

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Jan-Henning Klusmann

**Untersuchung zur Wirkung von Tregalizumab auf die
allergeninduzierte Atemwegsentszündung bei Patienten mit
Hausstaubmilbenallergie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Julia Schließmeyer

aus Zweibrücken

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Ralf Schubert
Korreferent/in: Prof. Dr. Dr. h.c. David Groneberg
[ggf. 2. Korreferent/in:] nur bei summa cum laude
Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Asthma bronchiale	7
1.2. Therapie des Asthma bronchiale.....	12
1.3. Tregalizumab	14
1.4. Zielsetzung.....	15
2. Patienten und Methoden	17
2.1. Patientenkollektiv	17
2.2. Studiendesign	22
2.3. Lungenfunktionsuntersuchung	23
2.4. Exhalierendes Stickstoffmonoxid	24
2.5. Sputuminduktion	24
2.6. Aufarbeitung der Sputumprobe	25
2.7. Herstellung der Zytospins und Zelldifferenzierung	26
2.8. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	27
2.9. Cytometric Bead Array	28
2.10. Statistische Auswertung	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Zelldifferenzierung des induzierten Sputums	30
3.2. ECP im induzierten Sputum	32
3.3. Zytokine im induzierten Sputum	33
3.4. Zytokin-RNA im Sputum.....	35
3.5. Zytokine im Blut.....	37

3.6. Transkriptionsfaktoren im induzierten Sputum	39
3.7. Klinische Daten	41
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung.....	52
6. Summary.....	54
7. Literaturverzeichnis	56
8. Anhang.....	63
9. Danksagung	80
Schriftliche Erklärung	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Frühe angeborene Immunantwort bei Asthma ⁷	8
Abb. 2: TH-1/TH-2 Imbalance bei Allergie	11
Abb. 3: Tregalizumab (BT-061) aktiviert Treg in vitro. ³⁴	15
Abb. 4: Ablaufplan	22
Abb. 5: Zelldifferenzierung des induzierten Sputums.	31
Abb. 6: Konzentration von ECP im induzierten Sputum.	32
Abb. 7: Konzentration der Zytokine im induzierten Sputum.....	34
Abb. 8: Konzentration der Zytokin-RNA im induzierten Sputum.....	36
Abb. 9: Konzentration der Zytokine im Blut.	38
Abb. 10: Konzentration der Transkriptionsfaktoren-RNA im induzierten Sputum.	40
Abb. 11: Klinische Ergebnisse der Probanden. ³⁷	42

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Probandencharakteristika.....	17
Tab. 2: Zelldifferenzierung des induzierten Sputums	63
Tab. 3: Konzentration von ECP im induzierten Sputum	66
Tab. 4: Konzentration der Zytokine im induzierten Sputum.....	67
Tab. 5: Konzentration der RNA im induzierten Sputum.....	71
Tab. 6: Konzentration der Zytokine im Blut	75

Abkürzungsverzeichnis

BAP	Bronchiale Allergenprovokation
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EAR	Early asthmatic response
ECF-A	Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
END	Eosinophil-derived Neurotoxin
eNO	Exhaliertes Stickstoffmonoxid
EPO	Eosinophilic Peroxidase
FeNO	Fraktioniertem exhaliertem Stickstoffmonoxid
FEV ₁	Einsekundenkapazität
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GATA3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HSM	Hausstaubmilbe
ICS	Inhalative Corticosteroide
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LABA	Long acting beta agonist
LAR	Late asthmatic response
mAB	Monoclonal antibodies
MBP	Major Basic Protein
MHC	Major histocompatibility complex
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
nTreg	naturally occurring Treg
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
SABA	Short acting beta agonist
T-bet	T-box expressed in T cells
TGF β	Transforming Growth Factor β
TH0-Zelle	Naive T-Helferzelle
TH1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
TH2-Zelle	Typ2-T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	Regulatorische T-Helferzelle
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
ULN	Upper level of normal

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, von der circa fünf Prozent der Erwachsenen sowie bis zu zehn Prozent der Kinder betroffen sind. Die Prävalenz in den Industriestaaten ist ansteigend.¹ Dabei schränkt Asthma nicht nur die Lebensqualität ein, sondern vermindert auch die Teilnahme an Schul- und Arbeitsleben, wie an Patienten in den USA gezeigt wurde.² Es ist charakterisiert durch eine Obstruktion der Bronchien, welche sich in Dyspnoe und auskultatorischem Giemen äußert. Die Symptomatik kann variieren. Man unterscheidet zwischen extrinsischem Asthma, welches auch allergisches Asthma genannt wird, intrinsischem, also nichtallergischem Asthma, sowie Mischformen aus beiden.¹ Nichtallergisches Asthma kann dabei durch physische Belastung, Infektionen oder Medikamente hervorgerufen werden, während das allergische Asthma häufig durch das Allergen der Hausstaubmilbe (HSM) ausgelöst wird.³ Daneben können aber auch Pollen, Gräser, Tierhaare und weitere Stoffe Grund für eine überschießende Immunantwort sein.⁴ An der daraus entstehenden bronchialen Entzündung sind vor allem Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Entzündungsmediatoren beteiligt. Die Bronchien der Betroffenen besitzen eine unspezifische Hyperreaktivität, welche sich im Methacholin-Provokationstest nachweisen lässt. Neben Bronchospasmen und Schleimhautödemen aufgrund der entzündeten Schleimhäute verursacht langfristig ein sogenanntes Remodeling eine endobronchiale Obstruktion. Dies beschreibt die Umbauvorgänge der Atemwegswände. Es wird zwischen einer Immunglobulin E (IgE) vermittelten Soforttyp-Reaktion und einer Spättyp-Reaktion unterschieden. Bei der Soforttyp-Reaktion wird mithilfe von IgE die Degranulation von Mastzellen initiiert, aus welchen Histamin, *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis* (ECF-A), Leukotriene und Bradykinin freigesetzt werden. Dies geschieht innerhalb von Sekunden bis Minuten. Die Spättyp-Reaktion ist IgG-vermittelt und tritt nach sechs bis zwölf Stunden auf.¹ Das Modell nach Coombs und Gell von 1963 wird bis heute angewandt und unterteilt allergische Reaktionen in Typ I bis IV. Typ I beschreibt dabei die IgE-vermittelte Soforttyp-Reaktion, die Menschen mit Neigung zu Atopie betrifft. In der Kindheit sind atopische Dermatitis und

allergische Rhinitis häufige Symptome dieser Reaktion. Mit voranschreitendem Alter kommt es zum sogenannten Etagenwechsel, welcher beschreibt, dass im Verlauf auch die unteren Atemwege vermehrt betroffen sind. Neben der unmittelbaren Reaktion kann es auch zur bereits beschriebenen Spättyp-Reaktion kommen, die durch antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen vermittelt wird. Diese Typ IV-Reaktion und die Typ I-Reaktion hängen miteinander zusammen und sorgen bei Atopikern für die verschiedenen Beschwerden.⁵ Bei einigen Patienten kommt es durch Pathomechanismen wie Fibrose und Hyperplasie zu irreversiblen Schäden in den Atemwegen. Diese Schäden können denen von Patienten mit chronischer Bronchitis ähneln.⁶

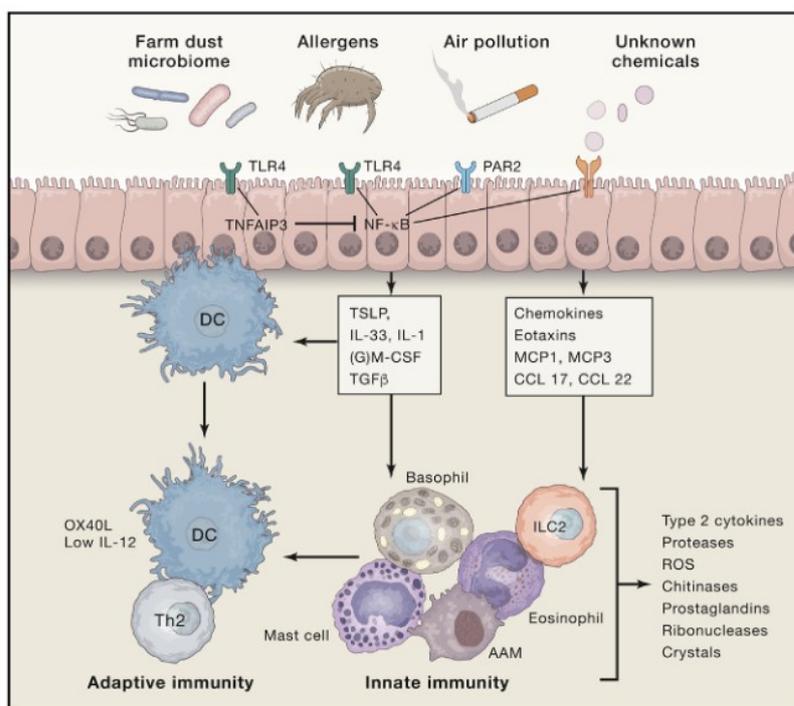


Abb. 1 Frühe angeborene Immunantwort bei Asthma⁷

Bevor es zu einer allergischen Reaktion vom Soforttyp und zur Bildung von IgE-Antikörpern kommt, findet eine Sensibilisierung statt. Dazu muss das Allergen in Kontakt mit einem Epithel an einer Schleimhautoberfläche kommen. Fehlt die Aktivierung von Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) in jungen Jahren während des Kontakts zu Allergenen wie der HSM, kann das die Entstehung einer Allergie im Laufe des Lebens fördern.⁸ Die Allergene besitzen die Fähigkeit, solche Schleimhautbarrieren zu überwinden und eine Zytokinausschüttung durch dendritische Zellen zu verursachen. Bei sensibilisierten Patienten gegenüber HSM schütten Epithelzellen des Atemwegs bei Kontakt zu dieser Interleukin (IL)-

25, IL-33 und *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) aus. Bei Erstkontakt des Allergens mit den antigenpräsentierenden Epithelzellen des Atemwegs kommt es zur Phagozytose durch diese.⁹ Im Anschluss erfolgt die Prozessierung des Allergens sowie die Bindung an und Präsentation durch *major histocompatibility complex* (MHC)-II-Moleküle an der Zelloberfläche. Währenddessen kommt es zur Drainage in Richtung Lymphknoten, wo die Präsentation des Allergens an den T-Zell-Rezeptor einer naiven T-Helferzelle (TH0-Zelle) stattfindet. Kostimulatoren wie *Cluster of differentiation* (CD) 80, CD86 und OX40-Ligand sowie IL-4 sorgen für die Heranreifung der TH0-Zelle zu einer Typ2-T-Helferzelle (TH2-Zelle). Diese spielen in der allergischen Reaktion eine zentrale Rolle. Im Folgenden werden durch die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 durch die TH2-Zelle B-Zellen zu ihrer Umwandlung in Plasmazellen angeregt. Diese vollziehen dann einen Antikörperklassenwechsel zu IgE-Antikörpern, die spezifisch gegen das Allergen gerichtet sind.¹⁰ Da Mastzellen ebenso wie basophile Granulozyten einen Rezeptor für die gebildeten IgE-Antikörper aufweisen, binden diese daran und führen bei wiederholtem Allergenkontakt zu einer Quervernetzung, welche durch das Allergen selbst stabilisiert wird. Diese Quervernetzung führt im Weiteren zur kaskadenartigen Aktivierung der Zellen. Es beginnt mit der Ausschüttung von Heparin, Histamin, Tryptase, Chymase sowie dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) durch Mastzellen, in welchen die Stoffe in Form von Granula vorliegen. Im Folgenden wird, Sekunden bis Minuten nach Kontakt mit dem Allergen, die Obstruktion der Atemwege ausgelöst.¹¹ In der Entstehung einer chronischen Entzündung spielen hauptsächlich eosinophile Granulozyten und TH2-Zellen eine große Rolle. In ihnen werden Botenstoffe hergestellt, die unter anderem die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten.¹² Leukotriene und Prostaglandin D2 gehören zu den Lipidmediatoren. Sie sorgen für die Bereitstellung von Makrophagen, T-Zellen, Granulozyten sowie Mastzellen.⁹ IL-3 ist ein Zytokin, welches zur Proliferation und Differenzierung basophiler und eosinophiler Granulozyten und Mastzellen beiträgt. Außerdem wird durch IL-3 vermehrt Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), ebenfalls ein Zytokin, freigesetzt, welcher eine synergistische Wirkung entfaltet. IL-4, gebildet durch TH2-Zellen und Mastzellen, führt zu einer autokrinen positiven Rückkopplung, zur Stimulation von basophilen Granulozyten und zu einem

Antikörperklassenwechsel von B-Zellen zu IgE. An letzterem ist auch IL-13 maßgeblich beteiligt. IL-13 stimuliert außerdem die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) der Epithelzellen. Das erklärt den Anstieg des exhalierten Stickstoffmonoxid (eNO) in der Ausatemluft. Es führt auch zur vermehrten Schleimbildung und Kontraktion glatter Muskelzellen.⁷ Eine große Rolle bei der Differenzierung eosinophiler Granulozyten spielt auch IL-5. Die Mastzellproliferation wird in ähnlicher Weise durch TH2-Zellen und das von ihnen produzierte IL-9 gefördert. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird im Wesentlichen von Makrophagen produziert und trägt unter anderem zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten bei.¹³ Nicht nur Mastzellen, sondern auch basophile Granulozyten verursachen die Freisetzung von Histamin und Leukotrienen.¹⁴ Zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten tragen maßgeblich IL-5, IL-3 und GM-CSF bei. Infolgedessen kommt es zur Ausschüttung zytotoxischer Stoffe, darunter Sauerstoffradikale, Major Basic Protein (MBP), Eosinophilic Cationic Protein (ECP), Eosinophil-derived Neurotoxin (END) und Eosinophilic Peroxidase (EPO). Letzteres fördert wiederum die Bildung weiterer Sauerstoffradikale. Durch ECP wird die Mukussekretion angeregt sowie basophile Granulozyten und Mastzellen stimuliert. MBP löst weiterhin die Bronchokonstriktion aus. Diese wird außerdem durch eine Vielzahl der anderen Zytokine, Leukotrien C₄, Prostaglandin E₂ und Thromboxan A₂ unterstützt.¹⁵ Wenn naive T-Zellen einer Antigenpräsentation ausgesetzt werden und mit IL-4 in Kontakt kommen, können TH2-Zellen aus ihnen entstehen.¹⁶ Durch sie wird IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF ausgeschüttet, sodass sie gemeinsam mit den eosinophilen Granulozyten die Entzündung befördern.⁹ Da man in Sputen von Asthmatikern vermehrt TH17-Zellen nachweisen konnte, liegt der Verdacht nahe, dass sie ebenfalls an der entzündlichen Reaktion bei Asthma bronchiale beteiligt sind.¹⁷ Sie sezernieren neben TNF- α und IL-6 weitere Interleukine, die das Asthma aufrecht erhalten.¹⁸ Durch die Vielzahl der beteiligten Zellen und die durch sie produzierten Stoffe kommt es zu einer Inflammation, welche sich selbst aufrecht erhält. Kern des Geschehens ist dabei das Überwiegen der Rolle der TH2-Zellen im Vergleich zu den TH1-Zellen.¹³

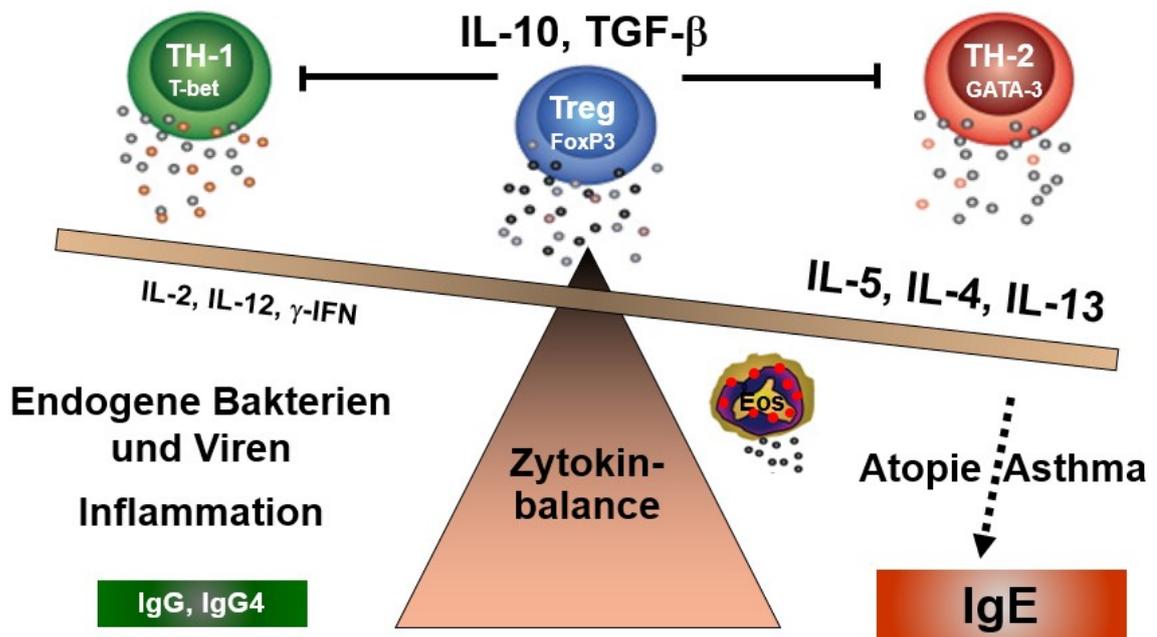


Abb. 2: TH-1/TH-2 Imbalance bei Allergie

Eine Untergruppe der CD4-tragenden T-Helferzellen sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs), die für die immunologische Toleranz unverzichtbar sind, indem sie Autoimmunität mindern. Etwa fünf bis zehn Prozent der CD4-T-Zellen sind Tregs. Sie unterscheiden sich von anderen T-Helferzellen unter anderem durch die vermehrte Produktion von Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3), welcher unter anderem an der Transkription des IL-2-Gens ansetzt und dessen Bildung hemmt. Tregs bilden außerdem Transforming growth factor beta (TGFβ), was eine hemmende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation haben kann. Mithilfe der Produktion von IL-10 können sie zusätzlich proinflammatorische Zytokine reduzieren. IL-10 hemmt nämlich antigenpräsentierende Zellen in ihrer Herstellung von IL-12 und IL-23, welche regulär die Entwicklung von TH1- und TH17-Zellen fördern. So kann es bei fehlerhaften Tregs sogar zu Autoimmunsyndromen kommen.¹⁹ Ihre Funktion lässt sich demnach als immunmodulierend beschreiben. Man kann außerdem zwischen naturally occurring Tregs (nTregs) und induzierbaren Tregs unterscheiden. Erstere entwickeln sich als Teil des normalen Immunsystems, letztere können als Reaktion auf Antigenexposition entstehen. Durch IL-10 und TGFβ können Tregs nicht nur TH2-Zellen hemmen, sondern auch Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten. Es konnte gezeigt werden, dass Asthma-Patienten eine

reduzierte Funktion ihrer Tregs aufweisen, was zum Überwiegen der TH2-Antwort beiträgt.²⁰

1.2. Therapie des Asthma bronchiale

Ziel der Asthmatherapie sollte sein, dass es gut kontrolliert ist und Patienten möglichst beschwerdefrei sind. Dazu zählen uneingeschränkte körperliche Belastung, Symptommfreiheit tagsüber sowie nachts und eine gute Lungenfunktion.²¹ In erster Linie sollte versucht werden, dass auslösende Allergen sowie andere Trigger zu meiden. Die Hyposensibilisierung ist eine Option für manche, ist jedoch nicht unumstritten. Für die medikamentöse Therapie orientiert man sich an einem fünfteiligen Stufenschema, das sich nach der Symptomatik der Patienten richtet. So sollte die Stufe bei unkontrolliertem Asthma erhöht, bei guter Asthmakontrolle gegebenenfalls reduziert werden. Bei Patienten aller Stufen werden kurzwirksame, inhalative β_2 -Sympathomimetika (SABA) als Bedarfsmedikation und inhalative Kortikosteroide (ICS) als Dauermedikation eingesetzt. Erstere erzielen eine kurzfristige Relaxation der glatten Muskelzellen in den Atemwegen, welche die Atmung erleichtern. Zweitere sollen in der langfristigen Behandlung die Entzündung der Atemwege mindern und den Einsatz der Bedarfsmedikation reduzieren. Weiterhin können Leukotrienantagonisten ab Stufe zwei, langwirksame β_2 -Sympathomimetika (LABA) ab Stufe drei und Anticholinergika ab Stufe vier in Erwägung gezogen werden. Ab Stufe fünf kann die Anwendung von Biologika von Vorteil sein.²²

