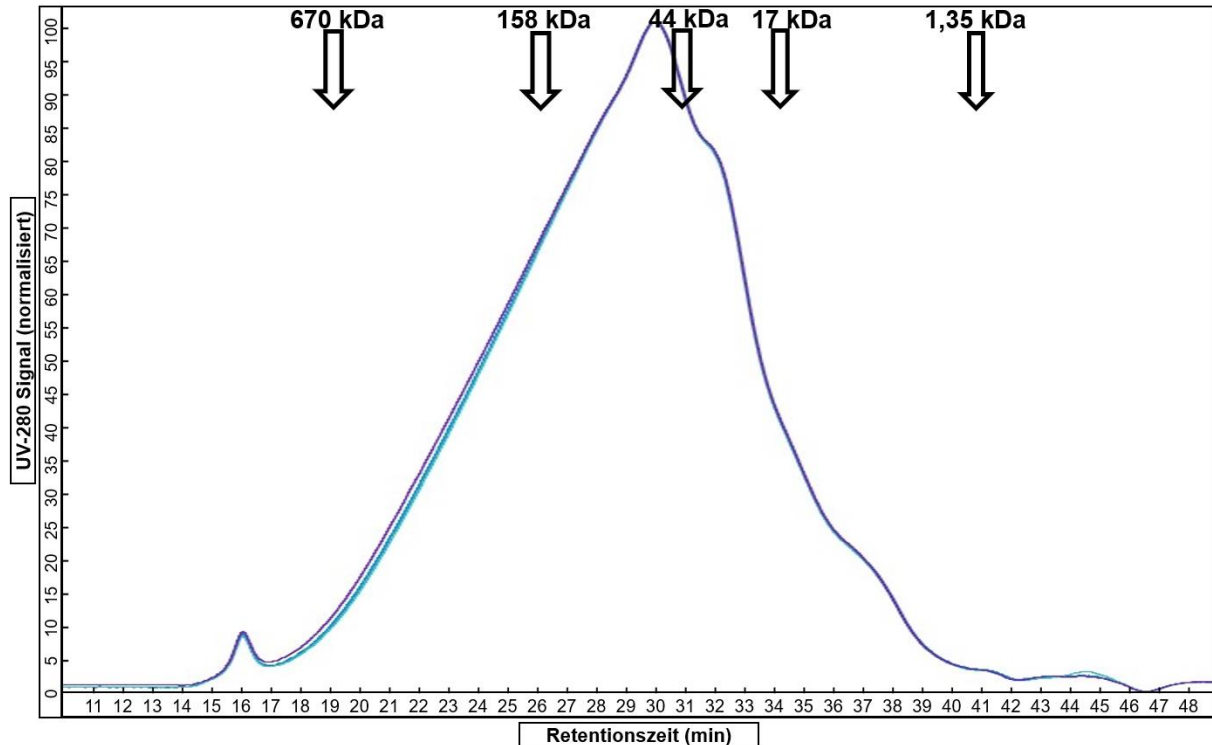


Abbildung 73 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 504 (n = 3) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

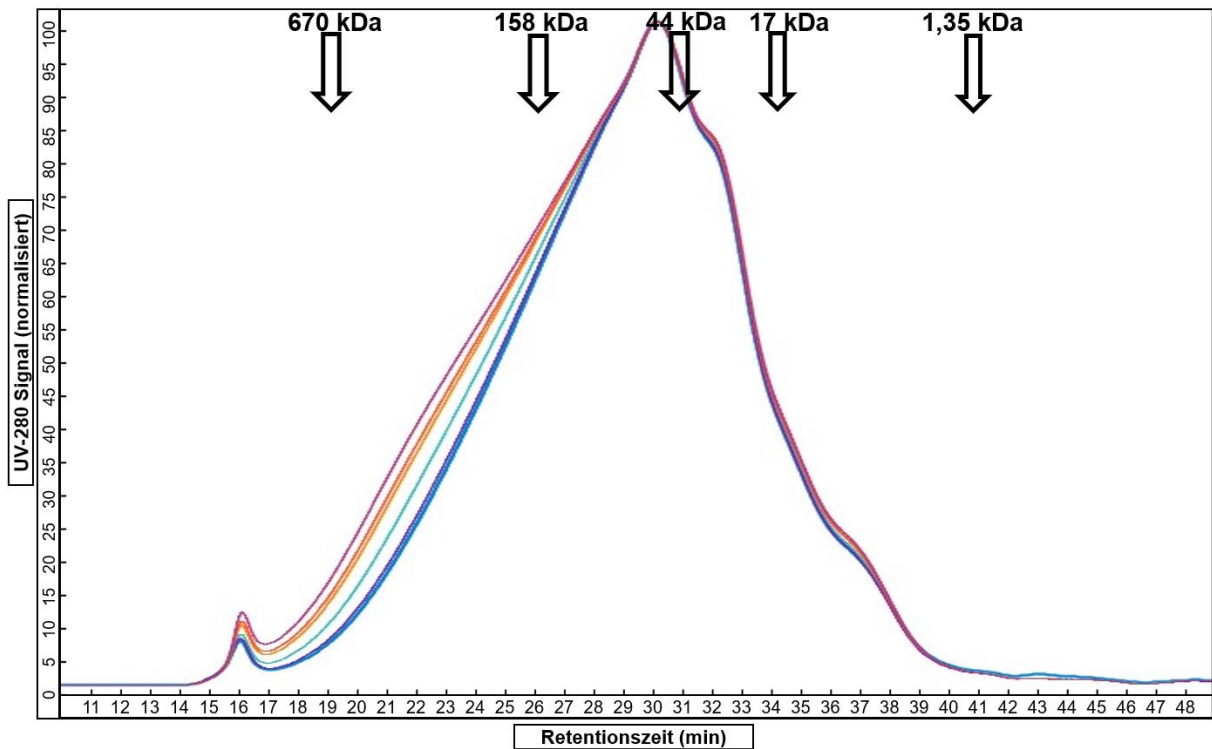


Abbildung 74 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756 (n = 6) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

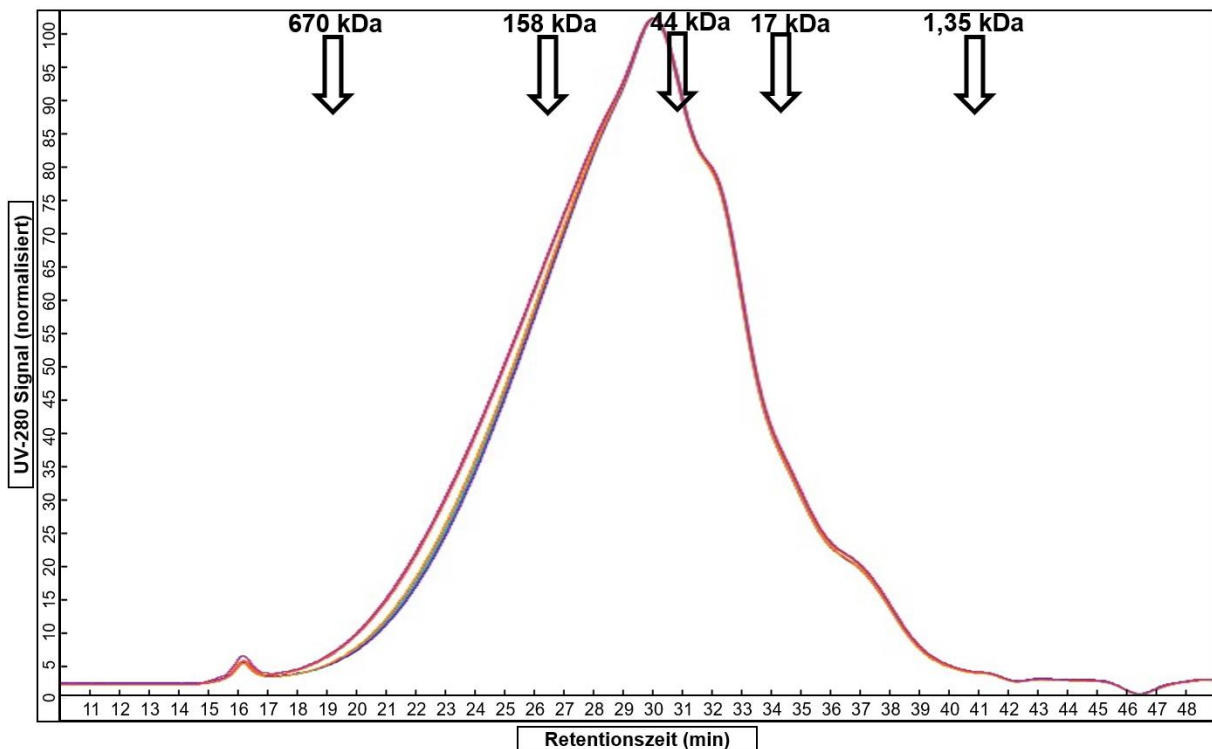


Abbildung 75 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 504Tr (n = 6) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

