

Aus dem  
Charité Centrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Pädiatrie m. S. Pneumologie und Immunologie  
Direktor: Professor Dr. med. U. Wahn

## **Habilitationsschrift**

# **Neue Therapien der Nahrungsmittelallergie im Kindesalter**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Pädiatrie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Dr. med. Kirsten Beyer**

Eingereicht:	Januar 2009
Dekanin:	Professor Dr. med. A. Grütters-Kieslich
1. Gutachter:	Professor Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring
2. Gutachter:	Professor Dr. med. Gesine Hansen

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>5</b>
2.1. Allergenidentifikation .....	5
2.1.1. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut induced systemic reactions .....	6
2.1.2. Identification of the Major Sesame Seed Allergens by 2D-Proteomics and Edman Sequencing – Seed Storage Proteins as Common Food Allergens .....	14
2.1.3. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7 .....	21
2.1.4. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3 .....	25
2.2. B-Zellepitope und Mutationsanalysen .....	34
2.2.1. Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen.....	35
2.2.2. Identification of amino acids critical for IgE-binding to sequential epitopes of bovine kappa-casein and the similarity of these epitopes to the corresponding human kappa-casein sequence .....	41
2.3. Orale Immuntherapie .....	49
2.3.1. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction .....	50
2.3.2. Rush oral immunotherapy in children with persistent cow's milk allergy.....	60
2.3.3. Effects of cooking methods on peanut allergenicity .....	63
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>69</b>
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	<b>74</b>
<b>5. Literatur</b> .....	<b>75</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>79</b>
<b>7. Erklärung</b> .....	<b>80</b>

# 1. Einleitung

---

Die Nahrungsmittelallergie ist mit einer Prävalenz von ungefähr sechs Prozent eine häufige Erkrankung im Kindesalter<sup>(1;2)</sup>. Bei Patienten mit atopischer Dermatitis kommt sie noch öfter vor. Jedes dritte Kind mit atopischer Dermatitis hat gleichzeitig auch eine Nahrungsmittelallergie, die in der Mehrzahl der Fälle mit Soforttypreaktionen einhergeht<sup>(3;4)</sup>. Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss, Nüsse, Samen, Weizen, Soja, Fisch und Schalentiere sind die Hauptauslöser von allergischen Reaktionen auf Nahrungsmittel<sup>(5)</sup>. Bei der Nahrungsmittelallergie treten Reaktionen vor allem an der Haut (z.B. Urtikaria, Quinckeödem, Verschlechterung der atopischer Dermatitis), dem Magendarmtrakt (z.B. Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall, mangelnde Gewichtszunahme), sowie dem respiratorischen Trakt (z.B. Rhinokonjunktivitis, pfeifende Atmung, Stridor, Atemnot) auf<sup>(6)</sup>. Ein oder mehrere Organsysteme können betroffen sein. Milde Lokalsymptome bis hin zur Anaphylaxie werden beobachtet. Im Kindesalter ist die Nahrungsmittelallergie die Hauptursache von anaphylaktischen Reaktionen<sup>(7)</sup>.

Die Mehrzahl der durch Nahrungsmittel ausgelösten allergischen Reaktionen sind IgE vermittelt. Als Ursache für die Entstehung einer Nahrungsmittelallergie wird eine fehlende Toleranzentwicklung oder ein Verlust der Toleranz gegen das entsprechende Allergen angenommen<sup>(8;9)</sup>. Interessanterweise entwickeln die meisten Patienten mit einer Kuhmilch- oder Hühnereiallergie die orale Toleranz dann über die Jahre und werden bis zum Schulalter klinisch tolerant<sup>(10)</sup>. Im Gegensatz hierzu behalten erdnussallergische Patienten ihre Allergie meist bis ins Erwachsenenalter<sup>(11)</sup>.

Patienten mit einer Nahrungsmittelallergie haben zurzeit als einzige Therapieoption die Eliminationsdiät<sup>(10)</sup>. Diese ist jedoch nicht einfach durchzuführen, insbesondere bei Nahrungsmittel, die häufig in der Lebensmittelindustrie verwendet werden. Beim versehentlichen Verzehr des Allergens kann es zu schweren allergischen Reaktionen mit potentiell tödlichem Ausgang zu bekommen. Dies ist besonders für die Erdnussallergie wichtig, da sie häufig lebenslang besteht und zu schweren Reaktionen neigt<sup>(12)</sup>. Die Allergenkennzeichnungsrichtlinien der EU haben zum Teil bereits zu einer Verbesserung der Durchführbarkeit der Diät geführt<sup>(13)</sup>. Schwierigkeiten hat der nahrungsmittelallergische Verbraucher jedoch nach wie vor mit loser Ware, die nicht kennzeichnungspflichtig ist. Kontaminationen von verpackter Ware sind ebenfalls ein Problem. Die Kennzeichnung von so genannten Spuren von allergenen Stoffen, die keine Zutaten sind, stützt sich auf Freiwilligkeit der Lebensmittelunternehmer. Daher ist die Vermeidung von allergenen Nahrungsmitteln nicht einfach. Die strikte Diät und das häufig notwendige Mitführen eines Notfallsets einschließlich Autoinjektoren mit Adrenalin ist eine Belastung, die den Alltag vieler Patienten und derer Familien bestimmt. Die Entwicklung kausaler Therapien für die Nahrungsmittelallergie ist daher dringend notwendig.

Die spezifische Immuntherapie gegen Inhalationsallergene ist bei anderen allergischen Erkrankungen, wie der polleninduzierten Rhinokonjunktivitis, eine wirksame Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass eine allergenspezifische Immuntherapie mit subkutanen Injektionen von Allergenextrakt bei der Erdnussallergie aufgrund einer extrem hohen Nebenwirkungsrate nicht geeignet scheint<sup>(14;15)</sup>. Neue immuntherapeutische Verfahren mit modifizierten Proteinen werden daher zurzeit entwickelt. Hierfür ist es jedoch notwendig, die entsprechenden Einzelallergene und die IgE-Bindungsstellen zu identifizieren. Desweiteren muss untersucht werden, ob durch Veränderung der Aminosäuresequenzen eine teilweise oder komplette Reduktion der IgE-Bindung erreicht werden kann.

Eine weitere Therapieoption ist die orale Immuntherapie. Bei der oralen Immuntherapie wird das entsprechende Allergen in steigender Dosierung dem Patienten verabreicht mit dem Ziel letztendlich eine orale Toleranz zu induzieren. Die Wirksamkeit dieses Verfahrens wurde seit mehreren Jahrzehnten immer wieder in einzelnen Fallberichten oder kleinen, unkontrollierten Studien beschrieben.

Notwendige Maßnahmen zur Entwicklung einer kausalen Therapie für Nahrungsmittelallergische Patienten ist daher die Entwicklung einer wirksamen und sicheren Immuntherapie. Im Folgenden sollen unsere Forschungsergebnisse in Bezug auf die Identifizierung von Allergenen, deren IgE-Bindungsstellen und Mutationsanalysen für die Entwicklung einer Immuntherapie mit modifizierten rekombinanten Proteinen dargestellt werden. Desweiteren wird die orale Immuntherapie in einer kontrollierten Studie untersucht und als therapeutische Option vorgestellt. Für Kuhmilchallergiker wird ein Rushverfahren vorgestellt, um schneller zu einem optimalen Schutz zu gelangen. Desweiteren werden Optionen für die Verringerung der Nebenwirkungen aufgezeigt.