Omalizumab war das erste Biologikum, das von der Food and Drug Administration zur Behandlung von Asthma zugelassen wurde. Es ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (mAB) gegen IgE und bindet dessen freies Fc-Fragment.²³ Dadurch wird die Aktivierung von Mastzellen unterbunden und ihre Ausschüttung von Botenstoffen wie Leukotrien, Histamin und Interleukinen reduziert. Ebenso wird die Bindung von IgE an Basophile, Eosinophile sowie dendritische Zellen verhindert. Durch diesen Mechanismus wird das freie IgE im Serum reduziert und dadurch die allergeninduzierte Früh- und Spätreaktion begrenzt.²⁴ Zugelassen ist das Medikament für die subkutane Anwendung bei Patienten ab sechs Jahren bei schwerem allergischem Asthma bronchiale. Sie sollten einen positiven Prick-Test oder ein allergen-spezifisches

IgE gegen ein ganzjähriges Aeroallergen aufweisen und die Symptome sollten unter ICS noch nicht kontrolliert sein.²³ Exazerbationen und Hospitalisierung konnten bei Patienten unter Einnahme von Omalizumab reduziert werden. Außerdem verbesserte sich ihre Lebensqualität und Lungenfunktion.²⁵ Bei 0,1 bis 0,2% der behandelten Patienten kam es zu einer Anaphylaxie, meist innerhalb der ersten drei Dosen. Daraufhin stattete man die Patienten mit Adrenalin-Autoinjektoren aus oder verabreichte das Medikament bis zur vierten Dosis in einer Klinik. Die Dosis basiert auf Körpergewicht und Gesamt-IgE der Patienten und beträgt 75 bis 375 mg alle zwei bis vier Wochen. Hierbei spiegelt das Gesamt-IgE allerdings nicht den Therapieerfolg wider.²³ Größere Exazerbationsreduktionen wurden bei Patienten mit hohem fraktioniertem exhaliertem Stickstoffmonoxid (FeNO) und hohen Eosinophilen im Blut beobachtet.²⁶ Ob ein Glucocorticoid-sparender Effekt vorhanden ist, ist bisher unklar.²³

Mepolizumab, Reslizumab und Benralizumab sind ebenfalls humanisierte mAB. Die beiden erst genannten binden IL-5, welches in der Regel an den IL-5-Rezeptor auf Eosinophilen und Basophilen bindet. Benralizumab bindet direkt an diesen Rezeptor und induziert darüber die Apoptose der betroffenen Zelle. Den drei Antikörpern ist gemein, dass sie zur Behandlung von schwerem eosinophilem Asthma zugelassen sind.²³ Sie verbessern die Lebensqualität Betroffener und reduzieren Exazerbationen.²⁷ Da die Anzahl der Eosinophilen reduziert wird, steigt die Wahrscheinlichkeit für Wurmerkrankungen.²³ Die Eosinophilie im Blut ist der beste Prädiktor für ein gutes Ansprechen auf diese Medikamente.²⁸ Für Mepolizumab und Benralizumab konnte außerdem gezeigt werden, dass der Bedarf an oralen Glucocorticoiden sinkt.²⁹ Mepolizumab reduzierte zudem die Anzahl der Hospitalisierungen. Es kann, wie unter Behandlung mit Reslizumab, zu Atemwegsinfekten, Kopfschmerzen oder einer Verschlechterung des Asthmas kommen. Außerdem wurden drei Fälle von Anaphylaxie beschrieben. Benralizumab konnte neben der Unterdrückung der Eosinophilen im Blut die Eosinophilen im Sputum um über 90% reduzieren. Außerdem verbesserte sich die Einsekundenkapazität (FEV₁) der Behandelten.²³ Dupilumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der an den IL-4-Rezeptor auf hämatopoetischen Zellen, Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen bindet.

Dadurch wird der IL-4- und IL-13-Signalweg inhibiert, welche diesen Rezeptor gemeinsam haben. Der Signalweg ist wichtig für die Bildung von TH2-Zellen und den Antikörperklassenwechsel von B-Zellen zu IgE.²³ Auch mit diesem Medikament konnten Exazerbationen, Hospitalisierungen sowie der Bedarf an oralen Glucocorticoiden reduziert werden. FEV₁ und die Lebensqualität der Patienten besserten sich.³⁰ Hohe Eosinophile im Blut und hohe FeNO-Werte waren Prädiktoren für ein gutes Ansprechen auf das Medikament. Bei circa 15% der Patienten kam es zu Reaktionen an der Injektionsstelle, bei 4-25% zu einer Hypereosinophilie, die meist asymptomatisch verlief. Vereinzelt wurden auch Granulomatosen mit Polyangiitis beschrieben. Da Dupilumab auch für Neurodermitis und chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolyposis zugelassen ist, kann es eine geeignete Behandlung für Patienten mit entsprechenden Komorbiditäten darstellen.²³

Tezepelumab ist ebenfalls ein humaner mAB gegen das Zytokin TSLP, welches die Bildung von TH2-Zellen fördert.²³ Exazerbationen, Eosinophile in Blut und Atemwegen, FeNO und Gesamt-IgE konnten bei Betroffenen reduziert werden.³¹ Verbessert haben sich auch ihre Lungenfunktion und Lebensqualität. Als Nebenwirkungen wurden Pharyngitis, Arthralgie und Rückenschmerzen beschrieben.²³

1.3. Tregalizumab

Tregalizumab ist ein monoklonaler IgG-Antikörper mit immunmodulatorischer Wirkung und wird auch als BT-061 bezeichnet. Er bindet an die Domäne 2 von CD4 und aktiviert regulatorische T-Zellen.³² Im Gegensatz zu anderen anti-CD4 mAB werden durch Tregalizumab nicht vermehrt proinflammatorische Zytokine freigesetzt. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Phosphorylierung von Signalmolekülen, die durch Tregalizumab aktiviert wurden, von denen anderer Antikörper unterscheidet. Im Vergleich zu Muromonab-CD3 (OKT3) finden ähnliche Phosphorylierungen an *lymphocyte kinase* (Lck), Phospholipase C γ (PLC- γ) und *lymphocyte cytosolic protein 2* (SLP-76) statt. Eine weniger starke Phosphorylierung lässt sich hingegen bei *cytoplasmic SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase* (SHP-2), *Zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP70), *linker for activation of T cells* (LAT), *mitogen-activated protein kinase*

(MAPK), MAPK kinase (MEK) und *proline-rich tyrosine kinase 2* (PyK2) feststellen. Außerdem ist die Phosphorylierung von kürzerer Dauer im Vergleich zu anderen anti-CD4 Antikörpern. Ein weiterer Unterschied ist die fehlende Phosphorylierung von *interleukin-2-inducible T-cell kinase* (ItK), Proteinkinase B (PKB), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun amino-terminal kinase* (JNK), Proteinkinase C (PKC), I κ B Kinase (IKK) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). So wird erreicht, dass der auf das Immunsystem unterdrückend wirkende Effekt von Tregs verstärkt wird. Eine quantitative Vermehrung von Tregs wird dadurch nicht erreicht, jedoch eine vermehrte Sekretion von TGF β und latency-associated peptide (LAP), welche gemeinsam ein Homodimer bilden. Die Aktivierung lässt sich unter anderem an der vermehrten Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Tregs feststellen. Daher hat Tregalizumab das Potential, in der Behandlung von Krankheiten mit autoimmunem Geschehen wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis und auch Asthma bronchiale, zum Einsatz zu kommen.³³

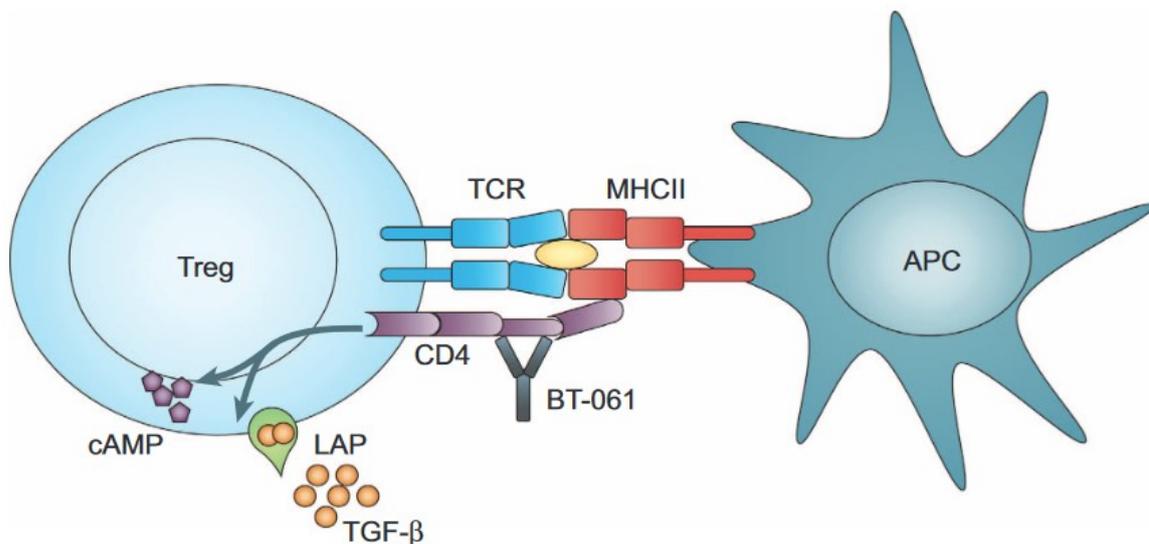


Abb. 3: Tregalizumab (BT-061) aktiviert Treg in vitro.³⁴

1.4. Zielsetzung

Da inzwischen viel zum Signalweg der Pathogenese von Asthma bronchiale aufgrund von HSM-Allergie bekannt ist, sollte man sich dieses Wissen zunutze machen, um an besseren und geeigneteren Medikamenten zur Therapie von Asthma bronchiale zu forschen. Außerdem kann man mithilfe der Informationen geeignete Parameter zur Beurteilung der Wirksamkeit festlegen. Tregalizumab

zeigte bisher, dass es in den bekannten Signalweg eingreifen kann und sollte daher als Therapieoption weiter untersucht werden. Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Wirkung von 100 mg Tregalizumab bei wöchentlicher Verabreichung als subkutane Injektion über zwölf Wochen an Patienten mit leichtem, kontrolliertem allergischem Asthma und HSM-Allergie. In dieser Arbeit soll im induzierten Sputum der Patienten die Gesamtzellzahl sowie die Anteile der Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und Lymphozyten betrachtet und in der Verum- und Placebogruppe gegenübergestellt werden. Die Quantifizierung verschiedener Zytokine sowie deren Genexpression im Sputum wird um die Werte der Zytokine im Blut ergänzt. Anhand dessen wird die systemische und pulmonale Entzündungsaktivität der Patienten beurteilt und die Wirkung von Tregalizumab bei ihnen bewertet.

2. Patienten und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Es wurden 42 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon je 21 in der Gruppe Placebo bzw. Verum. In der Verumgruppe kam es zu einem Drop-out.

Tab. 1: Probandencharakteristika

Parameter	Placebo (Median, Range)	Verum (Median, Range)
Anzahl Probanden	21	20
Alter Probanden (Jahre)	22 (18-30)	25 (19-32)
Geschlecht (m/w)	7/14	6/14
FVC (%)	102,4 (80-119)	105 (88,6-118)
FEV ₁ (%)	100,7 (81-110,1)	91,8 (77,2-108,2)
FEV ₁ /VC	83,6 (70,96-91,86)	76,88 (69,91-85,58)
eNO (ppb)	21 (5-86)	19 (10-108)
Methacholintest (mg)	0,39 (0,034-1,7)	0,51 (0,01-1,47)
Total IgE (IU/ml)	223 (13-1729)	166 (4-1971)
sIgE _{D. farinae} (IU/ml)	27,5 (2,66-92,3)	20,6 (0,57-100)
sIgE _{D. pteronyssinus} (IU/ml)	20,35 (4,2-93,5)	15,7 (1,21-100)

Einschlusskriterien:

Gewillt und in der Lage eine schriftliche Einwilligungserklärung nach erfolgter Aufklärung zu geben.

Männer oder Frauen im Alter von 18 bis 65 Jahren (jeweils einschließlich).

Bestehende Diagnose von leichtem kontrolliertem allergischem Asthma (GINA 2019) und Vorgeschichte von allergischem Asthma bronchiale seit mindestens einem Jahr.

Body-Mass-Index von 18,0 bis 30,0 (jeweils einschließlich).

Nichtraucher (alle Substanzen).

Spezifisches IgE für HSM > Klasse 2 im Radio-Allergo-Sorbent-Test.

Bronchiale Hyperreagibilität (d. h. Abfall der FEV₁ von mindestens 20%) gemessen mittels Methacholintest.

FEV₁ ≥ 75 % des Sollwerts (für Körpergröße, Körpergewicht und Geschlecht).

Der Proband muss innerhalb der ersten sieben Stunden nach der bronchialen Allergenprovokation (BAP) eine signifikante *early asthmatic response* (EAR) und *late asthmatic response* (LAR) ohne Anwendung der Bedarfsmedikation aufweisen. Eine EAR ist definiert als Abfall der FEV₁ von ≥ 20 % innerhalb von null bis drei Stunden nach der Allergenprovokation; eine LAR ist definiert als Abfall der FEV₁ von ≥ 15 % innerhalb von vier bis sieben Stunden nach der BAP. Keine klinisch relevanten Auffälligkeiten im 12-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) bei der Voruntersuchung.

Ausschlusskriterien

Schweres, instabiles Asthma bronchiale.

Asthma-Exazerbation ≤ vier Wochen vor der Voruntersuchung.

Behandlung mit parenteralen und oralen Corticosteroiden sechs Wochen vor der Voruntersuchung und während der Studie.

Behandlung mit ICS, Methylxanthinen (zum Beispiel Theophyllin), Anticholinergika (zum Beispiel Ipratropiumbromid), Leukotrienrezeptor-Antagonisten (zum Beispiel Montelukast), Tiotropiumbromid, Cromolyn oder Nedocromil innerhalb von zwei Wochen vor der Voruntersuchung und während der Studie.

Derzeitige Behandlung mit Immunsuppressiva (zum Beispiel mAB, Methotrexat, Cyclosporin).

Spezifische Immuntherapie gegen Milbenallergie innerhalb von drei Jahren vor der Voruntersuchung.

Schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkung einer früheren biologischen Therapie.

Frühere Therapie mit einem gegen CD4 gerichteten mAB, einschließlich Tregalizumab.

Bekannte Überempfindlichkeit gegenüber Inhaltsstoffen von Tregalizumab und/oder anderen mAB, die nach Einschätzung des Prüfarztes oder des medizinischen Monitors eine Kontraindikation für eine Teilnahme darstellt.

Vorheriger Einschluss in diese Studie.

Serumtransaminasen, Alanin-Transaminase und/oder Aspartat-Transaminase > 2,5-mal oberer Normwert (ULN) bei der Voruntersuchung.

Bilirubin > 34,2 µmol/l bei der Voruntersuchung.

Alkalische Phosphatase > 2-mal ULN bei der Voruntersuchung.

Harnstoff-Stickstoff > 1,5-mal ULN bei der Voruntersuchung.

Niereninsuffizienz, das heißt Kreatininspiegel > 133 µmol/l bei der Voruntersuchung.

Vorgeschichte einer schweren allergischen oder anaphylaktischen Reaktion auf Proteine humanen Ursprungs (zum Beispiel Impfreaktion, Reaktion auf eine biologische Therapie).

Vorliegen oder Vorgeschichte einer bösartigen Erkrankung innerhalb der vergangenen fünf Jahre (ausgenommen vollständig reseziertes Plattenepithel- oder Basalzellkarzinom der Haut).

Vorliegen oder Vorgeschichte einer klinisch signifikanten schweren Krankheit (zum Beispiel schwere Herz-/Lungenerkrankung mit *New York Heart Association* (NYHA)-Klasse \geq drei, Autoimmunerkrankung [ausgenommen rheumatoide Arthritis], akute unkontrollierte Hyper- oder Hypothyreose, schwere unkontrollierte Hypo- oder Hypertonie).

Schwerwiegende lokale (zum Beispiel Abszess) oder systemische (zum Beispiel Pneumonie, Sepsis) Infektion oder rezidivierende chronische Infektionen innerhalb von sechs Wochen vor dem Voruntersuchungstermin oder während der Voruntersuchungsphase.

Jegliche Infektion, die eine Antibiotikatherapie (unabhängig vom Verabreichungsweg) erforderlich macht, innerhalb von vier Wochen vor der Voruntersuchung.

Impfung mit Lebendimpfstoffen, attenuierten Lebendimpfstoffen und/oder Totimpfstoffen in den zwölf Wochen vor der ersten Verabreichung des Prüfpräparats und während der Studie, ausgenommen COVID-19-Impfstoffe.

Positive Diagnose von akuten oder chronischen Infektionen (zum Beispiel Hepatitis-C-Virus, Hepatitis-B-Virus, Humanes Immundefizienz-Virus) bei der Voruntersuchung oder Vorgeschichte einer früheren chronischen Infektion.

Akute oder klinisch symptomatische Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (infektiöse Mononukleose) oder Zytomegalievirus.

Vorliegen oder Vorgeschichte einer latenten oder aktiven Tuberkulose.

Bekannte Immundefizienz.

Vorliegen oder Vorgeschichte einer lymphoproliferativen Erkrankung, einschließlich

Lymphom und Lymphadenopathie.

Vorliegen oder Vorgeschichte von klinisch signifikantem Drogen- oder Alkoholmissbrauch.

Mitarbeiter des Prüfzentrums oder einer an dieser Studie beteiligten Einrichtung (einschließlich des Sponsors) oder Ehepartner/Partner oder Angehöriger eines Prüfarztes.

Schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die vorhaben, während der Studie

oder in den drei Monaten nach der letzten Verabreichung des Prüfpräparats schwanger zu werden.

Gebärfähige Frauen (sofern nicht chirurgisch sterilisiert oder postmenopausal seit > 52 Wochen), die während der Studie und für mindestens drei Monate nach der letzten Verabreichung des Prüfpräparats nicht zwei unabhängige wirksame Verhütungsmethoden (zum Beispiel orale oder injizierte Verhütungsmittel, Intrauterinpressare, doppelte Barrieremethode, Verhütungspflaster oder Sterilisation der Frau) anwenden

ODER

Nicht-vasektomierte Männer, die während der Studie und für mindestens drei Monate nach der letzten Verabreichung des Prüfpräparats nicht zwei unabhängige

wirksame Verhütungsmethoden (wie oben angegeben) anwenden oder vorhaben,

Samen zu spenden.

Blutspende innerhalb von 30 Tagen vor der Voruntersuchung bis zum Studienende.

Teilnahme an einer anderen klinischen Studie innerhalb von 90 Tagen vor der Voruntersuchung oder während der Studie.

Unfähigkeit oder fehlende Motivation, die Studienanforderungen zu befolgen und den Ablaufplan der Studie einzuhalten.

Inhaftierung oder Unterbringung in einer Anstalt (AMG § 40 (1), Satz 4).