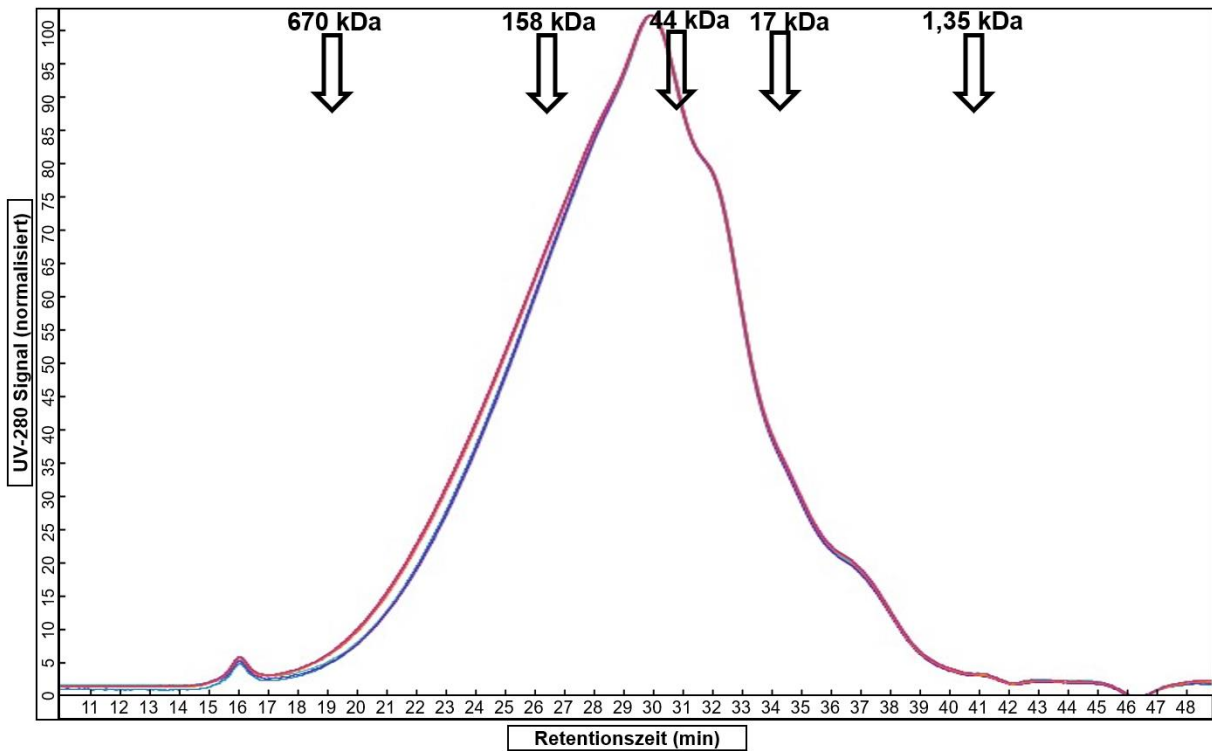


Abbildung 76 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756Tr (n = 6) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

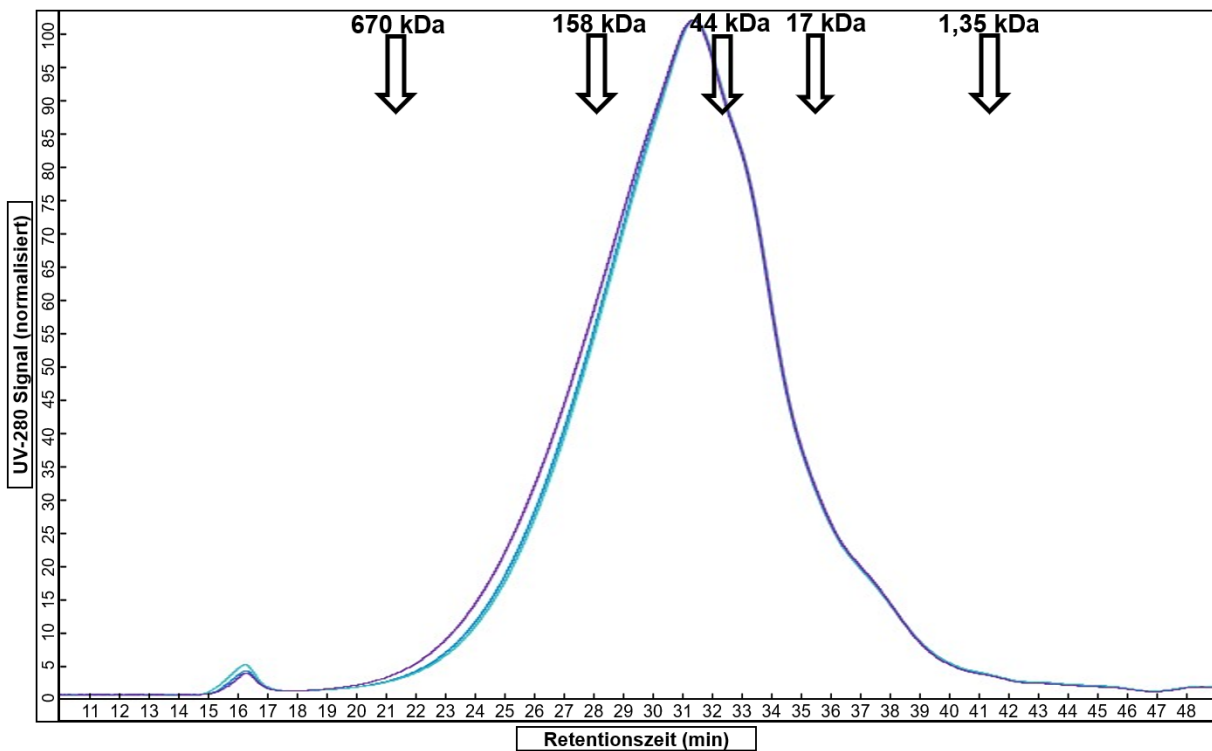


Abbildung 77 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756Tr+ (n = 3) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

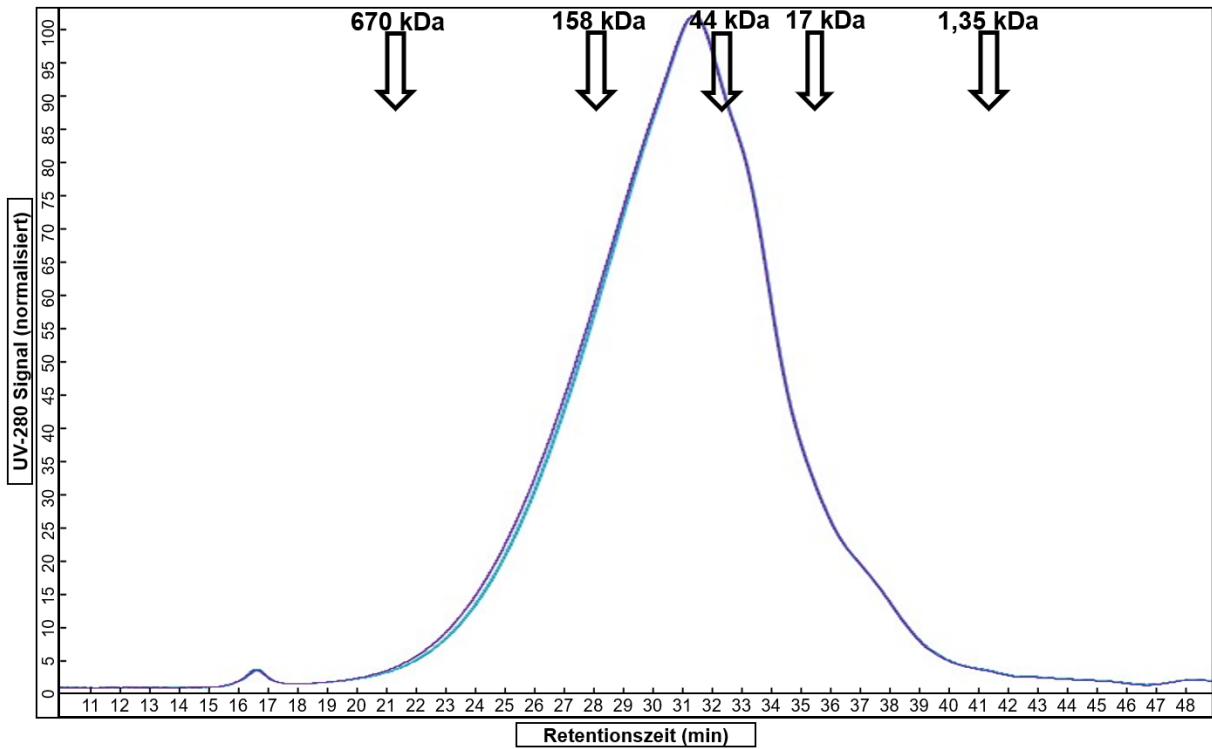


Abbildung 78 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrNa (n = 3) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

