

Όνομα Υποψήφιας Διδάκτορα: ΒΛΑΣΣΗ ΛΑΜΠΡΙΝΗ

**Ονόματα Τριμελούς Επιτροπής: (1) ΡΟΒΙΝΑ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ
(2) ΛΟΥΚΙΔΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ
(3) ΜΠΑΚΑΚΟΣ ΠΕΤΡΟΣ**

Τίτλος ερευνητικής μελέτης:

Οι ανοσοτροποποιητικές και κλινικές επιδράσεις της θεραπείας με αντισώματα έναντι της IL-5 (mepolizumab) και του υποδοχέα της IL-5 (benralizumab) στην ανώτερη και κατώτερη αναπνευστική οδό, σε ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα και ρινικούς πολύποδες

Εισαγωγή – Στόχος – Τρέχουσες γνώσεις:

Το άσθμα είναι μια ετερογενής χρόνια αναπνευστική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών και βρογχική υπεραντιδραστικότητα (airway hyperresponsiveness-AHR) σε μη ειδικά εισπνεόμενα ερεθίσματα^{1,2}. Περιλαμβάνει σύνθετους και πολλαπλούς κλινικούς φαινότυπους, κάποιοι από τους οποίους μπορεί να εκδηλώνονται με επίμονα συμπτώματα και οξείες παροξύνσεις. Ορισμένοι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρές, μερικές φορές απειλητικές για τη ζωή, παροξύνσεις της νόσου παρά το γεγονός ότι βρίσκονται υπό βέλτιστη θεραπεία^{1,2}. Αυτοί οι ασθενείς πάσχουν από σοβαρό άσθμα (ΣΑ) που δεν ελέγχεται επαρκώς και αντιπροσωπεύει μια μερίδα ασθενών που επιφέρει μείζονα κοινωνικοοικονομική επιβάρυνση, αλλά και αυξημένο κόστος περίθαλψης. Εκτός από τη φλεγμονή των αεραγωγών, το ΣΑ χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη ιστική αναδιαμόρφωση και στένωση των αεραγωγών, πάχυνση του επιθηλίου και σταθερό περιορισμό της ροής του αέρα^{1,2}. Μια υποομάδα ασθενών με ΣΑ χαρακτηρίζεται από υψηλή ανοσολογική απόκριση τύπου 2 (T2-high) έναντι περιβαλλοντικών αλλεργιογόνων, περιφερική ηωσινοφιλία και υψηλά επίπεδα εκπνεόμενου μονοξειδίου του αζώτου (FeNO)^{3,4}. Το ηωσινοφιλικό άσθμα χαρακτηρίζεται επίσης από περιφερική ηωσινοφιλία (>300 κύτταρα/μl), που σχετίζεται με ηωσινοφιλία στο βρογχικό ιστό και τα προκλητά πτύελα, πάχυνση της βασικής μεμβράνης και συχνά πολύ καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή^{3,4}.

Η συσχέτιση μεταξύ του ηωσινοφιλικού άσθματος, της χρόνιας ρινοκολπίτιδας (CRS) και των ρινικών πολυπόδων (NPs) είναι καλά τεκμηριωμένη. Εκτιμάται ότι το 7% των ασθενών με άσθμα εμφανίζουν CRS με NPs (CRSwNP)⁵. Το σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα, καθώς και η CRSwNP, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα Th2 κυτταροκινών, αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της IL-5 (IL-5R) και τοπική παραγωγή IgE⁶. Ως εκ τούτου, η οριοθέτηση των παθοβιολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στη φλεγμονή τύπου 2, η οποία είναι υπεύθυνη για το άσθμα και τους ρινικούς πολύποδες, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Η IL-5 είναι ένας βασικός παράγοντας που εμπλέκεται στη χημειοταξία, τη διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση και την επιβίωση των ηωσινοφίλων, και παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του ηωσινοφιλικού άσθματος και των ρινικών πολυπόδων⁶. Τα επίπεδα της IL-5 έχουν αποδειχθεί ότι είναι αυξημένα στο ρινικό ιστό σε άτομα με ρινικούς πολύποδες συγκριτικά με υγιή άτομα και επίσης, συσχετίζονται με τον παρατηρούμενο βαθμό ηωσινοφιλίας του ρινικού ιστού⁷. Επιπλέον, η εξαρτώμενη από την IL-5 ηωσινοφιλική φλεγμονή έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται σημαντικά με την επιθηλιακή βλάβη, την απώλεια όσφρησης, τη δραστηριότητα των ινοβλαστών, την

παραγωγή κολλαγόνου και την εναπόθεση ινωτικού ιστού στους ρινικούς πολύποδες⁸. Παρεμπιπτόντως, έχει αποδειχθεί ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν την IL-5 είναι ικανά να διακόψουν τα διαμεσολαβούμενα από την IL-5 διακυτταρικά δίκτυα/μονοπάτια που περιλαμβάνουν ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών και έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ρινικού πολύποδα⁹. Τα υψηλά επίπεδα ηωσινοφίλων, IL-5 και IgE έχουν αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την επανεμφάνιση των NPs και την ανάγκη για χειρουργική επέμβαση στα ιγμόρεια. Ως εκ τούτου, η αναστολή της σηματοδότησης της IL-5 έχει αναγνωριστεί ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία του σοβαρού ηωσινοφιλικού άσθματος, και ιδιαίτερα στην υποομάδα με συνυπάρχουσα ηωσινόφιλη CRSwNP¹⁰. Η βελτίωση των επιπέδων των ηωσινοφίλων του αίματος και των ιστών συνδέεται με λιγότερες παροξύνσεις και χαμηλότερο κόστος υγειονομικής περίθαλψης⁵.