2.2. Studiendesign

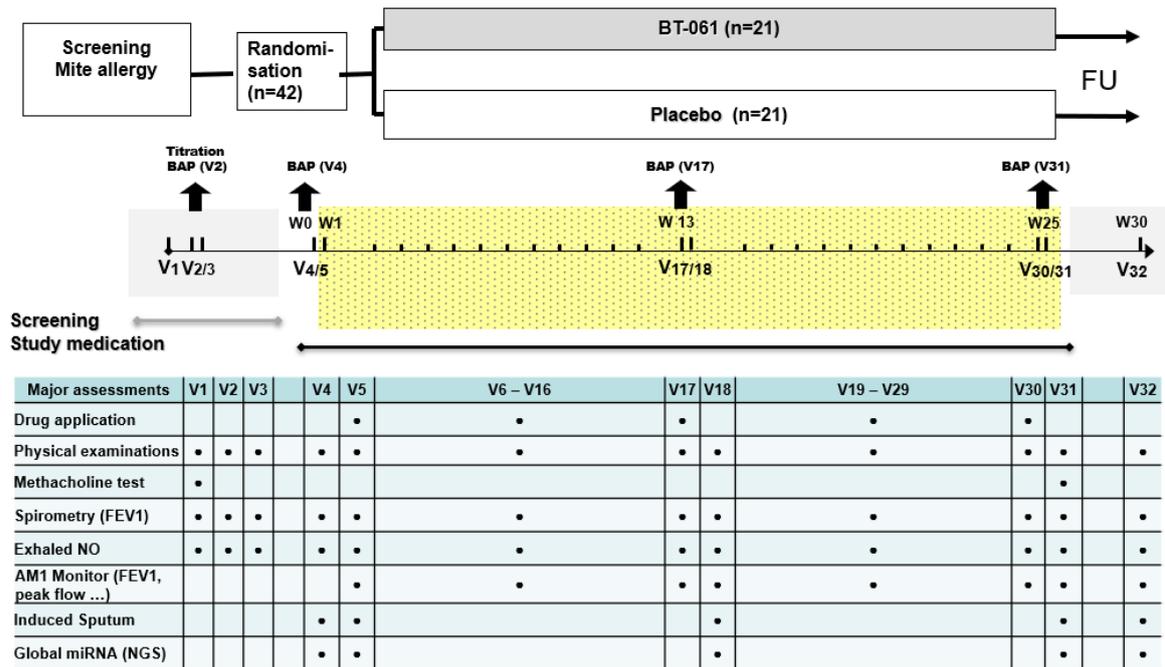


Abb. 4: Ablaufplan

Es handelte sich um eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte, monozentrische Studie bei erwachsenen Patienten mit leichtem kontrolliertem allergischem Asthma und Hausstaubmilbenallergie. Diese Studie umfasste eine Voruntersuchungsphase (Visiten V1 bis V4), eine Behandlungsphase (Visiten V5 bis V16) und eine Nachbeobachtungsphase (Visiten V17 bis V19). Die Patienten wurden innerhalb von elf Wochen vor der ersten Verabreichung des Prüfpräparats hinsichtlich ihrer Eignung voruntersucht. Zur Beurteilung der asthmatischen Reaktion vor und nach der Behandlung erfolgte eine BAP mit Milbenallergen. Die BAP zur Erfassung der Ausgangswerte wurde bei Visite V4 durchgeführt und die BAP nach der Behandlung erfolgte bei Visite V17. Die Provokationsdosis, bei der sich ein Abfall der FEV₁ von mindestens 20% ergibt, wurde bei Visite V2 bestimmt. Nach jeder BAP wurden die Studienteilnehmer im Hinblick auf klinische Asthma-bezogene Anzeichen und Symptome überwacht. Darüber hinaus wurden mindestens neun Stunden lang stündlich FEV₁-Messungen durchgeführt. Bei Visite V2 erhielten die Studienteilnehmer ein Gerät zur Asthmaüberwachung, das bis zum Studienende verwendet wurde. Der *Peak Flow*, der FEV₁-Wert und die Anwendung der Bedarfsmedikation wurden vom

Prüfarzt bei jeder Visite des Studienteilnehmers dokumentiert und überwacht. Die Studienteilnehmer wurden in zwei parallele Behandlungsgruppen randomisiert. Jeder Studienteilnehmer erhielt zwölf Wochen lang einmal wöchentlich entweder das Prüfpräparat (Tregalizumab) oder das Vergleichspräparat (Placebo, d. h. den Tregalizumab-Formulierungspuffer) als subkutane Injektion. Die erste Verabreichung erfolgte an Tag eins (Visite V5). Das Prüfpräparat wurde in wiederholten Einzeldosen von jeweils 100 mg verabreicht. Die Studienteilnehmer wurden bis fünf Wochen nach der letzten Verabreichung der Behandlung nachbeobachtet. Bei den Visiten V5, V6, V10, V16, V17 und V19 wurden Blutproben für die Bestimmung von Tregalizumab im Serum entnommen. Die Sputuminduktion erfolgte an den Visiten V5, V16 und V18.

2.3. Lungenfunktionsuntersuchung

Mithilfe der Spirometrie wurde die Lungenfunktion der Patienten untersucht. Zunächst wurde den Patienten der Ablauf der Untersuchung beschrieben und demonstriert. Sie wurden instruiert, aufrecht zu sitzen sowie den Kopf leicht zu reclinieren. Während der Untersuchung wurde eine Nasenklammer getragen. Die Probanden wurden aufgefordert, das Mundstück mit den Lippen fest zu umschließen. Nach einigen ruhigen Atemzügen sollte der Proband langsam maximal ausatmen. Im Anschluss erfolgte eine rasche vollständige Inspiration, um die Inspiratorische Vitalkapazität zu ermitteln. Dann sollte ohne Pause forciert und maximal bis zum Residualvolumen-Niveau ausgeatmet werden. Um das Residualvolumen zu erreichen, musste so lange wie möglich ausgeatmet werden. Wenn der Proband die beschriebenen Lungenvolumina nicht erreichte, wurde die Lungenfunktionsprüfung wiederholt. Um Schwankungen zu vermeiden, wurden die Messungen an den jeweiligen Visiten möglichst zum gleichen Zeitpunkt und am selben Spirometer durchgeführt. Es wurden mindestens drei Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt und im Anschluss das beste Ergebnis verwertet (FEV₁ mit dem größten Wert). Probanden, deren FEV₁ unter 80% des Sollwertes lag, wurden von der Studie ausgeschlossen.³⁵

2.4. Exhalierendes Stickstoffmonoxid

Das eNO wurde durch das Gerät NIOX VERO® (Aerocrine, Solna, Schweden) ermittelt. Die Probanden inhalierten bis zum Erreichen der Totalen Lungenkapazität die gefilterte Luft aus dem Gerät und anschließend sollte möglichst langsam und bei konstantem Fluss ohne Absetzen des Mundstücks über einen Zeitraum von zehn Sekunden in das Gerät ausgeatmet werden. Dies wurde mit einer visuellen Grafik zur Erleichterung begleitet. Durch Ermittlung eines Plateau-Wertes wird der NO-Wert unter Berücksichtigung der American Thoracic Society-Kriterien vom Gerät vollautomatisch berechnet. Vor der ersten spirometrischen Untersuchung sollte die eNO-Messung durchgeführt werden, da es sonst zu falsch-niedrigen eNO-Werten kommen kann.³⁶

2.5. Sputuminduktion

Vor dem Induzieren des Sputums wurde der FEV₁-Wert der Patienten bestimmt. Es wurde dabei der höchste Wert aus drei Versuchen gewertet. Im Anschluss inhalierten die Patienten 400 µg Salbutamol. Währenddessen wurden 10 ml 3%ige hypertone Natriumchlorid-Lösung in den Ultraschallvernebler (OMRON NE-U17, OMRON HEALTHCARE Co., GER) gegeben. Das Nebulisationsvolumen und der Luftfluss des Verneblers waren auf sieben eingestellt. Die Patienten wurden gebeten, durch das Mundstück sieben Minuten lang tief ein- und auszuatmen und währenddessen nach jedem Einatmen den Atem für circa drei bis fünf Sekunden anzuhalten. So wurde die Produktion von Sputum angeregt. Die Nase war während der Inhalation mit einer Nasenklammer verschlossen. Um den Anteil an squamösen Zellen und an Nasensekret zu reduzieren, wuschen sich die Patienten danach den Mund aus und reinigten die Nase. Daraufhin sollte versucht werden, Sputum durch tiefes Husten in eine Petrischale zu husten. Falls bei der anschließenden FEV₁-Messung der Wert um mehr als 20% vom Ausgangswert abfiel oder andere signifikante Beschwerden auftraten, wurde die Verneblung beendet und Salbutamol verabreicht. Wenn nicht ausreichend Sputum gewonnen wurde, wurde die siebenminütige Inhalation mit jeweils 10 ml 4%iger und 5%iger hypertoner Natriumchlorid-Lösung wiederholt. Das Nebulisationsvolumen und der Luftfluss des Verneblers wurden auf zehn erhöht, sofern nach der Inhalation mit 4%iger Natriumchlorid-Lösung

noch kein Sputum gewonnen wurde. Die Petrischale wurde vor, während und nach der Sputuminduktion auf Eis gelagert, um Zellsterben und Proteindegeneration zu reduzieren. Das Sputum wurde innerhalb von zwei Stunden nach Gewinnung aufbereitet.

2.6. Aufarbeitung der Sputumprobe

Die Sputum-Plugs wurden möglichst ohne Saliva mittels Impföse und Eppendorf-Pipette in ein leeres, vorgewogenes Polypropylen 50 ml Falcon-Röhrchen mit Schraubdeckel transferiert und ausgewogen. Das Gewicht des leeren Falcon-Röhrchens wurde vom Gesamtgewicht des Röhrchens mit Sputum abgezogen, um das Gewicht der selektierten Sputum-Plugs zu erhalten. Hinzu wurde die vierfache Menge 0,1%ige Dithiotreitol-Lösung gegeben. Durch vorsichtiges Aspirieren mit einer Pipette wurden die Sputum-Plugs gelöst und für 15 Sekunden gevortext. Die Mischung wurde 15 Minuten auf Eis auf einem Schüttler inkubiert. Es wurde die zweifache Menge des Sputumgewichts *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) hinzugefügt und die Probe für 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurde alles über einen 70 µm Filter (Falcon 70 µm Nylon Filter, Corning Inc., Corning, USA) in ein weiteres vorgewogenes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieser Filter wurde zuvor mit DPBS angefeuchtet. Anhand des Gewichts des leeren Röhrchens und des Gesamtgewichts des Röhrchens mit Filtrat wurde das Gewicht des Filtrats ermittelt. Die Gesamtzellzahl und die Vitalität der Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit der Trypan-Blau-Methode bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau vermischt und in der Zählkammer innerhalb von fünf Minuten gezählt. Hierbei wurden alle vier Quadranten berücksichtigt. Es wurde zwischen lebenden Leukozyten, toten Leukozyten und squamösen Zellen unterschieden. Der Durchschnittswert pro Quadrant wurde berechnet sowie der prozentuale Anteil von lebenden und squamösen Zellen. Das Filtrat wurde bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für zehn Minuten bei 4°C während der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer zentrifugiert (Kühlzentrifuge Minifuge RF, Heraeus, Hanau, GER), um einen Zell- und Ablagerungsfreien Überstand zu erhalten. Dieser Überstand wurde vorsichtig entnommen und auf vier Mikroreaktionsgefäße mit je mindestens 200 µl Überstand aufgeteilt. Diese

wurden mit Studienname, Visite und Patientenummer beschriftet und umgehend bei -80°C gelagert (80°C Gefrierschrank Forma 900 Series, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Zellsuspension wurde auf $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Zuerst wurden 0,5 bis 1,0 ml DPBS auf das Pellet gegeben, um es zu resuspendieren und danach auf das finale Volumen aufgefüllt. Hiermit wurden zwei Zytospin-Präparate hergestellt. Nach Entnahme der Zellen für die Zytospin-Präparate wurde die restliche Zellsuspension bei 2000 rpm für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 300 μl *RNA Protect Cell Reagent* auf die Zellen pipettiert und die Probe gevortext. Sie wurde in ein beschriftetes Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Falls mehr als 10×10^6 Zellen vorhanden waren, wurde die Menge an *RNA Protect Cell Reagent* individuell angepasst und die Probe auf mehrere Gefäße aufgeteilt. Es wurde eine Exceltabelle geführt mit Angabe der jeweiligen Patientenummer, der zugehörigen Visite, der nativen Gesamtzellzahl, dem Resuspensionsvolumen nach Aufarbeitung, der eingefrorenen Zellzahl und dem Anteil an Plattenepithel in der Zählkammer.

2.7. Herstellung der Zytospins und Zelldifferenzierung

Für die Herstellung des ersten Zytospin-Präparats wurden 100 μl der Zellsuspension verwendet. Der Objektträger wurde beschriftet und anschließend für sechs Minuten bei 450 rpm zentrifugiert (Shandon CytoSpin 3, Shandon, Waltham, USA) und die Zelldichte unter dem Mikroskop (DME Mikroskop, Leica, Buffalo, USA) beurteilt. Wiesen die Objektträger eine gute Zelldichte auf, wurde das zweite Zytospin-Präparat ebenfalls mit 100 μl Zellsuspension angefertigt. War die Zelldichte zu hoch, wurde das Verfahren mit 75 μl wiederholt, war sie zu niedrig, wurden 120 μl verwendet. Die visuelle Qualitätskontrolle, welche Zelldichte, groben Anteil der squamösen Zellen sowie eventuelle Besonderheiten beinhaltete, wurde ebenfalls in der Exceltabelle vermerkt. Die Objektträger wurden für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für zehn Minuten in Methanol fixiert. Die fixierten Objektträger wurden mittels Pappenheim-Färbung gefärbt. Für acht Minuten wurden sie mit May-Grünwald-Lösung gefärbt, mit Leitungswasser abgespült und daraufhin für

35 Minuten mit Giemsa-Lösung gefärbt. Sie wurden ein weiteres Mal kurz unter Leitungswasser gespült, an der Luft getrocknet und mit Eukitt und Deckgläschen abgedeckt. Nach Fertigstellung der beiden Präparate wurde die Zytologie mithilfe des Leucodiff 800 plus (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA) durchgeführt. Es wurden 400 Zellen beurteilt und anhand dessen die prozentuale Zellverteilung ermittelt. Dabei wurden Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, segmentkernige Granulozyten sowie stabkernige Granulozyten erfasst.

2.8. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Zytokine IL-5, IL-10, IL-13, Interferon- γ (IFN- γ), TGF β , und die Transkriptionsfaktoren FoxP3, GATA binding protein 3 (GATA3) und T-box expressed in T cells (T-bet) aus den Zellen des induzierten Sputums wurden mittels TaqMan qPCR (TaqMan® Advanced mRNA Assays; Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Die miR-24-3p wird aufgrund der geringen Varianz und der hohen Abundanz gegenüber den Kontrollproben als endogene Kontrolle verwendet. Um die Zellen der Probe zu stabilisieren, wurden sie mit RNA Protect Cell Reagent versetzt. Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) wurde mit dem Qiagen-RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Konzentration der RNA wird anschließend mittels Nanodrop Lite Spektrometrie (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) und die RNA-Integrität (RIN) mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit und dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Carla, CA, USA) bestimmt. Die Präparation der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgt durch Verlängerung von 5 ng transfer-RNA (tRNA) am 3'-Ende der reifen Transkripte durch Poly(A)-Addition. Danach wird das 5'-Ende durch Adaptor-Ligation verlängert und es folgt eine universelle reverse Transkription und Amplifikation mit dem TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit in dem Thermocycler (GeneAmp Cycler PCR Systems 9700 v3.12., Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland). Das Thermocycler-Programm der Reverse Transkriptase (RT)-Zyklen wird gemäß der Beschreibung des Herstellers programmiert. Für die qPCR werden 5 μ L 1:10 (v:v, in TE-Puffer) verdünnte cDNA zu den Oligonukleotiden gegeben. Die qPCR wird mit dem StepOnePlus Real-Time PCR

System und der StepOnePlus™ Software (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels 2- $\Delta\Delta$ Ct-Methode in der Expression Suite Software v1.1 (Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland). Bei der qRT-PCR wird zunächst in Echtzeit die Produktakkumulation gemessen, sodass die exponentielle Phase der Reaktion identifiziert werden kann. Sie wird dann genutzt, um die Template-Menge relativ zu quantifizieren. Dies geschieht mithilfe von Fluoreszenzlicht, welches sich je nach Menge des Produkts unterschiedet. Zur Quantifizierung der Transkripte durch qRT-PCR wurde das Eppendorf realplex S Detektions-System (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) verwendet. Als qRT-PCR-Primer dienten Oligonukleotide, die durch das Programm „Basic Local Alignment Search Tool“ des National Institute of Health erstellt wurden. So wurden im induzierten Sputum die qRT-PCR von IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ , TGF β , FoxP3, GATA3 und T-bet untersucht.

2.9. Cytometric Bead Array

Um die Zytokine im Überstand des Sputums zu bestimmen, wurde die Cytometric Bead Array (CBA) Methode verwendet (BD Biosciences-PharMingen, San Diego, CA, USA). Dabei werden fluoreszenz-markierte Partikel („beads“) durchflusszytometrisch analysiert. Die Unterscheidung der Partikel erfolgt anhand der Intensität der Fluoreszenz und wird in der Einheit Mean Fluorescence Intensity (MFI) gemessen. An den Oberflächen der Beads befinden sich Antikörper, die an jeweils ein bestimmtes Zytokin binden. Nach Bindung des Antikörpers an das Zytokin kann ein zweiter Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, binden. Eine Waschung entfernt ungebundene Antikörper. Es folgt die durchflusszytometrische Analyse der Beads. Die Konzentration der Zytokine konnte mithilfe der MFI interpretiert werden, welche mit steigender Menge an gebundenem Zytokin ebenfalls größer wird. Verschiedene Zytokine können mithilfe unterschiedlicher Kombinationen und Konzentrationen von Fluoreszenzfarbstoffen der Beads unterschieden werden. Die Analyse der Zytokine und Chemokine IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α im Blut sowie IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ und TGF β im induzierten Sputum erfolgte mittels dem BD FACSVerser Durchflusszytometer und die Auswertung

der Daten erfolgte mithilfe der FCAP Array Software v3.0 (BD Biosciences-PharMingen, San Diego, CA, USA).

2.10. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Softwareprogramm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) verwendet. Die Daten sind als Median und Range dargestellt. Die Analyse der Werte im Visitenverlauf innerhalb der Gruppen erfolgte mittels One-way ANOVA. Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Zelldifferenzierung des induzierten Sputums

Eosinophile Granulozyten

Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten zeigte sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe zwischen Visite V5 und Visite V16 einen signifikanten Abfall (Verum: V5 51,5%, 6-85,5%; $p < 0,05$. Placebo: V5 29%, 9-82%; V16 6%, 0,0-55%; $p < 0,05$). An V18 konnte ein signifikanter Anstieg nach Provokation im Vergleich zu V16 in der Placebogruppe beobachtet werden (Placebo: V16 6%, 0,0-55%; V18 23,5% 1-62%; $p < 0,01$), während in der Verumgruppe der Anstieg das Signifikanzniveau verfehlte (siehe Abb. 5b).

Alveolarmakrophagen

Die Provokation (V5 und V16) führte in beiden Gruppen zu einem prozentualen Abfall der Alveolarmakrophagen (siehe Abb. 5d). Während der Anteil der Alveolarmakrophagen in der Placebogruppe über die Visiten nur leicht variierte, konnte in der Verumgruppe ein signifikanter Anstieg von V5 zu V16 festgestellt werden (Verum: V5 26,5%, 14-58%; V16 53,5%, 12,5-79%; $p < 0,01$) (siehe Abb. 5d).

Neutrophile Granulozyten

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten im induzierten Sputum wies keine signifikante Veränderung im Visitenverlauf und zwischen beiden Gruppen auf (siehe Abb. 5c).

Lymphozyten

Im Lymphozytenanteil ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sowie im Studienverlauf feststellen (siehe Abb. 5e).