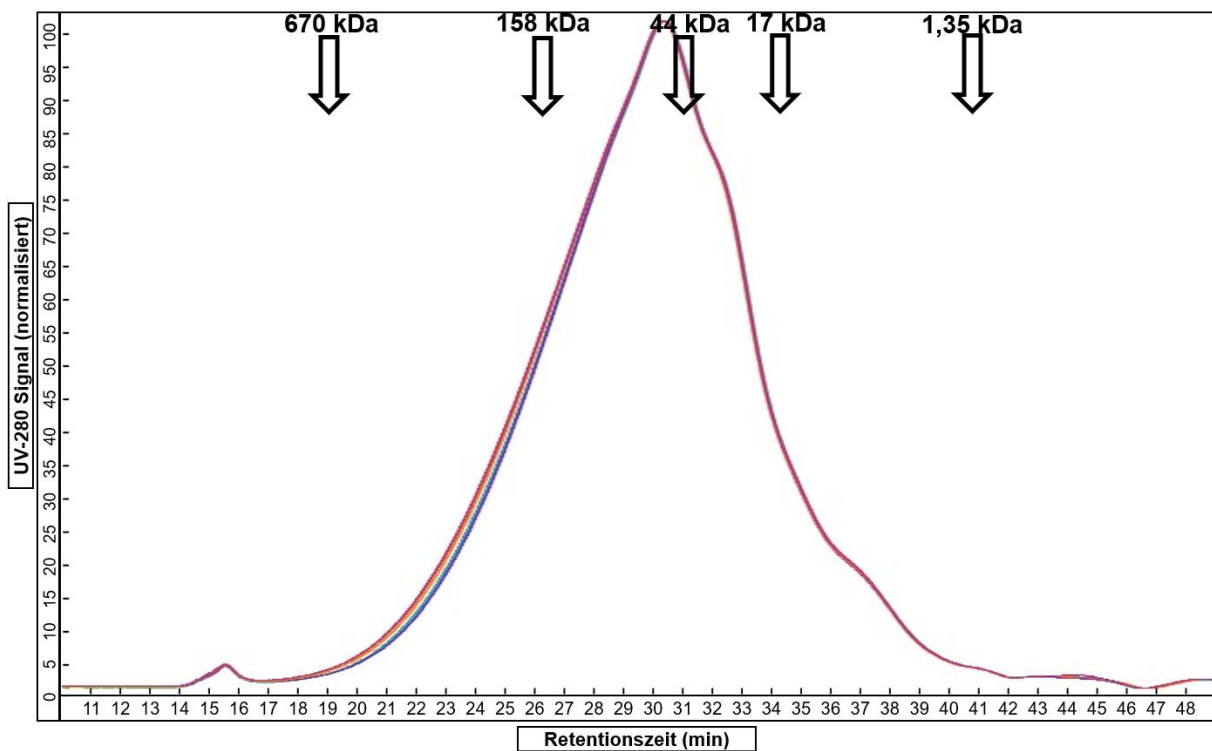


Abbildung 79 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 504TrMg (n = 6) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

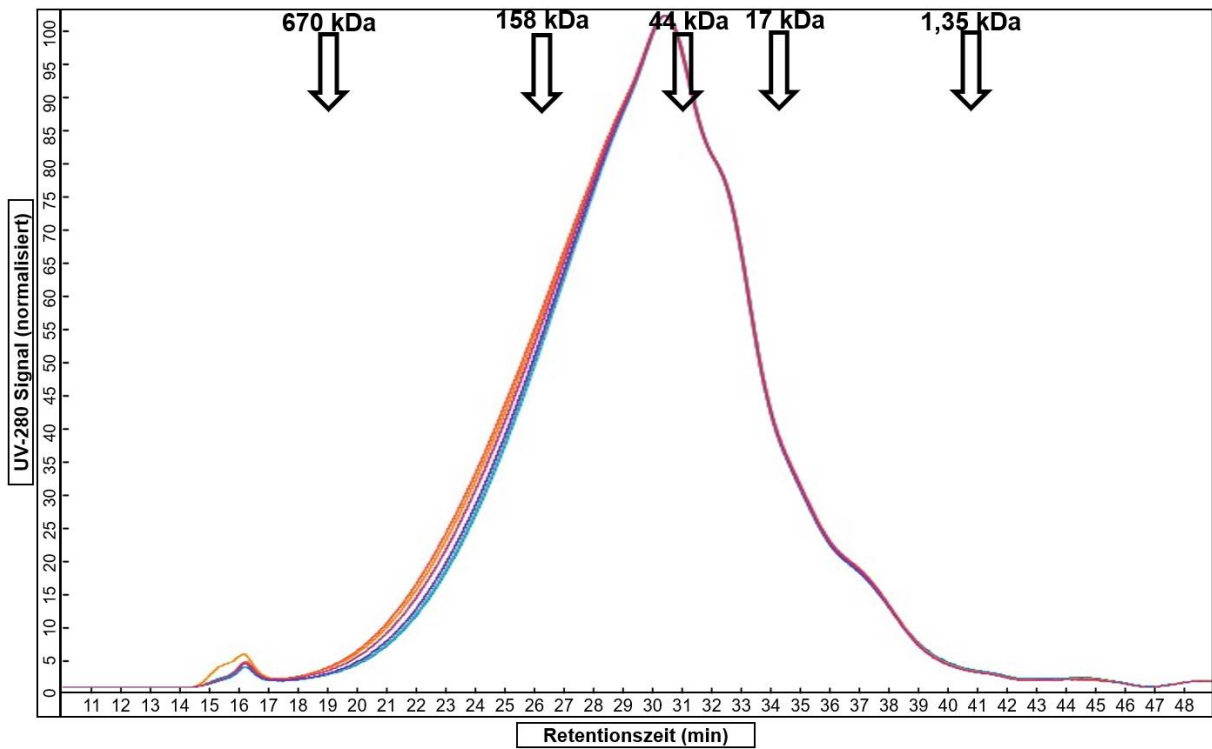


Abbildung 80 SEC-Chromatogramme des extrahierten Allergoids aus Implantaten der Charge 756TrMg(1) (n = 6) mit Angabe der molekularen Masse und der Retentionszeit des Proteinstandards.

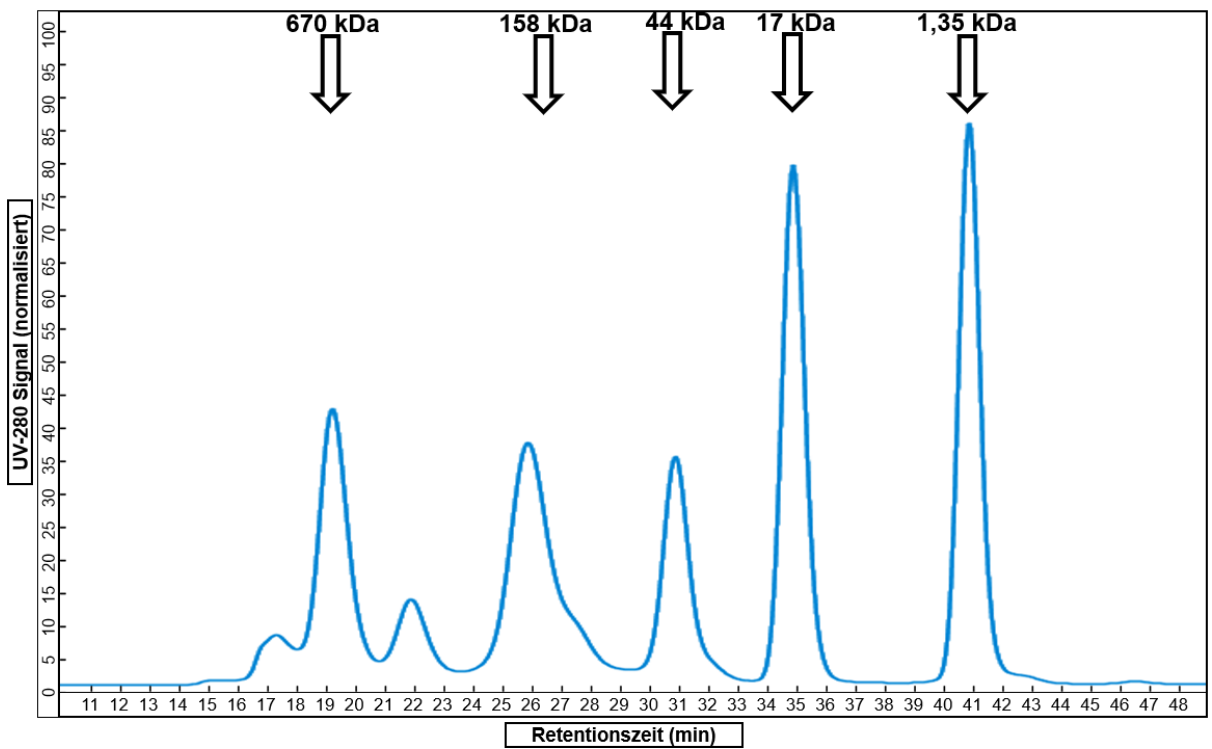


Abbildung 81 1. SEC-Chromatogramm des Proteinstandards mit Angabe der molekularen Massen.

