

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

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose  
Leiter Prof. Dr. med. Stefan Zielen

**Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit einer autologen E.coli  
Autovaccine-Therapie bei Hausstaubmilben-Allergikern mit  
intermittierendem oder mildem persistierendem Asthma bronchiale**

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

Vorgelegt von  
Sandra Voß  
geboren am 07.08.1985 in Bonn

Frankfurt am Main 2012

Studiendekan:	Herr Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Herr Prof. Dr. med. Stefan Zielen
Korreferent:	Herr Prof. Dr. Dr. David Groneberg
Tag der mündlichen Prüfung:	04.09.2012

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1 Hausstaubmilben-Allergie	5
1.2 Asthma bronchiale	6
1.3 Bronchiale Allergenprovokation	7
1.4 Autovaccine	8
1.5 Zielsetzung	10

## 2 Probanden, Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv	12
2.2 Screening	14
2.3 Ablauf der Visiten	15
2.4 Pricktest	17
2.5 Blutuntersuchung	17
2.6 Messung des exhalativen Stickstoffmonoxids (eNO)	17
2.7 Bronchiale Provokationen	18
2.7.1 Methacholin-Provokation	19
2.7.2. Spezifische Mehrstufenprovokation mit Hausstaubmilbe	20
2.7.3 Bestimmung der PD <sub>15</sub>	21
2.8 CO-Messung	22
2.9 Statistische Auswertung	22

## 3 Ergebnisse

3.1 Primärer Zielparameter	23
3.1.1 Exhalatives NO (eNO)	23
3.2 Sekundäre Zielparameter	26
3.2.1 Klinische Symptome und Verträglichkeit der Autovaccine	26
3.2.2 Bronchiale Hyperreagibilität	27
3.2.3 Allergie-Labor	29
3.2.4 Allergenprovokation	31
3.2.4.1 Spirometrie	31
3.2.4.2 PD <sub>15</sub> -Dosis	32
3.2.4.3 Maximaler Abfall der FEV <sub>1</sub> nach Provokation	33

3.2.5 Salbutamol-Verbrauch und Spätreaktion (LAR)	34
<b>4 Diskussion</b>	<b>38</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>6 Summary</b>	<b>50</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>60</b>
<b>12 Anhang</b>	<b>61</b>
12.1 Einzelwerte eNO	61
12.2 Verträglichkeit der Autovaccine	62
12.3 Einzelwerte Methacholin-Provokation	63
12.4 Einzelwerte Gesamt-IgE	64
12.5 Einzelwerte Spirometrien	65
12.6 Probandeninformation und Einverständniserklärung	67
12.7 Ablaufschema	70
12.8 Studiendesign	71
12.9 Probanden-Tagebuch	72
12.9 Ethikvotum und Amendment	73
<b>13 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>76</b>
<b>14 Lebenslauf</b>	<b>77</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergie

Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals 1906 von Clemens Freiherr von Pirquet eingeführt und beschrieb damals die Überempfindlichkeitsreaktion auf eine Vakzinierung [1]. Heute versteht man als Allergie die klinische Manifestation einer immunologisch vermittelten Reaktion auf primär unschädliche exogene Substanzen (Allergene) [2]. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge sind in den Industrienationen inzwischen bis zu 25% der Bevölkerung von Allergien betroffen. Klinisch von Bedeutung sind unter den allergischen Erkrankungen die Rhinokonjunktivitis allergica, das Asthma bronchiale und die atopische Dermatitis zählen. Als prädisponierend für die Entwicklung einer Allergie gelten die genetische Belastung, eine frühe Allergenexposition beispielsweise mit Kuhmilch oder die frühe Exposition mit Adjuvantien wie Tabakrauch [3]. Der Hygienetheorie zufolge besteht unter Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen und somit einem breiteren Spektrum an Mikroorganismen ausgesetzt sind, eine geringere Prävalenz für Atopien und allergisches Asthma [4].

Prinzipiell wird zwischen den saisonalen und den perennialen Allergien unterschieden. Während die Pollen oder Schimmelpilze meist nur saisonal Beschwerden verursachen, können Patienten mit Allergien auf Hausstaubmilben oder Tierepithelien ganzjährig unter Symptomen leiden.

Bei der allergischen Reaktion handelt sich nach Coombs und Gell um eine Soforttyp-Reaktion (Typ I), die durch IgE-Antikörper vermittelt wird. Nach Erstkontakt mit dem jeweiligen Allergen kommt es zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen dieses. Erfolgt ein zweiter Allergenkontakt, führt dies zur Bindung des Allergen an das rezeptorfixierte IgE auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und anschließend über eine Vernetzung zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese Reaktion führt innerhalb von 5 bis 20 Minuten zur Sofortreaktion mit den typischen Symptomen an Lunge, Haut oder Nase und kann im schlimmsten Fall bis zum anaphylaktischen Schock führen.

## 1.2 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist definiert als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable, reversible Atemwegsobstruktion charakterisiert ist [5].

Auf dem Boden einer bronchialen Überempfindlichkeit gegenüber exogenen Reizen kommt es zu einer Verengung der Atemwege, die charakteristisch durch eine entzündliche Schleimhautschwellung, vermehrte Schleimproduktion und eine glattmuskuläre Bronchokonstriktion entsteht. Bei den auslösenden Reizen kann es sich sowohl um spezifische – wie z.B. Allergene – aber auch um unspezifische Faktoren wie kalte Luft, Tabakrauch, Infekte oder auch körperliche wie psychische Belastung handeln. Man unterscheidet demnach das extrinsische (allergische) Asthma von einem intrinsischen (nicht-allergischen) Asthma, wobei häufig Mischformen vorliegen oder sich ein im Säuglingsalter zunächst infektgetriggertes Asthma im späteren Verlauf häufig mit Allergien assoziieren lässt.

Beim extrinsischen bzw. allergischen Asthma kommt es zur Bildung von IgE-Antikörpern gegen ein Allergen. Bei den Allergenen handelt es sich zum Beispiel um Pflanzenpollen, Hausstaubmilben, Schimmelpilze oder Tierepithelien.

Klinisch imponiert das Asthma meist mit erschwerter Atmung, Husten, pfeifendem Atemgeräusch und einem Engegefühl in der Brust. Diese Symptome treten meist anfallartig auf und zeigen sich mit oder ohne medikamentöse Behandlung rückläufig. Die bronchiale Entzündung hingegen besteht dauerhaft und führt zu einem strukturellen Umbau der bronchialen Schleimhaut – dem sogenannten Remodelling [6].

Die Diagnosestellung kann häufig bereits klinisch erfolgen. Zur Sicherung und Spezifizierung der Diagnose sowie zur Verlaufskontrolle sind jedoch einige apparative Untersuchungen sinnvoll. Dazu zählt unter anderem das Führen eines Peakflow-Protokolls (PEF), das eine Einschränkung des PEF sowie dessen Steigerung nach Inhalation eines  $\beta_2$ -Sympathomimetikums nachweist. Die bronchiale Hyperreagibilität kann ebenfalls mit Hilfe einer standardisierten Laufbelastung oder eines unspezifischen bronchialen Provokationstestes (Methacholin, Histamin) nachgewiesen werden. In Hinblick auf die allergologische Diagnostik erfolgt ein Pricktest oder eine Bestimmung des spezifischen IgE (Rast-Test) im Blut. Die klinische Relevanz einer Allergie kann mittels einer spezifischen bronchialen Allergenprovokation ermittelt werden.

### 1.3 Bronchiale Allergenprovokation

Grundsätzlich unterscheidet man die unspezifische bronchiale Provokation – etwa mit Methacholin oder Histamin – von der spezifischen bronchialen Provokation mit einem Allergen. Während die unspezifische Provokation zunächst zum Nachweis einer bronchialen Hyperreagibilität genutzt wird, beweist die spezifische bronchiale Provokation die Relevanz eines Allergens für das Asthma bronchiale. Dies kann beispielsweise bei nicht eindeutiger Anamnese oder Prick-Testung zur Diagnosesicherung vor Einleitung einer Hyposensibilisierung von Nutzen sein.

Allergenprovokationen können neben den bereits genannten diagnostischen Aspekten auch im wissenschaftlichen Bereich zum Einsatz kommen. In „Proof of Concept“-Studien kann die bronchiale Allergenprovokation zum Nachweis einer Medikamenten-Wirkung (Blockade der asthmatischen Reaktion) genutzt werden [7]. Die Nutzung von bronchialen Allergenprovokationen im Rahmen von klinischen Studien erfordert die Einhaltung von standardisierten Abläufen, um reproduzierbare Daten gewährleisten zu können: Entsprechend standardisierte Tests wurden in der Literatur beschrieben und unsere Arbeitsgruppe hat hierzu eine eigene Methode publiziert [8-11]. Bei der von uns etablierten PD<sub>20</sub>-Methode gilt es, die Allergendosis zu finden, mit der ein 20%iger FEV<sub>1</sub>-Abfall erreicht wird. Dabei atmet der Patient in jeder Stufe über einen immer länger werdenden Zeitraum aus dem Vernebler, so dass hierbei die Steigerung der Dosis durch Modifikation der Inhalationszeit erfolgt [12].

Die spezifische bronchiale Allergenprovokation führt bei Hausstaubmilbenallergikern selbst im beschwerdefreien Intervall zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion und asthmatischen Beschwerden. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe zur anti-entzündlichen Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) konnten wir mit Hilfe eines Provokationsmodells erstmals nachweisen, dass die allergische Entzündung gemessen am exhalativen NO (eNO) signifikant supprimiert wurde [13]. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten wir den Nutzen des Allergenprovokationsmodells für „Proof of Concept“-Studien belegen.

Die Reaktion auf die bronchiale Allergenprovokation zeigt in der Regel einen biphasischen Verlauf: Bei der asthmatischen Frühreaktion (early asthmatic reaction, EAR) stellt sich maximal 5-30 Minuten nach Provokation eine bronchiale Obstruktion ein, die für ungefähr 1-2 Stunden anhält [14, 15, 10]. Die EAR beruht auf einer Kontraktion der bronchialen Muskulatur und wird vermittelt durch Histamin,

Prostaglandine und Leukotriene [16]. Bei ungefähr 50% der Patienten kommt es drei bis acht Stunden nach der bronchialen Provokation zu einer wiederkehrenden Bronchokonstriktion, der sogenannten asthmatischen Spätreaktion (late asthmatic reaction, LAR) [14]. Diese Bronchokonstriktion begründet sich auf dem Einwandern von inflammatorischen Zellen, vor allem von eosinophilen Granulozyten und metachromatischen Zellen, in die Atemwege [17]. Die LAR ist allergenspezifisch. So tritt sie bei den perennialen Allergien wie der Hausstaub- oder den Tierepithelallergien deutlich häufiger auf als bei den saisonalen Allergien, z.B. der Gräserpollenallergie [18]. Bei den Patienten, die eine LAR entwickeln, besteht für mindestens eine Woche eine erhöhte unspezifische bronchiale Hyperreagibilität [19, 16).

#### 1.4 Autovaccine

Die Therapie allergischer Erkrankungen stützt sich heute auf zwei Säulen. Symptomatisch verschaffen Antiallergika, Bronchodilatativa und Steroide den Betroffenen Linderung. Den einzig kausalen Ansatz in der antiallergischen Therapie stellt die spezifische Immuntherapie (SIT) dar, die nachgewiesenermaßen zu einer Reduktion von Asthmasymptomen und Medikamentenverbrauch sowie einer Verbesserung der spezifischen bronchialen Hyperreagibilität führt [20, 21]. Bei der SIT wird dem Patienten in steigender Dosis und Konzentration das jeweils relevante Allergen meist subkutan zunehmend aber auch sublingual appliziert, um eine klinische Toleranz gegenüber der symptomauslösenden Allergene zu erreichen [22]. Bei Patienten mit Erkrankungen des allergischen Formenkreises findet sich vorwiegend ein Th2-Profil (IL-4, IL-5, IL-13), das entweder aus einer vermehrten Differenzierung und klonalen Expansion zu Th2-Zellen oder einer verminderten Neigung zum induzierten Zelltod durch INF- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen resultiert [23, 24]. Durch die SIT wird nun eine periphere T-Zelltoleranz induziert, die charakterisiert ist durch Generierung von allergenspezifischen T<sub>reg</sub>-Zellen (IL-10, TGF- $\beta$ ), die sowohl die proliferativen als auch die zytokinvermittelten Antworten auf das jeweilige Allergen unterdrücken [25]. Weiterhin erfolgt eine Verschiebung der beim Allergiker dominierenden Th2-Antwort zu einer stärkeren Th1-Antwort (IL-2, INF- $\gamma$ ) [24]. Allerdings ist der Erfolg der SIT abhängig vom Alter bei Therapiebeginn sowie von Anzahl und Art der Allergien, sodass es noch Alternativen zur SIT in der Therapie allergischer Erkrankungen bedarf (AWMF Leitlinien DGAKI).

Bei der im Rahmen unserer Studie verwendeten Autovaccine handelt sich um ein patientenspezifisches Individualtherapeutikum aus apathogenen rauhen und glatten Formen humaner E.coli. Diese werden aus der Fäkalflora eines Patienten isoliert, anschließend nach einem standardisierten Verfahren präpariert und zweimal über zwei Stunden bei 75°C hitzeinaktiviert [26].

Erste Versuche mit Autovaccinen wurden durch Wright bereits zu Beginn des 20.Jahrhunderts in England durchgeführt [35]. Seitdem hat sich die Forschung auf diesem Gebiet vor allem in die osteuropäischen Länder verlagert, wo mehrere Arbeitsgruppen Erfolge in der Behandlung von chronisch-entzündlichen Prozessen, wie z.B. der Akne vulgaris, chronischen Sinusitiden oder Otitiden, beschreiben [27-29]. Weiterhin finden sich Untersuchungen zum Nutzen von Autovaccinen in der Behandlung von Erkrankungen der Atemwege, der Furunkolosis sowie der chronischen Osteomyelitis [30, 31].

Der Arbeitsgruppe um Jutel ist es gelungen, die zugrunde liegenden immunologischen Wirkmechanismen im Mausmodell zu zeigen. In diesem Experiment kam es bei C57BL/6-Mäuse, die vor und nach Behandlung mit einer Autovaccine sowie mit einem Ovalbumin-Aerosol provoziert wurden, zu einer Aufhebung der bronchialen Hyperreagibilität. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der bronchialen Lavage nach Sektion der Tiere, wo sich als Zeichen der verminderten Entzündungsaktivität eine signifikante Erniedrigung der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten sowie ein Anstieg der anti-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 fand [32].

In einer ersten klinischen Studie in Deutschland ist es der Arbeitsgruppe um Rusch gelungen, den immunregulatorischen Effekt auf Zytokin-Ebene zu demonstrieren. Die Ergebnisse der Studie, die an 78 Patienten mit chronischen Entzündungen durchgeführt wurde, konnte vier bis sechs Wochen nach Behandlung mit einer Autovaccine einen deutlichen IL-6-Anstieg, eine signifikante IL-1 $\beta$ -Synthese sowie einen signifikanten Abfall von IFN- $\gamma$  nachweisen [33].

Bezüglich der bronchialen Hyperreagibilität konnte im Tiermodell bereits eine deutliche Verminderung der Atemwegsinflammation gezeigt werden [32].

Die Ergebnisse der genannten Studien lassen den Wirkmechanismus wie folgt erklären: Die immunmodulatorische Wirkung der Autovaccine beruht zunächst bei Applikation von niedrig konzentrierter Autovaccine auf der Stimulation einer IFN- $\gamma$ -Bildung und somit einer Aktivierung der zuvor verminderten Th1-Aktivität, die eine

weitere IFN- $\gamma$ -Produktion nach sich zieht. Hieraus resultiert eine Gegenregulation und das zuvor zugunsten der Th2-Antwort bestehende Ungleichgewicht ändert sich in Richtung der Th1-Antwort. Bei Konzentrationssteigerung der Vaccine kommt es dann zu einer Aktivierung von Monozyten, die wiederum eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Produktion induziert. Ein weiterer Effekt ist eine gesteigerte IL-6-Bildung, die eine verbesserte B-Zell-Differenzierung zur Folge hat. Letztlich kommt es zu einer Verschiebung Richtung Th1 und zu einer Balance zwischen Th1- und Th2-Aktivität wie sie beim Gesunden besteht. Ob dieser beschriebene Wirkmechanismus auch bei Patienten mit Asthma einen positiven Effekt zeigt, war Gegenstand unserer Studie und der vorliegenden Doktorarbeit.

### 1.5 Zielsetzung

In der Therapie allergischer Erkrankungen nehmen alternative Behandlungsansätze mit Bakterienlysaten und Probiotika einen immer größeren Stellenwert ein [61, 90]. Obwohl beispielsweise eine Autovaccine bereits seit vielen Jahren in verschiedenen Bereichen der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt wird, fehlt es bislang an systematischen klinischen Untersuchungen im Bereich der Allergie.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine kombinierte Phase I/II-Studie. In der offenen Phase I wurden zunächst Daten zur Sicherheit und Verträglichkeit der Autovaccine ermittelt, um dann bei entsprechenden Ergebnissen eine randomisierte, doppelblinde, plazebo-kontrollierte Phase II der Studie durchzuführen. Die Phase II-Studie diente der Hypothesengenerierung („Proof of concept“) und sollte Daten zur Pharmakodynamik und Wirksamkeit erbringen.

Das Konzept der Studie war so angelegt, dass Patienten mit Asthma und nachgewiesener Milbenallergie eine standardisierte Behandlung mit der Autovaccine erhielten. Vor und nach der sechs Monate langen Behandlung wurde eine bronchiale Allergenprovokation durchgeführt und die asthmatische Reaktion gemessen. Wie wir in Voruntersuchungen zeigen konnten, hat sich das eNO als sensibler Marker der bronchialen Entzündung etabliert [21].

Der primäre Zielparameter der Phase II-Studie war die Suppression des eNO als sensibler Marker der eosinophilen bronchialen Entzündung vor und nach Behandlung

sowie unter den spezifischen bronchialen Provokationen der Abschlusswoche, um den Rückgang der Entzündung unter der Therapie mit Autovaccinen zu überprüfen.

Als sekundäre Zielparameter untersuchen wir die klinische Verträglichkeit der Applikation mit Autovaccinen. Hierzu erhalten alle Probanden nach jeder Visite ein Tagebuch, das bis zur nächsten Visite bzw. für fünf Tage ab der jeweiligen Visite geführt werden und zu Beginn der folgenden Visite abgegeben werden muss. In diesem werden lokale und systemische Reaktionen sowie die Einnahme von Medikamenten erfasst. Als weiteren Parameter bestimmen wir die bronchiale Hyperreagibilität mittels Methacholin-Provokation sowie das Allergie-Labor (Gesamt-IgE, spezifisches IgE für Milbe), die Spätreaktion nach spezifischer bronchialer Provokation mit Milbe und den  $\beta_2$ -Sympathomimetika-Bedarf in der Provokationswoche.

## **2 Probanden, Material und Methoden**

### **2.1 Probandenkollektiv**

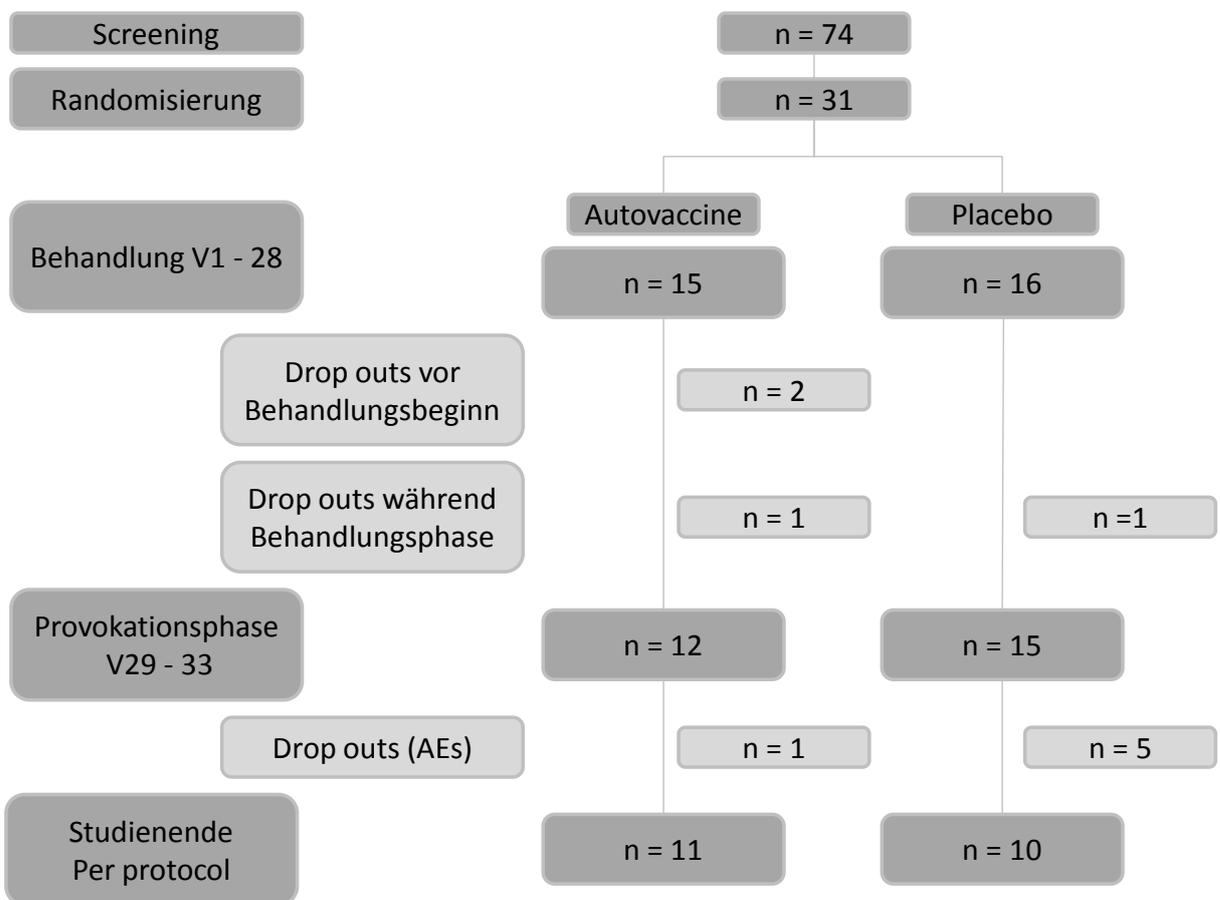
Die vorliegende „Investigator initiated“ Studie wurde im Zeitraum von Februar 2008 bis Juli 2009 durchgeführt und gliederte sich für die Patienten in 2 Screening-Termine und 33 Visiten (siehe Anhang Ablaufschema). Es handelte sich um eine Phase II „Proof-of-Concept“ Studie in der die Frage geklärt werden sollte, inwieweit die bronchiale Entzündung gemessen anhand des eNOs unter Therapie zurückgeht. Die Studie wurde vom PEI geprüft und von der Ethikkommission der Universität Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt genehmigt (siehe positives Votum im Anhang). Die Studie (Eudra-CT Nummer 2005-005534-12) wurde wie üblich bei Clinicaltrial.gov registriert.