## 2. Ergebnisse

---

### 2.1. Allergenidentifikation

---

Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss, Nüsse, Samen und Schalentiere gehören zu den Hauptauslöser von Nahrungsmittelallergischen Reaktionen. Die Hauptallergene vieler dieser Nahrungsmittel sind bereits identifiziert.

Die Kuhmilchallergene kann man in Caseine und Molkenproteine unterteilen<sup>(16)</sup>. Caseine machen 80% des Gesamtproteingehaltes der Milch aus. Sie setzen sich aus vier Fraktionen zusammen, die wenig Strukturhomogenität haben. Zu den Caseinen zählen  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ - Caseine, die alle als Allergene beschrieben sind. Die Molkenproteine machen 20% des Gesamtproteingehaltes von Kuhmilch aus. Sie bestehen unter anderem aus  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin, die beide als Allergene beschrieben sind<sup>(16)</sup>.

Die meisten Allergene des Hühnereies sind im Hühnereiweiß enthalten<sup>(6)</sup>. Eigelb löst seltener allergische Reaktionen aus. Hühnereiweiß enthält 24 verschiedene Glykoproteine. Die wichtigsten Hühnereiweißallergene sind Ovomucoïd (Gal d 1), Ovalbumin (Gal d 2), Ovotransferrin (Gal d 3) und Lysozym (Gal d 4). Der Anteil von Ovomucoïd macht ca. 10%, von Ovalbumin 54%, von Ovotransferrin 12% und von Lysozym 3% des Hühnereiweißes aus.

Bei der Erdnuss spielen vor allem Samenspeicherproteine eine wichtige Rolle<sup>(5)</sup>. Die wichtigsten Erdnussallergene umfassen Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3/Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6 und Ara h 7. Die meisten dieser Allergene gehören zu den 2S Albuminen, 7S und 11S Globulinen, die eine hohe Strukturähnlichkeit mit den Samenspeicherproteinen in Nüssen und Samen zeigen, obwohl diese botanisch nicht verwandt sind.

Für die Schalentiere glaubte man lange, das Tropomyosin das einzige Hauptallergen ist. Größte Lücken gibt es hingegen bei den Baumnüssen, wie der Haselnuss, sowie bei den Samen. Im Folgenden soll die Identifizierung von Allergenen der Haselnuss und Sesamsamen, sowie von einem zusätzlichen Allergen in Shrimps beschrieben werden.

### **2.1.1. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut induced systemic reactions**

---

*Kirsten Beyer, MD, Galina Grishina, MS, Ludmilla Bardina, MS, Alexander Grishin, PhD, and Hugh A. Sampson, MD. J Allergy Clin Immunol 2002;110:517-23.*

Die Haselnuss ist in Europa und den USA ein häufiges Allergen. Sie ist nicht nur an Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergien beteiligt, sondern auch Auslöser vieler systemischen Reaktionen. Ähnlich wie bei der Erdnussallergie tendieren die Reaktionen zu einem schwereren Verlauf. Daher sind eine verbesserte Diagnostik, die orale Nahrungsmittelprovokationen überflüssig macht und eine kausale Therapie wünschenswert. Wir konnten in den letzten Jahren ein neues Hauptallergen der Haselnuss identifizieren, das insbesondere bei Patienten mit systemischer, nicht-Pollen-assoziiertes Haselnussallergie eine wichtige Rolle spielt.

Hierfür wurden Haselnussproteine mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot mit dem Serum von 14 Haselnuss-allergischen Patienten durchgeführt. Ein 40-KD Protein wurde als Allergen identifiziert. Parallel wurde eine cDNA Library konstruiert und mit Primer durchsucht, die mittels der gefundenen Sequenz der Peptide konstruiert wurden. Auf diese Weise wurden cDNA Klone isoliert, sequenziert und letztendlich mit Patientenserum untersucht. Das von uns identifizierte Allergen Cor a 9 wurde von 12 der 14 Patienten (86%) mit nicht-Pollen-assoziiertes Haselnussallergie erkannt.

Cor a 9 gehört zur gleichen Proteinfamilie der 11S Globuline wie das Erdnussallergen Ara h 3. Die Homologie zwischen beiden Proteinen beträgt 45%. Interessanterweise ist die Homologie zwischen den beiden Proteinen an eine bekannten IgE-Bindungsstelle von Ara h 3 67%. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Aminosäuren für die IgE-Bindung an Ara h 3 nicht bedeutend sind. Möglicherweise findet sich hierdurch eine Erklärung für die häufig beobachtete Kreuzallergie zwischen der botanisch nicht verwandten Erdnuss und Haselnuss. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

## 2.1.2. Identification of the Major Sesame Seed Allergens by 2D-Proteomics and Edman Sequencing – Seed Storage Proteins as Common Food Allergens

---

*Kirsten Beyer, MD, Ludmilla Bardina, MS, Galina Grishina, MS, and Hugh A. Sampson, MD. J Allergy Clin Immunol 2002;110:154-9.*

Allergische Reaktionen auf Sesam scheinen zu zunehmen. Möglicherweise ist dieses auf die vielfältige Verwendung von Sesam in internationalen Fastfood Ketten und Backprodukten zurückzuführen. Um die Allergene von Sesam zu identifizieren wurden Sesamsamen mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot mit dem Serum von zwanzig Sesam-allergischen Patienten durchgeführt. IgE-Bindung zu Proteinen wurde bei 78, 52, 45, 34, 32, 29, 25, 20, 9, and 7 KD beobachtet.

Das 45 KD Protein wurde von 75% der Patienten erkannt. Sequenzierung des Proteins ergab, dass es sich um ein Protein mit bekannter Aminosäurefrequenz handelt, das zur Gruppe der 7S Globuline gehört. Dieses Protein wurde vom Allergennomenklaturkomitee als Allergen anerkannt und Ses i 3 genannt.

Das 7 KD Protein wurde von 30% der Patienten erkannt. Sequenzierung des Proteins ergab, dass es sich um ein Protein mit bekannter Aminosäurefrequenz handelt, das zur Gruppe der 2S Albumine gehört. Dieses Protein wurde vom Allergennomenklaturkomitee als Allergen anerkannt und Ses i 2 genannt.

Ses i 3 gehört zur gleichen Proteinfamilie wie das Erdnussallergen Ara h 1. Interessanterweise beträgt die Homologie zwischen den beiden Proteinen an einer bekannten IgE-Bindungsstelle von Ara h 1 80%. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Aminosäuren für die IgE-Bindung an Ara h 1 nicht bedeutend sind. Möglicherweise findet sich hierdurch eine Erklärung dafür, dass Patienten mit Erdnussallergie häufig auch eine Sesamallergie haben. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

### **2.1.3. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7**

---

*Kirsten Beyer, MD, Galina Grishina, MS, Ludmilla Bardina, MS, and Hugh A. Sampson, MD. J Allergy Clin Immunol 2007;119:1554-6.*

Verschiedene Allergene in Sesam konnten kürzlich von anderen und uns identifiziert werden. Die Identifizierung von Ses i 2 und Ses i 3 wurde im vorrausgehenden Abschnitt dargestellt. Die bisher bekannten Allergene Ses i 1 und Ses i 2 sind 2S Albumine und Ses i 3 ein 7S Globulin. 2S Albumine und 7S Globuline sind Samenspeicherproteine, die auch in der Erdnuss bekannte Allergene ausmachen. Mit der folgenden Studie wollten wir untersuchen, ob auch die Gruppe der 11S Globuline, bekannt als Hauptallergene der Erdnuss, für die Sesamallergie eine Rolle spielen.

