

Πρωτόκολλο έρευνας διδακτορικής διατριβής με τίτλο: Η ΑΝΟΣΟΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ BENRALIZUMAB ΣΤΟ ΣΟΒΑΡΟ ΑΣΘΜΑ

Υποψήφια διδάκτωρ: ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

Τριμελής επιτροπή: 1) ΜΠΑΚΑΚΟΣ ΠΕΤΡΟΣ (επιβέπων), 2) ΚΟΥΛΟΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, 3) ΡΟΒΙΝΑ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

Εισαγωγή

Το άσθμα είναι μια συχνή, χρόνια αναπνευστική νόσος που επηρεάζει το 1-18% του πληθυσμού σε διάφορες χώρες. Χαρακτηρίζεται, συνήθως, από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών με διαφόρου βαθμού απόφραξη στη ροή του αέρα, που οδηγούν στην ύπαρξη αναπνευστικών συμπτωμάτων, όπως ο συριγμός, η δυσκολία στην αναπνοή, το βάρος στο στήθος και ο βήχας, τα οποία ποικίλουν ως προς την ένταση και τη συχνότητα εμφάνισης.

Η Th2 μεσολαβούμενη φλεγμονή των αεραγωγών αποτελεί κεντρικό μηχανισμό της νόσου στους ασθενείς με σοβαρό αλλεργικό άσθμα. Αρχικά, τα ευαισθητοποιημένα από το αλλεργιογόνο δενδριτικά κύτταρα (DCs) διεγείρονται, παρουσία συνενεργοποιητών, όπως η προερχόμενη από επιθήλιο του στρώματος του θύμου λεμφοποιητίνη (TSLP), και προκαλούν διαφοροποίηση των Th σε τύπου 2 T λεμφοκύτταρα (Th2), τα οποία παράγουν κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνη-5 (IL-5), -4 (IL-4) και -13 (IL-13).

Βασικός είναι ο ρόλος της IL-5, μιας κυτταροκίνης υπεύθυνης για την επιβίωση και την ωρίμανση των ηωσινοφίλων. Η πρόσληψη ηωσινοφίλων στον βλεννογόνο προάγεται από χημειοκίνες, όπως εοταξίνη 1, 2, 3 (CCL11, CCL24 και CCL26 αντίστοιχα) μέσω των υποδοχέων τους (chemokine receptor 3, CCR3) και από άλλους χημειοελκυστικούς παράγοντες, όπως η προσταγλανδίνη D2 που προέρχεται από τα μαστοκύτταρα. Επιπλέον, οι IL-4 και IL-13 ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα και παράγουν IgE ειδική για το αλλεργιογόνο, η οποία συνδέεται με τους υψηλής συγγένειας υποδοχείς IgE στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων, οδηγώντας στην ενεργοποίηση τους. Στο μη αλλεργικό ηωσινοφιλικό άσθμα, η προερχόμενη από ρύπους και μικρόβια βλάβη του επιθηλίου των αεραγωγών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιντερλευκίνης-5 και -13 από τα λεμφοκύτταρα (γνωστά ως ILCs - innate lymphoid cells), ως απάντηση στην προσταγλανδίνη D2 και στις προερχόμενες από επιθήλιο λεμφοποιητίνη (TSLP), ιντερλευκίνη-33 (IL-33) και -25 (IL-25).

Στο σοβαρό άσθμα παρατηρείται παράλληλα με την χρόνια φλεγμονή και αλλαγή των χαρακτήρων της δομής των βρόγχων, φαινόμενο που ονομάζεται ιστική αναδόμηση (tissue remodeling), το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε σταθερή απόφραξη των αεραγωγών και μη ανταπόκριση στη θεραπεία. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή του επιθηλίου των βρόγχων, υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, νεοαγγειογένεση, πάχυνση του τοιχώματος βασικής μεμβράνης και υποεπιθηλιακή ίνωση. Φαίνεται ότι η ύπαρξη χρόνιας επίμονης φλεγμονής, καθώς και η πληθώρα κυτταροκινών (IL-5, IL-9, IL-13, όπως και άλλων τύπου 2 κυτταροκινών π.χ. οστεοποντίνη, αντιβίνη-A), χημειοκινών (CCR3 εξαρτώμενες) και αυξητικών παραγόντων (TGF-β1, VEGF) που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη και δομικά κύτταρα, παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών.