Für diese Studie wurden 74 Probanden im Alter von 18 bis 45 Jahren mit Hausstaubmilbenallergie in der Ambulanz der pädiatrischen Pneumologie und Allergologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main im Rahmen einer Screening-Untersuchung gesehen. Die Probanden erhielten zunächst eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung über mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen, Ziel und Ablauf der Studie. Die Teilnahme erfolgte freiwillig mit schriftlichem Einverständnis (Patienteninformation siehe Anhang).

Ausgehend von 74 gescreenten Patienten konnten 31 Probanden, die die Kriterien eines positiven Prick-Testes, eines positiven Methacholin-Provokationstestes sowie eines positiven spezifischen bronchialen Provokationstestes auf Hausstaubmilbe erfüllten, eingeschlossen werden.

Die Erstellung der Randomisierungsliste erfolgte durch eine unabhängige Biometrikerin der Firma Symbiovacin in Herborn. Der Autovaccine-Gruppe wurden acht männliche und sieben weibliche Probanden zugeteilt. In der Placebo-Gruppe wurden sechs männliche und 10 weibliche Probanden in die Studie aufgenommen. Zwei Probanden – ein weiblicher und ein männlicher aus der Autovaccine-Gruppe - beendeten die Teilnahme an der Studie ohne Angabe weiterer Gründe bereits vor der ersten Autovaccine-Injektion. Ein weiterer weiblicher Proband aus der Autovaccine-Gruppe sowie ein männlicher Proband aus der Placebo-Gruppe

beendeten die Studie vorzeitig. Insgesamt konnte in der Autovaccine-Gruppe bei 11 und in der Placebo-Gruppe bei 10 Probanden die Studie nach Protokoll durchgeführt werden (s. Anhang). Die klinischen Charakteristika der Patienten aufgeteilt in „Intention to treat“ (ITT) und Per protocol (PP) können der Tabelle 1 entnommen werden.



**Abb. 1: Die Anzahl der Patienten, ihre Verteilung in die beiden Studienarme und die Anzahl der Studienabbrecher.**

**Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Probanden (Median  $\pm$  SD).**

	Gesamt	Verum		Placebo	
		intention to treat	per protocol	intention to treat	per protocol
Anzahl (n)	31	n = 15	n = 11	n = 16	n = 10
Alter (Jahre)	24,0 $\pm$ 4,9	25,0 $\pm$ 3,2	25,0 $\pm$ 3,7	24,0 $\pm$ 5,2	25,0 $\pm$ 3,8
Geschlecht (m/w)	14 / 17	8 / 7	7 / 4	6 / 10	4 / 6
Größe (cm)	175,0 $\pm$ 8,8	178,0 $\pm$ 8,4	178,0 $\pm$ 9,2	171,0 $\pm$ 9,5	178,5 $\pm$ 8,7
Gewicht (kg)	70,0 $\pm$ 12,6	70,0 $\pm$ 12,4	70,0 $\pm$ 13,2	70,0 $\pm$ 13,2	75,0 $\pm$ 13,0
eNO (ppb)	29,2 $\pm$ 28,7	31,9 $\pm$ 31,6	36,7 $\pm$ 35,3	29,1 $\pm$ 26,3	31,8 $\pm$ 26,8
VC (% des Soll)	98,8 $\pm$ 10,4	96,7 $\pm$ 7,6	95,9 $\pm$ 8,7	100,5 $\pm$ 12,6	103,5 $\pm$ 14,6
FEV <sub>1</sub> (Mean % des Soll)	106,4 $\pm$ 12,2	106,4 $\pm$ 13,0	101,9 $\pm$ 14,0	106,3 $\pm$ 11,9	105,2 $\pm$ 11,3
FEV <sub>1</sub> %VC	89,2 $\pm$ 6,3	85,6 $\pm$ 5,8	85,5 $\pm$ 5,7	80,9 $\pm$ 6,4	76,8 $\pm$ 6,1
Gesamt IgE (KU / l)	174,0 $\pm$ 131,5	173,5 $\pm$ 111,4	113,5 $\pm$ 96,2	202,0 $\pm$ 150,7	167,0 $\pm$ 81,1
IgE Milbe Dp (KU / l)	27,5 $\pm$ 25,0	21,7 $\pm$ 23,8	20,1 $\pm$ 24,2	28,1 $\pm$ 27,1	28,1 $\pm$ 21,0
IgE Milbe Df (KU / l)	28,7 $\pm$ 27,6	26,4 $\pm$ 28,9	20,6 $\pm$ 29,0	34,3 $\pm$ 27,5	34,9 $\pm$ 35,4

## 2.2 Screening

Zunächst kamen die Probanden zu einer Screening-Visite, bei der ein Pricktest (Firma Allergopharma, Rheinbeck, Deutschland), eine Blutentnahme zur Bestimmung des spezifischen IgEs sowie eine Methacholin-Provokation zur Bestimmung der bronchialen Reizempfindlichkeit durchgeführt wurden. Eine Monosensibilisierung gegenüber Hausstaubmilbe war kein zwingendes Kriterium. Bei positivem Ausfall der im Screening durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Visite 0: bei dieser Visite wurden die Probanden in einem Mehrstufen-Provokationstest bronchial mit Hausstaubmilbe provoziert. Außerdem wurde bei allen Probanden das exhalierete Kohlenmonoxid (CO; Grenzwert < 5 ppm) bestimmt, um das Probandenkollektiv auf Nichtraucher zu beschränken. Bei positivem Ausfall der Bronchialprovokation sowie Erfüllen der Einschluss- bzw. Nichterfüllen der Ausschlusskriterien konnte ein Einschluss in die Studie erfolgen.

Bei einer weiteren Visite (Visite 0b), die frühestens eine Woche nach Visite 0 stattfinden durfte, wurde die errechnete PD<sub>15</sub>-Dosis in einer Einstufen-Provokation überprüft und gegebenenfalls mittels einer erneuten Einstufen-Provokation mit neu errechneter PD<sub>15</sub>-Dosis angepasst. Nach Einschluss gaben die Probanden eine Stuhlprobe ab, die zu Symbiovacin nach Herborn zur Herstellung der E.coli-Autovaccine geschickt wurde.

Einschlusskriterien:

- Erwachsene 18 - 45 Jahre
- Milbenallergie: Prick und bronchiale Provokation positiv
- GINA 0 - 1 (Asthma episodisch; keine Dauertherapie)
- Informierte Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- Anamnestiche Unverträglichkeit von Bestandteilen der Autovaccine
- Asthma > GINA I°
- Andere chronische Krankheiten oder Infektionen (HIV, Tbc)
- Schwangerschaft
- Behandlung mit systemischen Kortikosteroiden
- Dauerbehandlung mit inhalativen Kortikosteroiden
- Immunsuppressive Therapie, Zytostatikatherapie
- Einnahme anderer Probiotika wie Mutaflor (E.coli Nissle 1917)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung
- Bekannter Alkohol-, Drogen- und / oder Medikamentenmissbrauch
- Unfähigkeit zum Erfassen des Umfangs und Tragweite der Studie
- Raucher

### 2.3 Ablauf der Visiten

Nach Einschluss in die Studie folgten insgesamt 33 Visiten über 28 Wochen (Ablaufschema s. Anhang). An den Visiten 1 – 28 erfolgte jeweils die subkutane Injektion der Autovaccine in aufsteigender Dosierung (0,1 ml, 0,15 ml, 0,22 ml, 0,32

ml, 0,5 ml und 0,7 ml) und Konzentration oder des Placebos (natives Lösungsmittel mit Albumin-Lösung 5%):

**Tabelle 2: Die Verdünnungen und entsprechenden Keimäquivalente der verwendeten Stufen.**

Stufe	Autovaccine Verdünnung	Keimäquivalente
6	1 : 1 000 000 ( $10^6$ )	max. $10^4$
5	1 : 100 000 ( $10^5$ )	max. $10^5$
4	1 : 10 000 ( $10^4$ )	max. $10^6$
3	1 : 1 000 ( $10^3$ )	max. $10^7$
2	1 : 100 ( $10^2$ )	max. $10^8$
1	1 : 10 ( $10^1$ )	max. $10^9$

Die Probanden mussten jeweils eine Stunde nach Injektion der Autovaccine zur Beobachtung in der Ambulanz bleiben, um mögliche Reaktionen auf die Autovaccine dokumentieren zu können. Zu jeder Visite wurde den Probanden ein Tagebuch ausgehändigt, in dem lokale und systemische Impfreaktionen erfasst wurden. Dieses wurde bei der jeweils nächsten Visite wieder eingesammelt.

Weiterhin wurde bei Visite 1 zur Abklärung einer bronchialen Überempfindlichkeit ein Methacholin-Test, und zur Abklärung entzündlicher bronchialer Aktivität das Stickstoffmonoxid (eNO) aus der Ausatemluft bestimmt. Als weiteres klinisches Monitoring auf bronchiale Entzündung wurde das Sputum auf eosinophile Granulozyten untersucht. Ein zweiter Methacholin-Test erfolgte zu Visite 10, auch hier wurde das eNO vor und 24 Stunden nach der bronchialen Provokation bestimmt. Zu den Visiten 1, 6, 10, 16 und 28 erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung des Gesamt-IgEs und des spezifischen IgEs für unten aufgeführte Allergene (s. 2.2.4 Blutuntersuchung).

Zwischen den Visiten 6 und 7, 16 und 17 sowie 28 und 29 wurde für jeweils 2 Wochen pausiert, um eine immunologische Konditionierung zu erreichen.

Nach der abschließenden zweiwöchigen Pause (Latenzphase) erfolgten erneut eine Methacholin-Provokation, die Bestimmung des eNO und eine Blutuntersuchung. Binnen einer Woche wurden an vier aufeinander folgenden Tagen (Montag bis Donnerstag) vier bronchiale Hochdosis-Allergenprovokationen mit Hausstaubmilbe nach Standard (jeweils mit  $PD_{15}$ ) durchgeführt, um die Wirksamkeit der Intervention

zu prüfen (Effektivitätskontrolle). Bei einer basalen Vitalkapazität in der Lungenfunktion vor Provokation von  $< 70\%$  wurde eine Provokation ausgelassen und am nächsten Tag mit einer entsprechend angepassten Dosis fortgeföhren. Ebenso erfolgte bei zu starkem Abfall der FEV1  $< 70\%$  eine Anpassung der Dosis für die folgenden Provokationen. Jeweils vor Provokation wurde das eNO bestimmt.

#### 2.4 Pricktest

Durch den Pricktest (Allergopharma, Rheinbeck, Deutschland) wurde eine Sensibilisierung auf Standardallergene einschließlich Dermatophagoides pteronyssinus (Dp), Dermatophagoides farinae (Df), Gräserpollen, Birken- und Weidenpollen, Schimmelpilze sowie Hunde- und Katzenhaaren getestet. Es wurden Probelösungen mit dem Allergen sowie eine positive Histaminkontrolle und eine negative Natriumchloridkontrolle auf die Haut der Unterarmstreckseiten pipettiert. Anschließend wurde die Haut mit einer Lanzette leicht angeritzt, sodass die aufgebraachte Substanz in die Hautschichten eindringen konnte. Nach 10 Minuten wurde der Test abgelesen, wobei die Allergenbereiche mit der Histaminkontrollquaddel verglichen wurden. Ein positiver Test wurde vermerkt, wenn die Quaddel des Allergens gleich groß oder größer als die Histaminquaddel war.

#### 2.5 Blutuntersuchung

Es wurde Serum - Blut abgenommen und folgende Parameter bestimmt: Gesamt IgE und das spezifische IgE durch den RAST.

Das spezifische IgE wurde für folgende Allergene mittels IMMULITE 2500DPC (Bad Nauheim) mit der Chemilumineszenz bestimmt. Folgende Allergene wurden untersucht:

Lieschgras, Roggen, Beifuß, Warzenbirke, Katze, Pferde, Cladosporium herbarum, Alternaria tenuis, Dermatophagoides pteronyssinus und farinae sowie Milcheiweiß.

#### 2.6 Messung des exhalativen Stickstoffmonoxids (eNO)

Die Messung des eNO der unteren Atemwege im exhalieren Atemgas ist eine Methode zur Verlaufsbeurteilung der bronchialen Entzündung z.B. bei allergischem

Asthma. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die NO-Konzentration in der Ausatemluft mit Hilfe eines Chemiluminescence analyzers (NIOX® Nitric Oxide Monitorin System, Aerocrine, Schweden) bestimmt. Das Gerät arbeitet mit NO-freier Luft (gefilterter Inhalationsluft), um eine Kontamination mit hohen NO-Werten in der Raumluft zu verhindern. Der Proband inhaliert bis zum Erreichen der totalen Lungenkapazität gefilterte Luft aus dem Gerät ein und atmet anschließend langsam und bei möglichst konstantem Fluss über einen Zeitraum von 10 Sekunden ohne Absetzen des Mundstückes in das Gerät zurück. Das System hält die Exhalation auf einem konstanten Fluss von 50 ml/sec. Der eNO-Wert wird durch Ermittlung eines Plateau-Wertes entsprechend den ATS-Kriterien vollautomatisch vom Gerät berechnet.

Verstärkte Ausatmung wie z.B. durch die Spirometrie oder die Sammlung des Atemkondensats kann zu falsch-niedrigen eNO-Werten führen. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung vor der Atemkondensatsammlung und der Methacholinprovokation durchgeführt.

## 2.7 Bronchiale Provokationen

Alle Provokationen erfolgten über das Aerosol-Provokations-System (APS) der Firma Viasys (VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg). Dabei wurde die entsprechende Lösung über das APS vernebelt und dem Probanden über einen Triggermechanismus während der Inspirationsphase bronchial appliziert. Der Medic Aid Vernebler vernebelt das Aerosol mit einer Leistung von 160 mg/min, die Partikelgröße beträgt 3,2 µm. Die inhalierte und deponierte Menge des Aerosols hingen ab von Atemlage (FRC), Einatemtiefe (VT, IVC), Einatemgeschwindigkeit ( $V'$ ) und Einatemdauer. Die Inhalationszeit sollte möglichst länger als 5 Sekunden und die Strömung unter 0,5 l/s sein. Das APS verwendet einen integrierten Flowsensor zur Erkennung des inspiratorischen Flusses sowie der Inspirationszeit. Damit ist die Inhalation einer genau bestimmten Menge möglich. Diese Methode ist in unserer Abteilung etabliert und wurde vor Kurzem von Schulze et al publiziert [12, 34].

Der Proband war während der Inhalation über ein auswechselbares Mundstück an die Apparatur angeschlossen, das mit den Lippen dicht umschlossen werden musste. Eine Nasenklammer verschloss beide Nasenöffnungen.

Bei Erreichen des geforderten 20%igen Abfalls der FEV<sub>1</sub> bei der Methacholin-Provokation sowie bei der Mehrstufenallergen-Provokation bzw. nach Durchlaufen des Einstufentestschemas wurden den Probanden zur Broncholyse zwei Hübe Salbutamol-DA 0,2 mg verabreicht. In fünfminütigen Abständen wurde eine Spirometrie durchgeführt, um die aktuelle FEV<sub>1</sub> zu bestimmen. Bei weiterhin bestehenden subjektiven Beschwerden oder objektiver FEV<sub>1</sub>-Einschränkung > 20 % wurden erneut ein bis zwei Hübe Salbutamol-DA 0,2 mg verabreicht. Eine Entlassung aus der Ambulanz erfolgte erst, wenn die FEV<sub>1</sub> wieder auf Werte > 90 % angestiegen und somit eine positive Broncholyse dokumentiert war. Zusätzlich erhielten die Probanden nach jeder spezifischen bronchialen Allergenprovokation (BAP) ein Peak-Flow-Messgerät, um ihren Peak Expiratory Flow (PEF) in den nächsten 10 Stunden eigenständig zu kontrollieren und so eine mögliche Spätreaktion aufzuzeigen und zu objektivieren.

Bei subjektiven Beschwerden oder einem Abfall des PEF um > 15 % wurden die Probanden angehalten selbstständig ein bis zwei Hübe Salbutamol-DA 0,2 mg zu inhalieren und anschließend die PEF-Messung zu wiederholen. Alle gemessenen PEF-Werte sowie der Salbutamol-Verbrauch wurden in einem Protokoll festgehalten, dass zur Folgevisite mitgebracht wurde.

### 2.7.1 Unspezifische Provokation mit Methacholin

Die Messung der bronchialen Reizempfindlichkeit wurde mit Methacholin durchgeführt.

Das Methacholin wurde in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst. Die Lösung ist bei einer Lagerung bei 4°C drei Monate haltbar. Verwendet wurde eine mittlere Methacholinkonzentration (16 mg/dl), von der bekannt ist, dass Gesunde, wenn überhaupt, nur geringfügig mit einem Anstieg der Strömungswiderstände und entsprechendem Abfall der FEV<sub>1</sub> reagieren. Die Stärke des Abfalls der FEV<sub>1</sub> ist das Maß der bronchialen Empfindlichkeit.

Für die Provokationsuntersuchung in dieser Studie verwendeten wir folgendes Protokoll mit fünf Stufen (Tabelle), das bis zu fünf Dosisapplikationen vorsah. Beginnend mit 0,01 mg Methacholin folgten vier Stufen mit 0,1 mg, 0,4 mg, 0,8 mg und 1,6 mg.

**Tabelle 3: Das Stufenschema der PD<sub>20</sub>-Methacholinprovokation.**

Stufe	Stufendosis Methacholin [mg]	Kumulativedosis Methacholin [mg]
1	0,01	0,01
2	0,10	0,11
3	0,40	0,51
4	0,80	1,31
5	1,60	2,91

Nach den jeweiligen Provokationsstufen wurde nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten mit Hilfe des MasterScreens die Spirometrie durchgeführt und die Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) mit den Ausgangswerten verglichen. Diese Methode ist in unserer Abteilung etabliert und wurde von Schulze et al publiziert [12].

Als signifikante Reaktion gilt diejenige Methacholindosis, bei der die FEV<sub>1</sub> um 20 % abfällt (PD<sub>20</sub>FEV<sub>1</sub>). Die jeweilige PD<sub>20</sub> wurde vom Computer automatisch mittels logarithmischer Interpolation ermittelt. Für den Fall des Durchlaufens des kompletten Tests ohne einen 20%igen Abfall der FEV<sub>1</sub> war routinemäßig keine Gabe von Bronchodilatoren vorgesehen; hier erfolgte dies nur bei subjektiven Beschwerden des Probanden.

### 2.7.2 Spezifische bronchiale Mehrstufenprovokation mit Hausstaubmilbe

Bei der Visite 0 wurden die spirometrischen Basisdaten erhoben und eine bronchiale Mehrstufen-Allergenprovokation mit Hausstaubmilbe durchgeführt. Es wurde das Milbenallergen 5.000 BE/ml (Extrakt der Firma Allergopharma, Rheinbeck, Deutschland, gelöst in 0,9 % Kochsalzlösung) verwendet. Die Auswahl der Milbenart – Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) bzw. Dermatophagoides farinae (Df) - erfolgte je nach Ausfall des Prickhauttests bzw. des spezifischen IgEs in der Blutuntersuchung.

Zunächst inhalierte der Patient mit Kochsalzlösung (0,47 mg; 0,9 %). Im Anschluss an eine zweiminütige Einwirkzeit wurde die Spirometrie durchgeführt und die Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) mit den Ausgangswerten verglichen. Bei einem Abfall der FEV<sub>1</sub> < 10 % erfolgte nun die spezifische Provokation. Das Protokoll sah insgesamt sechs Applikationsstufen vor, beginnend mit einer Dosis von 10 BE. In

den folgenden Stufen verdoppelte sich die verabreichte Dosis jeweils (20 BE, 40 BE, 80 BE, 160 BE, 320 BE) (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Stufenschema der PD<sub>20</sub>-Allergenprovokation**

Stufe	Stufendosis Allergen [BE]	Kumulativedosis Allergen [BE]
1	10	10
2	20	30
3	40	70
4	80	150
5	160	310
6	320	630

Nach den jeweiligen Provokationsstufen wurde nach einer Einwirkzeit von 8 Minuten erneut eine Spirometrie durchgeführt und die Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) mit den Ausgangswerten verglichen. Als signifikante Reaktion gilt diejenige Allergendosis, bei der die FEV<sub>1</sub> um 20 % abfällt (PD<sub>20</sub>FEV<sub>1</sub>). Die jeweilige PD<sub>20</sub> wurde vom Computer automatisch mittels logarithmischer Interpolation ermittelt.

