

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 436**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015 E 15001472 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3093022**

54 Título: **Inhibidores de GATA-3 para su uso en el tratamiento del asma mediada por Th2**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2020

73 Titular/es:

**STERNA BIOLOGICALS GMBH & CO. KG
(100.0%)
Bismarckstrasse 7
35037 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**BILLE, JOACHIM y
RENTZ, JONAS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 753 436 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de GATA-3 para su uso en el tratamiento del asma mediada por Th2

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a inhibidores de GATA-3 para su uso en el tratamiento del asma mediada por Th2, en particular a enzimas de ADN dirigidas a la GATA-3 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece asma alérgica, en el que el paciente se caracteriza por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, particularmente del 4% o más, más particularmente del 5% o más; y/o (ii) un recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.

15 **Antecedentes de la invención**

Las inflamaciones crónicas constituyen un área de un problema médico cada vez mayor de gran importancia socioeconómica. Esto incluye en particular los siguientes grupos de enfermedades: enfermedades autoinmunes y enfermedades del área de enfermedades reumáticas (manifestaciones, entre otras, en la piel, pulmones, riñones, sistema vascular, sistema nervioso, tejido conectivo, sistema locomotor, sistema endocrino), reacciones alérgicas de tipo inmediato y asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), arterioesclerosis, psoriasis y eccema de contacto y reacciones de rechazo crónicas después de trasplantes de órganos y médula ósea. Muchas de estas enfermedades muestran una prevalencia creciente en las últimas décadas, no solo en las naciones industrializadas, sino a veces en todo el mundo. Por ejemplo, en Europa, América del Norte, Japón y Australia, más del 20% de la población padece enfermedades alérgicas y asma. Las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas son actualmente la quinta causa de muerte más frecuente en todo el mundo y, de acuerdo con los cálculos de la OMS, representarán la tercera causa de muerte más frecuente en el año 2020. La arterioesclerosis con las enfermedades secundarias de infarto cardíaco, accidente vascular cerebral y enfermedad arterial periférica es líder mundial en estadísticas de morbilidad y mortalidad. Junto con la neurodermatitis, la psoriasis y el eccema de contacto son en general las enfermedades inflamatorias crónicas más frecuentes de la piel.

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica común de las vías respiratorias, que comprende obstrucción variable de las vías respiratorias, hipersecreción del moco, inflamación de las vías respiratorias y aumento de la hiperreactividad de las vías respiratorias. La desregulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas se considera que juega un papel central en el desarrollo de la enfermedad. Se ha identificado un alto grado de heterogeneidad interindividual entre diferentes poblaciones de pacientes, lo que conlleva la definición de varios fenotipos clínicos y endotipos fisiopatológicos.¹ La condición de asma fisiopatológica mejor estudiada es la respuesta (alérgica) mediada por T-helper (TH)-2^{2,3}, que también se denomina "endotipo molecular TH2"^{4,5}.

Aproximadamente la mitad de los pacientes con asma, de forma independiente de la gravedad de la enfermedad, presentan este endotipo TH2, que se caracteriza por una activación predominante de células TH2 que producen citocinas como la IL-4, IL-5 e IL-13. La expresión y producción de todas estas citocinas Th2 se controla críticamente mediante el factor de transcripción de dedo de zinc GATA-3, que es esencial para la diferenciación de células Th2 y la activación, y consideran el factor de transcripción maestro de la vía de activación inmune de tipo 2 (TH2)⁶. GATA-3 es el principal responsable de la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de las células TH2. En el proceso, la diferenciación de los linfocitos TH2 está controlada principalmente por dos vías de transmisión de señales, el receptor de linfocitos T (TZR) y la vía del receptor de IL-4: Las señales reenviadas desde TZR activan los factores de transcripción específicos de células TH2 cMaf y GATA-3, así como también los factores de transcripción NFAT y AP-1. La activación del receptor de IL-4 da como resultado la unión de STAT6 en el dominio citoplasmático del receptor de IL-4, donde es fosforilada por las quinasas Jak1 y Jak3. La fosforilación por su parte da como resultado la dimerización y translocación de STAT6 en el núcleo, donde STAT6 activa la transcripción de GATA-3 y otros genes. GATA-3 es un factor de transcripción de dedo de zinc que se expresa exclusivamente en células TH2 maduras, no en células TH1. La sobreexpresión de GATA-3 se ha observado en muestras de lavado broncoalveolar y biopsias pulmonares de pacientes con asma severa a pesar de un tratamiento óptimo de acuerdo con las pautas de GINA⁷. Esta red inmune es, por lo tanto, un objetivo terapéutico prometedor. Además de los anticuerpos monoclonales anti-IgE ya aprobados, se están desarrollando varias nuevas terapias dirigidas a componentes individuales en dirección 3' del factor de transcripción GATA-3⁸.

Un enfoque alternativo se dirige directamente al factor de transcripción estratégico GATA-3 para interferir con todas las moléculas/citocinas en dirección 3' simultáneamente. Se ha analizado la expresión de GATA-3 para determinar el fenotipo molecular de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias crónicas y estratificar a los pacientes en subgrupos con "TH2 alto" y "TH2 bajo", y se sugirió tratar a pacientes con "TH2 alto" con inactivadores específicos de GATA-3 (WO 2014/040891). Dado que GATA-3 solo se expresa intracelularmente, se han desarrollado inactivadores de GATA-3 basados en ácido nucleico, tales como enzimas de ADN específicas de GATA-3, con capacidades de penetración celular in vivo (documento WO 2005/033314).

Sin embargo, en los trastornos inflamatorios crónicos, como en el asma alérgica, el problema de identificar un esquema de tratamiento adecuado es más complejo. Se sabe que en las reacciones alérgicas, el número de eosinófilos aumenta, lo que produce eosinofilia en ciertos pacientes. Sin embargo, se sabe que los eosinófilos también expresan GATA-3 (Zon y col., Blood 81 (1993) 3234-3241), dado que la expresión de GATA-3 no se limita a los linfocitos T, y la expresión de GATA-3 también se pudo confirmar en basófilos, mastocitos y células epiteliales. GATA-3 juega un papel central en la inmunopatogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, en particular del asma alérgica. Se demostró que una sensibilización aguda y una provocación con alérgenos produce un alto grado de acumulación de eosinófilos en las vías respiratorias con un reclutamiento mínimo de linfocitos (Paul Justice y col., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282 (2002) L302-L309), y esa provocación con alérgenos induce la expresión de genes de GATA-3 y genes sensibles a GATA-3 en eosinófilos pulmonares. En resumen, se postuló que los eosinófilos podrían proporcionar retroacción positiva para la respuesta inflamatoria. Por el contrario, se había demostrado que en la inflamación crónica alérgica de las vías respiratorias, como en el asma alérgica, el 60-90% de las células positivas para GATA-3 en el tejido pulmonar humano eran linfocitos T positivos para CD3, y solo menos del 15% de las células se identificaron como eosinófilos (Nakamura y col., J Allergy Clin Immunol 103 (1999) 215-222). Por lo tanto, se concluyó que en el asma humano, la expresión de eosinófilos de los genes sensibles a GATA-3 probablemente no era la fuente principal de citocinas proinflamatorias que provocan la inflamación de las vías respiratorias, pero podría proporcionar una fuente redundante de citocinas TH2 para apoyar el proceso inflamatorio crónico (Paul Justice y col., loc. cit.).

Por lo tanto, si bien GATA-3 en las células TH2 parece ser un objetivo atractivo para la intervención terapéutica en el caso de trastornos alérgicos como el asma alérgico, se desconoce por completo, qué efecto podría tener, si es que hay alguno, la presencia simultánea de eosinófilos, que también expresen GATA-3, en el éxito de dicho enfoque de tratamiento. Además, no era predecible en absoluto, si sería posible identificar ciertas poblaciones de pacientes que se beneficien particularmente de este enfoque.

Por lo tanto, todavía existe una gran necesidad insatisfecha de desarrollar terapias novedosas y eficaces para pacientes con asma alérgica. La solución presentada en esta solicitud, que está basada en la identificación de ciertas poblaciones de pacientes que se benefician particularmente de la administración de ciertos inhibidores de GATA-3, no se conocía hasta ahora y ninguna persona con experiencia ordinaria en la técnica podía esperarla.

Sumario de la invención

La invención se refiere a inhibidores de GATA-3 para su uso en el tratamiento del asma mediada por Th2, en particular a enzimas de ADN dirigidas a la GATA-3 para su uso en el tratamiento de ciertas subpoblaciones de pacientes que padecen asma alérgica.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3, particularmente una enzima de ADN dirigida a la GATA-3, para su uso en el tratamiento de un paciente que padece asma mediada por Th2, en el que el paciente es caracterizado por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, particularmente del 4% o más, más particularmente del 5% o más; y/o (ii) recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un método para tratar a un paciente que padece asma mediada por Th2, en particular asma alérgica, en el que el paciente se caracteriza por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, particularmente de 4 % o 5% o más, respectivamente; y/o (ii) un recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más, en el que dicho método comprende la etapa de administrar un inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3, particularmente una enzima de ADN dirigida a la GATA-3, a dicho paciente.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra el diseño del estudio y el diagrama de flujo. El panel **A** muestra una descripción general del diseño del estudio y los principales procedimientos del estudio. El panel **B** resume el número de pacientes registrados e incluidos en los análisis. Veintiún pacientes en el grupo SB010 completaron todas las evaluaciones del estudio, un paciente no fue elegible para la evaluación debido a la administración de una dosis diferente de alérgenos en las provocaciones con alérgenos previas y posteriores al tratamiento. En el grupo placebo, dos pacientes no fueron elegibles para la evaluación (1 paciente requirió SABA durante la provocación con alérgenos; 1 paciente recibió una dosis diferente de alérgenos en las provocaciones con alérgenos previas y posteriores al tratamiento). Por lo tanto, 21 pacientes evaluables en el grupo SB010 y 19 pacientes evaluables en el grupo placebo completaron el estudio "": En el grupo de placebo faltan datos de LAR para 1 paciente, dado que la espirometría en serie se detuvo involuntariamente 4 horas después de la provocación del alérgeno.

La **Figura 2** muestra los cambios en la función pulmonar después de la provocación con alérgenos antes y

después de 4 semanas de tratamiento. **Figura 2A:** Se muestran los niveles de FEV₁ como porcentaje del valor inicial del FEV₁ después de las provocaciones con alérgenos. Las provocaciones con alérgenos se realizaron antes del período de tratamiento (○) y después de completar el período de tratamiento de 4 semanas (●). La función pulmonar se registró durante siete horas después de la provocación con alérgenos. Se representan las medias aritméticas por grupo de tratamiento +/-SEM. El tratamiento con SB010 (▲) atenuó significativamente la respuesta asmática de fase temprana (P=0,04, prueba de suma de rango de Wilcoxon) así como la respuesta asmática de fase tardía (P=0,02, ANCOVA) en comparación con el placebo (■). Los resultados para el grupo de estudio en su conjunto se muestran en el panel **A**; subgrupos especificados previamente con eosinófilos en sangre ≥ 4% (panel **B**) y FeNO ≥ 40 ppb (panel **C**). Los niveles de eosinófilos en sangre y FeNO se midieron antes de la aleatorización. Ambos subgrupos consisten en 12 pacientes con placebo SB010/12, con 9 pacientes en el grupo SB010 y 11 pacientes en el grupo placebo presentes en ambos subgrupos. EAR y LAR mejoraron significativamente en el subgrupo de eosinófilos en sangre ≥ 4% (P=0,02 y P=0,05 respectivamente) y en el subgrupo FeNO ≥ 40 ppb (P=0,02 y P=0,05 respectivamente). Tenga en cuenta: el eje X extendido durante la primera hora después de la provocación con alérgenos se amplía. **Figura 2B:** La función pulmonar se expresa como porcentaje del valor inicial del FEV₁ a lo largo del tiempo. Se muestran curvas separadas de previas al tratamiento y después del tratamiento para SB010 y tratamiento con placebo para los tres subgrupos con eosinófilos en sangre ≥ 3%, ≥ 4% y ≥ 5%, respectivamente. Se representan las medias aritméticas por grupo de tratamiento más/menos SEM. Las cajas de inserción indican el % de mejora del área bajo la curva de FEV₁ (AUC) en el grupo de tratamiento SB010 en comparación con el placebo para la respuesta de fase temprana (caja izquierda) y la respuesta de fase tardía (caja derecha). Análisis estadístico por ANCOVA. Tenga en cuenta: Eje X extendido a diferentes escalas durante la primera hora después de la provocación con alérgenos. Mejora continua de la función pulmonar basada en los recuentos de eosinófilos en sangre según el valor inicial. **Figura 2C:** Aquí, las respuestas a las provocaciones con alérgenos después de un tratamiento de 28 días con SB010 se muestran combinadas para los tres subgrupos estratificados en los recuentos sanguíneos de eosinófilos según el valor inicial. A modo de comparación, se muestra la respuesta al placebo después del tratamiento para el subgrupo de eosinófilos en sangre ≥ 3% que no difiere significativamente de las respuestas al placebo en los otros dos subgrupos. Para más detalles véase la leyenda de la Figura 2.

La **Figura 3** muestra el cambio absoluto individual en el área bajo la curva (AUC) durante las respuestas asmáticas tardías (LAR). Para cada paciente en el grupo de tratamiento SB010 (n=21) y el grupo placebo (n=18), se calculó y se representó el cambio absoluto en el valor de AUC durante las respuestas de fase tardía (LAR). La línea representa la media; los puntos negros: pacientes con recuentos sanguíneos de eosinófilos ≥ 4% al inicio; los círculos: pacientes con recuentos de eosinófilos en sangre < 4% al inicio. Las respuestas LAR no difieren significativamente entre estos dos subgrupos. Para todo el grupo, el tratamiento con SB010 atenuó significativamente la respuesta asmática de fase tardía (P=0,02, Figura 2). Puntos de datos individuales véase las tablas del Apéndice Complementario S4A y S4B.

La **Figura 4** muestra el cambio en los niveles plasmáticos de IL-5 después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento con SB010 o placebo. Se muestran las medias ± SEM de cambios absolutos en las concentraciones plasmáticas de IL-5 de pacientes que presentaron niveles de IL-5 en plasma detectables en respuesta a la provocación con alérgenos previa al tratamiento que fueron 4,21 ± 1,51pg/ml en el grupo SB010 (13 pacientes) y 4,03 ± 0,92pg/ml en el grupo placebo (12 pacientes), respectivamente. La diferencia es estadísticamente significativa con P=0,05 (*).

La **Figura 5** (= **Figura S1** del Apéndice Complementario) muestra el papel central de las células Th2 y GATA-3 en la patogénesis del asma alérgica y el modo de acción de SB010, como se analiza en el Apéndice Complementario.

La **Figura 6** (= **Figura S2** del Apéndice Complementario) muestra la actividad de escisión del ARNm y la enzima de ADN dirigida a GATA-3 como se analiza en el Apéndice Complementario. Actividad de escisión in vitro de la enzima de ADN específica de GATA hgd40 para el ARN(c) copia de GATA-3. El marco completo de lectura abierto de ARNc transcrito in vitro se incubó durante diferentes intervalos de tiempo (cinética - **A**) o con dosis crecientes (dependencia de la dosis - **B**) de la hgd40 y los productos de escisión resultantes se separaron y se tiñeron con bromuro de etidio en geles de agarosa. De manera similar, el ARNc de GATA-3 se incubó con enzimas de ADN inespecíficas con dominios de unión codificados pero con una secuencia catalítica intacta (enzimas de ADN codificadas 1-6) o enzimas de ADN dirigidas contra una secuencia de factor de transcripción diferente (factor de transcripción de caja T Tbet, Tbet enzimas de ADN 1-3) para demostrar la especificidad de la secuencia del enfoque de enzima de ADN (**C**).

La **Figura 7** (= **Figura S3** del Apéndice Complementario) muestra la bioactividad de la hgd40, el componente activo de SB010 y los efectos del tratamiento con la hgd40 en linfocitos T primarios humanos y explantes de tejido nasal. **A** - Reducción de la expresión de la proteína GATA-3 por la transfección de hgd40 de células Th2 polarizadas humanas. **B** - Reducción de la secreción de IL-13 por la transfección de hgd40 de células Th2 polarizadas humanas. Los datos de la Figura S2A y S2B representan la tinción intracelular de células transfectadas positivas para FAM y se presentan como media + SEM para n = 8-10 por grupo. **C** y **D** - Absorción de la hgd40 marcada por fluorescencia (color rojo) por linfocitos T CD3+ (color verde) presentes en los explantes

de tejido de pólipos nasales humanos obtenidos de pacientes que padecen rinosinusitis crónica con pólipos nasales (CRSwNP). Los resultados se obtuvieron por microscopía de escaneo láser confocal y se presentaron como una superposición de ambos colores para las células no tratadas (Figura C) y tratadas con la hgd40 (Figura D). **E** - Expresión de ARNm de GATA-3 en explantes de tejido de pólipos nasales humanos obtenidos de pacientes que padecen CRSwNP en un ensayo de tejido *ex vivo*. Los datos se expresan como unidades de expresión relativa normalizadas y se presentan como media + SEM para n=6 por grupo. **F** - Liberación de proteína IL-5 de pólipos nasales humanos en un ensayo de tejido *ex vivo*. Los datos se presentan como media + SEM para n=16 por grupo. La significación se calculó mediante la prueba de la t de Student con GraphPad Prism 5; (*) P<0,05; (**) P<0,01. Para detalles técnicos, véase el Apéndice Complementario, Material y Métodos.