Für diese Studie wurde eine cDNA Library von Genen unreifer Sesamsamen konstruiert. Die bekannten Sequenzen von zwei 11S Globulinen von Sesam (Accession Nummer AF 091842 und AF 240004) wurden benutzt um Primer zu synthetisieren und die cDNA Library zu durchsuchen. Auf diese Weise konnten cDNA Klone isoliert werden. Anschließend wurden rekombinante Proteine hergestellt und mit dem Serum von 24 Patienten mit Sesamallergie getestet. Als Kontrolle diente das Serum von je einer atopischen und nicht-atopischen Kontrollperson.

Die rekombinanten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Serum der Patienten und Kontrollen getestet. Dreizehn der Patienten zeigten eine starke IgE-Bindung zu dem ersten rekombinanten Protein und zehn zu dem Zweiten. Diese beiden Proteine wurden vom Allergennomenklaturkomitee als Allergene anerkannt und Ses i 6 und Ses i 7 benannt. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.



### 2.1.4. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3

---

Rosalía Ayuso, MD, PhD, Galina Grishina, MS, Ludmilla Bardina, MS, Teresa Carrillo, MD, PhD, Carlos Blanco, MD, PhD, María Dolores Ibáñez, MD, PhD, Hugh A. Sampson, MD, and Kirsten Beyer, MD. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:795-802.

Allergische Reaktionen auf Shrimp sind eine häufige und meist lebenslange Erkrankung. Um bessere therapeutische Optionen zu entwickeln müssen alle bekannten Allergene eines Nahrungsmittels bekannt sein. Um zusätzliche Hauptallergene in Shrimp zu identifizieren haben wir Shrimpproteine mittels SDS-Page und 2D-Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot mit dem Serum von 38 Shrimp-allergischen Patienten durchgeführt.

Ein 20-KD Protein wurde durch IgE Antikörpern von 21 der Patienten (55%) erkannt. Parallel wurde eine cDNA Library von *Litopenaeus vannamei* (weißer Pazifikshrimp) generiert. Diese cDNA Library wurde mit Primer getestet, die mittels der ermittelten Sequenzen hergestellt wurden. Ein cDNA Klon wurde von der cDNA Library isoliert und sequenziert. Übersetzung in die Proteinsequenz identifizierte es als „Myosin Light Chain“, das eine große Ähnlichkeit zum Allergen der Kakerlaken Bla g 8 hatte.

Rekombinante Proteine wurden hergestellt und mit Seren der Shrimp-allergischen Patienten untersucht. Das rekombinante Protein wurde von siebzehn der Patienten erkannt. Hiermit konnte die Allergenität bestätigt werden. Das Allergen wurden vom Allergennomenklaturkomitee anerkannt und Lit v 3 genannt. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

## 2.2. B-Zellepitope und Mutationsanalysen

---

Die Kuhmilchallergie ist eine häufige Erkrankung im Kindesalter. Eine kausale Therapie gibt es zurzeit nicht. Da die Immuntherapie mit intakten Proteinen bei Erdnussallergikern zu unerwartet hohen Nebenwirkungen geführt hat, ist eine mögliche Alternative modifizierte, rekombinante Proteine mit geringerer Allergenität zu verwenden.

Die Hauptallergene der Kuhmilch sind gut charakterisiert. Kuhmilch besteht zu 80% aus Casein und zu 20% aus Molkenproteinen. Caseine sind die Hauptallergene in der Kuhmilch. Man unterscheidet  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ - Caseine. Um eine bessere und sicherere Immuntherapie zu entwickeln haben wir kürzlich die IgE- (und IgG-) Epitope aller Caseine identifiziert.

Hierfür haben wir für  $\alpha_{s1}$ -Casein 96 überlappende Peptide, die die gesamte Länge von  $\alpha_{s1}$ -Casein repräsentieren auf Cellulosemembran synthetisiert und anschließend mit Serum von 24 Kuhmilch-allergischen Kindern untersucht. Auf diese Weise konnten wir 6 Haupt-IgE-Bindungsstellen und 3 Nebenstellen identifizieren<sup>(17)</sup>. Auf ähnliche Art und Weise wurden auch die IgE-Bindungsstellen von  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ - Casein identifiziert. Es wurden vier Haupt-IgE-Bindungsstellen auf  $\alpha_{s2}$ -Casein, sechs auf  $\beta$ -Casein und acht auf  $\kappa$ - Casein identifiziert. Sechs Nebenstellen wurden auf  $\alpha_{s2}$ -Casein und drei auf  $\beta$ -Casein identifiziert<sup>(18;19)</sup>.

Neben den Caseine der Kuhmilch sind die Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin wichtige Allergene. Die Proteine sind gut charakterisiert und anhand der bekannten AA Sequenz haben wir für  $\alpha$ -Lactalbumin 57 und für  $\beta$ -Lactoglobulin 77 überlappende Peptide auf Zellulosemembranen synthetisiert. Diese Peptide wurden mit Seren von neunzehn kuhmilchallergischen Kindern untersucht. Wir identifizierten vier IgE-Bindungsepitope auf  $\alpha$ -Lactalbumin und sieben auf  $\beta$ -Lactoglobulin<sup>(20)</sup>.

Durch Mutationsanalysen konnten wir im Folgenden zeigen, welche Aminosäuren relevant für die IgE-Bindung sind. Austausch dieser Aminosäure führt zur Reduktion oder zum Verlust der IgE-Bindung. Auf diese Weise modifizierte Proteine sollten daher hypoallergen sein und bei Verwendung in der spezifischen Immuntherapie zu weniger Nebenwirkungen führen. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeiten hierzu dargestellt.

### **2.2.1. Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen**

---

*Renata R. Cocco, MD, Kirsi-Marjut Järvinen, MD, PhD, Hugh A. Sampson, MD, and Kirsten Beyer, MD. J Allergy Clin Immunol 2003;112:433-7.*

Um Therapien mit modifizierten Proteinen zu entwickeln haben wir die Aminosäuren in  $\alpha_{s1}$ -Casein, die unbedingt notwendig für die IgE-Bindung sind, identifiziert. Hierfür wurden Epitope von 10-14 AA Länge auf Membranen aus Nitrozellulose synthetisiert. Es wurden hierbei keine, eine oder mehrere AA durch Alanin ersetzt. Diese natürlichen und modifizierten Peptide wurden mit Poolserum von 15 und individuellen Serum von 8 Kuhmilch-allergischen Patienten untersucht.

Die Ergebnisse mit dem Poolserum zeigten, dass die Substitution von einer einzelnen Aminosäure bei zwei von acht Peptiden zum kompletten Verlust der IgE-Bindung führte. Die Substitution mehrerer Aminosäuren führte zum Verlust der IgE-Bindung bei den sechs übrigen Peptiden.

In vier der acht Peptide führte eine Substitution der kritischen Aminosäuren jedoch nicht zum Verlust der IgE-Bindung wenn individuelle Patientenserum verwendet wurden. Interessanterweise waren für diese Patienten andere Aminosäuren für die IgE-Bindung relevant als für die Mehrzahl der Patienten.