### 2.7.3 Spezifische bronchiale Einstufenprovokation mit Hausstaubmilbe

Die PD<sub>15</sub> entspricht der Dosis an inhaliertem Allergen, bei der ein Abfall der FEV<sub>1</sub> um 15 % erfolgt. Sie wird mit folgender Formel aus den im Mehrstufen-Provokationstest ermittelten Werten logarithmisch interpoliert:

$$PD_{15} \text{ FEV}_1 = \text{antilog} [\log D_1 + (\log D_2 - \log D_1) * (15 - F_1) / (F_2 - F_1)]$$

D<sub>1</sub>: Allergendosis vor PD<sub>20</sub>

D<sub>2</sub>: Allergendosis nach PD<sub>20</sub> (Konzentration, die einen Abfall von ≥ 20 % zur Folge hat)

F<sub>1</sub>: Prozentualer Abfall vor D<sub>1</sub>

F<sub>2</sub>: Prozentualer Abfall nach D<sub>2</sub>

Frühestens eine Woche nach Durchführung der Mehrstufen-Provokation erfolgte die Einstufen-Provokation mit der für den jeweiligen Probanden errechneten PD<sub>15</sub>-Dosis. Nach Bestimmung der spirometrischen Basisdaten inhalierte der Proband zunächst eine Kochsalzlösung (0,47 mg; 0,9 %). Im Anschluss an eine zwei minütige

Einwirkzeit wurde erneut eine Spirometrie durchgeführt. Bei einem Abfall der  $FEV_1 < 10\%$  erfolgte nun die spezifische Provokation mit der individuellen  $PD_{15}$  Dosis des Probanden. Hierzu wird die Verneblerkammer des APS mit 2 ml der Provokationslösung gefüllt. Im Anschluss an die Allergenapplikation wurde nach exakt 10, 15 und 30 Minuten jeweils eine Spirometrie durchgeführt, um die Entwicklung des  $FEV_1$ -Abfalls aufzuzeichnen und den maximalen  $FEV_1$ -Abfall zu ermitteln. Lag der maximale  $FEV_1$ -Abfall nicht zu einem der drei Messzeitpunkte (10, 15 und 30 Minuten) in einem Bereich von  $15 \pm 5\%$ , wurde die Einstufenprovokation frühestens eine Woche später mit einer angepassten Dosis wiederholt. Dies erfolgte solange bis mit einer Dosis ein  $FEV_1$ -Abfall von  $15 \pm 5\%$  erzielt werden konnte. Die gute Reproduzierbarkeit der Einstufenprovokation wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [34].

## 2.8 CO-Messung

Die CO-Messung ist ein Maß dafür, wie viel ein Proband raucht. Dazu holte der Patient tief Luft und hielt diese für 20 Sekunden an, um dann ohne noch ein weiteres Mal einzuatmen, die angehaltene Luft in das Messgerät (Microco von micro medical limited, UK & International) zu pusten. Dieses zeigte dann das exhalierte CO in % COHb und ppm an.

Probanden mit einem  $CO \geq 5$  ppm wurden als Raucher nicht in die Studie eingeschlossen.

## 2.9 Statistische Auswertung

Nach Fallzahlberechnung wurde eine Anzahl von  $n = 12$  Patienten pro Behandlungsgruppe zur Hypothesengewinnung als ausreichend eingestuft. Alle ermittelten Patienten-Daten wurden in Excel-Dateien für Windows eingegeben. Die statistische Datenauswertung wurde mittels des Programms BiAS 9.07 für Windows™ vorgenommen. Als Lokalisationsmaß wurde der Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung [SD]) verwendet.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei Normalverteilung mittels T-Test und bei nicht normal verteilten Werten mittels Mann-Whitney-Test geprüft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Primärer Zielparameter

#### 3.1.1 Exhalatives Stickstoffmonoxid (eNO)

##### Intention-to-Treat Analyse

Vor Beginn der Behandlung fanden sich keine Unterschiede im eNO zwischen der Placebo und Verum Gruppe. In der Autovaccine-Gruppe lag der eNO-Wert bei Median 31,9 ppb  $\pm$  31,6, in der Placebo-Gruppe bei Median 29,1 ppb  $\pm$  26,3.

Nach Behandlungsende und vor Beginn der abschließenden Provokationswoche wurde das eNO erneut bestimmt und hier zeigte sich bei der Placebo-Gruppe kein Unterschied zum Ausgangswert (28,0 ppb  $\pm$  14,8). Bei der mit der Autovaccine behandelten Gruppe war hingegen ein signifikanter Rückgang des eNO als Marker der bronchialen Entzündung zu verzeichnen. Die Werte sanken nach Therapie auf einen eNO-Wert Median 22,2 ppb  $\pm$  14,6 um ein Drittel niedriger als der Ausgangswert ab ( $p < 0,05$ ).

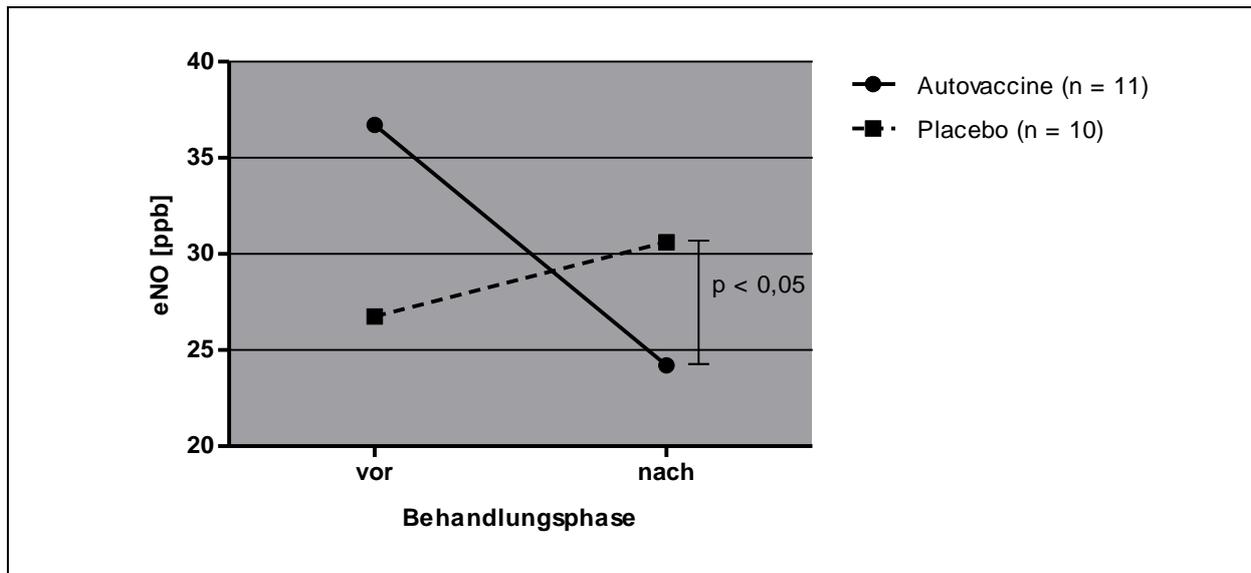
In der Abschlusswoche erfolgte mittels bronchialer Einstufen-Allergenprovokation an vier aufeinander folgenden Tagen eine massive Allergenexposition. Inwieweit dies eine bronchiale Entzündung induzierte, sollten die eNO-Bestimmungen jeweils 24 Stunden nach bzw. direkt vor der nächsten Provokation nachweisen. Sowohl die Autovaccine- als auch die unbehandelte Gruppe wiesen signifikante Anstiege im eNO im Laufe der Provokationswoche auf. So stieg das eNO der Placebo-Gruppe binnen der Abschlusswoche bis auf einen Wert von 93,7 ppb  $\pm$  50,0 am letzten Provokationstag. Bei der Autovaccine-Gruppe stieg das eNO ebenfalls von Visite zu Visite signifikant an, allerdings war in dieser Gruppe das Maximum bereits vor der letzten spezifischen Allergenprovokation mit einem Wert von 91,2 ppb  $\pm$  62,5 erreicht. 24 Stunden nach der letzten Provokation zeigte das eNO keinen weiteren Anstieg und sank sogar leicht auf einen Wert von 80,1 ppb  $\pm$  58,7 ab.

##### Per-Protocol Analyse

In die Per-Protocol-Analyse (PP) konnten 11 Patienten der behandelten und 10 der unbehandelten Gruppe eingeschlossen werden. Im Vergleich zur Intention-to-treat-Analyse (ITT) zeigte sich in der Placebo-Gruppe sogar ein leichter Anstieg des eNO

von 26,8 vor auf 30,6 ppb (n.s.) nach der Behandlungsphase, während die Werte der Autovaccine-Gruppe von 36,7 auf 24,2 ppb ( $p = 0,04$ ) signifikant abfielen. Im Vergleich des Delta-eNO zwischen Visite 1 und 29 unterschieden sich die beiden Gruppen statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

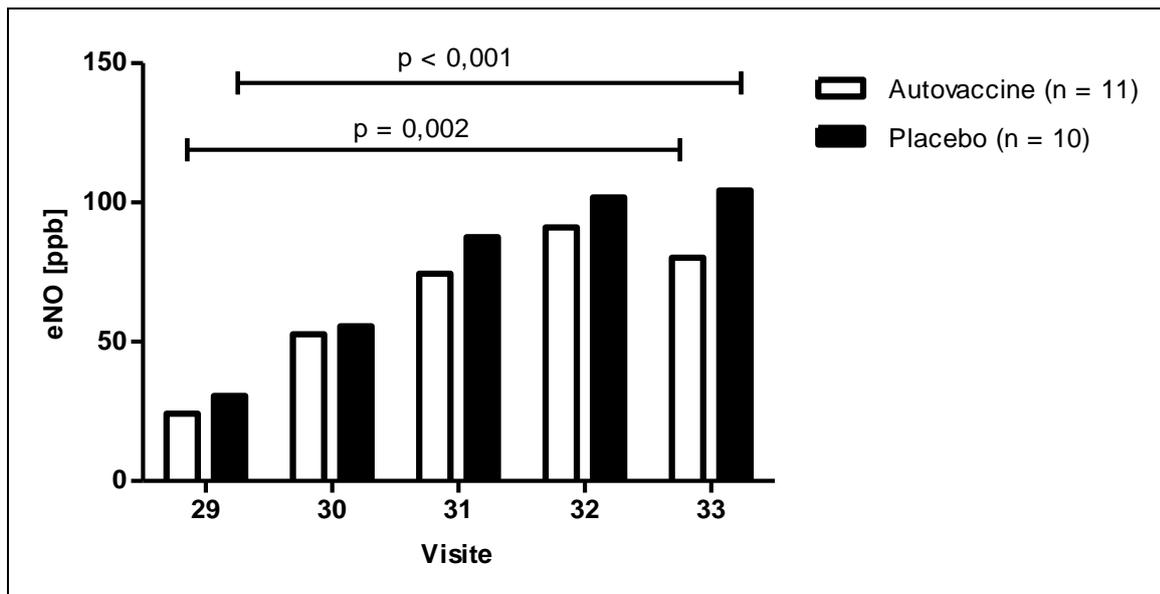
Die eNO-Werte beider Gruppen in der PP-Analyse sowohl vor als auch nach Behandlung (Visite 1 bzw. Visite 29) zeigt die Abb. 2.



**Abb. 2: Verlauf der eNO-Werte vor und nach Behandlungsphase im Vergleich der beiden Gruppen in der PP-Analyse.**

Der Anstieg des eNO während der Provokationswoche in der Placebo-Gruppe wies geringere Werte auf als die des jeweiligen Tages in der ITT-Analyse. Dies führten wir auf die Behandlung von zwei Probanden der ITT-Gruppe mit Steroiden zurück, die zu einer Unterdrückung der bronchialen Entzündung und somit des eNO führte.

In Abb. 3 ist der Verlauf des eNO beider Gruppen während der abschließenden Provokationswoche dargestellt. In beiden Gruppen war ein signifikanter Anstieg der bronchialen Entzündung zu verzeichnen. In der Autovaccine-Gruppe war bereits am vorletzten Tag das Maximum erreicht und es stellte sich eine Art Plateau ein, während die Werte der Placebo-Gruppe von der Tendenz her darüber hinaus weiter steigend waren. Signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen konnten wir nicht nachweisen.



**Abb. 3: Bronchiale Einstufen-Allergenprovokation an vier Tagen (Visiten 29 bis 32) nach Behandlungsende in der PP-Analyse.**

**Tabelle 5: ENO-Werte beider Gruppen in der ITT- und PP-Analyse vor und nach Behandlung sowie nach Provokation.**

eNO [ppb]	Intention-to-treat				Per-protocol			
	Verum	n	Placebo	n	Verum	n	Placebo	n
Vor Behandlung	31,9 ± 31,6	15	29,1 ± 26,3	16	36,7 ± 35,3	10	26,8 ± 22,2	11
Nach Behandlung	22,2 ± 14,6	12	28,0 ± 14,8	15	24,2 ± 15,0	10	30,6 ± 17,5	11
Nach Provokation	80,1 ± 58,7	12	93,7 ± 50,0	15	80,2 ± 61,1	10	104,4 ± 56,5	11

### 3.2 Sekundäre Zielparmeter

#### 3.2.1 Klinische Symptome und Verträglichkeit der Autovaccine

Insgesamt wurden in der Autovaccine-Gruppe 468 Injektionen mit autologer Autovaccine bei 13 Probanden durchgeführt, das Placebo wurde bei 16 Patienten 558 Mal injiziert. Die lokalen und systemischen Nebenwirkungen wurden mit Hilfe eines Tagebuches erfasst, das die Patienten bis zur nächsten Visite, maximal aber für jeweils 4 Tage, führen mussten.

In der Autovaccine Gruppe fanden sich signifikant mehr lokale Reaktionen als in der Placebo-Gruppe. (Autovaccine n= 120 vs Placebo n= 3 p < 0,001). Im Einzelnen traten in der Autovaccine-Gruppe 65 Rötungen (13,9%) an der Injektionsstelle bei elf Probanden auf, in der Placebo-Gruppe trat nur bei einem Probanden einmalig eine Rötung (0,2%) auf. In der Autovaccine-Gruppe waren Schwellungen von < 5 cm Durchmesser bei zehn Probanden mit 39 Episoden (8,3%) und Schwellungen mit > 5 cm Durchmesser bei fünf Probanden mit 16 Episoden (3,4%) festzustellen. Dies waren signifikant mehr Schwellungen als in der Placebo-Gruppe, in der lediglich bei zwei Probanden einmalige Schwellungen von < 5 cm Durchmesser (0,4%) und bei einem dieser Probanden ein weiteres Mal eine Schwellung mit einem Durchmesser von > 5 cm (0,2%) auftrat. Schmerzen an der Injektionsstelle mit einer Dauer von mehr als drei Stunden gaben zehn der mit der Autovaccine behandelten Probanden in insgesamt 48 Episoden (10,31%) an. In der Placebo-Gruppe waren vier Episoden (0,7%) mit Schmerzen bei drei Probanden festzustellen, davon bei zwei Probanden mit einmaligem Auftreten. Über Juckreiz an der Injektionsstelle berichteten vier der Behandelten mit 13 Episoden (2,8%), in der Placebo-Gruppe trat bei zwei der Probanden in vier Episoden (0,7%) Juckreiz auf. Eine Urtikaria trat bei keinem der Probanden auf. Asthma-Anfälle im Verlauf der Behandlung und außerhalb der Provokationswoche fanden sich in der Autovaccine-Gruppe bei zwei Probanden jeweils einmalig (0,4%). In der Placebo-Gruppe traten acht Episoden (1,4%) bei drei Probanden auf.

Bei zwei Probanden der Autovaccine-Gruppe wurde nach dem Auftreten von Rötung und Schwellung an der Injektionsstelle sowie Schmerzen bis zur Bewegungseinschränkung die Autovaccine-Dosis um zwei Dosen zur zuletzt vertragenen Dosis zurückgestuft. Danach konnten die Injektionen weiter nach Protokoll erfolgen.

An systemischen Reaktionen wurden hauptsächlich Gliederschmerzen, Kopfschmerzen und das Auftreten von grippalen Infekten erfasst. Hier zeigten sich in der Autovaccine-Gruppe bei sieben Probanden acht Episoden von Gliederschmerzen (1,7%), in der Vergleichsgruppe bei nur einem Probanden mit zweimaligem Auftreten von Gliederschmerzen (0,4%). Kopfschmerzen traten in der Autovaccine-Gruppe bei vier Probanden in sechs Episoden (1,3%) und in der Placebo-Gruppe bei fünf Probanden mit insgesamt 13 Episoden (2,3%) auf. Insgesamt waren Probanden der

Autovaccine-Gruppe mit 12 Episoden (2,6%) bei drei Probanden genauso häufig von grippalen Infekten betroffen als in der Placebo-Gruppe mit ebenfalls 12 Episoden (2,2%) bei vier Probanden.

Die Vitalparameter Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur zeigten keine über die physiologischen Schwankungen hinausgehenden Veränderungen.

### 3.2.2 Bronchiale Hyperreagibilität

Alle Probanden erhielten zu den Visiten 1, 29 und 33 jeweils eine Methacholin-Provokation. Bestimmt wurde dabei die Dosis, die zu einem FEV<sub>1</sub>-Abfall von  $\geq 20\%$  (PD<sub>20</sub>) führte.

#### Intention-to-Treat Analyse

Bei Visite 1 – also direkt vor Interventionsbeginn - unterschieden sich die beiden Gruppen in ihrer PD<sub>20</sub>-Dosis, jedoch nicht signifikant ( $p = 0,14$ ). Der Median der Autovaccine-Gruppe lag bei  $0,38 \text{ mg} \pm 0,52$  Methacholin, während er in der Placebo-Gruppe bei  $0,65 \text{ mg} \pm 1,11$  lag.

Bis Visite 29, der ersten Visite der abschließenden Provokationswoche, zeigte sich in der mit der Autovaccine behandelten Gruppe eine Verbesserung der bronchialen Hyperreagibilität. Die mediane PD<sub>20</sub>-Dosis stieg auf  $1,03 \text{ mg} \pm 1,07$  im Vergleich zu Visite 1. Dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,08$ ). Auch die Placebo-Gruppe zeigte im Vergleich der beiden Visiten einen Anstieg der Methacholin-Dosis, allerdings einen deutlich geringeren als in der Autovaccine-Gruppe. So stieg die PD<sub>20</sub>-Dosis auf  $1,06 \text{ mg} \pm 1,10$  an ( $p = 0,33$ ).

Nach den an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführten Einstufen-Provokationen mit Hausstaubmilbe wurden die Probanden an Visite 33 erneut mit Methacholin provoziert. Hierbei zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der bronchialen Hyperreagibilität. So lag in der Autovaccine-Gruppe die PD<sub>20</sub>-Dosis bei  $0,10 \text{ mg} \pm 0,47$ , in der Placebo-Gruppe die PD<sub>20</sub>-Dosis bei  $0,18 \text{ mg} \pm 0,83$ . Verglichen mit Visite 29 war dies in der Autovaccine-Gruppe ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ), in der Placebo-Gruppe sogar ein hochsignifikanter Anstieg ( $p < 0,01$ ).

Es fiel auf, dass in der Placebo-Gruppe bei zwei Probanden, die nach einer starken Spätreaktion Steroide eingenommen hatten, die abschließende Provokation nicht mehr durchgeführt werden konnte, während in der mit Autovaccine behandelten Gruppe alle provoziert werden konnten.

#### Per-Protocol Analyse

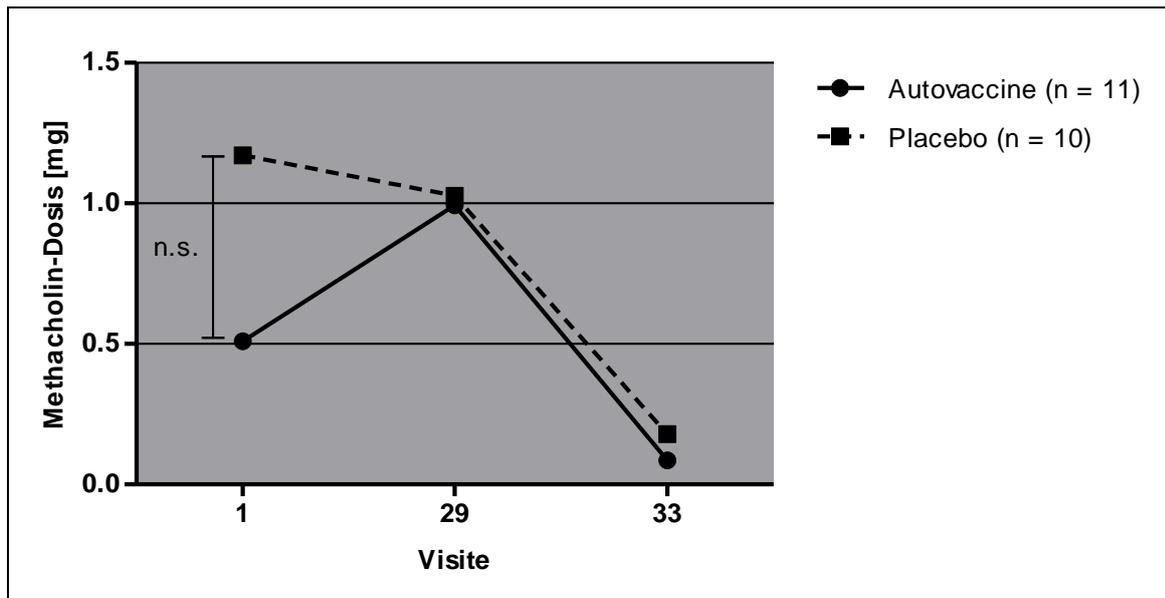
In die PP-Analyse konnten in der Autovaccine-Gruppe von ursprünglich 15 noch 11 Probanden eingeschlossen werden, da ein Proband schon während der Behandlungsphase die Studie beendet hatte. In der Kontrollgruppe hingegen mussten insgesamt sechs Probanden aus der Auswertung ausgeschlossen werden, sodass sich die Gruppe von anfänglich 16 auf 10 Probanden verkleinerte. Auch in dieser Gruppe beendete ein Proband bereits während der Behandlungsphase seine Teilnahme an der Studie, während bei den anderen fünf Teilnehmern aus gesundheitlichen Gründen nicht alle der im Protokoll vorgesehenen Provokationen der Abschlusswoche durchgeführt werden konnten.

Im Vergleich der ITT und der PP-Analyse zeigte sich bei der mit Autovaccine behandelten Gruppe kaum ein Unterschied in der initialen Methacholin-Dosis. Bei der Placebo-Gruppe hingegen zeigte sich ein wenn auch nicht signifikanter Anstieg der Dosis in der nach Protokoll durchgeführten Probandengruppe von  $0,65 \text{ mg} \pm 1,11$  auf  $1,17 \text{ mg} \pm 1,26$ . Dies gab Hinweis darauf, dass die fünf ausgeschlossenen Probanden eine deutlich niedrigere PD<sub>20</sub>-Dosis zeigten und somit eine höhere bronchiale Hyperreagibilität aufwiesen.

Der Verlauf der bronchialen Hyperreagibilität von vor Behandlungsbeginn bis nach Behandlungsende bzw. nach Provokationsende stellte sich ähnlich den Ergebnissen der ITT-Analyse dar (siehe Abb. 4). Die Probanden der Autovaccine-Gruppe wiesen eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante ( $p = 0,086$ ), Abnahme der bronchialen Hyperreagibilität auf. Bei der Placebo-Gruppe konnte im Vergleich zur ITT-Analyse sogar eine minimale Abnahme der Methacholin-Dosis festgestellt werden. Die Probanden dieser Gruppe waren also erwartungsgemäß ebenso hyperreagibel wie vor Behandlung.