Basophile Granulozyten

Es fanden sich nur vereinzelte basophile Zellen in der Sputumauszählung und keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

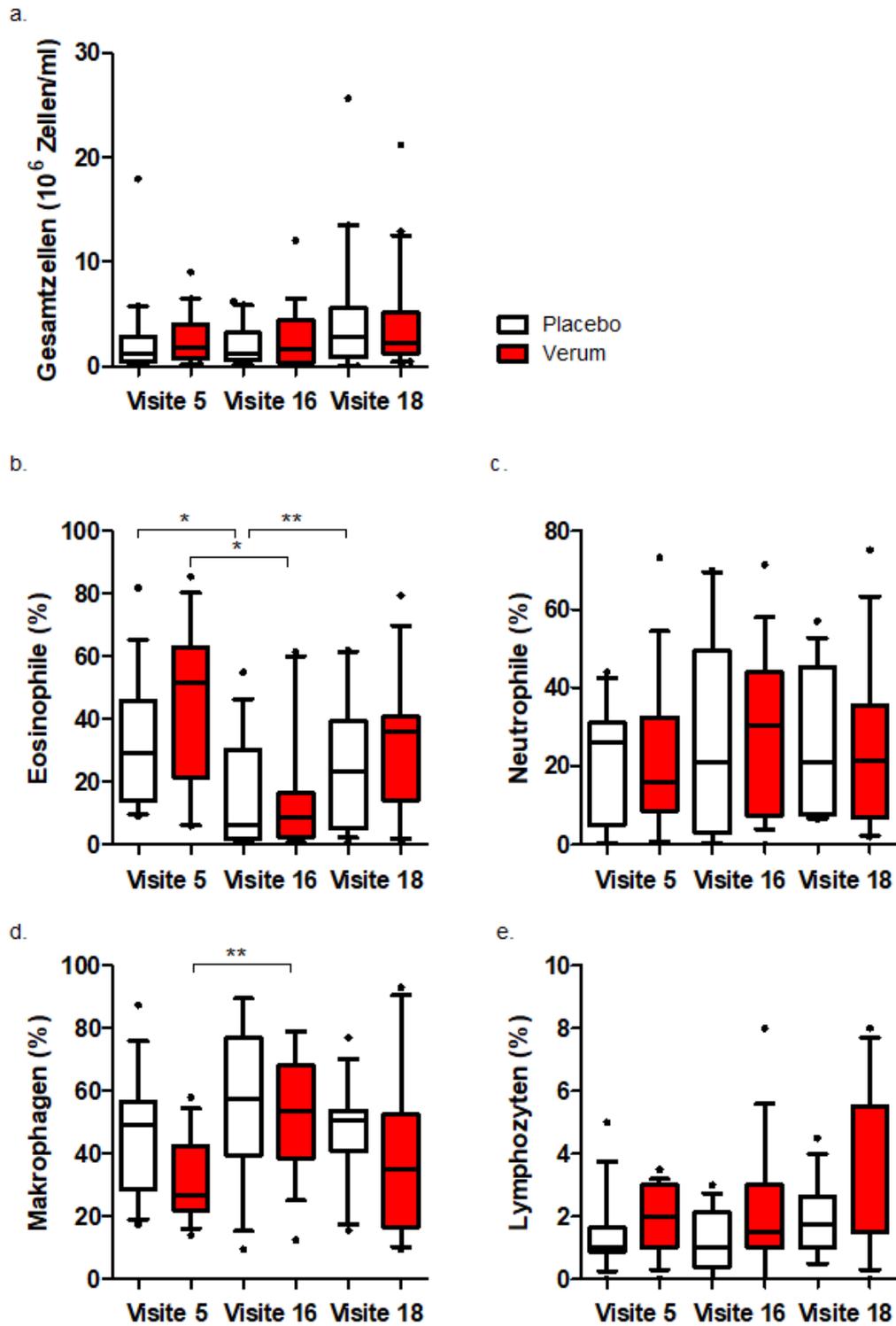


Abb. 5: Zelldifferenzierung des induzierten Sputums. Aufgeführt sind die Gesamtzellzahl (a) sowie der prozentuelle Anteil der eosinophilen Granulozyten (b), neutrophilen Granulozyten (c), Alveolarmakrophagen (d) und Lymphozyten (e) aus dem induzierten Sputum der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten 5, 16 und 18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2. ECP im induzierten Sputum

Die Konzentration des ECP zeigte sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe einen signifikanten Abfall von V5 zu V16 (Placebo: V5 191,2 µg/l, 8-8880 µg/l; V16 51,2 µg/l, 8-616 µg/l; $p < 0,001$. Verum: V5 758,4 µg/l, 8-14880 µg/l; V16 101,6 µg/l; 8-2000 µg/l; $p < 0,01$). Außerdem konnte, ebenfalls in beiden Gruppen, ein signifikanter Anstieg der ECP-Konzentration zwischen V16 und V18 aufzeigt werden (Placebo: V16 51,2 µg/l, 8-616 µg/l; V18 380,4 µg/l, 8-9840 µg/l; $p < 0,01$. Verum: V16 101,6 µg/l; 8-2000 µg/l; V18 500 µg/l, 34,48-15840 µg/l; $p < 0,05$) (siehe Abb. 6).

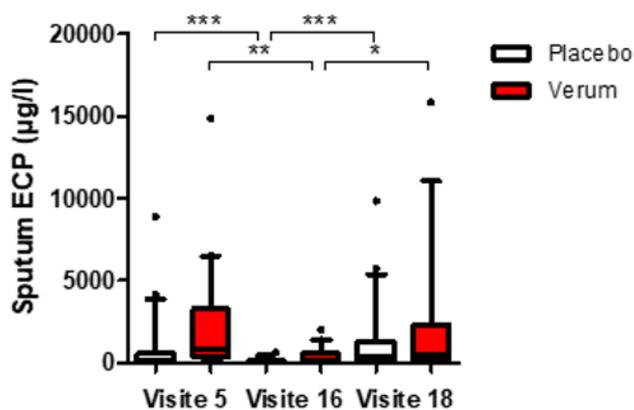


Abb. 6: Konzentration von ECP im induzierten Sputum. Aufgeführt sind die Daten der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten V5, V16 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3. Zytokine im induzierten Sputum

Die Konzentration von IL-5 fiel zwischen V5 und V16 in der Verumgruppe signifikant ab (Verum: V5 3,98 pg/ml, 0,0-127,4 pg/ml; V16 0,0 pg/ml, 0,0-16,94 pg/ml; $p < 0,05$). Zwischen V16 und V18 ließ sich in der Placebogruppe ein signifikanter Anstieg nachweisen (Placebo: V16 0,0 pg/ml, 0,0-0,25 pg/ml; V18 3,28 pg/ml, 0,0-111,7 pg/ml; $p < 0,01$) (siehe Abb. 7a). Neben leichten Schwankungen wurden keine signifikanten Änderungen der IL-10-Konzentration im Visitenverlauf gemessen (siehe Abb. 7b). Das IL-13 zeigte keine signifikanten Konzentrationsänderungen (siehe Abb. 7c). Die Konzentration von IL-17 blieb im Studienverlauf niedrig stabil (Daten nicht gezeigt). IFN- γ war lediglich in zwei Proben der Verumgruppe an V5 nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration von TGF β war in der Verum- und Placebogruppe ähnlich hoch und blieb über den Visitenverlauf unverändert (siehe Abb. 7d).

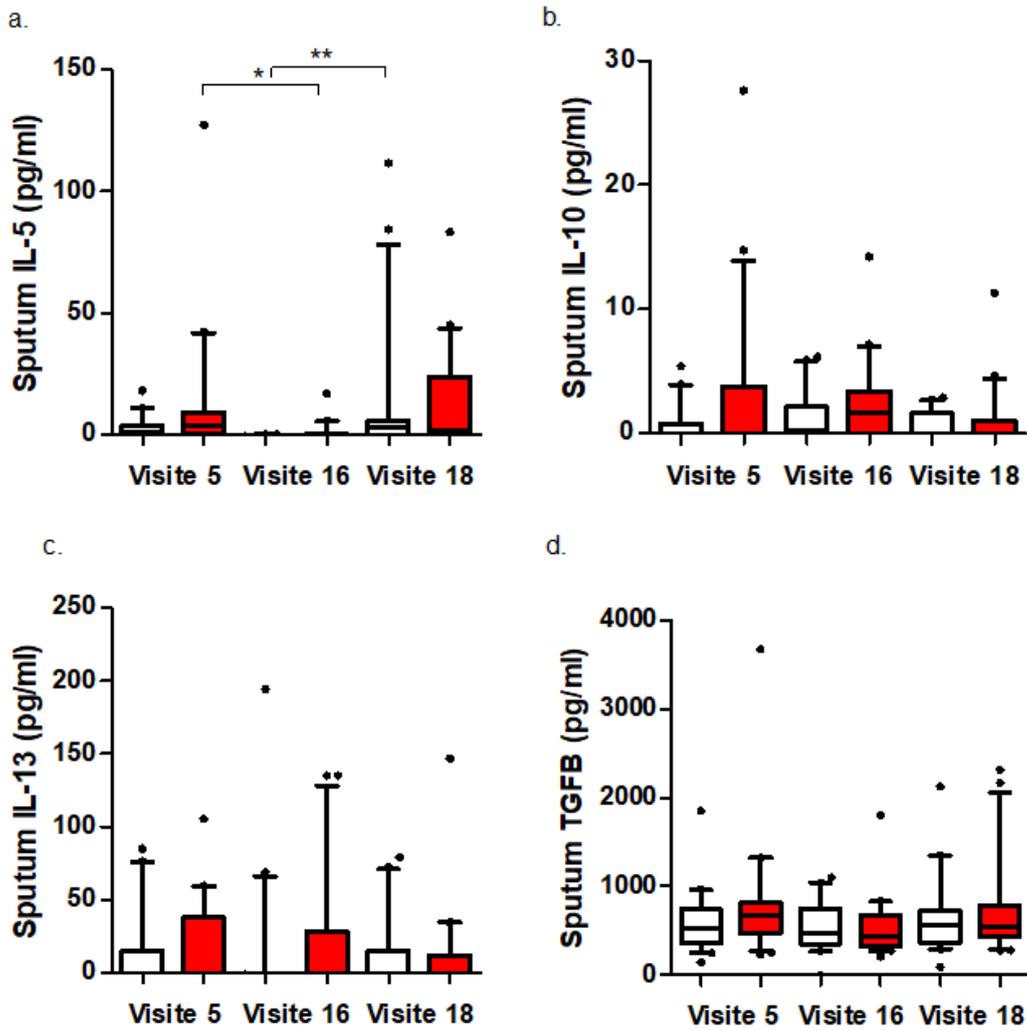


Abb. 7: Konzentration der Zytokine im induzierten Sputum. Aufgeführt ist die Konzentration von IL-5 (a), IL-10 (b), IL-13 (c) und TGFβ (d) der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten V5, V16 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt *p<0,05; **p<0,01.

3.4. Zytokin-RNA im Sputum

Die für IL-5 codierende RNA stieg in ihrer Konzentration signifikant zwischen V16 und V18 in der Placebogruppe an (Placebo: V16 $0,7800 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,0800-3,930 \cdot 2^{-ddCT}$; V18 $6,530 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,5000-8,280 \cdot 2^{-ddCT}$; $p < 0,01$) (siehe Abb. 8a). Die Konzentration der IL-10-RNA schwankte zwar im Visitenverlauf, wies jedoch keine Signifikanzen auf (siehe Abb. 8b). Von V5 zu V16 konnte in der Placebogruppe ein signifikanter Abfall der IL-13-RNA-Konzentration gezeigt werden (Placebo: V5 $11,63 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,76-24,14 \cdot 2^{-ddCT}$; V16 $0,4 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,07-3,04 \cdot 2^{-ddCT}$; $p < 0,05$). Weiterhin stieg sie zwischen V16 und V18 signifikant an (Placebo: V16 $0,4 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,07-3,04 \cdot 2^{-ddCT}$, V18 $16,61 \cdot 2^{-ddCT}$, $2,17-47,64 \cdot 2^{-ddCT}$; $p < 0,01$) (siehe Abb. 8c). Keine signifikanten Veränderungen zeigte die für IFN- γ codierende RNA im induzierten Sputum, ebenso wie die TGF β -RNA (siehe Abb. 8d-e).

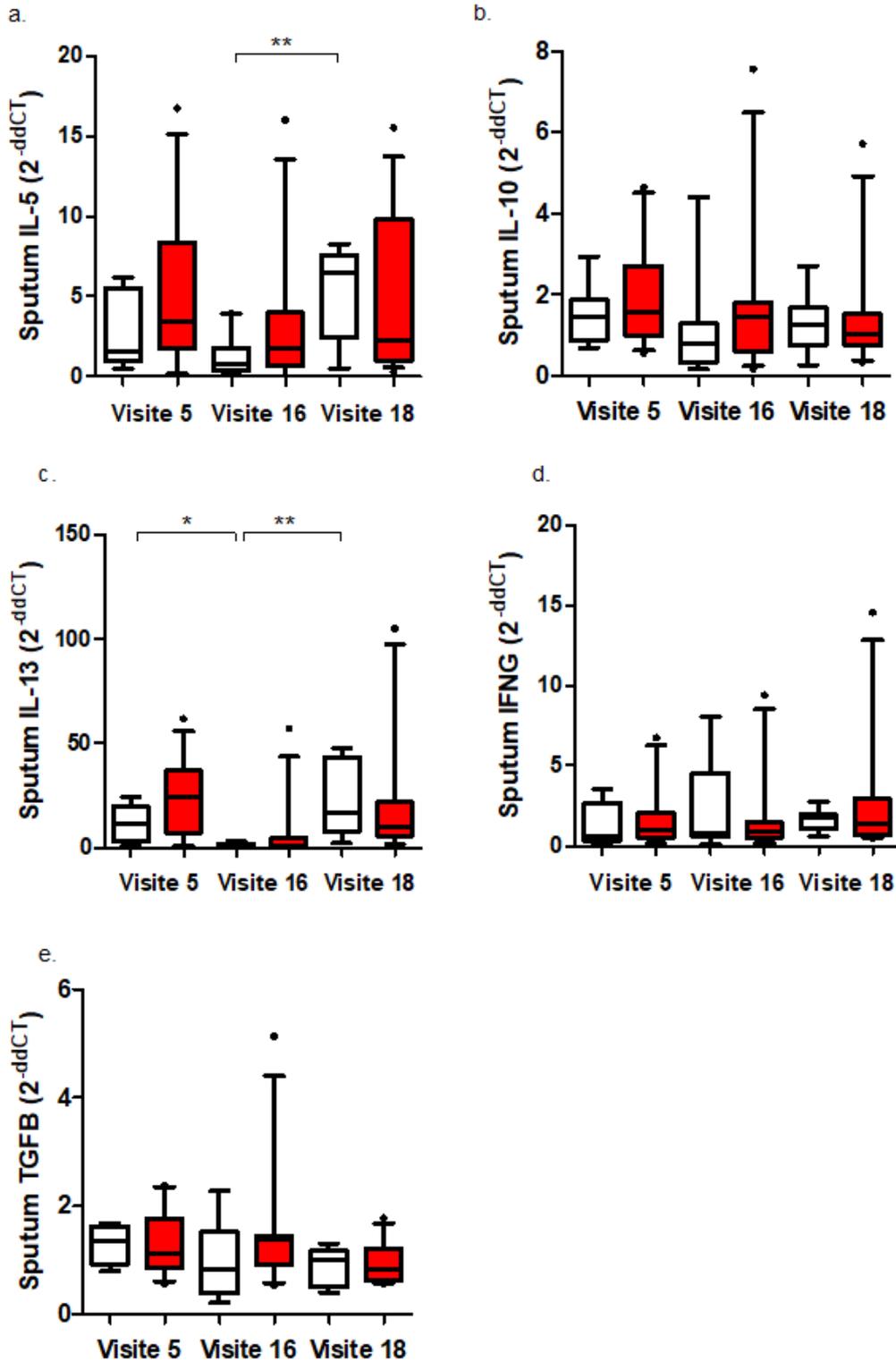


Abb. 8: Konzentration der Zytokin-RNA im induzierten Sputum. Aufgeführt ist die Konzentration der Zytokin-RNA IL-5 (a), IL-10 (b), IL-13 (c), IFN- γ (d) und TGF β (e) der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten V5, V16 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.5. Zytokine im Blut

Die Konzentration von IL-5 zeigte in der Placebogruppe zwischen V4 und V18 einen signifikanten Anstieg (V4 0,0 fg/ml, 0,0-620,3 fg/ml, V18 141,1 fg/ml, 0,0-9703 fg/ml; $p < 0,05$). In der Verumgruppe konnte ein signifikanter Anstieg der IL-5-Konzentration zwischen V4 und V5 beobachtet werden (V4 0,0 fg/ml, 0,0-0,0 fg/ml, V5 116 fg/ml, 0,0-4827 fg/ml; $p < 0,05$) (siehe Abb. 9a). Die Blutkonzentration von IL-6 und IL-10 zeigte weder im Visitenverlauf noch zwischen Placebo- und Verumgruppe eine signifikante Veränderung und blieb insgesamt stabil (siehe Abb. 9b-c). Die IL-17- und TNF- α -Konzentration schwankte in beiden Gruppen im Visitenverlauf, dennoch waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten (siehe Abb. 9d-e). IFN- γ war lediglich in einer Blutprobe in V18 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

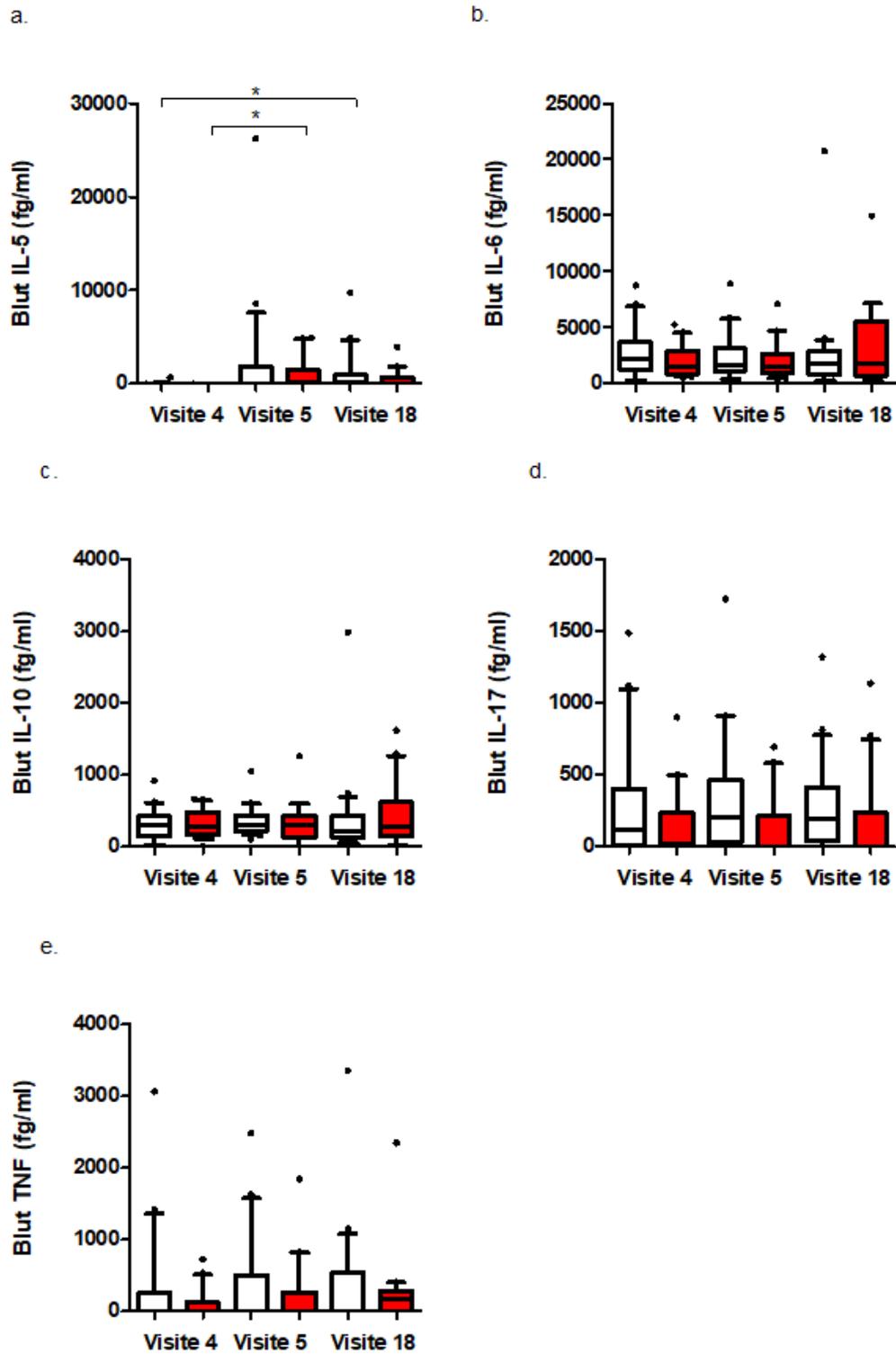


Abb. 9: Konzentration der Zytokine im Blut. Aufgeführt ist die Konzentration von IL-5 (a), IL-6 (b), IL-10 (c), IL-17 (d) und TNF-α (e) im Blut der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten V4, V5 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt *p<0,05.

3.6. Transkriptionsfaktoren im induzierten Sputum

FoxP3, GATA3 und T-bet

Die Konzentration der FoxP3-RNA wies in der Placebogruppe zwischen Visite V16 und Visite V18 einen signifikanten Anstieg auf (Placebo: V16 $0,8800 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,1600-2,730 \cdot 2^{-ddCT}$; V18 $4,270 \cdot 2^{-ddCT}$, $0,2800-8,420 \cdot 2^{-ddCT}$; $p < 0,01$) (siehe Abb. 10a). Die GATA3-RNA-Konzentration wies im Studienverlauf leichte Schwankungen auf, die allerdings kein Signifikanzniveau erreichten (siehe Abb. 10b). Die Konzentration der T-bet-RNA blieb weitgehend stabil und zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen (siehe Abb. 10c).