Η Th2 φλεγμονή των αεραγωγών παίζει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του αλλεργικού ηωσινοφιλικού άσθματος. Η αλλεργική ευαισθητοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DCs) παρουσία της θυμικής στρωματικής λεμφοποιητίνης (TSLP), διεγείρει τα Th2 λεμφοκύτταρα να παράγουν κυταροκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-4, IL-5 και IL-13, οι οποίες ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα για την παραγωγή ειδικής για το κάθε αλλεργιογόνο IgE, η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς υψηλής συγγένειας των μαστοκυττάρων, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους¹¹.

Στο μη αλλεργικό ηωσινοφιλικό άσθμα, η βλάβη του επιθηλίου των αεραγωγών που προκαλείται από ρύπανση και παθογόνα οδηγεί σε παραγωγή IL-5 και IL-13 από έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα (ILC2s), ως απόκριση στις κυταροκίνες TSLP, IL-25 και IL-33 που προέρχονται από το επιθήλιο (αλαρμίνες)¹². Τα ILC2 και τα Th2 κύτταρα αποτελούν σημαντική πηγή κυταροκινών τύπου 2 και παίζουν ρόλο στην ηωσινόφιλη φλεγμονώδη απόκριση, την αλλεργία και την ιστική αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στο άσθμα¹³. Αυξημένα επίπεδα ILC2 που εκφράζουν IL-5 και IL-13 έχουν ανιχνευθεί στην κυκλοφορία και ταπύελα σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα σε σύγκριση με ασθενείς με ήπιο άσθμα¹⁴. Επίσης, αυξημένος αριθμός ILC2 που εκφράζουν IL-5 και IL-13 βρέθηκε στα πτύελα ασθενών με άσθμα μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο¹⁵. Τα ILC2 και Th2 κύτταρα που εκφράζουν την IL-13 είναι επίσης υπεύθυνα για την καταστροφή του βρογχικού επιθηλίου και την απογύμνωση της βασικής μεμβράνης σε ασθενείς με άσθμα¹⁶.

Η μεπολιζουμάμπη είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG1/k) που στοχεύει με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα την IL-5, αποκλείοντας τη σύνδεσή της στην άλυσση α του συμπλέγματος υποδοχέων της IL-5 που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια των ηωσινοφίλων¹⁷, αναστέλλοντας έτσι τη σηματοδότηση της IL-5 και μειώνοντας την παραγωγή και την επιβίωση των ηωσινοφίλων. Αρκετές κλινικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των μελετών DREAM, MENSA και SIRIUS, έδειξαν ότι, σε ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα, η μεπολιζουμάμπη μείωσε τις παροξύνσεις της νόσου και βελτίωσε την ποιότητα ζωής, τον έλεγχο των συμπτωμάτων και την πνευμονική λειτουργία¹⁸. Όλα τα ευρήματα έδειξαν ότι η μεπολιζουμάμπη είναι αποτελεσματική τόσο σε αλλεργικούς όσο και σε μη αλλεργικούς ασθενείς, βελτιώνει τη λειτουργία των πνευμόνων σε επίπεδο μεγάλων και μικρών αεραγωγών και μπορεί να προκαλέσει ύφεση του άσθματος¹⁹. Ωστόσο, δεν έχουν περιγραφεί λεπτομερείς αλλαγές στο ανοσολογικό τοπίο στο σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντι-IL-5, και ειδικά στον φαινότυπο που σχετίζεται με το CRSwNP.

Η μπενραλιζουμάμπη είναι ένα ανθρωποποιημένο, μη φουκοζυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG1/k) που εφαρμόζει τα Fab τμήματά της για να καταλαμβάνει και να αποκλείει την άλφα υπομονάδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-5 (IL-5Rα), αναστέλλοντας συνεπώς την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτής της υπομονάδας υποδοχέα και του φυσικού προσδέματος IL-5²⁰. Η μπενραλιζουμάμπη έχει αξιολογηθεί εκτενώς στο

πλαίσιο ενός ευρέος προγράμματος κλινικών δοκιμών με το όνομα WINDWARD, οι οποίες κατέδειξαν ότι αυτό το βιολογικό φάρμακο μείωσε σημαντικά τον αριθμό των παροξύνσεων του σοβαρού ηωσινοφιλικού άσθματος και είχε θετική επίδραση στον έλεγχο των συμπτωμάτων και στη λειτουργία των πνευμόνων^{18,21}. Επίσης, η μπενραλιζουμάμπη έχει χαρακτηριστεί ως μονοκλωνικό αντίσωμα ικανό να εξαντλεί τα ηωσινόφιλα στο αίμα, να μειώνει τις παροξύνσεις του άσθματος και την πρόσληψη από του στόματος κορτικοστεροειδών (OCS), να ανακουφίζει από τα συμπτώματα και επίσης να βελτιώνει τον περιορισμό της ροής του αέρα και την παγίδευση αέρα στις κυψελίδες^{18,21}.