Die Provokationen der Abschlusswoche führten bei den Probanden beider Gruppen wieder zu einer signifikanten Zunahme der bronchialen Hyperreagibilität und erreichten sogar Dosiswerte noch unterhalb des Ausgangsniveaus vor

Behandlungsbeginn. Die Autovaccine-Gruppe fiel auf eine Methacholin-Dosis von Median 0,09 mg  $\pm$  0,41 ( $p = 0,009$ ), die Placebo-Gruppe auf Median 0,18 mg  $\pm$  0,92 ( $p = 0,015$ ) ab. Auch das Delta der PD<sub>20</sub>-Dosis vor und nach Behandlungsphase zeigten keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,19$ ).



**Abb. 4: Der Verlauf der bronchialen Hyperreagibilität vor und nach Behandlungsphase sowie nach Provokationsphase in der Per-protocol-Analyse.**

### 3.2.3 Allergie-Labor

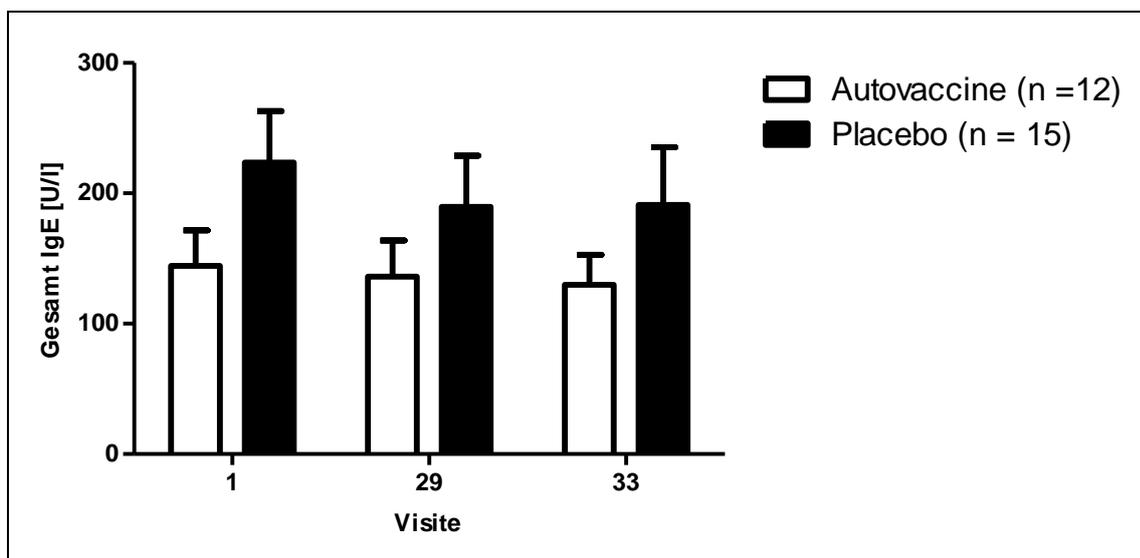
Jeweils vor und nach der Behandlungsphase (Visiten 1 und 29) sowie nach der Provokationswoche (Visite 33) wurden bei allen Probanden das Gesamt-IgE und das spezifischen IgE für Hausstaubmilben (Dp, Df) bestimmt. Die entsprechenden Werte beider Gruppen finden sich in Tabelle 6.

**Tabelle 6: Das Allergielabor der Autovaccine- und Placebo-Gruppe.**

Visite	Autovaccine (n = 12)			Placebo (n = 15)		
	1	29	33	1	29	33
Gesamt-IgE [U/l]	144,4 ± 94,6 (155,5)	136,1 ± 96,0 (127,5)	129,8 ± 79,7 (126,5)	223,5 ± 148,0 (212,5)	189,7 ± 151,9 (177,0)	191,2 ± 164,8 (150,0)
Dp [U/l]	31,1 ± 23,3 (21,0)	23,9 ± 22,4 (14,8)	22,2 ± 21,2 (13,0)	36,3 ± 27,5 (29,6)	28,3 ± 27,8 (21,9)	29,4 ± 28,0 (19,4)
Df [U/l]	32,9 ± 27,9 (24,7)	24,1 ± 20,6 (17,3)	22,2 ± 17,1 (16,7)	36,8 ± 28,0 (34,6)	29,4 ± 28,3 (18,6)	28,8 ± 27,9 (19,9)

Angegeben in Mittelwert ± SD (Median)

Im Gesamt-IgE zeigten sich zu allen Messzeitpunkten in der Autovaccine-Gruppe niedrigere Werte als in der Placebo-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Verlauf blieben die Werte konstant ohne signifikante Veränderungen (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Der Verlauf des Gesamt-IgE vor und nach Behandlung sowie nach Provokation in beiden Gruppen in der Intention-to-treat-Analyse.**

Die Werte für das spezifische IgE der beiden häufigsten Hausstaubmilbenarten *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) und *farinae* (Df) waren vom Verlauf vergleichbar mit denen des Gesamt-IgE. In der ITT-Analyse wies die Autovaccine-Gruppe bei allen Messungen niedrigere Werte auf als die Placebo-Gruppe, jedoch auch hier ohne statistische Signifikanz. In beiden Gruppen kam es im Verlauf der Visiten zu keinen signifikanten Änderungen des spezifischen IgE. In der PP-Analyse zeigte sich wie bereits beim Gesamt-IgE ein signifikanter Abfall in der Placebo-Gruppe, während die Werte der Autovaccine-Gruppe konstant blieben.

### 3.2.4 Allergenprovokation

#### 3.2.4.1 Spirometrie

Bei allen Probanden wurde zu Beginn jeder bronchialen Provokation eine Spirometrie durchgeführt. Die Ausgangs-FEV<sub>1</sub> bzw. die FEV<sub>1</sub> nach Inhalation von Kochsalzlösung sollte vor Beginn der Provokation nicht < 70% liegen. Die Tabellen 7 und 8 zeigen die Lungenfunktionsbasiswerte vor und nach Behandlungsphase beider Gruppen. Es fanden sich weder im direkten Gruppenvergleich noch innerhalb der Gruppen vor und nach Behandlung signifikante Unterschiede.

**Tabelle 7: Die Basalwerte der Lungenfunktion vor der Behandlungsphase in der Intention-to-treat-Analyse.**

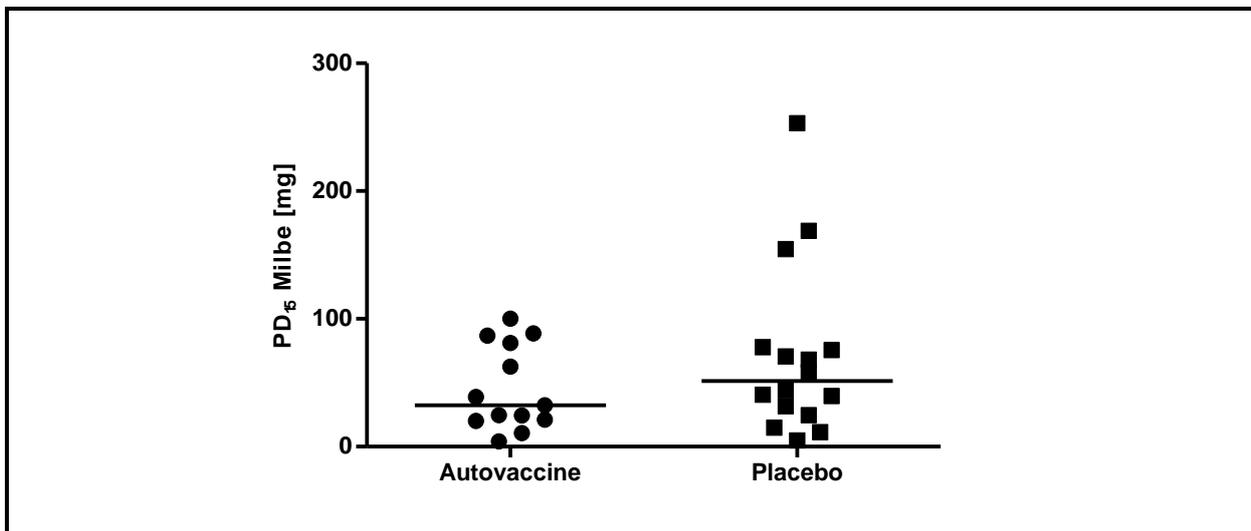
Vor Behandlung	Autovaccine (n = 15)		Placebo (n = 16)	
	Mittelwert ± SD	Median	Mittelwert ± SD	Median
FEV <sub>1</sub> %Soll	104,9 ± 13,0	106,4	103,2 ± 11,9	106,3
FVC%Soll	105,5 ± 23,7	104,9	109,7 ± 11,2	109,3
FEV <sub>1</sub> %VC (Tiffeneau)	101,1 ± 6,6	103,6	96,9 ± 7,5	97,3

**Tabelle 8: Die Basalwerte der Lungenfunktion nach der Behandlungsphase in der Intention-to-treat-Analyse.**

Nach Behandlung	Autovaccine (n = 12)		Placebo (n = 15)	
	Mittelwert ± SD	Median	Mittelwert ± SD	Median
FEV <sub>1</sub> %Soll	103,1 ± 13,4	105,0	105,1 ± 17,1	105,4
FVC%Soll	110,3 ± 24,4	109,2	112,8 ± 12,4	114,4
FEV <sub>1</sub> %VC (Tiffeneau)	95,7 ± 9,4	98,6	95,9 ± 10,0	97,5

### 3.2.4.2 PD<sub>15</sub>-Dosis

Die Milben-Dosis, mit der die Probanden während der Abschlusswoche provoziert werden sollten, wurde für jeden Probanden individuell mittels beschriebener Formel (siehe Abschnitt Methodik 2.7.3) errechnet und mit einer Einstufenprovokation vor Behandlungsbeginn überprüft und gegebenenfalls angepasst. Die Dosis, die die Probanden der Placebo-Gruppe (n = 15) inhalieren mussten, lag bei Median 51,3 mg, in der Autovaccine-Gruppe (n = 12) bei Median 32,3 mg (n.s.).



**Abb. 6: Die PD<sub>15</sub>-Hausstaubmilbendosis im Vergleich der Autovaccine- zur Placebo-Gruppe.**

Die Dosis der Probanden aus beiden Gruppen, die in die PP-Analyse eingeschlossen wurden, wiesen kaum einen Unterschied auf: Median 51,3 mg versus Median 38,9 mg (n.s.). Aus der Placebo-Gruppe konnten zwei Probanden mit Dosen weit über dem Gruppendurchschnitt (253,0 mg und 154,6 mg) nicht nach Protokoll die Abschlusswoche absolvieren, die anderen drei Probanden dieser Gruppe, die Provokationen auslassen mussten, wiesen jedoch mit 31,7 mg, 40,7 mg und 4,8 mg Dosen weit unterhalb des Gruppendurchschnittes auf.

### 3.2.4.3 Maximaler Abfall der FEV<sub>1</sub> nach Provokation

In beiden Gruppen wurde jeweils vor Provokation sowie 10, 15 und 30 Minuten nach Provokation eine Spirometrie durchgeführt. Aus den gemessenen FEV<sub>1</sub>-Werten wurde der niedrigste Wert jedes Probanden nach Provokation in Relation zum jeweiligen Ausgangswert gesetzt, um den maximalen Abfall der FEV<sub>1</sub> zu bestimmen.

Bei Betrachtung der Basalwerte der FEV<sub>1</sub> ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die basalen FEV<sub>1</sub>-Werte blieben in beiden Gruppen sowohl während der Behandlungsphase als auch in der Provokationswoche konstant (Abb. 7).

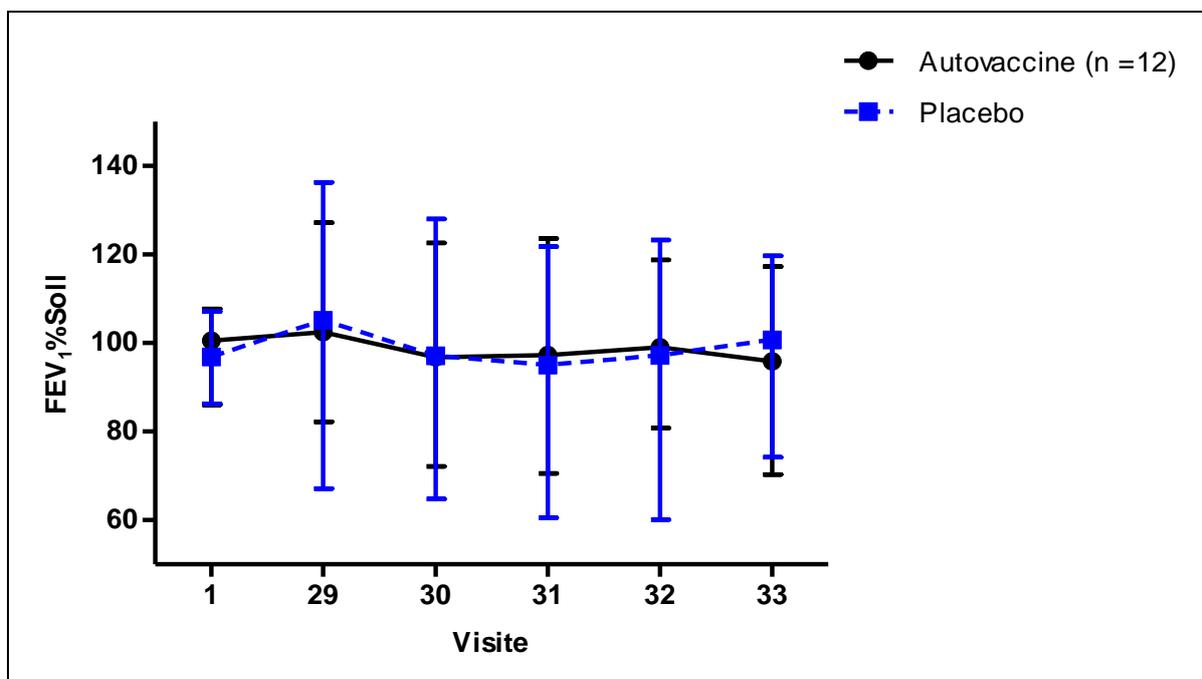


Abb. 7: Die Basalwerte der FEV<sub>1</sub> (%Soll) vor Behandlung und während der Provokationsphase im Gruppenvergleich in der ITT-Analyse.

In beiden Gruppen zeigte sich nach der ersten spezifischen Provokation (Visite 29) unter  $\beta_2$ -Sympathomimetika-Schutz wie erwartet nur ein geringfügiger Abfall des FEV<sub>1</sub>, während der größte Abfall des FEV<sub>1</sub> bei Visite 30 zu messen war. Die Autovaccine-Gruppe und die Placebo-Gruppe unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt weder in der ITT- noch in der PP-Analyse signifikant. Bei den Visiten 30,31 und 32 kam es, wie erwartet, zu einem reproduzierbaren Abfall der PD 20 (siehe Tabelle 9)

**Tabelle 9: Der maximale Abfall der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) während der der Provokationsphase (Visiten 30 – 32) nach Behandlungsende**

Maximaler Abfall FEV <sub>1</sub> (%)	Autovaccine (n = 12)		Placebo (n = 15)	
	Mittelwert ± SD	Median	Mittelwert ± SD	Median
Visite 30	27,30 ± 19,47	19,59	26,42 ± 15,13	27, 54
Visite 31	23,30 ± 13,31	22,98	19,14 ± 12,25	16,27
Visite 32	16,73 ± 17,64	12,41	22,11 ± 13,56	19,32

### 3.2.5 Salbutamol-Verbrauch und Spätreaktion (LAR)

Die repetitiven Milbenprovokationen über 4 Tage wurden in der abschließenden Provokationswoche sehr unterschiedlich vertragen. Jedoch zeigten sich positive Effekte der Autovaccine-Behandlung bezüglich der LAR sowie des Salbutamol-Verbrauches.

Anhand der Zahlen der PP-Analyse ist zu erkennen, dass aus der Placebo-Gruppe insgesamt fünf Probanden aus der Analyse ausgeschlossen werden mussten. Davon zeigten drei Probanden in der Ausgangs-FEV<sub>1</sub>-Werte < 70%, sodass die Provokation ausgelassen wurde und am Folgetag mit einer entsprechend reduzierten Dosis weiterproviziert wurde, sofern die Ausgangs-FEV<sub>1</sub> > 70% war. Zwei weitere Probanden mussten aufgrund einer heftigen Spätreaktion (LAR), die unter Salbutamol nicht zu kontrollieren war, 50 mg Decortin® p.o. einnehmen, sodass auch sie von der PP-Analyse ausgeschlossen wurden.

In der mit der Autovaccine behandelten Gruppe wurde lediglich ein Proband von der PP-Analyse ausgeschlossen. Hier kam es ebenfalls zu einer Ausgangs- $FEV_1 < 70\%$ , sodass mit einer reduzierten Milbendosis fortgefahren werden musste. Alle Probanden führten 10 Stunden nach Provokation stündlich eine Messung der PEF mittels Peak-Flow-Meter und Symptomtagebücher zu Hause durch. Die PEF-Werte sowie der Salbutamol-Verbrauch wurden von den Probanden dokumentiert. Zu einer LAR, definiert als Abfall des PEF-Wertes um  $\geq 15\%$ , kam es nach Visite 0 – also vor Behandlungsbeginn - in der Placebo-Gruppe bei 5 von 16 Probanden (31,3%) mit einem medianen Abfall des PEF von 22,5 % auf, in der Autovaccine-Gruppe bei 4 von 15 Probanden (26,7%) mit einem medianen Abfall von 17,0%. In der Abschlusswoche wiesen in der Placebo-Gruppe nach der ersten Provokation (Visite 29) 6 von 15 Provozierten (40,0%), nach der zweiten Provokation (Visite 30) 5 von 14 (35,7%), nach der dritten Provokation (Visite 31) 6 von 13 (46,2%) und nach der vierten und letzten Provokation mit Hausstaubmilbe (Visite 32) 8 von 14 Probanden (57,1%) eine LAR auf. Im Median fiel der PEF in der Provokationswoche in dieser Gruppe um 20,1% ab. In der Autovaccine-Gruppe waren deutlich weniger LAR zu verzeichnen: Am ersten Provokationstag (Visite 29) reagierten 2 von 12 Probanden (16,7%) mit einem PEF-Abfall von  $\geq 15\%$ , am zweiten Tag (Visite 30) 4 von 12 (33,3%), bei der dritten Provokation (Visite 31) 2 von 12 (16,7%) und bei der abschließenden Provokation an Visite 32 4 von 12 Probanden (33,3%). Auch der PEF-Abfall dieser Gruppe in der Abschlusswoche war mit einem Median von 17,1% geringer als in der Vergleichsgruppe. Nach der PP-Analyse fiel auf, dass in der Autovaccine-Gruppe trotz Spätreaktion fast alle Probanden die Provokationen nach Protokoll fortsetzen konnten. In der Placebo-Gruppe hingegen mussten gehäuft die Probanden mit einer LAR wegen einer eingeschränkten Ausgangs- $FEV_1$  am Folgetag aus der PP-Analyse ausgeschlossen werden. Am auffälligsten war, dass in der Autovaccine-Gruppe signifikant weniger Episoden einer LAR bezogen auf die Gesamtsumme der Provokationswoche auftraten als in der Placebo-Gruppe ( $p = 0,012$ ). Die Symptome der Spätreaktionen konnten durch das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Salbutamol rasch gelindert werden. Zwei Probanden der Placebo-Gruppe mussten, auf Grund der Atemnot, einmalig zusätzlich 50 mg Decortin® p.o. einnehmen.

**Tabelle 10: Spätreaktionen (LAR) und maximaler PEF-Abfall (%) in der Provokationsphase.**

Visite	29	30	31	32	Episoden gesamt	PEF- Abfall/Tag
Placebo	6/15 (21,2%)	5/14 (26,4%)	6/13 (21,1%)	8/14 (24,2%)	<b>25/56</b>	<b>23,3%</b>
Autovaccine	2/12 (13,0%)	4/12 (23,0%)	2/12 (16,3%)	4/12 (21,4%)	<b>10/48</b>	<b>18,4%</b>
<b>p =</b>	<b>0,236</b> <b>(0,213)</b>	<b>1</b> <b>(0,730)</b>	<b>0,202</b> <b>(0,566)</b>	<b>0,267</b> <b>(0,677)</b>	<b>0,012</b>	<b>0,286</b>

Angegeben in Probanden mit LAR/provozierte Probanden (maximaler PEF-Abfall).

Der Salbutamol-Verbrauch nach den Hausstaubmilben-Provokationen lag in der Placebo-Gruppe nach Visite 29, bei der sowohl eine Methacholin- als auch eine spezifische Milben-Provokation durchgeführt wurde, bei durchschnittlich  $4,29 \pm 2,16$  Hüben Salbutamol (Median 3,5 Hübe), nach Visite 30 bei  $3,57 \pm 1,99$  Hüben (Median 2,5 Hübe), nach Visite 31 bei  $3,08 \pm 1,93$  Hüben (Median 2,0 Hübe), nach Visite 32 bei  $3,33 \pm 2,38$  Hüben (Median 3,0 Hübe) und nach der letzten Visite 33 bei  $2,46 \pm 0,78$  Hüben (Median 2,0 Hübe). Die Probanden der Autovaccine-Gruppe verbrauchten bei Visite 29  $2,92 \pm 1,56$  Hübe, bei Visite 30  $2,33 \pm 0,78$  Hübe, bei Visite 31  $2,33 \pm 1,07$  Hübe, bei Visite 32  $1,83 \pm 1,07$  Hübe und bei Visite 33  $2,25 \pm 0,87$  Hübe. Im Median lag der Verbrauch in dieser Gruppe bei allen Provokationstagen bei 2,0 Hüben.