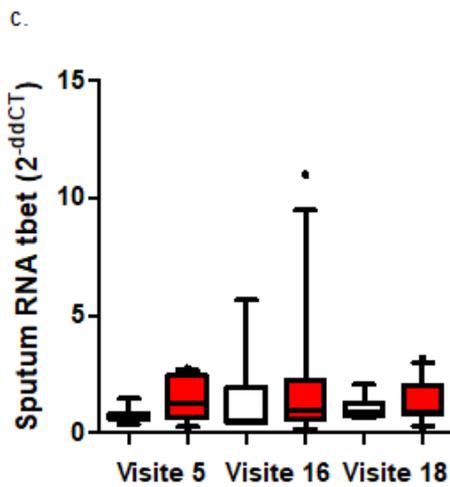
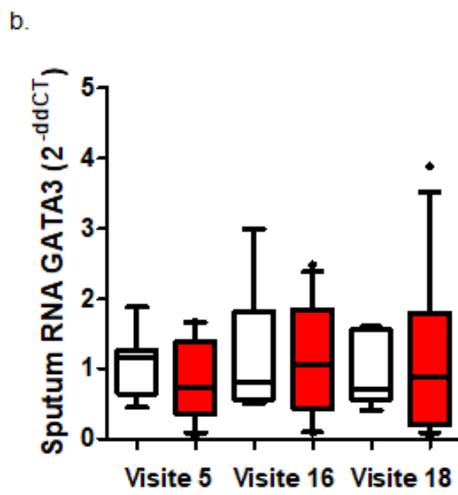
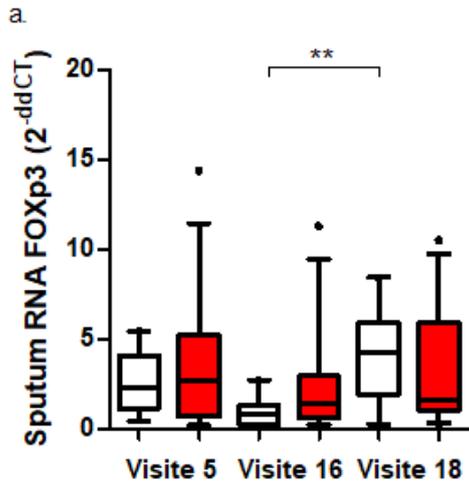


Abb. 10: Konzentration der Transkriptionsfaktoren-RNA im induzierten Sputum. Aufgeführt ist die Konzentration der RNA von FoxP3 (a), GATA3 (b) und T-bet (c) der Verum- und Placebogruppe zu den Visiten V5, V16 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt $**p < 0,01$.

3.7. Klinische Daten

Die klinischen Daten sind ausführlich in der Promotionsarbeit von Frau Rebekka Seibert³⁷ dargestellt.

EAR

Der stärkste prozentuale FEV₁-Abfall der EAR der Probanden schwankte im Studienverlauf leicht, zeigte aber, ebenso wie zwischen den Studiengruppen, keine signifikanten Veränderungen (siehe Abb. 11a).

LAR

Bei der LAR konnte in beiden Gruppen eine signifikante Verringerung des stärksten prozentualen FEV₁-Abfalls zwischen V4 und V17 gezeigt werden (Placebo: V4 28,1%, 17,51-52,48%; V17 25,55%, 11,55%-42,39%; p<0,001. Verum: V4 30,46%, 15,85%-53,96%; V17 27,37%, 11,88-62,27%; p<0,05) (siehe Abb. 11b).

Delta eNO

Das Delta eNO blieb im Studienverlauf und zwischen den Gruppen weitgehend stabil und wies daher keine Signifikanzen auf (siehe Abb. 11c).

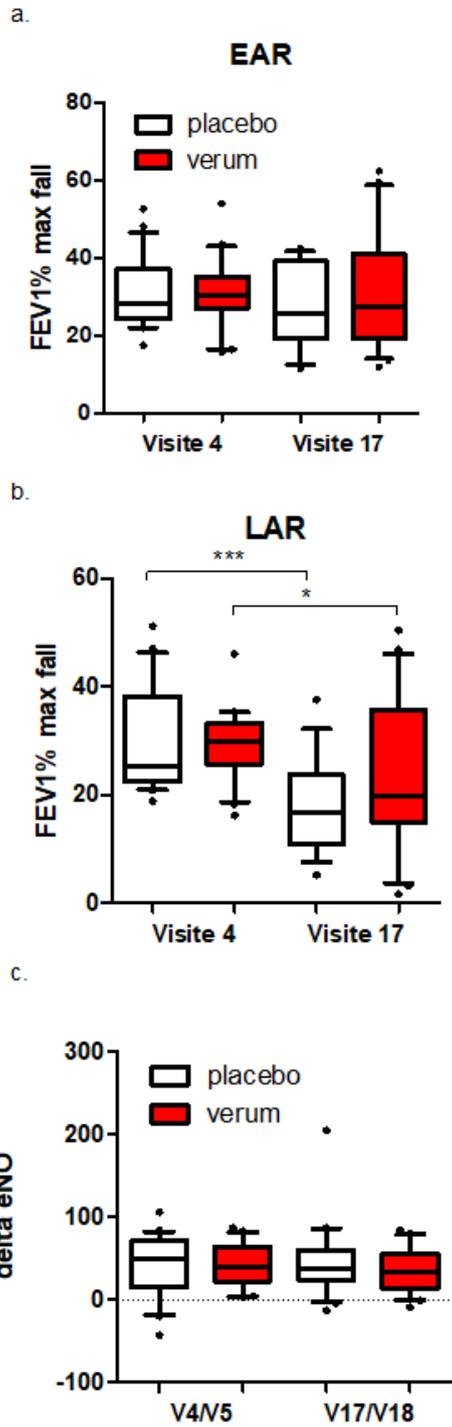


Abb. 11: Klinische Ergebnisse der Probanden.³⁷

Aufgeführt sind der stärkste prozentuale Abfall der FEV₁ bei der EAR (a) und LAR (b) zu den Visiten V4 und V17 sowie das Delta eNO zwischen den Visiten V4 und V5 und zwischen Visite V17 und V18. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots (10-90 Perzentile) und Ausreißer dargestellt *p<0,05; ***p<0,001.

4. Diskussion

Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegserkrankung, die bei Kindern und Erwachsenen auftritt und in den westlichen Industrienationen eine der meistdiagnostizierten Erkrankungen darstellt. Die Tendenz der Prävalenz ist insbesondere bei Kindern ansteigend. Betroffen sind dann nicht nur die Patienten selbst, sondern die ganze Familie. Es ist zu erwarten, dass der Trend des Prävalenzanstiegs in den nächsten Jahren ungebrochen bleiben und die Erkrankung in Zukunft ein wichtiges gesundheitliches Problem bleiben wird. Das wird dafür sorgen, dass hohe Kosten, unter anderem im Gesundheitssystem, und der Verlust an Lebensqualität der Patienten ebenfalls nicht abnehmen werden.³⁸ Es überrascht nicht, dass Betroffene, die unter schwerem Asthma leiden, den größten Anteil zur Morbidität und Mortalität von Asthma beitragen und Ursache der höchsten Behandlungskosten sind.³⁹ Nicht nur die Kosten für die Behandlung der Erkrankung, auch indirekte Kosten, die durch Arbeits-, Berufsunfähigkeit und vorzeitige Todesfälle entstehen, stellen eine hohe Belastung für die Volkswirtschaft dar.⁴⁰ Darüber hinaus verursacht die Erkrankung eine massive Einschränkung der Lebensqualität Betroffener.³⁸ Während die Mehrheit der Kinder und Jugendlichen mit Asthma anhand konventioneller Leitlinien angemessen behandelt werden kann, leidet eine Minderheit an problematischem schwerem Asthma, das trotz leitliniengerechter Behandlung nur schwer zu kontrollieren ist.⁴¹

Angesichts der immensen gesellschaftlichen und individuellen Belastung durch Asthma ist es dringend erforderlich, neue Strategien zur Behandlung der Krankheit zu entwickeln. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Tregalizumab, einem Immunmodulator, der direkt die Tregs aktiviert, auf die allergeninduzierte Atemwegsentzündung bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie zu untersuchen. In einem bronchialen Provokationsmodell sollte analysiert werden, inwieweit sich die Wirkung von BT-061 auf die allergische Entzündung im induzierten Sputum abbilden lässt.

Die Asthmatherapie hat das Ziel, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Daher ist es wichtig, neue Therapiemethoden zu prüfen und anhand geeigneter Parameter zur Therapieüberwachung zu monitoren. Neben den klinischen Parametern geben Biomarker Aufschluss über die entzündliche Reaktion in der

Lunge der Patienten.⁴² Als „Fenster zur Lunge“ bietet sich hier Untersuchungen in der bronchoalveoläre Lavage (BAL) oder im induzierten Sputum an.⁴³ Durch sie können Zelldifferenzierungen vorgenommen werden und Zytokine sowie Transkriptionsfaktoren bestimmt werden. Da eine BAL eine invasive Maßnahme ist, die insbesondere bei Asthmapatienten Risiken wie beispielsweise die Auslösung eines Bronchospasmus mit sich bringt, ist jedoch die Untersuchung im induzierten Sputum als alternatives Verfahren vorteilhafter. Dabei wird den Patienten eine hypertone Kochsalzlösung inhalativ verabreicht, die dazu führt, dass vermehrt Schleim produziert wird. Dieses Verfahren birgt ein wesentlich geringeres Risiko von Komplikationen und liefert dabei valide Ergebnisse.⁴⁴

Kern der überschießenden Immunantwort im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale ist das Überwiegen einer Typ-2-Entzündung. An dieser Entzündungskaskade sind unter anderem Signalproteine, IgE, IL-4 und IL-13, Immunzellen wie Basophile oder Mastzellen sowie TH2-Zellen beteiligt.⁴⁵

Im Sputum sowie in der BAL kann der Anstieg eosinophiler Granulozyten nach einer Asthmaexazerbation gut abgebildet werden und korreliert mit der Stärke der Beschwerden der Patienten.⁴⁶ Dies spiegelt sich sehr gut in unseren Analysen wieder. Verum- und Placebogruppe zeigen einen Anstieg der eosinophilen Granulozyten direkt nach Provokation der Probanden, während dieser nach einiger Zeit wieder abfiel. Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Gesamtzellen zeigte in der Verum- und Placebogruppe zwischen Visite V5 nach Provokation und Visite V16 ohne Provokation einen signifikanten Abfall. In der Placebogruppe stieg er nach der Provokation an Visite V18 wieder signifikant an. In der Verumgruppe war der Anstieg allerdings nicht signifikant. Dem folgend verhielt sich auch die Analyse des ECP. Es stieg signifikant direkt nach der Provokation in beiden Gruppen an und fiel danach wieder ab. ECP wird durch eosinophile Granulozyten gebildet und wirkt zytotoxisch. Es stimuliert basophile Granulozyten und Mastzellen und fördert die Mukussekretion in den Atemwegen.⁴⁷ Es ist daher stimmig, dass unser Versuch den Abfall von ECP von Visite V5 zu V16 und den relevanten Anstieg von Visite V16 zu V18 in beiden Gruppen zeigte. Unsere Untersuchungen bekräftigen die wichtige Rolle der Eosinophilen im Ablauf der allergischen Entzündungsreaktion

und zeigten die Qualifikation der Messung im induzierten Sputum als probate Methode für unsere Studie.

Neben den eosinophilen Granulozyten stand aber die TH2-Immunantwort im Mittelpunkt der Untersuchungen. Da diese auf zellulärer Ebene schwerer zu erfassen ist, wurden in dieser Studie inflammatorische Mediatoren wie die Zytokine IL-5 und IL-13 und die Transkriptionsfaktoren der T-Zellpopulationen zur Analyse herangezogen, um die Wirkung von Tregalizumab zu überprüfen.

Tregalizumab ist ein Medikament, das durch seinen Wirkmechanismus Potential zur Bekämpfung von Asthmasymptomen hat. Es ist ein monoklonaler IgG-Antikörper, der selektiv Tregs aktiviert. Diese sind für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz unerlässlich. Sie unterdrücken autoimmune und entzündliche Erkrankungen mit übermäßiger Aktivierung von T-Lymphozyten und die Bildung von TH2- aus TH0-Zellen. Es greift also sehr früh in der immunologischen Kaskade bei allergischem Asthma ein und könnte einen der ersten pathologischen Schritte der überschießenden Entzündung regulieren. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass sensibilisierte Blutzellen bei Stimulation mit HSM IL-5 und IFN- γ ausschütteten. In Anwesenheit von Tregalizumab waren die beiden Proteine sowie ihre mRNA signifikant weniger vorhanden. Tregs, welche mit dem Antikörper behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere Expression von FoxP3, TGF β und IL-10.⁴⁸ Tregalizumab hat demnach das Potential, in die Entzündungskaskade einzugreifen und somit bei der Behandlung von Asthma sowie anderen autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt zu werden. In einer Studie an Patienten mit Rheumatoider Arthritis führte es zu einer messbaren CD4-Modulation bei guter Verträglichkeit, allerdings ohne signifikante klinische Wirksamkeit.⁴⁹ Eine weitere Studie, die Tregalizumab an Patienten mit Psoriasis testete, deutete auf eine positive Wirkung hin.⁵⁰ Die Studienlage ist im Allgemeinen aber noch zu dünn, um aussagekräftige Ergebnisse zur Wirksamkeit von Tregalizumab bei diesen oder anderen Erkrankungen vorzuweisen.

Die Induktion regulatorischer T-Zellen sowie die Ausschüttung von IL-10 und TGF β durch sie wird heute schon durch einen anderen Behandlungsansatz angestrebt: die spezifische Immuntherapie.⁵¹ Sie zielt darauf ab, das

Immunsystem des Körpers gezielt zu beeinflussen, um allergische oder entzündliche Reaktionen zu unterdrücken, indem die gesunde TH1-Immunantwort gestärkt und die überschießende, asthmafördernde TH2-Reaktion gedämpft wird. Das resultiert in einer weniger starken Aktivierung von Plasmazellen, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen. Dafür werden vermehrt IgG und IgA gebildet, welche Teil der gesunden Immunantwort sind.⁵² Bei der spezifischen Immuntherapie wird das Allergen selbst sublingual oder subkutan verabreicht. Es handelt sich dabei um eine Langzeitbehandlung, die über Monate bis Jahre durchgeführt wird, um eine Toleranz gegenüber dem Allergen aufzubauen.⁵³ Die Wirksamkeit dieser Therapie ist wissenschaftlich belegt.⁵⁴

Um die Frage zu beantworten, ob die Aktivierung von Tregs durch Tregalizumab die überschießende TH2-vermittelte Immunantwort regulieren und Laborparameter für Entzündung und Allergie reduzieren kann, wurde der Antikörper an Patienten mit kontrolliertem allergischem Asthma und HSM-Allergie in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie getestet. Zur Beurteilung der immunologischen Aktivität in der Lunge, wurde zunächst die Verteilung der eosinophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und Lymphozyten im Sputum untersucht.

Es fand sich kein Unterschied in der Zellverteilung und im speziellen in der Anzahl der eosinophilen Granulozyten zwischen der Verum- und der Placebogruppe in der Zellverteilung im Sputum nach der Provokation. Die Eosinophilie spiegelt häufig den Schweregrad des Asthmas wider, und der Zusammenhang zwischen der Verringerung der Eosinophilen im Sputum und der Verringerung der Exazerbationen nach einer ICS-Therapie ist allgemein anerkannt.^{55,56} Auch der Einsatz von anderen mAB, wie z.B. anti-IL-5 führte zur Unterdrückung der Eosinophilie. So konnten Leckie et al. zeigen, dass Mepolizumab, ein monoklonaler Anti-IL5-Antikörper, bei 24 Patienten mit leichtem Asthma zu einem Rückgang der Eosinophilen im Sputum und im Blut nach einer Allergenbelastung führte.⁵⁷

In den letzten Jahren wurden verschiedene Biologika in der Behandlung von Asthma entwickelt und zugelassen. Sie greifen an unterschiedlichen Stellen in der immunologischen Signalkaskade ein. Eines dieser Biologika ist Omalizumab. Es bindet IgE und reduziert dadurch dessen Konzentration im Serum und damit seine Wirkung. Die Bindung an und Aktivierung von Basophilen, Eosinophilen und dendritischen Zellen wird vermindert. Ein weiteres Medikament, das zur Behandlung von Asthma eingesetzt wird, ist Dupilumab. Es bewirkt eine Inhibition des IL-4- und IL-13-Signalwegs, indem es an den gemeinsamen IL-4-Rezeptor bindet. Somit wirkt es unter anderem der Bildung von TH2-Zellen und dem Antikörperklassenwechsel von B-Zellen zu IgE entgegen. Tezepelumab ist ein gegen TSLP gerichteter Antikörper, der ebenfalls Symptomatik und Laborwerte Erkrankter verbessern konnte, indem es die Bildung von TH2-Zellen hemmt.²³ Mepolizumab, Reslizumab und Benralizumab sind ebenfalls Medikamente, die bei der Behandlung von Asthma eingesetzt werden. Sie wirken, indem sie an der Wirkstelle von IL-5 eingreifen und dieses binden oder seinen Rezeptor auf Eosinophilen und Basophilen blockieren.

Für die Mobilisierung von eosinophilen Granulozyten ist IL-5 essenziell, welches von den TH2-Zellen gebildet wird. Es ist ebenfalls ein Marker für die Schwere der Entzündung und die Krankheitsausprägung.⁴⁷

Dies konnte schon in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden und auch in der aktuellen Untersuchung führte die Provokation zu einer Aktivierung der TH2-Zellen.⁵⁸ Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte keinen Unterschied in der IL-5 Ausschüttung bzw. Expression nach den Provokationen. Allerdings fand sich ein signifikanter Anstieg von IL-5 auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nach der zweiten Provokation in der Placebogruppe, während dies in der Verumgruppe nicht der Fall war. Diese Beobachtung war ebenfalls bei der IL-13 Expression zu sehen. Das von TH2-Zellen sezernierte IL-13 führt zur Bildung von Plasmazellen aus B-Zellen, welche einen Antikörperklassenwechsel zu IgE vollziehen, und ist ein nennenswerter Bestandteil der immunologischen Kaskade des allergischen Asthma.¹⁰

Interessanterweise konnte IL-5 auch im Blut der Probanden nach Provokation gemessen werden, was im Einklang mit der Studie von Van De Pol steht, die

ebenfalls IL-5 im induzierten Sputum und Blut bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie im Rahmen einer Synbiotika-Studie bestimmt haben.⁵⁹ Auch hier zeigte unsere Studie, im Gegensatz zur Placebogruppe, keinen signifikanten Anstieg von IL-5 nach der zweiten Provokation in der Verumgruppe. Als weitere Zytokine wurden unserer Studie zudem IFN- γ , IL-17, IL-6 und TNF- α gemessen. IFN- γ ist ein Zytokin, das hauptsächlich von TH1-Zellen produziert wird.⁶⁰ Bei der gesunden Immunantwort dienen sie der Ausreifung von Makrophagen, welche pathogene Stoffe eliminieren.⁶¹ Es ist noch nicht ganz klar, wie sich dieses Zytokin im Rahmen der Asthmareaktion verhält und welche Rolle die Allergenprovokation bei einer möglichen Konzentrationsänderung spielt.⁶² In unserem Experiment war IFN- γ lediglich in einer Blutprobe in V18 nachweisbar sowie in zwei Sputumproben in V5. Bei der RNA im induzierten Sputum zeigten sich neben leichten Schwankungen keine signifikanten Änderungen im Studienverlauf. Dies erlaubt es uns nicht, den Einfluss der Entzündungsreaktion oder der Anwendung von Tregalizumab auf die Konzentration von IFN- γ zu bewerten. TH17-Zellen sezernieren das Zytokin IL-17, welches die Entzündungsreaktion intensiviert. In Sputen von Patienten mit schwerem Asthma und vor allem nach Allergenprovokation ist seine Konzentration höher als bei Gesunden.⁶³ Die IL-17-Konzentration unserer Probanden im Blut wies in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe zwar tendenziell niedrigere Werte auf, Signifikanzen ergaben sich allerdings keine. Im Verlauf der Visiten unterlagen die Werte keinen sehr großen Schwankungen. Im Sputum war die Konzentration durchweg niedrig stabil. IL-6 und TNF- α sind wichtige Zytokine im Ablauf der entzündlichen Reaktion und entstehen in verschiedenen Zellen. Sie unterstützen nicht nur die akute asthmatische Reaktion, sondern auch das Remodeling der Atemwege. Studien zeigten, dass die IL-6-Konzentration im Sputum Erkrankter, insbesondere nach Allergenprovokation, erhöht war, während dies bei TNF- α nicht der Fall war.^{64,65} Wir maßen die Konzentration von IL-6 im Blut und konnten weder im Visitenverlauf noch zwischen Placebo- und Verumgruppe eine signifikante Veränderung feststellen bei insgesamt stabilen Werten. Die TNF- α Konzentration im Blut zeigte sich, ähnlich wie das IL-17, in der Verumgruppe tendenziell geringer, ohne eine Signifikanz zu erreichen.