Wir konnten auf diese Weise Aminosäuren identifizieren, deren Austausch zum Bindungsverlust oder zur Reduktion der IgE-Bindung führte. In der Hälfte der Fälle wurden jedoch unterschiedliche AA für einen Teil der Patienten gefunden, was auf eine größere Heterogenität in der IgE-Bindung schließen lässt als erwartet. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

### **2.2.2. Identification of amino acids critical for IgE-binding to sequential epitopes of bovine kappa-casein and the similarity of these epitopes to the corresponding human kappa-casein sequence**

---

*Nancy Han, Kirsi-Marjut Järvinen, MD, PhD, Renata Cocco, MD, Paula Busse, MD, Hugh A. Sampson, MD, and Kirsten Beyer, MD. Allergy 2008;63:198-204.*

Wie für  $\alpha_{s1}$ -Casein haben wir auch die kritischen Aminosäuren für  $\kappa$ -Casein bestimmt. Hierfür wurden elf Peptide von 10-14 Aminosäuren Länge, die die IgE-Bindungsepitope von  $\kappa$ -Casein repräsentieren, mit Substitution einzelner Aminosäuren an jeder Position auf Nitrozellulosemembranen synthetisiert. Die Membranen wurden anschließend mit dem Poolserum von fünfzehn Patienten mit Kuhmilchallergie und individuellen Seren von zehn dieser Patienten getestet.

Für zehn der elf Peptide führte die Aminosäuresubstitution von ein bis fünf verschiedenen Aminosäuren zur vollständigen Aufhebung der IgE-Bindung durch Poolserum. Ähnlich wie für  $\alpha_{s1}$ -Casein zeigte die Benutzung von individuellem Serum auch für  $\kappa$ -Casein eine Heterogenität für die IgE-Bindungsepitope. Es konnte jedoch jeweils eine Aminosäure-Substitution gefunden werden, die zu einer Reduktion der IgE-Bindung in mindestens 80% der Patienten führte.

Interessanterweise zeigte eine IgE-Bindungsstelle der bovinen  $\kappa$ -Casein AA104-112 eine hohe Identität mit dem  $\kappa$ -Casein humaner Milch, einschließlich der für die IgE-Bindung kritischen Aminosäuren. Ob diese potentiell kreuzreaktiven Peptide klinisch relevant sind, müsste jedoch noch gezeigt werden. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

## 2.3. Orale Immuntherapie

---

Es gibt bis heute keine kausale Therapie für die Behandlung einer Nahrungsmittelallergie. Es konnte gezeigt werden, dass die subkutane Immunotherapie mit Erdnussextrakt eine hohe Rate an schweren allergischen Nebenwirkungen hatte <sup>(14;15;21)</sup>. Daher werden zurzeit andere immuntherapeutische Verfahren untersucht. Neben der potentiellen Immuntherapie mit modifizierten Proteinen scheint die orale Immuntherapie eine Option zu sein.

Seit mehreren Jahrzehnten gibt es immer wieder Fallberichte oder kleine unkontrollierte Studien, die einen Erfolg der oralen Immuntherapie für die Therapie der Nahrungsmittelallergie zeigen <sup>(22-24)</sup>. Hierbei wird das entsprechende Nahrungsmittel in kleinen, ständig steigenden Dosen oral verabreicht. Ein einheitliches Schema in Bezug auf Zeitintervalle und Dosen gibt es bisher nicht.

Nachdem die gewünschte Höchstdosis erreicht wird, nimmt der Patient das entsprechende Nahrungsmittel über einen gewissen Zeitraum täglich zu sich. Die meisten bisher veröffentlichten Studien haben ein sogenanntes konventionelles Schema angewandt. Dabei wird über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten die Allergengabe gesteigert. Wir führten kürzlich wurde die erste kontrollierte und randomisierte Studie durch, die die Wirkung der oralen Immuntherapie im Vergleich zur Eliminationsdiät untersucht. Desweiteren entwickelten wir ein Rush Verfahren für die orale Immuntherapie mit Kuhmilch. Die Ergebnisse dieser Arbeiten soll im Folgenden detailliert dargestellt werden.

Obwohl die orale Immuntherapie ein wirksamer Therapieansatz zu sein scheint, ist die Nebenwirkungsrate noch relativ hoch. Eine Reduktion der Allergenität bei unveränderter Antigenität der Allergene wäre wünschenswert. Wir zeigen im Folgenden für die Erdnuss, dass unterschiedliche Zubereitungsformen, wie kochen statt rösten, die Allergenität deutlich senkt. Ob auf diese Weise modifizierte Nahrungsmittel auch in der oralen Immuntherapie zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führen würde, muss jedoch in Zukunft noch gezeigt werden.

### **2.3.1. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction**

---

*Ute Staden, MD, Claudia Rolinck-Werninghaus, MD, Frank Brewe, Ulrich Wahn, MD, Bodo Niggemann, MD, and Kirsten Beyer, MD. Allergy 2007;62:1261-9.*

Um die orale Immuntherapie im Vergleich zur Eliminationsdiät zu untersuchen, führten wir kürzlich eine kontrollierte und randomisierte Studie durch. Eingeschlossen waren 45 Patienten im Durchschnittsalter von 2,5 Jahren mit Kuhmilch oder Hühnereiallergie. Die klinische Relevanz der Nahrungsmittelallergie wurde vor Beginn der Studie durch eine doppelblinde, Placebo kontrollierte Nahrungsmittelprovokation bestätigt. 25 Patienten erhielten eine konventionelle Immuntherapie und 20 Patienten eine Eliminationsdiät über den gleichen Zeitraum. Die Steigerung der Dosis während der Induktionsphase erfolgte über durchschnittlich 7 Monate täglich zu Hause bis die Patienten 250 ml Kuhmilch oder ein Hühnerei vertrugen. Während der Erhaltungsphase über 12 Monate bekamen die Kinder täglich 100 ml Kuhmilch oder 2 g Hühnereiprotein (ca. ½ Hühnerei). Vor erneuter Provokationstestung, die im Durchschnitt nach 21 Monaten erfolgte, erhielten alle Kinder in der Therapiegruppe erneut für 2 Monate eine Eliminationsdiät, um die langfristige Wirksamkeit der erreichten Toleranz zu beweisen.

36% der Patienten vertrugen das Allergen auch nach erneuter Elimination und wurden als tolerant eingestuft. Über den gleichen Zeitraum sind auch 35% der Kontrollkinder tolerant geworden. Die orale Immuntherapie scheint daher den natürlichen Krankheitsverlauf bei jüngeren Kindern nicht zu beeinflussen. Weitere 12% der Kinder in der Therapiegruppe vertrugen das Allergen, wenn sie es täglich zu sich nahmen. Die erneut durchgeführte Elimination durchbrach jedoch die erfolgreiche Desensibilisierung. Weitere 16% der Patienten vertrugen geringere Mengen als angestrebt und eine weitere Erhöhung der Dosis führte zu erneuten allergischen Reaktionen.