La **Figura 8 (= Figura S4 del Apéndice Complementario)** muestra la diferencia promedio de tratamiento en toda la población ITT y subgrupos especificados previamente. Esta es una visualización de las diferencias grupales que reflejan el delta de cambios relativos entre el tratamiento con SB010 y el grupo placebo. Los valores para toda la población de estudio se muestran en la **Tabla S2**, los valores para el subgrupo especificado previamente de pacientes con eosinófilos en sangre $\geq 4\%$ se representan en la **Tabla S3a**, y los valores para el subgrupo especificado previamente de pacientes con FeNO ≥ 40 ppb se encuentran en la **tabla S3B**. Arriba: el cambio porcentual en la función pulmonar entre el pre y el postratamiento se expresa como área bajo la curva (AUC). Abajo: se expresan los cambios porcentuales en la función pulmonar como disminución máxima en el FEV₁. EAR: respuesta asmática de fase temprana; LAR: respuesta asmática de fase tardía.

La **Figura 9 (= Figura S5 del Apéndice Complementario)** muestra el efecto del tratamiento con SB010 y placebo sobre los eosinófilos de esputo (en porcentaje). Las mediciones se realizaron en muestras de esputo inducido, antes y después de la inhalación de alérgenos tal como se describe en Material y Métodos. La inhalación de alérgenos se realizó antes y después de 28 días de tratamiento con SB010 (\blacktriangle) y placebo (\blacksquare). Se muestran los valores medianos y los intervalos de percentiles 25 y 75 para cada momento en el tiempo y grupo de tratamiento. Panel izquierdo: el grupo en su conjunto; panel central: subgrupo especificado previamente, eosinófilos en sangre $\geq 4\%$; panel derecho: subgrupo especificado previamente, FeNO ≥ 40 ppb. En el grupo en su conjunto, el cambio absoluto en el porcentaje de eosinófilos después de la provocación muestra una tendencia no significativa (P=0,06) entre los grupos de tratamiento, que se volvió significativa en el subgrupo de eosinófilos (P=0,009) y en el subgrupo FeNO (P=0,02). Esta disminución en porcentaje de eosinófilos de esputo no se debió a una mayor afluencia de neutrófilos, como se representa en la **Tabla S8** en el Apéndice Complementario.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a inactivadores basados en ácido nucleico, particularmente enzimas de ADN, para su uso en el tratamiento del asma mediada por Th2, en el que dichos inactivadores basados en ácido nucleico, particularmente enzimas de ADN, están dirigidas a la GATA-3 para su uso en el tratamiento de ciertas subpoblaciones de pacientes.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3, particularmente una enzima de ADN dirigida a la GATA-3, para su uso en el tratamiento de un paciente que padece asma mediada por Th2, en el que el paciente es caracterizado por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, particularmente del 4% o más, más particularmente del 5% o más; y/o (ii) recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un método para tratar a un paciente que padece asma mediada por Th2, en particular asma alérgica, en el que el paciente se caracteriza por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, particularmente de 4% o 5% o más, respectivamente; y/o (ii) un recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más, en el que dicho método comprende la etapa de administrar un inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3, particularmente una enzima de ADN dirigida a la GATA-3, a dicho paciente.

En el contexto de la presente invención, el término "inactivador basado en el ácido nucleico" se refiere a una sustancia basada en ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia del gen diana, y que inactiva la actividad del gen diana, por ejemplo bloqueando la reduplicación, transcripciones o desplazamiento, o escindiendo la secuencia diana. Un inactivador basado en el ácido nucleico puede consistir en ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos que no existen de manera natural y mezclas de los mismos, y puede ser una secuencia monocatenaria, una secuencia bicatenaria o una mezcla de las mismas. Los inactivadores basados en ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas de siARN, moléculas de shARN y enzimas de ADN.

En el contexto de la presente invención, el término "enzimas de ADN" se refiere a moléculas de ADN sintéticas monocatenarias catalíticamente activas, que no se existen en la naturaleza. Las enzimas de ADN de la familia 10-23 representan una nueva clase de moléculas antisentido, que se desarrollaron en la década de 1990, pero

solo recientemente han encontrado aplicaciones clínicas ⁹.

En el contexto de la presente invención, el término "familia 10-23" se refiere a un modelo general de enzima de ADN (Sontoro & Joyce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (1997) 4262-4266). Las enzimas de ADN del modelo 10-23, también denominadas "10-23 enzimas de ADN" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, que están flanqueados por dos dominios de unión al sustrato (véase el documento WO 2005/033314). Las ventajas potenciales de las enzimas de ADN incluyen una estabilidad relativamente alta y ninguna dependencia de las enzimas intracelulares.

En un modo de realización particular, el dominio catalítico tiene la secuencia ggctagctacaacga (SEQ ID No.: 1). La longitud de los dominios de unión al sustrato es variable: son de igual o diferente longitud. En modos de realización particulares, los dominios de unión al sustrato consisten en entre 6 y 14 nucleótidos, más particularmente en cada caso de al menos nueve nucleótidos. Dichas enzimas de ADN comprenden la secuencia general nnnnnnnnggctagctacaacgannnnnnnnn (SEQ ID NO 2). En modos de realización particulares de la presente invención, los dominios de unión al sustrato se unen al ARNm que codifica la proteína GATA-3.

El dominio catalítico central especificado ggctagctacaacga es solo un modo de realización particular. Un experto en la materia tiene conocimiento del hecho de que se pueden obtener "10-23 enzimas de ADN" con actividad biológica comparable con un dominio catalítico modificado.

En un modo de realización particular, los dominios de unión al sustrato son completamente complementarios a las regiones que flanquean el sitio de escisión. Sin embargo, para unir el ARN diana y escindirlo, la enzima de ADN no necesariamente tiene que ser completamente complementaria. Las enzimas de ADN del tipo 10-23 escinden el ARNm diana en secuencias de purina-pirimidina. Dentro del alcance de la presente invención, las enzimas de ADN comprenden preferentemente las enzimas de ADN activas in vivo contra la GATA-3 de acuerdo con el documento WO 2005/033314.

En modos de realización particulares de la presente invención, el paciente tiene un recuento de eosinófilos en sangre del 4% o más.

En modos de realización particulares, el paciente tiene un recuento de eosinófilos en sangre del 5% o más.

En modos de realización particulares de la presente invención, el paciente tiene un recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más.

En modos de realización particulares, el paciente tiene un recuento de eosinófilos en sangre de $450 \times 10^6/L$ o más.

En modos de realización particulares de la presente invención, el recuento sanguíneo de eosinófilos se determina mediante (i) recuento sanguíneo diferencial automático automatizado (por ejemplo, usando la Tecnología Coulter o la Tecnología Sysmex u otras tecnologías), o (ii) diferenciación celular microscópica manual usando frotis de sangre convencionales.

En modos de realización particulares de la presente invención, el paciente tiene óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.

En modos de realización particulares de la presente invención, el óxido nítrico espiratorio fraccional se determina usando el dispositivo portátil NIOX MINO®.

En modos de realización particulares de la presente invención, la enzima de ADN dirigida a la GATA-3 se selecciona de entre las secuencias hgd1 a hgd70 del documento WO 2005/033314 (véase la Figura 3 del documento WO 2005/033314), particularmente seleccionada de las secuencias hgd11, hgd13, hgd17 y hgd40, más particularmente la secuencia hgd40 (5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG; SEQ ID NO: 3).

En el contexto de la presente invención, el término "hgd40" se refiere a una enzima de ADN dirigida a la GATA-3, que consiste en 34 bases con la secuencia 5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG. Las nueve bases en la región 3' y 5' forman dos dominios de unión, que se unen de manera muy específica al ARNm diana de GATA-3. El núcleo central de la molécula representa el dominio catalítico que explica la escisión del objetivo después de la unión de la hgd40 al ARNm de GATA-3¹⁰ (véase las Figuras 5 y 6). La sustancia farmacológica hgd40 se caracteriza por una alta bioactividad y biodisponibilidad en el sitio de administración de fármacos por inhalación.¹²

En modos de realización particulares de la presente invención, la hgd40 está comprendida en una formulación que puede administrarse a un paciente por vía oral, rectal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intratecal, intravascular, localmente (polvo, pomada o gotas) o en forma de aerosol o inhalante. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente fisiológicamente aceptable y posibles conservantes, tampones o propulsores, dependiendo de los requisitos.

En modos de realización particulares de la presente invención, la hgd40 está comprendida en una formulación para inhalación.

5 En modos de realización particulares de la presente invención, dicha hgd40 se disuelve en PBS.

10 El médico a cargo determinará el tipo de dosificación y el esquema de dosificación de acuerdo con los factores clínicos. Un experto en la materia es consciente del hecho de que el tipo de dosificación y el esquema de dosificación dependen de diferentes factores como, por ejemplo, el tamaño corporal, el peso, la superficie corporal, la edad, el sexo o la salud general del paciente, pero también depende del agente a administrar, la duración y el tipo de administración y de otros medicamentos que pueden administrarse en paralelo. En el proceso, de acuerdo con un modo de realización especialmente ventajoso, la cantidad del ingrediente activo del medicamento puede adaptarse al nivel de expresión medido. Por lo tanto, en el caso de la colocación en el subgrupo "Th2 alto" y una expresión del gen GATA-3 muy alta establecida, se puede administrar una dosis incrementada del ingrediente activo, en particular una enzima de ADN específica para la GATA-3 específica. En consecuencia, en el caso de la colocación en el subgrupo "Th1 alto" y una expresión del gen Tbet muy alta establecida, se puede administrar una dosis incrementada del ingrediente activo, en particular de una enzima de ADN específica para Tbet.

20 En modos de realización particulares de la presente invención, la dosificación consiste en entre 5 y 50 mg de la hgd40, particularmente entre 5 y 20 mg de la hgd40, particularmente 10 mg de la hgd40. En modos de realización particulares, la dosificación se disuelve en 2 ml de PBS. En modos de realización particulares, estas dosificaciones son las cantidades de dosificación diarias.

25 En modos de realización particulares de la presente invención, dicho inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 se administra una vez al día, dos veces al día o tres veces al día, particularmente una vez al día.

30 En modos de realización particulares de la presente invención, dicha enzima de ADN dirigida a la GATA-3 se administra una vez al día durante 28 días consecutivos en tratamiento continuo, en particular tratamiento de mantenimiento.

35 En modos de realización particulares de la presente invención, dicho inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 se usa como tratamiento complementario para una o más terapias inhaladas u orales para el tratamiento del asma seleccionada entre la lista de: corticosteroides, beta-agonistas de acción prolongada (LABA), antagonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA), antileucotrienos, beta-agonistas beta de acción corta (SABA), anticolinérgicos y anticuerpos monoclonales.

40 Otras características, detalles y ventajas de la invención surgen de la redacción de las reivindicaciones, así como de la siguiente descripción de modos de realización ejemplares con la ayuda de los dibujos.

40 Ejemplos

45 Ejemplo 1: Estudio clínico "Atenuación de las respuestas asmáticas inducidas por alérgenos mediante enzima de ADN inhalada específica de GATA-3"

RESUMEN

ANTECEDENTES

50 El fenotipo más frecuente de asma se caracteriza por una inflamación dominada por eosinófilos mediada por TH2. El direccionamiento terapéutico de GATA-3, el factor de transcripción maestro de la vía TH2, puede ser favorable. Evaluamos la seguridad y la eficacia de una nueva enzima de ADN dirigida específicamente contra ARNm de GATA-3 (SB010).

55 MÉTODOS

60 En este ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, multicéntrico, los pacientes con asma alérgica con eosinofilia en el esputo que presentan una respuesta asmática bifásica de fase temprana y tardía (EAR y LAR) después de la provocación con alérgenos fueron asignados para recibir 10 mg de SB010 (21 evaluables pacientes) o placebo (19 pacientes evaluables) por inhalación una vez al día durante días. La provocación con alérgenos se realizó antes y después del tratamiento. El cambio en el área bajo la curva de FEV₁ (AUC) en LAR fue el punto final primario.

65 RESULTADOS

Después de 28 días de tratamiento, SB010 atenuó la media de AUC LAR en un 34% en comparación con el

tratamiento previo, mientras que se observó un aumento del 1% de AUC LAR en el grupo placebo (P=0,02) - AUC EAR se atenuó en un 11% con SB010, frente a un aumento del 10% después del placebo (P=0,03). Estos efectos fueron más pronunciados en subgrupos especificados previamente de pacientes con eosinofilia en sangre $\geq 4\%$ (mejoría LAR 41,7%, P=0,05; mejoría de EAR 28,3%, P=0,02) o FeNO ≥ 40 ppb. La inhibición de LAR por SB010 se asoció con la atenuación de la eosinofilia del esputo inducido por alérgenos (P=0,06 grupo completo; P=0,009 subgrupo de eosinófilos; P=0,02 subgrupo de FeNO), niveles bajos de triptasa de esputo (P=0,05) y niveles plasmáticos de IL-5 (P=0,05). Los niveles de FeNO inducidos por alérgenos y la hiperreactividad de las vías respiratorias a la metacolina no se vieron afectados por el tratamiento.

10 CONCLUSIONES

El tratamiento con SB010 atenuó significativamente tanto LAR como EAR en asma alérgica después de la provocación con alérgenos. El análisis de biomarcadores confirmó un efecto pronunciado sobre las respuestas inflamatorias reguladas por TH2 (Ensayos clínicos - número de gobierno, NCT 01743768).

15 INTRODUCCIÓN

El núcleo central del medicamento activo de SB010 representa el dominio catalítico que explica la escisión del objetivo después de la unión de la hgd40 al ARNm de GATA-3¹⁰ (véase las Figuras S1 y S2 en el Apéndice Complementario). Sel y col.¹¹ informaron sobre el desarrollo de enzimas de ADN capaces de escindir el ARNm de GATA-3 y demostraron su eficacia en modelos preclínicos de inflamación alérgica de las vías respiratorias. La sustancia farmacológica, hgd40, se caracteriza por una alta bioactividad y biodisponibilidad en el sitio de administración de fármacos por inhalación¹² y, por lo tanto, se eligió para un mayor desarrollo clínico; la hgd40 redujo significativamente el ARNm y la proteína de GATA-3, así como, posteriormente, la producción de citocinas TH2 en linfocitos T humanos y explantes de tejido (Figura S3, Apéndice Complementario). Se excluyeron los efectos no deseados fuera del objetivo¹³ y no se identificaron problemas importantes de seguridad en un extenso programa de toxicología¹⁴. El medicamento correspondiente, SB010, se investigó en tres ensayos recientes completamente aleatorizados, controlados con placebo, de fase I de aumento de dosis (documento original en revisión). Los resultados prometedores justificaron un ensayo de fase IIa para evaluar la eficacia de SB010. Este estudio representa la primera prueba de fase IIa de una enzima de ADN inhalada hasta la fecha.

MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO Y SUPERVISIÓN

Este estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo se llevó a cabo en 7 sitios de estudio especializados en investigación respiratoria en Alemania entre enero (primer paciente registrado) y octubre de 2013 (última visita del último paciente). Después de las evaluaciones de cribado y de los valores iniciales, los participantes fueron asignados al azar mediante una lista de aleatorización generada centralmente (Inamed GmbH, Múnich, Alemania) sin estratificación a un período de tratamiento de 4 semanas de tratamiento activo o placebo. Se realizaron tres provocaciones con alérgenos inhalados en el cribado (elegibilidad), antes de la aleatorización (previa al tratamiento) y el día 28 (después del tratamiento). El ensayo fue aprobado por la agencia reguladora alemana "Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)" y por comités de ética centrales y locales en cada centro participante antes de comenzar. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de buena práctica clínica y la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de realizar cualquier procedimiento específico del estudio. Los datos se recopilaron en cada sitio de estudio y se entraron en la base de datos de INAMED GmbH (Gauting, Alemania). El análisis estadístico fue realizado de forma independiente por FGK Clinical Research GmbH (Múnich, Alemania). El primer borrador del documento original fue preparado por los primeros y últimos autores, quienes también tomaron la decisión de enviar el documento original para su publicación. Un escritor médico profesional financiado por el patrocinador dio su apoyo en la redacción y la edición. Los primeros y últimos autores, y los autores que son empleados del patrocinador, avalan la exactitud e integridad de los datos, el análisis estadístico y la fidelidad del ensayo en el protocolo final.

55 PACIENTES

Reclutamos pacientes varones caucásicos de edades comprendidas entre 18 y 64 años, que habían sido diagnosticados con asma leve de acuerdo con las pautas de GINA¹⁵ al menos 6 meses antes del cribado y que no fueran tratados con medicamentos para el asma distintos de los broncodilatadores inhalados de acción corta. En el cribado, el FEV₁ tenía que ser $\geq 70\%$ de lo normal previsto al menos 6 horas después de cualquier toma de broncodilatadores de acción corta. La naturaleza alérgica de su asma tuvo que demostrarse mediante una prueba de punción cutánea positiva a aeroalérgenos comunes y respuesta temprana y respuesta de fase tardía inducida por alérgenos positivos (disminución de $\geq 20\%$ y $\geq 15\%$ en el FEV₁, respectivamente). La presencia de eosinófilos en el esputo tuvo que demostrarse antes o después del cribado de la provocación con alérgenos. Los detalles completos de los criterios de inclusión y exclusión se pueden encontrar en el Apéndice Complementario.