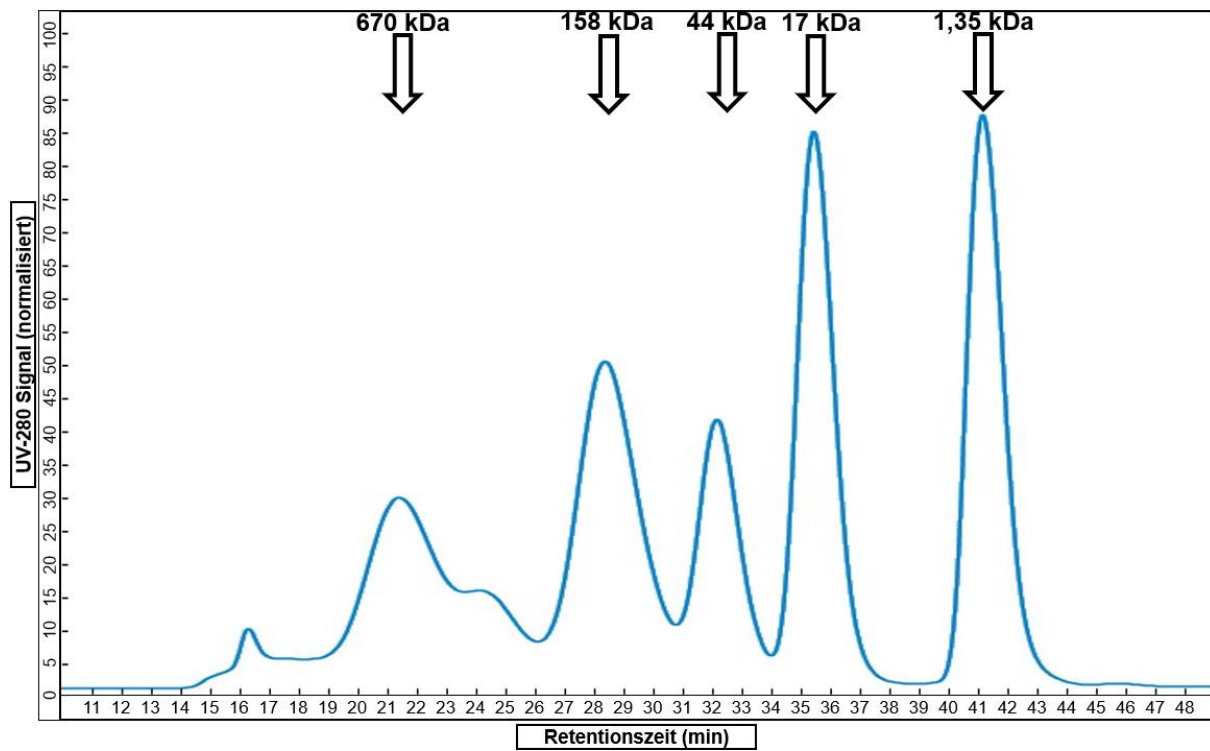


Abbildung 82 2. SEC-Chromatogramm des Proteinstandards mit Angabe der molekularen Massen.

8.3. Abkürzungen

AA	Allergenaktivität
AA/mg	IgE-Bindungskraft
AAPS	<i>Association of Pharmaceutical Scientists</i>
AIT	Allergen-Immuntherapie
AMG	Arzneimittelgesetz
APC	antigenpräsentierende Zelle
AR	allergische Rhinitis
ASIA	autoimmun/entzündliches Syndrom induziert durch Adjuvantien
B0	uninhibierter Maximalwert
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca(OH) ₂	Calciumhydroxid
ca.	circa
cDDS	<i>controlled Drug Delivery Systems</i>
DLS	dynamische Lichtstreuung
DSC	Differentialkalorimetrie
ELISA	<i>enzym-linked-immunosorbent Assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EPIT	epikutane Immuntherapie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Fab2	Fragment-Antikörper 2
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIP	<i>Federation International Pharmaceutique</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
GPU	IgG-basierte Potenzeinheit
GPU/mg	IgG-Bindungskraft
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase

i.v.	intravenös
IDIT	intradermale Immuntherapie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILIT	intralymphatische Immuntherapie
K	Kelvin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
L/D	Längen/Durchmesser Verhältnis
Lyo	Lyophilisat
m/m	Masse pro Masse (Massenverhältnis)
MAG	<i>magnification</i> (Vergrößerung)
Mg(OH) ₂	Magnesiumhydroxid
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 2
mM	Millimolar
M-PLA	Monophosphoryllipid A
MW	Mittelwert
n	unabhängige Probenvorbereitungen
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NSB	unspezifischer Nullwert

OAS	orales Allergiesyndrom
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PGA	Polyglycolid
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoeia Europaea</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PK	Polykondensation
PLA	Polylactid
PLGA	Poly-Lactid-co-Glycolid
PNU	<i>protein nitrogen unit</i>
PR-10	<i>pathogenesis-related</i> protein 10
Prel_DF	relative Allergene-Potenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R _h	hydrodynamischen Radius
röm.	römisch
ROP	Ringöffnungspolymerisation
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCIT	subkutane Immuntherapie
SD	Standardabweichung
SEC	Größenausschlusschromatographie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SME	Schmelzextrusion
tDC	tolerogene dendritische Zellen
TE	therapeutische Einheiten
T _g	Glasübergangstemperatur

TGF- β	<i>Transforming Groth Factor β</i>
Th-Zelle	T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
WHO	<i>World Health Organization</i>
α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

8.4. Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Konferenzbeiträge – Posterpräsentationen

- Römer, A. Wald, M. Cossé, A. Willers, C. Augustin, S. Scherließ, R., Allergoid implant for allergen immunotherapy: stability and long-term in-vitro release, EAACI-Congress 2023, Hamburg (2023).
- Cossé, A. Römer, A. Wald, M. Willers, C. Augustin, S. Scherließ, R., Allergoid-beladene Implantate für die Allergen-Immuntherapie: Stabilität und In-vitro-Freisetzung, 18. DAK, Bonn (2023)

9. Referenzen

1. Akdis CA, Agache I. Global Atlas of Allergy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2014.
2. Thornton C, Holt PG. Development of Allergy and Atopy (Kapitel 2). In: Allergy and Allergic Diseases. John Willey & Sons 2008. 2.
3. Klimek L, Vogelberg C, Werfel T. Weißbuch Allergie in Deutschland. Springer Medizin 2019. 4.
4. Ring J, Akdis C, Behrendt H, Lauener RP, Schäppi G, Akdis M et al. Davos Declaration: Allergy as a global problem. Allergy 2012. 67(2), 141-143.
5. Augustin M, Franzke N, Beikert FC, Stadler R, Reusch M, Schmitt J et al. Allergien in Deutschland - Häufigkeit und Wahrnehmung in der Bevölkerung. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2013. 11(6), 514-520.
6. Schmitz R, Kuhnert R, Thamm M. 12-Monats-Prävalenz von Allergien in Deutschland. Journal of Health Monitoring 2017. 2(1), 77-82.
7. Thamm R, Poethko-Müller R, Hüther A, Thamm M. Allergische Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. Journal of Health Monitoring 2018. 3(3), 3-18.
8. Amanda E, Boersma P. Diagnosed allergic conditions in adults: United States, 2021. NCHS Data Brief no 460. National Center for Health Statistics. 2023.
9. Aldakheel FM. Allergic Diseases: A Comprehensive Review on Risk Factors, Immunological Mechanisms, Link with COVID-19, Potential Treatments, and Role of Allergen Bioinformatics. Int. J. Environ. Res. Public Health 2021. 18(22), 12105.
10. Tanno LK, Calderon MA, Smith HE, Sanchez-Borges M, Sheikh A, Demoly P. Dissemination of definitions and concepts of allergic and hypersensitivity conditions. The World Allergy Organization Journal 2016. 9(24).
11. Rapiejko A, Jurkiewicz D, Lipiec A. Very high concentrations of birch pollen in the air of selected Polish cities in 2022 - clinical implications. Otolaryngol Pol. 2022. 76(6), 1-7.
12. Bachert C, Borchard U, Wedi B, Klimek L, Rasp G, Riechelmann H et al. Allergische Rhinokonjunktivitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI). Allergo J. 2023. 12, 94-182.
13. Klimek L, Bachert C, Pfaar O, Becker S, Bieber T, Brehler R et al. ARIA guideline 2019: treatment of allergic rhinitis in the German health system. Allergo J. Int. 2019. 29(7), 255-276.
14. Pfützner W. Allergenspezifische Immuntherapie: Aktueller Stand sowie neue Erkenntnisse und Entwicklungen. Aktuelle Dermatologie 2016. 42, 454-465.