Aus den Daten ergibt sich, dass die orale Immuntherapie bei Kuhmilch- und Hühnereiallergie am wahrscheinlichsten für ältere Kinder mit persistierender Allergie geeignet ist. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

### 2.3.2. Rush oral immunotherapy in children with persistent cow's milk allergy

---

*Ute Staden, MD, Katharina Blümchen, MD, Nike Blankenstein, Nicole Dannenberg, MD, Helen Ulbricht, Kerstin Dobberstein, Mandy Ziegert, Bodo Niggemann, MD, Ulrich Wahn, MD, and Kirsten Beyer, MD. J Allergy Clin Immunol 2008;122:418-9.*

Wie im vorigen Abschnitt dargestellt, zeigt die orale Immuntherapie nach konventionellem Steigerungsschema im Vergleich zur natürlichen Toleranzentwicklung keine bessere Prognose. Für ältere Kinder mit persistierender Allergie könnte sie jedoch eine kausale Therapie sein. Vorteilhaft wäre es auch, wenn die orale Toleranz schnell erreicht würde. Im Gegensatz zur konventionell durchgeführten oralen Immuntherapie wird im Rush Verfahren versucht möglichst schnell auf eine höhere Dosis zu kommen. Dies kann in der Regel nur unter ärztlicher Aufsicht erfolgen. Eine Fallstudie berichtete von einem 12 jährigen Mädchen mit persistierender Kuhmilchallergie, die nach 5 Tagen Rush Therapie 200 ml Kuhmilch vertrug<sup>(22)</sup>.

Ein ähnliches Verfahren haben wir kürzlich an einer größeren Gruppe von Kindern mit persistierender Kuhmilch angewandt. Neun Patienten zwischen 3 und 14 Jahren mit persistierender Kuhmilchallergie erhielten eine orale Immuntherapie im Rush Verfahren. Die klinische Aktualität der Kuhmilchallergie war zuvor mittels doppelblind, Placebo kontrollierter oraler Provokationstestung nachgewiesen worden. Die orale Immuntherapie wurde mit 1:100 der Schwellendosis der oralen Nahrungsmittelprovokation begonnen. Die Dosis wurde alle 2 Stunden verdoppelt. Täglich wurden 3 bis 5 Dosen gegeben bis die Patienten 120 ml Kuhmilch vertrugen oder 7 Tagen therapiert waren. Sechs der neun Patienten erreichten innerhalb von 2 bis 7 Tagen die angestrebten 120 ml Kuhmilch. Drei Patienten tolerierten nur geringere Mengen (1,5 ml; 8 ml und 40 ml). Alle Patienten zeigten wiederholt Nebenwirkungen, die unter der Gabe von Antihistaminika oder Salbutamol rasch verschwanden. Ob neben der erreichten Desensibilisierung langfristig eine spezifische orale Toleranz induziert wird, muss die langfristige Nachverfolgung dieser Patienten zeigen. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.

### 2.3.3. Effects of cooking methods on peanut allergenicity

---

*Kirsten Beyer, MD, Ellen Morrow, Xiu-Min Li, MD, Ludmilla Bardina, MS, Gary A. Bannon, PhD, A.Wesley Burks, MD, and Hugh A. Sampson, MD.  
J Allergy Clin Immunol 2001;107:1077-81.*

Die orale Immuntherapie führt zurzeit noch zu relativ vielen Nebenwirkungen. Ähnlich wie bei anderen immuntherapeutischen Verfahren ergibt sich die Frage, ob eine Reduktion der Allergenität bei unveränderter Antigenität möglich ist. Wir konnten für die Erdnuss zeigen, dass verschiedene Zubereitungsformen, wie rösten, frittieren und kochen zu einer Veränderung der Allergenität führen. Dies ist vermutlich durch die thermische Veränderung der Proteinstruktur zu erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden geröstete, frittierte und gekochte Erdnüsse von zwei verschiedenen Züchtungen (Florunner und Valencia) in Bezug auf ihre Allergenität gegenüber gestellt. Die Proteine wurden mittels SDS Page getrennt. Serum von acht Patienten mit Erdnussallergie wurden für die IgE-Bindungsuntersuchung verwendet.

Wir konnten zeigen, dass gekochte Erdnüsse eine deutlich geringere Allergenität hatten als geröstete. Dies galt für die drei Hauptallergene der Erdnuss, Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3. Vermutlich verändert sich durch die thermale Behandlung die Proteinstruktur, was wiederum zur Veränderung der Allergenität führt. Man kann spekulieren, dass durch den vermehrten Genuss gekochter Erdnüsse die niedrigere Prävalenz von Erdnussallergien in Asien erklärt werden kann. Ob sich durch den Einsatz modifizierter, z.B. gekochter Nahrungsmittel, bei der oralen Immuntherapie die Nebenwirkungen verringern lassen, muss gezweigt werden. Auf den folgenden Seiten findet sich die Originalpublikation.



### 3. Diskussion

---

Eine kausale Therapie der Nahrungsmittelallergie gibt es bislang nicht. Die einzige Option ist eine Eliminationsdiät. Nahrungsmittelallergiker müssen sich täglich mit ihrer Erkrankung beschäftigen. Um das entsprechende Nahrungsmittelallergen zu meiden, müssen Patienten und deren Angehörige beim Einkaufen jedes Label genau lesen. Lose Ware zu essen kommt häufig einem Glücksspiel gleich und der Besuch eines Restaurants kann zum Albtraum werden. Immer sitzt die Angst im Nacken, ob auch alles gut geht. Auch Eltern von Kindern mit Nahrungsmittelallergien sind im großen Maße beeinträchtigt. Sie müssen häufig den gesamten Speiseplan der Familie umstellen, um ihr allergisches Kind nicht zu gefährden. Wenn ihr Kind in den Kindergarten oder die Schule geht, müssen die Eltern sich darauf verlassen, dass die Betreuer die Nahrungsmittelallergie beachten. Es konnte gezeigt werden, dass die Lebensqualität von Patienten mit Nahrungsmittelallergie stark eingeschränkt ist<sup>(25)</sup>. Hinzu kommt, dass Nahrungsmittelallergiker, die Anaphylaxie gefährdet sind, immer ein Notfallset mit einem Adrenalin Autoinjektor mitführen müssen. Dies gilt für alle Erdnuss- und Nussallergiker, nahrungsmittelallergische Patienten mit Asthma, sowie für alle Patienten, die schon einmal eine anaphylaktische Reaktion hatte. Die potentielle Lebensbedrohung wird durch das Notfallset noch offensichtlicher.

Auf der Suche nach einer kausalen Therapie wurde bei Patienten mit Erdnussallergie bereits vor über zehn Jahren eine subkutane Immuntherapie, wie sie bei Pollenallergie üblich ist, versucht. Das Ergebnis war frustrierend, da die Patienten nicht nur während der Steigerungsphase, sondern auch in der Erhaltungsphase, schwere Nebenwirkungen hatten<sup>(14;15)</sup>. Eine Option wäre die Verwendung von modifizierten Proteinen. Wir konnten mit den hier vorgelegten Arbeiten die hierfür notwendigen Untersuchungen in Bezug auf Identifikation und Charakterisierung von Nahrungsmittelallergenen aufzeigen.