TRATAMIENTOS DE ESTUDIO

El medicamento SB010 era 10 mg de enzima de ADN específica de GATA-3 humana hgd40 (fabricada por BioSpring GmbH, Fráncfort, Alemania) en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (o placebo correspondiente). Los medicamentos finales se prepararon centralmente (BAG Health Care GmbH, Lich, Alemania) con un embalaje idéntico para asegurar el enmascaramiento. El medicamento o placebo se administró una vez al día por la mañana por inhalación controlada de flujo y volumen que duró aproximadamente 3-8 minutos durante 28 días consecutivos usando un nebulizador AKITA² APIXNEB (Activaero GmbH, Gemünden, Alemania) para asegurar la deposición optimizada del medicamento¹⁶. Antes de la inscripción, los pacientes recibieron formación obligatoria en el uso del dispositivo. En cada visita durante el período de tratamiento, se administró tratamiento activo o placebo en el sitio del estudio bajo la supervisión del personal del estudio. Las dosis restantes se autoadministraron y se verificó el cumplimiento utilizando la tarjeta inteligente del dispositivo.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En la Figura 1A se muestra una descripción general de los principales procedimientos e intervenciones del estudio (se puede encontrar un resumen completo de los procedimientos del estudio en el Apéndice Complementario).

- Provocación de alérgenos y pruebas de función pulmonar

El alérgeno adecuado para la provocación del alérgeno se identificó mediante una prueba de punción cutánea en la primera visita de cribado (para más detalles, véase la Tabla S1 en el Apéndice Complementario). Una prueba de dilución posterior por punción cutánea en la segunda visita del cribado (al menos 1 semana después de la primera) junto con la capacidad de respuesta de las vías respiratorias (por provocación con metacolina) se utilizó para definir una concentración inicial segura para la provocación de alérgenos de cribado¹⁷. Se administraron concentraciones crecientes de aeroalérgenos inhalados hasta que se alcanzó una disminución $\geq 20\%$ en el FEV₁¹⁸. Las últimas tres etapas de concentración de aeroalérgenos inhalados que condujeron a una disminución del 20% en el FEV₁ se administraron antes de la aleatorización (previa al tratamiento) y después del período de tratamiento de 28 días (después del tratamiento) de manera idéntica¹⁹. Las mediciones de espirometría en serie se realizaron por duplicado entre 10 y 180 minutos (respuesta asmática de fase temprana, EAR) y entre 7 horas (respuesta asmática de fase tardía, LAR) después de la provocación con alérgenos de acuerdo con las pautas recientes²⁰. Se implementaron los tiempos de lavado adecuados entre las provocaciones para asegurar que los niveles de FEV₁ y FeNO volvieran a los valores iniciales en todos los pacientes antes de provocaciones adicionales.

- Prueba de provocación con metacolina

La capacidad de respuesta de las vías respiratorias se evaluó en los momentos indicados en la Figura 1A como la concentración de metacolina (Provocholine, Metapharm Inc., Brantford, ON, Canadá), lo que provocó una disminución de $\geq 20\%$ en el FEV₁ (la concentración de PC20) de acuerdo con las pautas de ATS²¹.

- Medición de óxido nítrico exhalado

Los niveles de óxido nítrico espiratorio fraccional (FeNO) se midieron en los tiempos indicados en la Figura 1A utilizando el dispositivo portátil NIOX MINO® (Aerocrine, Solna, Suecia) de acuerdo con las recomendaciones de ATS/ERS²² de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Inducción de esputo

Las muestras de esputo inducido se tomaron en cinco momentos en el tiempo (Fig. 1A): en el cribado, antes (hasta dos semanas) y 24 h después de la provocación después del tratamiento previo, y antes (24-48 h) y 24 h después del tratamiento posterior. La distribución celular y el análisis de mediadores en el sobrenadante se evaluaron en un laboratorio central.

MEDICIÓN DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

Las citocinas y quimiocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 MCP-1, MCP-4, MIP-1 β , MDC, IP10 e IL-4, IL-5 e IL-13, e IFN- γ se midieron en sobrenadantes de plasma y/o esputo con un ensayo multiplex TH1/TH2 y quimiocina (Meso Scale Discovery, Rockville, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína catiónica de eosinófilos (ECP) y la triptasa en los sobrenadantes de esputo se midieron usando ELISA disponible comercialmente (ECP y triptasa: Cloud-Clone, Houston, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

EVALUACIONES DE LA SEGURIDAD

Los eventos adversos y la medicación concomitante se evaluaron en cada visita. Los análisis de laboratorio de

seguridad (que incluyen hematología, química clínica y análisis de orina) se realizaron antes de la primera administración y a intervalos de dos semanas durante el tratamiento (véase detalles en el Apéndice Complementario). Además, los anticuerpos antinucleares (prueba de detección de inmunofluorescencia) y la serología reumatoide (IgM) se midieron antes y después del tratamiento para excluir el desarrollo de (auto)anticuerpos debido al tratamiento con un fármaco basado en una enzima de ADN.

ESTUDIO DE MEDIDAS DE RESULTADO

La medida de resultado primaria fue la influencia de dosis múltiples de SB010 inhalado en el área bajo la curva de FEV₁ (AUC) expresada como porcentaje del valor inicial del FEV₁ durante LAR (4 horas después de la provocación con alérgenos). El AUC se calculó utilizando la regla trapezoidal. Los puntos finales exploratorios incluyeron la influencia de SB010 en el área bajo la curva de FEV₁ durante EAR (0-3 horas), cambios inducidos por alérgenos en la capacidad de respuesta de las vías respiratorias (metacolina PC20), niveles de FeNO y biomarcadores en plasma y esputo.

TAMAÑO DE MUESTRA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se requirieron al menos 38 sujetos evaluables suponiendo una probabilidad de error tipo I del 10%, una diferencia en el tamaño del efecto entre los grupos de tratamiento del 8% y una potencia de al menos el 80%. Basándose en una tasa de abandono prevista del 15%, 43 sujetos fueron asignados al azar y expuestos a medicación de prueba o placebo. La eficacia y los resultados farmacodinámicos se analizaron en todos los pacientes evaluables (población con intención de tratar) como se indica en la Figura 1.

El resultado primario de eficacia (AUC en LAR) se comparó entre los grupos de tratamiento utilizando un modelo ANCOVA con los valores iniciales de AUC en LAR como covariable. Cuatro pacientes en el grupo SB010 y tres pacientes en el grupo placebo demostraron LAR solo en la primera provocación con alérgenos previa al tratamiento. Para estos pacientes, los datos de la función pulmonar de esta provocación con alérgenos se usaron como valor previo al tratamiento. Otros puntos finales también se analizaron con el mismo modelo o usando pruebas de suma de rango de Wilcoxon para comparaciones entre grupos de cambios porcentuales tal como se define en el plan de análisis estadístico. Las medidas de resultado de seguridad se enumeraron por paciente y se calcularon estadísticas descriptivas. Se pueden encontrar más detalles de los métodos estadísticos en el Apéndice Complementario.

RESULTADOS

PACIENTES

Veintiún pacientes completaron todas las evaluaciones del estudio en el grupo SB010 y 18 y 19 pacientes, respectivamente, completaron las evaluaciones LAR y EAR en el grupo placebo (Figura 1B). Los datos demográficos y los valores iniciales para estos pacientes se muestran en la Tabla 1A y la Tabla 1B.

RESPUESTA ASMÁTICA DE FASE TEMPRANA Y TARDÍA

Como se muestra en la Figura 2A (Tabla S2 del Apéndice Complementario), la LAR se atenuó después del tratamiento SB010, con una mejora significativa del área media bajo la curva (AUC) del 33,7% (P=0,02) y una mejora en la disminución máxima del FEV₁ de 31,6 % (P=0,09). La EAR también se atenuó significativamente con una mejora media del AUC del 11,3% (P=0,04) y una mejora de la disminución máxima del FEV₁ en un 21,5% (P=0,04).

RESPUESTAS ASMÁTICAS DE FASE TEMPRANA Y TARDÍA EN SUBGRUPOS ESPECIFICADOS PREVIAMENTE

En subgrupos especificados previamente, los pacientes con recuentos relativos de eosinófilos en sangre $\geq 4\%$ al inicio del estudio mostraron una mejoría mayor en el AUC en LAR y un efecto pronunciado en la EAR después del tratamiento con SB010 (Figuras 2B y S3A del Apéndice Complementario). La disminución de AUC en LAR se atenuó en el grupo SB010 en un 41,7% (P=0,05) (Tabla S3A). Esto fue acompañado por una atenuación de 28,3% en la EAR (P=0,02). Los cambios individuales en el AUC después de SB010 y el tratamiento con placebo se representan en la Figura 3 (y en las Tablas S4A y S4B del Apéndice Complementario). Se notificaron observaciones similares para el subgrupo con FeNO ≥ 40 ppb al inicio (Figura 2C, Tabla 3B del Apéndice Complementario). Las pruebas de heterogeneidad entre estratos de los subgrupos no fueron significativas.

INTERFERENCIA CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN MEDIADA POR TH2

Después de 28 días de tratamiento, SB010 atenuó la eosinofilia del esputo inducido por alérgenos frente a placebo, aunque esta diferencia perdió significación estadística en todo el grupo de estudio (P=0,06), pero se volvió significativa en los subgrupos especificados previamente para los eosinófilos en sangre $\geq 4\%$ (P=0,009) y

para FeNO \geq 40ppb ($P=0,02$). Los cambios en la eosinofilia del esputo fueron acompañados por una diferencia significativa ($P=0,05$) en los niveles de IL-5 en sangre (Figura 4). El aumento después del tratamiento en los niveles de IL-5 observados en el grupo placebo estuvo ausente después del tratamiento con SB010. Al final del ciclo de tratamiento de 28 días, los niveles de triptasa de esputo fueron significativamente ($P=0,05$) más bajos en el grupo de tratamiento SB010 (mediana 6,39 IQR 2,03-13,88 ng/mL) en comparación con el placebo (mediana 13,10 IQR 6,05-22,77 ng/mL). Los niveles de FeNO inducidos por alérgenos y la hiperreactividad de las vías respiratorias a la metacolina 24 h después de la provocación no se vieron afectados por el tratamiento del estudio (Tabla S5 del Apéndice Complementario).

10 SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD

No se observaron diferencias notables en el tratamiento de eventos adversos emergentes (TEAE) entre los pacientes que recibieron SB010 o placebo. En el grupo placebo, 8 pacientes tenían TEAE en comparación con 6 pacientes en el grupo SB010 (Tabla 3). No hubo TEAE graves, ni ninguna TEAE relacionada con SB010 probable o cierta. Dos TEAE (náuseas y prurito) en dos pacientes posiblemente estaban relacionados con SB010. No hubo TEAE graves. Las otras variables de seguridad no revelaron ningún problema de seguridad, incluidos todos los puntos finales de seguridad enumerados en el Apéndice Complementario. Las mediciones antes y después del tratamiento de TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, MCP-4, MIP-1 β , MDC e IP-10 no revelaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Tabla S7 del Apéndice Complementario); tampoco se detectaron aumentos significativos en la serología reumatoide y los anticuerpos antinucleares, lo que indica en conjunto la ausencia de activación inmune innata y la ausencia de efectos fuera del objetivo.

ANÁLISIS

25 El provocación con alérgenos bronquiales inhalados es un modelo in vivo ampliamente aceptado de inflamación alérgica y broncoconstricción¹⁸, y la inhibición terapéutica de LAR en los primeros ensayos de fase clínica es un predictor razonablemente bueno para la eficacia clínica en etapas posteriores del programa de desarrollo de fármacos²⁴. Los ejemplos incluyen vías de direccionamiento de citocinas TH2 tales como IL-4^{25,26,27}, IL-5^{28,29,30}, IL-13^{31,32} y TSLP³³. En este estudio, el tratamiento con SB010 mejoró significativamente la función pulmonar durante EAR y LAR después de la inhalación de alérgenos. Dado que el SB010 se dirige específica y selectivamente al factor de transcripción GATA-3, estos datos apoyan en gran medida la importancia de las vías reguladas y dependientes de GATA-3 en la respuesta asmática después de la inhalación de alérgenos en pacientes con un fenotipo de asma mediado por TH2⁹ y sugieren que el SB010 puede representar un tratamiento prometedor para el asma alérgica.

35 Nuestros pacientes tenían asma alérgica leve con un típico endotipo mediado por TH2 como lo indican los elevados eosinófilos en sangre y esputo, así como los niveles elevados de FeNO^{34,35}. Este endotipo de tipo 2 no solo está presente en el asma prototípica atópica y alérgica, sino que también se ha observado recientemente en otros fenotipos clínicos del asma, incluido el asma hiper eosinofílica de inicio tardío, asma severa y persistente y asma sensible a la aspirina^{5,36,37}. Los criterios de inclusión se definieron para cubrir un espectro más amplio de pacientes con este endotipo (por ejemplo, "presencia de eosinófilos de esputo"), y los datos de la función pulmonar muestran que el SB010 tuvo un efecto significativo en este grupo de estudio en su conjunto. Sin embargo, en un análisis de subgrupos especificados previamente, los pacientes con un fenotipo más pronunciado mediado por TH2 (niveles de eosinófilos en sangre de al menos 4% o niveles de FeNO de al menos 40 ppb) parecieron beneficiarse específicamente del tratamiento con SB010. Además de un efecto terapéutico más pronunciado en LAR, EAR también mostró una atenuación significativa. Este modo de acción dual en ambas fases de la respuesta asmática no se ha notificado por ningún candidato a fármaco biológico desde el anti-IgE³⁸ y más recientemente el anti-TSLP³³. Es necesario investigar si el tratamiento con SB010 puede ser particularmente favorable para pacientes propensos a exacerbaciones graves en los próximos ensayos clínicos³⁶. El papel central de GATA-3 en la regulación de la respuesta TH2 está bien establecido. Tanto el desarrollo como el mantenimiento de las funciones efectoras TH2 dependen estrictamente de GATA-3³⁹. Más recientemente, se ha identificado una función esencial de GATA-3 en las células linfoides innatas de tipo 2⁴⁰. Sin embargo, estos factores de transcripción también ejercen funciones importantes mucho más allá del subconjunto de células TH2. GATA-3 también se expresa en mastocitos³⁹, eosinófilos⁴¹ y células epiteliales de las vías respiratorias, donde controla funciones importantes y mecanismos efectoras conectados con la respuesta alérgica inducida por alérgenos^{42,43}. Después de la provocación con alérgenos, la EAR depende de la desgranulación de los mastocitos, mientras que la LAR se considera que depende preferentemente de los linfocitos T y se acompaña de un marcado flujo de eosinófilos en las vías respiratorias y el lumen de las vías respiratorias. La triptasa de mastocitos representa un marcador fiable y robusto que refleja la activación de mastocitos y la desgranulación de mastocitos. Los resultados actuales indican que el tratamiento con SB010 afecta directa o indirectamente a estas células efectoras de la respuesta asmática. Es probable que el SB010 realice esta función inhibitoria y moduladora de forma dual, tanto modulando las células TH2 y privando a las células efectoras de los factores de supervivencia y activación, como a través de una interferencia directa con el ARNm de GATA-3 en eosinófilos y mástiles. Sin embargo, se necesitan más estudios mecanicistas para dilucidar completamente todos los efectos biológicos del tratamiento con enzima de ADN dirigida a GATA-3.

Los pacientes expuestos en este estudio, combinados con individuos expuestos durante el programa de fase I, comprenden una base de datos de seguridad de más de 1200 aplicaciones en más de 120 individuos, 39 de los cuales tenían asma. Hasta el momento no se han detectado señales de seguridad durante el desarrollo clínico, en línea con los resultados del exhaustivo programa no clínico. En conclusión, este ensayo de prueba de concepto proporciona indicios de la eficacia del tratamiento con SB010 de enzima de ADN inhalada, que atenuó significativamente las respuestas asmáticas de fase temprana y tardía después de la provocación con alérgenos. Se justifican estudios clínicos adicionales para explorar si estos efectos se traducen en beneficios clínicos en asmáticos persistentes y sintomáticos con un fenotipo TH2 predominante.