Με βάση τα παραπάνω στόχοι της μελέτης που πρόκειται να διεξάγουμε είναι:

(1) να οριοθετήσουμε τις ανοσολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στους αεραγωγούς και στη ρινική οδό του σοβαρού ηωσινοφιλικού άσθματος με και χωρίς ταυτόχρονη CRSwNP ως απόκριση στη θεραπεία με αντι-IL-5 ή αντι-IL-5Ra, δηλαδή με μεπολιζουμάμπη ή μπενραλιζουμάμπη αντίστοιχα, και να συγκρίνουμε τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών θεραπευτικών επιλογών και

(2) να διερευνήσουμε πιθανές συσχετίσεις με κλινικές και ανοσολογικές παραμέτρους της νόσου.

Υπόθεση:

Υποθέτουμε ότι η μεπολιζουμάμπη και η μπενραλιζουμάμπη θα ενισχύσουν σημαντικά τους ανοσορυθμιστικούς μηχανισμούς σε ασθενείς με σοβαρό ηωσινόφιλο άσθμα και σε ασθενείς με CRSwNP.

Έτσι, θέλουμε να αποκρυπτογραφήσουμε το μοριακό αποτύπωμα και τις ιδιότητες των ανοσοποιητικών κυττάρων που ανταποκρίνονται στην anti- IL-5 θεραπεία σε ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα και σε ασθενείς με CRSwNP και να συγκρίνουμε τα παθοφυσιολογικά και κλινικά αποτελέσματα με τις διαφορετικές θεραπευτικές διαδικασίες.

Στόχοι:

Στόχος μας είναι να συγκεντρώσουμε μια σειρά από ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα και συνύπαρξη ή όχι NPs (GINA 2018) (38) και ERS/ATS (39). Όλοι οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια για θεραπεία με μεπολιζουμάμπη ή μπενραλιζουμάμπη. Η θεραπεία θα χορηγείται από εξειδικευμένο στο άσθμα πνευμονολόγο, σύμφωνα με τις οδηγίες. Οι ασθενείς θα παρακολουθούνται για τουλάχιστον ένα έτος θεραπείας.

Ρινικές και βρογχικές βιοψίες, ρινικό έκπλυμα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) και αίμα θα συλλεχθούν και θα αποθηκευτούν για περαιτέρω αναλύσεις.

Όλοι οι ασθενείς θα ενημερωθούν και θα υπογράψουν έντυπο συγκατάθεσης. Οι ασθενείς θα υποβληθούν σε αξιολόγηση του σοβαρού ηωσινοφιλικού άσθματος όπως συνιστάται από τις κατευθυντήριες οδηγίες. Η μελέτη έχει ήδη λάβει έγκριση από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου «Σωτηρία».

Μέθοδοι:

Στόχος 1. Να οριοθετήσουμε τις ανοσολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στους αεραγωγούς και στο ρινικό επιθήλιο σε σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα με και χωρίς συνυπάρχουσα CRSwNP, ως απόκριση στη θεραπεία με anti-IL-5 ή anti-IL-5Ra μονοκλωνικό αντίσωμα και να συγκρίνουμε τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Στην προτεινόμενη μελέτη, θα χρησιμοποιήσουμε βιοψίες ρινικού και βρογχικού επιθηλίου για χρώση ανοσοφθορισμού, πριν και μετά τη θεραπεία με μεπολιζουμάμπη ή μεπνραλιζουμάμπη αντίστοιχα, σε ασθενείς με ηωσινοφιλικό άσθμα με ή χωρίς NPs. Τα κύτταρα από τα ρινικά και βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα θα υποβληθούν σε κυτταρομετρία ροής. Τα δένδριτικά κύτταρα θα ταυτοποιηθούν ως CD45+HLA-DR+CD11c+ κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα ως CD45+CD14+, τα ουδετερόφιλα ως CD45+CD15+CD16+, τα ηωσινόφιλα ως CD45+CD15+Siglec-8+, τα T λεμφοκύτταρα ως CD45+CD3+, τα μαστοκύτταρα ως CD45+FceRIa+ και τα βασεόφιλα ως CD45+CD123+HLA-DR κύτταρα. Οι αναλύσεις θα γίνουν στο κυτταρόμετρο ροής FACS Aria III (BD Biosciences) και τα υλικά θα αναλυθούν με το FlowJo.