Unsere Ergebnisse weisen zumindest auf einen schwachen Effekt von BT-061 auf die TH-2 Zellen hin. Ein direkter Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen mittels IL-10 oder TGF β konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. IL-10 und TGF β sind Zytokine, die von Tregs ausgeschüttet werden. Sie wirken hemmend auf die anderen T-Zellen und damit unterdrückend auf die überschießende Immunantwort. Sie werden zum Beispiel durch die spezifische Immuntherapie induziert.⁵¹ Die Blutkonzentration von IL-10 war in unserer Studie insgesamt sehr stabil. Die Konzentration der IL-10- und TGF β -RNA unterlag im Visitenverlauf zwar Schwankungen, zeigte aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Visiten oder Gruppen.

Deshalb wurden auch die Transkriptionsfaktoren FoxP3, GATA-3 und T-bet mithilfe der PCR im Sputum analysiert, um die direkte Wirkung von BT-061 auf die Tregs, TH1 und TH2-Zellen zu testen. FoxP3 dient als Marker für die Aktivität von nTregs und unterdrückt die TH2-Antwort.⁶⁶ Es konnte gezeigt werden, dass FoxP3 bei Asthma Patienten weniger stark exprimiert wird als bei Gesunden.⁶⁷ In unserer Stichprobe stieg die Konzentration der FoxP3-RNA in der Placebogruppe zwischen Visite V16 und V18, nach der Provokation, signifikant an. Der Anstieg von FoxP3 steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen von Schulze et al., die auch demonstrieren konnten, dass FoxP3 in Sputumzellen nach bronchialer Allergenexposition vermehrt exprimiert wird.⁵⁸ Es ist zu spekulieren warum dies in der Verumgruppe nicht der Fall ist. Möglicherweise sind die regulatorischen T-Zellen nach der andauernden Stimulation durch BT-061 „erschöpft“ und können dadurch nicht weiter aktiviert werden. Bei dem Vergleich der Mediane in zwischen der Placebo- und der Verumgruppe im Provokationsmodell fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den Visiten bei in der Gruppe, die mit Tregalizumab behandelt wurde, viel geringer ausfällt als bei der Placebogruppe.

Zusammenfassend erwiesen sich vor allem der Anteil eosinophiler Granulozyten, die Konzentration von IL-5 in Blut und Sputum und die Konzentration von ECP im Sputum als gute Parameter zur Beurteilung der Schwere der entzündlichen Reaktion bei unseren Studienteilnehmern. Wir konnten zeigen, dass sich die

allergische Entzündung verursacht durch das Provokationsmodell anhand der analysierten Parameter im Sputum aber auch im Blut gut monitoren ließ.

Ein klinischer Effekt von Tregalizumab konnte in dieser Studie nicht gefunden werden und dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit der Analyse der Entzündungsparameter im induzierten Sputum. So zeigte sich zwar ein erhöhter Anteil eosinophiler Granulozyten nach Allergenprovokation, einen Unterschied zwischen Placebo- und Verumgruppe gab es hingegen nicht. Ähnlich verhielt sich das ECP im Sputum und welches ebenfalls die allergische Entzündung gut abbildete.

Ein möglicher Grund für die fehlende Wirksamkeit von Tregalizumab könnte in der Route der Verabreichung oder in der Dosierung liegen. Möglicherweise könnte eine inhalative Applikation, als direkter Weg an das Zielorgan, eine Wirkung zeigen. Hier stellt sich natürlich auch die Frage, ob eine zwölfwöchige Therapie mit Tregalizumab ausreichend ist, um einen Therapieerfolg sichtbar zu machen. Der Wirkeintritt anderer Biologika beginnt in der Regel innerhalb der ersten Wochen, kann aber auch wenige Monate dauern. Außerdem wird beispielsweise Omalizumab körperlsgewichtsabhängig dosiert.⁶⁸ Möglich ist demnach auch eine inadäquate Tregalizumabdosis während unserer Studie. Unser Provokationsmodell schien den Grad der Entzündung in den Atemwegen plausibel abzubilden. Dennoch können wir nicht ausschließen, dass eine mögliche geringe Wirkung von Tregalizumab durch die starke Allergenprovokation überdeckt wurde. Auch der Zeitpunkt der Sputuminduktion unmittelbar nach der Provokation könnte einen möglichen längerfristigen Effekt des Antikörpers überlagern.

Obwohl diese Studie keinen therapeutischen Effekt von Tregalizumab auf die allergeninduzierte Atemwegsentzündung bei Patienten mit HSM-Allergie demonstrieren konnte, fanden sich schwache Hinweise für einen Einfluss auf Ebene der TH2-Zellen. Dies könnte die These unterstützen, dass Tregalizumab eine Wirkung auf die TH2-Zellen ausübt, der Effekt aber nicht stark genug ist, um in die Kaskade der allergischen Entzündung einzugreifen. Auch könnte, wie schon weiter oben erwähnt, die ständige Stimulation der regulatorischen T-Zellen durch die Gabe von Tregalizumab zu einer Ermüdung der regulatorischen T-Zellen führen.

Eine andere Ursache könnte die Auswahl der Probanden sein, welche lediglich leichtes allergisches Asthma bronchiale hatten. Die Wirkung könnte bei schwerem allergischem Asthma anders sein. Bei anderen Biologika ist im Gegensatz dazu gemein, dass sie bei schwerem allergischem Asthma zugelassen sind.²³ Die fehlende Signifikanz bei dem Anstieg der Eosinophilen Zellen oder den Zytokinen IL-5 und IL-13 in der Verumgruppe könnte darauf hinweisen, dass zumindest ein Teil der Patienten auf den Antikörper reagieren und dass die Zielgruppe hätte anders gewählt hätte werden müssen.

Es ist also nicht vollkommen ausgeschlossen, dass trotz unserer Studienergebnisse Tregalizumab eine Wirkung auf allergische Erkrankung wie das Asthma bronchiale und andere Erkrankungen mit autoimmunem Charakter haben könnte. Dazu müssen weitere Studien mit größeren Stichproben mehr Daten zur *in vivo* Wirkung von Tregalizumab erheben, gegebenenfalls auch in Kombination mit anderen Therapieoptionen.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Allergisches Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegserkrankung, deren Prävalenz zunimmt. Angesichts der immensen gesellschaftlichen und individuellen Belastung durch Asthma ist es dringend erforderlich, neue Strategien zur Behandlung der Krankheit zu entwickeln. Immunologisch ist allergisches Asthma durch ein Ungleichgewicht zwischen TH2-Zellen und TH1-Zellen gekennzeichnet, das durch regulatorische T-Zellen (Tregs) reguliert wird. Tregalizumab ist ein monoklonaler IgG-Antikörper, der Tregs selektiv aktiviert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Wirkung von Tregalizumab auf die allergeninduzierte allergische Entzündung bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie anhand eines bronchialen Provokationsmodells zu untersuchen.

Methoden: In einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden und placebokontrollierten Studie wurden 42 Probanden mit allergischem Asthma und Hausstaubmilbenallergie zwölf Wochen lang mit Tregalizumab 100 mg oder Placebo behandelt. Bronchiale Provokation mit HSM wurde vor (V4) und nach (V17) Tregalizumab-Gabe durchgeführt. Induziertes Sputum (Visite V5, V16, V18) und peripheres Blut (Visite V4, V5, V18) wurden entnommen und Zelldifferenzierung, Zytokine und Transkriptionsfaktoren wurden durch Mikroskopie, Durchflusszytometrie bzw. RT-PCR bewertet.

Ergebnisse: Sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe zeigte sich zwischen Visite V5 (24 Stunden nach Provokation) und vier Wochen nach Provokation bei Visite V16 ($p < 0,05$) ein signifikanter Rückgang des Anteils eosinophiler Granulozyten (wie auch des ECP-Levels). Interessanterweise konnte bei V18 (24 Stunden nach Provokation) nur in der Placebogruppe ein signifikanter Anstieg beobachtet werden ($p < 0,01$). Die Konzentration des TH-2-Zytokins IL-5 nahm zwischen V5 und V16 in der Verumgruppe signifikant ab ($p < 0,05$). Zwischen V16 und V18 konnte wiederum nur in der Placebogruppe ein signifikanter Anstieg festgestellt werden ($p < 0,01$). Dieser spätere Effekt wurde auch auf Protein- und Transkriptionsebene und im peripheren Blut sowie bei der

Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 gefunden. Auf der Ebene der TH-1-Zytokine konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Diskussion: Der Anteil eosinophiler Granulozyten, die Konzentration von IL-5 in Blut und Sputum sowie die Konzentration von ECP im Sputum haben sich als gute Parameter zur Beurteilung der Entzündungsreaktion bei unseren Studienteilnehmern erwiesen. Wir haben gezeigt, dass allergische Entzündungen, die durch das Provokationsmodell verursacht wurden, durch die analysierten Parameter im Sputum, aber auch im Blut gut überwacht werden konnten. Ein klinischer Effekt von Tregalizumab konnte in dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden und dieses Ergebnis stimmt gut mit der Analyse der Entzündungsparameter im induzierten Sputum überein.

6. Summary

Introduction: Allergic bronchial asthma is a chronic respiratory disease, whose prevalence is increasing. Given the immense societal and individual burden of asthma, there is an urgent need to develop new strategies to treat the disease. Immunologically, allergic asthma is characterized by a disbalance between TH2 cells and TH1 cells, which is regulated by regulatory T cells (Tregs). Tregalizumab is an IgG monoclonal antibody that selectively activates Tregs. Therefore, the aim of the present work was to investigate the effect of Tregalizumab on allergen-induced allergic inflammation in patients with house dust mite allergy using a bronchial provocation model.

Methods: In a prospective, randomized, double-blind and placebo-controlled study 42 subjects with allergic asthma and house dust mite (HDM) allergy were treated with Tregalizumab 100 mg or placebo for twelve weeks. Bronchial provocation with HDM was performed before (V4) and after (V17) Tregalizumab administration. Induced sputum (visit V5, V16, V18) and peripheral blood (visit V4, V5, V18) were collected and cell differentiation, cytokines and transcription factors were assessed by microscopy, flow cytometry and RT-PCR, respectively.

Results: The percentage of eosinophil granulocytes (as well as the ECP level) showed a significant decrease in both the verum and placebo group between visit V5 (24 hours after provocation) and four weeks after provocation at visit V16 ($p < 0.05$). Interestingly, at V18 (24 hours after provocation) a significant increase could only be observed in the placebo group ($p < 0.01$). The concentration of the TH-2 cytokine IL-5 decreased significantly between V5 and V16 in the verum group ($p < 0.05$). Again, between V16 and V18, a significant increase could only be detected in the placebo group ($p < 0.01$). This later pattern was also found at both the protein and transcriptional levels and in the peripheral blood as well as on the expression of the transcription factor FOX-P3. No significant changes could be found on the level of TH-1 cytokines.

Discussion: The percentage of eosinophilic granulocytes, the concentration of IL-5 in blood and sputum, and the concentration of ECP in sputum have been proved to be good parameters for assessing the inflammatory response in our study

participants. We demonstrated that allergic inflammation caused by the provocation model could be well monitored by the analyzed parameters in sputum but also in blood. However, a clinical effect of Tregalizumab could not be found in this study and this result is in good agreement with the analysis of the inflammatory parameters in the induced sputum.

7. Literaturverzeichnis

References

1. Herold G. *Innere Medizin 2022: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Gerd Herold; 2022.
2. Nurmagambetov T, Kuwahara R, Garbe P. The Economic Burden of Asthma in the United States, 2008-2013. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15(3):348-356. doi:10.1513/AnnalsATS.201703-259OC.
3. Ruggieri S, Drago G, Longo V, et al. Sensitization to dust mite defines different phenotypes of asthma: A multicenter study. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2017;28(7):675-682. doi:10.1111/pai.12768.
4. Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Current allergy and asthma reports*. 2010;10(1):39-48. doi:10.1007/s11882-009-0081-7.
5. Grevers G, Röcken M. *Taschenatlas der Allergologie: [Grundlagen, Diagnostik, Klinik]*. Stuttgart: Thieme; 2001.
6. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell*. 2010;140(6):777-783. doi:10.1016/j.cell.2010.03.004.
7. Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma. *Cell*. 2021;184(6):1469-1485. doi:10.1016/j.cell.2021.02.016.
8. Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K, et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015;349(6252):1106-1110. doi:10.1126/science.aac6623.
9. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008;38(6):872-897. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x.
10. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(2 Suppl):S65-71. doi:10.1067/mai.2001.116436.
11. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine*. 2012;106(1):9-14. doi:10.1016/j.rmed.2011.09.007.

12. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S73-80. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017.
13. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research*. 2010;690(1-2):24-39. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005.
14. Voehringer D. Basophils in allergic immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23(6):789-793. doi:10.1016/j.coi.2011.09.005.
15. Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27(2):117-127. doi:10.1055/s-2006-939514.
16. Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T-cell response to allergens. *Chem Immunol Allergy*. 2010;95:22-44. doi:10.1159/000315936.
17. Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009;57(5):331-344. doi:10.1007/s00005-009-0039-4.
18. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011;66(8):989-998. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02576.x.
19. Murphy KM, Weaver C, Janeway C, et al. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
20. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009;39(9):1314-1323. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x.
21. Leitlinien.de. 2 Diagnostik und Monitoring. Updated November 9, 2022. Accessed November 9, 2022.
22. Arastéh K. *Innere Medizin*. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.
23. Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic Therapies for Severe Asthma. *N Engl J Med*. 2022;386(2):157-171. doi:10.1056/NEJMra2032506.
24. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, et al. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(6):1828-1834. doi:10.1164/ajrccm.155.6.9196082.

25. National Institute for Health and Care Excellence. Omalizumab for treating severe persistent allergic asthma. 2013.
<https://www.nice.org.uk/guidance/TA278>.
26. Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(8):804-811.
doi:10.1164/rccm.201208-1414OC.
27. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2009;360(10):973-984.
doi:10.1056/NEJMoa0808991.
28. Hearn AP, Kavanagh J, d'Ancona G, et al. The relationship between Feno and effectiveness of mepolizumab and benralizumab in severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(5):2093-2096.e1.
doi:10.1016/j.jaip.2021.01.008.
29. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, et al. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2014;371(13):1189-1197. doi:10.1056/NEJMoa1403291.
30. Dupin C, Belhadi D, Guilleminault L, et al. Effectiveness and safety of dupilumab for the treatment of severe asthma in a real-life French multi-centre adult cohort. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2020;50(7):789-798.
doi:10.1111/cea.13614.
31. Diver S, Khalfaoui L, Emson C, et al. Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2021;9(11):1299-1312. doi:10.1016/S2213-2600(21)00226-5.
32. König M, Rharbaoui F, Aigner S, Dälken B, Schüttrumpf J. Tregalizumab - A Monoclonal Antibody to Target Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:11. doi:10.3389/fimmu.2016.00011.
33. Helling B, König M, Dälken B, et al. A specific CD4 epitope bound by tregalizumab mediates activation of regulatory T cells by a unique signaling

- pathway. *Immunology and Cell Biology*. 2015;93(4):396-405.
doi:10.1038/icb.2014.102.
34. Humblet-Baron S, Baron F. Tregalizumab (BT-061) increases regulatory T cell function. Boosting regulatory T-cell function with the humanized CD4-specific humanized monoclonal antibody Tregalizumab (BT-061). *Immunology and Cell Biology*. 2015;93(4):321-322.
doi:10.1038/icb.2014.120.
35. Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, et al. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie*. 2007;61(5):e1-40.
doi:10.1055/s-2007-959200.
36. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(8):912-930. doi:10.1164/rccm.200406-710ST.
37. Rebekka Seibert. *Klinische Effekte von Tregalizumab auf allergeninduzierte Atemwegsreaktion bei Patienten mit Asthma*. unv. Diss. Goethe-Universität Frankfurt am Main; 2023.
38. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2022. Available from: www.ginasthma.org.
39. Bahadori K, Doyle-Waters MM, Marra C, et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC pulmonary medicine*. 2009;9:24.
doi:10.1186/1471-2466-9-24.
40. Böcking C, Renz H, Pfefferle PI. Prävalenz und sozioökonomische Bedeutung von Allergien in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl*. 2012;55(3):303-307. doi:10.1007/s00103-011-1427-6.
41. Pike KC, Levy ML, Moreiras J, Fleming L. Managing problematic severe asthma: beyond the guidelines. *Archives of disease in childhood*. 2018;103(4):392-397. doi:10.1136/archdischild-2016-311368.
42. Fuhlbrigge AL. Asthma severity and asthma control: symptoms, pulmonary function, and inflammatory markers. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2004;10(1):1-6. doi:10.1097/00063198-200401000-00002.

43. Ulrich Zissler. *Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum*. Frankfurt am Main: Johann-Wolfgang Goethe Universität; 2012.
44. Veen JC in 't, Gouw HW de, Smits HH, et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *The European respiratory journal*. 1996;9(12):2441-2447. doi:10.1183/09031936.96.09122441.
45. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):57-65. doi:10.1038/nri3786.
46. Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, et al. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *The American review of respiratory disease*. 1992;145(6):1265-1269. doi:10.1164/ajrccm/145.6.1265.
47. Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, et al. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2006;97(3):312-320. doi:10.1016/S1081-1206(10)60795-8.
48. Prof. Dr. rer. nat. Ralf Schubert. Clinical phase II proof-of-concept trial for treatment of allergic asthma by means of Tregalizumab-activated regulatory T cells.
49. van Vollenhoven RF, Keystone EC, Strand V, et al. Efficacy and safety of tregalizumab in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase IIb, randomised, placebo-controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77(4):495-499. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212478.
50. Abufarag A, Aigner S, Czeloth N, Dälken B, Koch H, Niemann G, et al. Selective activation of naturally occurring regulatory T cells (Tregs) by the monoclonal antibody BT-061 as a novel therapeutic opportunity in psoriasis: early clinical results after single doses. *J Invest Dermatol* (2010) 130(Issue 2):S64.
51. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and

- specific immunotherapy. *European journal of immunology*. 2003;33(5):1205-1214. doi:10.1002/eji.200322919.
52. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:195-203. doi:10.1159/000090282.
53. Frew AJ. Allergen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S306-13. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.064.
54. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003;(4). doi:10.1002/14651858.CD001186.
55. Bell MC, Busse WW. Severe asthma: an expanding and mounting clinical challenge. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(2):110-21; quiz 122. doi:10.1016/j.jaip.2013.01.005.
56. Laviolette M, Gossage DL, Gauvreau G, et al. Effects of benralizumab on airway eosinophils in asthmatic patients with sputum eosinophilia. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(5):1086-1096.e5. doi:10.1016/j.jaci.2013.05.020.
57. Leckie MJ, Brinke A ten, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet (London, England)*. 2000;356(9248):2144-2148. doi:10.1016/s0140-6736(00)03496-6.
58. Schulze J, Voss S, Zissler U, Rose MA, Zielen S, Schubert R. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge. *Respiratory research*. 2012;13(1):78. doi:10.1186/1465-9921-13-78.
59. van de Pol MA, Lutter R, Smids BS, Weersink EJM, van der Zee JS. Synbiotics reduce allergen-induced T-helper 2 response and improve peak expiratory flow in allergic asthmatics. *Allergy*. 2011;66(1):39-47. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02454.x.
60. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344(5):350-362. doi:10.1056/NEJM200102013440507.
61. Königshoff M, Brandenburger T. *Kurzlehrbuch Biochemie*. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2018.

62. Vizmanos-Lamotte G, Moreno-Galdó A, Muñoz X, Gómez-Ollés S, Gartner S, Cruz MJ. Induced sputum cell count and cytokine profile in atopic and non-atopic children with asthma. *Pediatric pulmonology*. 2013;48(11):1062-1069. doi:10.1002/ppul.22769.
63. Zhou Q, Sun Y, Yao W. Characteristics of the airway inflammation and the relationship to interleukin-17 in severe asthma. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2005;28(9):630-634.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207434/>.
64. Bettiol J, Sele J, Henket M, et al. Cytokine production from sputum cells after allergenic challenge in IgE-mediated asthma. *Allergy*. 2002;57(12):1145-1150. doi:10.1034/j.1398-9995.2002.23586.x.
65. Neveu WA, Allard JL, Raymond DM, et al. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respiratory research*. 2010;11(1):28.
doi:10.1186/1465-9921-11-28.
66. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunological reviews*. 2006;212:86-98.
doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00426.x.
67. Marques CR, Costa RS, Costa GNdO, et al. Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy. *Asthma research and practice*. 2015;1:10.
doi:10.1186/s40733-015-0012-4.
68. Ruß A, Endres S, eds. *Arzneimittel pocket plus 2023*. 19. Auflage. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag GmbH; 2022.

8. Anhang

Die folgenden Tabellen beziehen sich auf Messungen im induzierten Sputum, sofern es nicht anders gekennzeichnet wurde. Fehlende oder nicht auswertbare Daten werden im Folgenden mit „NA“ gekennzeichnet.