Der Salbutamol-Bedarf der Autovaccine-Gruppe lag also durchschnittlich bei mehr als einem Hub weniger als in der Placebo-Gruppe, was allerdings auch nach der Provokation bei Visite 0 bereits der Fall war. Besonders auffällig war der statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beim durchschnittlichen Salbutamol-Tagesbedarf bezogen auf die gesamte Provokationswoche. Während die Probanden der Autovaccine-Gruppe in dieser Woche durchschnittlich  $2,33 \pm 0,82$  (Median 2,10) Hübe pro Tag verbrauchten, lag der Bedarf in der Placebo-Gruppe bei  $3,51 \pm 1,52$  (Median 3,20) Hüben pro Tag ( $p = 0,012$ ). Auch im Gesamtverbrauch während der Provokationswoche unterschieden sich die Gruppen signifikant. Die Placebo-Gruppe lag bei einem Gesamtverbrauch von  $15,47 \pm 5,91$  Hüben (Median 15,00) im

Vergleich zu  $11,67 \pm 4,10$  HÜben (Median 10,50) in der Autovaccine-Gruppe ( $p = 0,035$ ).

Die PP-Analyse zeigte, ähnlich der Auswertung der LAR, dass in der Placebo-Gruppe vor allem die Probanden mit einem hohen Salbutamol-Verbrauch von der Tendenz her nicht nach Protokoll provoziert werden konnten und somit aus der PP-Analyse ausgeschlossen wurden. Bei den Probanden, die mit Autovaccinen behandelt worden waren, zeigte sich nach der PP-Analyse hingegen sogar ein höherer Verbrauch. Die Unterschiede im Salbutamol-Verbrauch zwischen den beiden Gruppen waren zu allen Zeitpunkten statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 11: Der Salbutamol-Bedarf [Hübe] während der Provokationsphase.**

Visite	29	30	31	32	33	Gesamt- verbrauch	Verbrauch/ Tag
Placebo	4,29 (2,16)	3,57 (1,99)	3,08 (1,93)	3,33 (2,38)	2,46 (0,78)	<b>15,47</b> <b>(5,91)</b>	<b>3,51</b> <b>(1,52)</b>
Autovaccine	2,92 (1,56)	2,33 (0,78)	2,33 (1,07)	1,83 (1,27)	2,25 (0,75)	<b>11,67</b> <b>(4,10)</b>	<b>2,33</b> <b>(0,82)</b>
<b>p =</b>	<b>0,041</b>	<b>0,027</b>	<b>0,126</b>	<b>0,030</b>	<b>0,248</b>	<b>0,035</b>	<b>0,012</b>

Angegeben in Mittelwert (SD).

## 4 Diskussion

Bei der im Rahmen unserer Studie verwendeten Autovaccine handelt sich um ein patientenspezifisches Individualtherapeutikum aus apathogenen rauhen und glatten Formen humaner E.coli. Diese werden aus der Fäkalflora eines Patienten isoliert, anschließend nach einem standardisierten Verfahren präpariert und zweimal über zwei Stunden bei 75°C hitzeinaktiviert [26].

Erste Beschreibungen zur Behandlung mit einer Autovaccine gab es bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts aus England. So nutzte Almroth Edward Right eine Staphylokokken-Autovaccine zur Therapie der Furunkulose, Sykose und Akne [35]. Mit Einführung der antibiotischen Therapie und ihrer Erfolge traten die Autovaccine in ihrer Bedeutung wieder in den Hintergrund. In den letzten Jahrzehnten folgten jedoch erneut Berichte, vor allem aus osteuropäischen Arbeitsgruppen, über den erfolgreichen Einsatz von Autovaccinen in der Behandlung von beispielsweise schwerer Akne vulgaris, chronischer Otitis media oder chronischer Sinusitis [28, 29, 31, 36].

Der grundlegende immunologische Mechanismus der Autovaccine ist bislang nicht ausreichend geklärt. Die vorherrschende Meinung ist, dass durch eine Autovaccinierung mit E. coli eine Th1-gewichtete Immunantwort induziert wird. Nach Antigen-Kontakt kommt es zu einer inflammatorischen Immunantwort, die zu einer Homöostase bzw. zu einem Gleichgewicht von Th1- und Th2-Zellen bedingt durch eine Induktion von T-regulatorische Zellen ( $T_{reg}$ ) führt. Dieser Wirkmechanismus ist überwiegend durch Untersuchungen an Mäusen belegt [51-53]. Neben diesen Mechanismen haben einige Studien gezeigt, dass Pattern-Recognition-Rezeptor, (PRR) wie die Toll-like-Rezeptoren (TLR, vor allem TLR4 und 9), eine entscheidende Rolle in der Wirkung der Autovaccine auf die Th1/Th2-Antwort spielen [23, 24]. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) triggern zum einen über den TLR-4 die angeborene Immunantwort, jedoch sind auch noch zwei andere Wege für weitere Immunantworten bekannt: ein MyD88-abhängiger sowie ein MyD88-unabhängiger Weg [37]. MyD88 ist wesentlich an der Induktion von IL-1b, IL-6 und TNF- $\alpha$  beteiligt. Die MyD88-unabhängige Immunantwort resultiert in einer Expression des IFN- $\gamma$ -induzierten Protein 10 (IP10 =CXCL10), einem proinflammatorischen und anti-fibrotischem Chemokin, das aktivierte T-Zellen anlockt und rekrutiert [38]. Die Rolle des MyD88-Weges wird kontrovers diskutiert und sowohl für den MyD88-abhängigen

als auch für den MyD88-unabhängigen Weg wurde eine Induktion der Th2-Immunität beschrieben [39, 40]. Die Lipopolysaccharide, bestehend aus einem Lipid A, einer Kernregion und Polysaccharidketten, befinden sich eingegliedert in die zwei Lipiddoppelschichten der Zellwand der gramnegativen E.coli. Dem Lipid A kommt dabei die Stellung eines Endotoxins zu [41]. Im Vergleich zu den natürlichen, nicht aufbereiteten E.coli Formen enthalten die von uns verwendeten Autovaccine lediglich ein Lipid A-Analogon, dessen Wirkung im Wesentlichen denen des Endotoxins entspricht, dem jedoch die toxischen Eigenschaften fehlen. Die Inhalation mit LPS hat sich als nützliches Modell für Studien zur Induktion bronchialer Entzündung erwiesen [42-44].

Dass LPS auch Effekte auf die T-Zellfunktion hat, konnte bereits seit den 1970er Jahren in zahlreichen Studien gezeigt werden [45-47]. Unter anderem wiesen Armerding et al. in vitro eine Beeinflussung der spezifischen T-Helferzellfunktion und folglich der antigenspezifischen Antikörper-Antwort nach [48]. Bufe und Holst beschrieben u.a. LPS als Janus-Gesicht, da in niedriger Dosierung angewendet eine starke inflammatorische Antwort im Gewebe auftrat, während sich bei höherer Dosierung bzw. niedrigerer Dosierung über einen längeren Zeitraum eine Toleranz des angeborenen Immunsystems gegenüber dem Endotoxin entwickelte [49, 50]. Auch Zaluga et al. konnten in ihrer Arbeit über eine Vaccine aus *Propionibacterium acnes* spezifische Antikörper gegen Struktur-Antigene dieses Bakteriums nachweisen [27]. Die Induktion von Antikörpern wurde auch beim Einsatz einer TNF-Autovaccine in einem Melanom-Modell beobachtet [51]. Okrasinska-Cholewa et al. zeigten ebenfalls in ihrer Arbeit, dass eine Aktivierung von antigenspezifischen T-Helferzellsubpopulationen stattfindet. Die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen konnten teilweise an Tiermodellen veranschaulicht werden. So wurden C57BL/6-Mäuse zur Auslösung einer bronchialen Hyperreagibilität mit Ovalbumin sensibilisiert, um dann nach Behandlung mit einer Autovaccine erneut bronchial provoziert zu werden. Es zeigte sich keine bronchiale Hyperreagibilität mehr [52]. In einer weiteren Studie zeigten Yu et al. ebenfalls eine verminderte bronchiale Entzündung und Hyperreagibilität an einem Mausmodell für allergische Atemwegsentzündung, an dem vor Ovalbumin-Sensibilisierung eine Behandlung mit *L. rhamnosus* Lcr35 erfolgte [53]. Auch bei Schweinen, die mit *Ascaris suum* sensibilisiert wurden, resultierte eine sechswöchige orale Supplementierung mit *L. rhamnosus* in einer verminderten bronchialen Hyperreagibilität [54]. In einer neueren

in vitro Studie induzierte *L. rhamnosus* Lcr35 dosisabhängig einen Anstieg der pro-Th1/Th17-Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 und IL23) in humanen, von Monozyten abgeleiteten unreifen dendritischen Zellen, also gegenregulatorisch zu den bei den IgE-abhängigen Allergien beeinträchtigten Zytokinprofilen [55]. In einer klinischen Studie an erwachsenen Probanden mit allergischer Rhinitis verbesserte eine vierwöchige Therapie mit *L. paracasei* ST11 subjektiv die Beschwerden und bewirkte eine Down-Regulation des pro-inflammatorischen IL-5 [56].

Neben diesen spezifischen Effekten konnte aber auch eine eher unspezifische Antwort induziert werden. So wurde unter Behandlung mit Autovaccinen eine typische Akute-Phase-Reaktion mit einer schnellen Immunantwort im Sinne einer Freisetzung von verschiedenen Mediatoren beobachtet [57].

Durch eine Autovaccinierung mit *E. coli* kann in Mensch und Tier eine Th1-gewichtete Immunantwort induziert werden. Bei Allergikern vermag diese Immunisierung sogar eine Verschiebung von der Th2- zu einer Th1-dominierten Immunantwort zu erreichen und so eine unspezifische Immuntherapie darzustellen [36].

Charakteristischerweise reagieren Patienten, die unter einem allergischen Asthma leiden auf eine spezifische bronchiale Allergenprovokation mit einer Verschlechterung ihrer Lungenfunktion und klinischen Beschwerden wie Atemnot und Husten. In einer vorangegangenen Studie konnten wir den protektiven Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die bronchiale Entzündung bei einer spezifischen bronchialen Allergenprovokation mit Hausstaubmilben nachweisen [13, 58].

Auch Vaccinierungen mit Probiotika wurden in den vergangenen Jahrzehnten in zahlreichen Studien im Zusammenhang mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises untersucht. So konnten Kalliomäki et al protektive Effekte auf die Entwicklung eines atopischen Ekzems und eines allergischen Asthma bronchiale bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft mit *Lactobacillus* GG behandelt wurden, nachweisen [59, 60]. Eine positive Wirkung von *Lactobacillus* GG (LGG) konnten Rose et al. bei Kindern mit rezidivierenden Bronchitiden und einer positiven Familienanamnese auf atopische Erkrankungen nachweisen. Unter Behandlung mit LGG zeigten sich signifikant weniger Neusensibilisierungen und auch die Summe des kumulativen spezifischen IgE nahm ab [61]. Diese Ergebnisse veranlassten uns zu der Annahme, dass durch eine Autovaccinierung eine Immuntoleranz aktiviert

werden kann und es zu einer signifikant geringeren allergischen Entzündungsreaktion nach Allergenkontakt kommen könnte. Wir postulierten, dass diese positiven Effekte auch bei einer Behandlung mit Autovaccinen beobachtet werden könnten. Entsprechend wurde eine „Proof-of-Concept“ Studie konzipiert, die bei relativ kleinen Fallzahlen einen positiven Effekt der Autovaccinierung nachweisen könnte. Die Fallzahlberechnung ergab, dass ein positiver Effekt bzw. signifikanter Rückgang von eNO bei 15 Patienten vs Placebo nachweisbar ist.

Das Ziel unserer Studie war also die Prüfung der Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit einer autologen E.coli Autovaccine bei Hausstaubmilben-Allergikern mit intermittierendem oder mildem persistierendem Asthma bronchiale. So konnten wir bereits mit den Daten aus der Phase I-Studie an einem kleinen Kollektiv von acht Patienten belegen, dass der gewählte Stufenplan sicher und gut verträglich ist. Weiterhin zeigten sich erste Tendenzen im Rückgang der bronchialen Entzündung gemessen mittels eNO [62]. Dies sollte im Rahmen einer Phase II-Studie als „proof of concept“ Placebo-kontrolliert geprüft werden. Als klinische Zielparameter der Phase II-Studie definierten wir das eNO als Marker der bronchialen Entzündung. Sekundäre Parameter waren die Verträglichkeit der Autovaccinierung, der Verlauf der bronchialen Hyperreagibilität bestimmt mittels Methacholin-Provokation sowie die Symptome und der Bedarf an inhalativen Betamimetika.

Die Studie gliederte sich in zwei Abschnitte. Zunächst wurden alle Probanden nach Einschluss und Randomisierung über 26 Wochen (Visiten 1 – 28), entsprechend dem Ablaufschema, entweder mit der Autovaccine oder einem Placebo behandelt. Sowohl vor als auch nach dieser Behandlungsphase wurden eNO, bronchiale Hyperreagibilität und das Allergie-Labor (Gesamt-IgE und spezifisches IgE auf Milbe) bestimmt. Im Anschluss an die Behandlungsphase folgte die Provokationsphase, in der überprüft werden sollte, ob sich auch unter starker Allergenbelastung mögliche Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe bestätigen lassen. Auch während und nach dieser Phase wurden bei allen Probanden eNO, bronchiale Hyperreagibilität und das Allergie-Labor bestimmt. Bei der Betrachtung der Daten unterschieden wir die Analyse der beiden Behandlungsgruppen vor und nach Behandlung sowie nach Behandlung und nach Provokationsphase.

Als primären Zielparameter wählten wir das exhalative Stickstoffmonoxid als Marker der bronchialen Entzündung. Der Nutzen des eNO bei der Diagnosestellung eines Asthma bronchiale konnte in zahlreichen Studien belegt werden, da sowohl erhöhte

Werte als auch ein Ansprechen auf Kortikosteroide für ein Asthma bronchiale hochspezifisch sind [63, 64]. Jones et al. konnten signifikante Korrelationen zwischen eNO und klinischen Symptomen sowie Sputumeosinophilie nachweisen [65]. In Wirksamkeitsstudien zu antiinflammatorischen Medikamenten in der Asthma-Therapie, wie inhalativen Kortikosteroiden, Leukotrienrezeptor-Antagonisten oder auch Probiotika, wurden diese Erkenntnisse sowie die nicht-invasive, schnelle und präzise Messbarkeit des eNO bereits genutzt [66-70].

In unserer Studie zeigten die beiden Gruppen zu Beginn der Behandlungsphase mit einem Median von 31,9 ppb in der Autovaccine-Gruppe gegenüber 29,1 ppb in der Placebo-Gruppe keinen Unterschied. Während die Placebo-Gruppe nach der Behandlungsphase beinahe gleiche Werte aufwies, war in der Autovaccine-Gruppe ein signifikanter Abfall ( $p = 0,03$ ) des eNO und somit der bronchialen Entzündung nachweisbar. Erste Hinweise zum Rückgang der bronchialen Entzündung unter Behandlung mit Autovaccinen hatte bereits die Vorarbeit (Phase-I-Studie) gegeben [61]. So zeigten sich hier vor und nach Behandlung signifikante Unterschiede zwischen den Anstiegen vor und 24 Stunden nach bronchialer Allergenprovokation mit Milbe.

Signifikante Rückgänge des eNO und somit der bronchialen Entzündung sind seit Langem aus Studien zur Asthma-Therapie mit inhalativen Steroiden bekannt [65, 66], sodass eNO-Messungen unter dieser Therapie heute bereits zur Dosisfindung und zum Monitoring eingesetzt werden [68]. Neben den inhalativen Steroiden konnte auch für die Leukotrienrezeptor-Antagonisten (LTRA) in zahlreichen Studien ein antiinflammatorischer Effekt belegt werden [69, 70]. Ebenfalls positive Effekte auf die bronchiale Entzündung konnten aber auch bei alternativen Therapieansätzen wie mehrfach ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen werden. So zeigten unter anderem Schubert et al. konstant niedrigere eNO-Werte bei Probanden mit leichtem Asthma, die mit n-3 PUFA supplementiert wurden, im Vergleich zu den Asthmatikern, die ein Placebo eingenommen hatten [13]. Alternative Therapieansätze wie n-3 PUFA oder auch die von uns untersuchten Autovaccine können gerade bei leichten Asthmatikern, bei denen eine Therapie mit inhalativen Steroiden oder LTRA nicht indiziert ist, in Erwägung gezogen werden.

Asthma bronchiale ist neben der bronchialen Inflammation pathophysiologisch charakterisiert durch eine bronchiale Hyperreagibilität und durch eine auf

unspezifischen Reiz – beispielsweise Anstrengung oder kalte Luft – oder durch chemische Agenzien wie Methacholin induzierbare Bronchokonstriktion [8, 63]. In unserer Studie erfolgte die Messung der bronchialen Hyperreagibilität ebenso wie die eNO-Messungen vor und nach der Behandlungsphase. Während die mit der Autovaccine behandelte Gruppe, die vor Behandlung eine höhere bronchiale Hyperreagibilität aufwies, sich unter Behandlung tendenziell verbesserte, waren in der Placebo-Gruppe keine Unterschiede feststellbar.

Dies steht in guter Übereinstimmung mit Tierversuchen. Yu et al konnten einen Rückgang der bronchialen Hyperreagibilität sowie eine verminderte Entzündung in den Atemwegen von Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen nach Behandlung mit *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 nachweisen [53]. Navarro et al [71] konnten nachweisen, dass durch die orale Immunisierung mit dem Bakterienlysat Bronchovaxom (BV) eine allergische Erkrankung der Atemwege bei Mäusen verhindern werden konnte. Die Autoren fanden, dass die Behandlung mit BV die Atemwegsentzündung durch Interleukin-10 (IL-10)-abhängige und MyD88-abhängige Mechanismen supprimiert und es FoxP3 (-) T-Zellen in FoxP3 (+) regulatorische T-Zellen induziert. Dieser Befund wurde durch die Gruppe von Patrick Holt bestätigt. Sie fanden, dass die Aktivität der T-reg Zellen in sensibilisierten Ratten durch eine BV-Stimulation des Darms gesteigert wurde [72]. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass zumindest im Mausmodell die Behandlung mit bakteriellen Vakzinen eine sichere und effiziente Strategie ist, um die Entwicklung von allergischen Erkrankungen zu verhindern.

Am häufigsten wird die bronchiale Hyperreagibilität IgE-vermittelt durch repetitiven Allergenkontakt induziert. Im Rahmen unserer Studie wurden nur Hausstaubmilben-Allergiker mit positivem Pricktest und erhöhten Werten für das spezifische IgE und einer positiven bronchialen Allergenprovokation eingeschlossen. Sollte die Autovaccinierung tatsächlich T<sub>reg</sub> Zellen aktivieren und einen Shift von einer Th2 zu Th1 Immunantwort induzieren, so könnte eine Rückgang des spezifischen IgE und Anstieg des IgG hierfür ein guter Surrogatmarker sein.

Das Allergie-Labor (Gesamt-IgE, spezifisches IgE und IgG Dp. und Df.) wurden vor und nach Behandlung analysiert. Hier konnte allerdings keine Wirkung der Autovaccine nachgewiesen werden. Die Werte der Autovaccine-Gruppe befanden sich konstant unterhalb derer der Placebo-Gruppe. In beiden Gruppen unterschieden

sich die Werte jedoch nicht zwischen vor und nach Behandlung. Dies unterscheidet die Autovaccinierung von der SIT. In der Therapie allergischer Beschwerden hat sich in den vergangenen Jahren die SIT etabliert [21, 71, 74]. Während ein signifikanter Anstieg des IgG<sub>4</sub> in diversen Studien belegt wurde [75], konnte die Aussagefähigkeit des spezifischen IgE allerdings auch noch nicht abschließend geklärt werden: Während verschiedene Arbeitsgruppen einen signifikanten Rückgang des spezifischen IgE nach Immuntherapie [76, 77] nachweisen, konnten Pichler et al. keinen signifikanten Rückgang bestätigen [78]. Allerdings zeigten eigene Untersuchungen von Rosewich et al. [77], dass das spezifische IgE unter Therapie zunächst kurzzeitig anstieg und erst 4 Wochen nach Therapieende unter Konzentrationen von vor Therapiebeginn abfiel. Für weitere Studien mit Autovaccinen wäre es folglich interessant das spezifische IgE in einer Verlaufskontrolle nach Therapieende zu bestimmen. Letztlich bleibt auch zu berücksichtigen, dass die Autovaccinierung eine polyklonale Wirkung zeigt, während die SIT allergenspezifisch ansetzt, sodass die Autovaccinierung gerade bei Patienten mit Polysensibilisierungen von Vorteil sein könnte.

Wie bei anderen Formen der Immuntherapie kann es auch unter Autovaccinen zu lokalen (an der Einstichstelle) und systemischen Reaktionen kommen. Wir beobachteten mit zunehmender Konzentration leichte Reaktionen - wie sie auch vom Hersteller und anwendenden Ärzten beschrieben sind – in Form von Rötungen und Schwellungen an der Einstichstelle. Diese waren selbstlimitierend und wurden als Ausdruck der immunologischen Aktivierung gewertet. Klassische allergische oder anaphylaktische Reaktionen, wie sie im Rahmen der SIT beobachtet werden [21, 79], traten nicht auf. Allerdings muss dabei einschränkend erwähnt bleiben, dass diese eventuell bei der begrenzten Anzahl an Injektionen nur nicht beobachtet wurden.

Um die festgestellten Effekte nach Behandlung auch noch unter Allergenexposition zu bestätigen, mussten alle Probanden eine Provokationswoche mit an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten bronchialen Allergenprovokationen mit Hausstaubmilbe sowie zu Beginn und zum Ende der Provokationsphase einer Methacholin-Provokation durchlaufen. Unter den spezifischen bronchialen Allergenprovokationen der Abschlusswoche waren diese zuvor gezeigten Effekte der Autovaccine-Behandlung auf die bronchiale Entzündung und Hyperreagibilität nicht mehr so deutlich erkennbar. So stiegen beide Gruppen mit ihren eNO-Werten von

Visite zu Visite signifikant an, jedoch war in der Autovaccine-Gruppe bereits am vorletzten Tag der Provokation der maximale Anstieg erreicht. Danach sank das eNO in dieser Gruppe sogar wieder leicht ab, während die Placebo-Gruppe noch weiter anstieg. Dies zeigt zumindest einen Trend zu einer Verbesserung der bronchialen Entzündung unter Behandlung mit Autovaccinen. Nichtsdestotrotz war der primäre Parameter der Studie nachzuweisen, dass die Autovaccinierung zu einem signifikanten Rückgang des eNO-Anstiegs unter Provokation führt, nicht erfüllt.

