

**Immunologisch-klinische Effekte eines IL-4R α
Antikörpers vs. allergen-spezifischer Immuntherapie
bei Atopischer Dermatitis mit allergischer Rhinitis**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anne-Sophie Layritz

aus Schwerin

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Univ.- Prof. Dr. med. Natalija Novak
2. Gutachter: PD Dr. Süleyman Tolga Yavuz

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.11.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Prof. h. c. Thomas Bieber

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung.....	7
1.1.1	Atopische Dermatitis.....	7
1.1.2	Basophile Granulozyten.....	9
1.1.2.1	Aktivitätsmessung basophiler Granulozyten.....	10
1.1.3	Immunglobulin E.....	11
1.1.4	Allergische Rhinokonjunktivitis.....	12
1.1.5	Herleitung der Fragestellung.....	13
1.2	Material und Methoden.....	15
1.2.1	Studiendesign und Studienpopulation.....	15
1.2.2	Blutuntersuchungen.....	18
1.2.2.1	IgE Bestimmungen.....	18
1.2.2.2	Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT).....	19
1.2.3	Dermatology Life Quality Index (DLQI).....	23
1.2.4	Rhinitis Control Assessment Test (RCAT).....	23
1.2.5	Eczema Area Severity Index (EASI).....	24
1.2.6	Statistische Auswertung.....	24
1.3.	Ergebnisse.....	25
1.3.1	Gesamt-IgE und spezifisches IgE.....	25
1.3.1.1	Gesamt-IgE.....	25
1.3.1.2	Spezifisches IgE.....	25
1.3.2	Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT).....	26
1.3.3	ARC Symptomatik	30
1.4.	Diskussion.....	30
1.4.1	Immunglobulin E (IgE).....	30
1.4.2	Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT).....	32
1.4.3	ARC Symptomatik	35
1.4.4	Stärken und Schwächen.....	36
1.4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	37

1.5	Zusammenfassung.....	37
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung.....	39
2.	Veröffentlichung.....	55
	Abstract.....	55
	Introduction.....	56
	Material and Methods.....	57
	Results.....	60
	Discussion.....	69
	References.....	71
3.	Danksagung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
AIT	allergen-spezifische Immuntherapie
Anti-CD203c	anti-Cluster of Differentiation 203c
ARC	allergische Rhinokonjunktivitis
B-Zellen	B-Lymphozyten
BAT	Basophilen-Aktivierungs-Test
CCR3	C-C Chemokine Rezeptor Typ 3
CD	Cluster of Differentiation
CD-Sens	Basophilen-Sensitivität
DLQI	Dermatology Life Quality Index
EASI	Eczema Area Severity Index
EC-50	effektive Konzentration/Dosierung bei 50 %-iger Basophilenreaktivität
ECLIA	Elektrochemilumineszenzimmunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcεRI	Fc-epsilon-Rezeptor-1-alpha
FEIA	Fluoreszenzenzymimmunoassay
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
g	Gravidität
IgE	Immunglobulin E
IgG4	Immunglobulin G4
IL	Interleukin(e)
IL-4Rα Antikörper	Interleukin-4-Rezeptor-alpha-Antikörper
IQR	Inter-Quartile-Range
JAK-1	Januskinase-1
MD	Median
n	Stichprobenanzahl
ns	nicht signifikant

p	Signifikanzwert
RCAT	Rhinitis Control Assessment Test
rBet v1	Birke (<i>Betula verrucosa</i>), Allergen 1, rekombinant
rPhl p1	Lieschgras (<i>Phleum pratense</i>), Allergen1, rekombinant
rPhl p5	Lieschgras (<i>Phleum pratense</i>), Allergen 5, rekombinant
SCIT	subkutane Immuntherapie
slgE	spezifisches Immunglobulin E
SLIT	sublinguale Immuntherapie
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T-Zellen	T-Lymphozyten
Th2	T-Helferzellen Typ 2
Tregs	regulatorische T-Zellen
w0	0 Wochen = vor Therapiestart
w4	4 Wochen nach Therapiestart
w16	16 Wochen nach Therapiestart

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD), auch Neurodermitis genannt, ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen (Torres et al., 2019). Weltweit sind etwa 15 % – 20 % der Kinder und 2 % – 10 % aller Erwachsenen betroffen (Avena-Woods, 2017; Eyerich und Novak, 2013; Nutten, 2015; Torres et al., 2019).

Klinisch ist die AD durch trockene, schuppige Haut mit entzündlichen Erythemen, Lichenifikationen, Juckreiz und Erosionen bis hin zu viralen und bakteriellen Superinfektionen charakterisiert (Avena-Woods, 2017; Eyerich und Novak, 2013; Nutten, 2015; Torres et al., 2019). Zusätzlich geben Patient*innen häufig Einschränkungen ihrer Lebensqualität im Alltag und starke psychische Belastungen an (Avena-Woods, 2017; Eyerich und Novak, 2013; Torres et al., 2019).

Akute Entzündungsschübe einer AD sind unter anderem durch eine hohe Expression von Zytokinen (z. B Interleukine) gekennzeichnet (Eshtiaghi und Gooderham, 2018; Eyerich und Novak, 2017; Novak und Bieber, 2004; Torres et al., 2019). Bei allergischen Entzündungsreaktionen spielen insbesondere Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) eine wichtige Rolle. Über diese Interleukine wird neben der Th2-Zelldifferenzierung (aus naiven CD4⁺T-Zellen werden Th2-Zellen), auch die Produktion von Immunglobulin E (IgE) in B-Zellen induziert, als auch Mastzellen aktiviert (Gibbs et al., 2005; Ilkka, 2018; Miyake et al., 2021; Sokol und Medzhitov, 2010). IL-4 und IL-13 werden von basophilen Granulozyten, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und T-Zellen produziert.

Das Wissen um die Bedeutung und Funktionsweise von IL-4 und IL-13 wird heute in Form von monoklonalen Rezeptorantikörpern therapeutisch genutzt.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die allgemeinen Therapieoptionen der AD kurz erläutert und ein für schwere AD Formen zugelassener monoklonaler Interleukin-4-Rezeptor-*alpha*-Antikörper (IL-4R α Antikörper) vorgestellt.

Die Behandlung der AD folgt einem Stufenmodell (Werfel et al., 2008; Werfel et al., 2020), das sich von topischen Behandlungen mit Kortikosteroiden und/oder Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Pimecrolimus) bei leichter bis mäßiger Ausprägung bis hin zu systemischen Therapien (Immunsuppressiva wie z. B. Ciclosporin A und seit 2017 Biologika) bei schweren Krankheitsverläufen erstreckt (Torres et al., 2019; Werfel et al., 2014; Werfel et al., 2020). Zusätzlich kann eine UV-Therapie sinnvoll sein, welche jedoch unter Anwendung von Calcineurininhibitoren und Ciclosporin kontraindiziert ist (Werfel et al., 2008). Da es sich bei der AD um eine schubweise verlaufende chronisch entzündliche Erkrankung handelt, sind langfristige Behandlungen notwendig. Das breite Nebenwirkungsspektrum der ursprünglich zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva (z.B. bei Ciclosporin A: Immunsuppression mit erhöhtem Malignom/Lymphomrisiko, Infektionsrisiken, Nephrotoxizität) limitiert häufig deren langfristige Anwendung bei schweren Verlaufsformen der AD (Blauvelt et al., 2017; Sidbury et al., 2014).

Seit 2017 steht zur Behandlung der moderaten bis schweren therapierefraktären AD ein monoklonaler IL-4R α Antikörper (Dupilumab) zur Verfügung (Eshtiaghi und Gooderham, 2018; Harb und Chatila, 2020; Simpson et al., 2016). Dieser Antikörper ist das erste Präparat aus der Gruppe der Biologicals, welches für die Therapie moderater bis schwerer AD Formen zugelassen worden ist. Die Zulassung hat neue Möglichkeiten einer suffizienten und gleichzeitig sichereren (Langzeit)Behandlung schwerer AD Formen eröffnet (Bachert et al., 2019; Blauvelt et al., 2017; Paller et al., 2020).

In bisherigen Studien haben sich eine gesicherte Wirksamkeit als auch eine gute Verträglichkeit mit geringem Nebenwirkungsspektrum verglichen mit den bisherigen immunsuppressiven Therapien gezeigt (Bachert et al., 2019; Blauvelt et al., 2017; Paller et al., 2020). Die Anwendung des monoklonalen IL-4R α Antikörpers erfolgt subkutan alle

2 Wochen und wird von den Patient*innen bei guter Verträglichkeit im weiteren Verlauf selbstständig durchgeführt. Als Standarddosis für Erwachsene sind 300 mg/Injektion empfohlen (Werfel et al., 2020). Mittlerweile ist der IL-4R α Antikörper auch zur Asthma bronchiale Behandlung (Castro et al., 2018) sowie zur Therapie der chronischen Sinusitis mit Polyposis nasi (Bachert et al., 2019) und der eosinophilen Ösophagitis (Dellon et al., 2022) zugelassen.

Der Wirkmechanismus des IL-4R α Antikörpers beruht nach derzeitigem Erkenntnisstand zusammenfassend darauf, dass IL-4 und IL-13 nicht mehr an ihre spezifischen Rezeptoren binden können. Dadurch, dass sich die Rezeptoruntereinheiten nicht zusammenlagern, wird die Entzündungsreaktion über den JAK-STAT-Weg unterbrochen. Klinisch verbessern sich das Hautbild und die Lebensqualität der Patient*innen maßgeblich (Eshtiaghi und Gooderham, 2018; Harb und Chatila, 2020; Simpson et al., 2016).

Mittlerweile sind weitere Biologicals entwickelt worden, die an anderen Stellen der Entzündungskaskade ansetzen (JAK-Inhibitoren, IL-13-Inhibitor) (Gonçalves et al., 2021; Klein et al., 2022).

In der hier vorliegenden Arbeit sind die immunologisch-klinischen Effekte des monoklonalen IL-4R α Antikörpers (Dupilumab) untersucht worden.

1.1.2 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten stellen mit weniger als 1 % die kleinste Zellpopulation unter den Lymphozyten dar (Miyake et al., 2021). Sie zirkulieren permanent im peripheren Blut, wodurch sie gut zu detektieren sind. Basophile Granulozyten können IgE-abhängig und IgE-unabhängig aktiviert werden (Caughey, 2009; Metz et al., 2013).

Die IgE-abhängige Aktivierung läuft über den IgE Rezeptor *Fc-epsilon-Rezeptor-1-alpha* (Fc ϵ RI), welcher als Tetramer, bestehend aus einer α -Kette, einer β -Kette und zwei γ -

Ketten auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert wird (Caughey, 2009; Metz et al., 2013). Sowohl in vivo, als auch in vitro besteht eine positive Korrelation zwischen der IgE Konzentration und der Expressivität des FcεRI, d.h bei niedrigen IgE Konzentrationen wird der IgE Rezeptor herunterreguliert und bei hohen IgE Konzentrationen findet eine Hochregulation statt (Caughey, 2009; Metz et al., 2013).

Basophile Granulozyten produzieren nach IgE-abhängiger Aktivierung Zytokine wie IL-4 und IL-13, über welche sie eine Th2-Zelldifferenzierung sowie die IgE Antikörperproduktion in B-Zellen induzieren und so grundlegend zu allergischen Reaktionsmechanismen beitragen (Gibbs, 2005; Schroeder et al., 2001; Sokol und Medzhitov, 2010; Miyake et al., 2021; Ying et al., 1997).

Die IgE-unabhängige Aktivierung basophiler Granulozyten und Mastzellen wird über zahlreiche biologische Substanzen, wie beispielsweise Neuropeptide, Bakterienbestandteile (Lipopolysaccharide) oder andere Zytokine gesteuert (Caughey, 2009; Metz et al., 2013).

1.1.2.1 Aktivitätsmessung basophiler Granulozyten

Beim Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT) wird die Aktivierung der basophilen Granulozyten über die Detektion von Oberflächenmarkern bestimmt. Die Detektion über die Marker CD203 und CD63 ist als derzeitiges Standardverfahren am besten etabliert. Es stellt ein valides Verfahren zur Bestimmung der Aktivität (CDmax) und die Sensitivität (CD-Sens) basophiler Granulozyten dar (Hoffmann et al., 2015; Patil and Shreffler, 2012; Santos et al., 2015; Santos et al., 2021).

Zur Definition der Begriffe Basophilenaktivität und Basophilensensitivität:

Basophilenaktivität (CDmax): Angabe in % aller gemessenen aktivierten basophilen Granulozyten nach Stimulation (Hoffmann et al., 2015; Patil and Shreffler, 2012; Santos et al., 2015; Santos et al., 2021). In der hier vorliegenden Studie ist für den Parameter

Basophilenaktivität der prozentuale Anteil an aktivierten CD203c+/CD63+ basophilen Granulozyten bestimmt worden.

Basophilensensitivität (CD-Sens; definiert nach Santos et al. (2015)):

$CD-Sens = 1/EC-50 * 100.$

EC-50: mittlere effektive Konzentration = Allergenkonzentration, bei der die Hälfte (50 %) der Basophilenaktivität erreicht ist (Hoffmann et al., 2015; Santos et al., 2015).

Der reziproke Wert des EC-50 multipliziert mit 100 ergibt den Parameter der Basophilensensitivität (Santos et al., 2015).

Zu Beginn des BAT werden die beiden oben genannten Aktivierungswege basophiler Granulozyten mit Hilfe zweier Positivkontrollen überprüft (IgE-abhängig und IgE-unabhängig). Die IgE-abhängige Stimulation erfolgt über den IgE Rezeptor FcεRI und für eine IgE-unabhängige Stimulation wird das bakterielle Tripeptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) genutzt, welches über einen G-Protein-gekoppelten fMLP Rezeptor basophile Granulozyten aktivieren kann (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25; Santos et al., 2021). Der Einsatz der beiden Positivkontrollen erhöht die Effizienz der Bestimmung und ermöglicht ein Nicht-Reagieren basophiler Granulozyten (Non-Responder) aufzudecken. Zeigt eine der beiden Positivkontrollen eine Basophilenaktivierung > 10%, kann das Probenmaterial hinreichend ausgewertet werden (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25).

1.1.3 Immunglobulin E (IgE)

IgE spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung allergischer Erkrankungen, indem es über die Bindung an den IgE spezifischen Rezeptor FcεRI allergische Reaktionswege induziert. Die meisten allergischen Erkrankungen, wie auch die ARC, verlaufen IgE-vermittelt.

Es handelt sich nach der Klassifikation von Coombs und Gell um eine Soforttypreaktion (Typ 1) (Justiz Vaillant et al., 2020; Marwa and Kondamudi, 2021), bei der während einer

Sensibilisierungsphase durch primären Allergenkontakt B-Gedächtniszellen über die IL-4 und IL-13 aktiviert werden und einen Klassenwechsel des spezifischen Immunglobulin G (sIgG) zu spezifischem IgE (sIgE) stattfindet (Eguiluz-Gracia et al., 2019; Fujita et al., 2012; Mortuaire et al., 2017; Simons, 2010; Wheatley und Togias; 2015).

Bei erneutem Allergenkontakt binden Allergene an das sIgE, das an hoch affine Rezeptoren vom FcεRI Typ auf basophilen Granulozyten und Mastzellen gebunden ist (Brehler et al., 2013; Hoyte und Nelson, 2018; Wheatley und Togias; 2015).

Durch die Allergen-IgE-FcεRI-Bindung werden die basophilen Granulozyten aktiviert, setzen Botenstoffe frei (Histamin, Leukotriene) und provozieren typische Allergiesymptome und Entzündungsreaktionen (Fujita et al., 2012; Wheatley und Togias; 2015).

In der Allergiediagnostik werden das Gesamt-IgE und das sIgE bestimmt.

Das Gesamt-IgE wird mittels Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA) gemessen und in IU/ml angegeben. sIgE wird mittels Fluoreszenzenzymimmunoassay (FEIA) bestimmt und in kU/l angegeben.

In der hier vorliegenden Arbeit sind das Gesamt-IgE und die sIgE für Sensibilisierungen gegen Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1 und rPhl p5) untersucht worden.

1.1.4 Allergische Rhinokonjunktivitis (ARC)

Die ARC ist mit den charakteristischen Symptomen Rhinorrhoe, Pruritus, Konjunktivitis und Niesen eine der häufigsten Begleiterkrankungen der AD (Bachert et al., 2006; Brožek et al., 2017; Kowalska-Oledzka et al., 2019; May und Dolen, 2017; Wheatley und Togias, 2015). Die Prävalenz weltweit liegt bei 30 % - 40 % (Bauchau und Durham, 2004; Eichenfield et al., 2014; Kappen et al., 2017; Werfel et al., 2014). Die häufigsten Sensibilisierungen betreffen Gräserpollen (61,5 %) und Baumpollen (41,6 %) (Miguères et al., 2011; Mortuaire et al., 2017). Eine Polysensibilisierung ist bei 73,6 % der ARC Patient*innen nachzuweisen (Miguères et al., 2011; Mortuaire et al., 2017).

Die Behandlung der ARC richtet sich nach dem Schwere- bzw. Ausprägungsgrad der Erkrankung und erstreckt sich von symptomatischen Therapien mit H1-Antihistaminika,

intranasalen Glukokortikoiden und Leukotrien Rezeptor Antagonisten bis hin zum Einsatz systemischer Therapeutika (Brehler et al., 2013; Hoyte und Nelson, 2018; Wheatley und Togias; 2015).

Zur Behandlung ausgeprägter ARC steht die AIT als systemisches Therapieverfahren zur Verfügung. Die AIT kann sowohl subkutan (SCIT) als auch sublingual (SLIT) verabreicht werden und ist bisher das einzige Therapieverfahren zur Behandlung der ARC, das einen modulierenden und präventiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat und die Lebensqualität der Patient*innen verbessert (Bauchau und Durham, 2004; Brehler et al., 2013; Cox et al., 2012; Dhami et al., 2017; Frew et al., 2006; Frølund et al., 2010; Kappen et al., 2017; Moreno-Ancillo et al., 2007; Mortuaire et al., 2017; Novak et al., 2011; Rak et al., 2007; Scadding 2015; Wahn et al., 2019; Walker et al., 2001; Wilson et al., 2005; Zielen et al., 2018).

Das Wirkungsprinzip der AIT beruht zusammenfassend auf einer Aktivierung von Tregs, die über immunsuppressive Zytokine einen Immunswitch in den B-Zellen von IgE zu IgG₄ initiieren und dadurch die allergische Reaktionskaskade unterbrechen (Akdis und Akdis, 2015; Fujita et al., 2012; Kappen et al., 2017; Mortuaire et al., 2017).

1.1.5 Herleitung der Fragestellung

Die AD ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die bereits in der Kindheit auftreten kann und beide Geschlechter gleichermaßen betrifft. Eine häufige Komorbidität stellt die ARC dar, welche mit der AIT langfristig gut therapiert werden kann. Lange Zeit waren die Therapiemöglichkeiten einer ausgeprägten AD begrenzt. Seit 2017 steht ein monoklonaler IL-4R α Antikörper (Dupilumab) zur Verfügung, der in der Behandlung der moderaten bis schweren AD gute Therapieerfolge gezeigt hat.

In bisherigen Studien zum monoklonalen IL-4R α Antikörper ist der Schwerpunkt zunächst auf die klinische Wirksamkeit gelegt worden (Simpson et al., 2016).

Es ist jedoch bisher nicht hinreichend untersucht worden, welche Effekte ein monoklonaler IL-4R α Antikörper auf die Aktivität von Immunzellen hat.

Basophile Granulozyten stellen mit $\leq 1\%$ die kleinste Zellpopulation unter den Lymphozyten dar und sind daher in ihrer Bedeutung für allergische Reaktionsmechanismen lange Zeit unterschätzt worden (Miyake et al., 2021). Mittlerweile ist aber bekannt, dass basophile Granulozyten über ihre IL Produktion (insbesondere IL-4 und IL-13) maßgeblichen Einfluss auf T-Zelldifferenzierung und Antikörperproduktion in B-Zellen und somit auf allergische und entzündliche Prozessen nehmen (Gibbs et al., 2005; Sokol und Medzhitov, 2010; Miyake et al., 2021).

In der hier vorliegenden Arbeit sind prospektiv die Effekte eines monoklonalen IL-4R α Antikörpers auf die *in vitro* Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten und die Entwicklung Gesamt-IgE und sIgE Antikörperkonzentrationen untersucht worden. Ergänzend sind klinische Parameter, inklusive Hautbild, Lebensqualität der Patient*innen und ARC Symptomschwere erhoben und zum Therapiemonitoring und Sicherstellung der Therapieeffektivität herangezogen worden.

Um frühe allergisch-immunologische Mechanismen möglichst ohne äußere Störgrößen untersuchen zu können, ist, wie auch in klinischen Wirksamkeitsstudien des monoklonalen IL-4R α Antikörpers (Simpson et al., 2016), ein Beobachtungszeitraum von 16 Wochen gewählt worden. Die Datenerhebung ist zu den Zeitpunkten vor Therapiebeginn (w0), nach 4 (w4) und nach 16 Wochen (w16) Therapiedauer erfolgt. Gegenüber gestellt worden ist eine Gruppe mit AD Patient*innen und komorbider ARC unter AIT. Die AIT wird zur Behandlung von ARC und Asthma bronchiale eingesetzt. Die Effekte einer AIT auf die Aktivität von basophilen Granulozyten sind bereits gut untersucht worden (Ebo et al., 2007; Feng et al., 2020; Jones et al., 2009; Kim et al., 2011). In der hier vorliegenden Arbeit ist die Patient*innengruppe mit AIT gewählt worden, um eine valide Vergleichs- und Orientierungsgrundlage zu erhalten und die allergisch-immunologischen Effekte eines monoklonalen IL-4R α Antikörpers zu detektieren.

Zusammenfassend ist das Ziel dieser monozentrischen, prospektiven Studie, Effekte eines monoklonalen IL-4R α Antikörpers auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten und die Entwicklung von Gesamt- und sIgE Konzentrationen bei AD Patient*innen mit komorbiden ARC zu untersuchen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Studiendesign und Studienpopulation

Zur Untersuchung der Effekte eines IL-4R α Antikörpers auf die Reaktivität von basophilen Granulozyten und IgE Konzentrationen ist eine monozentrische, prospektive Studie durchgeführt worden.

Die Studie hat einen Zeitraum von zwei Jahren (07/2019 – 07/2021) umfasst.

Erhoben worden sind die Konzentrationen von Gesamt-IgE und sIgE mittels ECLIA und FEIA, als auch die Reaktivität basophiler Granulozyten in vitro mittels BAT.