Κύτταρα από ρινικά και βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα θα ταυτοποιηθούν επίσης χρησιμοποιώντας CyTOF. Αυτή η προηγμένη τεχνική κυτταρομετρίας μάζας μετρά ταυτόχρονα περισσότερες από 45 πρωτεΐνες κατά την ανάλυση ενός κυττάρου και σε συνδυασμό με προηγμένες τεχνικές ομαδοποίησης επιτρέπει την ανάλυση της ετερογένειας των λευκοκυττάρων. Τα συζευγμένα με μεταλλικά ιόντα αντισώματα θα στοχεύουν εξωκυτταρικούς δείκτες (δηλαδή CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD27, CD38, CD45, CD61, CD66, CD123, CD235a/b, HLA-DR) προκειμένου να εντοπιστούν όλα τα κύρια κυτταρικά υποσύνολα του περιφερειακού αίματος, συμπεριλαμβανομένων των κοκκιοκυττάρων, των βασεόφιλων, των πλασμοκυτταρικών δένδριτικών κυττάρων, των κυττάρων φυσικών φονιάδων (Natural Killer cells- NKs), των εκτελεστικών T φονικών κυττάρων, των naïve T φονικών κυττάρων, των ενεργοποιημένων T φονικών κυττάρων, των T φονικών κυττάρων μνήμης, των εκτελεστικών T βοηθητικών κυττάρων, των naïve T βοηθητικών κυττάρων, των ενεργοποιημένων T βοηθητικών κυττάρων, των T κυττάρων μνήμης, των B κυττάρων μνήμης, των naïve B κυττάρων, των B-κυττάρων του πλάσματος, των μυελοειδών δένδριτικών κυττάρων, των μονοκυττάρων, και των αιμοπεταλίων. Επιπλέον θα χρησιμοποιηθούν δείκτες ωρίμανσης (δηλαδή CD11b, CD10, CD15, CD124/IL-4R, CD45RA, CD45RO), δείκτες ενεργοποίησης (π.χ. CD66b, CD16, CD11b, CD62L, CD54/ICAM-1, CD63, CD274/PD-L1, HLA-DR), λειτουργικοί δείκτες (π.χ. Arg1, FoxP3, NOS), υποδοχείς χημειοκινών (π.χ. CXCR2, CXCR4, CXCR3, CXCR5). Θα αξιολογηθεί επίσης, η έκφραση διαφόρων κυτταροκινών (π.χ. IL-4, IL-17, IL-13, IL-6, TGF-β1, IL-10, TNF-a). Για να αποκτήσουμε πρακτικές πληροφορίες σχετικά με τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς, θα χρησιμοποιήσουμε τεχνικές που βασίζονται σε δεδομένα για ομαδοποίηση και μείωση διαστάσεων, όπως το FlowSOM, για τη δημιουργία αυτο-οργανωμένων, χωρίς επίβλεψη, χαρτών. Ολοκληρωμένες αναλύσεις του συνόλου των δεδομένων που θα δημιουργηθεί μέσω της προτεινόμενης μελέτης θα πραγματοποιηθούν μέσω προηγμένων μαθηματικών μοντέλων και βιοπληροφορικής με τη βοήθεια του τμήματος βιοπληροφορικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (IIBEA).

Επιπλέον, το προφίλ των κυτταροκινών στα ρινικά και βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα και στον ορό θα προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας ELISA.

Στόχος 2. Να διερευνήσουμε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των ευρημάτων μας και των κλινικών και ανοσολογικών παραμέτρων της νόσου.

Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των προφίλ ασθματικών ασθενών με κλινικές παραμέτρους [π.χ. πνευμονική λειτουργία, FeNO, παράμετροι πνευμονικής λειτουργίας (FEV₁, FVC, MEF50, MEF25), παλμική ταλαντωσιμετρία (αναπνευστική αντίδραση, αυξημένη περιφερικές αντιστάσεις κ.λπ.), βιοδείκτες, ACT και SNOTscores) θα διερευνηθούν. Οι αναλύσεις του συνόλου των δεδομένων που θα συλλεχθούν μέσω των παραπάνω θα πραγματοποιηθούν με τη βοήθεια προηγμένων μαθηματικών μοντέλων και βιοπληροφορικής.

Στατιστικές αναλύσεις: Τα αποτελέσματα θα αναλυθούν με τη χρήση μη ζευγαρωμένων και ζευγαρωμένων, παραμετρικών και μη παραμετρικών δοκιμών, σύμφωνα με την κανονικότητα των δεδομένων (GraphPad Prism).