Στο επίπεδο της IL-5 δρα το benralizumab, ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα, το οποίο στοχεύει την άλφα-αλυσίδα του υποδοχέα της IL-5 (anti-IL-5Ra) παρεμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση του καταρράκτη φλεγμονής, που κανονικά ενεργοποιείται ως αποτέλεσμα ειδικής αλληλεπίδρασης IL-5 και υποδοχέα. Το αποτέλεσμα είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των προδρόμων ηωσινοφιλικών κυττάρων στο μυελό των οστών, καθώς και της μετανάστευσης και ενεργοποίησης αυτών στις θέσεις φλεγμονής. Επιπλέον προάγει την απόπτωση των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό (ηωσινοφίλων κυρίως, αλλά και βασεόφιλων), μέσω κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενης από αντίσωμα.

Υπόθεση της μελέτης

Το Benralizumab θα ενισχύσει σημαντικά τους μηχανισμούς ανοσορύθμισης σε ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα. Συγκεκριμένα:

- α) θα ελαττώσει την προσέλκυση και την υπέρμετρη ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυτταρικών πληθυσμών (Th2, Th17, DCs, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα)
- β) θα αυξήσει την επαγωγή Tregs και άλλων ρυθμιστικών κυτταροκινών (IL-10, TGF-β1, ακτιβίνη-A) στο περιφερικό αίμα και στο βρογχικό ιστό ασθενών με σοβαρό άσθμα
- γ) θα ελαττώσει την εμφάνιση χαρακτηριστικών ιστικής αναδόμησης στους αεραγωγούς των ασθενών με σοβαρό άσθμα
- δ) θα μειώσει σημαντικά τη συχνότητα των παροξύνσεων και επίσης θα βελτιώσει τις σπироμετρικές παραμέτρους, τον έλεγχο της νόσου και την ποιότητα ζωής των ασθενών

Στόχος της μελέτης

1) Η διερεύνηση του ρόλου του Benralizumab στην ενίσχυση ανοσορυθμιστικών μηχανισμών στην περιφέρεια και στους αεραγωγούς ασθενών με σοβαρό άσθμα

α) Μελέτη της επίδρασης του Benralizumab στην προσέλκυση και ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων (και υποπληθυσμούς αυτών) και δενδριτικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, BAL και στο βρογχικό ιστό των ασθενών. Θα μελετηθούν, επίσης, διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στη μη-ειδική φλεγμονή (ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, κλπ) στο BAL και στο βρογχικό ιστό ασθενών.

β) Μελέτη της επίδρασης του Benralizumab στην έκφραση κυτταροκινών (π.χ. IL-5, IL-4, IL-13) και χημειοκινών (CC11, CC24 και CC24) στο περιφερικό αίμα και στο BAL των ασθενών.

2) Η μελέτη της επίδρασης του Benralizumab στην παρεμπόδιση της ιστικής αναδόμησης των αεραγωγών ασθενών με σοβαρό άσθμα

α) Μελέτη της επίδρασης του Benralizumab σε δείκτες ιστικής αναδόμησης (πάχυνση βασικής μεμβράνης, εναπόθεση κολλαγόνου, αύξηση λείων μυϊκών κυττάρων, αγγειογένεση, υπερπλασία καλυκοειδών κυττάρων) στο βρογχικό ιστό ασθενών και στην έκφραση αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών που συμμετέχουν στην ιστική αναδόμηση (VEGF, TGF-β1, οστεοποντίνη, ακτιβίνη-A) στο BAL και στο βρογχικό ιστό ασθενών.

3) Η μελέτη της επίδρασης του Benralizumab στην απάντηση του ανοσοποιητικού μηχανισμού σε λοιμώξεις σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα

α) Μελέτη της επίδρασης του Benralizumab στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος (inflammasome) με απότοκο μειωμένη ενεργοποίηση και λειτουργικότητα (χημειοταξία, φαγοκυτταρική ικανότητα) των περιφερικών (αίμα και BAL) και ιστικών μακροφάγων.