Zusätzlich sind klinische Parameter (Hautbild mittels Eczema Area and Severity Index (EASI), Lebensqualität mittels Dermatology Life Quality Index (DLQI), ARC Symptomatik basierend auf dem Rhinitis Control Assessment Test (RCAT)) erhoben worden, um die Symptomkontrolle unter IL-4R α Antikörpertherapie und AIT zu dokumentieren, die adäquate Therapieanwendung zu sichern und ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie (sog. Non-Responder) frühzeitig zu entdecken.

Die Patient*innen sind in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikum Bonn rekrutiert und aufgeklärt worden. Alle Patient*innen haben ihr schriftliches Einverständnis vor Beginn der Studie gegeben. Die Studie hat sich an den ethischen Prinzipien der Helsinki Deklaration orientiert und ist von der Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn bewertet worden (Idf. Nummer 267/19).

Die Einschlusskriterien dieser Studie sind folgendermaßen definiert worden:

Alter \geq 18 Jahre, gesicherte und symptomatische AD und ARC, sowie Bereitschaft und Einwilligung zur Studienteilnahme.

Die AD ist auf der Grundlage der Diagnosekriterien nach Hanifin und Rajka (Hanifin und Rajka, 1980) sowie der Diagnosekriterien der UK Working Party (Eichenfield et al., 2014; Williams et al., 1994) gesichert worden. Die Symptomschwere ist anhand des EASI dokumentiert worden.

Für die Diagnosestellung der ARC ist zunächst im Rahmen einer Vorauswahl die Patient*innenanamnese bzw. Erkrankungsgeschichte und die klinische Symptomatik basierend auf dem RCAT (Cut-off-Wert ≤ 17 Punkte) herangezogen worden. Um eine symptomatische ARC zu sichern, sind in einem zweiten Schritt die IgE Laborwerte bestimmt worden (Cut-off-Wert ≥ 5 kU/l) und auf Übereinstimmung mit denen in der Vorauswahl getroffenen Symptomangaben geprüft worden (siehe Tabelle 1 in Layritz, Galicia et al., 2023).

Vor Studienbeginn festgelegte Ausschlusskriterien sind wie folgt definiert worden:

Alter < 18 Jahren, das Vorliegen von malignen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz, schwere chronische Erkrankungen, aktive systemische virale/bakterielle Infektionen, Pilzinfektionen oder Helminthosen, Behandlungen mit immunsuppressiven systemischen Therapien, unzureichende Kontrazeption, Schwangerschaft und fehlende Einwilligung in die Studienteilnahme.

Es sind insgesamt 44 Patient*innen mit AD und ARC als Komorbidität für die Studie rekrutiert worden. Die Patient*innen sind in zwei Gruppen eingeteilt worden:

Die Indexgruppe (IL-4R α Antikörper) hat 29 AD Patient*innen mit komorbider ARC unter IL-4R α Antikörpertherapie (300 mg, subkutane, zweiwöchige Applikation) umfasst.

Alle Patient*innen mit IL-4R α Antikörpertherapie sind entsprechend ihrer Allergensensibilisierungen gegenüber Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1/p5) und der ARC Symptomatik auf Grundlage des RCAT und IgE ausgewählt worden. 21 Patient*innen (13 Frauen und 8 Männer, von 18–69 Jahren, medianes Alter: 29 Jahre;

siehe Tabelle 1 in Layritz, Galicia et al., 2023) sind in der Analyse berücksichtigt worden.

Acht Patient*innen sind nicht in die Analyse einbezogen worden:

Drei Patient*innen haben die Studie vorzeitig beendet, sodass die Ergebnisse der drei Untersuchungstermine nicht vollständig vorlagen. Bei fünf Patient*innen hat sich ein Widerspruch zwischen den Angaben zur Symptomschwere und den laborchemischen Messung des sIgE gezeigt. Es konnte daher nicht mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die beschriebene ARC Symptomatik durch die in dieser Arbeit untersuchten Sensibilisierungen gegen Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1/ rPhl p5) bedingt worden ist.

Für die Kontrollgruppe (AIT) sind zunächst 15 AD Patient*innen, die im Rahmen ihrer AD topisch und im Zuge ihrer komorbiden ARC mit AIT (sublinguale, tägliche Applikation) behandelt worden sind, rekrutiert worden. Alle Patient*innen mit AIT sind entsprechend ihrer Allergensensibilisierung (sIgE), ARC Symptomatik und der allergen-spezifischen Therapie für Birken- und Gräserpollen ausgewählt worden.

11 Patient*innen (7 Frauen and 4 Männer, von 24-59 Jahren, medianes Alter: 31 Jahre; siehe Tabelle 1 in Layritz, Galicia et al., 2023) sind in der Analyse berücksichtigt worden: Vier Patient*innen sind nicht in die Analyse einbezogen worden, wobei zwei Patient*innen die Studie vorzeitig beendet haben. Bei zwei weiteren Patient*innen haben die angegebenen ARC Symptome nicht mit den laborchemisch gemessenen Werten übereinstimmt, sodass der Zusammenhang zwischen Allergiesymptomatik und denen in der Studie zu untersuchenden Sensibilisierungen gegen Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1/ rPhl p5) nicht hinreichend sicher hergestellt werden konnte.

Für die Kontrollgruppe sind AD Patient*innen mit komorbider ARC unter AIT ausgewählt worden, da die Wirkungsweise der AIT bereits gut untersucht ist, Erfahrungen im Therapiemonitoring mittels BAT bestehen (Ebo et al., 2007; Feng et al., 2020; Jones et al., 2009; Kim et al., 2011) und somit die Ergebnisse der AIT eine valide Kontroll- und Vergleichsgrundlage bilden, um bisher unbekannte Effekte eines monoklonalen IL-4R α Antikörpers auf die Aktivität/Sensitivität basophiler Granulozyten zu untersuchen.

Eine Begleitmedikation (Antihistaminika und topische Therapien) ist den Studienteilnehmenden gestattet worden, da keine Interferenzen gegenüber den laborchemischen Verfahren, insbesondere BAT (Santos et al., 2021; Sturm et al., 2009), bekannt sind und diese Therapieformen auch in den Zulassungsstudien zur Anwendung des monoklonale IL-4R α Antikörpers erlaubt worden sind (Simpson et al., 2016).

Die Teilnahmedauer an der Studie hat insgesamt drei Untersuchungstermine umfasst: vor Therapiebeginn (Woche 0, w0), vier Wochen (w4) und 16 Wochen (w16) nach Therapiestart. Bei jedem der drei Untersuchungstermine ist eine Blutentnahme zur Allergiediagnostik, sowie die Bestimmung klinischer Parameter anhand eines Fragebogens basierend auf den standardisierten Indizes EASI, DLQI und RCAT erfolgt.

1.2.2 Blutuntersuchungen

Blutentnahme zur Allergiediagnostik:

2 \times Serum = 2 \times 7,5 ml

1 \times EDTA = 1 \times 9 ml

4 \times Heparin = 4 \times 9 ml

→ gesamt: 60 ml → an drei Terminen 3 \times 60 ml = 180 ml

1.2.2.1 IgE Bestimmung

Bei der Serumdiagnostik (Serum Monovette, 7,5 ml, Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland) ist mittels ECLIA (cobas® e801, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Elecsys IgE II. V 1.0 german, 2016) das Gesamt-IgE und per FEIA (Phadia 250, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden. ImmunoCAP Specific IgE Conjugate 100 and 400, revision date 2008) die sIgE rBet v1, rPhl p1 und rPhl p5 bestimmt worden.

Die Bestimmungen sind Teil der standardisierten Allergiediagnostik und sind im Rahmen der allergologischen Routinediagnostik über das Zentrallabor des Uniklinikum Bonn vorgenommen worden.

1.2.2.2 Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT)

Die Aktivität basophiler Granulozyten ist mit dem BAT nachgewiesen worden.

Verwendet worden ist das standardisierte Flow Cast CD203 c Reagent Set der Firma Bühlmann (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25). Die quantitative in vitro Bestimmung der Expression der Oberflächenantigene CD203 und CD63 nach allergen-spezifischer Zellstimulation gibt bei diesem Verfahren Aufschluss über den Aktivierungsgrad der basophilen Granulozyten. Die Analyse ist per Durchflusszytometrie erfolgt.

Als Probenmaterial ist EDTA Vollblut (9 ml Röhrchen, S-Monovette, Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland) verwendet worden, das innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden verarbeitet worden ist. Die EDTA Röhrchen sind für eine sichere BAT Messung gemäß Herstellerempfehlung mindestens bis zur Hälfte gefüllt gewesen. Eine Lagerung, wenn nötig, ist nach Herstellerangaben bei 2 °C – 8 °C für maximal 24 Stunden erfolgt (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25).

Für den BAT sind gefriergetrocknete Allergene (*Betula pendula* und *Phleum pratense*) der Firma Bühlmann (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) verwendet worden. Die Allergene sind in 250 µL Stimulationspuffer gelöst worden (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25).

Das standardisierte Flow Cast Schema ist in dieser Studie zum Zweck der Überprüfung einer möglichen Dosisabhängigkeit der Allergene um eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:10 und 1:100) erweitert worden.

Die vier verschiedenen Konzentrationen sind nach folgender Zusammensetzung hergestellt worden und im nachfolgend beschriebenen Vorgehen bearbeitet worden:

Verdünnungsstufe 1 (100 ng/ml) $\hat{=}$ unverdünnte Allergenkonzentration

Verdünnungsstufe 1:1 (50 ng/ml)

Verdünnungsstufe 1:10 (10 ng/ml)

Verdünnungsstufe 1:100 (1 ng/ml)

Die Bearbeitung ist in vier Schritten erfolgt:

Schritt 1: Stimulation

In die entsprechenden Röhren ist entweder 50 μ l der Positivkontrollen (anti-Fc ϵ RI oder fMLP), 50 μ l des Stimulationspuffer (Negativkontrolle) oder 50 μ l der entsprechenden Allergene pipettiert worden. In alle Röhren sind anschließend 100 μ l Stimulationspuffer und 50 μ l Blut beigefügt worden. Danach sind 20 μ l der Färbereagenz Anti-CCR3-PE/Anti-CD3-AF647 und 20 μ l der Färbereagenz Anti-CD203c-PE-DY647mAb hinzugefügt worden und die Röhren für 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert worden.

Schritt 2: Lyse

Nach Hinzufügen eines Lyseagenzes sind die Röhren bei Raumtemperatur für 5 bis 10 Minuten inkubiert worden und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert worden. Der Überstand ist anschließend abgekippt worden.

Schritt 3: Analyse

Im letzten Schritt wurde das Pellet mit 300 μ l Waschpuffer resuspendiert und anschließend eine durchflusszytometrische Messung/Auswertung bei 488 nm Blaulicht durchgeführt (Facs Canto, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany).

Schritt 4: Durchflusszytometrische Auswertung

Die durchflusszytometrische Auswertung ist gemäß des Manuals der Firma Bülmann AG erfolgt (Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25).

Gating

Im ersten Schritt sind aus den drei Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) die basophilen Granulozyten über den spezifischen Oberflächenrezeptor CCR-3 (y-Achse) und Sidewardsscatter (SCC^{low}) (x-Achse) selektiert worden (siehe Abbildung 1 A1 (w0), B1 (w4), C1 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023).

Negativkontrolle

Zur Negativkontrolle ist die Stimulation mit Pufferlösung ohne Allergenzusatz genutzt worden (siehe Abbildung 1 A2 (w0), B2 (w4) C2 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023).

Für die Negativkontrolle ist die im ersten Schritt detektierte basophile Granulozytenpopulation in je einen neuen Graphen mit CCR-PE (x-Achse) and CD63-FITC (y-Achse) und CCR-PE (x-Achse) und CD203c-PE-DY647 (y-Achse) übertragen worden. In Abbildung 1 A2 (w0), B2 (w4) C2 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023 ist die Gesamtdarstellung der Doppelfärbung gezeigt. Die Quadranteneinteilung ist so gesetzt worden, dass der Aktivierungsgrad der basophilen Granulozyten $< 5\%$ betragen hat.

Positivkontrolle

Zur Messung der Positivkontrollen ist die Quadranteneinteilung wie für die Negativkontrolle generiert, beibehalten und übertragen worden. Es ist die Stimulation über den $Fc\epsilon RI$ Rezeptor (anti- $Fc\epsilon RI$; IgE-vermittelter Mechanismus) als erste Positivkontrolle erfolgt (siehe Abbildung 1 A3 (w0), B3 (w4), C3 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023). Weiterhin sind die basophilen Granulozyten für eine zweite Positivkontrolle über den fMLP Rezeptor stimuliert worden (nicht-IgE-vermittelter Mechanismus) (siehe Abbildung 1 A4 (w0), B4 (w4) C4 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023).

Zeigte eine der beiden Positivkontrollen eine Basophilenaktivierung $> 10\%$, konnte das Probenmaterial hinreichend ausgewertet werden (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25).

Allergen-spezifische Stimulation

Anschließend ist die allergen-spezifische Stimulation mit Birken- und Gräserpollenallergenen erfolgt. Für die allergen-spezifische Stimulation ist die Quadranteneinteilung der Negativ- und Positivkontrolle beibehalten worden (siehe Abbildung 1 A5 (w0), B5 (w4) C5 (w16) in Layritz, Galicia et al., 2023).

Die graphische Darstellung ist mit der FlowJo Software Version 10 im Contour Plot Format erarbeitet worden.

Qualitätskontrolle

Um die Qualität der Blutproben, der Durchführung und Aussagekraft zu sichern, sind folgende drei Punkte, gemäß den Herstellerempfehlungen (Bühlmann AG, Schönenbuch, Schweiz) beachtet worden:

1. Die Darstellung aller drei Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) ist als Qualitätsmerkmal der Blutproben bestimmt worden. Die Verarbeitung des Blutes ist bis maximal 24 Stunden nach Abnahme, unter Beachtung der Lagerungsvorschriften durchgeführt worden.
2. Die Basophilenanzahl ist bei der zytometrischen Einmessung zwischen 200 und 600 festgelegt worden.
3. In der Negativkontrolle ist der Anteil aktivierter basophiler Granulozyten auf $< 5\%$ festgelegt worden.

Das bei jeder Blutentnahme zusätzlich gewonnene Heparinblut (9 ml Heparin S-Monovette; Starstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland) ist für eine 5-(und-6)-Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester (5(6)-CFDA, SE;CFSE) Färbung im Rahmen eines ergänzenden Projektes zur T-Zell Proliferation verwendet worden. Die Mechanismen des IL-4R α Antikörpers auf die T-Zell Proliferation sind nicht Schwerpunkt dieser Arbeit (Layritz, Galicia et al., 2023).

Bei jedem der drei Untersuchungstermine haben die Patient*innen zur Einschätzung der Symptomkontrolle unter IL-4R α Antikörpertherapie und AIT einen auf der Grundlage standardisierter Indizes (DLQI, RCAT, EASI) aufgebauten Fragebogen beantwortet.

1.2.3 Dermatology Life Quality Index (DLQI)

Der DLQI erfasst die Auswirkungen von Hauterkrankungen auf das alltägliche Leben und die damit verbundene Lebensqualität (Hongbo et al., 2005; Silverberg et al., 2018). Er ist für Patient*innen ab 18 Jahren konzipiert und besteht aus 10 Fragen mit je fünf Antwortmöglichkeiten unterschiedlicher Gewichtung (Lewis und Finlay, 2004; Hongbo et al., 2005). Ein DLQI Wert > 10 ist als moderate Einschränkung der Lebensqualität und ein Wert > 21 als schwere Beeinträchtigung der Lebensqualität zu interpretieren (Lewis und Finlay, 2004; Hongbo et al., 2005; Silverberg et al., 2018).

1.2.4 Rhinitis Control Assessment Test (RCAT)

Die Symptome der ARC sind in Anlehnung an den RCAT erfasst worden (Meltzer et al., 2013; Nathan, 2014). Erfragt werden hiernach die Häufigkeit von Niesanfällen, einer verstopften Nase, tränender Augen sowie Schlafstörungen und eine Beeinträchtigung der Freizeitaktivitäten durch die ARC Symptomatik. Die Antwortmöglichkeiten werden je Frage mithilfe einer 5-Punkte Likert Skala erfasst (Meltzer et al., 2013). Bei der Auswertung des RCAT ist zu beachten, dass sich Punktwerte und Symptomausprägung invers verhalten. Dies bedeutet, dass bei einem hohen Punktwert eine gering ausgeprägte ARC Symptomatik vorliegt (Meltzer et al., 2013).

1.2.5 Eczema Area and Severity Index (EASI)

Der EASI ist ein Score zur objektiven Einschätzung des Schweregrades der AD. Beurteilt wird die Ausprägung im Bereich Kopf/Hals, Arme, Rumpf und Beine und jeweils die Parameter Rötung (Redness), Infiltration (Thickness), Exkoration (Scatching) und Lichenifikation (Lichenification). Bei EASI Werten von 7,1 bis 21 sind die Hautläsionen als mäßig, bei Werten von 21,1 bis 50 als schwer einzuschätzen (Leshem et al., 2015).

1.2.6. Statistische Auswertung

Die Daten sind mittels One-way-ANOVA nach Tukey's multiple comparison test mit GraphPad Prism Version 9.1.2 ausgewertet worden.

Als statistisch signifikant sind p-Werte $\leq 0,05$ interpretiert worden (ns: nicht signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

Für die Analyse der Indexgruppe (IL-4R α Antikörper, n = 21) sind die Daten der Patient*innen mit ARC Symptomwerten ≤ 17 basierend auf dem RCAT und/oder slgE Konzentrationen ≥ 5 kU/l eingeschlossen worden.

Für die Analyse der Kontrollgruppe (AIT, n = 11), sind die Daten 7 Patient*innen mit Birkenpollen-spezifischer AIT und die Daten 4 Patient*innen mit Gräserpollen-spezifischer AIT ausgewertet worden.

Für die Auswertung der Gesamt- und slgE ist mit der logarithmierten Form (\log_{10}) der Daten gearbeitet worden.

Die Basophilensensitivität (CD-Sens = $1/EC_{50} * 100$) ist basierend auf einer Dosis-Wirkungs-Kurve, angelehnt an Hoffmann et al., 2015, Patil und Shreffler, 2012, Santos et al., 2015 und Santos et al., 2021 mittels One-way-ANOVA nach Friedman-Test bestimmt worden.

Die graphischen Darstellungen sind mit GraphPad Prism Version 9.1.2. and FlowJo Version 10.8.0 erarbeitet worden.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Gesamt-IgE und sIgE

Im Blut von Patient*innen unter einem monoklonalen IL-4R α Antikörper sind signifikant reduzierte IgE Serumkonzentrationen beobachtet worden, wohingegen im Blut von Patient*innen unter AIT keine signifikanten Änderungen festgestellt worden sind.

Um die Auswirkungen der monoklonalen IL-4R α Antikörpertherapie auf allergen bedingte Sensibilisierung zu untersuchen, sind routinediagnostisch die Konzentrationen des Gesamt-IgE und der sIgE für Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1/rPhl p5) bestimmt worden.

1.3.1.1 Gesamt-IgE

Die Auswertung des Gesamt-IgE ist auf der Grundlage logarithmierter Daten ($\log(10)$ Gesamt-IgE in IU/ml) erfolgt.

Unter der Therapie mit einem IL-4R α Antikörper hat sich ab der vierten Woche nach Therapiestart (w4) eine signifikante Abnahme der Gesamt-IgE Konzentration im Blutserum gezeigt (siehe Tabelle 2 A in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 3 A in Layritz, Galicia et al., 2023).

Unter der Behandlung mit AIT sind im Beobachtungszeitraum von insgesamt 16 Wochen keine signifikanten Veränderungen der Gesamt-IgE Konzentrationen im Blutserum zu beobachten gewesen (siehe Tabelle 2 H in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 3 E in Layritz, Galicia et al., 2023).

1.3.1.2 sIgE

Ergänzend zum Gesamt-IgE sind die spezifischen Sensibilisierungen für Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1 und rPhl p5) bestimmt worden. Die Auswertung ist auf der Grundlage logarithmierter Daten ($\log(10)$ sIgE in kU/l) erfolgt.

Im Blutserum der Patient*innen unter Therapie mit einem IL-4R α Antikörper sind für die Sensibilisierungen für Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1/rPhl p5) nach vier und 16 Wochen Behandlungsdauer signifikante Reduktionen der IgE Konzentrationen gemessen worden (siehe Tabelle 2 A in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 3 B – D in Layritz, Galicia et al., 2023).

Im Blutserum der Patient*innen unter AIT haben sich im Beobachtungszeitraum von insgesamt 16 Wochen keine signifikanten Veränderungen der IgE-Konzentrationen gezeigt (siehe Tabelle 2 H in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 3 F, G in Layritz, Galicia et al., 2023). Bei Patient*innen unter AIT ist ausschließlich eine Sensibilisierung gegenüber der Gräserpollenkomponente rPhl p1 nachgewiesen worden, jedoch nicht gegenüber der Gräserpollenkomponente rPhl p5.

1.3.2. BAT

Im Blut von Patient*innen unter der Therapie mit einem monoklonale IL-4R α Antikörper ist eine signifikante Steigerung der Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten beobachtet worden, wohingegen im Blut von Patient*innen unter Birkenpollenspezifischer Immuntherapie eine signifikante Reduktion der Aktivität festgestellt worden ist.

Der BAT ist durchgeführt worden, um die Auswirkungen der IL-4R α Blockade durch den monoklonalen Antikörper auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten zu untersuchen.

Im Blut von AD Patient*innen unter Therapie mit einem IL-4R α Antikörper und Birkenpollensensibilisierung haben sich im BAT folgende Ergebnisse gezeigt: In der Verdünnungsstufe 1 (100 ng/ml) ist zunächst keine signifikante Änderung der Basophilenaktivität beobachtet worden (siehe Tabelle 2 B in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 A in Layritz, Galicia et al., 2023), wohingegen in den Verdünnungsstufen 1:1 (50 ng/ml) und 1:10 (10 ng/ml) nach 16-wöchigem Behandlungsintervall (w16) ein signifikanter Anstieg der Aktivität basophiler Granulozyten zu beschreiben gewesen ist

(siehe Tabelle 2 B in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 B, C in Layritz, Galicia et al., 2023). In der Verdünnungsstufe 1:100 (1 ng/ml) hat sich keine signifikante Aktivitätsänderung der basophilen Granulozyten gezeigt (siehe Tabelle 2 B in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 D in Layritz, Galicia et al., 2023).