15. Cox L, Nelson H, Lockey R, Calabria C, Chacko T, Finegold I et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. 127(1), 1-55.
16. Hesse L, Oude Elberink JNG, van Oosterhout AJM, Nawijn MC. Allergen immunotherapy for allergic airway diseases. Use lessons from the past to design a brighter future. *Pharmacology & Therapeutics* 2022. 237, 108115.
17. Senna G, Caminati M, Lockey RF. Allergen Immunotherapy Adherence in the Real World. How Bad Is It and How Can It Be Improved. *Curr Treat Options Allergy* 2015. 2(1), 39-53.
18. Musa F, Al-Ahmad M, Arifhodzic N, Al-Herz W. Compliance with allergen immunotherapy and factors affecting compliance among patients with respiratory allergies. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 2017. 13(3), 514-517.
19. Caruso C, Bramé B, Bagnasco D, Cocconcelli A, Ortolani V, Pravettoni V et al. Adherence to Allergen Subcutaneous Immunotherapy is Increased by a Shortened Build-Up Phase. A Retrospective Study. *BioMed Res. Int.* 2020. 2020, 1-4.
20. Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery. In: *Advances in Delivery Science and Technology*. Springer 2012.
21. Adepu S, Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* 2021. 26(19), 5905.
22. Wright JC, Burgess DJ. Long Acting Injections and Implants. In: *Advances in Delivery Science and Technology*. Springer 2012.
23. Burgess DJ, Crommelin DJ, Hussain AS, Chen ML. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS PharmSci* 2004. 6(1).
24. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011. 3(3), 1377-1397.
25. Wang Y, Qin B, Xia G, Choi SH. FDA's Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Research Program and Regulatory Outcomes. *AAPS Journal* 2021. 23(4).
26. Lee PW, Pokorski JK. Poly(lactic-co-glycolic acid) devices: Production and applications for sustained protein delivery. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2018. 10(5).
27. Lim YW, Tan WS, Ho KL, Mariatulqabtiah AR, Abu Kasim NH, Abd Rahman N et al. Challenges and Complications of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Long-Acting Drug Product Development. *Pharmaceutics* 2022. 14, 614.
28. Maniruzzaman M, Boateng JS, Snowden MJ, Douroumis D. A review of hot-melt extrusion: process technology to pharmaceutical products. *ISRN Pharmaceutics* 2012. 2012, 1-9.

29. Patil H, Tiwari RV, Repka MA. Hot-Melt Extrusion. From Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. AAPS PharmSciTech. 2015. 17(1), 20-42.
30. Wüthrich B, Borelli S, Geiges M, Lautenschlager S. Aus der Geschichte der Allergologie: Allergie im Selbstversuch – v. Pirquets Arm in der Moulagensammlung des Dermatologischen Ambulatoriums Stadtspital Triemli Zürich. Allergologie 2014. 37(8), 338-340.
31. Kay, AB. Allergy and Hypersensitivity: History and Concepts (Kapitel 1). In: Allergy and Allergic Diseases. Blackwell Publishing 2008. 2.
32. Pirquet C von. Allergie. Münchener medizinische Wochenschrift 1906. 53, 1457-1458.
33. Gell P, Coombs R. Clinical Aspects of Immunology. Blackwell Scientific Publications 1968. 2.
34. Kroegel C, Bartuschka B, Henzgen M. Klinische Pneumologie. 2008. Springer 2008.
35. Beutner C, Werchan B, Forkel S, Gupta S, Fuchs T, Schön MP et al. Sensitization rates to common inhaled allergens in Germany - increase and change patterns over the last 20 years. Journal of the German Society of Dermatology 2021. 19(1), 37-44.
36. Jarvis DL, Shaheen SO, Burney P. Epidemiology of Asthma, Atopy, and Atopic Disease (Kapitel 58). In: Allergy and Allergic Diseases. Blackwell Publishing 2008. 2.
37. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 2013. 56(5-6), 698-706.
38. Heidemann C, Scheidt-Nave C, Beyer A-K, Baumert J, Thamm R, Maier B et al. Gesundheitliche Lage von Erwachsenen in Deutschland – Ergebnisse zu ausgewählten Indikatoren der Studie GEDA 2019/2020-EHIS. Journal of Health Monitoring 2011. 6(3), 3-27.
39. Han H, Roan F, Ziegler SF. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. Immunol Rev. 2017. 278(1), 116-130.
40. Hill DA, Spergel JM. The atopic march: Critical evidence and clinical relevance. Ann Allergy Asthma Immunol. 2018. 120(2), 131-137.
41. Yang L, Fu J, Zhou Y. Research Progress in Atopic March. Front. Immunol. 2020. 11, 1907.
42. Tsuge M, Ikeda M, Matsumoto N, Yorifuji T, Tsukahara H. Current Insights into Atopic March. Children 2021. 8, 1067.
43. Murphy K, Weaver C. Allergien und allergische Erkrankungen (Kapitel 14). In: Janeway Immunologie. Springer 2018. 9.
44. R. Urbanek KN. Allergologie (Kapitel 11). In: Pädiatrie. Springer 2019. 5.

45. Raith M, Swoboda I. Birch pollen - The unpleasant herald of spring. *Front. Allergy* 2023. 4, 1181675.
46. Poncet P, Sénéchal H, Charpin D. Update on pollen-food allergy syndrome. *Expert Review of Clinical Immunology* 2020. 16(6), 561-578.
47. Breiteneder H, Kraft D. The History and Science of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1. *Biomolecules* 2023. 13(7), 1151.
48. Biedermann T, Winther L, Till SJ, Panzner P, Knulst A, Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy* 2019. 74(7), 1237-1248.
49. Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, Scadding GK. Allergic rhinitis. *Lancet* 2011. 378(9809), 2112-2122.
50. Fokkens W, Bousquet J. Definition and Classification of Allergic Rhinitis and Upper Airways Diseases (Kapitel 67). In: *Allergy and Allergic Diseases*. Blackwell Publishing 2008. 2.
51. Skoner DP. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. 108(1), 2-8.
52. Akdis CA, Agache I, Hellings PW. *Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2015.
53. Hoyte FCL, Nelson HS. Recent advances in allergic rhinitis. *F1000Research* 2018. 7, 1333.
54. Tsilochristou OA, Douladiris N, Makris M, Papadopoulos NG. Pediatric allergic rhinitis and asthma: Can the march be halted? *Paediatric Drugs* 2013. 15(6), 431-440.
55. Khan DA. Allergic rhinitis and asthma. Epidemiology and common pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* 2014. 35(5), 357-361.
56. Dykewicz MS, Wallace DV, Amrol DJ, Baroody FM, Bernstein JA, Craig TJ et al. Rhinitis 2020: A practice parameter update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020. 146(4), 721-767.
57. Meltzer EO. Allergic Rhinitis. Burden of Illness, Quality of Life, Comorbidities, and Control. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2016. 36(2), 235-248.
58. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911. 177(4580), 1572-1573.
59. Ring J, Gutermuth J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy* 2011. 66(6), 713-724.
60. Linhart B, Valenta R. Vaccines for allergy. *Current opinion in immunology* 2012. 24(3), 354-360.
61. Cox LS, Murphey A, Hankin C. The Cost-Effectiveness of Allergen Immunotherapy Compared with Pharmacotherapy for Treatment of Allergic Rhinitis and Asthma. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2020. 40(1), 69-85.
62. Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of

- immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy* 2012. 2(1), 8.
63. Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO Position Paper - Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998. 44(53), 4-42.
 64. Sousa L, Martín-Sierra C, Pereira C, Loureiro G, Tavares B, Pedreiro S et al. Subcutaneous immunotherapy induces alterations in monocytes and dendritic cells homeostasis in allergic rhinitis patients. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2018. 14(1), 45.
 65. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M et al. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. 130(5), 1153-1158.e2.
 66. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organization Journal* 2015. 8, 17.
 67. Klimek L, Brehler R, Hamelmann E, Kopp M, Ring J, Treudler R et al. Evolution of subcutaneous allergen immunotherapy (part 1): from first developments to mechanism-driven therapy concepts. *Allergo J. Int.* 2019. 28(3), 78-95.
 68. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. 121(6), 1467-1472.e1.
 69. Şahin E, Bafaqeeh SA, Güven SG, Çetinkaya EA, Muluk NB, Coşkun ZO et al. Mechanism of action of allergen immunotherapy. *American Journal of Rhinology & Allergy* 2016. 30(5 Suppl. 1), 1-3.
 70. Mahler V, Kleine-Tebbe J, Vieths S. Immuntherapien von Allergien: Aktueller Stand. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2020. 63(11), 1341-1356.
 71. Kucuksezer UC, Ozdemir C, Cevhertas L, Ogulur I, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergology International* 2020. 69(4), 549-560.
 72. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. 129(4), 1020-1030.
 73. Wambre E, DeLong JH, James EA, Torres-Chinn N, Pfützner W, Möbs C et al. Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4(+) T-cell responses in an epitope-dependent manner. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. 3, 872-9.e7.
 74. Möbs C, Ipsen H, Mayer L, Slotosch C, Petersen A, Würtzen PA et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient

- TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. 130(5), 1108-1116.e6.
75. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, Jensen-Jarolim E, Knol EF, Kleine-Tebbe J et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy* 2017. 72(8), 1156-1173.
76. Bozek A, Cudak A, Canonica GW. Long-term efficacy of injected allergen immunotherapy for treatment of grass pollen allergy in elderly patients with allergic rhinitis. *Allergy and Asthma Proceedings* 2020. 41(4), 271-277.
77. Worm M, Rak S, Samoliński B, Antila J, Höiby A-S, Kruse B et al. Efficacy and safety of birch pollen allergoid subcutaneous immunotherapy: A 2-year double-blind, placebo-controlled, randomized trial plus 1-year open-label extension. *Clinical & Experimental Allergy* 2019. 49(4), 516-525.
78. Bożek A, Kołodziejczyk K, Jarzab J. Efficacy and safety of birch pollen immunotherapy for local allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018. 120(1), 53-58.
79. Lee JH, Kim SC, Choi H, Jung CG, Ban GY, Shin YS et al. Subcutaneous Immunotherapy for Allergic Asthma in a Single Center of Korea: Efficacy, Safety, and Clinical Response Predictors. *Journal of Korean Medical Science* 2017. 32(7), 1124-1130.
80. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007.
81. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007. 62(8), 943-948.
82. Bergmann K-C, Demoly P, Worm M, Fokkens WJ, Carrillo T, Tabar AI et al. Efficacy and safety of sublingual tablets of house dust mite allergen extracts in adults with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. 133(6), 1608-1614.e6.
83. Niu C-K, Chen W-Y, Huang J-L, Lue K-H, Wang J-Y. Efficacy of sublingual immunotherapy with high-dose mite extracts in asthma: A multi-center, double-blind, randomized, and placebo-controlled study in Taiwan. *Respiratory Medicine* 2006. 100(8), 1374-1383.
84. Wahn U, Bachert C, Heinrich J, Richter H, Zielen S. Real-world benefits of allergen immunotherapy for birch pollen-associated allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2019. 74(3), 594-604.
85. Senti G, Moos S von, Tay F, Graf N, Johansen P, Kündig TM. Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. *Allergy* 2015. 70(6), 707-710.