Die bronchiale Hyperreagibilität wurde nach Ende der Provokationsphase ebenfalls erneut mittels Methacholintest bestimmt. Ein solches Modell zur allergen-bedingten Entwicklung eines Asthmas beschrieb Cockcroft ebenfalls in einer Arbeit [19]. Wie Cockcroft zeigten auch wir in unserer Arbeit signifikante Anstiege der bronchialen Hyperreagibilität in der Methacholin-Provokation. Auch konnte kein positiver Effekt der Autovaccine nachgewiesen werden.

Im Gegensatz hierzu waren die klinischen Effekte der Autovaccinierung trotz der kleinen Patientenzahl sehr eindrucksvoll. Um die Wirkungen der Behandlung auf die Klinik der Probanden zu bewerten, führten alle Probanden während der abschließenden Provokationswoche ein Tagebuch über den jeweiligen Bedarf an  $\beta_2$ -Mimetika und ein Peakflow-Protokoll zur Erfassung der LAR.

Die LAR hat sich als wichtiger Parameter zur Bestimmung der Effektivität einer Therapie, wie z.B. der SIT, erwiesen [80]. Bei der LAR handelt es sich um eine erneute Atemwegobstruktion 3 – 8 Stunden nach Allergenexposition. Während an der EAR IgE-Antikörper, präformierte Mediatoren aus Mastzellen, beteiligt sind, sind die Mechanismen der LAR noch nicht genau geklärt [18, 81-84]. Vermutlich wird sie jedoch, zumindest teilweise durch Lipidmediatoren wie Leukotriene und eine T-Zellaktivierung verursacht. Im Gegensatz zur EAR ist die LAR ein besserer Prädiktor für das allergische Asthma [84, 85]. Die Häufigkeit der LAR ist allergenspezifisch und wird häufiger bei den perennealen Allergien, wie der Hausstaubmilbenallergie, beobachtet als bei den saisonalen Allergien [18, 86]. Blumberga et al. zeigten in einer Studie, dass im ersten Jahr nach Hausstaubmilben SIT von anfänglich 50 Probanden mit einer LAR nur noch 30 Probanden eine LAR aufwiesen, während in der Placebo-Gruppe die Zahl der Probanden mit LAR sogar von 54 auf 77 Probanden stieg [87]. Auch in unserer Studie zur Wirkung der Autovaccine wurden in der Placebo-Gruppe bezüglich der LAR signifikant mehr Episoden im Vergleich zur Autovaccine-Gruppe während der Provokationswoche gemessen. Zu Studienbeginn

wiesen die beiden Gruppen noch keine Unterschiede hinsichtlich der LAR auf: in der Autovaccine-Gruppe trat bei 4 von 15 Probanden eine LAR auf, während es in der Placebo-Gruppe bei 5 von 16 Probanden zu einer LAR kam. In der abschließenden Provokationswoche zeigten sich jedoch statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl an Episoden mit einer LAR bezogen auf die Anzahl an Provokationen. So traten in der Autovaccine nur 10 Episoden einer LAR bei 48 durchgeführten Provokationen auf, während die Placebo-Gruppe mit einer Anzahl von 25 Episoden bei 56 durchgeführten Provokationen keinen signifikanten Unterschied zum Behandlungsbeginn aufwies.

Als weiteren Parameter zur Einschätzung der Wirkung der autologen Autovaccine wurde der Verbrauch an  $\beta_2$ -Sympathomimetika (Salbutamol) erfasst. Auch im Rahmen zahlreicher Studien zur SIT wurde die Wirksamkeit u.a. anhand des Medikamentenbedarfs beurteilt. Hier konnte unter Therapie ein deutlicher Rückgang des Medikamentenverbrauchs belegt werden [70, 87-89]. Beim Salbutamol-Verbrauch während der Provokationswoche fanden sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. So lag sowohl der Gesamtverbrauch als auch der durchschnittliche Tagesbedarf in der Autovaccine-Gruppe signifikant niedriger als in der Placebo-Gruppe. Da es sich bei unserem Probandenkollektiv lediglich um Asthmatiker GINA I° handelte, war bei unseren Probanden der Einsatz von inhalativen bzw. systemischen Steroiden oder LTRA nicht notwendig und konnte so auch nicht in die Beurteilung des Medikamentenbedarfs einbezogen werden.

In beiden Gruppen mussten Probanden aufgrund eingeschränkter basaler FEV<sub>1</sub>-Werte vor Provokation oder des Bedarfs an Kortikosteroiden Probanden aus der Per-Protocol-Analyse ausgeschlossen werden. Dabei fiel auf, dass in der Placebo-Gruppe fünf Probanden ausgeschlossen wurden im Vergleich zu nur einem Probanden in der Autovaccine-Gruppe. Unter den fünf ausgeschlossenen Probanden der Placebo-Gruppe fanden sich insbesondere Probanden mit einer schweren LAR oder einem deutlich höheren Salbutamol-Bedarf.

Die unter Therapie mit Autovaccinen gezeigten positiven Effekte auf die bronchiale Entzündung sowie Hyperreagibilität während der ersten Therapiephase konnten zwar unter den mehrfachen bronchialen Allergenprovokationen nicht bestätigt werden. Dennoch wies die Auswertung der LAR und des Salbutamol-Verbrauchs unter Provokation Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zugunsten der

Autovaccine-Gruppe auf. Dieser eindrucksvolle klinische Befund konnte nicht durch einen gleichzeitigen Rückgang der bronchialen Entzündung bestätigt werden, so dass zu diskutieren ist, ob der gesetzte Reiz durch bronchiale Allergenprovokationen mit Hausstaubmilbe an vier aufeinanderfolgenden Tagen in der Provokationswoche zu stark war und einen möglicherweise größeren Effekt der Behandlung verdeckte. Unabhängig hiervon waren die positiven Effekte in der Behandlungsphase und die klinische Wirkung in der Provokationswoche signifikant und unsere „Proof-of-Concept“ Studie ist trotz negativem primären Parameter als erfolgreich einzustufen. Es handelte sich hierbei um eine erste, prospektiv und placebo-kontrollierte Studie, die den Nachweis der Wirkung einer Autovaccinierung überprüfen sollte, die bereits seit Jahrzehnten in der alternativen Medizin Anwendung fand. Erfreulicherweise waren die lokalen Nebenwirkungen relativ milde und deutlich geringer als bei der bereits etablierten SIT. Darüber hinaus ist das Anaphylaxierisiko nicht gegeben. Die Nebenwirkungen beschränkten sich auf leichte Rötungen und Schwellungen an der Injektionsstelle, zu systemischen Reaktionen kam es im Rahmen unserer Studie nicht.

Insgesamt konnte unsere Phase 2-Studie einen positiven Einfluss der Autovaccine auf das Asthma bronchiale mit Milbenallergie nachweisen. Es kam zu einem Rückgang der bronchialen Entzündung, der bronchialen Hyperreagibilität sowie des  $\beta_2$ -Mimetika-Verbrauchs und der Spätreaktion (LAR). Möglicherweise kann eine höhere Gesamtdosis der Autovaccine die gezeigten Effekte verstärken und hilft so weitere Erkenntnisse zum genauen Wirkmechanismus zu erlangen. Bei einem sehr günstigen Nebenwirkung/Wirkungsprofil und signifikanten klinischen Effekten ist die Voraussetzung für eine placebo-kontrollierte Feldstudie (Phase III) vor einer allgemeinen Zulassung bei Patienten mit Asthma und Milbenallergie gegeben.

## 5 Zusammenfassung

Einleitung: Beim allergischen Asthma bronchiale handelt es sich um eine weltweit zunehmende Erkrankung, für die es bislang nur wenige kausale Therapien gibt. In der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der chronischen Rhinitis, Sinusitis, Akne vulgaris oder auch dem Asthma bronchiale, werden seit vielen Jahrzehnten autologe Autovaccine eingesetzt und stellen eine effektive Behandlungsoption dar.

Methoden: In einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden Studie wurden 31 Probanden mit einem Asthma GINA I° sowie einem positiven Prick-Hauttest und einer positiven bronchialen Allergenprovokation mit Hausstaubmilbe entweder mit einer autologen E. coli Autovaccine (AV) oder einem Placebo über 24 Wochen behandelt, woraufhin eine abschließende Provokationsphase folgte. Als primären Zielparameter bestimmten wir das exhalative Stickstoffmonoxid (eNO) als Marker der bronchialen Entzündung. Die sekundären Zielparameter waren die bronchiale Hyperreagibilität vor und nach Behandlung sowie nach Provokation, das Allergielabor (Gesamt-IgE, spezifisches IgE gegen Hausstaubmilbe), die klinische Verträglichkeit sowie die Spätreaktion und der Medikamentenverbrauch in der abschließenden Provokationswoche.

Ergebnisse: Die Patienten der AV-Gruppe (36,7 ppb) fielen unter Behandlung signifikant auf 24,2 ppb ab, während die Placebo-Gruppe (26,8 ppb) mit 30,6 ppb eher angestiegen war. Bezüglich der bronchialen Hyperreagibilität ergab sich in der AV-Gruppe ebenfalls eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur Placebo-Gruppe: Placebo 1,17 mg vs. AV 0,51 mg vor Behandlung auf Placebo 1,03 mg vs. AV 0,99 mg nach Behandlung. Sowohl bezüglich der BHR als auch der eNO-Werte konnten diese Ergebnisse unter Provokation nicht bestätigt werden. In beiden Gruppen stieg das eNO unter den abschließenden bronchialen Allergenprovokationen signifikant auf 104,4 ppb in der Placebo-Gruppe und 91,1 ppb in der AV-Gruppe an. Während der abschließenden Provokationsphase zeigten sich in der AV-Gruppe ein signifikant geringerer Salbutamol-Bedarf sowie ein signifikant geringeres Auftreten von Spätreaktionen (LAR) im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Es traten nur leichte, selbst limitierende Lokalreaktionen auf.

Diskussion: Die Anwendung einer autologen E. coli Autovaccine war sicher und gut verträglich. Die Ergebnisse zeigten einen positiven Einfluss auf die bronchiale Entzündung und Hyperreagibilität bei leichten Asthmatikern mit Hausstaubmilben-Allergie und stellen so eine neue Behandlungsoption dar. Zum genauen Wirkmechanismus der AV bedarf es weiterer Studien.

## 6 Summary

**Introduction:** Asthma is a worldwide increasing disease, for that there are only few options for a causal therapy found. In chronic-inflammatory disease like chronic rhinitis, sinusitis, acne vulgaris or asthma autologous autovaccines (AV) are used for several decades and demonstrate an effective treatment option.

**Methods:** In a prospective, randomized, double-blind trial 31 asthmatics GINA I° with a positive skin prick test and bronchial allergen challenge on house dust mite were treated with either an autologous AV or a placebo for 24 weeks, after that a final bronchial allergen challenge period followed. The exhaled nitric monoxide was defined as the primary efficiency endpoint. The secondary objectives were the bronchial hyperresponsiveness (BHR) before and after treatment as well as after bronchial allergen challenge, the allergy laboratory (total IgE, specific IgE against house dust mite), clinical tolerance and late asthmatic response and use of salbutamol during the final challenge period.

**Results:** Patients in the AV-group (36.7 ppb) decreased significantly to 24.2 ppb under therapy while the placebo-group (26.8 ppb) rather increased to 30.6 ppb. Regarding the BHR the AV-group also showed a definite improvement compared to the placebo-group: placebo 1.17 mg vs. AV 0.51 mg before treatment to placebo 1.03 mg vs. AV 0.99 mg after treatment. As well for BHR as for eNO results could not be proven under provocation. In both groups eNO increased significantly to 104.4 ppb in the placebo-group und 91.1ppb in the AV-group. During the final challenge period the AV-group revealed significantly less use of salbutamol and significantly reduced late airway reactions. Local reactions were mild and self-limiting.

**Discussion:** Autovaccine application was safe and well-tolerated. The results demonstrate a positive impact on bronchial inflammation and hyperresponsiveness in mild asthmatics with house dust mite allergy, implying a new treatment option for allergic asthma. To find out more about the mode of action of the autovaccine it will take further investigations.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Allergeneinheiten
APS	Aerosol provocation system
ATS	American Thoracic Society
CO	Kohlenmonoxid
BAP	Bronchiale Allergenprovokation
BE	biologische Einheit
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
DA	Dosieraerosol
Dpt.	Dermatophagoides pteronyssinus
Df.	Dermatophagoides farinae
EAR	Early asthmatic response (Frühreaktion)
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay
eNO	Exhalierendes Stickstoffmonoxid
et al.	et alia (und andere)
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec (Einsekundenkapazität)
FRC	Funktionelle Residualkapazität
GINA	Global Initiative for Asthma
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukine
ITT	Intention to treat
IU	International Unit (internationale Einheit)
IVC	Inspiratorische Vitalkapazität
h	Stunde
kg	Kilogramm
l	Liter
LAR	Late asthmatic response (Spätreaktion)
LPS	Lipopolysaccharid

LTRA	Leukotrienrezeptorantagonist
m	männlich
max.	Maximum
Mean	Mittelwert
mg	Milligramm
min	Minute
min.	Minimum
ml	Milliliter
n	Anzahl
NIOX	Nitric Oxide Monitoring System
n.s.	nicht signifikant
p	probability (Wahrscheinlichkeit)
PD <sub>20</sub> FEV <sub>1</sub>	Allergendosis, die einen 20%igen FEV <sub>1</sub> -Abfall bewirkt
PEF	Peak Expiratory Flow (maximale Atemstoßstärke)
p.o.	per os
PP	per protocol
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PUFA	polyunsaturated fatty acid (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
RAST	Radio-Allergen-Sorbent-Test
s	Sekunde
SD	Standarddeviation
SIT	Spezifische Immuntherapie
Tbc	Tuberkulose
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ (Wachstumsfaktor $\beta$ )
Th-Zellen	T-Helferzellen
T <sub>reg</sub> -Zellen	regulatorische T-Zellen
U/ml	Units/Milliliter
VC	Vitalkapazität
VT	Tidalvolumen
w	weiblich
$\mu$ l	Mikroliter
°C	Grad Celsius
%CO Hb	prozentuale Kohlenmonoxid-Sättigung des Hämoglobins

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Die Anzahl der Patienten, ihre Verteilung in die beiden Studienarme und die Anzahl der Studienabbrecher. \_\_\_\_\_ **13**
- Abb. 2:** Verlauf der eNO-Werte vor und nach Behandlungsphase im Vergleich der beiden Gruppen in der PP-Analyse. \_\_\_\_\_ **24**
- Abb. 3:** Bronchiale Einstufen-Allergenprovokation an vier Tagen (Visiten 29 bis 32) nach Behandlungsende in der PP-Analyse. \_\_\_\_\_ **25**
- Abb. 4:** Der Verlauf der bronchialen Hyperreagibilität vor und nach Behandlungsphase sowie nach Provokationsphase in der Per-protocol-Analyse. **29**
- Abb. 5:** Der Verlauf des Gesamt-IgE vor und nach Behandlung sowie nach Provokation in beiden Gruppen in der Intention-to-treat-Analyse. \_\_\_\_\_ **30**
- Abb. 6:** Die PD<sub>15</sub>-Hausstaubmilbendosis im Vergleich der Autovaccine- zur Placebo-Gruppe. \_\_\_\_\_ **32**
- Abb. 7:** Die Basalwerte der FEV<sub>1</sub> (%Soll) vor Behandlung und während der Provokationsphase im Gruppenvergleich in der ITT-Analyse. \_\_\_\_\_ **33**

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 5:</b> Klinische Charakteristika der Probanden.	14
<b>Tabelle 6:</b> Die Verdünnungen und entsprechenden Keimäquivalente der verwendeten Stufen.	16
<b>Tabelle 7:</b> Das Stufenschema der PD <sub>20</sub> -Methacholinprovokation.	20
<b>Tabelle 8:</b> Stufenschema der PD <sub>20</sub> -Allergenprovokation.	21
<b>Tabelle 5:</b> eNO-Werte beider Gruppen in der ITT- und PP-Analyse vor und nach Behandlung sowie nach Provokation.	25
<b>Tabelle 6:</b> Das Allergielabor der Autovaccine- und Placebo-Gruppe.	30
<b>Tabelle 7:</b> Die Basalwerte der Lungenfunktion vor der Behandlungsphase in der Intention-to-treat-Analyse.	31
<b>Tabelle 8:</b> Die Basalwerte der Lungenfunktion nach der Behandlungsphase in der Intention-to-treat-Analyse.	32
<b>Tabelle 9:</b> Der maximale Abfall der Einsekundenkapazität (FEV <sub>1</sub> ) während der der Provokationsphase (Visiten 30 – 32) nach Behandlungsende	34
<b>Tabelle 10:</b> Spätreaktionen (LAR) und maximaler PEF-Abfall (%) in der Provokationsphase.	36
<b>Tabelle 11:</b> Der Salbutamol-Bedarf [Hübe] während der Provokationsphase.	37

## 10 Literaturverzeichnis

1. Turk JL. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. *J R Soc Med* 1987;80:31–3. eng.
2. Arshad SH. Primary prevention of asthma and allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005;116:3-14; quiz 15. (doi:10.1016/j.jaci.2005.03.043). eng.
3. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Holgate S. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2005;35:1113–24. (doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02328.x). eng.
4. Ege MJ, Mayer M, Normand A, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:701–9. (doi:10.1056/NEJMoa1007302). eng.
5. Buhl R, Berdel D, Criée C, et al. [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie* 2006;60:139–77. (doi:10.1055/s-2005-919153). ger.
6. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105:1041–53. eng.
7. Gonsior E, Henzgen M, Jörres RA, et al. [Guidelines for conducting provocation tests with allergens. German Society of Allergology and Clinical Immunology and German Society for Immunology]. *Pneumologie* 2002;56:187–98. (doi:10.1055/s-2002-20553). ger.
8. Cockcroft DW, Davis BE, Boulet L, et al. The links between allergen skin test sensitivity, airway responsiveness and airway response to allergen. *Allergy* 2005;60:56–9. (doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00612.x). eng.
9. Melillo G, Aas K, Cartier A, et al. Guidelines for the standardization of bronchial provocation tests with allergens. An update by an international committee. *Allergy* 1991;46:321–9. eng.
10. Ravensberg AJ, van Rensen ELJ, Grootendorst DC, et al. Validated safety predictions of airway responses to house dust mite in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2007;37:100–7. (doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02617.x). eng.
11. Taylor DA, Harris JG, O'Connor BJ. Comparison of incremental and bolus dose inhaled allergen challenge in asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy* 2000;30:56–63. eng.
12. Schulze J, Smith H, Fuchs J, et al. Methacholine challenge in young children as evaluated by spirometry and impulse oscillometry. *Respir Med* 2012;106:627–34. (doi:10.1016/j.rmed.2012.01.007). eng.
13. Schubert R, Kitz R, Beermann C, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in asthma after low-dose allergen challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009;148:321–9. (doi:10.1159/000170386). eng.
14. Boulet L, Gauvreau G, Boulay M, O'Byrne P, Cockcroft DW. The allergen bronchoprovocation model: an important tool for the investigation of new asthma anti-inflammatory therapies. *Allergy* 2007;62:1101–10. (doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01499.x). eng.
15. Kopferschmitt-Kubler MC, Bigot H, Pauli G. Allergen bronchial challenge tests: variability and reproducibility of the early response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987;80:730–40. eng.
16. Arshad SH. Bronchial allergen challenge: a model for chronic allergic asthma? *Clin. Exp. Allergy* 2000;30:12–5. eng.
17. Inman MD, Watson R, Cockcroft DW, Wong BJ, Hargreave FE, O'Byrne PM. Reproducibility of allergen-induced early and late asthmatic responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;95:1191–5. eng.
18. Hatzivlassiou M, Grainge C, Kehagia V, Lau L, Howarth PH. The allergen specificity of the late asthmatic reaction. *Allergy* 2010;65:355–8. (doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02184.x). eng.
19. Cockcroft DW. Allergen-induced increase in nonallergic airway responsiveness: a citation classic revisited. *Can. Respir. J.*;7:182–7. eng.
20. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(4):CD001186. eng.

21. Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L, et al. [Allergen immunotherapy - a position paper of the German society for allergology and clinical immunology]. *Pneumologie* 2001;55:438–44. (doi:10.1055/s-2001-16954). ger.
22. Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:S306-13. (doi:10.1016/j.jaci.2009.10.064). eng.
23. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007;119:780–91. (doi:10.1016/j.jaci.2007.01.022). eng.
24. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127:18-27; quiz 28-9. (doi:10.1016/j.jaci.2010.11.030). eng.
25. Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2009;21:700–7. (doi:10.1016/j.coi.2009.07.012). eng.
26. Zielinski T, Zimmermann K, Ottendorfer D, Rusch V. [Quality control and documentation of effectiveness of bacterial autovaccines with the use of flow cytometry]. *Arzneimittelforschung* 1998;48:502–11. ger.
27. Załuga E. [Skin reactions to antigens of propionibacterium acnes in patients with acne vulgaris treated with autovaccine]. *Ann Acad Med Stetin* 1998;44:65–85. pol.
28. Rubisz-Brzezińska J, Wilk-Czyz R, Brzezińska-Wcisło L, Kasproicz A. [Clinical evaluation of serious forms of acne treated with autovaccine]. *Med Dosw Mikrobiol* 1994;46:35–42. pol.
29. Wilczyński K, Koźmińska J, Biliński A. [The testing of auto-vaccination of patients with chronic purulent otitis media]. *Otolaryngol Pol* 1995;49 Suppl 23:183–5. pol.
30. Filatov VF, Filatov SV. [Polypous ethmoiditis]. *Vestn. Otorinolaringol.* 1999;(2):11–4. rus.
31. Novotný Z, Krupicka J, Hánová I, Rys E. [Treatment with autovaccines and the immunologic profile of patients]. *Cesk Otolaryngol* 1990;39:40–7. cze.
32. 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. *Eur. J. Immunol.* 2003;33:1205–14. (doi:10.1002/eji.200322919). eng.
33. Rusch V, Ottendorfer D, Zimmermann K, et al. Results of an open, non-placebo controlled pilot study investigating the immunomodulatory potential of autovaccine. *Arzneimittelforschung* 2001;51:690–7. eng.
34. Schulze J, Rosewich M, Dressler M, Riemer C, Rose MA, Zielen S. Bronchial allergen challenge using the Medicaid dosimeter. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012;157:89–97. (doi:10.1159/000324473). eng.
35. Wright AE. On the Treatment of Acne, Furunculosis, and Sycosis by Therapeutic Inoculations of Staphylococcus Vaccine. *Br Med J* 1904;1:1075–7. eng.
36. Bereznaia NM, Beiko VA, Evseeva TA. [Immunological mechanisms of specific hyposensitization in allergic diseases of an infectious nature. IV. The comparative characteristics of the changes in the immunological processes in nonspecific (dekaris) and specific (autovaccine) immunotherapy of infectious-allergic bronchial asthma]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1982;(12):95–9. rus.
37. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* 2001;167:5887–94. eng.
38. Liu M, Guo S, Hibbert JM, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22:121–30. (doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001). eng.
39. Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 2002;14:695–700. eng.
40. Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J. Clin. Invest.* 2005;115:459–67. (doi:10.1172/JCI22462). eng.
41. Martin M, Michalek SM, Katz J. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect. Immun.* 2003;71:2498–507. eng.