Auch im Blut von Patient*innen unter der Therapie mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper und Gräserpollensensibilisierung (rPhl p1/rPhl p5) ist die Aktivität basophiler Granulozyten innerhalb des Beobachtungszeitraumes (w16) dosisabhängig signifikant angestiegen. In den Verdünnungsstufen 1 (100 ng/ml) und 1:1 (50 ng/ml) sind zunächst keine signifikanten Aktivitätsänderungen beobachtet worden (siehe Tabelle 2 C in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 E, F in Layritz, Galicia et al., 2023). In den Verdünnungsstufen 1:10 (10 ng/ml) und 1:100 (1 ng/ml) hat sich jedoch eine signifikante Zunahme der Basophilenaktivität gezeigt (siehe Tabelle 2 C in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 G, H in Layritz, Galicia et al., 2023).

Im Gegensatz zur allergen-spezifischen Basophilenstimulation ist im Blut von Patient*innen unter IL-4R α Antikörpertherapie nach Stimulation mit fMLP (IgE-unabhängige Positivkontrolle) eine signifikante Reduktion der Basophilenaktivierung beobachtet worden (siehe Tabelle 2 D in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 I in Layritz, Galicia et al., 2023).

Nach der Stimulation über Fc ϵ RI (IgE-abhängige Positivkontrolle) hat sich ein Anstieg der Basophilenaktivität gezeigt, welcher jedoch nicht statistisch signifikant gewesen ist (siehe Tabelle 2 D in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 J in Layritz, Galicia et al., 2023). Da die Aktivität der basophilen Granulozyten unter IL-4R α Antikörpertherapie bei Stimulation mit Birkenpollen- und Gräserpollenallergenen signifikant angestiegen ist, jedoch bei der Stimulation mit fMLP (Positivkontrolle) signifikant abgenommen hat, ist davon auszugehen, dass der beschriebene Effekt der Aktivitätssteigerung basophiler Granulozyten allergen-spezifisch ist.

Auf Grundlage einer Dosis-Wirkungskurve sind EC-50 und die Sensitivität basophiler Granulozyten (CD-Sens) bestimmt worden.

Bei AD Patient*innen unter IL-4R α Antikörpertherapie und Birkenpollensensibilisierung ist bei signifikant absteigendem EC-50 Wert (siehe Tabelle 2 B in Layritz, Galicia et al., 2023) für die CD-Sens ein signifikanter Anstieg nach 16-wöchiger Behandlungsdauer ermittelt worden (siehe Tabelle 2 B in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 K in Layritz, Galicia et al., 2023). Bei AD Patient*innen unter IL-4R α Antikörpertherapie und Gräserpollensensibilisierung ist eine signifikante Abnahme des EC-50 Wertes (siehe Tabelle 2 C in Layritz, Galicia et al., 2023) sowie ein signifikanter Anstieg der CD-Sens ab der vierten Behandlungswoche errechnet worden (siehe Tabelle 2 C in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 4 L in Layritz, Galicia et al., 2023).

Im Blut von Patient*innen mit Birkenpollen-spezifischer AIT ist eine signifikante Abnahme der Basophilenaktivität nach 16-wöchiger Behandlungsdauer in der Verdünnungsstufe 1 (100 ng/ml) zu beobachten gewesen (siehe Tabelle 2 I in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 A in Layritz, Galicia et al., 2023). In den Verdünnungsstufen 1:1 (50 ng/ml), 1:10 (10 ng/ml) und 1:100 (1 ng/ml) haben sich keine signifikanten Aktivitätsänderungen basophiler Granulozyten gezeigt (siehe Tabelle 2 I in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 B – D in Layritz, Galicia et al., 2023).

Im Blut von Patient*innen unter Gräserpollen-spezifischer AIT hingegen sind keine signifikanten Aktivitätsänderungen basophiler Granulozyten beobachtet worden (siehe Tabelle 2 J in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 E – H in Layritz, Galicia et al., 2023).

Im Gegensatz zur allergen-spezifischen Basophilenstimulation haben sich im Blut von Patient*innen unter AIT nach Stimulation mit fMLP und Fc ϵ RI (Positivkontrollen) keine signifikante Änderung der Basophilenaktivierung gezeigt (siehe Tabelle 2 K in Layritz,

Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 I, J in Layritz, Galicia et al., 2023). Da sich die Aktivität der basophilen Granulozyten unter AIT bei Stimulation mit Birkenpollenallergenen im Vergleich zur fMLP- und FcεRI spezifischen Stimulation unter AIT jedoch signifikant reduziert hat, ist auch hier davon auszugehen, dass der beschriebene Effekt der Aktivitätsreduktion basophiler Granulozyten unter Birkenpollen-spezifischer AIT allergenspezifisch ist.

Auch in der Kontrollgruppe sind auf Grundlage einer Dosis-Wirkungskurve EC-50 und CD-Sens bestimmt worden.

Bei AD Patient*innen mit Birkenpollen-spezifischer AIT sind aufgrund der kleinen Gruppengröße (n = 7) keine statistisch signifikanten Änderungen des EC-50 Wertes (siehe Tabelle 2 I in Layritz, Galicia et al., 2023) als auch der CD-Sens errechnet worden (siehe Tabelle 2 I in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 K in Layritz, Galicia et al., 2023). Ebenso sind bei AD Patient*innen mit Gräserpollen-spezifischer AIT (n = 4) keine statistisch signifikanten Änderungen des EC-50 Wertes (siehe Tabelle 2 J in Layritz, Galicia et al., 2023) und der CD-Sens ermittelt worden (siehe Tabelle 2 J in Layritz, Galicia et al., 2023 und Abbildung 5 L in Layritz, Galicia et al., 2023).

Zusammenfassend weisen die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass der monoklonale IL-4Rα Antikörper die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten je nach Stimulationsmodus signifikant erhöht hat, wohingegen die Birkenpollen-spezifische AIT zu einer signifikanten Reduktion der Basophilenreaktivität geführt hat.

1.3.3 ARC Symptomatik

Bei Patient*innen unter der Therapie mit dem IL-4R α Antikörper hat sich die ARC Symptomatik signifikant verbessert; bei Patient*innen unter AIT sind die ARC Symptome innerhalb von 16 Wochen konstant geblieben.

Zusätzlich zu den laborchemischen Untersuchungen sind in dieser Arbeit ARC Symptome basierend auf dem RCAT dokumentiert worden.

Die allergischen Symptome haben sich innerhalb der ersten vier Behandlungswochen signifikant (w4) unter einer IL-4R α Blockade verbessert (siehe Tabelle 2 G in Layritz, Galicia et al., 2023). Bei Patient*innen unter AIT (n = 11) sind keine signifikanten Veränderungen der allergischen Symptomatik (RCAT, n = 11) beobachtet worden (siehe Tabelle 2 N in Layritz, Galicia et al., 2023).

1.4 Diskussion

In dieser Studie sind die Effekte einer monoklonalen IL-4R α Antikörpertherapie und der AIT auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten und IgE Konzentrationen bei Patient*innen mit AD und komorbider ARC untersucht worden.

Unter der therapeutischen IL-4R α Blockade ist einerseits eine signifikante Reduktion der IgE Konzentrationen und der ARC Symptomatik beobachtet worden. Andererseits ist jedoch auch ein signifikanter Anstieg der Basophilenaktivität und Sensitivität festgestellt worden. Unter Birkenpollen-spezifischer AIT hingegen hat sich eine signifikante Abnahme der Aktivität basophiler Granulozyten gezeigt.

1.4.1 IgE

Um den Einfluss des monoklonalen IL-4R α Antikörpers und der AIT auf die Allergensensibilisierungen zu untersuchen, sind mittels ECLIA und FEIA die Gesamt-IgE Konzentration, sowie die sIgE Konzentrationen für Birkenpollen (rBet v1) und Gräserpollen (rPhl p1 und rPhl p5) bestimmt worden. Hierbei hat sich eine signifikante

Reduktion des Gesamt-IgE und der sIgE unter IL-4R α Antikörpertherapie, jedoch nicht unter AIT gezeigt.

Der IL-4R α Antikörper verhindert die Bindung der IL-4 und IL-13 an spezifische Rezeptoren und unterbindet dadurch IL-vermittelte Reaktionswege, wie die Differenzierung von Th2-Zellen und die Aktivierung von IgE produzierenden B-Zellen (Gibbs, 2015; Sokol et al., 2009). Die in dieser Arbeit beobachteten reduzierten IgE Konzentrationen lassen sich somit durch eine verminderte B-Zell Aktivierung mit nachfolgend reduzierter IgE Produktion erklären.

Auch in anderen Untersuchungen (Busse et al., 2020; Jonstam et al., 2019) sind unter der Therapie mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper reduzierte IgE Konzentrationen beobachtet worden. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Busse et al. (2020) und Jonstam et al. (2019), in denen signifikante Reduktionen der IgE Konzentrationen frühestens nach 12-wöchigem Therapieintervall beobachtet worden sind, ist in der hier vorliegenden Arbeit eine Reduktion sowohl der Gesamt-IgE Konzentrationen als auch sIgE Konzentrationen nach bereits vier-wöchiger IL-4R α Antikörpertherapie bei AD Patient*innen mit komorbider ARC beobachtet worden.

Unter AIT haben sich in der hier vorliegenden Arbeit die IgE Konzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 16 Wochen nicht signifikant verändert.

In der Literatur stellen sich die Studienergebnisse zu Veränderungen der IgE Konzentrationen unter AIT kontrovers da. Einige Studien, die klinische Effekte einer subkutanen AIT bei Patient*innen mit Hausstaubmilbensensibilisierung untersucht haben, konnten keine Reduktion der IgE Konzentrationen nach 1 – 5-jährigen Behandlungsintervallen feststellen (Kwon et al., 2010; Werfel et al., 2006). Chu et al. (2020) hingegen haben in ihrer Arbeit nach einem Jahr subkutaner AIT eine signifikante Reduktion der spezifischen IgE Werte bei AD Patient*innen mit Tierhaarallergien und/oder Hausstaubmilbensensibilisierungen beobachtet.

Im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie sind folgende Punkte zu beachten: Die Beobachtungsdauer (16 Wochen) in der hier vorliegenden Arbeit hat weniger als ein

Jahr betragen, wobei bis zum vollständigen Ansprechen der AIT ein Behandlungszeitraum von mindestens drei Jahren empfohlen wird (EMA, 2008; Larenas-Linnemann et al., 2012). Der hier gewählte Zeitrahmen ist jedoch nicht vorrangig an der Kontrollgruppe (AIT) orientiert gewesen, sondern an den Zulassungsstudien des für die Indexgruppe relevanten Systemtherapeutikum (IL-4R α Antikörper) (Simpson et al., 2016).

1.4.2 BAT

Um den Einfluss einer therapeutischen IL-4R α Blockade und AIT auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten zu untersuchen, ist der BAT nach allergenspezifischer Stimulation in vitro durchgeführt worden. Hierbei hat sich eine signifikante Zunahme der Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten unter der Behandlung mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper gezeigt, wohingegen unter Birkenpollenspezifischer AIT eine Abnahme der Aktivität basophiler Granulozyten beobachtet worden ist.

In einigen Studien sind supprimierende Effekte der AIT auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten bereits beschrieben worden (Ebo et al., 2007; Feng et al., 2020; Jones et al., 2009; Kim et al., 2011). Feng et al. (2020) und Jones et al. (2009) haben bei ihren Untersuchungen der Basophilenaktivität unter AIT den BAT mit unterschiedlichen Allergenkonzentrationen durchgeführt und beschrieben, dass eine signifikante Reduktion der Aktivität basophiler Granulozyten dosisabhängig ab der 16. Behandlungswoche zu beobachten gewesen ist.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit sind verschiedene Allergenkonzentrationen genutzt worden (Verdünnungsstufen: 1 (100 ng/ml); 1:1 (50 ng/ml); 1:10 (10 ng/ml); 1:100 (1 ng/ml)), um eine Dosisabhängigkeit der Basophilenreaktivität zu überprüfen. Es hat sich eine dosisabhängige signifikante Reduktion basophiler Granulozyten nach 16-wöchigem Behandlungsintervall mit Birkenpollen-spezifischer AIT gezeigt. Unter Gräserpollenspezifischer AIT ist hingegen keine statistisch signifikante Reduktion im BAT beobachtet worden. Dies ist auf die kleine Stichprobengröße ($n = 4$) dieser Therapieuntergruppe (AIT) zurückzuführen.

Unter der Behandlung mit einem IL-4R α Antikörper hat sich in der hier vorliegenden Studie ein signifikanter Anstieg der Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten innerhalb der 16-wöchigen Beobachtungszeit gezeigt.

Denkbar wäre, dass dem Anstieg der basophilen Granulozyten ein Feedback-Mechanismus zugrunde liegt, der auf einer verminderten Antwort von B- und Th2-Zellen auf die basophilen Granulozyten beruht. Basophile Granulozyten interagieren als Hauptproduzenten der Zytokine IL-4 und IL-13. Nach IgE Rezeptor Stimulation induzieren sie mittels der IL die IgE Produktion in B-Zellen sowie die Th2-Zellaktivierung und sie tragen zu einer erhöhten Zellpermeabilität und Freisetzung allergischer Mediatoren bei, was letztendlich zur Ausprägung allergischer Symptome führt (Gibbs, 2005; Schroeder et al., 2001; Sokol und Medzhitov, 2010; Ying et al., 1997). Die B-Zellen und Th2-Zellen kommunizieren wiederum rückwirkend über ihre Mediatoren mit den basophilen Granulozyten. Der monoklonale IL-4R α Antikörper greift in diesen Kommunikationsmechanismus ein, indem er die Wirkung des IL-4 blockiert und somit die Th2-Zelldifferenzierung und die IgE Antwort der B-Zellen unterdrückt.

Wie in der hier vorliegenden Studie gezeigt worden ist, reduziert die IL-4R α Blockade Gesamt- und sIgE Konzentrationen, was wiederum durch die reduzierte B-Zell Induktion zu erklären ist.

Dass reduzierte IgE Konzentrationen zusammen mit einer Zunahme der Basophilenaktivität/Sensitivität auftreten, ist in Untersuchungen mit einem IgE Antikörper (Omalizumab) bei Patient*innen mit einer chronischen spontanen Urtikaria (CSU) beobachtet worden (Alizadeh Aghdam, 2020; Macglashan und Saini, 2013; Metz et al., 2017). Alizadeh Aghdam et al. (2020) haben in ihrer Arbeit die Effekte einer IgE-Blockade (Therapie mit Omalizumab) auf die Reaktionsweise basophiler Granulozyten bei Patient*innen mit CSU untersucht. Interessanterweise haben Alizadeh Adhdam et al. (2020) eine Zunahme der IgE gesteuerten Basophilenaktivierung via Fc ϵ RI (IgE-abhängiger Reaktionsweg) vs. eine signifikante Reduktion eines G-Protein-gekoppelten Reaktionsweges (IgE-unabhängig) beschrieben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zu Beginn des BAT zwei Aktivierungswege basophiler Granulozyten mit Hilfe zweier Positivkontrollen (IgE-abhängig via Fc ϵ RI vs. IgE-unabhängig via fMLP; Positivkontrollen) überprüft.

Nach Stimulation mit fMLP hat sich im Blut von Patient*innen unter IL-4R α Blockade eine signifikante Reduktion der Basophilenaktivierung gezeigt, sodass davon auszugehen ist, dass der IgE-unabhängige Reaktionsweg herunterreguliert worden ist.

Nach der Stimulation über Fc ϵ RI waren zunächst keine signifikante Aktivitätsänderung zu beobachten gewesen. Jedoch hat sich nach allergen-spezifischer Stimulation eine signifikante Steigerung der Aktivität der basophilen Granulozyten unter IL-4R α Therapie gezeigt. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivitätssteigerung basophiler Granulozyten über den IgE-abhängigen Reaktionsweg vermittelt worden ist, und da dieser Effekt erst nach Stimulation mit Birken- und Gräserpollenallergenen zu beobachten war, als allergen-spezifisch interpretiert werden kann.

Macglashan und Saini (2013) haben ebenfalls bei CSU Patient*innen unter IgE-Blockade die Auswirkungen auf die Aktivität basophiler Granulozyten untersucht und einen reversiblen Anstieg der basophilen Reaktivität beschrieben, da sie drei Monate nach Beendigung der Therapie eine Reduktion auf das Ausgangsniveau nachweisen konnten. Interessant ist nun die Frage, ob sich auch nach einer Unterbrechung der IL-4R α Blockade die bisher beobachtete Zunahme der Basophilenaktivität/Sensitivität auf das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt w0 (vor Therapiestart) reduzieren würde. Für die Klärung dieser Frage bedarf es zukünftiger Langzeitstudien, in denen insbesondere Anpassungsmechanismen im Rahmen von Down-Regulation und Desensibilisierung (MacGlashan, 2009) basophiler Granulozyten und ihrer Aktivierungswege untersucht werden sollten.

1.4.3 ARC Symptomatik

Zusätzlich zu den laborchemischen Untersuchungen ist in dieser Arbeit die ARC Symptomatik basierend auf dem RCAT dokumentiert worden.

Patient*innen unter der Behandlung mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper haben subjektiv verbesserte ARC Symptome berichtet. Weinstein et al. (2018) haben übereinstimmend hiermit herausgefunden, dass ein IL-4R α Antikörper als add-on Therapeutikum bei Patient*innen mit unkontrolliertem Asthma bronchiale und komorbider ARC die ARC Symptomatik signifikant verbessern konnte. Jedoch ist in der Arbeit von Weinstein et al. (2018), im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie, keine Analyse der IgE Konzentrationen vorgenommen worden.

Wie bereits in voranstehenden Abschnitten dargelegt, hat sich in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sowohl Gesamt-IgE- als auch sIgE Konzentrationen signifikant unter einer monoklonalen IL-4R α Antikörpertherapie abgesunken sind.

Denkbar wäre, dass die erniedrigten IgE Konzentrationen ein reduziertes Allergiepotezial und somit eine abnehmende Allergiesymptomatik bedingen. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der hier vorliegenden Polysensibilisierungen der Patient*innen und des begrenzten Beobachtungszeitraums eine isolierte Betrachtung der Allergen getriggerten Symptomatik insbesondere im Hinblick auf die langfristige klinische Relevanz unter Vorbehalt interpretiert werden muss.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter IL-4R α Antikörpertherapie ist für die ARC Symptomatik unter AIT nach 16 Wochen Untersuchungszeitraum keine signifikante Veränderung festzustellen gewesen. Das Ergebnis weitgehend gleichbleibender ARC Symptome steht in Übereinstimmung mit den gemessenen IgE Konzentrationen, bei denen ebenfalls keine signifikanten Veränderungen festgestellt worden sind.

Weiterhin sind in verschiedenen Arbeiten (Didier et al., 2007; Hajdu et al., 2021; Rizk et al., 2019; Sánchez Caraballo et al., 2012) signifikante Effekte auf klinische Parameter unter AIT frühestens nach 6 Monaten beschrieben worden.

1.4.4 Stärken und Schwächen

In dieser Arbeit sind die Effekte eines IL-4R α Antikörpers und der AIT auf die Aktivität/Sensitivität basophiler Granulozyten, Gesamt- und sIgE Konzentrationen in einem Gesamtzeitraum von zwei Jahren untersucht worden.

Die Patient*innen haben jeweils drei Untersuchungstermine innerhalb 16 Wochen wahrgenommen. Der Untersuchungszeitraum dieser Studie ist an den Zeitraum der Zulassungsstudien für den monoklonalen IL-4R α Antikörper angepasst worden (Simpson et al., 2016), in denen nach 16 Wochen aussagekräftige klinische Ergebnisse berichtet worden sind. Zudem ist es durch die Datenerhebungen während der Anfangszeit der Behandlung möglich gewesen, immunologisch-klinische Effekte klarer zu erkennen und externe Störfaktoren zu minimieren. Um das Vorhandensein einer symptomatischen ARC zu sichern, wurden Patient*innen mit sIgE Werten ≥ 5 kU/l und ARC Symptomen ≤ 17 Fragepunkten ausgewählt. Lebensqualität und Hautbild sind bei jedem Termin mit standardisierten Indizes erhoben worden.

Ein limitierender Faktor der Studie ist der auf 16 Wochen begrenzte zeitliche Rahmen. Für die Behandlung mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper wird eine langfristige Therapie und für die Behandlung mit AIT ein Zeitraum von mindestens 3 Jahre empfohlen (EMA Guidelines, 2008; Larenas-Linnemann et al., 2012).

Weiterhin ist es zu Überschneidungen verschiedener Allergenzeiten bei zumeist polysensibilisierten Patient*innen gekommen, sodass insbesondere die Daten der ARC Symptomatik vorsichtig interpretiert werden sollten.

Da der Studienzeitraum mit der Covid-19 Pandemie zusammengefallen ist, haben sich Einschränkungen bei der Patientenrekrutierung und Untersuchung ergeben, sodass nur eine begrenzte Probandenanzahl gewonnen werden konnte.

Um die beschriebenen Ergebnisse im Hinblick auf ihre weiteren Entwicklungen und langfristigen Effekte beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenpopulation sowie ein weiter gesteckter zeitlicher Rahmen mit ergänzenden follow-ups zu empfehlen (EMA Guidelines, 2008).

1.4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser hier vorliegenden Studie ist gezeigt worden, dass ein monoklonaler IL-4R α Antikörper bei AD Patient*innen mit komorbider ARC die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten signifikant gesteigert hat und gleichzeitig zur Reduktion von IgE Konzentrationen beigetragen hat. Erklärungsansätze für die beschriebenen Ergebnisse sind in dieser Studie bereits gegeben worden, jedoch sollte diesen in weiterführenden Arbeiten detailliert nachgegangen werden. So ist für künftige Studien zu empfehlen, die Auswirkungen einer IL-4R α Blockade auf die Rezeptordichte IgE-abhängiger und IgE-unabhängiger Reaktionswege, als auch die zeitliche Entwicklung der Basophilenaktivität/Sensitivität im Hinblick auf Anpassungsmechanismen im Rahmen von Down-Regulation und Desensibilisierung (MacGlashan, 2009) zu untersuchen. Weiterhin sollten die bereits beschriebenen Effekte in Langzeitstudien mit zusätzlichen follow-ups und größeren Fallzahlen hinsichtlich langfristiger Entwicklungen und klinischer Relevanz evaluiert werden.

1.5 Zusammenfassung

Die Atopische Dermatitis (AD) und die allergische Rhinokonjunktivitis (ARC) gehören zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises und treten oftmals komorbid auf.