Αναμενόμενα Αποτελέσματα:

Αναμένουμε ότι τα αποτελέσματα από τη συστηματική μας ανάλυση που θα αφορούν τον ανοσοφαινότυπο και τις λειτουργικές αποκρίσεις των κυττάρων των αεραγωγών και του ρινικού βλεννογόνου θα παράσχουν, για πρώτη φορά, σύμφωνα με τις ως τώρα γνώσεις μας, ένα ολοκληρωμένο τοπίο των ανοσολογικών απαντήσεων τόσο των ασθενών με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα, όσο και των ασθενών με CRSwNP μετά από θεραπεία με μεπολιζουμάμπη ή μπενραλιζουμάμπη (στόχος 1). Πιστεύουμε ότι τα ευρήματά μας από τις CyTOF αναλύσεις θα προσδιορίσουν έναν νέο κρίσιμο ρόλο της IL-5 και του IL-5R στην παθογένεση του ΣΑ και της CRSwNP. Στην πραγματικότητα, πιστεύουμε ότι η αναστολή της σηματοδότησης της IL-5 θα περιορίσει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Αναμένουμε ότι η θεραπεία με μεπολιζουμάμπη και/ή με μπενραλιζουμάμπη θα μειώσει τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως Th2 και Th17 κυττάρων, δένδριτικών κυττάρων, ηωσινόφιλων, μαστοκυττάρων και βασεόφιλων, ίσως με διαφορετικό τρόπο. Επίσης, πιστεύουμε ότι η απελευθέρωση κυτταροκινών και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών στο ρινικό βλεννογόνο και στους αεραγωγούς θα μειωθεί μετά τη χορήγηση anti-IL-5 και/ή anti-IL-5R. Είναι σημαντικό, τέλος, ότι αναμένουμε πως οι βιολογικές θεραπείες θα μειώσουν σημαντικά τα συμπτώματα χρόνιας ρινίτιδας, τη ρινική υπεραντιδραστικότητα μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνα, τους ρινικούς πολύποδες και το ποσοστό παροξύνσεων, ενώ θα βελτιώσουν την πνευμονική λειτουργία, την κατάσταση της υγείας και την ποιότητα ζωής ασθενών με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα.

Ειδικότερα, η ανάπτυξη μιας πιο ολοκληρωμένης σειράς αντιφλεγμονωδών θεραπειών και θεραπειών τροποποίησης της νόσου που ανταποκρίνονται καλύτερα στις ανάγκες του ΣΑ και της CRSwNP μπορεί να εξεταστεί στο εγγύς μέλλον.

Επιπτώσεις:

Συνοψίζοντας τις παραπάνω σκέψεις, είναι πολύ σαφές ότι η IL-5 παίζει κεντρικό ρόλο ως ο πιο σημαντικός παθογόνος μεσολαβητής, υπεύθυνος για το ηωσινοφιλικό άσθμα και την CRSwNP, καθώς και ως κρίσιμος θεραπευτικός στόχος για βιολογικές θεραπείες για το άσθμα. Επί του παρόντος, η έλλειψη προληπτικής, θεραπευτικής και τροποποιητικής διαχείρισης της νόσου για ΣΑ και CRSwNP συνιστά μια σημαντική κλινική ανάγκη που δεν ικανοποιείται, ενώ ο εντοπισμός νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων παραμένει μια διαρκής πρόκληση.

Σχετικά με την επίπτωση σε κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, αναμένουμε ότι αυτή η

πρόταση θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στον τομέα της έρευνας στην πνευμονολογία, δεδομένου ότι απευθύνεται στην επίλυση κρίσιμων ζητημάτων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στους αεραγωγούς των ασθματικών ασθενών. Στην πραγματικότητα, αναμένουμε ότι η επένδυση στον εντοπισμό των μηχανισμών που διέπουν τη σηματοδότηση της IL-5 μπορεί να προωθήσει την έρευνα για το άσθμα και να επιταχύνει την πρόοδο στην πρόληψη και τον έλεγχο του ΣΑ. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχει μια αναδυόμενη ανάγκη για στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε άτομα με άσθμα και CRSwNP, αναμένουμε ότι τα αποτελέσματα από τις προτεινόμενες μελέτες θα επιταχύνουν την πρόοδο προς εξατομικευμένες θεραπείες.

Βιβλιογραφία:

1. Holgate ST, et al. Clin Chest Med. 2019;40(1):227-241.
2. Kuo CS, et al. Eur Respir J. 2017;49(2).
3. Terl M, et al. Allergy 2017;72(9):1279-87.
4. Rodrigo-Munoz JM, et al. Allergy 2019;74(3):507-517.
5. Pearlman AN, et al. Am J Rhinol Allergy 2009;23:145-8.
6. Bachert C, et al. J Allergy Clin Immunol 2001;107:607-14.
7. Bachert C, et al. Curr Allergy Asthma Rep 2010;10:194-201.
8. Gevaert, P, et al. Int. Forum Allergy 2022, 12, 1413–1423.
- 9., Buchheit, K.M, et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2021, 148, 574–584.
10. Gevaert P, et al. J Allergy Clin Immunol 2011;128:989-95.
11. Papi A, et al. Lancet 2017; 391:783-800.
12. Xue L, et al. J Immunol. 2005;175(10):6531-6.
13. Aron JL, Akbari O. Allergy. 2017;72(8):1148-55.
14. Sokolowska M, et al. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(4):1379-83.
15. Sugita K, et al. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(1):300-10 e11.
16. Wawrzyniak P, et al. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(1):93-103.
17. Pavord, I.D, et al. Allergy 2022, 77, 778–797.
18. Pelaia, C, et al. J. Clin. Med. 2023, 12, 3371.
19. Maglio, A, et al. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2455.
20. Pelaia, C, et al. BioMed Res. Int. 2018, 2018, 4839230.
21. Di Bona, D, et al. Clin. Exp. Allergy 2022, 52, 312–323.