4) Συσχέτιση των παραπάνω παραμέτρων με κλινικά και σπιρομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών και το βαθμό ανταπόκρισης στη θεραπευτική παρέμβαση με Benralizumab.

Μεθοδολογία της μελέτης

Θα συμμετάσχουν 20 ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό άσθμα, όπως αυτό ορίζεται κατά GINA 2018 και ERS/ATS. Όλοι οι ασθενείς θα τηρούν τα κριτήρια ένταξης σε αγωγή με Benralizumab και η χορήγηση του φαρμάκου θα γίνει μετά από απόφαση των θεραπόντων ιατρών σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη θα έχουν ενημερωθεί επ' αυτής και θα έχουν υπογράψει έντυπο συγκατάθεσης. Ο έλεγχος στον οποίο θα υποβληθούν περιλαμβάνει εξετάσεις που

γίνονται σε όλους τους ασθενείς με σοβαρό ηωσινοφιλικό βρογχικό άσθμα, πριν και κατά τη διάρκεια χορήγησης αγωγής με Benralizumab, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες και το υπάρχον διαγνωστικό και θεραπευτικό πρωτόκολλο της 7^{ης} Πνευμονολογικής Κλινικής και του Κέντρου Άσθματος. Οι εξετάσεις που θα πραγματοποιούνται στους ασθενείς σε κάθε επίσκεψη περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα ροής της μελέτης:

ΕΠΙΣΚΕΨΗ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Χρόνος επισκέψεως	N/A	N/A	0	4w	8w	16w	24w	32w	40w	48w	49-52w
Ιστορικό	X										
Φυσική εξέταση	X	X		X	X	X	X	X	X	X	
Λήψη αίματος	X	X		X		X		X		X	X
Σπιρομέτρηση	X			X		X		X		X	
Ελεγχος ατοπίας (SPTs, RAST ή IgE)	X										
Βρογχοσκόπηση		X									X
Χορήγηση Benralizumab			X	X	X	X	X	X	X	X	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018. Available from: www.ginasthma.org
- Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet* 2017; 391:783-800
- Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol* 2015; 16:45–56.
- James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:1–6.
- Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:477–486.
- Samitas K, Carter A, Kariyawasam HH, Xanthou G. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy* 2018; 73(5):993-1002
- Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:676–680.
- Kolbeck R, Kozhich A, Koike M, et al. MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor α mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:1344–1353.
- Antoniou SA. Benralizumab as a potential treatment of asthma. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Jul; 17(7):895-900.

PhD thesis protocol entitled: THE IMMUNE-REGULATORY EFFECT OF BENRALIZUMAB IN SEVERE ASTHMA

PhD candidate: KONTOGIANNI CHRYSOULA

Three-member committee: 1) BAKAKOS PETROS (supervisor), 2) KOULOURIS NIKOLAOS, 3) ROVINA NIKOLETTA

Introduction

Asthma is a common, chronic respiratory disease that affects 1-18% of the population in different countries. It is usually characterized by chronic airway inflammation with variable expiratory airflow limitation leading to respiratory symptoms such as wheezing, shortness of breath, chest tightness and cough that vary over time and in intensity.

Type 2 mediated airway inflammation is a central mechanism of the disease in patients with severe allergic asthma. Following allergic sensitization and consequent stimulation by dendritic cells in the presence of coactivators such as epithelium-derived thymic stromal lymphopoietin (TSLP), adaptive T helper 2 cells produce cytokines, such as interleukin-5 (IL-5), -4 (IL-4), and -13 (IL-13).

Interleukin-5 is an obligate cytokine for the survival and maturation of eosinophils. Recruitment of eosinophils to the lung mucosa is mediated via C-C motif chemokine receptor 3 chemokines and other eosinophil chemoattractants, such as mast cell-derived prostaglandin D₂. In non-allergic eosinophilic asthma, innate lymphoid cells produce interleukin-5 and interleukin-13 in response to prostaglandin D₂ and epithelium-derived alarmins interleukin-33, interleukin-25, and thymic stromal lymphopoietin released after epithelial damage by pollutants and microbes.