Ein Interleukin-4-Rezeptor-*alpha* (IL-4R α) Antikörper wird zur Therapie moderater bis schwerer AD Ausprägungen eingesetzt, wohingegen die allergen-spezifische Immuntherapie (AIT) zur Behandlung der ARC und Asthma bronchiale verwendet wird. Wirkungsweisen der AIT auf Immunzellen, wie basophile Granulozyten, sind bereits beschrieben worden. Jedoch sind bisher die Effekte eines monoklonalen IL-4R α Antikörpers auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten und Immunglobulin E (IgE) Konzentrationen unzureichend untersucht worden.

Zur Klärung der Effekte eines IL-4R α Antikörpers auf die Aktivität und Sensitivität basophiler Granulozyten und IgE Konzentrationen ist eine monozentrische, prospektive Studie durchgeführt worden. 32 Patient*innen mit AD und komorbider ARC mit Sensibilisierungen gegenüber Birkenpollen (r Bet v1) und Gräserpollen (r Phl p1/p5) sind

über einen Zeitraum von 16 Wochen begleitet worden. N = 21 Patient*innen sind mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper (300 mg subkutan/2 Wochen; Indexgruppe) therapiert und n = 11 Patient*innen mit allergen-spezifischer Immuntherapie (AIT) (sublingual/täglich; Kontrollgruppe) behandelt worden. Patient*innen unter IL-4R α Antikörpertherapie sind anhand des allergen-spezifischen Immunglobulin E (sIgE) und der auf dem Rhinitis Control Assessment Test (RCAT) basierenden ARC Symptomatik eingeteilt worden. Patient*innen unter AIT sind nach sIgE, ARC Symptomatik und der Allergenspezifität der AIT unterteilt worden. An drei festgelegten Zeitpunkten (vor Therapiestart (w0), 4 Wochen (w4) und 16 Wochen (w16) nach Therapiebeginn) sind Laborbestimmungen (Gesamt-IgE, sIgE und Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT) vorgenommen worden, sowie klinische Parameter (Hautbild, Lebensqualität, allergische Symptomatik) erhoben worden.

Der BAT ist dabei nach allergen-spezifischer in vitro Stimulation durchgeführt worden.

Unter der Therapie mit einem IL-4R α Antikörper sind im BAT die Basophilenaktivität und Basophilensensitivität signifikant angestiegen, wohingegen die Aktivität der basophilen Granulozyten unter Birkenpollen-spezifischer AIT signifikant abgenommen hat. Unter der Therapie mit einem monoklonalen IL-4R α Antikörper haben sich sowohl IgE Konzentrationen, als auch ARC Symptome signifikant reduziert, wobei unter AIT kein statistisch signifikanter Effekt beobachtet worden ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein monoklonaler IL-4R α Antikörper gegenüber der AIT unterschiedliche Effekte auf frühe immunologische Reaktionen und Immunzellen wie basophile Granulozyten hat. Langzeiteffekte sind in dieser Studie nicht detektiert worden und sollten in künftigen Arbeiten untersucht werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific Immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* (2015) 8:17. DOI 10.1186/s40413-015-0063-2

Alizadeh Aghdam M, Knol EF, van den Elzen M, den Hartog Jager C, van Os-Medendorp H, Knulst AC, Otten HG, Röckmann H. Response of FcεRI-bearing leucocytes to omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2020 Mar;50(3):364-371. doi: 10.1111/cea.13566. Epub 2020 Feb 7. PMID: 31925825; PMCID: PMC7065003

Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care*. 2017 Jun;23(8 Suppl):S115-S123. PMID: 28978208

Bachert C, Borchard U, Wedi B, Klimek L, Rasp G, Riechelmann H, Schultze-Werninghaus G, Wahn U, Ring J. Allergische Rhinokonjunktivitis Leitlinie der DGAI in Abstimmung mit der DDG. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2006; 4(3): 264-275, <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2006.04349.x>

Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, Mullol J, Greos LS, Bosso JV, Laidlaw TM, Cervin AU, Maspero JF, Hopkins C, Olze H, Canonica GW, Paggiaro P, Cho SH, Fokkens WJ, Fujieda S, Zhang M, Lu X, Fan C, Draikiwicz S, Kamat SA, Khan A, Pirozzi G, Patel N, Graham NMH, Ruddy M, Staudinger H, Weinreich D, Stahl N, Yancopoulos GD, Mannent LP. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet*. 2019 Nov 2;394(10209):1638-1650. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31881-1. Epub 2019 Sep 19. Erratum in: *Lancet*. 2019 Nov 2;394(10209):1618. PMID: 31543428

Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*. 2004 Nov;24(5):758-64. doi: 10.1183/09031936.04.00013904. PMID: 15516669

Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, Simpson EL, Papp KA, Hong HC, Rubel D, Foley P, Prens E, Griffiths CEM, Etoh T, Pinto PH, Pujol RM, Szepietowski JC, Ettler K, Kemény L, Zhu X, Akinlade B, Hultsch T, Mastey V, Gadkari A, Eckert L, Amin N, Graham NMH, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD, Shumel B. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Jun 10;389(10086):2287-2303. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31191-1. Epub 2017 May 4. PMID: 28478972

Brehler R, Klimek L, Kopp MV, Virchow JC: Specific immunotherapy—indications and mode of action. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(9): 148–58. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0148

Brożek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, Brignardello-Petersen R, Canonica GW, Casale T, Chavannes NH, Correia de Sousa J, Cruz AA, Cuello-Garcia CA, Demoly P, Dykewicz M, Etxeandia-Ikobaltzeta I, Florez ID, Fokkens W, Fonseca J, Hellings PW, Klimek L, Kowalski S, Kuna P, Laisaar KT, Larenas-Linnemann DE, Lødrup Carlsen KC, Manning PJ, Meltzer E, Mullol J, Muraro A, O'Hehir R, Ohta K, Panzner P, Papadopoulos N, Park HS, Passalacqua G, Pawankar R, Price D, Riva JJ, Roldán Y, Ryan D, Sadeghirad B, Samolinski B, Schmid-Grendelmeier P, Sheikh A, Togias A, Valero A, Valiulis A, Valovirta E, Ventresca M, Wallace D, Wasserman S, Wickman M, Wiercioch W, Yepes-Nuñez JJ, Zhang L, Zhang Y, Zidarn M, Zuberbier T, Schünemann HJ. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Oct;140(4):950-958. doi: 10.1016/j.jaci.2017.03.050. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28602936

Busse WW, Maspero JF, Lu Y, Corren J, Hanania NA, Chipps BE, Katelaris CH, FitzGerald JM, Quirce S, Ford LB, Rice MS, Kamat S, Khan AH, Jagerschmidt A, Harel S, Rowe P, Pirozzi G, Amin N, Ruddy M, Graham NMH, Teper A. Efficacy of dupilumab on clinical outcomes in patients with asthma and perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020 Nov;125(5):565-576.e1. doi: 10.1016/j.anai.2020.05.026. Epub 2020 May 28. PMID: 32474156

Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, Busse WW, Ford L, Sher L, FitzGerald JM, Katelaris C, Tohda Y, Zhang B, Staudinger H, Pirozzi G, Amin N, Ruddy M, Akinlade B, Khan A, Chao J, Martincova R, Graham NMH, Hamilton JD, Swanson BN, Stahl N, Yancopoulos GD, Teper A. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med*. 2018 Jun 28;378(26):2486-2496. doi: 10.1056/NEJMoa1804092. Epub 2018 May 21. PMID: 29782217

Caughey G.H. Mast Cells and Basophils. In: Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC, eds. *Asthma and COPD (Second Edition)*, Academic Press, 2009: 111-120, ISBN 9780123740014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374001-4.00009-2>

Chu H, Park KH, Kim SM, Lee JH, Park JW, Lee KH, Park CO. Allergen-specific immunotherapy for patients with atopic dermatitis sensitized to animal dander. *Immun Inflamm Dis*. 2020 Jun;8(2):165-169. doi: 10.1002/iid3.291. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162849;PMCID:PMC7212191

Cox LS, Casale TB, Nayak AS, Bernstein DI, Creticos PS, Ambroisine L, Melac M, Zeldin RK. Clinical efficacy of 300IR 5-grass pollen sublingual tablet in a US study: the importance of allergen-specific serum IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Dec;130(6):1327-34.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2012.08.032. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23122534

Dellon ES, Rothenberg ME, Collins MH, Hirano I, Chehade M, Bredenoord AJ, Lucendo AJ, Spergel JM, Aceves S, Sun X, Kosloski MP, Kamal MA, Hamilton JD, Beazley B, McCann E, Patel K, Mannent LP, Laws E, Akinlade B, Amin N, Lim WK, Wipperman MF, Ruddy M, Patel N, Weinreich DR, Yancopoulos GD, Shumel B, Maloney J, Giannelou A, Shabbir A. Dupilumab in Adults and Adolescents with Eosinophilic Esophagitis. *N Engl J Med*. 2022 Dec 22;387(25):2317-2330. doi: 10.1056/NEJMoa2205982. PMID: 36546624.

Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Jäger S, Montagut A, André C, de Beaumont O, Melac M. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;120(6):1338-45. doi: 10.1016/j.jaci.2007.07.046. Epub 2007 Nov 1. PMID: 17935764

Dhami S, Nurmatov U, Arasi S, Khan T, Asaria M, Zaman H, Agarwal A, Netuveli G, Roberts G, Pfaar O, Muraro A, Ansotegui IJ, Calderon M, Cingi C, Durham S, van Wijk RG, Halken S, Hamelmann E, Hellings P, Jacobsen L, Knol E, Larenas-Linnemann D, Lin S, Maggina P, Mösges R, Oude Elberink H, Pajno G, Panwankar R, Pastorello E, Penagos M, Pitsios C, Rotiroti G, Timmermans F, Tsilochristou O, Varga EM, Schmidt-Weber C, Wilkinson J, Williams A, Worm M, Zhang L, Sheikh A. Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 Nov;72(11):1597-1631. doi: 10.1111/all.13201. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28493631

Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 May;72(3):196-203. doi: 10.1002/cyto.b.20142. PMID: 17111386.

Eguiluz-Gracia I, Pérez-Sánchez N, Bogas G, Campo P, Rondón C. How to Diagnose and Treat Local Allergic Rhinitis: A Challenge for Clinicians. *J Clin Med*. 2019 Jul 19;8(7):1062. doi: 10.3390/jcm8071062. PMID: 31331047; PMCID: PMC6678883

Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, Berger TG, Bergman JN, Cohen DE, Cooper KD, Cordoro KM, Davis DM, Krol A, Margolis DJ, Paller AS, Schwarzenberger K, Silverman RA, Williams HC, Elmets CA, Block J, Harrod CG, Smith Begolka W, Sidbury R. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Feb;70(2):338-51. doi: 10.1016/j.jaad.2013.10.010. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24290431; PMCID: PMC4410183

EMA. 2008: Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases. CHMP/EWP/18504. London, UK: European Medicines Agency 2008. <https://www.ema.europa.eu/en/clinical-development-products-specific-immunotherapy-treatment-allergic-diseases> (01.11.2022)

Eshtiaghi P, Gooderham MJ. Dupilumab: an evidence-based review of its potential in the treatment of atopic dermatitis. *Core Evid*. 2018 Feb 23;13:13-20. doi: 10.2147/CE.S133661. PMID: 29503598; PMCID: PMC5826246

Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*. 2013 Aug;68(8):974-82. doi: 10.1111/all.12184. Epub 2013 Jul 29. PMID: 23889510

Feng M, Zeng X, Su Q, Shi X, Xian M, Qin R, Li J. Allergen Immunotherapy-Induced Immunoglobulin G4 Reduces Basophil Activation in House Dust Mite-Allergic Asthma Patients. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Feb 20;8:30. doi: 10.3389/fcell.2020.00030. PMID: 32154245; PMCID: PMC7044416

Frew AJ, Powell RJ, Corrigan CJ, Durham SR, UK Immunotherapy Study Group. Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):319-25. doi: 10.1016/j.jaci.2005.11.014. PMID: 16461133

Frølund L, Durham SR, Calderon M, Emminger W, Andersen JS, Rask P, Dahl R. Sustained effect of SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet on rhinoconjunctivitis quality of life. *Allergy*. 2010; 65: 753–75

Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012 Jan 5;2(1):2. doi: 10.1186/2045-7022-2-2. PMID: 22409879; PMCID: PMC3395833

Gonçalves F, Freitas E, Torres T. Selective IL-13 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Drugs Context*. 2021 Mar 30;10:2021-1-7. doi: 10.7573/dic.2021-1-7. PMID: 33889195; PMCID: PMC8015935

Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med*. 2005 Jul;5(2):43-9. doi: 10.1007/s10238-005-0064-5. PMID:16096852

Hanifin, JM, Rajka, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92:44–47

Harb H, Chatila TA. Mechanisms of Dupilumab. *Clin Exp Allergy*. 2020;50:5–14. <https://doi.org/10.1111/cea.13491>

Hajdu K, Kapitány A, Dajnoki Z, Soltész L, Baráth S, Hendrik Z, Veres I, Szegedi A, Gáspár K. Improvement of clinical and immunological parameters after allergen-specific immunotherapy in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021 Jun;35(6):1357-1361. doi: 10.1111/jdv.17018. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33131126

Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzair P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann OV, Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015 Nov;70(11):1393-405. doi: 10.1111/all.12698. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26198455

Hongbo Y, Thomas CL, Harrison MA, Salek MS, Finlay AY. Translating the science of quality of life into practice: What do dermatology life quality index scores mean? *J Invest Dermatol*. 2005 Oct;125(4):659-64. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23621.x. PMID: 16185263

Hoyte F, Nelson HS. Recent advances in allergic rhinitis. *F1000Research* 2018, (F1000 Faculty Rev):1333. doi: 10.12688/f1000research.15367.1

Ilkka J.S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes; *Front Immunol*. 9/2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.00888, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00888>

Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, Shreffler WG, Steele P, Henry KA, Adair M, Francis JM, Durham S, Vickery BP, Zhong X, Burks AW. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;124(2):292-300, 300.e1-97. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.022. Epub 2009 Jul 3. PMID: 19577283; PMCID: PMC2725434

Jonstam K, Swanson BN, Mannent LP, Cardell LO, Tian N, Wang Y, Zhang D, Fan C, Holtappels G, Hamilton JD, Grabher A, Graham NMH, Pirozzi G, Bachert C. Dupilumab reduces local type 2 pro-inflammatory biomarkers in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy*. 2019 Apr;74(4):743-752. doi: 10.1111/all.13685. Epub 2019 Jan 21. PMID: 30488542; PMCID: PMC6590149

Justiz Vaillant AA, Vashisht R, Zito PM. Immediate Hypersensitivity Reactions. [Updated 2022 Aug 25]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/>

Kappen JH, Durham SR, Veen HI, Shamji MH. Applications and mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. *Ther Adv Respir Dis*. 2017 Jan;11(1):73-

86. doi: 10.1177/1753465816669662. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27678500; PMCID: MC5941975

Kim EH, Bird JA, Kulis M, Laubach S, Pons L, Shreffler W, Steele P, Kamilaris J, Vickery B, Burks AW. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):640-6.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1083. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21281959; PMCID: PMC3052379

Klein B, Treudler R, Simon JC. JAK-Inhibitoren in der Dermatologie - kleine Moleküle, große Wirkung? Übersicht über Wirkmechanismus, Studienergebnisse und mögliche unerwünschte Wirkungen. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2022 Jan;20(1):19-25. German. doi: 10.1111/ddg.14668_g. PMID: 35040564

Kowalska-Olędzka E, Czarnecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *J Drug Assess.* 2019;8(1):126-128. Published 2019 Jun 12. doi:10.1080/21556660.2019.1619570

Kwon YS, Oh SH, Wu WH, Bae BG, Lee HJ, Lee MG, Lee KH. CC chemokines as potential immunologic markers correlated with clinical improvement of atopic dermatitis patients by immunotherapy. *Exp Dermatol.* 2010;19(3):246–251

Larenas-Linnemann DE, Gupta P, Mithani S, Ponda P. Survey on immunotherapy practice patterns: dose, dose adjustments, and duration. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012 May;108(5):373-378.e3. doi: 10.1016/j.anai.2012.03.009. PMID: 22541411

Layritz A-S, Galicia-Carreón J, Benfadal S, Novak N. Differences in allergen-specific basophil activation and T cell proliferation in atopic dermatitis patients with comorbid allergic rhinoconjunctivitis treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody or allergen-specific immunotherapy. *Immun Inflamm Dis.* 2023;11:e808. doi:10.1002/iid3.808

Leshem YA, Hajar T, Hanifin JM, Simpson EL. What the Eczema Area and Severity Index score tells us about the severity of atopic dermatitis: an interpretability study. *Br J Dermatol*. 2015;172(5):1353-7. doi: 10.1111/bjd.13662. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25580670

Lewis V, Finlay AY. 10 years experience of the Dermatology Life Quality Index (DLQI). *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004 Mar;9(2):169-80. doi: 10.1111/j.1087-0024.2004.09113.x. PMID: 15083785

MacGlashan Jr. DW. Self-termination/Anergic mechanisms in human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 150:109-121. doi: 10.1159/000218114

Macglashan DW Jr, Saini SS. Omalizumab increases the intrinsic sensitivity of human basophils to IgE-mediated stimulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;132(4):906-11.e1-4. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.056. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23791510; PMCID: PMC4302343

May JR, Dolen WK. Management of Allergic Rhinitis: A Review for the Community Pharmacist. *Clin Ther*. 2017 Dec;39(12):2410-2419. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.10.006. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29079387

Marwa K, Kondamudi NP. Type IV Hypersensitivity Reaction. 2022 Aug 14. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32965899.

Meltzer EO, Schatz M, Nathan R, Garris C, Stanford RH, Kosinski M. Reliability, validity, and responsiveness of the Rhinitis Control Assessment Test in patients with rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):379-86. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.022. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23219170.

Metz M, Brockow K, Metcalfe D.D, Galli S.J; 22 - Mast cells, basophils, and mastocytosis; Editor(s): Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W. Schroeder, Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand; *Clinical Immunology (Fourth Edition)*, Elsevier, 2013, Pages 284-297, ISBN 9780723436911, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00043-X>

Metz M, Staubach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, Ashton-Chess J, Jarvis P, Georgiou P, Canvin J, Hillenbrand R, Erpenbeck VJ, Maurer M. Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of FcεRI-positive cells in the skin. *Theranostics*. 2017 Mar 6;7(5):1266-1276. doi: 10.7150/thno.18304. PMID: 28435464; PMCID: PMC5399592

Migueres M, Fontaine JF, Haddad T, Grosclaude M, Saint-Martin F, Bem David D, Crestani B. Characteristics of patients with respiratory allergy in France and factors influencing immunotherapy prescription: a prospective observational study (REALIS). *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Apr-Jun;24(2):387-400. doi:10.1177/039463201102400212. PMID: 21658313

Miyake K, Shibata S, Yoshikawa S, Karasuyama H. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy*. 2021 Jun;76(6):1693-1706. doi: 10.1111/all.14662. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33205439

Moreno-Ancillo A, Moreno C, Ojeda P, Domínguez C, Barasona MJ, García-Cubillana A, Martín S. Efficacy and quality of life with once-daily sublingual immunotherapy with grasses plus olive pollen extract without up dosing. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(6):399-405. PMID:18088023

Mortuaire G, Michel J, Papon JF, Malard O, Ebbo D, Crampette L, Jankowski R, Coste A, Serrano E. Specific immunotherapy in allergic rhinitis. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2017; 134: 253–258

Nathan RA. The rhinitis control assessment test: implications for the present and future. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;14(1):13-9. Doi: 10.1097/ACI.000000000000020. PMID: 24300418.

Novak N, Bieber T, Pathophysiologie der Atopischen Dermatitis. *Dtsch Arztebl*. 2004; 101(3):A-108/ B94/ C-92

Novak N, Bieber T, Allam JP. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011 Jun;66(6):733-9. Doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02535.x. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21251016

Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 1:8-16. Doi: 10.1159/000370220. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25925336

Paller AS, Siegfried EC, Thaçi D, Wollenberg A, Cork MJ, Arkwright PD, Gooderham M, Beck LA, Boguniewicz M, Sher L, Weisman J, O'Malley JT, Patel N, Hardin M, Graham NMH, Ruddy M, Sun X, Davis JD, Kamal MA, Khokhar FA, Weinreich DM, Yancopoulos GD, Beazley B, Bansal A, Shumel B. Efficacy and safety of IL-4-Ra-antibody with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *Am Acad Dermatol*. 2020 Nov;83(5):1282-1293. Doi: 10.1016/j.jaad.2020.06.054. Epub 2020 Jun 20.

Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol*. 2012 Jan; 167(1):59-66. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x. PMID: 22132885; PMCID: PMC3248087

Rak S, Yang WH, Pedersen MR, Durham SR. Once-daily sublingual allergen-specific immunotherapy improves quality of life in patients with grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: a double-blind, randomized study. *Qual Life Res*. 2007

Mar;16(2):191-201. Doi: 10.1007/s11136-006-9110-3. Epub 2006 Oct 11. PMID: 17033900

Rizk P, Rodenas M, De Benedetto A. Allergen Immunotherapy and Atopic Dermatitis: the Good, the Bad, and the Unknown. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019 Nov 27;19(12):57. Doi: 10.1007/s11882-019-0893-z. PMID: 31776678

Sánchez Caraballo JM, Cardona Villa R. Clinical and immunological changes of immunotherapy in patients with atopic dermatitis: randomized controlled trial. *ISRN Allergy.* 2012 Mar 7;2012:183983. doi: 10.5402/2012/183983. PMID: 23724240; PMCID: PMC3658480

Santos AF, Alpan O, Hoffmann H. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy.* 2021;76:2420–2432. <https://doi.org/10.1111/all.14747>

Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, Lack G. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jan;135(1):179-86. doi: 10.1016/j.jaci.2014.09.001. PMID: 25567046; PMCID: PMC4282725

Scadding GK. Optimal management of allergic rhinitis. *Arch Dis Child.* 2015 Jun;100(6):576-82. doi: 10.1136/archdischild-2014-306300. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25838332;PMCID:PMC4514979

Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol.* 2001;77:93-122. doi: 10.1016/s0065-2776(01)77015-0.PMID:11293121

Sidbury R, Davis DM, Cohen DE, Cordoro KM, Berger TG, Bergman JN, Chamlin SL, Cooper KD, Feldman SR, Hanifin JM, Krol A, Margolis DJ, Paller AS, Schwarzenberger K, Silverman RA, Simpson EL, Tom WL, Williams HC, Elmets CA, Block J, Harrod CG, Begolka WS, Eichenfield LF; American Academy of Dermatology. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Aug;71(2):327-49. doi: 10.1016/j.jaad.2014.03.030. Epub 2014 May 9. PMID: 24813298; PMCID: PMC4410179

Silverberg JI, Gelfand JM, Margolis DJ, Fonacier L, Boguniewicz M, Schwartz LB, Simpson E, Grayson MH, Ong PY, Fuxench ZCC. Severity strata for POEM, PO-SCORAD, and DLQI in US adults with atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018 Oct;121(4):464-468.e3. doi: 10.1016/j.anai.2018.07.004. Epub 2018 Jul 9. PMID: 30003968

Simons FE. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S161-81. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.981. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Oct;126(4):885. PMID: 20176258

Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, Beck LA, Blauvelt A, Cork MJ, Silverberg JI, Deleuran M, Kataoka Y, Lacour JP, Kingo K, Worm M, Poulin Y, Wollenberg A, Soo Y, Graham NM, Pirozzi G, Akinlade B, Staudinger H, Mastey V, Eckert L, Gadkari A, Stahl N, Yancopoulos GD, Ardeleanu M; SOLO 1 and SOLO 2 Investigators. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2335-2348. doi: 10.1056/NEJMoa1610020. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27690741

Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*. 2009;10:713-20

Sokol CL, Medzhitov R. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. *Mucosal Immunol* 3, 129–137 (2010), <https://doi.org/10.1038/mi.2009.137>

Sturm GJ, Kranzelbinder B, Sturm EM, Heinemann A, Groselj- Strele A, Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*. 2009;64(9):1319- 1326

Torres T, Ferreira EO, Gonçalo M, Mendes-Bastos P, Selores M, Filipe P. Update on Atopic Dermatitis. *Acta Med Port.* 2019 Sep;32(9):606–613, <https://doi.org/10.20344/amp.11963>

Wahn U, Bachert C, Heinrich J, Richter H, Zielen S. Real-world benefits of allergen immunotherapy for birch pollen-associated allergic rhinitis and asthma. *Allergy*. 2019 Mar;74(3):594-604. doi: 10.1111/all.13598. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30183091; PMCID: PMC6585786

Walker SM, Pajno GB, Lima MT, Wilson DR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jan;107(1):87-93. doi: 10.1067/mai.2001.112027. PMID: 11149996

Weinstein SF, Katial R, Jayawardena S, Pirozzi G, Staudinger H, Eckert L, Joish VN, Amin N, Maroni J, Rowe P, Graham NMH, Teper A. Efficacy and safety of dupilumab in perennial allergic rhinitis and comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jul;142(1):171-177.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.051. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29355679

Werfel T, Breuer K, Ruéff F, Przybilla B, Worm M, Grewe M, Ruzicka T, Brehler R, Wolf H, Schnitker J, Kapp A. Usefulness of specific immunotherapy in patients with atopic dermatitis and allergic sensitization to house dust mites: a multi-centre, randomized, dose-

response study. *Allergy*. 2006 Feb;61(2):202-5. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.00974.x. PMID: 16409197

Werfel T, Schwerk N, Hansen G, Kapp A. The diagnosis and graded therapy of atopic dermatitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2014 Jul 21;111(29-30):509-20, i. doi: 10.3238/arztebl.2014.0509. PMID: 25142076; PMCID: PMC4150028.

Werfel T, Heratizadeh A, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, Diepgen T, Fölster-Holst R, Gieler U, Kahle J, Kapp A, Nast A, Nemat K, Ott H, Przybilla B, Roecken M, Schlaeger M, Schmid-Grendelmeier P, Schmitt J, Schwennesen T, Staab D, Worm M. S2k – Guideline on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. Update. Kurzversion der Leitlinie Neurodermitis [atopisches Ekzem; atopische Dermatitis] Entwicklungsstufe: S2k [ICD-10: L20.8, L20.9, L28.0] AWMF-Registernummer: 013-027. AWMF online 2008; https://register.awmf.org/assets/guidelines/013-027k_S2k_Neurodermitis_2020-06-abgelaufen.pdf (30.04.2023)

Werfel T, Heratizadeh A, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, Diepgen T, Fölster-Holst R, Kahle J, Kapp A, Nemat K, Ott H, Peters E, Schlaeger M, Schmid-Grendelmeier P, Schmitt J, Schwennesen T, Staab D, Traidl-Hoffmann C, Werner R, Wollenberg A, Worm M. Aktualisierung „Systemtherapie bei Neurodermitis“ zur Leitlinie Neurodermitis [atopisches Ekzem; atopische Dermatitis] Entwicklungsstufe: S2k3 [ICD 10: L20.8, L20.9, L28.0]4, AWMF-Registernummer: 013-0275. AWMF online 02/2020; https://register.awmf.org/assets/guidelines/013_D_Dermatologische_Ges/013-027m_S2k_Neurodermitis_2020-06.pdf (30.04.2023)

Wheatley LM, Togias A. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2015 Jan 29;372(5):456-63. doi: 10.1056/NEJMcp1412282. PMID: 25629743; PMCID: PMC4324099

Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, Bingham EA, Finlay AY, Pembroke AC, Graham-Brown RA, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1994 Sep;131(3):383-96. doi: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb08530.x. PMID: 7918015

Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2005 Jan;60(1):4-12. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00699.x. PMID: 15575924

Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol*. 1997 May 15;158(10):5050-7. PMID: 9144526

Zielen S, Devillier P, Heinrich J, Richter H, Wahn U. Sublingual immunotherapy provides long-term relief in allergic rhinitis and reduces the risk of asthma: A retrospective, real-world database analysis. *Allergy*. 2018 Jan;73(1):165-177. doi: 10.1111/all.13213. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28561266; PMCID: PMC5763412

2. Veröffentlichung



Received: 15 June 2022 | Revised: 17 February 2023 | Accepted: 24 February 2023

DOI: 10.1002/iid3.808

ORIGINAL ARTICLE

Immunity, Inflammation and Disease

Open Access

WILEY

Differences in allergen-specific basophil activation and T cell proliferation in atopic dermatitis patients with comorbid allergic rhinoconjunctivitis treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody or allergen-specific immunotherapy

Anne-Sophie Layritz | Jorge Galicia-Carreón | Said Benfadal | Natalija Novak

Department of Dermatology and Allergy,
University Hospital Bonn, Bonn,
Germany

Correspondence

Natalija Novak, Department of
Dermatology and Allergy, University
Hospital Bonn, Venusberg Campus 1,
DE-53127 Bonn, Germany.
Email: Natalija.Novak@ukbonn.de

Funding information

Cluster of Excellence Immunosensation

Abstract

Background: Atopic dermatitis (AD), a chronic inflammatory disorder, is often accompanied by allergic rhinoconjunctivitis (ARC) as a co-morbidity. The use of a monoclonal anti-IL-4R α antibody has been effective in controlling moderate to severe AD symptoms. Allergen-specific immunotherapy (AIT) is widely used for the treatment of ARC and asthma. The effects of AIT on basophil reactivity/effector functions have already been examined and used as indicators of the treatment efficacy. However, it is unclear, how an anti-IL-4R α antibody can influence allergen-specific immune responses of basophils and T cells of AD patients with comorbid ARC.

Objective: To investigate the effect of a monoclonal anti-IL-4R α antibody on the in vitro allergic responses of basophils and T cells deriving from AD patients with comorbid ARC.

Methods: Blood samples of 32 AD patients were obtained before, after 4 and 16 weeks of an anti-IL-4R α antibody therapy (300 mg subcutaneously/2 weeks; $n = 21$) or AIT (daily sublingual application; $n = 11$). Patients treated with an anti-IL-4R α antibody were grouped according to their serum specific

Abbreviations: 7-AAD, 7-amino actinomycin D; AD, atopic dermatitis; AIT, allergen-specific immunotherapy; ARC, allergic rhinoconjunctivitis; BAT, basophil activation test; CD-max, basophil maximal reactivity; CD-sens, basophil allergen threshold sensitivity; CFSE, carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester; CSU, chronic spontaneous urticaria; FCS, fetal calf serum; Fc ϵ RI, high-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E; fMLP, *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; IL-13, interleukin-13; IL-4, interleukin-4; IL-4R α , interleukin-4 receptor alpha; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate buffered saline; rBet v1, *Betula verrucosa*, allergen 1, recombinant; RCAT, Rhinitis Control Assessment Test; rPhl p1, *Phleum pratense*, allergen 1, recombinant; rPhl p5, *Phleum pratense*, allergen 5, recombinant; sIgE, specific immunoglobulin-E; Th2, helper T (cell) type 2; Treg, regulatory T (cell).

Anne-Sophie Layritz and Jorge Galicia-Carreón contributed equally to this work.

Anne-Sophie Layritz is a doctoral candidate at the University of Bonn and this work will be part of her thesis.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Immunity, Inflammation and Disease* published by John Wiley & Sons Ltd.

immunoglobulin E levels and ARC symptoms, while patients receiving an AIT were additionally grouped according to the allergen specificity of their AIT. Basophil activation test and T cell proliferation assays were undertaken after an in vitro allergen stimulation.

Results: A significant reduction of the immunoglobulin E levels and the allergen-specific T cell proliferation was observed in AD patients treated with an anti-IL-4R α -antibody, while the allergen-specific basophil activation/sensitivity were found to be significantly increased. In patients receiving an AIT, the in vitro allergen-specific basophil activation and the T cell proliferation were found to be significantly decreased in response to seasonal allergens.

Conclusions: An IL-4R α blockade induced by a monoclonal anti-IL-4R α antibody leads to an increased activity/sensitivity of early effector cells (such as basophils), in contrast to a decreasing reactivity observed under an AIT. The late-phase T cell reaction to allergens did not differ between the herein assessed treatments.

KEYWORDS

allergic rhinoconjunctivitis, atopic dermatitis, basophil activation test, T cell proliferation

1 | INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD) is a complex, chronic inflammatory skin disease that is characterized by recurrent eczematous lesions and pruritus and that can be complicated by viral or bacterial superinfections.¹⁻⁴ AD might precede the development of several comorbidities such as allergic rhinoconjunctivitis (ARC), with symptoms such as rhinorrhea, nasal pruritus, sneezing, itching and ocular surface inflammation.⁵⁻¹³ For patients with moderate to severe AD, a systemic therapy is available through the use of a monoclonal antibody against the interleukin-4 (IL-4) receptor alpha (IL-4R α); this anti-IL-4R α antibody blocks the IL-4/interleukin-13 (IL-13) binding to IL-4 receptor types 1 and 2.¹⁴⁻¹⁸ Previous 16-week-studies and subsequent clinical trials have shown that the monoclonal anti-IL-4R α antibody can substantially improve the AD symptoms in adults, adolescents and children between 6 and 11 years of age, with acceptable safety.¹⁹⁻²¹

On the other hand, allergen-specific immunotherapy (AIT) has an immunomodulatory impact on the course of ARC and asthma, as well as a predictive effect on the development/worsening of polysensitisation or of asthma.^{6,11,22-31} A successful AIT regimen can reduce the activity of effector cells at early timepoints, while at the same time it can induce allergen-specific CD4+ regulatory T (Treg) cells, support the isotype switching of

B cells and increase the release of immunosuppressive mediators such as interleukin-10, transforming growth factor beta and interleukin-35 by regulatory B cells and Tregs.^{6,15,29-34}

Basophil granulocytes represent <1% of the leukocytes in the peripheral blood.^{35,36} Nevertheless, basophils play a key role in immediate type allergic reactions by producing IL-4 and IL-13. Through these ILs, basophils induce immunoglobulin E (IgE) synthesis in B cells as well as T cell differentiation,^{37,38} and therefore, they maintain reactions through the adaptive immune system.³⁷ The basophil activation test (BAT; performed with surface markers CD203c and CD63) is reliable, validated and widely used for the diagnostic evaluation of the basophil maximal reactivity (CD-max).³⁹ The basophil allergen threshold sensitivity (CD-sens), defined as the effective dose at 50% (EC50) of CD-max, might be an effective tool for the monitoring of allergen-specific immunotherapies.^{39,40}

While the effects of AIT on basophils have already been examined in several studies,⁴⁰⁻⁴⁴ it is still unclear how a monoclonal anti-IL-4R α antibody influences the allergen-specific immune responses of early effector cells and T cells in patients with AD and comorbid ARC.

This study has aimed at evaluating the effect of a monoclonal anti-IL-4R α antibody on the total and specific IgE (sIgE) serum levels, the in vitro basophil activation and the T cell allergen proliferation in

individuals bearing AD and ARC symptoms and being diagnosed based on the serum allergen sIgE for common birch or timothy grass.

2 | METHODS

2.1 | Study design and study population

This prospective, single center study took place at the Department of Dermatology and Allergy of the University Hospital Bonn from 2019 until 2021. Patients were included according to the following inclusion criteria: age ≥ 18 and active diagnosis of AD and comorbid ARC.

AD was diagnosed based on the criteria of Hanifin and Rajka⁴⁵ and on the UK working party diagnostic criteria.^{46,47} ARC was diagnosed based on the patient symptom history, the Rhinitis Control Assessment Test (RCAT ≤ 17), and sIgE (≥ 5 kU/L). Exclusion criteria were comorbidities such as malignomas, immunodeficiency, severe chronic diseases and pregnancy. All donors provided their written informed consent before the beginning of the study. The study followed the ethical principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee (approval number: 267/19).

Initially, 44 patients were enrolled. Five patients discontinued the study protocol for personal reasons. In seven patients, the clinical parameters of the ARC symptoms based on the RCAT did not match with the sIgE levels of their birch pollen and grass pollen sensitization, so we were not able to determine with

certainty if the ARC symptoms were related to the seasonal allergens of birch pollen (rBet v1; *Betula verrucosa*, allergen 1, recombinant) or timothy grass pollen (rPhl p1 or p5; *Phleum pratense*, allergen 1 or 5, recombinant).

Two observation groups were formed: the index group and the control group. The index group included 21 patients (13 females and 8 males; age range: 18–69 years; median age: 29 years) with AD and comorbid ARC that received an anti-IL-4R α antibody therapy (demographic data presented in Table 1). All patients treated with the monoclonal anti-IL-4R α antibody were grouped according to their exposure to rBet v1, rPhl p1/rPhl p5, as well as according to their ARC symptoms (based on the RCAT). The control group consisted of 11 patients (seven females and four males; age range: 24–59 years; median age: 31 years) with AD and comorbid ARC that were treated with daily sublingual AIT (demographic data presented in Table 1). Patients treated with AIT were grouped according to their sIgE levels, their ARC symptoms and their allergen-specific treatment for birch and grass pollen.

To classify the observable effects of the monoclonal anti-IL-4R α antibody on allergen-specific immune responses, we selected AD patients with AIT-treated ARC as a control group, since the effects of AIT on the IgE levels and the effector cells have already been examined in previous studies.^{40–44}

The observational time was 16 weeks, based on data from a registration study of a monoclonal anti-IL-4R α antibody,¹⁸ in which the clinical parameters associated with skin lesions and the quality of life were shown to

TABLE 1 Demographics and characteristics of the study population.

	Anti-IL-4R α antibody	AIT
Timepoint	w0	w0
Sample size	$n = 21$	$n = 11$
Age [MD (range)]	29 (18–69)	32 (24–59)
Gender: female	13	7
Gender: male	8	4
ARC symptoms based on the RCAT (MD \pm SD)	17.00 \pm 5.30	20.00 \pm 4.52
Log total IgE in IU/mL (MD \pm SD)	3.25 \pm 0.84	3.12 \pm 0.67
Log rBet v1 in kU/L (MD \pm SD)	1.74 \pm 0.54	1.78 \pm 0.43
Log rPhl p1 in kU/L (MD \pm SD)	1.28 \pm 0.96	0.14 \pm 0.66

Note: The sample size, age (MD and range), gender, RCAT (MD \pm SD), log total IgE (MD \pm SD), and log sIgE (ret v1; rPhl p1) (MD \pm SD) are given for the observational timepoint w0 (week 0 = before therapy), in the two therapy groups of an anti-IL-4R α antibody treatment and AIT.

Abbreviations: AIT, allergen-specific immunotherapy; anti-IL-4R α antibody, anti interleukin-4 receptor alpha antibody; MD, median; RCAT, Rhinitis Control Assessment Test; SD, standard deviation; w0, week 0 = before therapy.

improve significantly during this period. Moreover, significant changes could be indicated more easily at the beginning of the treatment without disruptive factors or external triggers.

The observational period was assessed at three timepoints: (i) before the start of any systemic treatment (w0), (ii) at 4 weeks (w4) after the start of a systemic treatment and (iii) at 16 weeks (w16) after the start of a systemic treatment. All patients filled in a questionnaire based on the Dermatology Life Quality Index (DLQI), the RCAT and the Eczema Area and Severity Index (EASI); the answers to this questionnaire were evaluated to assess the efficacy of the treatment, to ensure the correct handling and to detect nonresponders. The DLQI was used so as to estimate the effects of skin diseases on daily life routine and their impact on the quality of life.^{48,49} Additionally, questions based on the RCAT were used to objectify the ARC symptoms, while the EASI was raised so as to classify the expression and severity of AD.⁴⁸

Blood samples were obtained (by using Serum Monovette; 7.5 mL; Sarstedt AG & Co KG) from patients to determine the total IgE serum levels through an electrochemiluminescence immunoassay (by using Cobas® e801; Roche Diagnostics)⁵⁰ and the sIgE serum levels for birch (rBet v1) and grass (rPhl p1, rPhl p5) pollen through a fluoroenzyme immunoassay (by Phadia 250; Thermo Fisher Scientific, Phadia AB),⁵¹ the activation level of basophils⁵² and the T lymphocyte proliferation. Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester (CFSE) T cell allergen proliferation assays were evaluated in 11 donors treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody and in 10 patients treated with AIT. Proliferation assays were performed in individuals sensitized to rBet v1 or rPhl p1/rPhl p5.

2.2 | BAT

EDTA-blood (collected in a 9-mL tube using S-Monovette; Sarstedt AG & Co KG) was used to verify the activation of basophil cells via the detection of surface markers (CD203c and CD63) through the undertaking of BAT according to the standardized instruction manual (Bühlmann Laboratories AG).⁵² Data were acquired by using a flow cytometer emitting at 488 nm (FACSCanto; Becton Dickinson GmbH). An example of the gating strategy and the allergen-specific basophil activation is visualized in Figure 1A-C, as generated by FlowJo version 10.8.0.⁵³

In an attempt to ensure the high quality of the undertaken BAT, the three typical leukocyte populations (i.e., lymphocytes, monocytes and granulocytes) had to be detected in the blood samples before gating as a

criterion of blood samples' quality. The absolute number of basophils ranged between 200 and 600 and the percentage of basophils in the negative control was determined as <5%.⁵² BAT assays were performed within the first 24 h after the blood collection, according to the standardized instruction manual (Bühlmann Laboratories AG).⁵² If the blood samples had to be stored, they were kept protected from light and refrigerated at 2°C–8°C.

2.3 | Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood was collected into sodium heparin tubes (9-mL Heparin S-Monovette; Sarstedt AG & Co KG) and PBMCs were isolated with the use of a Lymphoprep™ (Sigma-Aldrich) density gradient after centrifugation at 2100 rpm, for 30 min, at room temperature (25°C). After centrifugation, the mononuclear cell layer was collected, washed twice and counted by using an automated cell counter (NucleoCounter NC-200; ChemoMetec).

2.4 | Allergens

The undertaken BAT and antigen-specific T cell proliferation assay were induced by freeze-dried allergens obtained by Bühlmann Laboratories AG (Schönenbuch, Switzerland). Each allergen was prepared as an aqueous extract in 250 μ L of stimulation buffer, until the extract was dissolved. The allergens for BAT were used at different dilutions to rule out any dose-dependent effects (1 = 100 ng/mL; 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, and 1:100 = 1 ng/mL).

2.5 | CFSE labeling

CFSE mixed isomers (Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit; Invitrogen) were used for the CFSE labeling. In brief, CFSE was stored frozen as a 10-mM stock solution until used. A pellet of 1×10^6 cells was resuspended in 1 mL with 1% fetal calf serum (FCS)–phosphate buffered saline (PBS) solution and a CFSE labeling solution of a concentration ranging from 0.5 to 10 μ M to 37 nM and were incubated for 8 min, at room temperature, in the dark. After incubation, 1 mL of FCS per 2×10^6 cells was added to each sample, followed by a 10min incubation. Cells were then washed twice with a 2% FCS-PBS solution and were centrifuged at 1350 rpm for 10 min, before resuspension in RPMI.⁵⁴ PBMCs stained with CFSE were analysed before and after 7 days of cell

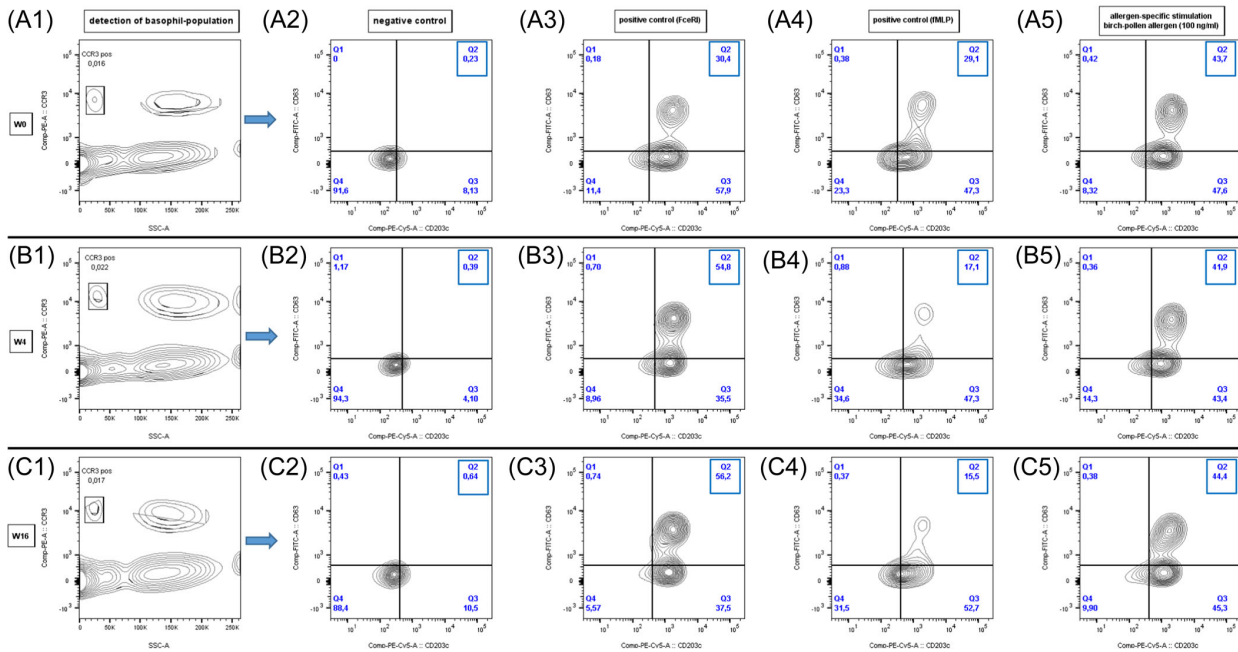


FIGURE 1 An example of a gating strategy and representative data of the CD203c⁺/CD63⁺ basophils for three timepoints [week 0 (w0), week 4 (w4), and week 16 (w16)]; [A1 (w0), B1 (w4), C1 (w16)] detection of basophils: The basophil population was gated as CCR3⁺ cells (y-axis) and SSC^{low} (x-axis); [A2 (w0), B2 (w4), C2 (w16)] negative control: The detected cells were displayed in one graph with CD63-FITC (y-axis) and CCR-PE (x-axis) and one graph with CD203c-PE-DY647 (y-axis) and CCR-PE (x-axis). In A2 (w0), B2 (w4), C2 (w16) both markers were set in one graph. For the negative control (basophil stimulation with a cellular buffer) the quadrant gate was set for an activation level <5% (Q2); [A3 (w0), B3 (w4), C3 (w16)] positive controls: The same quadrant position as set for the negative control was used for the positive controls via FceRI [A3 (w0), B3 (w4), C3 (w16)] and fMLP [A4 (w0), B4 (w4), C4 (w16)] and allergen-specific stimulation [A5 (w0), B5 (w4), C5 (w16)]; an example of allergen-specific basophil stimulation with birch pollen allergen (dilution 1:100 ng/mL) during an anti-IL-4R α antibody treatment is shown in A5 (w0), B5 (w4), C5 (w16).

culturing, through flow cytometry (FACSCanto; Becton Dickinson GmbH). Analysis was performed by using the BD FACSDiva software version 5.0.3 and the FlowJo version 10.8.0 for Mac OS X software.^{53,55}

2.6 | Cell viability determination

After the CFSE labeling, cells were stained with 7-amino actinomycin D (7-AAD; 0.2 $\mu\text{g}/10^6$ cells) (Sigma-Aldrich) and were incubated for 5 min before their analysis through flow cytometry.⁵⁴ 7-AAD-positive cells were considered as dead and discarded for T cell proliferation analysis.