Name of PhD Candidate: VLASSI LAMPRINI

**Names of the Committee: (1) ROVINA NIKOLETTA
(2) LOUKIDES STYLIANOS
(3) BAKAKOS PETROS**

Title of research study:

The immunomodulatory and clinical effects of anti-IL-5 (mepolizumab) or anti-IL5R α (benralizumab) treatment on upper and lower respiratory tract in patients with severe eosinophilic asthma and nasal polyps (NP).

Introduction – Aim – Current Knowledge:

Asthma is a chronic heterogeneous lung disease characterized by airway hyperresponsiveness (AHR) to innocuous inhaled allergens and pulmonary inflammation^{1,2}. Asthma encompasses complex and multiple clinical phenotypes that incorporate persistent symptoms and acute exacerbations. Certain asthmatics exhibit severe, sometimes life-threatening, disease exacerbations despite being under treatment^{1,2}. These patients suffer from severe asthma (SA) that is poorly controlled and represents a major health and socio-economic burden. Apart from airway inflammation, SA is characterized by extensive airway remodeling and narrowing, thickened epithelium and fixed airflow obstruction^{1,2}. A subgroup of SA patients, termed T2-high, is characterized by overactive type II immune responses against environmental allergens, increased eosinophilia and high levels of exhaled nitric oxide (FeNO)^{3,4}. Eosinophilic asthma is also characterized by blood eosinophilia (>300 cells/ μ l), associated with tissue and sputum eosinophilia, thickening of the basement membrane zone and often by good response to inhaled corticosteroid therapy^{3,4}.

The association between eosinophilic asthma, chronic rhinosinusitis (CRS), and nasal polyps (NP) is well established. It is estimated that 7% of patients with asthma have CRS with NP (CRSwNP)⁵. Severe eosinophilic asthma, as well as, CRSwNP are associated with increased Th2 cytokine levels, increased expression of the IL-5 receptor (IL-5R), and local production of IgE⁶. Hence, delineation of the pathobiologic mechanisms implicated in type 2 inflammation responsible for asthma and nasal polyposis is essential for the development of more effective therapeutic interventions.

IL-5 is a key factor involved in the chemotaxis, differentiation, activation, and survival of eosinophils, and plays a central role in the pathogenesis of eosinophilic asthma and NP⁶. IL-5 levels have been shown to be increased in NP tissue compared with nasal tissue from healthy individuals, and also correlate with the observed degree of tissue eosinophilia⁷. Moreover, IL-5-dependent eosinophilic inflammation has been shown to significantly correlate with epithelial damage, smell loss, fibroblast activity, collagen production, and the deposition of fibrotic tissue within nasal polyps⁸. Incidentally, it has been shown that molecular antibodies targeting IL-5 are able to interrupt IL-5-mediated intercellular networks involving eosinophils, mast cells, and airway epithelial cells, which result nasal polyp development⁹. High levels of eosinophils, IL-5, and IgE have been shown to be associated with recurrence of NP and need for sinus surgery. Inhibition of IL-5 signaling has, therefore, been identified as a promising therapeutic approach for the treatment of severe eosinophilic asthma, and particularly in the subgroup with concurrent eosinophilic CRSwNP¹⁰. Improvements in the blood and tissue eosinophilia are associated with fewer exacerbations and lower health care costs⁵.

Th2 mediated airway inflammation plays a central role in the pathophysiology of allergic eosinophilic asthma. The allergic sensitization of dendritic cells (DCs) in the presence of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), induces Th2 lymphocytes to produce cytokines such as interleukins IL-4, IL-5, and IL-13, which activate B lymphocytes to produce allergen specific IgE, which binds to the high affinity mast cell receptors, leading to their activation¹¹. In non-allergic eosinophilic asthma airway epithelial damage caused by pollution and pathogens leads to IL-5 and IL-13 production by innate lymphoid cells (ILC2s), in response to TSLP, IL-25 and IL-33¹². ILC2s and Th2 cells are a significant source of type 2 cytokines and play a role in eosinophilic inflammatory response, allergy and remodelling in asthma¹³. Increased circulating and sputum IL-5 and IL-13-producing ILC2s were detected in severe asthma compared to mild asthma patients¹⁴. Furthermore, increased numbers of IL-5+ and IL-13+ ILC2s were found in sputum after allergen challenge in asthma patients¹⁵. IL-13-expressing ILC2 and Th2 cells are also responsible for bronchial epithelial tight junction barrier leakiness in asthma patients¹⁶.