Tab. 2: Zelldifferenzierung des induzierten Sputums

	Alveolarmakrophagen in %			Neutrophile Granulozyten in %		
	V5	V16	V18	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	56,50	42,00	44,50	28,00	26,50	25,50
S0002-004	52,00	42,00	19,50	0,00	1,50	15,50
S0001-006	64,50	61,00	51,50	5,50	1,00	6,50
S0008-007	20,50	76,00	53,50	29,00	11,00	7,00
S0010-008	29,00	21,00	15,50	24,50	70,00	57,00
S0012-012	NA	7,00	22,50	NA	51,67	4,00
S0028-013	54,50	52,50	53,50	10,50	41,00	34,50
S0025-016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S0031-017	17,50	65,00	29,50	1,00	0,00	7,00
S0033-020	70,00	68,00	NA	3,50	3,50	NA
S0047-023	54,50	NA	NA	2,50	NA	NA
S0035-024	27,00	9,50	63,50	28,50	69,00	10,50
S0048-027	87,50	89,50	50,00	3,00	3,50	8,00
S0054-029	57,50	79,50	52,00	18,50	18,00	25,50
S0052-030	15,50	NA	NA	2,50	NA	NA
S0060-031	62,00	NA	NA	0,50	NA	NA
S0062-035	30,50	74,50	47,50	28,00	24,50	48,50
S0064-036	46,00	89,50	77,00	41,00	9,50	17,00
S0077-038	30,00	32,50	54,50	44,00	67,50	44,50
S0083-040	52,00	53,50	46,50	37,50	43,50	47,50
S0090-042	20,00	83,50	NA	76,00	13,50	NA
Verum: Pat. Nr.						
S0004-001	58,00	38,50	49,00	32,50	27,00	21,50
S0011-003	40,00	12,50	10,75	35,00	71,50	75,25
S0003-005	19,00	43,50	30,50	73,25	46,75	55,50
S0005-009	NA	10,50	NA	NA	67,00	NA
S0015-010	42,50	48,00	39,50	13,50	37,50	12,50
S0016-011	14,00	78,00	52,50	0,00	7,00	7,00
S0017-014	41,50	61,00	57,00	3,00	25,00	18,00
S0024-015	22,00	33,50	9,50	1,00	6,50	42,50
S0023-018	22,50	79,00	16,50	8,50	7,50	2,50

S0040-019	36,50	NA	69,00	30,50	NA	11,50
S0038-021	29,50	42,00	15,00	16,00	49,00	25,00
S0034-022	24,50	37,50	31,00	12,00	0,00	2,00
S0046-025	26,50	59,00	35,50	17,00	35,50	28,00
S0045-026	NA	80,50	81,00	NA	3,00	2,00
S0055-028	6,50	NA	26,50	0,00	NA	12,50
S0061-032	52,00	68,00	93,00	31,50	30,50	5,50
S0049-033	17,50	53,50	28,50	29,00	44,00	30,00
S0058-034	50,50	79,00	89,00	12,00	15,50	7,50
S0074-037	39,50	NA	NA	14,00	NA	NA
S0071-039	26,00	59,67	35,00	42,00	37,67	35,50
S0088-041	NA	NA	NA	NA	NA	NA

	Eosinophile Granulozyten in %			Basophile Granulozyten in %		
	V5	V16	V18	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	14,50	29,00	29,00	0,00	0,00	0,00
S0002-004	47,00	55,00	62,00	0,00	0,00	0,00
S0001-006	25,00	38,00	40,00	0,00	0,00	0,00
S0008-007	49,00	13,00	37,50	0,00	0,00	0,00
S0010-008	45,50	6,00	23,00	0,00	0,00	0,00
S0012-012	NA	14,50	73,00	NA	0,50	0,00
S0028-013	32,50	6,00	10,50	0,00	0,00	0,00
S0025-016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S0031-017	82,00	34,00	61,00	0,00	0,00	0,00
S0033-020	24,50	27,50	NA	0,00	0,00	NA
S0047-023	43,00	NA	NA	0,00	NA	NA
S0035-024	43,50	19,00	24,00	0,00	0,00	0,00
S0048-027	9,00	5,00	39,00	0,00	0,00	0,00
S0054-029	23,00	2,00	21,50	0,00	0,00	0,00
S0052-030	82,00	NA	NA	0,00	NA	NA
S0060-031	35,50	NA	NA	0,00	NA	NA
S0062-035	40,50	1,50	3,50	0,00	0,00	0,00
S0064-036	12,50	1,00	5,50	0,00	0,00	0,00
S0077-038	25,50	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
S0083-040	10,50	2,50	4,00	0,00	0,00	0,00
S0090-042	3,50	2,00	NA	0,00	0,00	NA
Verum: Pat. Nr.						
S0004-001	6,00	32,00	29,50	1,50	0,00	0,00
S0011-003	21,50	16,50	13,00	1,00	0,00	0,00
S0003-005	6,25	8,50	14,00	0,00	0,00	0,00
S0005-009	NA	21,00	NA	NA	0,00	NA
S0015-010	40,50	10,50	41,00	0,00	0,00	0,00

S0016-011	85,50	7,00	38,50	0,00	0,00	0,00
S0017-014	53,00	13,00	23,50	0,00	0,00	0,00
S0024-015	77,00	59,00	40,00	0,00	0,00	0,00
S0023-018	67,50	12,00	79,50	0,00	0,00	0,00
S0040-019	27,50	NA	15,00	0,00	NA	0,00
S0038-021	51,50	5,00	58,50	0,00	0,00	0,00
S0034-022	63,00	61,50	63,50	0,00	0,00	0,00
S0046-025	55,50	2,50	36,00	0,00	0,00	0,00
S0045-026	NA	16,50	16,50	NA	0,00	0,00
S0055-028	93,50	NA	61,00	0,00	NA	0,00
S0061-032	15,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
S0049-033	52,50	2,50	39,50	0,00	0,00	0,00
S0058-034	35,50	5,50	2,50	0,00	0,00	0,00
S0074-037	43,50	NA	NA	0,00	NA	NA
S0071-039	30,00	0,33	24,00	0,00	0,00	0,00
S0088-041	NA	NA	NA	NA	NA	NA

	Lymphozyten in %		
	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.			
S0006-002	1,00	2,50	1,00
S0002-004	1,50	1,00	3,00
S0001-006	5,00	0,00	2,00
S0008-007	2,00	0,50	1,50
S0010-008	1,00	3,00	4,50
S0012-012	NA	0,50	1,00
S0028-013	2,50	1,00	1,50
S0025-016	NA	NA	NA
S0031-017	0,50	1,00	2,50
S0033-020	2,00	1,00	NA
S0047-023	0,50	NA	NA
S0035-024	1,00	2,50	2,00
S0048-027	0,50	2,00	3,50
S0054-029	1,00	1,00	1,00
S0052-030	0,00	NA	NA
S0060-031	2,00	NA	NA
S0062-035	1,00	0,50	0,50
S0064-036	1,00	0,00	1,00
S0077-038	1,00	0,00	0,50
S0083-040	0,00	1,00	2,00
S0090-042	1,00	1,50	NA
Verum: Pat. Nr.			
S0004-001	2,00	3,00	0,00
S0011-003	3,00	0,00	1,50

S0003-005	2,00	1,25	0,50
S0005-009	NA	1,50	NA
S0015-010	3,50	4,00	7,50
S0016-011	0,50	8,00	2,50
S0017-014	3,00	1,50	1,50
S0024-015	0,00	1,50	8,00
S0023-018	2,50	1,50	1,50
S0040-019	6,00	NA	4,50
S0038-021	3,00	3,50	2,00
S0034-022	0,50	1,00	3,50
S0046-025	1,50	2,50	6,50
S0045-026	NA	0,00	0,50
S0055-028	0,00	NA	0,00
S0061-032	2,00	1,00	1,00
S0049-033	1,00	0,50	1,50
S0058-034	2,00	0,00	1,50
S0074-037	3,00	NA	NA
S0071-039	2,00	2,33	5,50
S0088-041	NA	NA	NA

Tab. 3: Konzentration von ECP im induzierten Sputum

	ECP in µg/l		
	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.			
S0006-002	648	464	1272
S0002-004	273,6	22,48	2216
S0001-006	130,4	<16	58,24
S0008-007	8880	69,36	5720
S0010-008	4176	387,2	1520
S0012-012	88,8	76,08	97,6
S0028-013	182,4	45,0	1224
S0025-016	<16	<16	<16
S0031-017	180,8	36,08	9840
S0033-020	166,4	<16	158,4
S0047-023	179,2	<16	<16
S0035-024	1144	616	197,6
S0048-027	142,4	55,76	1288
S0054-029	777,6	44	632,8
S0052-030	187,2	107,2	123,2
S0060-031	39,2	37,36	120,8
S0062-035	195,2	113,6	171,2
S0064-036	317,6	120	563,2
S0077-038	254,4	46,64	144

S0083-040	332,8	203,2	687,2
S0090-042	281,6	82,4	NA
Verum: Pat. Nr.			
S0004-001	335,2	1368	257,6
S0011-003	3240	2000	2304
S0003-005	14880	533,6	11040
S0005-009	<16	228	182,4
S0015-010	616	1224	4256
S0016-011	816	58,16	104,8
S0017-014	1776	41,04	580
S0024-015	3456	202,4	15840
S0023-018	2472	36,48	500
S0040-019	329,6	26,48	259,2
S0038-021	6488	1064	355,2
S0034-022	238,4	NA	48,64
S0046-025	4240	115,2	1168
S0045-026	38,72	17,6	140
S0055-028	348	29,92	1464
S0061-032	268,8	101,6	87,2
S0049-033	1440	167,2	2328
S0058-034	551,2	45,2	1544
S0074-037	17,2	NA	NA
S0071-039	758,4	<16	40,48
S0088-041	<16	<16	34,48

Tab. 4: Konzentration der Zytokine im induzierten Sputum

	IL-10 in pg/ml			IL-13 in pg/ml		
	V5	V16	V18	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	3,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0002-004	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,23
S0001-006	5,41	2,29	0,00	0,00	41,97	0,00
S0008-007	3,93	0,44	0,00	10,86	0,00	0,00
S0010-008	0,85	0,86	2,10	0,00	0,00	0,00
S0012-012	0,00	0,00	0,00	70,64	0,00	0,00
S0028-013	0,00	3,71	1,42	0,00	0,00	0,00
S0025-016	0,00	0,00	2,71	0,00	0,00	0,00
S0031-017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0033-020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0047-023	0,00	6,18	0,12	76,59	0,00	79,19
S0035-024	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0048-027	0,00	4,82	1,00	0,00	68,79	46,71

S0054-029	0,46	0,00	2,88		16,39	0,00	55,53
S0052-030	0,00	0,00	0,00		85,04	194,36	0,00
S0060-031	0,00	1,51	0,00		63,17	0,00	72,79
S0062-035	0,00	5,93	0,00		0,00	0,00	0,00
S0064-036	0,00	0,00	2,01		0,00	0,00	0,00
S0077-038	0,00	1,54	0,00		0,00	0,00	0,00
S0083-040	0,91	1,50	1,68		0,00	0,00	0,00
S0090-042	5,27	0,00	NA		0,00	0,00	NA
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	6,63	7,16	0,00		0,00	0,00	16,18
S0011-003	2,93	14,23	1,87		0,00	0,00	0,00
S0003-005	4,12	2,98	11,32		0,00	0,00	0,00
S0005-009	1,68	2,92	1,39		52,35	0,00	0,00
S0015-010	0,00	4,00	4,67		0,00	0,00	0,00
S0016-011	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0017-014	0,00	1,12	0,00		0,00	0,00	0,00
S0024-015	0,00	2,76	0,00		0,00	0,00	0,00
S0023-018	0,00	0,00	0,00		50,72	38,38	0,00
S0040-019	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0038-021	0,00	2,12	1,48		0,00	0,00	0,00
S0034-022	2,50	0,00	0,00		51,47	0,00	0,00
S0046-025	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0045-026	0,00	3,48	0,00		0,00	66,33	34,89
S0055-028	0,00	0,00	0,00		105,57	135,23	0,00
S0061-032	27,61	0,00	0,00		0,00	0,00	22,51
S0049-033	14,75	0,00	0,00		0,00	53,30	32,93
S0058-034	4,90	6,05	0,00		0,00	0,00	0,00
S0074-037	0,00	NA	NA		0,00	NA	NA
S0071-039	0,00	3,26	0,00		59,98	135,12	146,85
S0088-041	2,03	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00

	IL-17 in pg/ml				IL-5 in pg/ml		
	V5	V16	V18		V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.							
S0006-002	0,00	0,00	0,00		2,04	0,00	0,00
S0002-004	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0001-006	0,00	0,00	0,00		1,27	0,00	2,98
S0008-007	0,00	0,00	0,00		11,18	0,00	0,39
S0010-008	0,00	7,38	0,00		18,20	0,00	2,56
S0012-012	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0028-013	0,00	4,98	0,00		10,52	0,00	111,71
S0025-016	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0031-017	0,00	0,00	0,00		0,75	0,00	84,48
S0033-020	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00

S0047-023	0,00	0,00	39,04		2,62	0,19	3,58
S0035-024	0,00	0,00	0,00		6,85	0,25	0,00
S0048-027	0,00	0,98	0,00		0,00	0,00	16,45
S0054-029	2,22	0,00	7,01		1,22	0,00	5,94
S0052-030	0,00	8,70	0,00		0,00	0,00	0,00
S0060-031	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	3,69
S0062-035	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	5,03
S0064-036	0,00	0,00	0,00		0,30	0,00	20,60
S0077-038	0,00	0,00	0,00		3,66	0,00	4,81
S0083-040	0,00	0,00	1,56		3,55	0,00	6,15
S0090-042	0,00	0,00	NA		0,00	0,00	NA
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	1,25	0,52	0,00		1,98	5,91	0,00
S0011-003	0,00	19,26	4,10		24,69	0,01	1,24
S0003-005	0,00	0,00	0,00		127,37	0,19	27,47
S0005-009	10,35	1,93	0,00		0,00	0,00	0,00
S0015-010	0,00	0,00	0,00		4,92	16,94	83,34
S0016-011	0,00	0,00	0,00		3,79	0,00	0,00
S0017-014	0,00	0,00	0,00		37,38	0,00	30,66
S0024-015	0,00	0,00	0,00		1,64	0,00	45,33
S0023-018	0,00	0,00	0,00		4,17	0,00	0,00
S0040-019	0,00	0,00	0,00		6,21	0,00	0,00
S0038-021	0,00	0,00	0,00		7,65	0,00	0,00
S0034-022	0,00	0,00	0,00		2,94	0,00	13,28
S0046-025	0,00	0,00	0,00		42,45	0,00	6,81
S0045-026	0,00	0,00	0,00		0,00	0,70	2,34
S0055-028	2,43	0,88	0,00		0,61	3,23	9,91
S0061-032	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,66
S0049-033	26,65	0,00	0,00		9,93	0,00	10,74
S0058-034	0,00	1,89	0,00		4,46	0,35	30,38
S0074-037	0,00	NA	NA		0,00	NA	NA
S0071-039	0,00	0,00	0,00		1,52	0,00	0,00
S0088-041	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00

	IFN- γ in pg/ml				TGF β in pg/ml		
	V5	V16	V18		V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.							
S0006-002	0,00	0,00	0,00		870,14	769,71	1351,98
S0002-004	0,00	0,00	0,00		398,36	273,98	1230,56
S0001-006	0,00	0,00	0,00		299,31	365,74	337,05
S0008-007	0,00	0,00	0,00		1852,09	467,65	355,40
S0010-008	0,00	0,00	0,00		832,28	979,05	552,29
S0012-012	0,00	0,00	0,00		636,60	504,05	493,51
S0028-013	0,00	0,00	0,00		522,79	474,83	1351,35

S0025-016	0,00	0,00	0,00		250,41	314,79	295,70
S0031-017	0,00	0,00	0,00		468,05	637,38	2128,94
S0033-020	0,00	0,00	0,00		149,98	474,54	725,67
S0047-023	0,00	0,00	0,00		553,54	0,00	306,65
S0035-024	0,00	0,00	0,00		776,52	1006,35	539,63
S0048-027	0,00	0,00	0,00		349,02	454,97	514,63
S0054-029	0,00	0,00	0,00		645,06	716,62	405,52
S0052-030	0,00	0,00	0,00		543,01	372,62	609,81
S0060-031	0,00	0,00	0,00		415,46	273,21	736,95
S0062-035	0,00	0,00	0,00		475,08	426,49	93,38
S0064-036	0,00	0,00	0,00		970,03	348,53	613,67
S0077-038	0,00	0,00	0,00		351,16	1106,25	612,34
S0083-040	0,00	0,00	0,00		648,88	1044,59	580,59
S0090-042	0,00	0,00	NA		2039,40	937,66	NA
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	3,05	0,00	0,00		763,18	790,67	499,96
S0011-003	0,00	0,00	0,00		1327,44	839,35	732,93
S0003-005	0,00	0,00	0,00		3672,99	317,40	2168,77
S0005-009	0,00	0,00	0,00		230,31	428,56	368,24
S0015-010	0,00	0,00	0,00		259,21	277,87	447,08
S0016-011	0,00	0,00	0,00		488,31	517,65	588,29
S0017-014	0,00	0,00	0,00		530,75	212,68	469,40
S0024-015	0,00	0,00	0,00		792,65	691,98	2316,24
S0023-018	0,00	0,00	0,00		1055,42	538,41	635,92
S0040-019	0,00	0,00	0,00		832,77	686,76	869,56
S0038-021	0,00	0,00	0,00		1271,68	1807,67	282,50
S0034-022	0,00	0,00	0,00		585,91	311,74	431,12
S0046-025	0,00	0,00	0,00		454,62	328,97	503,98
S0045-026	0,00	0,00	0,00		690,19	405,06	747,19
S0055-028	0,00	0,00	0,00		463,63	452,22	479,09
S0061-032	0,00	0,00	0,00		638,98	391,28	1029,94
S0049-033	0,00	0,00	0,00		728,60	359,09	801,47
S0058-034	0,00	0,00	0,00		658,90	536,33	653,42
S0074-037	0,00	NA	NA		261,94	NA	NA
S0071-039	0,00	0,00	0,00		785,38	657,38	388,65
S0088-041	4,05	0,00	0,00		356,89	281,79	284,24

Tab. 5: Konzentration der RNA im induzierten Sputum

	FoxP3 in 2 ^{-ddCT}			GATA3 in 2 ^{-ddCT}		
	V5	V16	V18	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	3,67	2,73	5,75	1,19	0,56	1,60
S0002-004	NA	6,21	4,96	NA	NA	0,41
S0001-006	5,44	1,24	4,27	NA	NA	1,01
S0008-007	1,15	0,23	0,28	0,45	2,99	0,72
S0010-008	4,42	0,97	5,70	0,65	0,81	0,41
S0012-012	NA	1,11	1,80	NA	1,13	NA
S0028-013	3,77	1,36	8,42	1,27	0,61	0,69
S0025-016	NA	1,40	NA	NA	NA	NA
S0031-017	NA	0,32	2,51	NA	4,20	0,46
S0033-020	0,19	NA	NA	2,02	NA	NA
S0047-023	2,76	NA	NA	1,62	NA	NA
S0035-024	2,35	0,30	3,74	0,87	0,50	1,57
S0048-027	NA	0,91	4,10	NA	0,93	0,61
S0054-029	1,09	0,88	6,13	1,88	1,82	0,57
S0052-030	NA	0,42	0,52	NA	1,30	0,19
S0060-031	1,36	0,16	1,05	NA	NA	0,92
S0062-035	NA	0,32	2,94	NA	1,82	0,37
S0064-036	0,45	0,55	2,75	1,17	1,54	1,28
S0077-038	NA	1,71	3,47	NA	1,32	1,32
S0083-040	NA	1,46	4,12	NA	0,86	1,66
S0090-042	1,44	1,34	NA	0,51	0,90	NA
Verum: Pat. Nr.						
S0004-001	2,74	1,43	1,62	0,83	0,43	0,37
S0011-003	7,03	1,59	1,16	0,74	0,09	0,06
S0003-005	0,61	0,19	0,18	0,66	0,57	0,60
S0005-009	NA	0,52	0,28	NA	0,46	0,08
S0015-010	4,79	6,64	10,49	1,64	1,85	2,05
S0016-011	5,66	11,29	5,95	0,83	2,48	1,50
S0017-014	14,37	0,92	1,35	1,39	1,66	1,65
S0024-015	0,26	0,30	2,91	0,03	0,13	0,20
S0023-018	0,76	2,42	1,24	0,21	NA	NA
S0040-019	7,75	NA	NA	1,53	NA	NA
S0038-021	0,17	3,18	0,54	0,32	1,07	0,20
S0034-022	1,45	NA	NA	NA	NA	NA
S0046-025	4,80	0,80	5,92	0,54	1,02	1,80
S0045-026	NA	0,30	0,42	NA	2,13	1,23
S0055-028	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S0061-032	2,69	0,92	0,98	1,67	1,70	3,89
S0049-033	1,73	2,70	8,57	0,35	2,01	0,88