5

10

Tabla 1A. Datos demográficos y valores iniciales para pacientes que completaron el estudio

	SB010 (n=21)	Placebo (n=19)	Valores de p
Edad (años)	33,8 (9,4)	38,5 (12,1)	0,24
Índice de masa corporal (kg/m ²)	26,7 (4,2)	25,6 (3,2)	0,81
Valor inicial de FEV ₁ % del previsto Valor absoluto (L)	91,8 (11,6) 3,8 (0,7)	91,9 (12,9) 3,8 (0,6)	0,95 0,87
FeNO (ppb)	49,3 (22,5)	51,6 (47,1)	0,34
PC ₂₀ (mg/dL)	3,2 (4,2)	2,8 (4,0)	0,83
Eosinófilos en el esputo (mediana) Diferencial, %	3,7 (1,5; 12,1)	2,4 (1,3; 13,3)	0,75
Eosinófilos en sangre (media) Recuento absoluto (10 ⁶ /L) Diferencial, %	282,4 (245,8) 4,9 (4,0)	262,8 (173,6) 4,5 (3,2)	0,91 0,97

Todos los datos expresados como media (SD), excepto los eosinófilos en el esputo (mediana, primer y tercer cuartil). El óxido nítrico espiratorio fraccionado (FeNO), la hiperreactividad de las vías respiratorias (PC₂₀), los eosinófilos y los eosinófilos sanguíneos en el esputo inducido se midieron antes de la aleatorización. Eosinófilos en valores de esputo basados en n=20 para SB010 y n=17 para el grupo placebo, respectivamente. Valores de p de acuerdo con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (véase Material y Métodos).

15

20

Tabla 1B: Datos demográficos y valores iniciales detallados para pacientes que completaron el estudio

	Eosinófilos en sangre ≥ 3%			Eosinófilos en sangre ≥ 4%			Eosinófilos en sangre ≥ 5%		
	Placebo	SB010	Valor de p	Placebo	SB010	Valor de p	Placebo	SB010	Valor de p
Edad (años)	36·4 (12·3)	33·8 (9·8)	0·6121	35·0 (12·3)	33·3 (11·0)	0·8395	33·4 (12·0)	32·4 (12·8)	0·8096
Índice de masa corporal (kg/m ²)	25·41 (3·17)	26·39 (3·44)	0·8141	24·77 (3·21)	26·68 (3·85)	0·3406	23·49 (2·52)	25·29 (2·67)	0·2685
Valor inicial de FEV ₁ (% del predicho)	88·3 (12·0)	92·9 (12·1)	0·2699	90·2 (11·9)	93·0 (11·9)	0·5635	89·6 (8·6)	95·3 (11·5)	0·3862
Valor inicial de FEV ₁ (Valor absoluto (L))	3·727 (0·691)	3·874 (0·711)	0·4808	3·660 (0·664)	3·854 (0·730)	0·9310	3·937 (0·616)	3·941 (0·718)	0·9616
FeNO (ppb)	58·01 (51·20)	52·24 (22·55)	0·5752	66·03 (52·60)	59·14 (22·30)	0·5444	76·72 (58·85)	66·79 (19·88)	0·4705
PC ₂₀ (mg/dL)	1·609 (1·840)	3·082 (4·040)	0·3660	1·774 (1·997)	3·476 (4·858)	0·7290	1·657 (2·099)	1·781 (1·972)	0·9233
Eosinófilos (absolutos) en sangre (10 ⁶ /L)	325·4 (128·7)	349·5 (280·8)	0·8033	358·7 (125·6)	446·6 (299·5)	0·5230	389·4 (139·2)	488·8 (340·6)	0·7144
Eosinófilos en sangre (%)	5·10 (3·25)	5·42 (4·07)	0·9711	5·64 (3·42)	6·88 (4·26)	0·4881	5·96 (3·94)	7·73 (4·98)	0·4699

	Eosinófilos en sangre \geq 3%			Eosinófilos en sangre \geq 4%			Eosinófilos en sangre \geq 5%		
	Placebo	SB010	Valor de p	Placebo	SB010	Valor de p	Placebo	SB010	Valor de p
<p>Todos los datos expresados como media (SD). El óxido nítrico espiratorio fraccionado (FeNO), la hiperreactividad de las vías respiratorias (PC20), los eosinófilos y los eosinófilos sanguíneos en el esputo inducido se midieron antes de la aleatorización. Valores de p de acuerdo con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (véase Material y Métodos).</p>									

Tabla 2. Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento

	SB010		Placebo		Cambios en la función pulmonar				Valor de p
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	SB010 absoluto	Cambio placebo	Porcentaje SB010	Cambio placebo	
LAR									
AUC en h	66,4	44,0	59,2	60,0	22,4	-0,8	33,7 %	-1,4 %	P=0,02
Disminución máxima en %	30,1	20,6	29,5	26,3	9,5	3,2	31,6 %	10,8 %	P=0,09
EAR									
AUC en h	37,9	33,6	41,1	45,4	4,3	-4,3	11,3 %	-10,5 %	P=0,04
Disminución máxima en %	30,3	23,8	33,1	31,9	6,5	1,2	21,5 %	3,6 %	P=0,04

Se muestran las medias aritméticas para el área bajo la curva (AUC) para la respuesta asmática tardía (LAR) y la respuesta asmática temprana (EAR). La disminución de los valores de AUC desde el tratamiento previo hasta el tratamiento posterior refleja una mejora en la función pulmonar. Se proporcionan los valores de AUC antes y después del tratamiento, seguidos de los cambios en la función pulmonar para el grupo SB010 y el grupo placebo, respectivamente. Estos cambios se presentan como los valores pre-post de AUC y como un cambio porcentual entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior. Los valores positivos reflejan una mejora en la función pulmonar, los valores negativos corresponden a un área más grande debajo de la curva en la provocación posterior al tratamiento en comparación con el tratamiento previo. Conjunto de datos completo, véase la Tabla S2 en el Apéndice Complementario.

Tabla 3. Tratamiento de eventos adversos emergentes (TEAE) por sistema de clasificación de órganos
Sistemas de órganos

Sistemas de órganos	Grupo de tratamiento			
	SB010 (n=21)		Placebo (n=19)	
	Número de TEAE	Número de pacientes	Número de TEAE	Número de pacientes
Trastornos del oído y del laberinto ¹	1	1 (4,5 %)	0	0 (0 %)
Trastornos gastrointestinales ²	1	1 (4,5 %)	1	1 (4,8 %)
Infecciones e infestaciones ³	4	3 (13,6 %)	2	2 (9,5 %)
Lesiones, intoxicaciones y complicaciones del método ⁴	0	0 (0 %)	1	1 (4,8 %)
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo ⁵	1	1 (4,5 %)	0	0 (0 %)
Trastornos del sistema nervioso ⁶	5	3 (13,6 %)	2	2 (9,5 %)
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos ⁷	3	3 (13,6 %)	5	4 (19 %)
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo ⁸	1	1 (4,5 %)	0	0 (0 %)

¹ vértigo; ² diarrea, náusea; ³ herpes simple, nasofaringitis; ⁴ laceración; ⁵ mialgia; ⁶ dolor de cabeza, ciática; ⁷ asma, obstrucción bronquial, disnea, aumento de la secreción de la vías respiratorias superior, dolor orofaríngeo, síndrome de tos en la vía respiratoria superior; ⁸ prurito.

Apéndice Complementario: Atenuación de las respuestas asmáticas inducidas por alérgenos mediante enzima de ADN inhalada específica de GATA-3

MATERIAL Y MÉTODOS

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes adultos varones de raza blanca de ≥ 18 años y ≤ 60 años,
2. Diagnóstico clínico de asma leve (de acuerdo con las pautas de GINA 2008) durante al menos 6 meses antes del cribado. Ningún tratamiento concomitante para el asma, excepto los broncodilatadores de acción corta 75 inhalados,
3. FEV₁ de cribado valor de FEV₁ $\geq 70\%$ del valor normal previsto (ECSC) después de un lavado de al menos 6 horas para broncodilatadores de acción corta inhalados,
4. El paciente debe demostrar una producción de esputo inducido suficiente,
5. Prueba de punción cutánea positiva (reactividad de la piel) a aeroalérgenos comunes (por ejemplo, epitelios de animales, ácaros del polvo),
6. El paciente debe demostrar broncoconstricción de las vías respiratorias de fase temprana y tardía inducida por alérgenos positivos.
7. En todos los momentos en el tiempo antes de AC y MCh, los pacientes deben mostrar FEV₁ no inferior al 65%

previsto.

8. Presencia de eosinófilos en el esputo antes o después del cribado de la provocación con alérgenos (primer o segundo esputo inducido),

9. El paciente ha sido informado verbalmente y por escrito sobre los objetivos del ensayo clínico, los métodos, los beneficios anticipados y los riesgos potenciales y la incomodidad a la que puede estar expuesto, y ha dado su consentimiento por escrito para participar en el ensayo antes de comenzar el ensayo y cualquier procedimiento relacionado con el ensayo,

10. El paciente puede comprender y dar su consentimiento informado por escrito y ha firmado un formulario de consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Investigador,

11. No fumadores o exfumadores que dejaron de fumar durante al menos 1 año antes del comienzo del estudio clínico con <10 años paquete,

12. Capacidad para inhalar de forma adecuada (los pacientes recibirán formación para inhalar desde el dispositivo AKITA2 APIXNEB® con un medicamento placebo en la visita de cribado).

13. Solo se incluirán en este estudio los hombres que no quieran engendrar hijos durante seis meses después de la última dosis de SB010.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Presencia de enfermedades clínicamente significativas distintas del asma (cardiovascular, renal, hepática, gastrointestinal, hematológica, neurológica, genitourinaria, autoinmune, endocrina, metabólica, etc.) que, en opinión del investigador, pueden poner al paciente en riesgo a causa de la participación en el ensayo, o enfermedades que pueden influir en los resultados del estudio o en la capacidad del paciente para participar en él,

2. Presencia de enfermedades pulmonares relevantes o antecedentes de cirugía torácica, tales como:

- tuberculosis activa conocida,

- Antecedentes de enfermedad intersticial pulmonar o tromboembólica pulmonar,

- Resección pulmonar durante los últimos 12 meses,

- Antecedentes de estado asmático,

- Antecedentes de bronquiectasias secundarias a enfermedades respiratorias (por ejemplo, fibrosis quística, síndrome de Kartagener, etc.),

- Antecedentes de bronquitis crónica, enfisema, aspergilosis broncopulmonar alérgica o infección respiratoria en las 4 semanas anteriores a la primera administración de IMP por la mañana.

3. Pacientes en tratamientos concomitantes, excepto broncodilatadores inhalados de acción corta según lo juzgue el investigador,

4. Uso de agonistas β_2 de acción corta 6 horas antes de las visitas de estudio 2, 3, 4, 5, 11 y 12.

5. Hospitalización o tratamiento en la sala de emergencias por asma aguda en los 6 meses previos al cribado, entre el cribado y el inicio del período de tratamiento.

6. Intubación (alguna vez) u hospitalización durante más de 24 horas para el tratamiento de una exacerbación del asma dentro de los 6 meses anteriores a la visita de cribado,

7. Antecedentes o indicios actuales de alergias clínicamente relevantes o idiosincrasia a medicamentos,

8. Antecedentes de reacciones alérgicas a cualquier ingrediente activo o inactivo de la solución de nebulizador.

9. Anormalidades del ECG de relevancia clínica,

10. Sujetos con una frecuencia cardíaca en reposo < 45 lpm, presión arterial sistólica < 100 mmHg, presión arterial diastólica < 60 mmHg,

11. Propensión a la desregulación ortostática, desmayos o lipotimias,
- 5 12. Antecedentes de malignidad en los últimos 5 años, excepto basaliomas extirpados,
13. Anormalidades clínicamente relevantes en química clínica, hematológica o en cualquier otra variable de laboratorio según lo juzgue el investigador.
- 10 14. Infecciones agudas clínicamente relevantes en las últimas 4 semanas anteriores a la AC,
- 15 15. Infecciones crónicas clínicamente relevantes,
16. Resultados positivos en cualquiera de las pruebas de virología del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecciosa aguda o crónica e infecciones a causa del virus de la hepatitis B/C,
17. Cribado de fármacos positivo,
18. Abuso de alcohol o fármacos,
- 20 19. Prueba de cotinina positiva,
20. Tratamiento con cualquier agente inductor o inhibidor enzimático conocido (hierba de San Juan (Johanniskraut), barbitúricos, fenotiazinas, cimetidina, ketoconazol, etc.) dentro de los 30 días antes de la primera administración de medicación de prueba o durante el período de tratamiento de la prueba,
- 25 21. Uso de cualquier medicamento concomitante prohibido dentro de 2 semanas (para productos biológicos: 6 meses o 10 veces la vida media de eliminación del fármaco respectivo) antes de la primera administración del medicamento de ensayo o dentro de < 10 veces la vida media de eliminación del fármaco respectivo, o la duración del efecto farmacodinámico, lo que sea más largo, o medicación concomitante anticipada durante el período de tratamiento,
- 30 22. Consumo de cualquier enzima que induzca o inhiba alimentos y bebidas (por ejemplo, brócoli, coles de Bruselas, pomelo, jugo de pomelo, fruta de estrella, etc.) dentro de los 14 días previos a la primera administración del medicamento de ensayo y durante el período de tratamiento del ensayo,
- 35 23. Consumo de cualquier producto que contenga cafeína 6 horas antes del primer procedimiento en cada visita de estudio
24. Cirugía del tracto gastrointestinal que pueda interferir con la absorción del fármaco de la fracción tragada (Nota: esto no es aplicable para cirugía abdominal menor, como apendicectomía o herniotomía),
- 40 25. Donación de sangre en los últimos 30 días antes del cribado,
26. Donación planificada de células germinales, sangre, órganos o médula ósea durante el transcurso del ensayo o dentro de los 6 meses posteriores,
- 45 27. Participación en otro ensayo clínico con un medicamento o dispositivo en investigación durante el último mes o dentro de 10 veces la vida media del fármaco respectivo. Para los productos biológicos, el período mínimo es de al menos 6 meses o el tiempo de duración del efecto farmacodinámico o 10 veces la vida media del fármaco respectivo antes de su inclusión en este ensayo,
- 50 28. Falta de capacidad o voluntad de dar consentimiento informado o incapacidad para cooperar adecuadamente,
- 55 29. No disponibilidad anticipada para las visitas/procedimientos de ensayo,
30. Sujetos vulnerables (por ejemplo, personas detenidas),
31. Empleado en el sitio de investigación, pariente o cónyuge del investigador.
- 60

EXPERIMENTOS IN VITRO

65 Se realizaron experimentos in vitro para demostrar la actividad de escisión y la especificidad de la enzima de ADN dirigida a GATA-3. La bioactividad y el modo de acción se evaluaron en experimentos de cultivo celular utilizando linfocitos T de sangre periférica y fragmentos de tejido sino-nasal como modelo de tejido de la vías respiratorias de la mucosa.

- Ensayo de escisión (Apéndice Complementario Figura S2)

5 El análisis de la actividad catalítica de ARN escindido de enzimas de ADN se realizó utilizando un ensayo de escisión *in vitro* tal como se ha descrito previamente (Sel y col. JACI 2008). En síntesis, 2 μ l de ARN(c) copia de GATA-3 transcrito *in vitro* (250 ng/ μ l) se añadieron a una mezcla de 4 μ l de agua libre de RNasa, 1 μ l 1 M NaCl, 1 μ l 10 mM de MgCl₂ y 1 μ l 500 mM Tris pH 7,4. Se añadió un μ l de la enzima de ADN respectiva (hgd40, enzimas de ADN codificadas 1-6 con regiones de unión codificadas pero de secuencia catalítica intacta, enzimas de ADN 1-3 específicas del factor de transcripción Tbet) o agua (control negativo) y la mezcla se incubó a 37 °C. Si no se indica lo contrario, se aplicaron enzimas de ADN a una concentración de 10 μ M y el tiempo de incubación estándar fue de 60 minutos. Posteriormente, las mezclas de reacción se separaron electroforéticamente usando geles de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio usando procedimientos estándar.

- 15 • Pacientes y recolección de muestras (Figura S3, C - F del Anexo Complementario)

Los sujetos del estudio fueron seleccionados sobre la base de unos antecedentes médicos documentado de rinosinusitis crónica con pólipos nasales (CRSwNP), una endoscopia nasal patológica y un TAC de los senos. Se recogieron muestras de los senos etmoidales de n=16 pacientes (de 16 a 72 años con una mediana de edad de 44 años; 11 hombres, 5 mujeres; 8 atópicos y 10 asmáticos) durante los procedimientos de cirugía endoscópica funcional de los senos (FESS), indicados de forma independiente de este estudio, en el Departamento de Otorrinolaringología del Hospital de la Universidad de Gante, Bélgica, de acuerdo con las pautas europeas y americanas actuales. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes de su participación y el estudio fue aprobado por el comité ético local. El uso de cualquier medicamento oral o tópico con posible impacto en las mediciones de mediadores se detuvo en todos los sujetos al menos 4 semanas antes de la cirugía.

- Preparación y tratamiento de fragmentos de tejido sinonasal (Figura S3, C y D del Apéndice Complementario)

30 Inmediatamente después de la extirpación quirúrgica de los pólipos nasales de los pacientes, se prepararon fragmentos de tejido de aproximadamente 0,9 mm³ cada uno cortando explantes sinonasales. Los fragmentos de tejido se suspendieron en un medio RPMI-1640 y se incubaron con el medio de cultivo de tejido (TCM) solos o con 4 mg/ml de enzima de ADN hgd40 durante 6 (ARN) y 24 horas (proteína). A continuación, los fragmentos de tejido y los sobrenadantes se congelaron rápidamente y se almacenaron a -20 °C/-80 °C hasta el análisis de proteínas y ARNm. Para la investigación de la absorción de la enzima de ADN hgd40, los fragmentos de tejido se incubaron con TCM solo o con 4 mg/ml de la hgd40 marcado con rodamina 6G en presencia de reactivo de transfección de lipofectamina durante 24 horas. A continuación, se incorporaron fragmentos de tejido, se congelaron inmediatamente y se cortaron en secciones de 5 μ m. Las secciones se tiñeron para el marcador CD3 de acuerdo con la recomendación del fabricante. Posteriormente, los portaobjetos se evaluaron mediante microscopía de escaneo láser confocal.