86. Atipas K, Kanjanawasee D, Tantilipikorn P. Intradermal Allergen Immunotherapy for Allergic Rhinitis: Current Evidence. *J. Pers. Med.* 2022. 12(8), 1341.
87. Hylander T, Latif L, Petersson-Westin U, Cardell LO. Intralymphatic allergen-specific immunotherapy: an effective and safe alternative treatment route for pollen-induced allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. 131(2), 412-420.
88. Therapieallergene-Verordnung vom 7. November 2008. *BGBI. I*, 2177.
89. Giannetti A, Ricci G, Procaccianti M, Santoro A, Caffarelli C. Safety, Efficacy, and Preventive Role of Subcutaneous and Sublingual Allergen Immunotherapy for the Treatment of Pediatric Asthma. *Journal of Asthma and Allergy* 2020. 13, 575-587.
90. Calderón MA, Simons FER, Malling H-J, Lockey RF, Moingeon P, Demoly P. Sublingual allergen immunotherapy: Mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy* 2012. 67(3), 302-311.
91. Chesné J, Schmidt-Weber CB, Esser von-Bieren J. The Use of Adjuvants for Enhancing Allergen Immunotherapy Efficacy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2016. 36(1), 125-145.
92. Zubeldia JM, Ferrer M, Dávila I, Justicia JL. Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy. Modulating and Enhancing the Immune Response. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2019. 29(2), 103-111.
93. Jensen-Jarolim E. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. *World Allergy Organization Journal* 2015. 8, 7.
94. Gajdanowicz P, Pfaar O, Jutel M. Adjuvantien in der Allergen-Immuntherapie. *Allergologie* 2018. 41(9), 427-434.
95. Cox LS, Hankin C, Lockey R. Allergy immunotherapy adherence and delivery route: location does not matter. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. 2(2), 156-160.
96. Egert-Schmidt A-M, Kolbe J-M, Mussler S, Thum-Oltmer S. Patients' compliance with different administration routes for allergen immunotherapy in Germany. *Patient Preference and Adherence* 2014. 8, 1475-1481.
97. Silva D, Pereira A, Santos N, Placido JL. Costs of treatment affect compliance to specific subcutaneous immunotherapy. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2014. 46(2), 87-94.
98. Lee JH, Lee SH, Ban GY, Ye YM, Nahm DH, Park HS et al. Factors Associated with Adherence to Allergen Specific Subcutaneous Immunotherapy. *Yonsei Med. J.* 2019. 60(6), 570-577.
99. Allam J-P, Andreasen JN, Mette J, Serup-Hansen N, Wüstenberg EG. Comparison of allergy immunotherapy medication persistence with a sublingual immunotherapy tablet versus subcutaneous immunotherapy in Germany. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. 141(5), 1898-1901.e5.

100. Kiel MA, Röder E, van Gerth Wijk R, Al MJ, Hop WCJ, Rutten-van Mülken MPMH. Real-life compliance and persistence among users of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. 132(2), 353-60.e2.
101. Compalati E, Incorvaia C, Cavaliere C, Masieri S, Gargiulo A, Mistrello G et al. The role of allergoids in allergen immunotherapy: From injective to sublingual route. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2020. 52(5), 195-204.
102. Carter E. Detoxified Pollen Extract. Abott Laboratories. United States Patent Office 1932. 2019808, USA.
103. Glenny A, Hopkins B. Diphtheria Toxoid as an Immunising Agent. *Br. J. Exp. Pathol.* 1923. 4(5), 283-288.
104. Marsh DG, Lichtenstein LM, Campbell DH. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* 1970. 18(5), 705-722.
105. Metz B, Kersten GF, Baart GJ, Jong A de, Meiring H, Hove J ten et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: Reactions with insulin. *Bioconjugate Chem.* 2006. 17(3), 815-822.
106. Metz B, Kersten GFA, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HAM, Jong A de et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins. *J. Biol. Chem.* 2004. 279(8), 6235-6243.
107. Rajakulendran M, Tham EH, Soh JY, van Bever HP. Novel strategies in immunotherapy for allergic diseases. *Asia Pacific allergy* 2018. 8(2), e14.
108. Brehler R, Kahlert H, Thum-Oltmer S. Hypoallergenic preparations in SCIT. Immunological features and their impact on clinical efficacy and safety, exemplary for the allergoids Allergovit®, Acaroid® and a folding variant of the recombinant birch pollen major allergen Bet v 1. *Allergo J.* 2010. 19, 477-484.
109. Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin. Exp. Allergy* 2003. 33(9), 1266-1272.
110. Puttonen E, Maasch HJ, Pilström L. Studies of allergen and allergoid preparations from purified timothy (*Phleum pratense*) pollen extracts. I. Physicochemical characteristics and binding to allergen-specific human IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1982. 68(1), 1-6.
111. Fiebig H, Kahlert H, Nandy A, Wald M, Suck R, Weber B. Test procedures for allergoids and hypoallergenic recombinant allergens: Immunological characterization. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut* 2006. 95, 135-146.

112. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 2004. 37(5), 790-796.
113. Heydenreich B, Bellinghausen I, Lorenz S, Henmar H, Strand D, Würtzen PA et al. Reduced in vitro T-cell responses induced by glutaraldehyde-modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells. *Immunology* 2012. 136(2), 208-217.
114. Henmar H, Nedergaard Larsen J, Lund L, Hvalsøe Meno K, Ferreras M. Comparison of Intact Allergen Extracts and Allergoids For Subcutaneous Immunotherapy: The Effect of Chemical Modification Differs Both Between Species and Between Individual Allergen Molecules. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2023. 33(3), 190-199.
115. Olivier CE. The use of Allergoids and Adjuvants in Allergen Immunotherapy. *Arch. Asthma Allergy Immunol.* 2017. 1(1), 40-60.
116. Lüderitz-Püchel Ü, Keller-Stanislawski B, Haustein B. Neubewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen. Eine Analyse der UAW-Meldungen von 1991 bis 2000. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2001. 44(7), 709-718.
117. Distler A, Pappelendam D. 13-year overview of severe adverse drug reactions following subcutaneous specific immunotherapy with a chemically modified allergen preparation. *Allergo J. Int.* 2015. 24, 294-302.
118. Mistrello G, Brenna O, Roncarolo D, Zanoni D, Gentili M. Monomeric chemically modified allergens: Immunologic and physicochemical characterization. *Allergy* 1996. 51(1), 8-15.
119. Passalacqua G, Pasquali M, Ariano R, Lombardi C, Giardini A, Baiardini I et al. Randomized double-blind controlled study with sublingual carbamylated allergoid immunotherapy in mild rhinitis due to mites. *Allergy* 2006. 61(7), 849-854.
120. Mösges R, Ritter B, Kayoko G, Allekotte S. Carbamylated monomeric allergoids as a therapeutic option for sublingual immunotherapy of dust mite- and grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: A systematic review of published trials with a meta-analysis of treatment using Lais tablets. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* 2010. 19(3), 3-10.
121. Quercia O, Bruno ME, Compalati E, Falagiani P, Mistrello G, Stefanini GF. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid: Comparison between two different treatment regimens. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2011. 43(6), 176-183.
122. Lofarma Deutschland GmbH. Fachinformation: Lais Tabletten 300/1.000 UA/Tablette 2019.