S0058-034	2,04	0,41	3,46		0,75	NA	1,12
S0074-037	4,58	NA	NA		NA	NA	NA
S0071-039	7,88	3,95	NA		1,41	1,01	NA
S0088-041	NA	NA	0,29		NA	NA	NA

	T-bet in 2^{-ddCT}				IL-5 in 2^{-ddCT}		
	V5	V16	V18		V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.							
S0006-002	0,73	1,95	2,06		5,00	3,93	7,37
S0002-004	NA	NA	0,90		NA	0,21	6,62
S0001-006	NA	NA	1,44		1,50	0,26	7,67
S0008-007	0,62	0,42	0,71		1,25	0,51	0,50
S0010-008	0,83	1,30	1,14		6,18	1,42	7,46
S0012-012	NA	0,97	NA		NA	3,98	2,61
S0028-013	0,58	0,49	0,91		6,04	1,90	8,28
S0025-016	NA	NA	NA		NA	0,29	NA
S0031-017	NA	2,20	1,50		NA	1,96	3,94
S0033-020	0,60	NA	NA		1,86	NA	NA
S0047-023	0,36	NA	NA		4,51	NA	NA
S0035-024	0,59	5,67	0,84		2,80	0,58	4,66
S0048-027	NA	0,16	0,52		NA	1,15	4,74
S0054-029	1,48	0,46	1,28		1,54	1,71	6,53
S0052-030	NA	2,48	0,43		NA	0,15	0,70
S0060-031	NA	NA	0,28		0,52	0,08	1,45
S0062-035	NA	0,98	1,25		NA	0,79	2,87
S0064-036	0,38	0,42	0,64		0,73	0,78	3,39
S0077-038	NA	0,99	1,11		NA	2,74	3,32
S0083-040	NA	1,35	2,07		NA	1,06	6,42
S0090-042	1,06	1,09	NA		2,27	1,54	NA
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	2,43	0,62	0,79		5,54	1,00	1,71
S0011-003	0,47	0,99	0,90		12,66	3,99	0,94
S0003-005	0,68	0,56	0,88		2,15	0,36	0,29
S0005-009	NA	1,68	0,55		NA	1,04	2,08
S0015-010	1,24	2,22	0,82		7,94	9,91	15,52
S0016-011	1,62	10,99	2,23		7,29	15,99	10,74
S0017-014	2,74	0,68	1,04		16,74	1,75	1,63
S0024-015	0,22	0,07	0,24		0,35	2,49	4,90
S0023-018	0,51	NA	NA		1,29	0,02	2,27
S0040-019	0,88	NA	NA		12,58	NA	NA
S0038-021	0,63	1,09	3,18		0,09	4,00	0,98
S0034-022	NA	NA	NA		4,18	NA	NA
S0046-025	1,66	0,53	2,04		8,72	1,26	8,80
S0045-026	NA	0,20	0,17		NA	0,30	0,86

S0055-028	NA	NA	NA		NA	NA	NA
S0061-032	2,49	3,49	0,48		3,46	1,22	1,03
S0049-033	0,99	1,00	1,47		3,12	3,03	11,02
S0058-034	0,45	NA	0,65		3,26	0,08	2,92
S0074-037	NA	NA	NA		0,40	NA	NA
S0071-039	8,89	5,11	NA		18,76	4,53	NA
S0088-041	NA	NA	NA		NA	NA	0,22

	IL-10 in 2^{dd}CT				IL-13 in 2^{dd}CT		
	V5	V16	V18		V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.							
S0006-002	1,49	1,28	1,26		7,06	1,13	46,19
S0002-004	NA	NA	0,66		NA	27,44	46,67
S0001-006	NA	NA	1,00		11,63	1,02	16,61
S0008-007	2,94	0,17	2,70		18,89	2,70	7,71
S0010-008	1,87	0,98	1,58		24,14	0,08	16,37
S0012-012	NA	0,85	NA		NA	0,66	7,50
S0028-013	0,86	0,48	1,67		13,87	0,08	47,64
S0025-016	NA	NA	NA		NA	4,62	NA
S0031-017	NA	0,61	1,78		NA	NA	17,21
S0033-020	2,25	NA	NA		0,53	NA	NA
S0047-023	1,25	NA	NA		16,34	NA	NA
S0035-024	1,44	4,40	0,83		20,69	0,40	2,17
S0048-027	NA	1,35	1,31		NA	0,95	12,18
S0054-029	1,42	0,78	0,27		1,32	0,07	8,17
S0052-030	NA	0,93	1,97		NA	0,60	2,80
S0060-031	NA	NA	1,27		4,45	3,04	40,81
S0062-035	NA	0,96	0,54		NA	0,37	10,82
S0064-036	0,68	0,33	0,76		0,76	0,12	21,38
S0077-038	NA	0,67	1,14		NA	0,54	1,95
S0083-040	NA	0,89	0,78		NA	0,35	3,47
S0090-042	1,71	3,34	NA		2,11	1,81	NA
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	2,71	1,54	0,76		5,37	6,38	6,12
S0011-003	1,97	2,14	0,91		26,26	1,20	12,81
S0003-005	4,00	1,35	5,71		24,56	0,35	4,43
S0005-009	NA	1,37	1,37		NA	0,12	2,51
S0015-010	1,52	1,45	1,04		26,83	23,41	85,81
S0016-011	1,11	1,46	0,98		41,18	57,13	22,73
S0017-014	0,99	0,53	1,01		46,63	0,20	10,33
S0024-015	1,89	0,60	1,76		1,42	0,73	16,32
S0023-018	1,06	NA	NA		61,82	2,08	105,01
S0040-019	2,15	NA	NA		32,25	NA	NA
S0038-021	4,65	7,56	1,51		0,80	2,39	8,00

S0034-022	NA	NA	NA		22,17	NA	NA
S0046-025	0,56	0,17	0,33		32,83	1,99	20,82
S0045-026	NA	0,42	0,39		NA	2,36	3,90
S0055-028	NA	NA	NA		NA	NA	NA
S0061-032	0,87	0,71	0,55		9,46	0,73	0,13
S0049-033	1,55	1,81	1,18		8,89	0,74	5,56
S0058-034	1,12	NA	0,84		14,96	1,18	5,93
S0074-037	NA	NA	NA		14,88	NA	NA
S0071-039	1,15	2,32	NA		12,22	2,12	NA
S0088-041	NA	NA	NA		NA	NA	0,86

	IFN- γ in 2 ^{-ddCT}			TGF β in 2 ^{-ddCT}		
	V5	V16	V18	V5	V16	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	2,67	2,35	1,73	0,79	0,79	1,31
S0002-004	NA	NA	3,88	NA	NA	0,79
S0001-006	NA	NA	9,16	NA	NA	0,44
S0008-007	0,15	0,78	1,15	1,43	0,22	0,40
S0010-008	1,51	4,54	1,96	1,33	0,39	1,01
S0012-012	NA	5,49	NA	NA	0,93	NA
S0028-013	0,57	0,59	1,72	0,93	0,84	1,14
S0025-016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S0031-017	NA	5,78	1,81	NA	0,33	1,06
S0033-020	1,24	NA	NA	0,89	NA	NA
S0047-023	0,47	NA	NA	0,56	NA	NA
S0035-024	0,60	8,06	1,08	1,68	2,28	0,58
S0048-027	NA	0,08	0,30	NA	0,74	0,51
S0054-029	3,54	0,61	2,76	1,34	0,91	0,50
S0052-030	NA	0,15	1,09	NA	1,37	2,35
S0060-031	NA	NA	0,71	NA	NA	0,87
S0062-035	NA	0,27	1,10	NA	1,08	0,89
S0064-036	0,35	0,09	0,61	1,63	1,53	1,18
S0077-038	NA	0,99	0,71	NA	1,82	1,18
S0083-040	NA	2,44	4,05	NA	1,07	1,90
S0090-042	0,82	0,68	NA	0,35	1,04	NA
Verum: Pat. Nr.						
S0004-001	6,74	1,47	1,13	2,38	1,42	1,20
S0011-003	0,52	0,88	0,72	0,97	5,13	1,09
S0003-005	0,55	0,52	1,39	2,24	0,98	1,78
S0005-009	NA	1,61	1,82	NA	1,38	1,97
S0015-010	0,97	1,13	1,46	0,86	1,06	0,84
S0016-011	1,67	9,41	5,91	0,56	0,91	0,56
S0017-014	2,04	0,95	1,75	1,76	0,74	0,82
S0024-015	0,37	0,09	0,50	1,13	1,37	0,94

S0023-018	0,48	NA	NA		0,45	NA	NA
S0040-019	3,24	NA	NA		0,93	NA	NA
S0038-021	0,11	0,74	14,56		1,18	1,39	0,78
S0034-022	NA	NA	NA		NA	NA	NA
S0046-025	1,06	0,46	2,92		0,82	0,54	0,64
S0045-026	NA	0,32	0,48		NA	0,54	0,46
S0055-028	NA	NA	NA		NA	NA	NA
S0061-032	0,77	4,91	1,38		0,96	1,44	1,26
S0049-033	4,37	0,72	0,69		1,45	1,49	0,62
S0058-034	2,04	NA	0,57		1,79	NA	0,96
S0074-037	NA	NA	NA		NA	NA	NA
S0071-039	13,63	6,96	NA		0,25	0,97	NA
S0088-041	NA	NA	NA		NA	NA	NA

Tab. 6: Konzentration der Zytokine im Blut

	IL-10 im Blut in fg/ml			IL-17 im Blut in fg/ml		
	V4	V5	V18	V4	V5	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	0,00	559,83	118,35	0,00	351,03	186,33
S0002-004	540,71	602,73	412,89	1116,84	910,26	811,78
S0001-006	129,87	264,36	429,44	112,44	0,00	341,23
S0008-007	465,36	339,56	299,03	54,10	274,28	156,22
S0010-008	315,08	338,99	217,59	0,00	0,00	85,16
S0012-012	205,13	249,13	166,03	62,66	114,97	182,53
S0028-013	153,65	344,12	336,27	109,31	52,52	0,00
S0025-016	367,51	535,06	230,87	0,00	0,00	0,00
S0031-017	912,91	1048,47	2986,60	121,47	325,22	366,41
S0033-020	97,00	271,72	114,38	0,00	0,00	0,00
S0047-023	190,19	200,34	735,61	0,00	0,00	103,10
S0035-024	312,43	291,74	444,06	250,28	373,82	431,14
S0048-027	390,62	365,31	362,68	18,38	91,99	0,00
S0054-029	439,04	263,98	152,69	452,69	410,25	388,57
S0052-030	284,82	229,55	132,35	93,76	148,01	0,00
S0060-031	618,09	501,33	479,43	128,47	64,36	66,87
S0062-035	68,69	323,01	169,73	342,81	203,67	187,39
S0064-036	148,32	196,08	79,62	1015,87	907,73	1320,52
S0077-038	234,64	172,25	214,39	437,91	584,50	391,11
S0083-040	393,73	98,14	39,33	1485,19	1724,23	630,41
S0090-042	0,00	152,77	0,00	362,91	521,96	436,90
Verum: Pat. Nr.						
S0004-001	479,64	491,18	632,60	0,00	110,82	0,00
S0011-003	284,60	117,12	544,06	0,00	0,00	185,50

S0003-005	498,69	548,86	0,00	0,00	0,00	0,00
S0005-009	194,03	131,14	305,96	0,00	0,00	0,00
S0015-010	148,09	0,00	143,51	0,00	0,00	0,00
S0016-011	263,55	308,15	380,19	30,64	0,00	0,00
S0017-014	662,90	279,94	197,56	356,35	356,98	0,00
S0024-015	134,82	132,30	61,59	0,00	0,00	0,00
S0023-018	278,30	1257,24	1615,13	0,00	692,25	1135,88
S0040-019	103,82	158,33	262,16	0,00	0,00	0,00
S0038-021	310,06	355,11	358,78	55,95	0,00	0,00
S0034-022	152,98	0,00	42,84	172,25	0,00	0,00
S0046-025	193,94	121,92	179,87	161,65	203,93	189,66
S0045-026	182,05	410,68	143,33	0,00	0,00	30,60
S0055-028	425,23	398,66	767,11	0,00	0,00	0,00
S0061-032	280,15	428,68	288,01	38,39	119,24	120,31
S0049-033	0,00	NA	0,00	151,17	NA	182,82
S0058-034	505,60	249,27	168,00	413,74	143,74	265,02
S0074-037	454,33	593,99	1293,93	249,24	215,07	247,09
S0071-039	650,94	364,08	972,20	898,42	589,94	774,01
S0088-041	0,00	0,00	0,00	500,71	488,21	465,93

	IL-5 im Blut in fg/ml		
	V4	V5	V18
Placebo: Pat. Nr.			
S0006-002	0,00	77,20	0,00
S0002-004	0,00	26226,10	141,11
S0001-006	0,00	2538,33	482,81
S0008-007	0,00	0,00	26,30
S0010-008	40,42	2261,23	0,00
S0012-012	0,00	0,00	0,00
S0028-013	0,00	1297,03	3309,03
S0025-016	0,00	1263,56	330,67
S0031-017	0,00	3530,08	9703,12
S0033-020	0,00	0,00	0,00
S0047-023	0,00	8561,82	4898,13
S0035-024	0,00	0,00	0,00
S0048-027	620,28	0,00	2741,04
S0054-029	0,00	0,00	207,48
S0052-030	0,00	0,00	0,00
S0060-031	0,00	0,00	710,02
S0062-035	0,00	76,87	1067,81
S0064-036	0,00	0,00	0,00
S0077-038	0,00	149,57	0,00
S0083-040	0,00	0,00	0,00
S0090-042	0,00	0,00	232,19

Verum: Pat. Nr.			
S0004-001	0,00	0,00	0,00
S0011-003	0,00	51,06	1800,82
S0003-005	0,00	657,21	0,00
S0005-009	0,00	969,99	3918,57
S0015-010	0,00	0,00	605,43
S0016-011	0,00	1372,59	0,00
S0017-014	0,00	1888,60	495,88
S0024-015	0,00	180,94	0,00
S0023-018	0,00	3938,55	884,31
S0040-019	0,00	1506,47	0,00
S0038-021	0,00	211,69	132,92
S0034-022	0,00	4800,48	1819,85
S0046-025	0,00	0,00	0,00
S0045-026	0,00	0,00	0,00
S0055-028	0,00	0,00	0,00
S0061-032	0,00	0,00	0,00
S0049-033	0,00	NA	512,81
S0058-034	0,00	0,00	0,00
S0074-037	0,00	4826,95	0,00
S0071-039	0,00	25,33	137,94
S0088-041	0,00	0,00	0,00

	IL-6 im Blut in fg/ml		
	V4	V5	V18
Placebo: Pat. Nr.			
S0006-002	132,58	3099,27	1702,29
S0002-004	1697,02	1847,46	1996,90
S0001-006	3452,80	2836,19	3502,13
S0008-007	869,12	1325,18	1956,57
S0010-008	5920,16	5267,91	2781,54
S0012-012	1792,73	2422,16	3084,02
S0028-013	1365,48	1326,13	2006,09
S0025-016	3347,65	1108,87	852,07
S0031-017	8741,49	8909,10	20767,09
S0033-020	7083,26	305,28	931,68
S0047-023	3432,48	1477,30	2986,53
S0035-024	3094,25	4652,03	2761,49
S0048-027	1502,54	1261,83	1181,60
S0054-029	5529,60	5867,09	0,00
S0052-030	2190,92	1864,62	585,81
S0060-031	3839,85	1123,98	502,26
S0062-035	2122,19	3084,13	1634,91
S0064-036	1416,70	800,38	1746,68
S0077-038	976,44	1566,12	365,00

S0083-040	1049,12	939,16	4012,51
S0090-042	102,70	118,24	226,97
Verum: Pat. Nr.			
S0004-001	3842,22	1463,22	4075,17
S0011-003	734,24	1522,97	6110,02
S0003-005	575,73	3576,33	190,36
S0005-009	785,12	628,97	680,86
S0015-010	989,40	271,71	1365,73
S0016-011	2188,40	1685,47	6472,01
S0017-014	1488,39	2609,24	2012,88
S0024-015	1347,64	1365,66	484,21
S0023-018	1067,75	7078,34	5646,47
S0040-019	3878,54	4687,00	5369,77
S0038-021	477,51	639,54	1027,14
S0034-022	833,78	1748,54	599,56
S0046-025	5249,87	425,15	0,00
S0045-026	830,34	1324,60	5089,86
S0055-028	2658,04	1415,75	1381,90
S0061-032	4567,02	4157,61	1844,53
S0049-033	1758,03	NA	2835,63
S0058-034	1863,43	965,84	1564,50
S0074-037	3022,12	2620,56	14946,85
S0071-039	2451,71	1390,05	7185,20
S0088-041	872,98	843,67	743,55

	IFN- γ im Blut in fg/ml			TNF- α im Blut in fg/ml		
	V4	V5	V18	V4	V5	V18
Placebo: Pat. Nr.						
S0006-002	0,00	0,00	0,00	0,00	1041,07	0,00
S0002-004	0,00	0,00	0,00	691,11	608,84	500,08
S0001-006	0,00	0,00	0,00	134,51	0,00	685,60
S0008-007	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0010-008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0012-012	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0028-013	0,00	0,00	0,00	175,36	154,53	758,62
S0025-016	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0031-017	0,00	0,00	0,00	1125,33	1342,39	3355,40
S0033-020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0047-023	0,00	0,00	0,00	203,02	165,74	182,98
S0035-024	0,00	0,00	0,00	1418,55	1625,44	1147,90
S0048-027	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0054-029	0,00	0,00	0,00	290,64	71,37	210,54
S0052-030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S0060-031	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

S0062-035	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0064-036	0,00	0,00	0,00		121,34	389,18	402,60
S0077-038	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0083-040	0,00	0,00	0,00		3060,11	2477,30	571,72
S0090-042	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
Verum: Pat. Nr.							
S0004-001	0,00	0,00	0,00		0,00	290,40	325,02
S0011-003	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	349,10
S0003-005	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0005-009	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0015-010	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0016-011	0,00	0,00	0,00		282,31	424,54	208,73
S0017-014	0,00	0,00	0,00		719,23	649,04	406,43
S0024-015	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	220,48
S0023-018	0,00	0,00	0,00		0,00	1838,07	2346,47
S0040-019	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0038-021	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0034-022	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0046-025	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
S0045-026	0,00	0,00	0,00		137,33	112,87	0,00
S0055-028	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	182,94
S0061-032	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	187,59
S0049-033	0,00	NA	0,00		58,44	NA	75,99
S0058-034	0,00	0,00	0,00		76,16	183,88	185,04
S0074-037	0,00	0,00	246,13		532,76	828,27	297,77
S0071-039	0,00	0,00	0,00		301,61	149,29	136,14
S0088-041	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	142,32

9. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Ralf Schubert und Prof. Dr. med. Stefan Zielen für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation. Darüber hinaus bedanke ich mich für die großartige Betreuung während der klinischen Phase der Studie bis zum Abschluss dieser Dissertationsschrift in fachlicher und menschlicher Hinsicht.

Des Weiteren möchte ich Petra Schön, Katrin Krug und Gaby Gottwald für ihre engagierte Unterstützung im Labor danken, die maßgeblich zum Gelingen der methodischen Untersuchungen beigetragen haben.

Außerdem möchte ich meiner Mitdoktorandin Anna Jacobs für die gute und zuverlässige Zusammenarbeit danken. Meiner Vorgängerin Lia Kriszeleit danke ich für die gute Einarbeitung.

Meinem Freund Anatoli Kasanski danke ich herzlich für die Hilfe bei technischen Fragen und die geduldige Unterstützung. Ebenfalls möchte ich meiner Familie für den verlässlichen emotionalen Beistand danken, sowie meinem Bruder Stefan Schließmeyer darüber hinaus für die Korrekturlesung.

Zu guter Letzt gilt mein Dank den Probanden der Studie, die Zeit und Geduld aufgewandt haben, um an dieser Studie teilzunehmen.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchung zur Wirkung von Tregalizumab auf die allergeninduzierte Atemwegsentzündung bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie

in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Ralf Schubert mit Unterstützung durch Prof. Dr. Stefan Zielen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)