- 40 • Generación y transfección de células Th2 polarizadas (Figura S3, A y B del Apéndice Complementario)

45 Las células CD4 + humanas vírgenes se aislaron de sangre total o capas leucocíticas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll y posterior enriquecimiento usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 vírgenes (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células aisladas se polarizaron en células Th2 mediante estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 (20 ng/ml), IL-4 (20 ng/ml) y anti-IFN γ (1 μ g/ml) durante 10 días, como se ha descrito anteriormente. Después de la polarización, las células Th2 se transfectaron con la enzima de ADN específica de GATA-3 humana marcada con FAM hgd40 o con la enzima de ADN de control codificada marcada con FAM ODNg3 mediante electroporación usando el sistema Amaxa. Las células transfectadas se volvieron a colocar y se incubaron durante 22 h.

- Análisis de expresión de GATA-3 en células Th2 polarizadas (Figura S3A del Apéndice Complementario)

55 Después del período de incubación, las células transfectadas se recogieron y se analizaron para determinar la expresión de la proteína GATA-3 mediante análisis de citometría de flujo con fluorescencia (FACS). Por lo tanto, las células se tiñeron intracelularmente para la proteína GATA-3 con un anticuerpo anti-GATA de ratón marcado con Alexa Fluor 647 (Clon L50-823, BD Pharmingen) usando el "conjunto de tampón de tinción del factor de transcripción" (eBioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis, se establecieron barreras en células transfectadas positivamente y se determinaron los niveles de expresión de GATA-3 en estas células como niveles medios geométricos. Los niveles medios geométricos de expresión de la proteína GATA-3 en células transfectadas controladas por positividad FAM se compararon entre las células transfectadas con la hgd40 y las transfectadas de control.

- 65 • Expresión del gen GATA-3 en fragmentos de tejido sinonasal (Figura S3E del Apéndice Complementario)

Después de un tiempo de incubación de 6 horas, se extrajo el ARN total utilizando el Mini Kit de Aurum Total

RNA (Bio-Rad Laboratories) y el ADNc se sintetizó con el kit de síntesis de iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories). La amplificación por PCR en tiempo real se realizó con las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 10 segundos a 72 °C, y un análisis de curva de disociación desde 60 °C a 95 °C. La β -actina (ACTB), la hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 y el factor de alargamiento 1 se utilizaron como referencia endógena para la normalización.

- Medición de la proteína IL-5 (Figura S3F del Anexo Complementario)

Después de un período de incubación de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de IL-5 con la tecnología Luminex xMAP utilizando los kits Fluorokine MAP disponibles comercialmente (R&D Systems Europe Ltd.) siguiendo las pautas del fabricante y medidos en una plataforma Bio-Plex 200 (Laboratorios Bio-Rad). El límite de detección fue de 1,5 pg/ml.

- Ensayo de secreción de IL-13 (Figura S3B del Apéndice Complementario)

Para el análisis de la liberación de IL-13, las células transfectadas se estimularon con 1 μ g/ml de Staphylococcus aureus enterotoxina B (SEB) durante 22 h. La secreción de IL-13 se detectó mediante análisis FACS utilizando el kit de detección de ensayo de secreción de IL-13 (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis, se establecieron barreras en células transfectadas positivamente y se determinaron los niveles de expresión de IL-13 en estas células como niveles medios geométricos (GeoMean). Los niveles medios geométricos de expresión de la proteína IL13 en células transfectadas controladas por positividad FAM se compararon entre las células transfectadas con la hgd40 y las transfectadas de control.

PUNTOS FINALES DE SEGURIDAD

Se evaluaron los siguientes parámetros de química clínica: creatinina, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gamma glutamil transpeptidasa, proteína total, ácido úrico, urea, sodio, potasio, calcio, cloruro, glucosa (en ayunas), lactato deshidrogenasa, y creatina fosfoquinasa. Los parámetros hematológicos fueron: hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos con recuento diferencial (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos) y recuento de plaquetas, tiempo de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina, INR, fibrinógeno. Se evaluaron los siguientes parámetros de análisis de orina: leucocitos, nitrito, pH, proteína, glucosa, cetona, urobilinógeno, bilirrubina, sangre (hemoglobina y eritrocitos). Se registraron los siguientes parámetros de ECG: Se registró un ECG de 12 derivaciones después de 5 minutos de descanso en posición supina utilizando los cables de acuerdo con Einthoven y Goldberger, así como 6 cables precordiales de acuerdo con Wilson.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS (versión 9.3) de FGK Clinical Research GmbH (Múnich, Alemania). La Figura S2 se preparó utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.0).

ANÁLISIS DE LA FIGURA S1:

Después de la provocación con alérgenos, las células dendríticas de las vías respiratorias presentan alérgenos en las células Th0 que se diferencian de las células Th2 bajo la influencia de las citocinas derivadas del epitelio, tales como TSLP, IL25 e IL-33 y la IL-4 inicial (por ejemplo, producida por los linfocitos innatos de tipo 2 ILC2). La GATA-3 representa el factor de transcripción maestro para la diferenciación y la activación de Th2 y es indispensable para la producción de citocinas Th2, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-13. Mediante la liberación de estas citocinas, las células Th2 implican varios mecanismos efectores, tales como la producción de IgE por parte de los linfocitos B con posterior unión a los mastocitos, reclutamiento y activación de eosinófilos y desarrollo de hiperplasia de células caliciformes. Los mediadores liberados por estas células efectoras promueven aún más la inflamación, provocan la contracción del músculo liso y la producción de moco con el posterior estrechamiento de las vías respiratorias y la fuga vascular. El SB010 interfiere bastante en dirección 5' en este proceso al escindir específicamente el ARN mensajero para GATA-3 en las células Th2. En consecuencia, se genera menos proteína GATA-3 que puede no transactivar suficientemente las citocinas Th2 de transcripción con la posterior inhibición de todos los procesos en dirección 3'. De manera similar a su acción en las células Th2, el SB010 también puede suprimir la producción de GATA-3 en otras células que expresan GATA-3, como ILC2, mastocitos y eosinófilos con inhibición en dirección 3' de la liberación de citocinas de tipo 2 y también la producción de moléculas efectoras en mastocitos y eosinófilos. **La Figura S1** muestra además la bioactividad de la hgd40, el compuesto activo del SB010. Existen indicios claros de los efectos directos y específicos de la hgd40, la enzima de ADN activa dirigida a GATA-3 en el SB010, sobre la expresión de GATA-3 y los efectos biológicos en dirección 3'. Una serie de experimentos *in vitro* e *in situ* demuestran claramente el modo de acción del SB010, cuyos resultados se incluyen en las **Figuras S2 y S3** (detalles técnicos, véase el Apéndice Complementario). Inicialmente, se mostró la actividad específica de la hgd40, la enzima de ADN activa dirigida a GATA-3 en el SB010, usando el ensayo de escisión (**Figura S2** adicional) que representa un método *in vitro* altamente

específico para determinar la actividad catalítica de 10-23 enzimas de ADN. Para ello, el ARN-copia (ARNc) transcrito *in vitro*, en el presente caso ARNc de GATA-3 humano, se incubó con la enzima de ADN. Durante esta incubación, las enzimas de ADN activas escinden catalíticamente un ARNc objetivo en dos productos de escisión que pueden demostrarse mediante electroforesis en gel de agarosa. Basado en una serie de análisis de ensayos de escisión, resultó que la hgd40, el componente activo en el SB010, es la enzima de ADN más activa con respecto a la actividad de escisión de ARNc de GATA-3. Se demostró que la hgd40 dosifica y escinde de forma temporal el ARNc de GATA-3 (**Figuras S2A y S2B**). La escisión es altamente específica de secuencia, como lo demuestra el análisis de eficacia de enzimas de ADN no específicas de GATA-3 en ARNc de GATA-3 (**Figura S2C**). También se demostró que la hgd40 escinde específicamente el ARN monocatenario incluso a bajas concentraciones (0,5 µM hgd40) y no escinde el ADN bicatenario, incluso tampoco a altas concentraciones (20 µM hgd40). Además, los efectos no deseados fuera del objetivo, como la activación de las células inmunes innatas o en las células implicadas en mecanismos efectores alérgicos, se han excluido previamente (Dicke T y col. *Nucleic Acid Therapeutics* 2012; 22 (2): 117-26). Posteriormente, demostramos la bioactividad de esta molécula en células y tejidos humanos (**Figura S3 adicional**). La transfección de células TH2 CD4+ polarizadas humanas con la hgd40 suprimió significativamente la expresión de la proteína GATA-3 y la posterior producción de IL-13 en comparación con las células transfectadas con una enzima de ADN de control codificada ODNg3 (**Figuras S3A, S3B**). A continuación, los explantes de tejido nasal obtenidos de asmáticos atópicos se incubaron con la enzima de ADN hgd40. Como se muestra en las Figuras 3C y 3D, la hgd40 fue captada por las células CD3+ y CD3- dentro del explante y redujo significativamente los niveles de ARNm de GATA-3 en 6 horas (**Figura S3E**) acompañado de una producción significativamente reducida de IL-5 a las 24 horas (**Figura S3F**)

Tabla S1 del Apéndice Complementario. Alérgenos utilizados para la provocación con alérgenos

Nombre	SB010		Placebo	
	Número	%	Número	%
Gato	3	14 %	2	11 %
Perro	2	10 %	0	0 %
Mezcla de hierba	3	14 %	6	32 %
Abedul	6	29 %	2	11 %
Centeno	2	10 %	4	21 %
D. pteronyssinus	5	24 %	4	21 %
Caballo	0	0 %	1	5 %
total	21	100 %	19	100 %
aceite en agua estacional	11	52 %	14	63 %
aceite en agua perenne	10	48 %	7	37 %

Alérgenos suministrados por ALK-Abelló Arzneimittel GmbH, Alemania, o Allergopharma Joachim Ganzer KG, Alemania, en el caso de *Alternaria tenuis*

Tabla S2 del Apéndice Complementario. Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Conjunto completo de datos de función pulmonar

	SB010		Placebo		Cambios en la función pulmonar				Diferencia de grupo (%)	Estadística
	Pre	Post	Pre	Post	SB010	Placebo	SB010	Placebo		
LAR										
AUC	[h*100]				[%]		[%]			
Media	66,4	44,0	59,2	60,0	22,4	-0,8	33,7 %	-1,4 %	35,1 %	0,02
Mediana	64,2	33,1	47,2	37,2	31,1	10,0	48,4 %	21,2 %	27,2 %	
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]	

Media	30,1	20,6	29,5	26,3	9,5 %	3,2 %	31,6 %	10,8 %	20,8 %	0,09	
Mediana	30,2	15,0	22,3	22,1	15,2 %	0,2 %	50,3 %	0,9 %	49,4 %		
EAR											
AUC	[h*100]						[%]		[%]		
Media	37,9	33,6	41,1	45,4	4,3	-4,3	11,3 %	-10,5 %	21,8 %	0,04	
Mediana	33,5	28,5	40,1	39,9	5,0	0,2	14,9 %	0,5 %	14,4 %		
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]		
Media	30,3	23,8	33,1	31,9	6,5 %	1,2 %	21,5 %	3,6 %	17,9 %	0,04	
Mediana	29,3	22,9	33,9	33,1	6,4 %	0,8 %	21,8 %	2,4 %	19,4 %		

Leyenda de la Tabla S2: Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Conjunto completo de datos de función pulmonar

- 5 Las provocaciones con alérgenos se realizaron antes (pre) y después (post) de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo. Se muestran las medias aritméticas para el área bajo la curva (AUC) para la respuesta asmática tardía (LAR) y la respuesta asmática temprana (EAR). La disminución de los valores de AUC desde el tratamiento previo hasta el tratamiento posterior refleja una mejora en la función pulmonar. Se proporcionan los valores de AUC antes y después del tratamiento, seguidos de los cambios en la función pulmonar para el grupo SB010 y el grupo placebo, respectivamente. Estos cambios se presentan como los valores pre-post del AUC y como un cambio porcentual entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior. Los valores positivos reflejan una mejora en la función pulmonar, los valores negativos corresponden a un área más grande debajo de la curva en la provocación posterior al tratamiento en comparación con el tratamiento previo. La diferencia de grupo muestra el delta de cambios relativos entre el SB010 y el grupo placebo. Los valores de p para AUC LAR y la disminución máxima del FEV₁ en LAR y EAR se calcularon mediante el modelo ANCOVA; el valor de P para AUC EAR se calculó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.
- 10
- 15

20 **Tabla S3A del Apéndice Complementario. Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Análisis de un subgrupo especificado previamente de pacientes con eosinófilos en sangre $\geq 4\%$**

	SB010		Placebo		Cambios en la función pulmonar				Diferencia de grupo (%)	Estadística	
	Pre	Post	Pre	Post	SB010	Placebo	SB010	Placebo			Valor de p
LAR											
AUC	[h*100]						[%]		[%]		
Media	55,6	32,4	62,8	67,3	23,2	-04,5	41,7 %	-7,2 %	48,9 %	0,05	
Mediana	43,5	28,3	47,0	93,3	15,2	-46,3	34,9 %	-98,5 %	133,5 %		
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]		
Media	27,6	17,1	30,6	29,2	10,5 %	1,4 %	38,0 %	4,6 %	33,5 %	0,07	
Mediana	27,5	14,2	21,6	35,6	13,3 %	-14,0 %	48,4 %	-64,8 %	113,2 %		
EAR											
AUC	[h*100]						[%]		[%]		
Media	26,5	19,0	35,5	41,9	7,5	-6,4	28,3 %	-18,0 %	46,3 %	0,02	
Mediana	26,0	18,5	36,0	44,9	7,5	-8,9	28,9 %	-24,7 %	53,6 %		
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]		
Media	28,2	19,0	29,7	30,8	9,2 %	-1,1 %	32,6 %	-3,7 %	36,3 %	0,10	
Mediana	27,4	18,0	28,8	33,8	9,4 %	-5,0 %	34,3 %	-17,4 %	51,7 %		

Leyenda de la Tabla S3A: Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Análisis de un subgrupo especificado previamente de pacientes con eosinófilos en sangre $\geq 4\%$

5 Las provocaciones con alérgenos se realizaron antes (pre) y después (post) de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo. Se muestran las medias aritméticas para el área bajo la curva (AUC) para la respuesta asmática tardía (LAR) y la respuesta asmática temprana (EAR). La disminución de los valores de AUC desde el tratamiento previo hasta el tratamiento posterior refleja una mejora en la función pulmonar. Se proporcionan los valores de AUC antes y después del tratamiento, seguidos de los cambios en la función pulmonar para el grupo SB010 y el grupo placebo, respectivamente. Estos cambios se presentan como los valores pre-post del AUC y como un cambio porcentual entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior. Los valores positivos reflejan una mejora en la función pulmonar, los valores negativos corresponden a un área más grande debajo de la curva en la provocación posterior al tratamiento en comparación con el tratamiento previo. La diferencia de grupo muestra el delta de cambios relativos entre el SB010 y el grupo placebo.