Neben der spezifischen Immuntherapie wurden verschiedene andere therapeutische Ansätze untersucht<sup>(26)</sup>. Ein deutlicher Fortschritt in der Pharmakotherapie der Nahrungsmittelallergie konnte kürzlich durch eine Therapie mit humanisierten Anti-IgE Antikörpern erzielt werden. In einer Studie konnte durch die Gabe dieses Antikörpers, der gegen die Cε3 Domäne der Fc Region von IgE gerichtet ist, der Schwellenwert für eine klinische Reaktion gegen Erdnuss für die meisten Patienten enorm erhöht werden<sup>(27)</sup>. Obwohl dies keine Heilung bedeutet, schützt es jedoch diese Patienten gegen die versehentliche Aufnahme von Erdnüssen, solange die Anti-IgE Therapie durchgeführt wird. Leider wird der verwendete Antikörper TNX-901 nicht vermarktet werden. Eine Wiederholung der Studie mit dem für die Behandlung des schweren Asthma bronchiale zugelassenen Antikörpers Omalizumab ist daher dringend notwendig.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Verwendung von traditioneller chinesischer Medizin bei der Erdnussallergie. Die Verwendung der Kräutermixtur FAHF-2 führte zur deutlichen Verringerung der allergischen Symptome im Mausmodell<sup>(28)</sup>. C3H/HeJ Mäuse mit etablierter Erdnussallergie, die eine Therapie mit FAFH-2 oder Placebo erhielten, waren noch 4 Wochen nach der Therapie gegen eine Erdnuss-induzierte Anaphylaxie geschützt. Dieser klinische Schutz war begleitet von einem Abfall des Erdnuss-spezifischen IgE und der Th2 Zytokine, sowie einen Anstieg von Th1 Zytokinen.

Die Verwendung von modifizierten Proteinen in der spezifischen Immuntherapie scheint jedoch eine der vielversprechendsten Optionen zu sein<sup>(29)</sup>. Für verschiedenen Erdnussallergene konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen einzelner Aminosäuren die IgE-Bindung vollständig aufhebt<sup>(30-32)</sup>. In Tierversuchen führte die Immunotherapie unter Verwendung dieser Proteine zu einer deutlichen Reduktion der Symptome, allerdings war die alleinige Verwendung ungenügend<sup>(33)</sup>. Die gleichzeitige Anwendung modifizierter Erdnussproteine mit hitzeinaktivierten *L. monocytogenes* zeigte deutlich bessere Ergebnisse. Ob jedoch die subkutane Injektion von *L. monocytogenes* als Adjuvant beim Menschen ein sicheres Verfahren ist, muss noch gezeigt werden. Ein weiterer erfolgversprechender Weg scheint die rektale Verwendung von mutierten Proteinen mit hitzeinaktivierten *E. coli* als Adjuvant. Dies hätte zum Vorteil, dass die teure Aufreinigung der hergestellten rekombinanten Proteinen wegfallen würde, da sie rektal in eine Umgebung appliziert würden, die voll von *E. coli* ist. Obwohl die Verwendung von modifizierten Proteinen in Tierversuchen sehr erfolgreich zu sein scheint, muss der schützende Effekt beim Menschen noch bewiesen werden. Zurzeit wird die erste klinische Studie in den USA vorbereitet. Wichtig ist die Beobachtung, dass die Modifizierung der IgE-Bindungsstellen die T-Zellantwort unbeeinträchtigt lässt<sup>(34)</sup>.

Neben der Erdnussallergie ist die Kuhmilchallergie insbesondere im Kindesalter eine häufige Erkrankung. Ähnlich wie für die Erdnussallergie haben wir für die bekannten Kuhmilchallergene die IgE-Bindungsstellen bestimmt<sup>(17-20)</sup>. Wie in den vorliegenden Arbeiten dargestellt, wurden anschließend Peptide, die diese Bindungsstelle repräsentieren mit Punktmutationen an jeder Stelle synthetisiert und mit Serum von Kuhmilch-allergischen Patienten getestet. Auf diese Weise waren wir in der Lage, Aminosäure, die für die IgE-Bindung kritisch sind, zu identifizieren. Interessanterweise konnten wir gleichzeitig zeigen, dass es eine gewisse Heterogenität gibt. Für einige Patienten sind andere Aminosäuren für die IgE-Bindung essenziell als für die Mehrzahl der Patienten. Dieses kann für die zukünftige Therapie entscheidend sein, da gegeben falls eine individuelle Anpassung der Therapie erfolgen muss. Diese Heterogenität wurde für die Erdnussallergene nicht gesehen, da die Bestimmung der kritischen Aminosäuren für die Erdnussallergene nur mit Poolserum und nicht mit individuellen Seren, wie in den vorliegenden Studien, erfolgte.

Wahrscheinlich ist für eine optimale Therapie in Zukunft die Bestimmung der kritischen Aminosäuren für große Patientengruppen notwendig. Mit der in unseren Arbeiten beschriebenen Methode der SPOT-Membran Technologie wäre dieses enorm zeitaufwendig und würde große Mengen an Serum benötigen. Insbesondere für pädiatrische Patienten stellt dieses ein Problem da. Wir konnten kürzlich eine Microarraymethode, die für Proteine entwickelt wurde auch für die IgE Messung gegen Peptiden weiterentwickeln<sup>(35)</sup>. Auf diese Weise ist die Messung der IgE-Bindung für Hunderte von Peptide mit nur Mikroliter von Serum möglich.

Ähnlich wie für  $\alpha$ - und  $\kappa$ -Casein, die in den vorliegenden Arbeiten beschrieben wurden, haben wir auch die kritischen Aminosäuren für  $\beta$ -Casein und  $\beta$ -Lactoglobulin bestimmt. Hierfür wurden Epitope von 10-14 AA Länge auf Membranen aus Nitrozellulose synthetisiert bei denen keine, eine oder mehrere Aminosäuren durch Alanin (oder Glycin) ersetzt wurden. Diese natürlichen und modifizierten Peptide wurden mit Poolserum von 15 und individuellen Serum von 6 Kuhmilch-allergischen Patienten untersucht. Aminosäuren, deren Austausch zum Bindungsverlust oder zur Reduktion der IgE-Bindung durch Poolserum führte, wurden identifiziert. Durch den Austausch einer einzigen, bestimmten Aminosäure konnte die IgE-Bindung in sechs der elf B-Zellepitope von  $\beta$ -Casein und in allen sechs B-Zellepitopen von  $\beta$ -Lactoglobulin reduziert werden. In vier der fünf B-Zellepitope von  $\beta$ -Casein führte der gleichzeitige Austausch von zwei Aminosäuren zum Verlust der IgE Bindung. Die Benutzung von individuellem Serum zeigte jedoch eine ähnliche Heterogenität, wie sie auch schon für  $\alpha$ -Casein beobachtet wurde. Drei der elf modifizierten Peptide von  $\beta$ -Casein und fünf der sechs modifizierten Peptide von  $\beta$ -Lactoglobulin wurden weiterhin durch IgE Antikörper von mindestens einem der Patienten erkannt, von den individuelles Serum benutzt wurde. Aufgrund dieser gefundenen Heterogenität ist eine Bestimmung der individuellen B-Zell-Epitope vor einer potentiellen Immunotherapie gegeben falls notwendig.

Um eine Immunotherapie auch auf weitere Nahrungsmittelallergene, wie Nüsse und Samen ausweiten zu können, müssen die relevanten Allergene bekannt sein. Wie auch die Erdnussallergie bestehen Allergien gegen Nüsse und Samen in der Regel lebenslang. Daher ist eine Immunotherapie hier besonders notwendig. In den vorliegenden Arbeiten haben wir die Identifizierung eines Haselnussallergens, mehrerer Sesamallergene und eines neuen Allergens in Shrimps beschrieben. Desweiteren haben wir an der Identifizierung eines neuen Allergens in Cashewnuss mitgewirkt<sup>(36)</sup>. Allergische Reaktionen auf Cashewnüsse sind vor allem in den USA ein häufiges Problem. Als Hauptallergene der Cashewnuss konnten 11S Globuline identifiziert werden. Wir waren in der Lage ein weiteres Hauptallergen der Cashewnuss zu identifizieren, das zur Gruppe der 2S Albumine gehört.