2.7 | Cell culture

PBMCs were cultured in 96-well flat-bottomed plates (Corning Inc.) at a density of 0.2×10^6 cells/well, in RPMI-1640 medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin and 10%

heat-inactivated FCS. Cells were incubated at 37°C, in a 5% CO₂ humidified chamber. Antigen-specific stimulation was performed by adding the corresponding allergen in diluted concentrations (1 = 100 ng/mL, 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, and 1:100 = 1 ng/mL). Likewise, the cells were co-stimulated at day 0 in the presence or absence of MACSiBeadTM (4×10^8 particles) being conjugated to the monoclonal anti-biotin human antibodies against CD2 (CD2-biotin; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CD3 (CD3-biotin; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CD28 (CD28-biotin; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (T Cell Activation/Expansion Kit, human; Miltenyi Biotec). Five experimental conditions were analysed to determine the T cell proliferation index after the in vitro allergen stimulation in both groups of donors. CFSE-labeled cells were cultured for 7 days with the corresponding allergen and were co-stimulated with MACSiBeadsTM (at a ratio of 1:10 per 1×10^6 cells) and with of recombinant human IL-2 (PeproTech; at a ratio of 50–100 UI/mL per 1×10^6 cells, every 2 days). Moreover, CFSE-labeled PBMCs were cultured for 10 days with human recombinant IL-2 (50–100 UI/mL, every 48 h) and the related allergen dilutions. Additionally, cells were cultured only with

monoclonal anti-biotin human antibodies against CD2, CD3, and CD28 (100 µg/mL) and with IL-2 (50–100 UI/mL per 1×10^6 cells, every 2 days) and they were harvested after 7 and 10 days of culturing to serve as cell stimulation positive controls. Furthermore, cells were cultured only with IL-2 (50–100) and without any costimulation (RPMI). The fluorescence of the stimulated CD4+ CFSE-diluted cells was measured after 7 and 10 days of cell culturing, through flow cytometry.

2.8 | T cell proliferation assay

T lymphocyte proliferation was monitored by establishing a dose-response curve with the culprit allergen. Therefore, a dose-response curve using four allergen concentrations (1 = 100 ng/mL; 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, and 1:100 = 1 ng/mL) was established after 7 days of cell culturing. T cell proliferation was evaluated through the undertaking of flow cytometry and the obtained data were analysed with the use of FlowJo version 10.8.0.⁵³ Representative histograms of the allergen-specific T cell proliferation are presented in Figure 2A–D and Figure S1a–d.

T cell proliferation assays were analysed through the calculation of the average number of divisions that all responding cells have undergone since the initiation of the culturing process (proliferation index). Similarly, the cell growth was evaluated by calculating the number of divisions for all cells in the original culture (division index) versus the number of undivided cells after 7 days of allergen stimulation.⁵⁶

2.9 | Statistics

All collected data were analysed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test by using GraphPad Prism version 9.1.2 for MacOS. Differences were considered as statistically significant when the test yielded *p* values that were <.05.

For the analysis of the index group (treated with the anti-IL-4R α antibody; *n* = 21), patients with ARC symptoms exhibiting ≤ 17 score points (based on the RCAT) and/or sIgE serum levels ≥ 5 kU/L were included. For the analysis of the control group (receiving an AIT; *n* = 11), seven patients receiving a birch pollen-specific AIT and four patients receiving a grass pollen-specific AIT were analysed. For patients that dropped out or for those whose diagnosis of seasonal-related ARC was not ensured, their data were excluded. Finally, 32 patients were included into the statistical analysis.

For the BAT analysis the calculation of the CD-sens was based on a dose-response curve adapted from

Hoffmann et al.³⁹ and Santos et al.⁵⁷ The data were analysed with one-way ANOVA followed by a Friedman test.

The results of the proliferative capacity of responding T cells are shown in units deriving from the division index parameter as the total number of divisions per number of cells at the beginning of the culturing process.

The figures were generated through GraphPad Prism version 9.1.2. and FlowJo version 10.8.0.⁵³

3 | RESULTS

3.1 | Decrease in the total IgE and sIgE serum levels was observed in patients treated with an anti-IL-4R α antibody, but not in patients receiving an AIT

The levels of the total IgE decreased significantly after 4 and 16 weeks in patients treated with an anti-IL-4R α antibody (w0–w4: *p* < .0001; w0–w16: *p* < .0001; w4–w16: *p* < .01; Table 2A and Figure 3A). Additionally, the serum levels of sIgE decreased significantly after 4 and 16 weeks under an anti-IL-4R α antibody treatment (**rBet v1**: w0–w4, *p* < .05; w0–w16, *p* < .001; w4–w16, *p* < .001; **rPhl p1**: w0–w4, *p* < .05; w0–w16, *p* < .0001; w4–w16, *p* < .0001; **rPhl p5**: w4–w16, *p* < .01; Table 2A and Figure 3B–D). In contrast, the levels of total IgE and sIgE did not change significantly until week 16 in patients receiving an AIT (Table 2H and Figure 3E–G).

3.2 | Allergen-specific basophil activation and sensitivity increased in patients treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody, but decreased in patients under birch pollen-specific AIT

To investigate the effects of a monoclonal anti-IL-4R α antibody and of an AIT on early effector cells, we analysed the in vitro activation response on CD203c + / CD63 + basophils at four different allergen concentrations (1 = 100 ng/mL, 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, and 1:100 = 1 ng/mL). In an attempt to detect dose-dependent effects, four different allergen dilutions were used for the induction of allergen stimulation. We calculated the basophil sensitivity (CD-sens = $1/EC50 \times 100$) based on a dose-response curve adapted from Hoffmann et al.³⁹ and Santos et al.⁵⁷

In patients treated with the monoclonal anti-IL-4R α antibody and sensitized toward rBet v1, the in vitro basophil activation in response to the birch pollen allergen increased significantly depending on the allergen concentration.

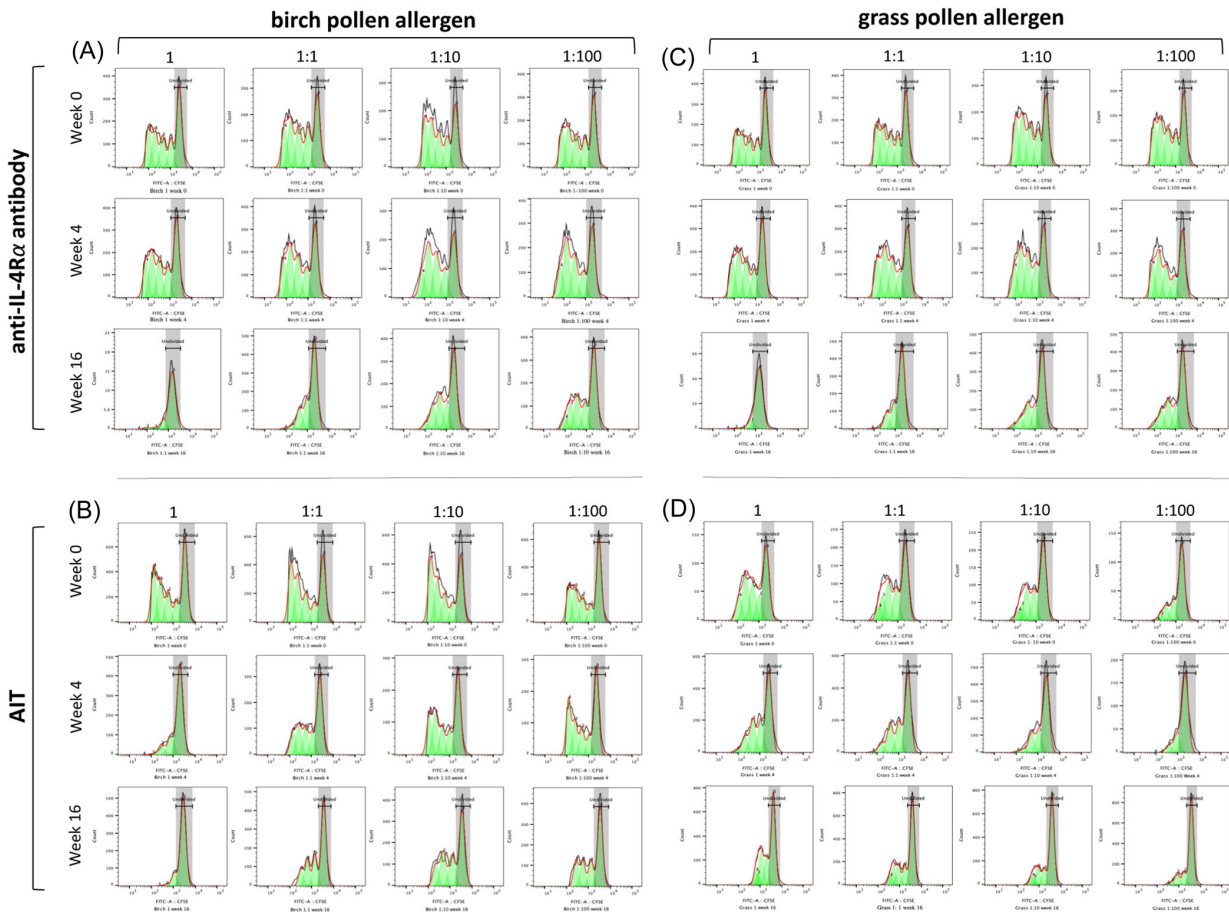


FIGURE 2 Representative histograms of T cell proliferation. Representative histograms showing a progressive dilution in the CFSE fluorescent intensity of proliferating T cells for anti-IL-4R α antibody (A, C) and AIT (B, D) treated AD patients. For the assays, PBMC (1×10^6 cells) were incubated with CFSE ($0.5 \mu\text{M}$) at room temperature for 8 min and the reaction was blocked by addition of FCS. The cells were washed in 2% FCS-PBS solution. Afterwards, the cells were cultured and stimulated with birch- and grass pollen allergen. The fluorescence of the stimulated CD4 $^+$ CFSE-diluted cells was measured after 7 days using flow cytometry. T cell proliferation of CD4 $^+$ CFSE + T cells of AD patients was analysed after 7 days of allergen stimulation with birch pollen allergen (A, B) and grass pollen allergen (C, D) at dilutions 1 (100 ng/mL), 1:1 (50 ng/mL), 1:10 (10 ng/mL) and 1:100 (1 ng/mL) at week 0 (w0), 4 (w4) and 16 (w16), respectively. AD, atopic dermatitis; FCS, fetal calf serum; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

At allergen dilution 1 (100 ng/mL) no significant changes were observed after 16 weeks of an anti-IL-4R α antibody treatment (Table 2B and Figure 4A). In contrast, at the 1:1 (50 ng/mL; w0–w16, $p < .05$) and the 1:10 (10 ng/mL; w0–w16, $p < .001$) allergen dilutions, a significant increase of the basophil reactivity was found (Table 2B and Figure 4B,C). At the 1:100 (1 ng/mL) allergen dilution no statistical differences were detected (Table 2B and Figure 4D).

In patients with grass sensitization (rPhl p1 and rPhl p5) that received an anti-IL-4R α treatment, an increase of the basophil activation to the grass pollen allergen was observable within 16 weeks depending on the allergen concentration. At the 1 (100 ng/mL) and the

1:1 (50 ng/mL) allergen dilutions, no significant changes were observed (Table 2C and Figure 4E,F). In contrast, at the 1:10 (10 ng/mL; w0–w16, $p < .01$) and the 1:100 (1 ng/mL; w0–w16, $p < .01$) allergen dilutions, a significant increase of the basophil activation was detected (Table 2C and Figure 4G,H).

On the other hand, the basophil activation decreased in patients treated with an anti-IL-4R α antibody after a basophil stimulation with fMLP (positive control; w0–w16; $p < .05$; Table 2D and Figure 4I), but increased after the allergen stimulation. Additionally, basophils displayed an increasing tendency of activation after a stimulation by Fc ϵ RI (positive control), but the observed effect was not determined as statistically significant (Table 2D and Figure 4J).

TABLE 2 Median, IQR, and *p* values for the parameters IgE, basophil activation and sensitivity (EC-50, CD-sens), division index for T cell proliferation and ARC symptoms based on the RCAT.

Anti-IL-4R α antibody	MD w0	MD w4	MD w16	IQR w0	IQR w4	IQR w16	<i>p</i> (w0-w4)	<i>p</i> (w0-w16)	<i>p</i> (w4-w16)
A—log(10) total/specific IgE									
log(10) total IgE in IU/mL (<i>n</i> = 21)	3.25	3.09	2.88	2.50–4.00	2.30–3.80	2.00–3.50	****	****	**
log(10) sIgE (rBetv1) in kU/L (<i>n</i> = 17)	1.74	1.67	1.23	1.20–2.00	0.95–2.00	0.81–1.92	*	***	***
log(10) sIgE (rPhlp1) in kU/L (<i>n</i> = 18)	1.28	1.12	0.89	0.51–1.99	0.29–1.98	0.04–1.67	*	****	****
log(10) sIgE (rPhlp5) in kU/L (<i>n</i> = 16)	1.10	0.95	0.78	(–1.00)–1.77	(–1.00)–1.77	(–1.00)–1.57	ns	ns	**
B—BAT Birch (<i>n</i> = 17) in %									
% CD203c+/CD63+ dilution 1 (100 ng/mL)	52.60	55.50	59.50	42.20–65.00	35.70–69.05	52.25–63.15	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.1 (50 ng/mL)	61.20	60.50	63.60	41.00–69.20	38.90–66.85	52.95–71.50	ns	*	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.10 (10 ng/mL)	51.50	64.50	57.50	15.55–61.95	13.30–71.65	25.90–72.70	ns	***	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.100 (1 ng/mL)	2.00	0.80	1.90	0.05–9.65	0.00–14.35	0.50–23.45	ns	ns	ns
EC50 in ng/mL	0.42	0.21	0.28	0.15–1.78	0.06–0.95	0.07–0.66	ns	*	ns
CD-sens	235.40	510.00	369.80	57.77–954.80	107.20–1590.00	152.70–1471.00	ns	*	ns
C—BAT Grass (<i>n</i> = 19) in %									
% CD203c+/CD63+ dilution 1 (100 ng/mL)	53.40	66.70	64.30	46.10–72.50	39.80–78.50	47.50–68.60	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.1 (50 ng/mL)	59.40	60.90	64.30	43.40–73.70	30.10–78.80	45.80–71.50	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.10 (10 ng/mL)	55.10	61.30	66.30	23.40–63.80	9.60–74.70	37.90–74.70	ns	**	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.100 (1 ng/mL)	3.30	3.50	14.30	0.00–13.50	0.20–23.40	0.50–32.30	ns	**	ns
EC50 in ng/mL	0.37	0.31	0.07	0.26–0.43	0.08–0.43	0.05–0.38	ns	***	**
CD-sens	266.70	322.30	1449.00	230.80–381.50	230.00–1204.00	263.10–1967.00	ns	***	**
D—positive controls BAT in %									
fMLP	39.60	32.00	20.00	17.25–56.25	12.45–55.35	12.90–53.10	ns	*	ns
Fc ϵ RI	59.90	64.90	62.40	47.00–69.50	51.60–73.95	51.15–72.15	ns	ns	ns
E—CFSE Birch (<i>n</i> = 11) division index									
CD4+ T-cells dilution 1 (100 ng/mL)	0.53	0.55	0.40	0.26–0.68	0.31–0.64	0.32–0.65	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.1 (50 ng/mL)	0.60	0.59	0.50	0.53–0.74	0.37–0.73	0.36–0.67	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.10 (10 ng/mL)	0.70	0.63	0.55	0.61–0.73	0.38–0.70	0.39–0.74	ns	*	ns
CD4+ T-cells dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.65	0.58	0.47	0.51–0.76	0.36–0.65	0.37–0.59	ns	**	ns

TABLE 2 (Continued)

Anti-IL-4R α antibody	MD w0	MD w4	MD w16	IQR w0	IQR w4	IQR w16	<i>p</i> (w0–w4)	<i>p</i> (w0–w16)	<i>p</i> (w4–w16)
F—CFSE Grass (<i>n</i> = 11) division index									
CD4+ T-cells dilution 1 (100 ng/mL)	0.61	0.55	0.36	0.42–0.72	0.28–0.62	0.26–0.50	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.1 (50 ng/mL)	0.56	0.57	0.40	0.47–0.72	0.27–0.65	0.28–0.51	ns	*	ns
CD4+ T-cells dilution 1.10 (10 ng/mL)	0.60	0.53	0.43	0.54–0.67	0.28–0.66	0.30–0.49	ns	**	ns
CD4+ T-cells dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.57	0.46	0.38	0.50–0.63	0.21–0.64	0.14–0.49	ns	*	ns
G—ARC symptoms based on RCAT (<i>n</i> = 21)									
RCAT	17.00	19.00	17.00	11.00–19.00	17.00–21.00	14.00–20.50	*	ns	ns
AIT									
H—log(10) total/specific IgE									
log(10) total IgE in IU/mL (<i>n</i> = 11)	3.11	3.03	3.00	2.63–3.49	2.54–3.47	2.43–3.66	ns	ns	ns
log(10) sIgE (rBetv1) in kU/L (<i>n</i> = 7)	1.78	1.77	1.91	1.41–1.90	1.64–2.00	1.61–1.97	ns	ns	ns
log(10) sIgE (rPhlp1) in kU/L (<i>n</i> = 4)	0.15	0.24	0.07	(–0.75)–0.45	(–0.72)–0.38	(–0.77)–0.26	ns	ns	ns
I—BAT Birch (<i>n</i> = 7) in %									
% CD203c+/CD63+ dilution 1 (100 ng/mL)	65.80	54.30	65.40	52.90–74.00	44.10–76.60	45.50–66.40	ns	*	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.1 (50 ng/mL)	72.40	60.10	62.40	49.70–75.80	50.00–72.70	53.90–66.60	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.10 (10 ng/mL)	36.60	38.00	27.50	12.80–75.40	24.30–71.60	15.90–61.00	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.90	0.30	1.00	0.00–20.00	0.00–15.40	0.30–1.20	ns	ns	ns
EC50 in ng/mL	0.44	0.50	0.52	0.07–0.79	0.14–0.63	0.33–1.41	ns	ns	ns
CD-sens	226.60	201.90	194.00	128.50–1541.00	159.80–1186.00	71.02–303.10	ns	ns	ns
J—BAT Grass (<i>n</i> = 4) in %									
% CD203c+/CD63+ dilution 1 (100 ng/mL)	34.95	39.70	29.90	8.50–45.95	5.93–59.30	5.95–55.43	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.1 (50 ng/mL)	22.75	28.15	23.70	4.40–35.40	6.08–42.80	1.28–45.68	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.10 (10 ng/mL)	2.55	4.60	3.50	0.08–51.23	1.00–5.65	0.45–8.05	ns	ns	ns
% CD203c+/CD63+ dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.50	0.05	0.45	0.125–0.65	0.00–2.13	0.00–2.25	ns	ns	ns
EC50 in ng/mL	1.42	1.42	1.44	0.19–2.54	0.93–2.50	0.88–5.24	ns	ns	ns
CD-sens	136.40	74.91	70.02	39.45–740.80	41.47–108.90	27.49–120.70	ns	ns	ns

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Anti-IL-4R α antibody	MD w0	MD w4	MD w16	IQR w0	IQR w4	IQR w16	<i>p</i> (w0–w4)	<i>p</i> (w0–w16)	<i>p</i> (w4–w16)
K—positive controls BAT in %									
fMLP	21.80	26.10	22.40	9.00–37.30	13.70–29.30	12.10–26.20	ns	ns	ns
Fc ϵ RI	66.70	62.60	63.20	59.60–79.30	54.50–80.30	41.50–72.40	ns	ns	ns
L—CFSE Birch (<i>n</i> = 5) division index									
CD4+ T-cells dilution 1 (100 ng/mL)	0.44	0.49	0.29	0.32–0.54	0.24–0.55	0.18–0.34	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.1 (50 ng/mL)	0.56	0.41	0.36	0.50–0.68	0.33–0.63	0.31–0.44	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.10 (10 ng/mL)	0.56	0.47	0.40	0.50–0.60	0.35–0.66	0.32–0.52	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.48	0.45	0.35	0.41–0.51	0.35–0.55	0.21–0.46	ns	ns	ns
M—CFSE Grass (<i>n</i> = 5) division index									
CD4+ T-cells dilution 1 (100 ng/mL)	0.41	0.38	0.31	0.30–0.64	0.25–0.45	0.30–0.37	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.1 (50 ng/mL)	0.43	0.43	0.34	0.38–0.62	0.36–0.49	0.27–0.41	ns	ns	**
CD4+ T-cells dilution 1.10 (10 ng/mL)	0.43	0.43	0.39	0.33–0.61	0.33–0.53	0.23–0.43	ns	ns	ns
CD4+ T-cells dilution 1.100 (1 ng/mL)	0.32	0.41	0.25	0.23–0.51	0.24–0.43	0.14–0.35	ns	ns	ns
N—ARC symptoms based on RCAT (<i>n</i> = 11)									
RCAT	20.00	21.00	19.00	12.00–22.00	18.00–23.00	13.00–20.00	ns	ns	ns

Note: The median, the IQR and the *p* values for IgE, basophil activation and sensitivity (EC-50/CD-Sens), division index of T cell proliferation and ARC symptoms based on the RCAT are given for the three observational timepoints w0 (week 0), w4 (week 4), and w16 (week 16), in two therapy groups (A–G: anti-IL-4R α antibody; H–N: AIT); analysed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test and Friedman-test.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; anti-IL-4R α antibody, anti interleukin-4 receptor alpha antibody; BAT, basophil activation test; CD-sens, basophil allergen threshold sensitivity; CFSE, 5-(und-6)-carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester; EC-50, effective concentration (dose) at 50% of the basophil reactivity; Fc ϵ RI, Fc-epsilon-receptor-1-alpha; fMLP, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; IQR, interquartile range; MD, median; ns, nonsignificant; *p*, *p* value; RCAT, Rhinitis Control Assessment Test; w0, week 0; w4, week 4; w16, week 16.

p* < .05; *p* < .01; ****p* < .001; *****p* < .0001.