Mepolizumab is a humanized monoclonal IgG1/k antibody that specifically interacts with the α -chain of IL-5, thus inhibiting its binding to the α subunit of the IL-5R α ¹⁷. Several clinical trials, including the DREAM, MENSA and SIRIUS studies, demonstrated that, in patients with severe eosinophilic asthma, mepolizumab diminished disease exacerbations and improved quality of life, symptom control, and pulmonary function¹⁸. All findings exhibited that mepolizumab is effective in both allergic and non-allergic patients, improves lung function at the level of large and small airways, and can induce asthma remission¹⁹. However, detailed changes to the immunological landscape has not been described in severe eosinophilic asthma during anti-IL-5 therapy, and especially in the phenotype associated with CRSwNP.

Benralizumab is humanized and afucosylated IgG1/k monoclonal antibody benralizumab applies its Fab portions to occupy and blockade IL-5R α , consequently inhibiting the interaction between this receptor subunit and the natural ligand IL-5²⁰. Benralizumab has been extensively evaluated within the context of a wide program of clinical trials named WINDWARD, which exhibited that this biologic drug significantly decreased the number of exacerbations of severe eosinophilic asthma, and had a positive impact on symptom control and lung function¹⁸. Also, benralizumab has been characterized as a monoclonal antibody capable of depleting blood eosinophils, reducing asthma exacerbations and OCS intake, relieving symptoms, and also improving airflow limitation and alveolar air trapping¹⁸.

Our aims are: (1) to delineate the immunological changes that occur in the airways and in the nasal of severe eosinophilic asthma with and without concomitant CRSwNP in response to treatment with anti-IL-5 or anti-IL-5R α therapy with mepolizumab or benralizumab, respectively, and to compare the differences between the different therapeutic protocols, and (2) to explore possible correlations with clinical and immunological disease parameters.

Hypothesis:

We hypothesize that mepolizumab and benralizumab will significantly enhance the immunoregulatory mechanisms in patients with severe eosinophilic asthma and in CRSwNP patients.

So, we want to decipher the molecular signature and effector properties of the IL-5-responsive immune cells severe eosinophilic asthma and in CRSwNP patients and to compare the different therapeutic processes.

Subjects:

We aim to assemble a cohort including patients with severe eosinophilic asthma and patients with severe eosinophilic asthma and NPs (GINA 2018) (38) and ERS/ATS (39). All patients participating in the study have to fulfil the criteria for treatment with mepolizumab or benralizumab. The treatment will be allocated by a specialized in asthma respiratory physician according to the guidelines. Patients will be followed-up for at least one year of treatment.

Nasal and bronchial biopsies, nasal irrigation, bronchoalveolar lavage (BAL) and serum will be collected and stored for further analyses.

All patients will be informed and will sign a consent form. Patients will undergo the assessment of severe eosinophilic asthma as recommended by guidelines. The study has already got approval by the Ethics Committee of "Sotiria" Hospital.

Methods:

Aim 1. To delineate the immunological changes that occur in the airways and in the nasal of severe eosinophilic asthma with and without concomitant CRSwNP in response to treatment with anti-IL-5 or anti-IL-5R α therapy with mepolizumab or benralizumab, respectively, and to compare the differences between the different therapeutic protocols.

In the proposed studies, we will utilize nasal and bronchial biopsies for immunofluorescence staining, prior and after the treatment with mepolizumab or benralizumab respectively, in patients with eosinophilic asthma with or without NPs. Nasal irrigation cells and bal cells will be subjected to multicolor flow cytometry. DCs will be identified as CD45+HLA-DR+CD11c+ cells. Monocytes/macrophages will be identified as CD45+CD14+, neutrophils as CD45+CD15+CD16+, eosinophils as CD45+CD15+Siglec-8+, T lymphocytes as CD45+CD3+, mast cells as CD45+Fc ϵ RI α + cells and basophils as CD45+CD123+HLA-DR- cells. Data will be acquired on FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo.

Nasal irrigation cells and bal cells we will also characterize using CyTOF. This advanced mass cytometry technique measures simultaneously over 45 proteins at a single-cell resolution and combined with advanced clustering techniques allows the analysis of leukocyte heterogeneity. Metal ion-conjugated antibodies will be targeting extracellular markers (i.e. CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD27, CD38, CD45, CD61, CD66, CD123, CD235a/b, HLA-DR) in order to identify all major peripheral blood cellular subsets, including granulocytes, basophils, plasmacytoid dendritic cells, natural killer cells, effector T killer cells, naïve T killer cells, activated T killer cells, memory T killer cells, effector T helper cells, naïve T helper cells, activated T helper cells, memory T helper cells, memory B cells, naïve B cells, plasma B cells, myeloid dendritic cells, noncanonical monocytes, canonical monocytes, and platelets. In addition will be used maturation markers (i.e. CD11b, CD10, CD15, CD124/IL-4R, CD45RA, CD45RO), activation markers (e.g. CD66b, CD16, CD11b, CD62L, CD54/ICAM-1, CD63, CD274/PD-L1, HLA-DR), functional markers (e.g. Arg1, FoxP3, NOS), chemokine receptors (e.g. CXCR2, CXCR4, CXCR3, CXCR5) and cytokine expression (e.g. IL-4, IL-17, IL-13, IL-6, TGF- β 1, IL-10, TNF- α). To gain functional information about cell subpopulations, we will employ data-driven techniques for clustering and dimensionality

reduction, such as, FlowSOM, to generate unsupervised self-organizing maps. Comprehensive analyses of the large data sets that will be generated through the proposed studies will be performed through advanced mathematical models and bioinformatics with the help of the BRFAA bioinformatics department.