Die in den letzten Jahren zunehmende Identifizierung von Allergenen in verschiedenen Nüssen und Samen ergab, das dies meisten dieser Allergen zur Gruppe der Samenspeicherproteine gehört, die auch die Hauptallerge der botanisch

nicht verwandten Erdnuss ausmachen. Die Samenspeicherproteine umfassen 2S Albumine, 7S Globuline und 11S Globuline. Durch die Ähnlichkeit der Proteine bleibt zu hoffen, dass Therapieerfolge bei der Erdnuss auch auf Baumnüsse und Samen angewendet werden können.

Die Identifikation von Nahrungsmittelallergenen spielt nicht nur für die Therapie der Nahrungsmittelallergie eine wichtige Rolle. Die von uns identifizierten Allergene sind auch für eine bessere Diagnostik hilfreich. Sowohl für Inhalations- als auch für Nahrungsmittelallergene konnte gezeigt werden, dass die komponentenbasierte Diagnostik, das heißt die Verwendung von Einzelallergenen, statt Allergengemischen, einen wichtigen Stellenwert gewonnen hat<sup>(37;38)</sup>.

Ein weiterer Ansatz für die Therapie der Nahrungsmittelallergie ist die orale Immuntherapie. Im Gegensatz zur subkutanen spezifischen Immuntherapie, die eine hohe Nebenwirkungsrate bei der Behandlung von Nahrungsmittelallergien zeigte<sup>(14;15)</sup>, werden hierbei kleine, aufsteigende Mengen des Allergens oral gegeben mit dem Ziel eine orale Toleranz zu induzieren. Bisher werden hierbei native, nicht-modifizierte Allergene verwendet. Seit Jahrzehnten beschreiben kleine, nicht kontrollierte Studien oder Fallberichte Erfolge mit diesem therapeutischen Ansatz<sup>(39)</sup>. Wir konnten, wie dargestellt, in einer kontrollierten Studie zeigen, dass diese Therapie den natürlichen Verlauf der Kuhmilch- oder Hühnereiallergie nicht zu verändern scheint<sup>(40)</sup>. Eine Hauptindikationsstellung scheint daher für Patienten mit persistierender Nahrungsmittelallergie zu sein. Für diese Patienten, zum Beispiel mit persistierender Kuhmilchallergie, konnten wir zeigen, dass auch ein Rush Verfahren zu Erfolg führt<sup>(41)</sup>. Obwohl die Nebenwirkungsrate relativ hoch ist, scheinen die Reaktionen gut kontrollierbar zu sein.

Andere Arbeitsgruppen haben auch einen ähnlich guten Erfolg mit der oralen Immuntherapie gezeigt. In Italien wurde eine randomisierte, Plazebo kontrollierte Studie an 60 Kindern mit schwerer Kuhmilchallergie durchgeführt<sup>(40)</sup>. Die Kinder im Alter von 5 bis 17 Jahren waren hochgradig sensibilisiert mit Kuhmilch-spezifischem IgE zwischen 85 kU/l und >100 kU/l. Die Kinder reagierten in der oralen Provokationstestung auf weniger als 1 ml Kuhmilch. Nach Randomisierung erhielt die Hälfte der Patienten eine orale Immuntherapie, während die andere Hälfte über ein Jahr unter einer kuhmilchfreien Eliminationsdiät beobachtet wurde. Nach einem Jahr waren in der Therapiegruppe 36% der Patienten komplett tolerant und zusätzliche 54% vertrugen zwischen 5 und 150 ml Kuhmilch. In der Kontrollgruppe waren nach dem gleichen Zeitraum alle Patienten nach wie vor Kuhmilchallergisch.

Ähnlich wie in unserer Studie, konnte gezeigt werden, dass eine orale Immuntherapie wirksam, aber nicht Nebenwirkungsarm ist. Fast alle Patienten in der Therapiegruppe hatten allergische Symptome unter der Therapie<sup>(42)</sup>. Die meisten Symptome waren kutan oder abdominal, einige Patienten benötigten jedoch eine Adrenalin Injektion oder inhalatives Adrenalin aufgrund von respiratorischen

Problemen. Im gleichen Zeitraum hatten 20% der Patienten der Kontrollgruppe eine allergische Reaktion bei versehentlichem Verzehr von Kuhmilch. Alle Reaktionen in der Kontrollgruppe verliefen leicht.

Auch in den USA wurde kürzlich eine randomisierte und kontrollierte Studie zur oralen Immuntherapie bei Kuhmilchallergie durchgeführt<sup>(43)</sup>. Zwanzig Patienten zwischen 6 und 17 Jahren wurden 2:1 in einen Behandlungs- und einen Plazebo-Arm eingeteilt. Es zeigte sich eine signifikante Schwellenwerterhöhung in der Behandlungsgruppe im Vergleich zu Patienten in der Plazebo Gruppe. Wie auch bei anderen Immuntherapeutischen Verfahren stiegen die Kuhmilch-spezifische IgG4-Werte in der Therapiegruppe signifikant an. In dieser Studie kam es bei 45% der Gaben in der Behandlungsgruppe und bei 11% der Gaben in der Plazebo Gruppe zu Nebenwirkungen. Vier Patienten in der Behandlungsgruppe benötigten Adrenalin. Ähnliche Untersuchungen und Ergebnisse konnten auch für Patienten mit Hühnereiallergie<sup>(44;45)</sup> und Erdnussallergie gezeigt werden<sup>(46)</sup>.

Insgesamt scheint die orale Immuntherapie eine Option, den Schwellenwert des Nahrungsmittels für eine Reaktion zu erhöhen und dadurch schwere Reaktionen unvorbereiteter Patienten nach versehentlichem Allergenkontakt zu verhindern. Ob hierbei langfristig nicht nur eine Desensibilisierung erfolgt sondern eine orale Toleranz induziert wird, muss in Folgestudien gezeigt werden. Desweiteren bleibt zu zeigen, ob der Einsatz thermisch veränderter Nahrungsmittel zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führt.

## 4. Zusammenfassung

---

Nahrungsmittelallergien sind insbesondere im Kindesalter eine häufige Erkrankung. Die allergischen Reaktionen reichen von milden Hautreaktionen bis hin zur Anaphylaxie mit potentiell tödlichem Ausgang. Eine kausale Therapie gibt es nach wie vor nicht. Hinzu kommt, dass Nahrungsmittelallergien gegen hochpotente Allergene, wie die Erdnuss, häufig lebenslang bestehen bleiben.

Auf der Suche nach neue Therapieoptionen scheint die orale Immuntherapie ein vielversprechender Ansatz. Es konnten von anderen und uns insbesondere für die Kuhmilch-, Hühnerei- und Erdnussallergie gute Erfolge gezeigt werden. Die Nebenwirkungsrate ist jedoch relativ hoch. Ob langfristig die Nebenwirkungsrate gerechtfertigt werden oder durch die Verwendung von thermisch modifizierten Nahrungsmitteln gesenkt werden kann, muss in großen klinischen Studien gezeigt werden.