El valor de p para AUC LAR se calculó mediante el modelo ANCOVA; los valores de p para AUC EAR y la disminución máxima de FEV₁ en LAR y EAR se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

20 **Tabla S3B del Apéndice Complementario. Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Análisis de un subgrupo especificado previamente de pacientes con FeNO ≥ 40 ppb**

	SB010		Placebo		Cambios en la función pulmonar				Diferencia de grupo (%)	Estadística
	Pre	Post	Pre	Post	SB010	Placebo	SB010	Placebo		
LAR										
AUC	[h*100]				[%]				[%]	
Media	58,3	36,7	58,5	65,3	21,6	-6,8	37,1 %	-11,6 %	48,7 %	0,05
Mediana	44,6	32,4	47,0	71,6	12,2	-24,6	27,4 %	-52,3 %	79,6 %	
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]	
Media	28,0	18,0	29,8	28,3	10,1 %	1,5 %	35,7 %	5,0 %	30,7 %	0,08
Mediana	22,9	14,1	21,6	26,4	8,8 %	-4,8 %	38,4 %	-22,2 %	60,7 %	
EAR										
AUC	[h*100]				[%]				[%]	
Media	26,8	22,6	35,2	43,5	4,2	-8,3	15,7 %	-23,6 %	39,3 %	0,02
Mediana	23,0	18,5	36,0	44,9	4,5	-8,9	19,6 %	-24,7 %	44,3 %	
Disminución Máx.					punto porcentual		[%]		[%]	
Media	29,3	20,3	29,8	32,5	9,0 %	-2,7 %	30,7 %	-9,1 %	39,8 %	0,02
Mediana	26,6	19,3	28,8	35,0	7,3 %	-6,2 %	27,4 %	-21,5 %	49,0 %	

25 Leyenda de la Tabla S3B: Cambios en la respuesta de fase tardía y temprana después de la provocación con alérgenos antes y después del tratamiento - Análisis de un subgrupo especificado previamente de pacientes con FeNO ≥ 40 ppb

30 Las provocaciones con alérgenos se realizaron antes (pre) y después (post) de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo. Se muestran las medias aritméticas para el área bajo la curva (AUC) para la respuesta asmática tardía (LAR) y la respuesta asmática temprana (EAR). La disminución de los valores de AUC desde el tratamiento previo hasta el tratamiento posterior refleja una mejora en la función pulmonar. Se proporcionan los valores de AUC antes y después del tratamiento, seguidos de los cambios en la función pulmonar para el grupo SB010 y el grupo placebo, respectivamente. Estos cambios se presentan como los valores pre-post del AUC y como un cambio porcentual entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior. Los valores positivos reflejan una mejora en la función pulmonar, los valores negativos corresponden a un área más grande debajo de la curva en la provocación posterior al tratamiento en comparación con el tratamiento previo. La diferencia de grupo

muestra el delta de cambios relativos entre el SB010 y el grupo placebo. Los valores de p para AUC LAR y la disminución máxima del FEV₁ en LAR y EAR se calcularon mediante el modelo ANCOVA; el valor de P para AUC EAR se calculó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

5 **Tabla S4A del Apéndice Complementario: Respuesta individual a la provocación con alérgenos, respuesta asmática de fase tardía (LAR, 3-7h)**

Paciente		Eos de sangre	de Alérgeno usado	AUC [h]				
				Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Cambio absoluto	% Cambio	
<u>Grupo de tratamiento con SB010</u>	1	*	Polen de abedul	0,94	0,66	-0,28	-29,9 %	
	2		Polen de abedul	1,33	0,99	-0,33	-25,2 %	
	3	*	Gato	1,25	0,83	-0,42	-33,8 %	
	4		Polen de hierba	0,45	0,31	-0,08	-17,3 %	
	5	*	Ácaros del polvo doméstico	0,32	0,13	-0,19	-59,8 %	
	6	*	Perro		-0,17	-1,09	-119,0 %	
	7	*	Gato	0,92	0,68	0,47	-0,21	-31,2 %
	8	*	Polen de abedul	0,43	0,25	-0,18	-41,6 %	
	9		Polen de la hierba	0,66	0,49	-0,17	-26,1 %	
	10		Ácaros del polvo doméstico	0,59	0,22	-0,37	-62,1 %	
	11	*	Polen de la hierba	0,03	0,33	0,31	1224,0 %	
	12		Ácaros del polvo doméstico	0,36	0,09	-0,28	-77,5 %	
	13		Ácaros del polvo doméstico	0,95	1,00	0,05	5,5 %	
	14	*	Ácaros del polvo doméstico	0,44	0,32	-0,13	-28,3 %	
	15		Polen de abedul	1,63	1,39	-0,25	-15,1 %	
	16		Polen de abedul	0,64	0,74	0,10	15,3 %	
	17	*	Gato	0,18	0,07	-0,10	-58,2 %	
	18	*	Polen de abedul	0,76	0,11	0,01	1,6 %	
	19		Perro	0,66	0,07	-0,59	-89,5 %	
	20	*	Centeno	0,32	0,10	-0,22	-65,8 %	
	21	*	Centeno	0,43	0,13	-0,30	-70,1 %	
Media				0,66	0,44	-0,22	-33,7 %	

ES 2 753 436 T3

Paciente		Eos de sangre	de Alérgeno usado	AUC [h]			
				Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Cambio absoluto	% Cambio
<u>Grupo de tratamiento con placebo</u>	1	*	Polen de la hierba	0,37	1,03	0,66	180,3 %
	2		Ácaros del polvo doméstico	0,33	0,22	-0,10	-31,7 %
	3	*	Gato	0,47	0,28	-0,19	-41,0 %
	4	*	Polen de abedul	0,47	0,94	0,41	99,4 %
	5		Centeno	0,39	0,13	-0,26	-67,4 %
	6		Polen de la hierba	0,49	0,12	0,23	47,0 %
	7	*	Gato	0,25	0,28	0,03	13,9 %
	8	*	Centeno	1,14	0,98	-0,16	-13,8 %
	9	*	Crin de caballo	0,24	-0,02	-0,26	-108,0 %
	10		Polen de la hierba	0,53	0,30	-0,23	-43,0 %
	11	*	Ácaros del polvo doméstico	0,36	0,41	0,07	19,4 %
	12		Polen de la hierba	0,31	0,06	-0,25	-80,9 %
	13		Polen de la hierba	1,17	1,64	0,47	40,7 %
	14	*	Ácaros del polvo doméstico	1,27	1,63	0,35	27,9 %
	15	*	Ácaros del polvo doméstico	0,96	0,93	-0,03	-2,7 %
	16	*	Polen de la hierba	1,29	1,29	-0,01	-0,4 %
	17		Centeno	0,54	0,33	-0,21	-39,0 %
	18	*	Polen de abedul	0,11	-0,34	-0,45	-411,9 %
	Media			0,59	0,60	0,01	1,4 %

*: Paciente incluido en un subgrupo especificado previamente con eosinófilos en sangre $\geq 4\%$.

Tabla S4B del Apéndice Complementario: Respuesta asmática individual de fase temprana (EAR, 0-3 h) a la provocación con alérgenos

Paciente		Alérgeno usado	AUC h				
			Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Cambio absoluto	% Cambio	
<u>Grupo de tratamiento con SB010</u>	1	*	Polen de abedul	0,16	0,21	0,04	26,2 %

ES 2 753 436 T3

Paciente		Alérgeno usado	AUC h			
			Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Cambio absoluto	% Cambio
2		Polen de abedul	0,54	0,29	-0,26	-47,3 %
3	*	Gato	0,87	0,32	-0,55	-63,6 %
4		Polen de la hierba	0,24	0,23	-0,01	-5,4 %
5	*	Ácaros del polvo doméstico	0,22	0,20	-0,02	-9,2 %
6	*	Perro	0,14	-0,07	-0,21	-146,5 %
7	*	Gato	-0,08	0,04	0,12	-157,3 %
8	*	Polen de abedul	0,48	0,00	-0,48	-99,6 %
9		Mezcla de hierba	0,63	0,49	-0,14	-21,8 %
10		Ácaros del polvo doméstico	0,28	0,21	-0,07	-23,5 %
11	*	Polen de la hierba	-0,03	0,10	0,12	-473,1 %
12		Ácaros del polvo doméstico	0,31	0,53	0,19	53,5 %
13		Ácaros del polvo doméstico	0,74	0,88	0,14	18,2 %
14	*	Ácaros del polvo doméstico	-0,01	0,33	0,33	-5516,1 %
15		Polen de abedul	0,81	0,95	0,14	17,2 %
16		Polen de abedul	0,45	0,82	0,37	84,0 %
17	*	Gato	0,34	0,17	-0,16	-49,0 %
18	*	Polen de abedul	0,47	0,39	-0,08	-17,6 %
19		Perro	0,74	0,38	-0,36	-48,9 %
20	*	Centeno	0,30	0,06	-0,24	-80,1 %
21	*	Centeno	0,31	0,54	0,24	76,6 %
		Media	0,38	0,34	-0,04	-11,3 %
	*	Polen de la hierba	0,01	0,75	0,74	8266,7 %
		Ácaros del polvo doméstico	0,31	0,24	-0,07	-22,7 %
	*	Gato	0,40	0,31	-0,05	-11,7 %
	*	Polen de abedul	0,47	0,63	0,16	34,1 %
		Centeno	0,52	0,33	-0,19	-36,9 %
		Polen de la hierba	0,59	0,83	0,25	41,7 %

Grupo de tratamiento con placebo

Paciente	Alérgeno usado	AUC h				% Cambio
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento	del Cambio absoluto		
	hierba					
7	* Gato	0,23	0,31	0,16	68,7 %	
6	* Centeno	0,41	0,23	-0,19	-45,0 %	
9	* Caballo	0,22	0,22	0,00	-0,5 %	
10	Polen de la hierba	0,39	0,40	0,01	3,1 %	
11	* Ácaros del polvo doméstico	0,58	0,51	-0,08	-12,9 %	
12	Polen de la hierba	0,66	0,34	-0,32	-48,3 %	
13	Polen de la hierba	0,88	1,06	0,19	21,5 %	
14	* Ácaros del polvo doméstico	0,32	0,72	0,40	125,8 %	
15	* Ácaros del polvo doméstico	0,62	0,64	0,02	3,2 %	
16	* Polen de la hierba	0,71	0,61	-0,11	-14,9 %	
17	Centeno	0,20	0,40	0,20	96,1 %	
18	* Polen de abedul	0,11	-0,23	-0,33	-318,1 %	
19	* Centeno	0,18	0,21	0,04	21,0 %	
	Media	0,41	0,45	0,04	10,5 %	

*: Paciente incluido en un subgrupo especificado previamente con eosinófilos en sangre $\geq 4\%$.

Tabla S5 del Apéndice Complementario. Efecto de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo sobre los niveles de FeNO y PC20 posteriores a la provocación

	Pre		Post		Valor de p
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
FeNO (ppb)					
SB010	85,33	47,67	68,00	36,33	0,37
Placebo	65,00	44,58	74,50	45,33	
PC20 (mg/dl)					
SB010	0,30	1,33	0,44	0,94	0,54
Placebo	0,49	0,69	0,37	0,71	

5

Leyenda de la Tabla S5: Efecto de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo sobre los niveles de FeNO y PC20 posteriores a la provocación

10

Efecto de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo sobre los niveles de FeNO y PC20 Las mediciones de los niveles de FeNO y la evaluación de la hiperreactividad de las vías respiratorias (PC20) se realizaron después de las provocaciones con alérgenos antes y después del ciclo de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo. Los niveles de FeNO se expresan como ppb, PC20 se expresa en metacolina mg/dl. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

15

Tabla S6 del Apéndice Complementario. Efecto de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo sobre niveles de FeNO sin provocación

	Antes del tratamiento		60 días de seguimiento		Valor de p
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
todos					
SB010	46,67	30,67	38,67	35,17	0,14
Placebo	41,67	32,25	38,42	48,50	
EOS ≥ 4%					
SB010	63,83	32,75	37,50	34,83	0,15
Placebo	46,33	22,00	62,50	45,17	
FeNO ≥ 40 ppb					
SB010	63,83	21,00	43,67	30,17	0,15
Placebo	46,33	21,33	62,50	37,00	

Leyenda de la Tabla S6: Efecto de 28 días de tratamiento con SB010 o placebo sobre niveles de FeNO sin provocación

5

El FeNO se midió al inicio de la provocación previa con los alérgenos y el tratamiento previo seguido de mediciones en el día 88 al final del período de seguimiento de 60 días. Se muestran los intervalos medios e intercuartil (IQR) para la población de estudio con intención de tratar, así como para los subgrupos preestablecidos de eos de sangre ≥ 4% y valor inicial de FeNO ≥ 40 ppb. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

10

Tabla S7 del Apéndice Complementario: Biomarcadores de seguridad

	Grupo de tratamiento con SB010				Grupo de tratamiento con placebo				Valor de p
	Antes del tratamiento		Después del tratamiento		Antes del tratamiento		Después del tratamiento		
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
<u>En el esputo</u>									
TNFa	5,18	4,19	7,43	8,51	4,10	3,20	4,57	6,06	0,45
IL-1b	16,44	34,27	28,79	51,90	31,73	41,05	30,09	52,13	0,75
IL-8	855,95	934,34	948,05	1.436,70	841,51	1.590,87	1.285,23	1.899,13	0,82
<u>Plasma</u>									
TNFa	2,84	3,04	2,76	2,86	2,69	3,85	2,87	3,44	0,95
IL-8	6,17	2,37	6,18	3,06	5,77	1,85	6,20	2,81	0,24
MCP-1	228,83	42,73	219,23	53,93	244,22	59,72	238,87	65,16	0,74
MCP-4	334,49	162,81	348,54	174,88	366,60	229,67	312,84	233,00	0,69
MIP-1b	74,94	20,71	82,01	29,85	88,34	28,47	82,33	23,23	0,30
MDC	4.202,15	1.957,44	3.876,35	2.222,62	3.238,25	1.493,30	3.653,38	1.223,84	0,69
IP-10	180,82	50,98	165,88	52,24	194,44	156,78	197,88	164,14	0,72
Sangre IL-4, IL-13 e IFN-γ: La mayoría de los valores están por debajo del límite inferior de cuantificación; IL-5 véase Figura S6 del Apéndice Complementario.									

15

Tabla S8 del Apéndice Complementario: Recuento diferencial de células en el esputo: expresado como células x10⁶/g de esputo)

		Eosinófilos		Neutrófilos		Linfocitos		Monocitos	
		Media	Std.	Media	Std.	Media	Std.	Media	Std.
SB010	Antes del tratamiento	1,9	2,8	5,1	11,7	0,1	0,4	0,3	0,9
	Después del tratamiento	0,9	1,3	1,8	2,6	0,0	0,0	0,1	0,1

		Eosinófilos		Neutrófilos		Linfocitos		Monocitos	
		Media	Std.	Media	Std.	Media	Std.	Media	Std.
Placebo	Antes del tratamiento	0,8	1,0	3,3	5,3	0,1	0,2	0,1	0,1
	Después del tratamiento	1,7	4,2	4,2	8,9	0,0	0,1	0,1	0,1

La tabla muestra las medias aritméticas más la desviación estándar/cambios posteriores a los alérgenos antes y después del tratamiento, respectivamente.

5

Tabla S9 del Apéndice Complementario: Lista de puntos finales de estudio

Punto final	Momentos en el tiempo de medición	Datos
<u>Punto final primario</u> Respuesta asmática de fase tardía (LAR), AUC	Día -64 a -16, -1, 28	Datos incluidos en el documento original
<u>Punto final secundario</u> Seguridad y tolerabilidad	En todo el estudio	Eventos adversos y monitorización inmune incluidos en el documento original
<u>Punto final exploratorio</u> LAR, disminución máxima AUC de respuesta asmática de fase temprana (EAR) y disminución máxima	Día -54 a -15, -1, 28 Día -54 a -15, -1, 28	Datos incluidos en el documento original Datos incluidos en el documento original
PC ₂₀ FeNo Análisis de esputo	Día -56 a -17, 0, 29 Día -1,0, 1, 13, 28, 29, 88 Día -56 a -17, -53 a -14, 0, 26, 29	Datos incluidos en el apéndice del documento original Datos incluidos en el apéndice del documento original Recuento celular diferencial (% de eosinófilos) incluido en el documento original; las mediciones de citocinas y ARNm no son significativas debido al bajo volumen de esputo; todas las citocinas medibles incluidas en la Tabla S6; triptasa incluida en el documento original
Biomarcadores sistémicos	Día -1,0, 28, 29	IL-5 incluida en el documento original: sin efecto específico evidente del SB010 en otros biomarcadores
Análisis de subgrupos (AUC LAR y disminución máxima; AUC EAR y disminución máxima)	Día -54 a -15, -1, 28	Subgrupos clave incluidos en el documento original
Farmacocinética	Día 1, 28/23	Datos no incluidos en el documento original

Lista de referencias

- 10 1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014. www.ginasthma.org; http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014.pdf
- 15 2. Bhakta NR, Woodruff PG. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. *Immunol Rev* 2011;242(1):220-232.
3. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF y col. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(5):388-395.
- 20 4. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012; 18(5):673-683.
5. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18(5):716-725.
- 25 6. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J*