42. Kitz R, Rose MA, Borgmann A, Schubert R, Zielen S. Systemic and bronchial inflammation following LPS inhalation in asthmatic and healthy subjects. *J. Endotoxin Res.* 2006;12:367–74. (doi:10.1179/096805106X153934). eng.
43. Michel O. Systemic and local airways inflammatory response to endotoxin. *Toxicology* 2000;152:25–30. eng.
44. Michel O, Duchateau J, Sergysels R. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J. Appl. Physiol.* 1989;66:1059–64. eng.
45. Baroni CD, Franceschi GS de, Uccini S, Adorini L, Cnen GD, Ruco L. Biological effects of Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS) in vivo. I. Selection in the mouse thymus of killer and helper cells. *Immunology* 1976;31:217–24. eng.
46. Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 2002;347:869–77. (doi:10.1056/NEJMoa020057). eng.
47. Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* 2001;56:498–505. eng.
48. Armerding D, Katz DH. Activation of T and B lymphocytes in vitro. I. Regulatory influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on specific T-cell helper function. *J. Exp. Med.* 1974;139:24–43. eng.
49. Bufe A, Holst O. LPS-binding protein as a target molecule in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;114:583–5. (doi:10.1016/j.jaci.2004.06.034). eng.
50. Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, et al. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:297–303. eng.
51. Waterston AM, Salway F, Andreakos E, Butler DM, Feldmann M, Coombes RC. TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model. *Br. J. Cancer* 2004;90:1279–84. (doi:10.1038/sj.bjc.6601670). eng.
52. Okraśńska-Cholewa B. [Clinical evaluation of treating accessory nasal sinus diseases in children using autovaccine]. *Med Dosw Mikrobiol* 1994;46:67–73. pol.
53. Yu J, Jang S, Kim B, et al. The Effects of Lactobacillus rhamnosus on the Prevention of Asthma in a Murine Model. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:199–205. (doi:10.4168/aaair.2010.2.3.199). eng.
54. Thomas DJ, Husmann RJ, Villamar M, Winship TR, Buck RH, Zuckermann FA. Lactobacillus rhamnosus HN001 attenuates allergy development in a pig model. *PLoS ONE* 2011;6:e16577. (doi:10.1371/journal.pone.0016577). eng.
55. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic Lactobacillus rhamnosus Lcr35. *PLoS ONE* 2011;6:e18735. (doi:10.1371/journal.pone.0018735). eng.
56. Wassenberg J, Nutten S, Audran R, et al. Effect of Lactobacillus paracasei ST11 on a nasal provocation test with grass pollen in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 2011;41:565–73. (doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03695.x). eng.
57. Kaye PM. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. *Immunol. Today* 1995;16:423–7. eng.
58. Schubert R, Kitz R, Beermann C, et al. Influence of low-dose polyunsaturated fatty acids supplementation on the inflammatory response of healthy adults. *Nutrition* 2007;23:724–30. (doi:10.1016/j.nut.2007.06.012). eng.
59. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076–9. (doi:10.1016/S0140-6736(00)04259-8). eng.
60. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869–71. (doi:10.1016/S0140-6736(03)13490-3). eng.

61. Rose MA, Stieglitz F, Köksal A, Schubert R, Schulze J, Zielen S. Efficacy of probiotic *Lactobacillus* GG on allergic sensitization and asthma in infants at risk. *Clin. Exp. Allergy* 2010;40:1398–405. (doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03560.x). eng.
62. Rose MA, Weigand B, Schubert R, Schulze J, Zielen S. Safety, tolerability, and impact on allergic inflammation of autologous *E.coli* autovaccine in the treatment of house dust mite asthma--a prospective open clinical trial. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:45. (doi:10.1186/1472-6882-11-45). eng.
63. Pendharkar S, Mehta S. The clinical significance of exhaled nitric oxide in asthma. *Can. Respir. J.* 2008;15:99–106. eng.
64. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003;123:751–6. eng.
65. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;164:738–43. eng.
66. van Rensen EL, Straathof KC, Veselic-Charvat MA, Zwinderman AH, Bel EH, Sterk PJ. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax* 1999;54:403–8. eng.
67. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;153:454–7. eng.
68. Lim KG, Mottram C. The use of fraction of exhaled nitric oxide in pulmonary practice. *Chest* 2008;133:1232–42. (doi:10.1378/chest.07-1712). eng.
69. Bisgaard H, Loland L, Oj JA. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:1227–31. eng.
70. Moeller A, Lehmann A, Knauer N, Albisetti M, Rochat M, Johannes W. Effects of montelukast on subjective and objective outcome measures in preschool asthmatic children. *Pediatr. Pulmonol.* 2008;43:179–86. (doi:10.1002/ppul.20753). eng.
71. Navarro S, Cossalter G, Chiavaroli C, et al. The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways. *Mucosal Immunol* 2011;4:53–65. (doi:10.1038/mi.2010.51). eng.
72. Strickland DH, Judd S, Thomas JA, Larcombe AN, Sly PD, Holt PG. Boosting airway T-regulatory cells by gastrointestinal stimulation as a strategy for asthma control. *Mucosal Immunol* 2011;4:43–52. (doi:10.1038/mi.2010.43). eng.
73. Inal A, Altintas DU, Yilmaz M, Karakoc GB, Kendirli SG, Sertdemir Y. Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:85–91. eng.
74. Hałasa J, Hałasa M. [Significance of immunotherapy in treatment of bronchial asthma]. *Pol. Merkur. Lekarski* 2002;12:140–2. pol.
75. Schubert R, Eickmeier O, Garn H, et al. Safety and immunogenicity of a cluster specific immunotherapy in children with bronchial asthma and mite allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009;148:251–60. (doi:10.1159/000161585). eng.
76. Zielen S, Kardos P, Madonini E. Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;126:942–9. (doi:10.1016/j.jaci.2010.06.002). eng.
77. Rosewich M, Schulze J, Eickmeier O, et al. Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children. *Clin. Exp. Immunol.* 2010;160:403–10. (doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04106.x). eng.
78. Pichler CE, Helbling A, Pichler WJ. Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite extracts in

- patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. *Allergy* 2001;56:301–6. eng.
79. Moote W, Kim H. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011;7 Suppl 1:S5. (doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S5). eng.
  80. Arvidsson MB, Löwhagen O, Rak S. Allergen specific immunotherapy attenuates early and late phase reactions in lower airways of birch pollen asthmatic patients: a double blind placebo-controlled study. *Allergy* 2004;59:74–80. eng.
  81. Pelikan Z. Delayed Type of Asthmatic Response to Allergen Challenge and Cytokines in the Peripheral Blood. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2012. ENG.
  82. van de Pol MA, Lutter R, van Ree R, van der Zee JS. Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics. *Allergy* 2012;67:67–73. (doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02722.x). eng.
  83. Haugaard L, Iversen M, Dahl R. Predictors of early- and late-phase reactions to bronchial allergen challenge. *Allergy* 1997;52:999–1004. eng.
  84. van der Veen MJ, van Neerven RJ, Jong EC de, Aalberse RC, Jansen HM, van der Zee JS. The late asthmatic response is associated with baseline allergen-specific proliferative responsiveness of peripheral T lymphocytes in vitro and serum interleukin-5. *Clin. Exp. Allergy* 1999;29:217–27. eng.
  85. Ali FR, Kay AB, Larché M. Airway hyperresponsiveness and bronchial mucosal inflammation in T cell peptide-induced asthmatic reactions in atopic subjects. *Thorax* 2007;62:750–7. (doi:10.1136/thx.2006.072041). eng.
  86. Lopuhaä CE, Out TA, Jansen HM, Aalberse RC, van der Zee JS. Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2002;32:1720–7. eng.
  87. Blumberga G, Groes L, Dahl R. SQ-standardized house dust mite immunotherapy as an immunomodulatory treatment in patients with asthma. *Allergy* 2011;66:178–85. (doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02451.x). eng.
  88. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(8):CD001186. eng.
  89. Cevit O, Kendirli SG, Yilmaz M, Altintas DU, Karakoc GB. Specific allergen immunotherapy: effect on immunologic markers and clinical parameters in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:286–91. eng.
  90. Razi CH, Harmancı K, Abacı A, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;126:763–9. (doi:10.1016/j.jaci.2010.07.038). eng.

## 12 Anhang

**eNO**  
(ppb)

n =31	Visite 1	Visite 1 - 24h	Visite 29	Visite 30	Visite 31	Visite 32	Visite 33
1	91,3	117,7	74,6	114,4	130,2	178,8	170,1
2	33,8	70,1	11,2	57,5	98,4	127,2	130,2
3	28,9	50,1	28,8	58,2	83,4	103,5	116,6
4	10,1	22,6	7,7	36,9	56,1	56,8	75,3
5	24	28,1	24,2	7,6	48,9	51,5	61,9
6	76,9	85,6	62,1	59,6	56,7	91,1	66,8
7	30,8	57,7	28,6	60,8		87,23	95,2
8	15,1	13,4	15,6	26,8	38,8	45,87	50,6
9	53	60,7	25,9	26,3	33,8	37,03	39,4
10	26,6	21,3	16		92	94	80
11	106,8	133,6	28	33	25	17	
12	15	16,1	34	52,8	91,6	100,1	83
13	24,2	44,2	18	36	66	71	81
14	111,3	147,3	26	100	212	213	220
15	24,6	78	40	43	45	73	78
16	36,7	44,3	33	85	122,4	145,8	135,9
17	17,7	24	25,8	45,4	65,6	76,1	77,8
18							
19	41,2	28,7	34,4	52,7	74,4	76,5	80,2
20	34,8	113,9	35,9	104,5	144,8	190,1	229,2
21	22,5	43,7					
22	104,3	66,2	20,2	137,7	216,5	232,2	211,7
23	36,8	46,7	32,4	96,8	127,6	134,3	158
24	13,4	26,7	19,3	36,6	67,9	81,1	121,5
25	24,6	34,9	18,6	83,6	132,9	135,6	168,9
26	21,6	47,7					
27	28,2	78	20,2	50,1	82,2	91,3	80,9
28	29,7	39,9					
29	7,1	10,8	11,4	33,7	54,5	62,1	67,3
30	31,9	29,8					
31	29,2	26,5	13	38,9	67	77,2	92,1
32	38,9	49,2	27,7	57,1	74,5	61	74
<b>Mittelwert</b>	<b>38,4193548</b>	<b>53,4677419</b>	<b>27,1333333</b>	<b>59,0384615</b>	<b>88,7769231</b>	<b>100,386296</b>	<b>109,446154</b>
<b>SD</b>	<b>28,7057302</b>	<b>35,3980074</b>	<b>14,6089804</b>	<b>31,1896275</b>	<b>48,9333041</b>	<b>53,618134</b>	<b>53,3308633</b>
<b>Median</b>	<b>29,2</b>	<b>44,3</b>	<b>25,9</b>	<b>52,75</b>	<b>74,45</b>	<b>87,23</b>	<b>82</b>

## Verträglichkeit der Autovaccine

Intention to treat (n=29)    1026 Injektionen

	Verum (n=13)	Placebo (n=16)
Injektionen	468	558
Rötungen	65 (13,9%)	1 (0,2%)
Schwellungen <5cm	39 (8,3%)	2 (0,4%)
Schwellungen >5cm	16 (3,4%)	1 (0,2%)
Schmerzen	48 (10,3%)	4 (0,7%)
Juckreiz	13 (2,8%)	4 (0,7%)
Urtikaria	0	0
Asthma-Anfall	2 (0,4%)	8 (1,4%)
Gliederschmerzen	8 (1,7%)	2 (0,4%)
Kopfschmerzen	6 (1,3%)	13 (2,3%)
Grippale Infekte	12 (2,6%)	12 (2,2%)

Per protocol (n=21)    756 Injektionen

	Verum (n=11)	Placebo (n=10)
Injektionen	396	360
Rötungen	50 (12,6%)	1 (0,2%)
Schwellungen <5cm	30 (7,6%)	2 (0,6%)
Schwellungen >5cm	16 (4,0%)	1 (0,2%)
Schmerzen	32 (8,1%)	4 (0,7%)
Juckreiz	13 (2,8%)	0
Urtikaria	0	0
Asthma-Anfall	2 (0,5%)	2 (0,6%)
Gliederschmerzen	7 (1,8%)	2 (0,6%)
Kopfschmerzen	4 (1,0%)	6 (1,7%)
Grippale Infekte	9 (2,3%)	6 (1,7%)

**Metha PD20 (mg)**

n = 31	Screening	Visite 1	Visite 10	Visite 29	Visite 33
1	0,0781	0,0604	0,0405	0,26	0,11
2	3	1,393	2,91	2,188	1,164
3	3	0,9755	1,18	0,51	0,0478
4	1,104	0,9871	2,177	2,9	0,5431
5	0,1743	0,2478	0,117	0,1282	0,0292
6	0,015	0,0166	0,0135	0,01	0,01
7	2,168	0,5431	2,03	2,067	0,135
8	2,528	3	3	2,23	1,18
9	0,097	0,01	0,019	0,11	0,0246
10	1,409	0,2643	0,292	1,074	1,23
11	0,51	0,01	0,01	0,0464	nd
12	1,489	1,952	0,5664	0,9926	0,1755
13	1,425	0,6384	2,174	1,8	-
14	0,5968	0,51	1,347	0,2251	0,117
15	0,0252	0,025	0,0302	0,0133	0,01
16	0,2159	0,3825	1	0,9926	0,0565
17	2,264	3	1,31	1,787	0,6985
18					
19	0,5618	0,1871	0,1789	3	0,8174
20	0,8842	0,0626	0,3555	1,062	0,1151
21	1,337				
22		0,7556	0,5431	1,145	0,0855
23	2,261	1,366	1,418	0,8789	0,3476
24	1,511	1,31	3	3	0,8174
25	0,65	3	3	3	3
26	0,292				
27	0,8614	1,164	1,31	1,31	0,6985
28	0,2607	0,2369	0,3476	-	-
29	1,363	0,5706	0,2991	0,3529	0,0286
30	<0,01	0,0348	0,0437	-	-
31	0,5434	0,6523	0,7756	3	0,1834
32	0,0455	0,1459	0,2369	0,1672	0,0318
<b>Mittelwert</b>	<b>1,06</b>	<b>0,81</b>	<b>1,03</b>	<b>1,27</b>	<b>0,47</b>
<b>SD</b>	<b>0,92</b>	<b>0,91</b>	<b>1,03</b>	<b>1,07</b>	<b>0,67</b>
<b>Median</b>	<b>0,86</b>	<b>0,54</b>	<b>0,57</b>	<b>1,06</b>	<b>0,14</b>

**Gesamt IgE**

	Visite 1	Visite 6	Visite 10	Visite 16	Visite 28	Visite 29	Visite 33
1	106	80	80	55	85	94	88
2	274	178	254	374	294	294	252
3	8	7	8		7	8	7
4	17	15	26	39	21	18	22
5	35	32	58	52	44	43	52
6	45	72	40	55	67	50	52
7	53	55	44	38	48	46	42
8	202	158	179	165	169	177	165
9	89	85	83	105	124	100	92
10	219	267	214	248	204	181	208
11	382	350	396	306	164	178	213
12	223	186	221	178	144	182	145
13	360	441	383	334	321	283	303
14	211	211	182	193	147	149	135
15	262	229	238	230	170	237	219
16	173	167	144	167	103	136	139
17	167	150	165	164	123	133	126
18							
19	138	150	123	117	102	120	118
20	116	116	118	87	73	87	63
21	-	-	-	-	-	-	-
22	64	58	54	49	52	74	73
23	231	241	198	229	211	224	155
24	392	438	398	360	342	557	563
25		70	76	79	88	81	
26	378	-	-	-	-	-	-
27	174	213	139	146	117	135	144
28	35	31	24	29	-	-	-
29	294	323	299	249	297	333	271
30	224	144	115	139	-	-	-
31	101	92	107	101	89	91	84
32	526	489	418	409	534	468	504
	<b>189,6</b>	<b>174,1</b>	<b>165,0</b>	<b>167,8</b>	<b>153,3</b>	<b>165,9</b>	<b>162,9</b>
<b>Median</b>	<b>174,0</b>	<b>150,0</b>	<b>139,0</b>	<b>155,0</b>	<b>123,0</b>	<b>135,0</b>	<b>137,0</b>
<b>SD</b>	<b>131,5</b>	<b>131,5</b>	<b>120,7</b>	<b>111,9</b>	<b>118,2</b>	<b>130,6</b>	<b>133,7</b>

## Spirometrien Visite 1 und Visite 29

n = 31	V0		V29		V0		V29	
	VC in	(%)			FVC	(%)		
1	4,8	82,8	4,65	80,3	5,11	92,4	5,11	92,5
2	5,63	117,9	5,72	119,9	5,85	121,1	6,17	127,8
3	3,93	99,7	4,02	101,2	4,01	101,9	4,41	112,6
4	5,15	94	5,76	105,7	5,5	104,9	6,15	118
5	5,08	85,1	4,96	83,5	5,17	90,8	4,99	88,1
6	3,72	105,4	4	111,9	3,86	108,8	4,45	125,3
7	4,05	107,8	4,24	111,2	4,29	115,1	4,74	125,9
8	6,25	98,3	6,66	104,6	6,52	107,4	7,38	121,5
9	5,37	95,7	5,24	93,9	5,55	103,5	5,81	108,8
10	4,11	102,7	4,3	107,5	4,43	112,4	4,59	116,2
11	3,63	94,2	3,59	93,7	3,63	95,3	3,98	105
12	5,21	121,9	3,99	93,5	5,21	123,6	4,37	103,8
13	3,67	109,4	3,61	108,4	3,82	116,1	3,85	117,9
14	5,69	95,9	5,59	94,2	5,87	103,7	6,03	106,5
15	6,34	107,2	6,06	102,9	6,58	116,5	6,43	114,4
16	3,58	88,4	3,82	95,6	3,71	92,9	4,21	106,6
17	6,71	110,7	6,75	111,9	6,8	117,6	7,32	127,2
19	5,45	94,8	5,53	96,2	5,82	105,9	6,02	109,6
20	4,64	121,2	4,86	120,3	4,88	128	5,15	129,1
21	4,1	101,5			4,47	112,1		
22	5,94	101,1	6,09	103,8	6,63	118,2	6,43	114,7
23	5,27	116,3	5,34	117,8	5,52	124,1	5,67	127,6
24	4,09	85,6	4,28	90,7	4,53	99	4,33	95,9
25	3,37	81,5	3,47	85	3,79	93	3,9	95,6
26	5,62	100,9			5,63	105,8		
27	4,27	96,7	4,45	100,9	4,55	104,8	4,64	106,8
28	5,85	98,6			6,27	110,6		
29	3,46	96,7	3,19	88,1	3,47	96,6	3,41	94,8
30	3,88	98,8			4,17	107,5		
31	3,74	94,6	4,02	103	4,21	107,9	4,19	107,3
32	4,09	101,3	4,24	108,6	4,24	106,2	4,47	115,9
<b>Mean</b>	<b>4,7</b>	<b>100,2</b>	<b>4,8</b>	<b>101,3</b>	<b>5,0</b>	<b>107,9</b>	<b>5,1</b>	<b>111,7</b>
<b>Median</b>	<b>4,6</b>	<b>98,8</b>	<b>4,5</b>	<b>102,9</b>	<b>4,9</b>	<b>107,4</b>	<b>4,7</b>	<b>112,6</b>
<b>SD</b>	<b>1,0</b>	<b>10,4</b>	<b>1,0</b>	<b>10,9</b>	<b>1,0</b>	<b>10,0</b>	<b>1,1</b>	<b>11,8</b>

n = 31	V0		V29		V0		V29	
	FEV1	(%)			FEV1%VC	(%)		
1	3,76	81,5	3,09	67,1	73,54	89,5	60,49	73,6
2	5,06	127	5,07	127,2	86,47	103,9	82,16	98,7
3	3,47	100,9	3,6	105,4	86,52	103	81,68	97,5
4	4,49	101,9	4,66	106,4	81,78	99,1	75,79	92
5	4,1	86,3	3,88	82,2	79,32	96,1	77,79	94,5
6	3,48	112,5	2,85	92,1	90,21	106,9	64,15	76
7	3,86	118,7	4,49	136,3	90	106,7	94,58	112,1
8	5,46	108,4	6,19	122,8	83,78	101,3	83,91	101,5
9	3,9	87,4	3,81	85,9	70,36	86	65,65	80,4
10	3,93	114	3,92	113,7	88,68	105,1	85,54	101,4
11	2,65	79,4	3,28	99,1	72,82	86,3	82,35	97,9
12	3,92	106,4	2,96	80,3	75,25	89,2	67,72	80,3
13	3,18	112	3,17	112,6	83,15	102	82,28	101,2
14	5,04	106,4	4,91	103,6	85,85	103,8	81,44	98,5
15	4,89	104,2	4,82	103,3	74,4	90,5	75	91,5
16	3,07	87,9	3,74	108,3	82,69	98	88,76	105,2
17	5,33	110,9	5,8	121,2	78,38	95,2	79,11	96,3
19	5,18	112,3	5,3	114,8	89,08	107,7	87,94	106,3
20	3,93	121,9	4,01	115	80,54	96,4	77,95	92,4
21	4,19	120,1			93,65	111		
22	5,67	120,7	5,33	113,5	85,51	103,4	82,87	100,2
23	4,13	106,2	4,32	111,1	74,91	89,4	76,13	90,9
24	3,88	98,9	3,62	93,3	85,75	103,7	83,66	101,2
25	3,43	96	3,65	102,2	90,35	107,1	93,51	110,9
26	4,58	108,2			86,14	104,2		
27	3,58	94	3,61	94,8	78,58	93,2	77,76	92,2
28	5,09	107,3			81,17	98,1		
29	3,03	96,8	2,97	94,7	87,38	103,6	87,09	103,2
30	3,3	97,3			79,08	94		
31	3,07	89,9	3,29	96,5	72,79	86,3	78,61	93,2
32	3,79	108,6	3,71	110,1	89,43	106	83,02	98,4
<b>Mean</b>	<b>4,1</b>	<b>104,0</b>	<b>4,1</b>	<b>104,2</b>	<b>82,5</b>	<b>98,9</b>	<b>79,9</b>	<b>95,8</b>
<b>Median</b>	<b>3,9</b>	<b>106,4</b>	<b>3,8</b>	<b>105,4</b>	<b>83,2</b>	<b>101,3</b>	<b>81,7</b>	<b>97,9</b>
<b>SD</b>	<b>0,8</b>	<b>12,2</b>	<b>0,9</b>	<b>15,3</b>	<b>6,3</b>	<b>7,3</b>	<b>8,2</b>	<b>9,5</b>

## **Patienten Information Phase II**

### **TITEL DER STUDIE:**

### **Phase II zu Verträglichkeit und Wirkung/Wirksamkeit von Autovaccinen bei Hausstaubmilben-Allergikern**

#### **Sehr geehrte Damen und Herren,**

bei Ihnen besteht ein Allergie gegen Hausstaubmilbe, die sich als tränende Augen, laufende Nase (Rhinokonjunktivitis“) und / oder Husten und Luftnot (allergisches Asthma bronchiale) nach Kontakt mit entsprechendem Hausstaub äußern kann. Dieses Beschwerdebild ist nicht nur lästig, sondern kann auch langfristig zum dauerhaften „Milben-Asthma“ führen mit entsprechender Beeinträchtigung der Lebensqualität. Das Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankung der Atemwege; Asthmaanfälle können u.a. durch Anstrengung, allergische Reize oder Infektionen ausgelöst werden.