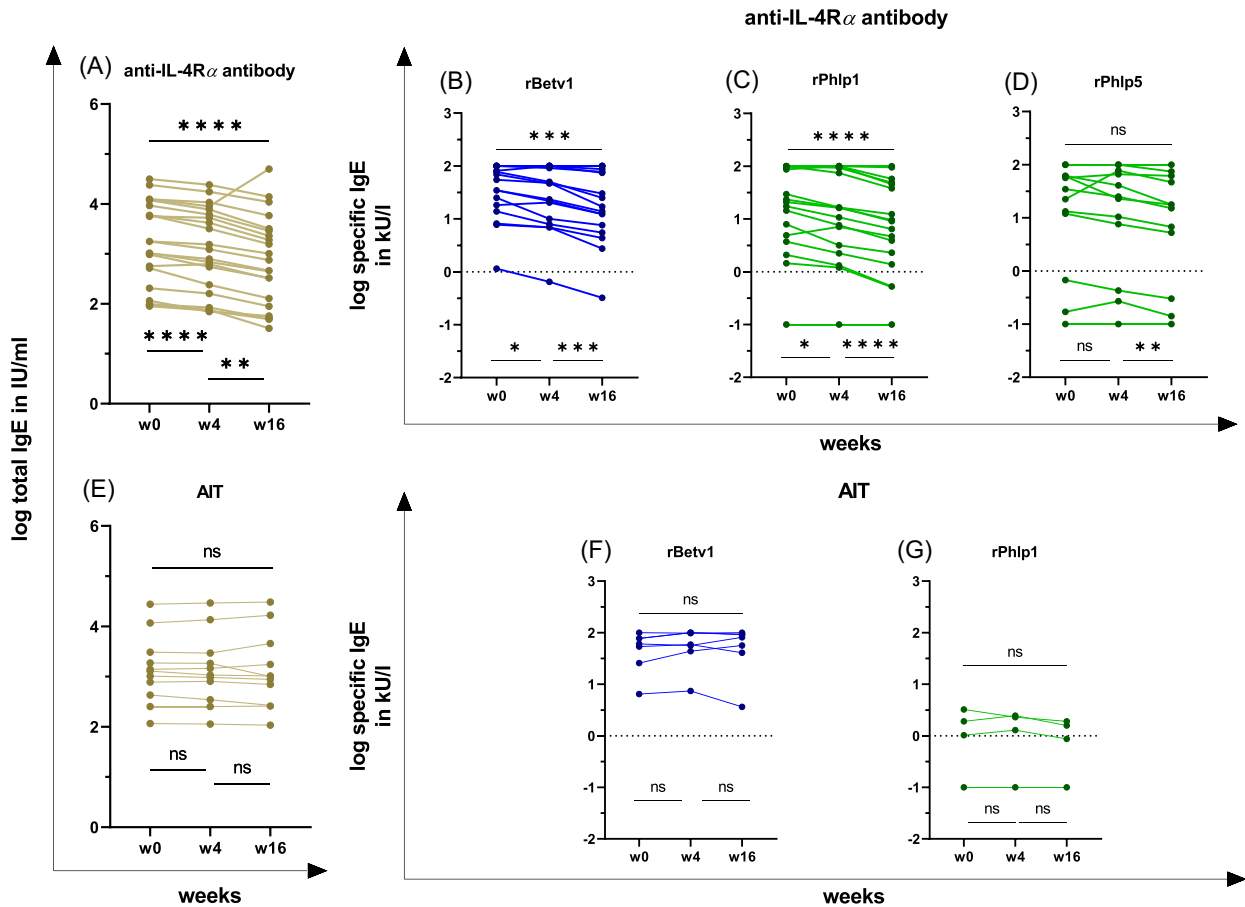


FIGURE 3 Total IgE in IU/mL and specific IgE in kU/L in patients receiving an anti-IL-4R α antibody or AIT, before therapy (w0) and at week 4 (w4) and week 16 (w16); logarithmic data: log₁₀; ns nonsignificant; * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$. (A, E) total IgE. (A) anti-IL-4R α antibody: $n = 21$, p (w0–w4) $< .0001$; p (w0–w16) $< .0001$; p (w4–w16) $< .01$; (E) AIT: $n = 11$. (B–D; F, G) Specific IgE. (B–D) Anti-IL-4R α antibody: rBetv1: $n = 17$, p (w0–w4) $< .05$; p (w0–w16) $< .001$; p (w4–w16) $< .001$; rPhlp1: $n = 18$, p (w0–w4) $< .05$; p (w0–w16) $< .0001$; p (w4–w16) $< .0001$; rPhlp5: $n = 16$, p (w4–w16) $< .01$; (F–G) AIT: rBetv1: $n = 7$; rPhlp1: $n = 4$.

Since a significant increase of the basophil activation after the allergen stimulation could be observed, we hypothesized that through an IL-4R α blockade induced by a monoclonal anti-IL-4R α antibody, the activation of basophils were modified depending of the activating stimulus.

Additionally, we calculated the CD-sens based on a dose-response curve. In patients receiving the monoclonal anti-IL-4R α antibody and being sensitized toward birch pollen, the EC₅₀ value decreased (w0–w16, $p < .05$; Table 2B) and, correspondingly, the CD-sens increased significantly after 16 weeks of treatment (w0–w16, $p < .05$; Table 2B and Figure 4K). A significant decrease of the EC₅₀ from week 4 onward (w0–w16, $p < .001$; w4–w16, $p < .01$; Table 2C) and, correspondingly, a significant increase

of the CD-sens was identified in patients with grass pollen sensitization that were treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody (w0–w16, $p < .001$; w4–w16, $p < .01$; Table 2C and Figure 4L).

In patients receiving an AIT, a significant decrease of the basophil activation after stimulation with the birch pollen allergen was observed at week 16 at the allergen dilution 1 (100 ng/mL; w0–w16, $p < .05$; Table 2I and Figure 5A).

At the 1:1 (50 ng/mL), 1:10 (10 ng/mL) and 1:100 (1 ng/mL) allergen dilutions, no significant effects on the basophil activation were identified (Table 2I and Figure 5B–D).

In patients receiving an AIT and being sensitized to the grass pollen allergen, no significant differences in basophil activation were observed within 16 weeks (Table 2J and Figure 5E–H).

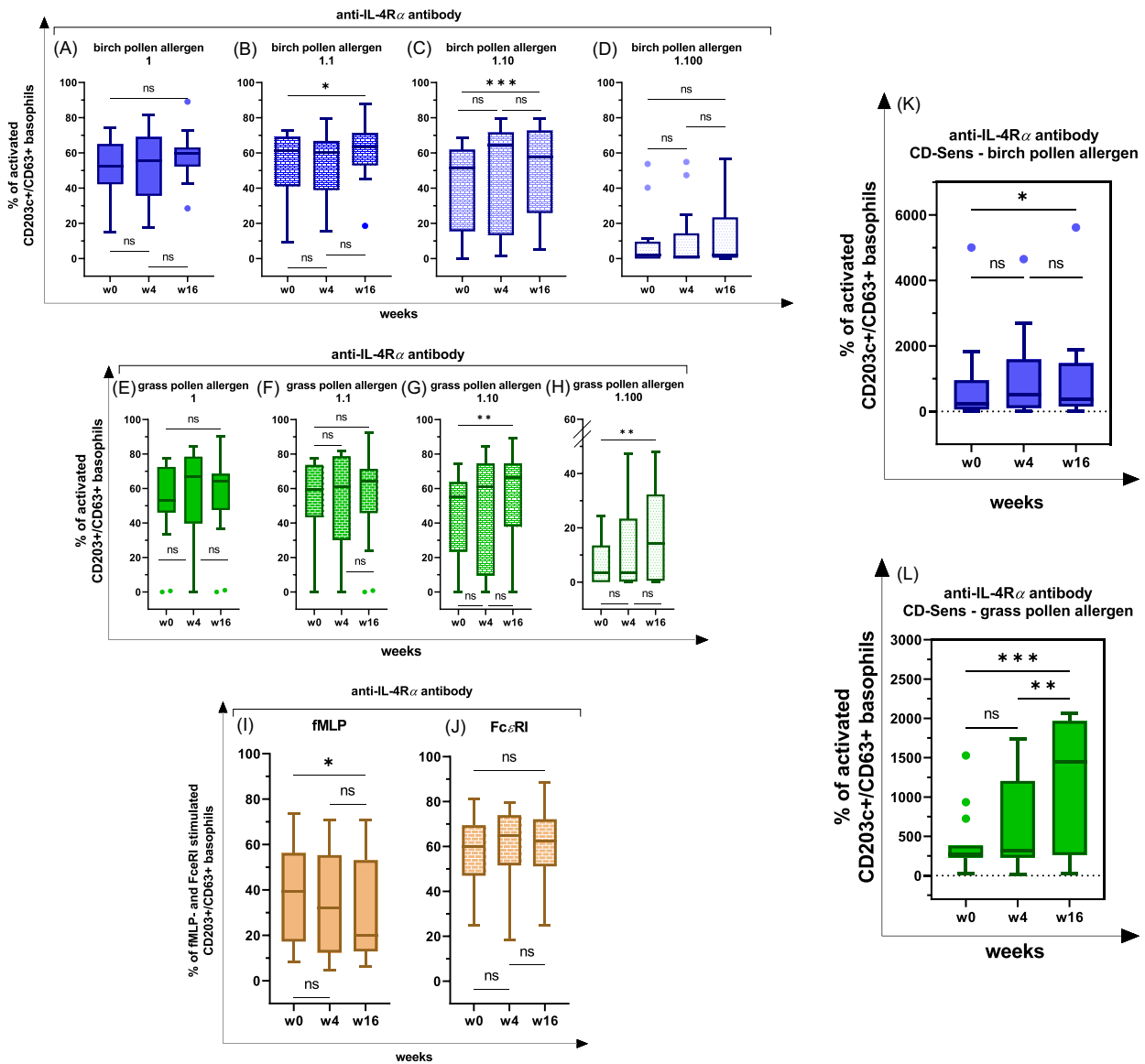


FIGURE 4 Basophil reactivity and sensitivity in AD patients with sensitization for birch- and grass pollen, receiving an anti-IL-4R α antibody; BAT was performed with four different allergen concentrations (1 = 100 ng/mL, 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, 1:100 = 1 ng/mL) for three timepoints [before therapy (w0) and at week 4 (w4) and week 16 (w16)]; ns nonsignificant; * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$. In the box-whisker plots the median, 25th and 75th percentile, the range and outliers are represented. (A–D) Birch pollen specific stimulation: $n = 17$, dilution level 1 (100 ng/mL): p (w0–w16) = ns; dilution level 1:1 (50 ng/mL): p (w0–w16) $< .05$; dilution level 1:10 (10 ng/mL): p (w0–w16) $< .001$; dilution level 1:100 (1 ng/mL) p = ns; (E–H) grass pollen specific stimulation: $n = 19$, dilution level 1 (100 ng/mL): p = ns; dilution level 1:1 (50 ng/mL): p = ns; dilution level 1:10 (10 ng/mL): p (w0–w16) $< .01$; dilution level 1:100 (1 ng/mL): p (w0–w16) $< .01$; (I) fMLP-mediated stimulation: $n = 21$, p (w0–w16) $< .05$; (J) Fc ϵ RI-mediated stimulation: $n = 21$, p = ns; (K) CD-sens in birch pollen stimulated CD203c+/CD63+ basophils, p (w0–w16) $< .05$; (L) CD-sens in grass pollen stimulated CD203c+/CD63+ basophils, p (w0–w16) $< .001$, p (w4–w16) $< .01$. AD, atopic dermatitis.

On the other hand, the basophil activation did not change significantly in patients receiving an AIT after a basophil stimulation with fMLP and Fc ϵ RI (Table 2K and Figure 5I,J). Due to the fact that the basophil activation

did not change significantly in response to the fMLP- and the IgE-mediated stimulation, but decreased after the birch pollen allergen stimulation, the suppressive effect of AIT was considered to be allergen-specific.

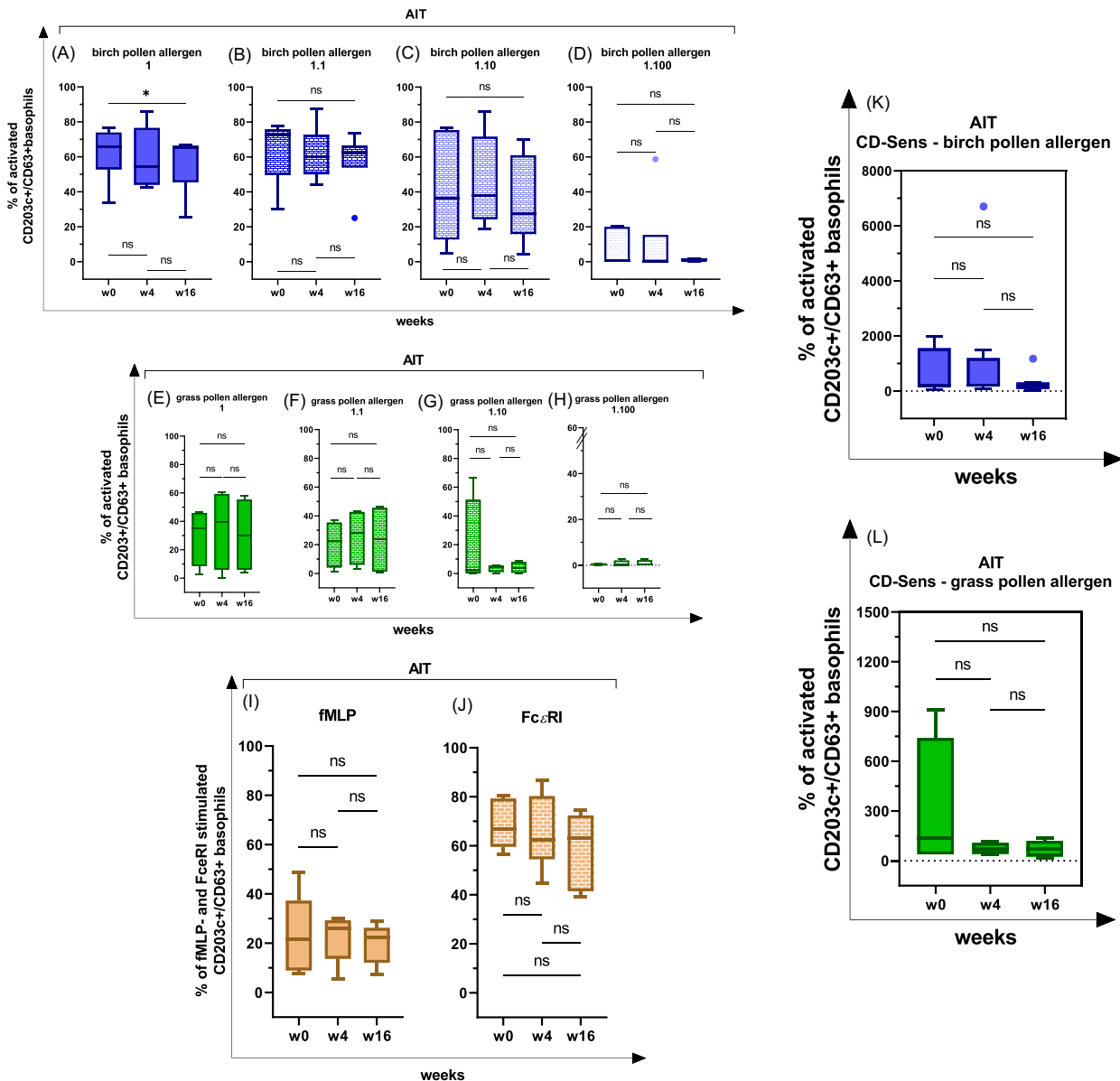


FIGURE 5 Basophil reactivity and sensitivity in AD patients with a sensitization for birch- and grass pollen, receiving an AIT; BAT was performed with four different allergen concentrations (1 = 100 ng/mL, 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, 1:100 = 1 ng/mL) for three timepoints [before therapy (w0) and at week 4 (w4) and week 16 (w16)]; ns nonsignificant; * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$. In the box-whisker plots the median, 25th and 75th percentile, the range and outliers are represented. (A–D) Birch pollen specific stimulation: $n = 7$, dilution level 1 (100 ng/mL): p (w0–w16) $< .05$; dilution level 1:1 (50 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:10 (10 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:100 (1 ng/mL): $p = ns$. (E–H) grass pollen specific stimulation: $n = 4$, dilution level 1 (100 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:1 (50 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:10 (10 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:100 (1 ng/mL): $p = ns$. (I) fMLP-mediated stimulation: $n = 11$, $p = ns$. (J) FcεRI-mediated stimulation: $n = 11$, $p = ns$. (K) CD-sens in birch pollen stimulated CD203c+/CD63+ basophils, $n = 7$, $p = ns$. (L) CD-sens in grass pollen stimulated CD203c+/CD63+ basophils, $n = 4$, $p = ns$.

In AIT-patients with birch and grass pollen sensitization, a decreasing tendency of the CD-sens was observable, but due to the small number of patients recruited, the effect was not statistically significant (Table 2I,J and Figure 5K,L).

Overall, an IL-4 α blockade by a monoclonal anti-IL-4 α antibody significantly increased the basophil reactivity and the basophil sensitivity depending on the activating stimulus, whereas the AIT decreased the basophil responsiveness.

3.3 | T cell proliferation in response to seasonal allergens was found decreased in patients treated with an anti-IL-4R α antibody or with an AIT

To investigate the effect of the IL-4R α blockade through the administration of a monoclonal anti-IL-4R α antibody versus that of an AIT on specific T cells deriving from AD patients with comorbid ARC, we analysed the proliferative response in parallel to the basophil activation and the sIgE levels.

The proliferation in response to the birch-induced stimulation decreased significantly in CFSE-treated CD4⁺ cells deriving from PBMCs of patients treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody or with AIT, depending on the allergen concentration.

In patients treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody, no significant differences in T cell proliferation were found after a birch-induced stimulation at the 1 (100 ng/mL) and the 1:1 (50 ng/mL) allergen dilutions (Table 2E and Figure 6A,B), but this was not the case for the 1:10 (10 ng/mL; w0–w16, $p < .05$) and the 1:100 (1 ng/mL; w0–w16, $p < .01$) allergen dilutions after 16 weeks (Table 2E and Figure 6C,D).

In contrast, the T cells of AIT-treated patients did not exhibit any differences in terms of their proliferation after a birch-induced stimulation from week 4 onward (Table 2K and Figure 6E–H).

As far as the grass pollen allergen is concerned, T cells did not show any significant diminished division at

allergen dilution 1 (100 ng/mL) within 16 weeks after an anti-IL-4R α antibody treatment (Table 2F and Figure 6I), but this was not the case at the 1:1 (50 ng/mL; w0–w16, $p < .05$), 1:10 (10 ng/mL; w0–w16, $p < .01$) and 1:100 (1 ng/mL; w0–w16, $p < .05$) allergen dilutions (Table 2F and Figure 6J–L).

In AIT-treated patients the CFSE-treated CD4⁺ cells decreased significantly from week 4 onward after a grass pollen allergen stimulation. A significant decrease in T cell proliferation was observed at the 1:1 (50 ng/mL) dilution (w4–w16, $p < .01$; Table 2M and Figure 6M,N). No significant changes in T cell proliferation were found at the 1 (100 ng/mL), the 1:10 (10 ng/mL) and the 1:100 (1 ng/mL) allergen dilutions tested (Table 2M and Figure 6O,P).

No statistical differences were observed with regard to the T cell proliferative indexes response after a birch- and a grass-induced stimulation with human recombinant IL-2 (Figure S2) and in cell stimulation positive controls with monoclonal anti-biotin human antibodies against CD2, CD3 and CD28, recombinant human IL-2 or RPMI. In summary, the anti-IL-4R α antibody treatment, as well as the AIT decreased the allergen-specific T cell proliferation.