123. Himly M, Carnes J, Fernandez-Caldas E, Briza P, Ferreira F. Characterization of allergoids. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut* 2009. 96, 61-70.
124. Zimmer J, Bonertz A, Vieths S. Quality requirements for allergen extracts and allergoids for allergen immunotherapy. *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 2017. 45(S1), 4-11.
125. European Pharmacopoeia 10.4. Allergen Products 2019:1063.
126. European Medicines Agency. Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues 2008.
127. Göpferich, A., Gref, R., Minamitake, Y., Shieh, L., Alonso, M. J., Tabata, Y., & Langer, R. Drug Delivery from Bioerodible Polymers. In *Acs Symposium Series* 1993, 242-277.
128. Vaishya R, Khurana V, Patel S, Mitra AK. Long-term delivery of protein therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. 12(3), 415-440.
129. Shi Y, Li LC. Current advances in sustained-release systems for parenteral drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005. 2(6), 1039-1058.
130. Chaubal MV, Roseman TJ. Drug delivery trends for parenteral therapeutics. *Drug Delivery System* 2006. 21(4), 388-397.
131. Borandeh S, van Bochove B, Teotia A, Seppälä J. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2021. 173, 349-373.
132. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010. 1(1), 149-173.
133. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000. 21(23), 2475-2490.
134. Silva ATCR, Cardoso BCO, Silva MESRe, Freitas RFS, Sousa RG. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation. *JBNB* 2015. 6(1), 8-19.
135. Qian H, Wohl AR, Crow JT, Macosko CW, Hoyer TR. A Strategy for Control of "Random" Copolymerization of Lactide and Glycolide: Application to Synthesis of PEG-b-PLGA Block Polymers Having Narrow Dispersity. *Macromolecules* 2011. 44(18), 7132-7140.
136. Zhou S, Deng X, Li X, Jia W, Liu L. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. *Journal of Applied Polymer Science* 2004. 91(3), 1848-1856.
137. Qinwei GAO, Ping LAN, Huili SHAO, Xuechao HU. Direct Synthesis with Melt Polycondensation and Microstructure Analysis of Poly(L-lactic acid-co-glycolic acid). *Polymer Journal* 2022. 34(11), 786-793.
138. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. 15(3), 3640-3659.

139. Park TG. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 1995. 16(15), 1123-1130.
140. Houchin ML, Topp EM. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008. 97(7), 2395-2404.
141. Solorio L, Carlson A, Zhou H, Exner AA. *Implantable Drug Delivery Systems (Kapitel 7)*. In: *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*. John Wiley & Sons 2014. 1.
142. Engineer C, Parikh JK, Raval A. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2011. 25(2), 79-85.
143. Horvath D, Basler M. PLGA Particles in Immunotherapy. *Pharmaceutics* 2023. 15(2), 615.
144. Cao H, Liu L, Wang J, Gong M, Yuan R, Lu J et al. Effects of rAmb a 1-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles in a Murine Model of Allergic Conjunctivitis. *Molecules* 2022. 27(3), 598.
145. Folkman J, Long DM. The Use of Silicone Rubber as a Carrier for Prolonged Drug Therapy. *J. Surg. Res.* 1964. 4(3), 139-142.
146. Kleiner LW, Wright JC, Wang Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2014. 181, 1-10.
147. FDA. IDE Definitions and Acronyms 2017. (Internet) <https://www.fda.gov/medical-devices/investigational-device-exemption-ide/ide-definitions-and-acronyms> (Zugriff am 07.09.2023).
148. AstraZeneca Österreich GmbH. Fachinformation für Zoladex Depot 10,8 mg - Implantat 2016.
149. AstraZeneca Österreich GmbH. Fachinformation für Zoladex Depot 3,6 mg - Implantat 2016.
150. Schwendeman SP, Shah RB, Bailey BA, Schwendeman AS. Injectable controlled release depots for large molecules. *Journal of Controlled Release* 2014. 190, 240-253.
151. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther. Deliv.* 2015. 6(1), 41-58.
152. Solorio L, Exner AA. Effect of the Subcutaneous Environment on Phase-Sensitive In Situ-Forming Implant Drug Release, Degradation, and Microstructure. *J. Pharm. Sci.* 2015. 104(12), 4322-4328.
153. Repka MA, Majumdar S, Kumar Battu S, Srirangam R, Upadhye SB. Applications of hot-melt extrusion for drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008. 5(12), 1357-1376.

154. Ghalanbor Z, Körber M, Bodmeier R. Improved lysozyme stability and release properties of poly(lactide-co-glycolide) implants prepared by hot-melt extrusion. *Pharmaceutical Research* 2010. 27(2), 371–379.
155. Smith L, Mosley J, Johnson J, Nasri M. Probuphine (Buprenorphine) Subdermal Implants for the Treatment Of Opioid-Dependent Patients. *Pharmacy and Therapeutics* 2017. 42(8), 505-508.
156. Virro JJ, Besinque K, Carney CE, Gross D, Bernick B, Mirkin S. Long-Lasting, Patient-Controlled, Procedure-Free Contraception: A Review of Annovera with a Pharmacist Perspective. *Pharmacy* 2020. 8(3), 156.
157. Simões MF, Pinto RMA, Simões S. Hot-melt extrusion in the pharmaceutical industry: Toward filing a new drug application. *Drug Discovery Today* 2019. 24(9), 1749-1768.
158. Allyn MM, Luo RH, Hellwarth EB, Swindle-Reilly KE. Considerations for Polymers Used in Ocular Drug Delivery. *Front. Med.* 2022. 9, 787644.
159. Thermo Scientific. Betriebsanleitung Pharma 11 Doppelschnecken-Extruder (Doc. No. 042-3688 Version 1.5) 2013.
160. Guangliang Liu and Kathleen McEnnis. Glass Transition Temperature of PLGA Particles and the Influence on Drug Delivery Applications. *Polymers* 2022. 14(5), 993.
161. Wald M, Roemer A, Bauermeister K, Willers C, Cossé A, Augustin S. Formallergoids are more resistant against aggregation induced by thermal stress than native allergen extract. *Allergy* 2020. 109, 8.
162. Wang K. Die Swell of Complex Polymeric Systems (Kapitel 4). In *Viscoelasticity - From Theory to Biological Applications* (De Vicente J.). InTech 2012.
163. He P, Xu S, Guo Z, Yuan P, Liu Y, Chen Y et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of PLGA-based doxorubicin-loaded implants for tumor therapy. *Drug Delivery* 2022. 29(1), 478-488.
164. Hawe A, Hulse WL, Jiskoot W, Forbes RT. Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharmaceutical Research* 2011. 28(9), 2302-2310.
165. Carnés J, Himly M, Gallego M, Iraola V, Robinson DS, Fernández-Caldas E et al. Detection of allergen composition and in vivo immunogenicity of depigmented allergoids of *Betula alba*. *Clin. Exp. Allergy* 2009. 39(3), 426-434.
166. Lebedev I., Brill L., Rivera D., Tackett B. Size Exclusion Chromatography for the Determination of Protein Hydrodynamic Radius - Revisiting the Calibration Curve (White Paper). Phenomenex, Inc. 2021.
167. Morales M, Gallego MT, Iraola V, Moya R, Santana S, Carnés J. Preclinical safety and immunological efficacy of *Alternaria alternata* polymerized extracts. *Immunity, Inflammation and Disease* 2018. 6(2), 234-244.

168. Sola JP, Pedreño Y, Cerezo A, Peñalver-Mellado M. Development and characterization of an allergoid of cat dander for immunotherapy. *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 2018. 46(5), 491-498.
169. Würtzen PA, Lund L, Lund G, Holm J, Millner A, Henmar H. Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007. 144(4), 287-295.
170. Maasch HJ, Marsh DG. Standardized extracts modified allergens--allergoids. *Modified allergens - Allergoids. Clin. Rev. Allergy* 1987. 5(1), 89-106.
171. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2007. 1767(9), 1073-1101.
172. Gross PC, Zeppezauer M. Infrared spectroscopy for biopharmaceutical protein analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010. 53(1), 29-36.
173. Schönknecht C, Bauermeister K, Laffert B, Reese G, Scharff V, Willers C et al. Entwicklung eines kompetitiven ELISAs zur Bestimmung der IgG-basierten Aktivität von Allergoid-Präparaten der Hausstaubmilben *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*. *Allergo J. Int.* 2019. 28, 209-254.
174. Konstantinos Avgoustakis. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. CRC Press 2008. 2.
175. Zlomke C, Barth M, Mäder K. Polymer degradation induced drug precipitation in PLGA implants - Why less is sometimes more. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2019. 139, 142–152.
176. Ghalanbor Z, Körber M, Bodmeier R. Protein release from poly(lactide-co-glycolide) implants prepared by hot-melt extrusion: thioester formation as a reason for incomplete release. *International Journal of Pharmaceutics* 2012. 438(1-2), 302-306.
177. Van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharmaceutical Research* 2000. 17(10), 1159-1167.
178. Mäder K, Gallez B, Liu K.J, Swartz H. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomaterials* 1996. 17(4), 457-461.
179. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polym. Int.* 2005. 54(1), 36-46.
180. Anne Cossé, Corinna König, Alf Lamprecht, Karl G Wagner. Hot Melt Extrusion for Sustained Protein Release: Matrix Exosion and In Vitro Release of PLGA-Based Implants. *AAPS PharmSciTech.* 2016. 18(1), 15-26.
181. Duque L, Körber M, Bodmeier R. Improving release completeness from PLGA-based implants for the acid-labile model protein ovalbumin. *International Journal of Pharmaceutics* 2018. 538(1-2), 139-146.