In addition, the cytokine profile will be determined in the nasal irrigation, bal and serum using elisa.

Aim 2. To explore possible correlations between our findings and clinical and immunological disease parameters.

The possible correlations between the metabolite profiles of asthmatic patients with clinical parameters (i.e. lung function, FeNO, Pulmonary function parameters (FEV1, FVC, MEF50, MEF25), impulse oscillometry (respiratory reactance, increased peripheral resistance etc.), biomarkers, ACT and SNOT scores) will be investigated. Analyses of the large data sets that will be generated through the proposed studies will be performed through advanced mathematical models and bioinformatics.

Statistical analyses: The results will be analyzed using non-paired and paired, parametric and non-parametric tests according to the normality of the data (GraphPad Prism).

Expected Results:

We expect that results from our systematic analysis of the immunophenotype and functional responses of airway and nasal cells will provide, for the first time to our knowledge, a comprehensive landscape of human immune responses in severe eosinophilic asthma and in CRSwNP patients after treatment with mepolizumab or benralizumab (aim 1). We believe that our findings from the CyTOF analyses will identify a novel crucial role for IL-5 and IL-5R in the pathogenesis of SA and in CRSwNP. In fact, we believe that inhibition of IL-5 signalling will restraint inflammatory responses. We expect that mepolizumab and/or benralizumab treatment will reduce the recruitment and activation of inflammatory cells, such as Th2, Th17, DCs, eosinophils, mast cells, basophils maybe through different way. Also, we believe that the release of cytokines and other inflammatory mediators in the nasal and in the airways will be decreased in after IL-5 and/or IL-5R administration. Importantly, we anticipate that biological therapies will significantly reduce chronic rhinitic symptoms, nasal hyperresponsiveness to allergen provocation, nasal polyps, exacerbation rate, pulmonary function, health status and quality of life of patients with severe eosinophilic asthma.

Notably, the development of a more comprehensive array of anti-inflammatory, disease modifying therapies that better address the needs of SA and of CRSwNP may be envisaged in the near future.

Implications:

Taking together the above considerations, it is very clear that IL-5 plays a central role as the most important pathogenic mediator responsible for eosinophilic asthma and CRSwNP, as well as a crucial therapeutic target for anti-asthma biological treatments. At present, the lack of preventative, curative and disease modifying management for SA and CRSwNP constitutes a major unmet clinical need, while identification of new therapeutic approaches remains an ongoing challenge.

Pertinent to the socio-economical impact, we expect that this proposal will have a major impact in the field

of respiratory medicine research as it addresses critical issues pertinent to inflammatory response modulation in the airways of asthmatics. In fact, we anticipate that investment in the identification of the mechanisms underlying IL-5 signaling may drive forward asthma research and hasten progress in preventing, and controlling SA. Moreover, considering that there is an emerging need for targeted treatment approaches in asthmatic and CRSwNP individuals, we expect that results from the proposed studies will accelerate progress towards personalized treatments.

References:

1. Holgate ST. et al. Clin Chest Med. 2019;40(1):227-241.
2. Kuo CS. et al. Eur Respir J. 2017;49(2).
3. Terl M, et al. Allergy 2017;72(9):1279-87.
4. Rodrigo-Munoz JM, et al. Allergy 2019;74(3):507-517.
5. Pearlman AN, et al. Am J Rhinol Allergy 2009;23:145-8.
6. Bachert C, et al. J Allergy ClinImmunol 2001;107:607-14.
7. Bachert C, et al. Curr Allergy Asthma Rep 2010;10:194-201.
8. Gevaert, P, et al. Int. Forum Allergy 2022, 12, 1413–1423.
- 9., Buchheit, K.M, et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2021, 148, 574–584.
10. Gevaert P, et al. J Allergy ClinImmunol 2011;128:989-95.
11. Papi A, et al. Lancet 2017; 391:783-800.
12. Xue L, et al. J Immunol. 2005;175(10):6531-6.
13. Aron JL, Akbari O. Allergy. 2017;72(8):1148-55.
14. Sokolowska M, et al. J Allergy ClinImmunol. 2017;139(4):1379-83.
15. Sugita K, et al. J AllergyClinImmunol. 2018;141(1):300-10 e11.
16. Wawrzyniak P, et al. J AllergyClinImmunol. 2017;139(1):93-103.
17. Pavord, I.D, et al. Allergy 2022, 77, 778–797.
18. Pelaia, C, et al. J. Clin. Med. 2023, 12, 3371.
19. Maglio, A, et al. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2455.
20. Pelaia, C, et al. BioMed Res. Int. 2018, 2018, 4839230.
21. Di Bona, D, et al. Clin. Exp. Allergy 2022, 52, 312–323.