In severe asthma occur airway structural alterations along with chronic inflammation, which called tissue remodeling and can lead to irreversible airflow obstruction and non-response to treatment. It is characterized by damage of bronchial epithelium, smooth muscle hypertrophy/hyperplasia, increased angiogenesis, reticular basement membrane thickness and subepithelial fibrosis. Chronic inflammation and cytokines (IL-5, IL-9, IL-13, such as other type 2 cytokines, e.g. osteopontin, antiviral-A), chemokines (CCR3 dependent), and growth factors (TGF- β 1, VEGF) released from inflammatory and structural cells in the airway are considered to play a pivotal role in the development of airway remodeling.

Benralizumab, a humanized monoclonal antibody, is able to bind to the IL-5 receptor α chain (anti-IL-5Ra) thus interfering with the downstream signaling pathway normally activated as a result of specific IL-5/receptor interaction. The result is an inhibition of proliferation and maturation of eosinophil cells precursors in bone marrow and of the migration and activation of the mature cells at the sites of inflammation. In addition, induces apoptosis of the cells expressing this receptor (both eosinophils and basophils) through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

Research hypothesis

Benralizumab will significantly enhance immunomodulation mechanisms in patients with severe eosinophilic asthma. Specifically, Benralizumab:

- a) will reduce attraction and excessive activation of inflammatory cell populations (Th2, Th17, DCs, eosinophils, basophils, mast cells)
- b) will increase the induction of Tregs and other regulatory cytokines (IL-10, TGF- β 1, activin-A) in peripheral blood and bronchial tissue of patients with severe asthma
- c) will reduce the development of tissue remodeling in the airways of patients with severe asthma
- d) will reduce the frequency of exacerbations and will improve the spirometry parameters, disease control and the quality of life of patients

Goals

1) Investigating the role of Benralizumab in enhancing immunoregulatory mechanisms in the peripheral blood and the airways of patients with severe asthma

- a) Study of the effect of Benralizumab on the attraction and activation of T lymphocytes (and their subpopulations) and dendritic cells in peripheral blood, BAL and bronchial tissue of patients. Various cell populations involved in non-specific inflammation will also be studied (eosinophils, mast cells, basophils, neutrophils, etc.) in BAL and bronchial tissue of patients.
- b) Study of the effect of Benralizumab on cytokine (e.g., IL-5, IL-4, IL-13) and chemokine (CC11, CC24 and CC24) expression in peripheral blood and BAL of patients.

2) Investigating the effect of Benralizumab on the inhibition of airway remodeling of patients with severe asthma

- a) Study of the effect of Benralizumab on tissue remodeling markers (basal membrane thickening, collagen deposition, smooth muscle hypertrophy, angiogenesis, calicoid cell hyperplasia) in patients' bronchial tissue and in the expression of growth factors and cytokines involved in tissue remodeling (VEGF, TGF- β 1, osteopontin, activin -A) in BAL and bronchial tissue of patients.

3) Investigating the effect of Benralizumab on the response of the immune mechanism to infections in patients with severe asthma

- a) Study of the effect of Benralizumab on the activation of the NLRP3 inflammasome resulting in reduced activation and functionality (chemotaxis, phagocytic ability) of peripheral (blood and BAL) and tissue macrophages.

4) Correlation of the above parameters with clinical and spirometry characteristics of patients and the response to treatment with Benralizumab.

Methods

Twenty patients with severe eosinophilic asthma, as defined by GINA 2018 and ERS/ATS, will participate. All patients will adhere to the Benralizumab treatment criteria and the drug will be given after the doctors' decision according to the latest guidelines. All participants in the study will be informed and will have signed a consent form. The investigations that will be performed include examinations which are performed on all patients with severe eosinophilic bronchial asthma prior to and during treatment with Benralizumab in accordance with the international guidelines and the existing diagnostic and therapeutic protocol of the 7th Pulmonary Clinic and the Asthma Center. The examinations that will be performed on patients at each visit are described in the study flow chart below:

[illegible]