182. Rajagopal K, Wood J, Tran B, Patapoff TW, Nivaggioli T. Trehalose limits BSA aggregation in spray-dried formulations at high temperatures. Implications in preparing polymer implants for long-term protein delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013. 102(8), 2655-2666.
183. Rajagopal K, Chang D, Nayak P, Izadi S, Patapoff T, Zhang J et al. Trehalose Limits Fragment Antibody Aggregation and Influences Charge Variant Formation in Spray-Dried Formulations at Elevated Temperatures. *Molecular Pharmaceutics* 2018. 16(1), 349-358.
184. James S, McManus JJ. Thermal and solution stability of lysozyme in the presence of sucrose, glucose, and trehalose. *Journal of Physical Chemistry B* 2012. 116(34), 10182-10188.
185. Kaushik JK, Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry* 2003. 278(29), 26458-26465.
186. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science* 2008. 18(1), 24-36.
187. Chang LL, Pikal MJ. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009. 98(9), 2886-2908.
188. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics* 2005. 289(1-2), 1-30.
189. Li L, Li Z, Guo Y, Zhang K, Mi W, Liu J. Preparation of uniform-sized GeXIVA1,2-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency. *Drug Delivery* 2022. 29(1), 2283-2295.
190. Zhao X, Zhang S, Yang G, Zhou Z, Gao Y. Exploring Trehalose on the Release of Levonorgestrel from Implantable PLGA Microneedles. *Polymers* 2020. 12(1), 59.
191. Giteau A, Venier-Julienne M, Aubert-Pouëssel A, Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2008. 350(1-2), 14-26.
192. Kipping T, Rein H. A new method for the continuous production of single dosed controlled release matrix systems based on hot-melt extruded starch: analysis of relevant process parameters and implementation of an in-process control. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013. 84(1), 156-171.
193. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2006. 314(2), 198-206.
194. Alaei M, Moghadam SH, Sayyar P, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation of a Reservoir Type Levonorgestrel Delivery System using High Molecular Weight Poly L-Lactide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2009. 8(2), 97-93.

195. Bassand C, Benabed L, Freitag J, Verin J, Siepmann F, Siepmann J. How bulk fluid renewal can affect in vitro drug release from PLGA implants: Importance of the experimental set-up. *International Journal of Pharmaceutics*: X 2022. 4, 100131.
196. Siewert M, Dressman JB, Brown CK, Shah VP. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*. 2003. 4(1), 43-52.
197. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. Stoffdatenblatt Magnesiumhydroxid. GESTIS-Stoffdatenbank 2023.
198. Zhu G, Schwendeman SP. Stabilization of Proteins Encapsulated in Cylindrical Poly(lactide-co-glycolide) Implants: Mechanism of Stabilization by Basic Additives. *Pharmaceutical Research* 2000. 17(3), 351-357.
199. Giles HF, Wagner JR, Mount EM. *Extrusion: The Definitive Processing Guide and Handbook*. William Andrew 2005.
200. Brudar S, Hribar-Lee B. Effect of Buffer on Protein Stability in Aqueous Solutions: A Simple Protein Aggregation Model. *Journal of Physical Chemistry B* 2021. 125(10), 2504-2512.
201. Amin S, Barnett GV, Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2014. 19(5), 438-449.
202. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007. 39(8), 549-559.
203. Pikal-Cleland KA, Carpenter JF. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric [beta]-galactosidase. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001. 90(9), 1255-1268.
204. Machatschek R, Lendlein A. Fundamental insights in PLGA degradation from thin film studies. *Journal of Controlled Release* 2020. 319, 276-284.
205. Pavani P, Kumar K, Rani A, Venkatesu P, Lee M-J. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *Journal of Molecular Liquids* 2021. 331, 115753.
206. Becker S, Fassio F, Muñoz-Cano R, Klimek L, Vidal C, Heath MD et al. Major Allergen Content in Allergen Immunotherapy Products: The Limited Value of Numbers. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2022. 32(5), 345-356.
207. Frendel A. *Pharma MiniLab – a small scale compounder for pharmaceutical research (White Paper)*. Thermo Scientific 2007.
208. Shadambikar G, Kipping T, Di-Gallo N, Elia A-G, Knüttel A-N, Treffer D et al. Vacuum Compression Molding as a Screening Tool to Investigate Carrier Suitability for Hot-Melt Extrusion Formulations. *Pharmaceutics* 2020. 12(11), 1019.

209. Bassand C, Verin J, Lamatsch M, Siepman F, Siepman J. How agarose gels surrounding PLGA implants limit swelling and slow down drug release. *Journal of Controlled Release* 2022. 343, 255-266.
210. Ghalanbor Z, Körber M, Bodmeier R. Improved Lysozyme Stability and Release Properties of Poly(lactide-co-glycolide) Implants Prepared by Hot-Melt Extrusion. *Pharmaceutical Research* 1009. 27(2), 371-379.
211. Wang C-K, Wang W-Y, Meyer RF, Liang Y, Winey KI, Siegel SJ. A rapid method for creating drug implants: translating laboratory-based methods into a scalable manufacturing process. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2010. 93(2), 562-572.
212. Chamberlain R, Windolf H, Geissler S, Quodbach J, Breitzkreutz J. Precise Dosing of Pramipexole for Low-Dosed Filament Production by Hot Melt Extrusion Applying Various Feeding Methods. *Pharmaceutics* 2022. 14(1), 216.
213. Sophocleous AM, Desai K-GH, Mazzara JM, Tong L, Cheng J-X, Olsen KF et al. The nature of peptide interactions with acid end-group PLGAs and facile aqueous-based microencapsulation of therapeutic peptides. *Journal of Controlled Release* 2013. 172(3), 662-670.
214. R. Bhardwaj JB. In vitro characterization and in vivo release profile of a poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based implant delivery system for the h-MSH analog, melanotan-I. *International Journal of Pharmaceutics* 1998. 170, 109-117.
215. Calderón MA, Larenas D, Kleine-Tebbe J, Jacobsen L, Passalacqua G, Eng PA et al. European Academy of Allergy and Clinical Immunology task force report on 'dose-response relationship in allergen-specific immunotherapy'. *Allergy* 2011. 10, 1345-1359.
216. Allergopharma. Fachinformation: Allergovit Gräser- und Getreidepollen 2018.
217. Maghsoodi M, Barghi L. Polymer Percolation Threshold in Multi-Component HPMC Matrices Tablets. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2011. 1(1), 27-33.
218. Pavlović MM, Pantović RV, Janković Z, Nedeljković D, Nikolić ND, Pavlović MG et al. Electric Conductivity of Electrolytic Copper Powder Filled Poly(Lactide-co-Glycolide) Composites. *International Journal of Electrochemical Science* 2019. 14(10), 9825-9837.
219. Klose D, Delplace C, Siepman J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2011. 404(1-2), 75-82.
220. Kahlert H, Grage-Griebenow E, Stüwe HT, Cromwell O, Fiebig H. T cell reactivity with allergoids: Influence of the type of APC. *Journal of Immunology* 2000. 165(4), 1807-1815.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei all jenen bedanken, die mich während meiner Forschungsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Prof. Dr. Regina Scherließ, die nicht nur meine akademische Leitung übernommen hat, sondern auch stets ein offenes Ohr für meine Ideen und Herausforderungen hatte. Trotz der geografischen Distanz zwischen Kiel und Reinbek konnte ich durchweg von ihrer fachkundigen Anleitung und ihren wertvollen Ratschlägen profitieren, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

Ein weiterer Dank geht an meine Betreuerin bei Allergopharma, Dr. Anne Cossé, für ihre unermüdliche Unterstützung (trotz Elternzeit) und die grundlegende Rolle, die sie bei der Entstehung dieser Arbeit gespielt hat. Durch ihre eigenen Forschungsarbeiten hat sie den Grundstein gelegt und mir die Inspiration und das Wissen vermittelt, um dieses Projekt zu realisieren. Danke Anne!!!

Zusätzlich möchte ich mich bei jenen Kollegen/innen von Allergopharma bedanken, die mich während meiner Zeit in Reinbek immer unterstützt, aufgebaut und in die spezifischen Methoden und Verfahren eingearbeitet haben, die für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung waren. Dabei möchte ich besonders Dr. Martin Wald und Dr. Christina Polasky für ihre wissenschaftliche Expertise und unermüdliche Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken. In diesem Zuge gilt ein besonderer Dank auch der Allergopharma GmbH für die Finanzierung der Doktorarbeit und die Möglichkeit diese im industriellen Umfeld anfertigen zu können.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Arbeitskreises der pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie der Uni Kiel für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Trotz meiner seltenen Besuche in Kiel wurde ich dort immer freundschaftlich in Empfang genommen.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meinen tatkräftigen Korrekturlesern aus meinem privaten und beruflichen Umfeld für ihre hilfreichen Ratschläge.

Meinen Eltern und meinen Bruder danke ich für ihren Rückhalt und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten. Ohne ihren Optimismus, ihre Güte und bedingungslose Unterstützung wäre ich nicht die Person, die ich heute bin.

Letztlich gilt mein größter Dank vor allem meiner Kim. Danke für Deine unermüdliche Unterstützung, deine Geduld und dein Optimismus in allen Lebenslagen der letzten 10 Jahre. Auf Dich konnte ich mich immer verlassen. DANKE!!!

11. Erklärung nach § 9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin, nach Inhalt und Form eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde weder ganz noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin wurde mir weder ein akademischer Grad entzogen, noch habe ich an dieser oder einer anderen Fakultät einen früheren Promotionsversuch unternommen.



Anton Römer