Bislang gibt es vorbeugende und behandelnde Ansätze zum Umgang mit Milbenallergien. Zu den vorbeugenden Maßnahmen zählen Klimaveränderungen, Sanierungen des Haushaltes und der Betten hinsichtlich Milbenstaub. Behandeln lassen sich die Symptome der Allergie durch antiallergische, bronchienerweiternde und entzündungshemmende Medikamente (Tropfen, Sprays etc.). Die bislang einzige ursächliche Behandlung, d.h. der Versuch, dem Übel an die Wurzel zu gehen, stellt die Hyposensibilisierung oder spezifische Immuntherapie (SIT) dar. Hierbei wird den Allergikern über den Zeitraum von drei Jahren ein Milbenextrakt von ansteigender Konzentration unter die Haut gespritzt. Bei einem Teil der Allergiker geht die Allergie hierunter weg, bei anderen lässt sich die Verschlimmerung aufhalten. Bestehen allerdings gleichzeitig noch andere Allergien, sind die Erfolgsaussichten der SIT deutlich vermindert.

Alternativ zur SIT gibt es eine naturheilkundliche Methode, bei der aus eigenen Darmbakterien individuell ein hochgereinigtes Extrakt (sog. „Auto-Vaccine“ = Selbst-Impfung) gewonnen wird. In den darauffolgenden Monaten wird dieses hochverdünnt und in steigender Konzentration unter die Haut gespritzt, wodurch eine Toleranz gegen Hausstaubmilbe erreicht werden soll.

#### **Ziel und Zweck der Studie**

Unsere Studie soll untersuchen, ob sich die Empfindlichkeit von Milbenallergikern durch die Behandlung mit Auto-Vaccine herunterregulieren lässt. Wir können diese wichtigen Fragen nur mit Ihrer Hilfe beantworten. Hierfür möchten wir Ihren Allergie-Status mittels Analysen von Blutbestandteilen, Atemluftzusammensetzung und Lungenfunktion ermitteln. Insgesamt 24-30 erwachsene Milbenallergiker erhalten anschliessend nach dem Zufallsprinzip („randomisiert“) entweder die Auto-Vaccine, oder ein Schein-Präparat („Placebo“) in die Oberarmhaut gespritzt. Um objektives Urteilen zu ermöglichen, wissen weder die Probanden, noch die wissenschaftlichen Betreuer, wer welcher Gruppe angehört („doppel-blind“).

## **Wie läuft die Studie ab ?** (siehe Ablaufschema)

Die Studie dauert insgesamt etwa sieben Monate. Bei der Eingangsuntersuchung („**Screening**“) befragt Sie der Prüfarzt bzw. seine Mitarbeiter nach Ihrer Krankengeschichte. Wir prüfen Ihr Blut auf Allergien und Entzündungen sowie Ihre Atemleistung in Form einer Lungenfunktionsuntersuchung mit Inhalationstestung („Methacholin- und spezifische Provokation“) und analysieren Ihrer Ausatemluft und das Sputum auf Entzündungen.

Es folgt die „**Interventionsphase**“: In den nächsten drei Wochen erhalten Sie 12 kleine Injektionen unter die Oberarmhaut (Auto-Vaccine oder Plazebo). Es folgen zwei Wochen Pause. In den folgenden fünf Wochen erhalten Sie weitere 12 Injektionen; nach weiteren zwei Wochen Pause erhalten Sie über die nächsten 12 Wochen weitere 12 Injektionen und nach der letzten untersuchen wir Ihre Ausatemluft.

Nach wiederum zwei Wochen Pause („**Latenzphase**“) kommt die Überprüfung des Erfolges unserer Maßnahmen („**Milbenbelastung**“). Hier möchten wir Sie binnen einer Woche viermal mit hochverdünntem Milbenextrakt inhalieren lassen. Parallel hierzu möchten wir wieder Ihre Ausatemluft, Ihr Blut und Sputum auf Allergien und Entzündungen sowie Ihre Lungenfunktion inklusive Metacholinprovokation testen.

Bei der **Abschlußuntersuchung** am Anfang der nächsten Woche werden die Eingangsuntersuchungen nochmals durchgeführt.

Die auch für Sie interessanten Ergebnisse dieser aufwendigen Tests stellen wir Ihnen selbstverständlich zur Verfügung. Ihr Aufwand pro Visite jeweils ca. ein bis zwei Stunden.

Während Ihrer gesamten Teilnahme an der Studie führen Sie bitte ein Tagebuch, in dem Sie mögliche Veränderungen an der Impfstelle und andere Auffälligkeiten wie z.B. Infekte, Fieber etc. protokollieren. Diese Ereignisse haben zwar häufig nichts mit der Impfung zu tun, sind aber für uns zur Verlaufsbeurteilung wichtig.

## **Wieviele Probanden werden insgesamt an der Studie teilnehmen?** 24-30

## **Welche Nebenwirkungen bzw. Begleiterscheinungen sind möglicherweise zu erwarten?**

Wie bei jeder Impfung kann es kommen zu

1. lokalen Nebenwirkungen (Verletzung / Infektion / Schwellung an der Einstichstelle)
2. systemischen Nebenwirkungen (Anstieg der Körpertemperatur, Unpässlichkeit, etc.)

Im Rahmen der Inhalationstestung (Milbenbelastung, Methacholintest) kann es vereinzelt vorübergehend zu Husten, Kratzen im Hals und Luftnot kommen, die entweder spontan oder nach Inhalation eines bronchienerweiternden Spray (Salbutamol) wieder verschwindet.

## **Wer kommt für die Kosten auf?**

Die entstehenden Kosten werden von der die Firma Symbiopharm aus Herborn übernommen.

Phase II zu Verträglichkeit und Wirkung/Wirksamkeit von Autovaccinen bei Hausstaubmilben-Allergikern Version4 09.07.2007

### **Versicherung**

Für alle Probanden besteht zum Ausgleich eines Vermögensschadens infolge einer studienbedingten Gesundheitsschädigung der für klinische Prüfungen gesetzlich vorgeschriebene Versicherungsschutz. Bei Verdacht auf einen studienbedingten Gesundheitsschaden ist der behandelnde Prüfarzt sofort zu benachrichtigen, damit dieser in Ihrem Auftrag die Versicherung informieren kann. Sie können erwarten, dass Sie eine Abschrift der Meldung erhalten. Sie können die Versicherung auch selbst informieren.

Die Versicherung wurde bei der Allianz-Versicherung abgeschlossen, mit der Versicherungs-Nummer Die Versicherungsbedingungen wurden ausgehändigt.

### **Welchen Nutzen haben Sie von der Teilnahme an der Studie?**

Alle Teilnehmer erhalten eine finanzielle Aufwandsentschädigung und eine intensive allergologische Beratung und Untersuchung. Sollten Sie in der Autovaccine Gruppe sein, kann es möglicherweise zu einer deutlichen Besserung der Beschwerden kommen.

### **Werden Sie informiert, wenn während der Studie neue Erkenntnisse bezüglich der Studienmedikation gewonnen werden?**

Sie werden entsprechend informiert, wenn während der Dauer der Studie neue Erkenntnisse gewonnen werden, die einen Einfluss auf Ihre Bereitschaft zur Fortführung der Studie haben könnten.

### **Wen sollen Sie ansprechen, wenn Sie Fragen haben?**

Sofern Sie während der Dauer der Studie zusätzliche Fragen bezüglich des Fortgangs der Studie oder Ihrer Rechte als Studienpatient haben, wenden Sie sich bitte mit diesen Fragen an

- siehe unten -

Sofern bei Ihnen im Zusammenhang mit der Studie eine körperliche Beeinträchtigung oder ein gleich wie geartetes Problem auftritt, setzen Sie sich bitte in Verbindung mit:

Prüfarzt: Dres. Rose / Schulze / Lieb  
Anschrift: Universitätskinderklinik Frankfurt,  
Theodor-Stern-Kai 7,  
60590 Frankfurt/M

Telefon-Nr.: 069-6301-83063

### **Freiwilligkeit**

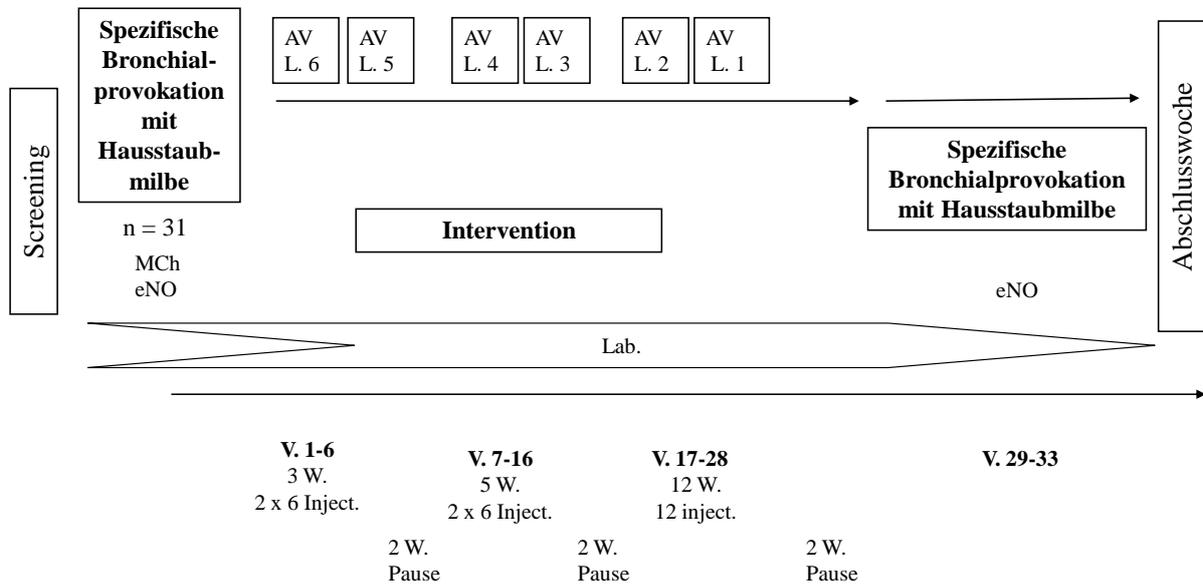
Ihre Teilnahme ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angaben von Gründen, Ihre Teilnahmebereitschaft widerrufen, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre weitere ärztliche Versorgung entstehen. Auch die Prüfarzte sind zur jeder Zeit ermächtigt, die Teilnahme eines Probanden aus bestimmten Gründen zu beenden.

Modifiziertes Ablaufschema der Studie  
 „Wirkung autologer Autovakzine bei Milbenallergikern“ **Phase 2**

Woche	Visite	Wochentag / AV Dosis*	Untersuchung vor Inj.	Provokation
	0		Prick, EKG, LabS, UrinS&M	Milbe PD 20
1	1	Mo Stufe 6 0,1 ml Stufe 6 0,15 ml	eNO, SpuEos, LabI	MCh
	2	Do Stufe 6 0,22 ml Stufe 6 0,32 ml		
2	3	Mo Stufe 6 0,5 ml Stufe 6 0,7 ml		
	4	Do Stufe 5 0,1 ml Stufe 5 0,15 ml		
3	5	Mo Stufe 5 0,22 ml Stufe 5 0,32 ml		
	6	Do Stufe 5 0,5 ml Stufe 5 0,7 ml	LabI	
4/5		Pause		
6	7	Mo Stufe 4 0,1 ml Stufe 4 0,15 ml		
	8	Do Stufe 4 0,22 ml Stufe 4 0,32 ml		
7	9	Mo Stufe 4 0,5 ml		
	10	Do Stufe 4 0,7 ml	eNO, LabI, EKG	MCh
8	11	Mo Stufe 3 0,1 ml		
	12	Do Stufe 3 0,15 ml		
9	13	Mo Stufe 3 0,22 ml		
	14	Do Stufe 3 0,32 ml		
10	15	Mo Stufe 3 0,5 ml		
	16	Do Stufe 3 0,7 ml	LabI	
11/12		Pause		
13	17	Mi Stufe 2 0,1 ml		
14	18	Mi Stufe 2 0,15 ml		
15	19	Mi Stufe 2 0,22 ml		
16	20	Mi Stufe 2 0,32 ml		
17	21	Mi Stufe 2 0,50 ml		
18	22	Mi Stufe 2 0,70 ml		
19	23	Mi Stufe 1 0,1 ml		
20	24	Mi Stufe 1 0,15 ml		
21	25	Mi Stufe 1 0,22 ml		
22	26	Mi Stufe 1 0,32 ml		
23	27	Mi Stufe 1 0,50 ml		
24	28	Mi Stufe 1 0,70 ml	LabI	
25/26		Pause	eNO (Ende Woche 26)	
27	29	Mo	eNO, SpuEos, LabI	MCh Milbe PD 5
	30	Di	eNO	Milbe PD 5
	31	Mi	eNO, SpuEos	Milbe PD 5
	32	Do	eNO, LabS, US	Milbe PD 20
28	33/End-	Mo	eNO, SpuEos, LabI, US&M	MCh

Prick = Prick-Hauttest; AV = Autovaccine; \* oder analoge Menge Placebo. Provo = Milben-Provokation; MCh = Metacholin-Test; NO = Stickoxid; SuEos = Sputum-Eosinophilie; Med/CD63 = Mediatoren/CD63; Lab = Sicherheits („S“) und Immun („I“) -Labor; hrs = Stunden; End = Abschlussvisite; US = Urin-Stix; US&M = Urin Stix plus Beta-Mikroglobulin

**Abb. 1: Studiendesign Autologe E. coli Autovaccine allergischem Asthma durch Hausstaubmilbe**



Legend: AV = Autovaccine; L. = Level; MCh = Metacholin-Provokation; eNO = exhalierendes Stickstoffmonoxid (vor und 24h nach Provokation); Lab. = BB, CrP, Klinische Chemie & Hämatologie; V. = Visite; W. = Wochen

**RPCDB Studie zur Wirkung der autologen Autovaccine bei Hausstaubmilben-Allergikern (FIAVS)**

Sie erhielten heute eine Spritze zur Autovaccine-Immuntherapie. Wir möchten Sie deshalb bitten, heute und in den nächsten vier Tagen zu dokumentieren, ob nach der Impfung Begleiterscheinungen aufgetreten sind. Bitte bringen Sie den ausgefüllten Symptomkalender zur nächsten Visite mit. **Vielen Dank!**

Visite \_\_\_\_\_ (Woche \_\_\_\_\_)

Proband Nr. \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Begleiterscheinungen	Tag der Impfung Ja <input type="checkbox"/> / Nein <input type="checkbox"/>	Tag 1 Ja <input type="checkbox"/> / Nein <input type="checkbox"/>	Tag 2 Ja <input type="checkbox"/> / Nein <input type="checkbox"/>	Tag 3 Ja <input type="checkbox"/> / Nein <input type="checkbox"/>	Tag 4 Ja <input type="checkbox"/> / Nein <input type="checkbox"/>
Temperatur °C	<input type="text"/> , <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/>
Rötung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schwellung < 5 cm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
> 5 cm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schmerzen > 3 h	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Juckreiz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nesselsucht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
sonstige Lokalreaktion (bitte nennen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Asthma-Anfall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gliederschmerzen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kopfweh	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
sonstige system. Reaktion (bitte nennen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medikamente keine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
akut	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
vorbeugend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dokument  
verifiziert,  
ggf. Kom-  
mentare.  
Datum,  
Unterschrift

# Ethikvotum

16/04/2012 08:07 004969630183434

ETHIK KGU

S. 03/08



## Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Universitätsklinikum - Theodor-Stern-Kal 7 · 60590 Frankfurt

Herr  
Prof. Dr. Stefan Zielen  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I  
ZKi

**Ethik-Kommission  
Der Vorsitzende**

Bearbeiterin: Dr. Astrid Gießler/f  
Tel.: 069/63 01-45 97  
Fax: 069/63 01-83434  
E-Mail: Astrid.Giesler@kgu.de

Dienstag, 26. August 2008

**Geschäfts-Nr.: 319/04 BITTE STETS ANGEBEN!**  
**EudraCT-Nr.: 2005-005534-12**  
**Protokoll-Nr.: AVH-2004/01**  
**Sponsor: Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Klinikum der J. W. Goethe Universität, Prof. Dr. S.  
Zielen**

**Titel: Phase I / Phase II Studie zur Verträglichkeit und Wirkung  
/Wirksamkeit von Autovaccinen bei Hausstaubmilben-Allergikern**

**Geschäftsführung der  
Ethik-Kommission**  
Tel.: 069/63 01-4597

**Sekretariat der  
Ethik-Kommission**  
Tel.: 069/63 01-7239

<http://ethik-kommission.klinik.uni-frankfurt.de>

Sehr geehrter Herr Professor Zielen,

hiermit bestätige ich, dass in unserem Votum vom 12.10.2006 noch der ursprüngliche Titel der Studie „Randomisierte, doppel-blinde, placebo-kontrollierte Studie zur Wirkung der autologen Autovaccine bei Hausstaubmilben-Allergikern (FIAVS)“ verwendet wurde. Es hätte der oben stehende verwendet werden müssen, der auch auf dem Protokoll vom 24.07.2006 steht, welches durch das Votum zustimmend bewertet wurde.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Astrid Gießler  
Geschäftsführerin der Ethik-Kommission

319-04p.doc



Fachbereich Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Universitätsklinikum - Theodor-Stern-Kal 7 - 60590 Frankfurt

Herr  
Prof. Dr. Stefan Zielen  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I  
ZKi

**Ethik-Kommission  
Der Vorsitzende**

Bearbeiterin: Dr. Astrid Gießler/ff  
Tel.: 069/63 01-45 97  
Fax: 069/63 01-83434  
E-Mail: ethikkommission@kgu.de

Donnerstag, 12. August 2010

**Geschäfts-Nr.: 319/04 BITTE STETS ANGEBEN!**  
**EudraCT-Nr.: 2005-005534-12**  
**Protokoll-Nr.: AVH-2004/01**  
**Sponsor: Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Klinikum der J. W. Goethe Universität,  
Prof. Dr. S. Zielen**

**Titel:** Phase I / Phase II Studie zur Verträglichkeit und Wirkung /Wirksamkeit von  
Autovaccinen bei Hausstaubmilben-Allergikern

cc: PEI

**Geschäftsführung der  
Ethik-Kommission**  
Tel.: 069/63 01-4597

**Sekretariat der  
Ethik-Kommission**  
Tel.: 069/63 01-7238

<http://ethik-kommission.klinik.uni-frankfurt.de>

**Nachträgliche Änderung gemäß § 10 Abs. 1 GCP-V vom 12.07.2010**  
hier: Patienten Information Phase II, Nachuntersuchungsvisite  
modifiziertes Ablaufschema vom 08.07.2010

Sehr geehrter Herr Professor Zielen,

die Ethik-Kommission hat Ihren Antrag auf nachträgliche Änderung nach §  
10 Abs. 1 GCP-V geprüft.

**Die Ethik-Kommission erteilt eine zustimmende Bewertung zu der  
nachträglichen Änderung, mit der Bedingung, dass die  
Versicherungsbestätigung zum Amendment vom 27.07.2010 vorgelegt  
wird.**

Der Bewertung liegen die in Anhang 1 aufgeführten Unterlagen zugrunde.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Sebastian Harder  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

319-04r.doc

U 23

**Allgemeine Hinweise:**

- Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser klinischen Prüfung verbleibt beim Sponsor, bei der Leiterin/dem Leiter der klinischen Prüfung und bei den Prüferinnen/Prüfern.
- Zusammensetzung und Arbeitsweise der Ethik-Kommission entsprechen nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung.

• **Anhang 1**

**Vorgelegte Unterlagen**

- Amendment vom 27.07.2010
- Notification of a substantial Amendment vom 28.07.2010
- Patienteninformation Phase II, Nachuntersuchungsvisite, Version 5 vom 08.07.2010
- Einverständniserklärung, Version 20.07.2010
- Modifiziertes Ablaufschema zur Studie vom 08.07.2010
- Fragebogen vom 06.08.2010

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

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

**Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit einer autologen E.coli  
Autovaccine-Therapie bei Hausstaubmilben-Allergikern mit intermittierendem  
oder mildem persistierendem Asthma bronchiale**

im **Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Pädiatrische Allergologie,  
Pneumologie und Mukoviszidose**

unter Betreuung und Anleitung von **Herrn Prof. Dr. med. Stefan Zielen** mit

Unterstützung durch **Herrn Prof. Dr. med. Markus A. Rose** ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation abgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

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

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)