3.4 | ARC symptoms

In patients treated with an anti-IL-4R α antibody, the severity of ARC symptoms decreased significantly within

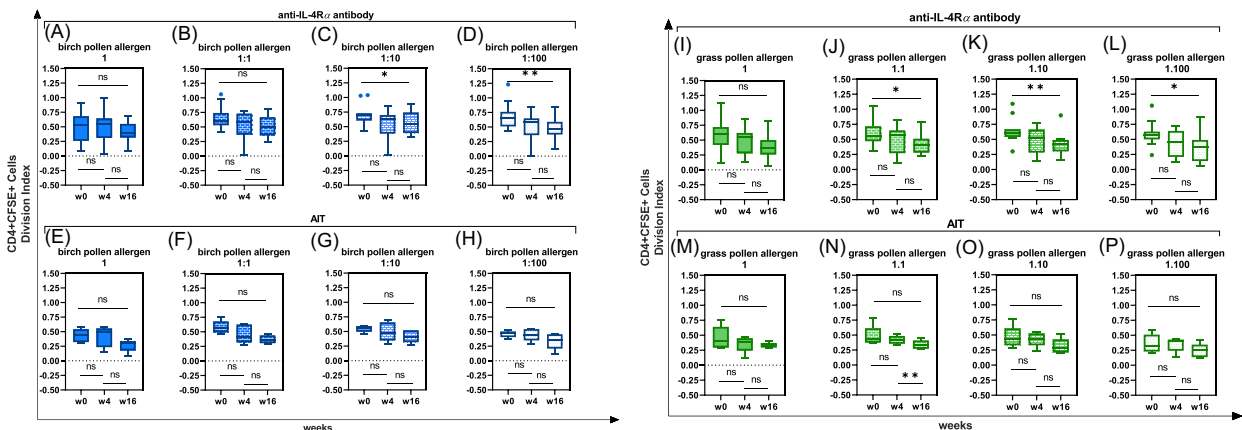


FIGURE 6 T cell proliferation under an anti-IL-4R α antibody or AIT. Comparative analysis of the median response for the variable division-index according to birch-and grass pollen stimulation (1 = 100 ng/mL, 1:1 = 50 ng/mL, 1:10 = 10 ng/mL, 1:100 = 1 ng/mL) in two therapy groups and three observational points (w0, w4, w16); ns nonsignificant; * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$. The Global (Min-Max) and Interquartile (25%–75%) ranges are shown. (A–D) Frequency of CFSE+ CD4⁺ after 7 days of cell culture after birch pollen stimulation in patients with an anti-IL-4R α antibody (A–D, $n = 11$) dilution level 1 (100 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:1 (50 ng/mL): p (w0–w16) $< .05$; dilution level 1:10 (10 ng/mL): p (w0–w16) $< .01$, and AIT (E–H, $n = 5$). (I–P) Frequency of CFSE+ CD4⁺ after 7 days of cell culture after grass pollen stimulation in patients with an anti-IL-4R α antibody (I–L, $n = 11$) dilution level 1 (100 ng/mL): $p = ns$; dilution level 1:1 (50 ng/mL) p (w0–w16) $< .05$; dilution level 1:10 (10 ng/mL): p (w0–w16) $< .01$; dilution level 1:100 (1 ng/mL): p (w0–w16) $< .05$ and AIT (M–P, $n = 5$) dilution 1:1 (50 ng/mL) p (w4–w16) $< .01$.

4 weeks, whereas no significant changes were observed in patients under an AIT.

In addition to the measurement of total IgE- and sIgE levels, we examined the severity of ARC symptoms based on the RCAT. In patients receiving an anti-IL-4R α antibody, the ARC symptoms improved significantly (w4) within 4 weeks (Table 2G). In contrast, in patients receiving an AIT, no significant changes of the allergic symptoms were observed within the observational time of 16 weeks (Table 2N).

4 | DISCUSSION

Patients with AD and comorbid ARC under therapy with a monoclonal anti-IL-4R α antibody (index group) or receiving an AIT (control group) were, herein, studied to investigate how the monoclonal anti-IL-4R α antibody impacts the total IgE and the sIgE levels as well as the allergen-specific basophil activation and T cell proliferation. Our findings indicate a significant decrease of the total IgE and the sIgE serum levels and of the T cell response, but also a significant increase of the basophil activation and sensitivity within 16 weeks in patients treated with the monoclonal anti-IL-4R α antibody. In patients receiving an AIT, the allergen-specific basophil activation and the T cell proliferation in response to seasonal allergens were found to be significantly decreased.

First, we found reduced total IgE and sIgE levels in patients treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody, but not in patients receiving an AIT. While the anti-IL-4R α antibody inhibits the IL-4-mediated pathways such as the Th2-differentiation and B cell induction, a reduced B cell induction can cause a reduced IgE synthesis and, therefore, might explain the reduced IgE levels.^{37,38} In patients receiving an AIT, their IgE levels did not change significantly during the observational period of 16 weeks, whereas significantly decreased IgE levels were detected at later timepoints in previous studies on AD patients receiving an AIT.^{58,59}

In addition to the measurement of the total IgE and the sIgE levels, we examined the patients' ARC symptoms based on the RCAT. In patients treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody, a significant reduction of their ARC symptoms was observed, but this was not the case in patients receiving an AIT. The significant reduction of the ARC symptoms as a result of the anti-IL-4R α antibody treatment is in line with the reduced total IgE and sIgE levels that we observed in our study. In patients receiving an AIT, their ARC symptoms did not change significantly during the observational period of 16 weeks. In previous studies significant changes in the

ARC symptoms as a result of an AIT were detected at later times, taking into account that an AIT can last at least 3 years.^{27,59}

Second, the allergen-specific basophil activation and sensitivity exhibited a decreasing tendency in patients under a birch-specific AIT; however, in patients treated with the monoclonal anti-IL-4R α antibody, a significant increase of the basophil responsiveness was observed. Several studies have reported a suppressive effect of AIT on basophil activation^{41–44} and have indicated this as a criterion of the treatment's efficacy.⁴⁰

On the other hand, we observed a significant increase of the basophil activation and sensitivity within 16 weeks under a monoclonal anti-IL-4R α antibody therapy. It might be possible that the increased basophil activation response to the anti-IL-4R α antibody is associated with a feedback mechanism, in which the basophils overreact to the reduced IgE-mediated stimulation caused by the lower B cell induction. There are reports in which the briefly increasing effects of basophils are described after the beginning of a treatment with the IgE-blocking monoclonal antibody omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria (CSU).^{60–62} Alizadeh Aghdam et al.⁶¹ examined the effects of different stimulus-secretion pathways of basophil granulocytes and described an upregulation of the IgE-mediated pathway by Fc ϵ RI, whereas the IgE-independent pathway via G-protein-coupled C5a receptors was down regulated during IgE-blocking by Omalizumab.

In our study two activation routes of basophil granulocytes were tested at the beginning of the BAT using two positive controls (IgE-dependent via Fc ϵ RI vs. IgE-independent via fMLP). We observed a significant decrease of basophil activation in patients treated with an anti-IL-4R α antibody after a basophil stimulation with fMLP within 16 weeks. Additionally, basophils displayed no significant changes after a stimulation via Fc ϵ RI without an allergen-specific stimulus. However, after allergen-specific stimulation with birch- and grass pollen allergen, a significant increase of the basophil activation was observable under an IL-4R α blockade.

We assumed that through an IL-4R α blockade induced by a monoclonal anti-IL-4R α antibody, the IgE-independent reaction pathway via fMLP has been down regulated, whereas the allergen-specific activation of basophils were mediated via the IgE-dependent pathway and modified depending of the activating stimulus.

Another report has described the effect of an increased basophil sensitivity in CSU patients treated with omalizumab as “reversible,” because 3 months after the termination of the IgE-blocking therapy, the basophil sensitivity returned to baseline levels.⁶² It might be

possible, that the increased basophil reactivity and sensitivity observed in our study also decreases during the treatment with the monoclonal anti-IL-4R α antibody. In future studies, it would be useful to monitor the parameters for longer periods of time to investigate the process of the basophil responsiveness in self-terminating cases and in desensitization pathways.⁶³

To examine the biological efficacy of a monoclonal anti-IL-4R α antibody in AD patients with comorbid ARC, we followed the T cell proliferative response after an in vitro allergen-specific stimulation. Our findings revealed a significant decrease in CFSE-treated CD4+ cells from baseline through week 16 under the anti-IL-4R α antibody treatment. Our data are in line with those of a previous report that has demonstrated a functional blockade of the IL-4R α in T cells from week 4 through week 52 in patients with moderate to severe AD.⁶⁴ Remarkably, our study confirmed the inhibitory effect of the anti-IL-4R α antibody on the ex vivo proliferative response of T cells deriving from PBMCs after a 7-day allergen-specific stimulation. Some reports have emphasized the role of the IL-4R α pathway and its association in modulating immune tolerance by undermining allergen-specific Treg cell responses.¹⁷ The blocking of the IL-4R α pathway might be crucial for the induction of allergen-specific Tregs and the reversal of the allergic inflammatory response. Notwithstanding, some reports suggest that the IL-4R α -mediated signaling pathway can induce Forkhead-box-P3 + Treg cells to optimally control Th2 inflammation during infections associated with a Th2 response, such as those caused by helminths.⁶⁵ Similarly, it has been reported that the IL-4R α binding with IL-4 and IL-13 is important for the generation of functional Tregs in an antigen-dependent manner.⁶⁶

4.1 | Strengths and limitations

Our study is the first attempting to analyse the impact of a monoclonal anti-IL-4R α antibody on basophil activation and allergen-specific T cell proliferation in vitro, in patients with AD and comorbid ARC. We have, herein, selected the patients according to their sIgE levels (being ≥ 5 kU/L) and/or their ARC symptoms (based on the RCAT being ≤ 17) to assure a symptomatic comorbid ARC. We have also monitored the development of the parameters for 16 weeks, based on data from the registration studies of the monoclonal anti-IL-4R α antibody.¹⁸ Moreover, significant changes could be indicated more easily at the beginning of the treatment, without the interference of disruptive factors or external triggers. We have chosen AD patients with AIT-treated ARC as a control group, because the effects of AIT on IgE levels

and the basophil activation have been described in several studies and are, therefore, well known.^{40,43–45} Furthermore, our patients filled in a questionnaire based on the DLQI as well as the RCAT and the EASI; this questionnaire enabled us to evaluate the efficacy of the monoclonal anti-IL-4R α antibody and to ensure the correct handling, the detection of nonresponders and the minimizing of bias.

A limitational factor in our study was the fact that most of the patients were polysensitized and, therefore, the effects of external allergen triggers could not be excluded. Additionally, the observational time was only 16 weeks, but the treatment with a monoclonal anti-IL-4R α antibody lasts longer in patients with AD, while the administration of an AIT should be conducted for a total of 3 years. Furthermore, the study took place during the COVID-19 pandemic and the recruitment of the patients had to be halted; as a result, only a small number of patients receiving an AIT were finally included in our study.

5 | CONCLUSION

The purpose of our study was to investigate the effect of a monoclonal anti-IL-4R α antibody on the in vitro allergic response of basophils and T cells deriving from AD patients with comorbid ARC. We have, herein, described a trend of increasing basophil activity and sensitivity under a treatment with a monoclonal anti-IL-4R α antibody, whereas the patients' serum IgE levels and their T cell proliferation decreased significantly. Nonetheless, long-term effects were not evaluated by our study and might be part of future research projects.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anne-Sophie Layritz: formal analysis; investigation; methodology; project administration; visualization; writing—original draft; writing—review & editing. **Jorge Galicia-Carreón:** formal analysis; investigation; methodology; visualization; writing—review & editing. **Said Benfadal:** Investigation. **Natalija Novak:** conceptualization; funding acquisition; project administration; supervision; validation; writing—review & editing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kirsten Brendes and Lisa Nauroth for their excellent technical assistance and the proofreading-service of the University of Bonn and Enago for language and grammar editing. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work received support by the Cluster of Excellence Immunosensation 390873048.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Natalija Novak reports grants and personal fees from Abbvie, Allergopharma, Alk Abello, Bencard Allergy Therapeutics, Blueprint, HAL Allergy, Leti Pharma, Leo Pharma, Eli Lilly, Lofarma, Novartis, Pfizer, Regeneron, Sanofi Genzyme, Stallergenes-Greers, Streamed up, Thermo Fisher. The rest of the authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

This study protocol was reviewed and approved by the Ethics committee of the University Hospital Bonn; approval number 267/19. All donors gave their written informed consent before starting the study.

ORCID

Anne-Sophie Layritz  <https://orcid.org/0000-0003-0018-2580>

Jorge Galicia-Carreón  <http://orcid.org/0000-0003-1037-1545>

Said Benfadal  <http://orcid.org/0000-0003-3467-6300>

Natalija Novak  <http://orcid.org/0000-0001-8146-8673>

REFERENCES

- Torres T, Ferreira EO, Gonçalo M, Mendes-Bastos P, Selores M, Filipe P. Update on Atopic Dermatitis. *Acta Med Port.* 2019;32(9):606-613. doi:10.20344/amp.11963
- Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *The Lancet.* 2016;387(10023):1109-1122. doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X. Epub 2015 Sep 13 PMID: 26377142.
- Brunner PM, Silverberg JI, Guttman-Yassky E, et al. Increasing comorbidities suggest that atopic dermatitis is a systemic disorder. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):18-25. doi:10.1016/j.jid.2016.08.022. Epub 2016 Oct 20 PMID: 27771048.
- Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *The Lancet.* 2020;396(10247):345-360. doi:10.1016/S0140-6736(20)31286-1
- Han H, Roan F, Ziegler SF. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev.* 2017;278(1):116-130. doi:10.1111/imr.12546
- Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy.* 2012;2:2.
- Walker SM, Pajno GB, Lima MT, Wilson DR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:87-93.
- Kowalska-Oleđzka E, Czarnecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *J Drug Assess.* 2019;8(1):126-128.
- Brożek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):950-958. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.050. Epub 2017 Jun 8 PMID: 28602936.
- Bachert C, Borchard U, Wedi B, et al. [Allergic rhinoconjunctivitis. Guidelines of the DGAI in association with the DDG]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006;4(Issue 3):264-275. doi:10.1111/j.1610-0387.2006.04349.x
- Wheatley LM, Togias A. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2015;Jan 29 372(5):456-463. doi:10.1056/NEJMcp1412282 PMID: 25629743; PMC ID: PMC4324099.
- May JR, Dolen WK. Management of allergic rhinitis: a review for the community pharmacist. *Clin Ther.* 2017;39(12):2410-2419. doi:10.1016/j.clinthera.2017.10.006. Epub 2017 Oct 25 PMID: 29079387.
- Miguères M, Fontaine JF, Haddad T, et al. Characteristics of patients with respiratory allergy in France and factors influencing immunotherapy prescription: a prospective observational study (REALIS). *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(2):387-400. doi:10.1177/039463201102400212 PMID: 21658313.
- Hornung T, Bieber T. Therapie der atopischen dermatitis: nach wie vor eine besondere Herausforderung. *Dtsch Arztebl.* 2018;115(20-21):[12]. doi:10.3238/PersDerma.2018.05.21.02
- Werfel T, Schwerk N, Hansen G, Kapp A. The diagnosis and graded therapy of atopic dermatitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(29-30):509-520. doi:10.3238/arztebl.2014.0509 PMID: 25142076; PMCID: PMC4150028 i.
- Eshtiaghi P, Gooderham MJ. Dupilumab: an evidence-based review of its potential in the treatment of atopic dermatitis. *Core Evid.* 2018;13:13-20. doi:10.2147/CE.S133661
- Harb H, Chatila TA. Mechanisms of Dupilumab. *Clin Exp Allergy.* 2020;50(1):5-14. doi:10.1111/cea.13491 Epub 2019 Sep 30 PMID: 31505066; PMCID: PMC6930967.
- Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, et al. Two phase 3 trials of Dupilumab versus placebo in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2335-2348. doi:10.1056/NEJMoa1610020
- Paller AS, Siegfried EC, Thaçi D, et al. Efficacy and safety of dupilumab with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(5):1282-1293. doi:10.1016/j.jaad.2020.06.054
- Blauvelt A, De bruin-Weller M, Gooderham M, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2017;389(10086):2287-2303. doi:10.1016/S0140-6736(17)31191-1
- Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet (London, England).* 2019;394(10209):1638-1650. doi:10.1016/S0140-6736(19)31881-1
- Mortuaire G, Michel J, Papon JF, et al. Specific immunotherapy in allergic rhinitis. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017;134(4):253-258.

23. Hoyte FCL, Nelson HS. Recent advances in allergic rhinitis. *F1000Research*. 2018;7(F1000 Faculty Rev):1333. doi:10.12688/f1000research.15367.1.
24. Scadding GK. Optimal management of allergic rhinitis. *Arch Dis Child*. 2015;100:576-582. doi:10.1136/archdischild-2014-306300
25. Brehler R, Klimek L, Kopp MV, Christian Virchow J. Specific immunotherapy—indications and mode of action. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(9):148-158. doi:10.3238/arztebl.2013.0148
26. Cox LS, Casale TB, Nayak AS, et al. Clinical efficacy of 300IR 5-grass pollen sublingual tablet in a US study: the importance of allergen-specific serum IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1327-1334.e1. doi:10.1016/j.jaci.2012.08.032
27. Didier A, Malling HJ, Worm M, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1338-1345. doi:10.1016/j.jaci.2007.07.046
28. Bousquet J, Hejjaoui A, Becker W, et al. Clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple pollen species *II. Clinical and immunologic characteristics. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:737-746.
29. Kappen JH, Durham SR, Veen HI, Shamji MH. Applications and mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2017;11(1):73-86. doi:10.1177/1753465816669662
30. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organization Journal*. 2015;8(1):17. doi:10.1186/s40413-015-0063-2
31. Novak N, Bieber T, Allam JP. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011;66(6):733-739. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02535.x
32. Kucuksezer UC, Ozdemir C, Cevhertas L, Ogulur I, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergol Int*. 2020;69(4):549-560. doi:10.1016/j.alit.2020.08.002
33. Shamji MH, Layhadi JA, Achkova D, et al. Role of IL-35 in sublingual allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(3):1131-1142.e4. doi:10.1016/j.jaci.2018.06.041
34. Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*. 2018;73(4):765-798. doi:10.1111/all.13317
35. Miyake K, Shibata S, Yoshikawa S, Karasuyama H. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy*. 2021;76(6):1693-1706. doi:10.1111/all.14662
36. Sokol CL, Medzhitov R. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. *Mucosal Immunol*. 2010;3:129-137. doi:10.1038/mi.2009.137
37. Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med*. 2005;5(2):43-49. doi:10.1007/s10238-005-0064-5
38. Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature Immunol*. 2009;10:713-720.
39. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al. The clinical utility of basophil-activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70(11):1393-1405. doi:10.1111/all.12698
40. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the clinic review series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(1):59-66. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x
41. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted quantification of *in vitro* activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2007;72:196-203.
42. Kim EH, Bird JA, Kulis M, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:640-646.e1.
43. Jones SM, Pons L, Roberts JL, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:292-300, 300.e1-97.
44. Feng M, Zeng X, Su Q, et al. Allergen immunotherapy-induced immunoglobulin G4 reduces basophil-activation in house dust mite-allergic asthma patients. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:30. doi:10.3389/fcell.2020.00030
45. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92:44-47.
46. Williams HC, Jburney PG, Hay RJ, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for atopic dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1994;131(3):383-396. doi:10.1111/j.1365-2133.1994.tb08530.x
47. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):338-351. doi:10.1016/j.jaad.2013.10.010
48. Kim DH, Li K, Seo SJ, et al. Quality of life and disease severity are correlated in patients with atopic dermatitis. *J Korean Med Sci*. 2012;27(11):1327-1332. doi:10.3346/jkms.2012.27.11.1327
49. Hongbo Y, Thomas CL, Harrison MA, Sam Salek M, Finlay AY. Translating the science of quality of life into practice: what do dermatology life quality index scores mean? *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):659-664. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23621.x PMID: 16185263.
50. cobas® e801, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Elecsys IgE II. V 1.0 german, 2016.
51. Phadia 250, Thermo Fisher Scientific, Uppsalla, Sweden. ImmunoCAP Specific-IgE Conjugate 100 and 400, revision date 2008.
52. Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland. CD203c Reagent Set Flow Cast Basophil-activation Test (BAT) Flow Cytometry. B-CCR-203Set 100 tests. Revision date:2011-05-25.
53. FlowJo™ Software for Mac Version 10.8.0. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company; 2019.
54. Lašťovička J, Budinský V, Špišek R, Bartůňková J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cell Immunol*. 2009;256(1-2):79-85. doi:10.1016/j.cellimm.2009.01.007
55. Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Vis Exp*. 2010;44:2259. doi:10.3791/2259
56. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry, Part A*. 2011;79(2):95-101. doi:10.1002/cyto.a.21010 Epub 2011 Jan 12.

57. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):179-186. doi:10.1016/j.jaci.2014.09.001
58. Chu H, Park KH, Kim SM, et al. Allergen-specific immunotherapy for patients with atopic dermatitis sensitized to animal dander. *Immun Inflamm Dis*. 2020;8(2):165-169. doi:10.1002/iid3.291
59. Hajdu K, Kapitány A, Dajnoki Z, et al. Improvement of clinical and immunological parameters after allergen-specific immunotherapy in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35(6):1357-1361. doi:10.1111/jdv.17018
60. Metz M, Staubach P, Bauer A, et al. Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of FcεRI-positive cells in the skin. *Theranostics*. 2017;7(5):1266-1276. doi:10.7150/thno.18304
61. Alizadeh Aghdam M, Knol EF, den Elzen M, et al. Response of FcεRI-bearing leucocytes to omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(3):364-371. doi:10.1111/cea.13566
62. Macglashan DW, Jr., Saini SS. Omalizumab increases the intrinsic sensitivity of human basophils to IgE-mediated stimulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4):906-911.e4. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.056
63. MacGlashan Jr. DW. Self-termination/anergic mechanisms in human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150:109-121. doi:10.1159/000218114
64. Bakker DS, van der Wal MM, Heeb LEM, et al. Early and long-term effects of dupilumab treatment on circulating T-cell functions in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2021;141(8):1943-1953.e13. doi:10.1016/j.jid.2021.01.022
65. Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The IL-4 receptor α -chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *The Journal of Immunology*. 2005;175(9):6107-6116. doi:10.4049/jimmunol.175.9.6107
66. Abdel Aziz N, Nono JK, Mpotje T, Brombacher F. The Foxp3+ regulatory T-cell population requires IL-4R α signaling to control inflammation during helminth infections. *PLoS Biol*. 2018;16(10):e2005850. doi:10.1371/journal.pbio.2005850

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Layritz A-S, Galicia-Carreón J, Benfadal S, Novak N. Differences in allergen-specific basophil activation and T cell proliferation in atopic dermatitis patients with comorbid allergic rhinoconjunctivitis treated with a monoclonal anti-IL-4R α antibody or allergen-specific immunotherapy. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11:e808. doi:10.1002/iid3.808

3. Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Natalija Novak, die diese Arbeit angeregt, ihren Fortgang gefördert, wissenschaftlich begleitet und betreut hat.

Mein Dank geht weiterhin an die Mitarbeiter*innen der allergologischen Ambulanz und der AG Novak für die angenehme Zusammenarbeit, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen motivierenden Worte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und auf meinem Weg zur Dissertation immer wohlwollend und vielfältig unterstützt haben.