Eine alternative immuntherapeutische Option könnte die Verwendung von modifizierten Proteinen in der subkutanen, sublingualen, rektalen oder oralen Therapie sein. Die Identifizierung und Charakterisierung von Nahrungsmittelallergenen ist hierbei ein wichtiger Baustein. Durch verbesserte Verfahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen und wir die relevanten Allergene in Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss, Nüssen, Samen, Weizen, Soja, Fisch und Schalentieren beschreiben. Desweiteren konnten die relevanten B-Zell Epitope für diese Allergene identifiziert werden. Molekulare Veränderungen dieser Bindungsstellen für zu einem Verlust der IgE-Bindung und damit zu einem Protein, das eine nebenwirkungsarme Immuntherapie ermöglichen sollte. Zukünftige klinische Untersuchungen am Menschen werden die Wirksamkeit jedoch beweisen müssen.

Mit den hier vorliegenden Forschungsergebnissen hoffen wir einen Beitrag in der Entwicklung von therapeutischen Optionen für Nahrungsmittelallergiker geleistet zu haben.

## 5. Literatur

---

- (1) Kanny G. [Food allergy]. *Allerg Immunol (Paris)* 2001; 33(9):351-6.
- (2) Sampson HA. Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113(5):805-19.
- (3) Werfel T, Ballmer-Weber B, Eigenmann PA, Niggemann B, Rance F, Turjanmaa K et al. Eczematous reactions to food in atopic eczema: position paper of the EAACI and GA2LEN. *Allergy* 2007; 62(7):723-8.
- (4) Eigenmann PA, Sicherer SH, Borkowski TA, Cohen BA, Sampson HA. Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics* 1998; 101(3):E8.
- (5) Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S470-S475.
- (6) Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(5 Pt 1):717-28.
- (7) Mehl A, Wahn U, Niggemann B. Anaphylactic reactions in children--a questionnaire-based survey in Germany. *Allergy* 2005; 60(11):1440-5.
- (8) Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 3):1595-600.
- (9) Sampson HA, Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Annu Rev Nutr* 1996; 16:161-77.
- (10) Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(6):981-9.
- (11) Spergel JM, Beausoleil JL, Pawlowski NA. Resolution of childhood peanut allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85(6 Pt 1):473-6.
- (12) Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD et al. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(1 Suppl):S2-24.
- (13) Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6(3):186-90.
- (14) Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DY. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(2):256-62.

- (15) Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(6 Pt 1):744-51.
- (16) Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89(6 Suppl 1):3-10.
- (17) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(2):379-83.
- (18) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(8):1256-62.
- (19) Busse PJ, Jarvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(1):93-6.
- (20) Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126(2):111-8.
- (21) Burks W, Bannon G, Lehrer SB. Classic specific immunotherapy and new perspectives in specific immunotherapy for food allergy. *Allergy* 2001; 56 Suppl 67:121-4.
- (22) Bauer A, Ekanayake MS, Wigger-Alberti W, Elsner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy* 1999; 54(8):894-5.
- (23) Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004; 59(9):980-7.
- (24) Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De PT et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(3):459-65.
- (25) Marklund B, Ahlstedt S, Nordstrom G. Food hypersensitivity and quality of life. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7(3):279-87.
- (26) Burks W, Lehrer SB, Bannon GA. New approaches for treatment of peanut allergy: chances for a cure. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 27(3):191-6.



- (27) Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW, Jr., Schneider LC, Wortel CH et al. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med* 2003; 348(11):986-93.
- (28) Qu C, Srivastava K, Ko J, Zhang TF, Sampson HA, Li XM. Induction of tolerance after establishment of peanut allergy by the food allergy herbal formula-2 is associated with up-regulation of interferon-gamma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(6):846-55.
- (29) Nowak-Wegrzyn A. New perspectives for use of native and engineered recombinant food proteins in treatment of food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27(1):105-27.
- (30) Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur J Biochem* 1997; 245(2):334-9.
- (31) Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G et al. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342(2):244-53.
- (32) Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest* 1999; 103(4):535-42.
- (33) Li XM. Beyond allergen avoidance: update on developing therapies for peanut allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(3):287-92.
- (34) King N, Helm R, Stanley JS, Vieths S, Luttkopf D, Hatahet L et al. Allergenic characteristics of a modified peanut allergen. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(10):963-71.
- (35) Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(4):776-82.
- (36) Robotham JM, Wang F, Seamon V, Teuber SS, Sathe SK, Sampson HA et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(6):1284-90.
- (37) Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk HF et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 2008; 63(11):1521-8.
- (38) Lidholm J, Ballmer-Weber BK, Mari A, Vieths S. Component-resolved diagnostics in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6(3):234-40.

- (39) Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Beyer K, Niggemann B. Specific oral tolerance induction (SOTI). *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2006; 154(5):432-+.
- (40) Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007; 62(11):1261-9.
- (41) Staden U, Blumchen K, Blankenstein N, Dannenberg N, Ulbricht H, Dobberstein K et al. Rush oral immunotherapy in children with persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
- (42) Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2):343-7.
- (43) Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
- (44) Buchanan AD, Green TD, Jones SM, Scurlock AM, Christie L, Althage KA et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(1):199-205.
- (45) Burks AW, Jones SM. Egg oral immunotherapy in non-anaphylactic children with egg allergy: follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1):270-1.
- (46) Burks AW, Laubach S, Jones SM. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(6):1344-50.

## 6. Danksagung

---

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Mentoren Herrn Prof. Dr. Ulrich Wahn, Herrn Prof. Dr. B. Niggemann und Herrn Prof. Dr. Hugh Sampson bedanken für ihre langjährige engagierte Unterstützung und Förderung.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfe und die Kraft, die sie mir gegeben haben, danken. Ohne sie hätte ich das nicht geschafft.

Meinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen an der Charité und der ‚Mount Sinai School of Medicine‘ danke ich für ihr fantastisches Engagement. Insbesondere den wissenschaftlichen Mitarbeitern Kirsi Jarvinen, Wayne Shreffler, Renata Cocco, Lynette Shek, Rosalia Ayuso, Scott Sicherer und Xiu-Min Li von der ‚Mount Sinai School of Medicine‘ und Renate Nickel, Nina Blümchen, Ute Staden, Claudia Rolinck-Werninghaus und Birgit Ahrens von der Charité gebührt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung und die vielen Anregungen und kritischen Diskussionen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Den Mitarbeitern im Labor möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Begeisterung danken, insbesondere Ludmilla Bardina und Galina Grishina von der ‚Mount Sinai School of Medicine‘ und Gabriele Schulz, Petra Ellensohn, Magret Oberreit, Kerstin Schüler und Alexander Rohrbach von der Charité.

Den Studienschwestern und Diätassistentinnen möchte ich von ganzem Herzen danken für ihre großartige Patientenbetreuung, insbesondere Sally Noone von der ‚Mount Sinai School of Medicine‘ und Susanne Paschke-Goosens, Sue Travis, Mandy Ziegert, Christiane Binder und Kerstin Dobberstein von der Charité.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei allen Patienten und Eltern, die an den Studien teilgenommen haben für ihre Zeit und Bereitschaft die Wissenschaft zu unterstützen.

## 7. Erklärung

---

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

07.01.2009

.....  
Datum

.....  
Unterschrift