- Clin Invest 1999;104(8):985-993.
7. Bergqvist A, Andersson CK, Hoffmann HJ y col. Marked epithelial cell pathology and leukocyte paucity in persistently symptomatic severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(12): 1475-1477.
- 5 8. Holgate ST. Trials and tribulations in identifying new biologic treatments for asthma. *J Immunol* 2012;33(5):238-246.
9. Cho EA, Moloney FJ, Cai H y col. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase first-in-human trial (DISCOVER). *Lancet* 2013;381(9880):1835-1843.
- 10 10. Santiago FS, Khachigian LM. Nucleic acid based strategies as potential therapeutic tools: mechanistic considerations and implications to restenosis. *J Mol Med (Berl)* 2001;79(12):695-706.
- 15 11. Sel S, Wegmann M, Dicke T y col. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(4):910-916.
12. Turowska A, Librizzi D, Baumgartl N y col. Biodistribution of the GATA-3-specific DNAzyme hgd40 after inhalative exposure in mice, rats and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;272(2):365-372.
- 20 13. Dicke T, Pali-Scholl I, Kaufmann A, Bauer S, Renz H, Garn H. Absence of unspecific innate immune cell activation by GATA-3-specific DNAzymes. *Nucleic Acid Ther* 2012;22(2):117-126.
- 25 14. Fuhst R, Runge F, Buschmann J y col. Toxicity profile of the GATA-3-specific DNAzyme hgd40 after inhalation exposure. *Pulm Pharmacol Ther* 2013;26(2):281- 289.
15. Global Initiative for Asthma (GINA): Global strategy for asthma management and prevention. 2008. www.ginasthma.org. *Eur Respir J* 2008; 31: 143-178.
- 30 16. Brand P, Beckmann H, Maas EM y col. Peripheral deposition of alpha1-protease inhibitor using commercial inhalation devices. *Eur Respir J* 2003;22(2):263-267.
17. Cockcroft DW, Murdock KY, Kirby J, Hargreave F. Prediction of airway responsiveness to allergen from skin sensitivity to allergen and airway responsiveness to histamine. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135(1):264-267.
- 35 18. Diamant Z, Gauvreau GM, Cockcroft DW y col. Inhaled allergen bronchoprovocation tests. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132(5): 1045-1055.
19. Gauvreau GM, Watson RM, Rerecich TJ, Baswick E, Inman MD, O'Byrne PM. Repeatability of allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(1):66-71.
- 40 20. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V y col. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26(2):319-338.
- 45 21. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL y col. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. Esta declaración oficial de la American Thoracic Society fue adoptada por la Junta Directiva de ATS, julio de 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):309-329.
22. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171 (8):912-930.
- 50 23. Janssen O, Schaumann F, Holz O y col. Low-dose endotoxin inhalation in healthy volunteers--a challenge model for early clinical drug development. *BMC Pulm Med* 2013;13:19.
24. O'Byrne PM. Allergen-induced airway inflammation and its therapeutic intervention. *Allergy Asthma Immunol Res* 2009;1(1):3-9.
- 55 25. Wenzel S, Wilbraham D, Fuller R, Getz EB, Longphre M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet* 2007;370(9596):1422-1431.
- 60 26. Wenzel S, Ford L, Pearlman D y col. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013;368(26):2455-2466.
27. Corren J, Busse W, Meltzer EO y col. A randomized, controlled, phase 2 study of AMG 317, an IL-4Ralpha antagonist, in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(8):788-796.
- 65

28. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B y col. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009;360(10):973-984.
- 5 29. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M y col. Mepolizumab for prednisone¹¹³ dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009;360(10):985-993.
30. Pavord ID, Korn S, Howarth P y col. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012;380(9842):651-659.
- 10 31. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA y col. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011;365(12):1088-1098.
32. Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(4):829-842.
- 15 33. Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet LP y col. Effects of an Anti-TSLP Antibody on Allergen-Induced Asthmatic Responses. *N Engl J Med* 2014.
- 20 34. Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ y col. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax* 2012;67(3):199-208.
- 35 35. Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Maitland-van der Zee AH, Koenderman L. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics* 2013;7:199-210.
- 25 36. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy* 2012;42(5):650-658.
- 30 37. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med* 2013;19(8):977-979.
38. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH y col. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(6):1828-1834.
- 35 39. Winandy S, Brown M. No DL1 Notch ligand? GATA be a mast-cell. *Nat Immunol* 2007;8(8):796-798.
- 40 40. Mjosberg J, Bernink J, Golebski K y col. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 2012;37(4):649-659.
- 41 41. Sadat MA, Kumatori A, Suzuki S, Yamaguchi Y, Tsuji Y, Nakamura M. GATA-3 represses gp91phox gene expression in eosinophil-committed HL-60-C15 cells. *FEBS Lett* 1998;436(3):390-394.
- 42 42. Gauvreau GM, Boulet LP, Postma DS y col. Effect of low-dose ciclesonide on allergen-induced responses in subjects with mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(2):285-291.
- 45 43. Kent SE, Boyce M, Diamant Z y col. The 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor, GSK2190915, attenuates the early and late responses to inhaled allergen in mild asthma. *Clin Exp Allergy* 2013;43(2):177-186.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un inactivador de GATA-3 basado en el ácido nucleico para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece asma mediada por Th2, en el que el paciente humano está caracterizado por (i) un recuento de eosinófilos en sangre del 3% o más, en particular del 4% o más, más particularmente del 5% o más; y/o (ii) recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más; y/o (iii) óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.
- 10 **2.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inactivador basado en el ácido nucleico es una enzima de ADN dirigida a la GATA-3.
- 15 **3.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho paciente humano tiene un recuento de eosinófilos en sangre del 4% o más, más particularmente del 5% o más.
- 20 **4.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho paciente humano tiene un recuento de eosinófilos en sangre de $350 \times 10^6/L$ o más, más particularmente de $450 \times 10^6/L$ o más
- 25 **5.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dicho recuento de eosinófilos en sangre está determinado mediante (i) recuento sanguíneo diferencial automatizado; o (ii) mediante diferenciación celular microscópica manual usando frotis de sangre convencionales.
- 30 **6.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho paciente humano tiene óxido nítrico espiratorio fraccional de 40 ppb o más.
- 35 **7.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 es la enzima de ADN hgd40 (SEQ ID NO: 3, 5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGAG).
- 8.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho hgd40 está comprendido en una formulación para inhalación.
- 9.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho hgd40 está disuelto en PBS.
- 40 **10.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que entre 5 y 50 mg de la hgd40, particularmente entre 5 y 20 mg de la hgd40, particularmente 10 mg de la hgd40 están disueltos en 2 ml de PBS.
- 45 **11.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 se administra una vez al día, dos veces al día o tres veces al día, particularmente una vez al día.
- 50 **12.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 se administra una vez al día en tratamiento continuo, en particular tratamiento de mantenimiento.
- 55 **13.** El inactivador basado en el ácido nucleico de GATA-3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho inactivador basado en el ácido nucleico se usa como tratamiento complementario para una o más terapias inhaladas u orales para el tratamiento del asma seleccionada entre la lista de: corticosteroides, beta-agonistas de acción prolongada (LABA), antagonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA), antileucotrienos, beta-agonistas beta de acción corta (SABA), anticolinérgicos y anticuerpos monoclonales.

Figura 1:

A

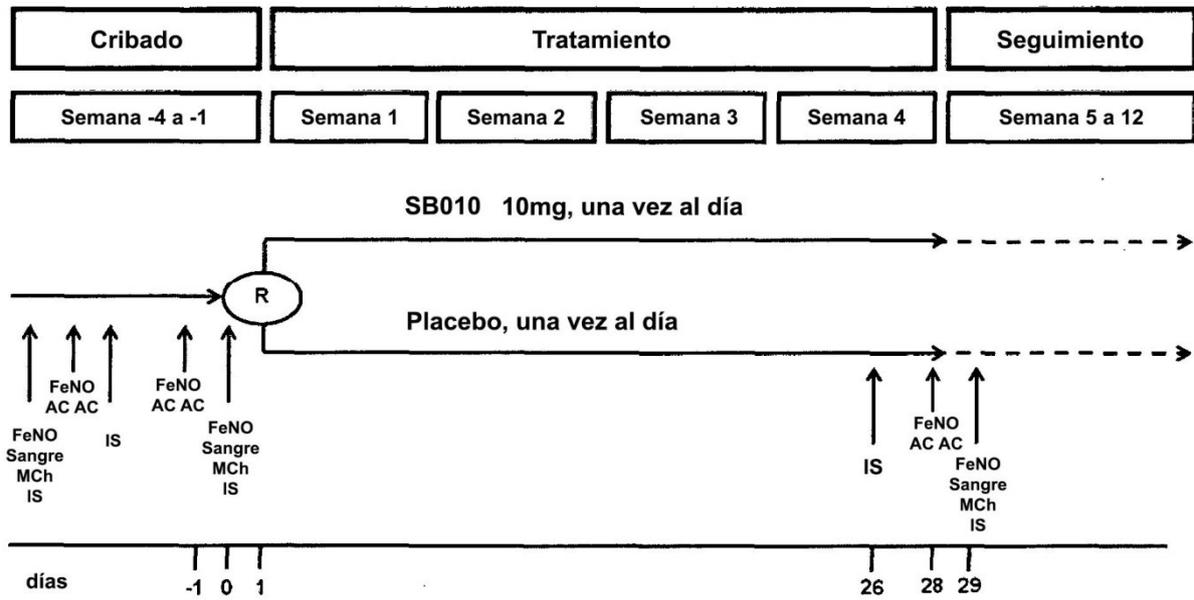


Figura 1B

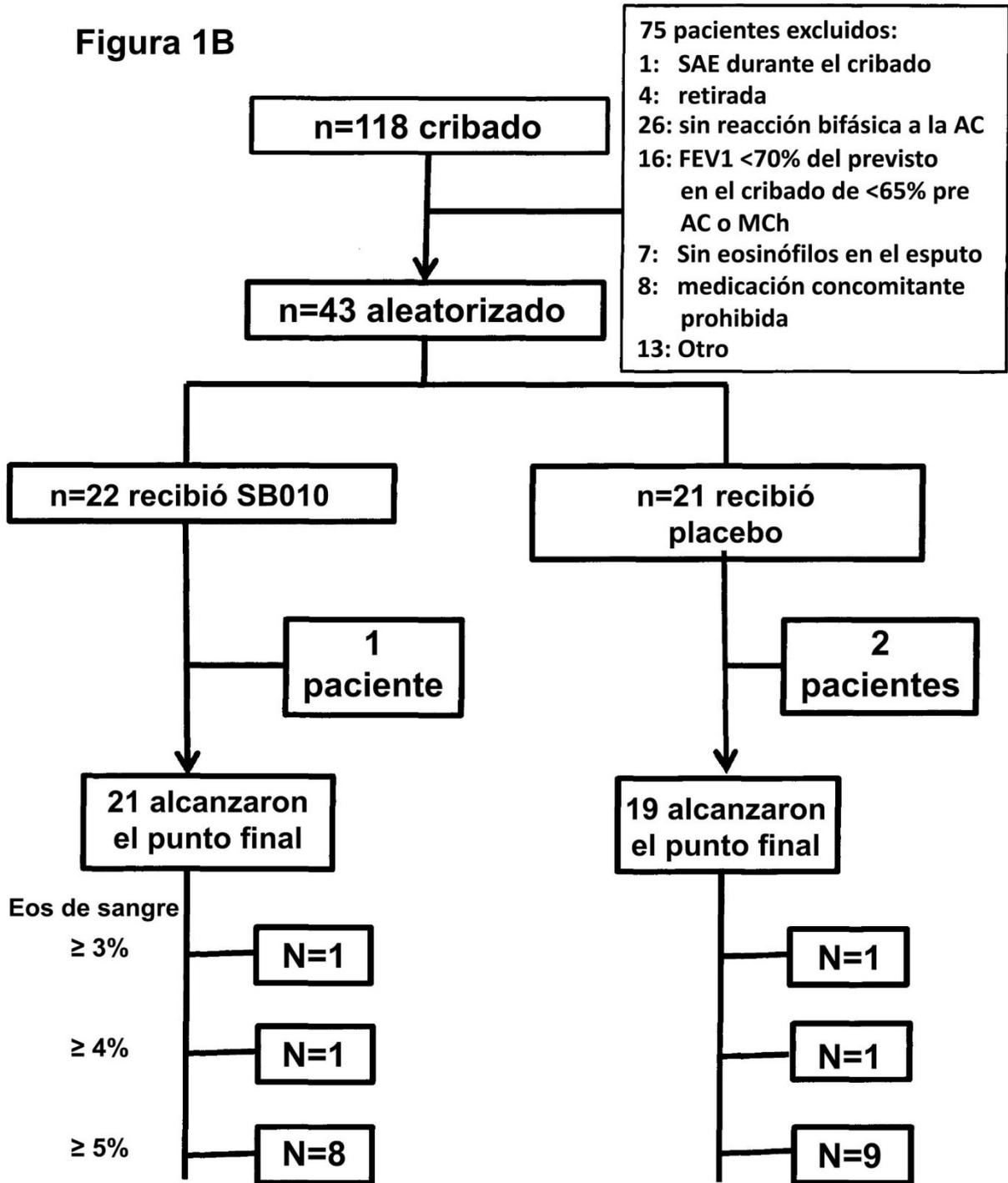


Figura 2A

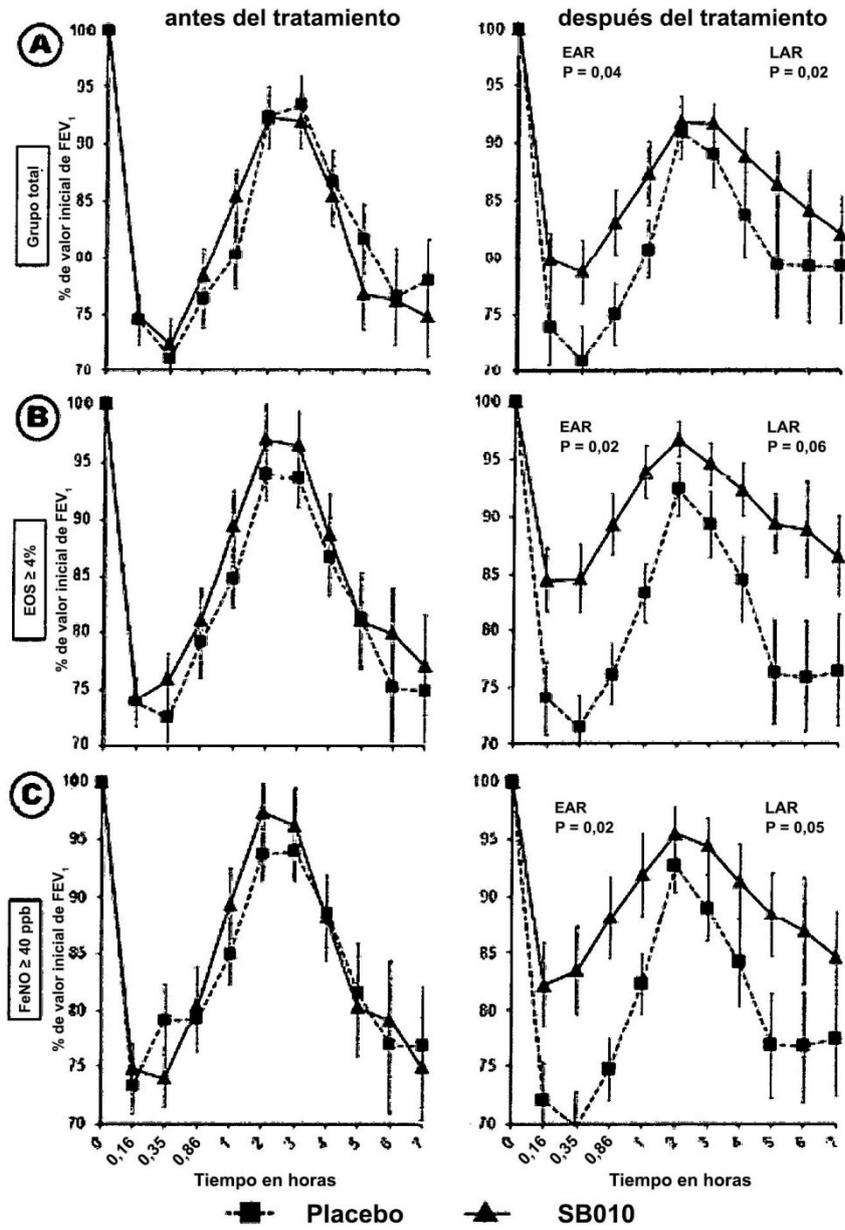


Figura 2B

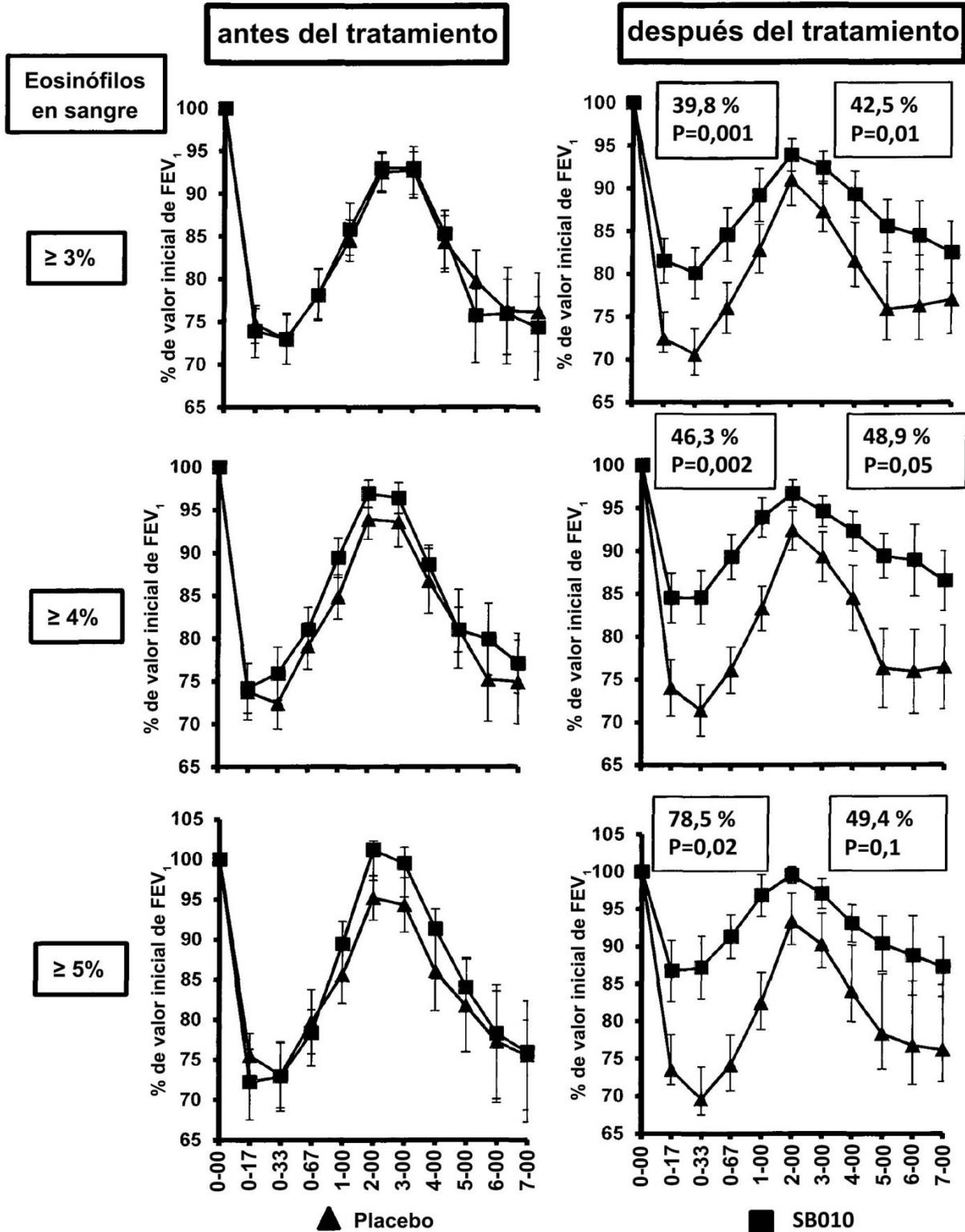


Figura 2C:

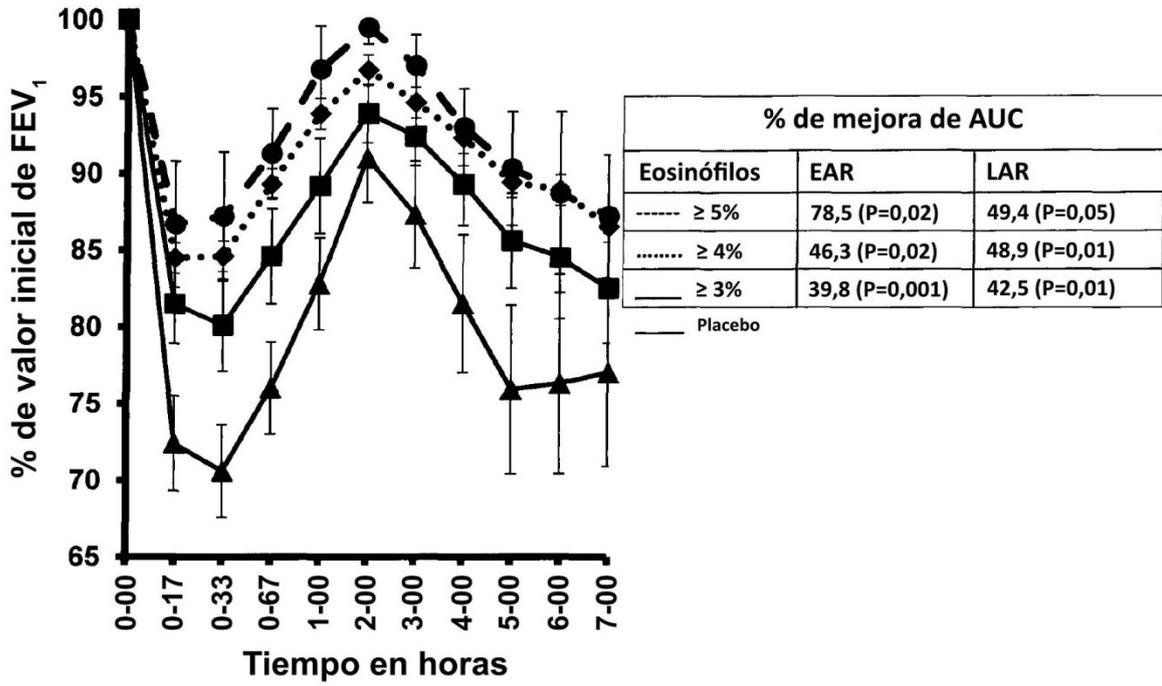


Figura 3

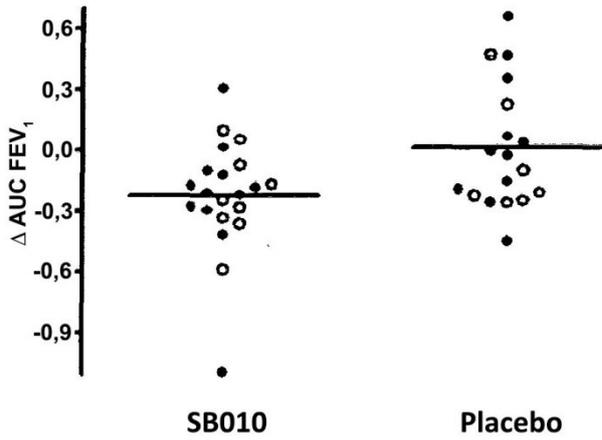


Figura 4

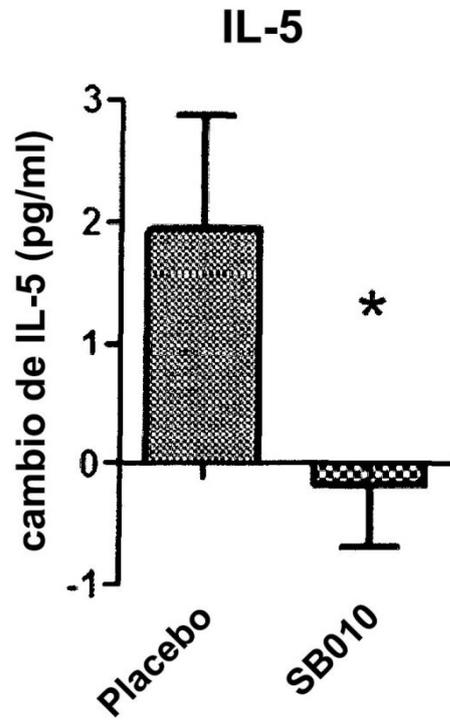


Figura 5 = Figura S1

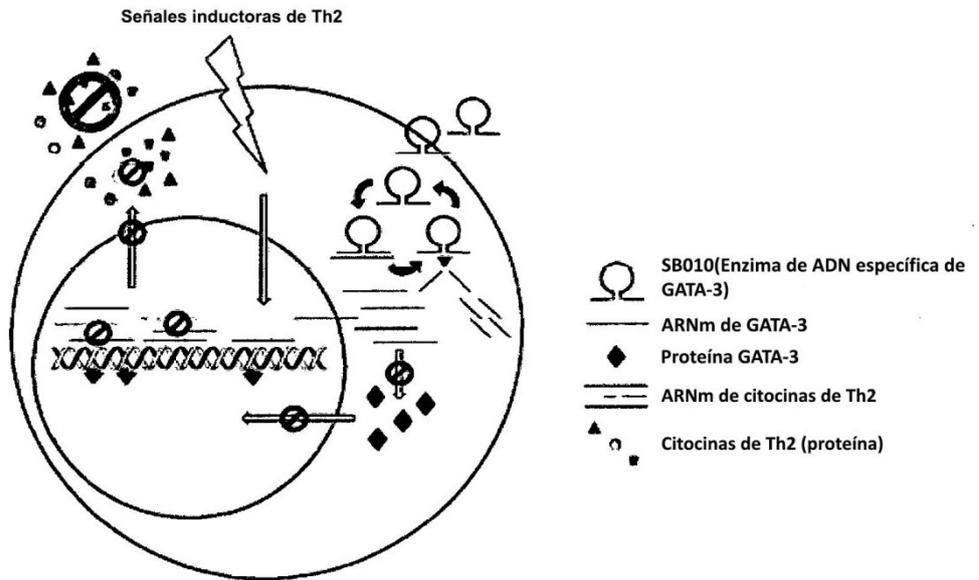
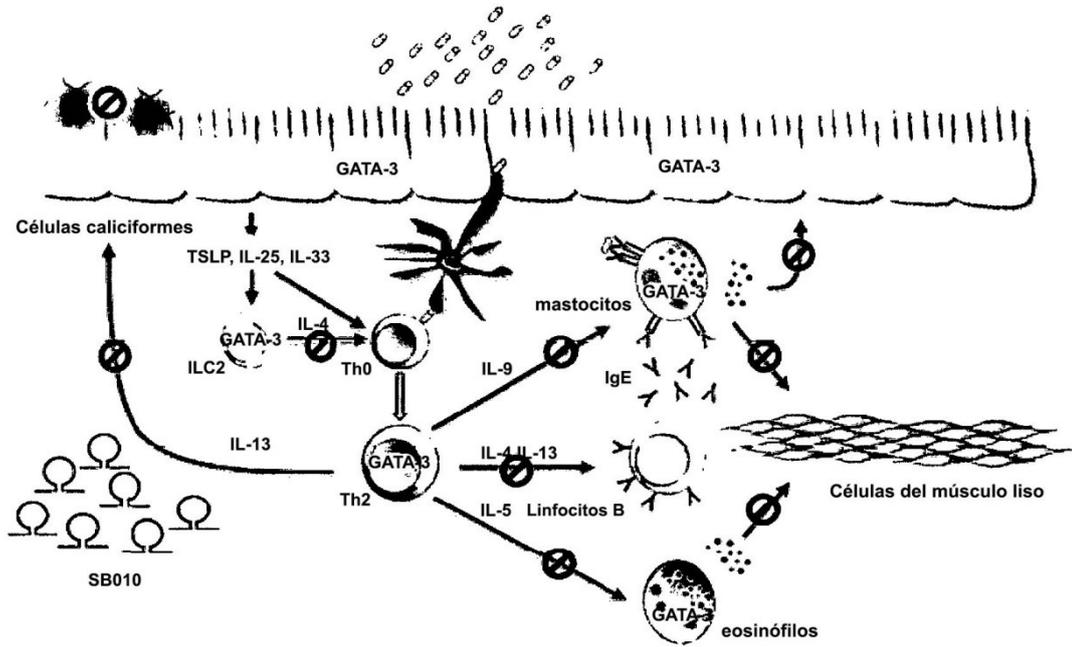


Figura 6 = Figura S2

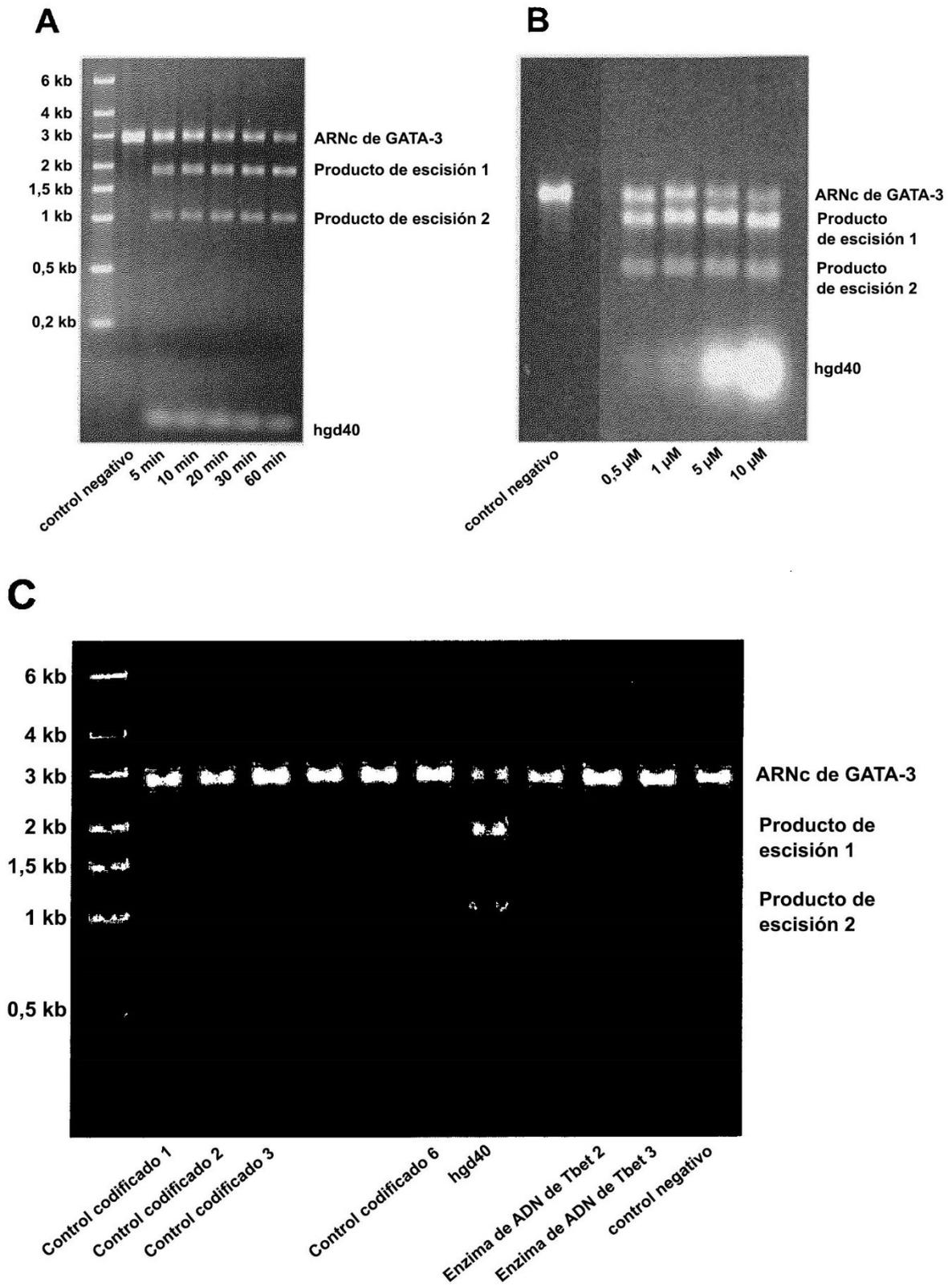


Figura 7 = Figura S3

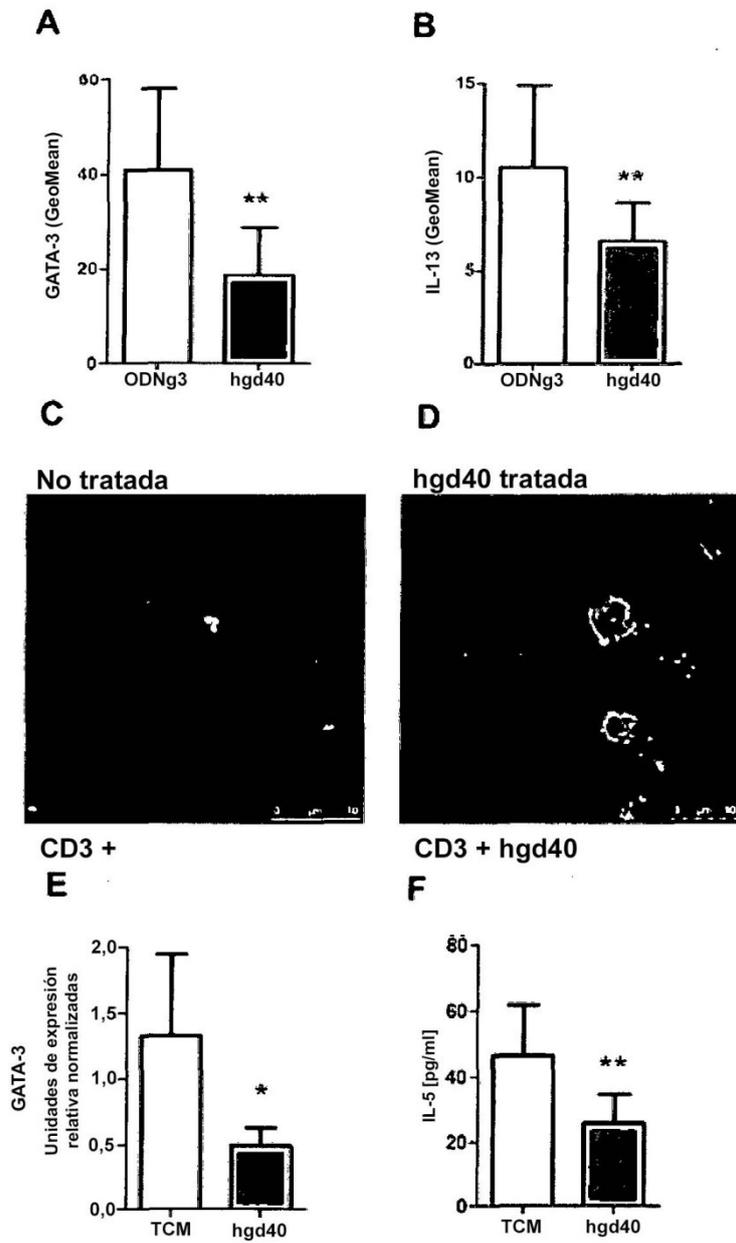


Figura 8 = Figura S4

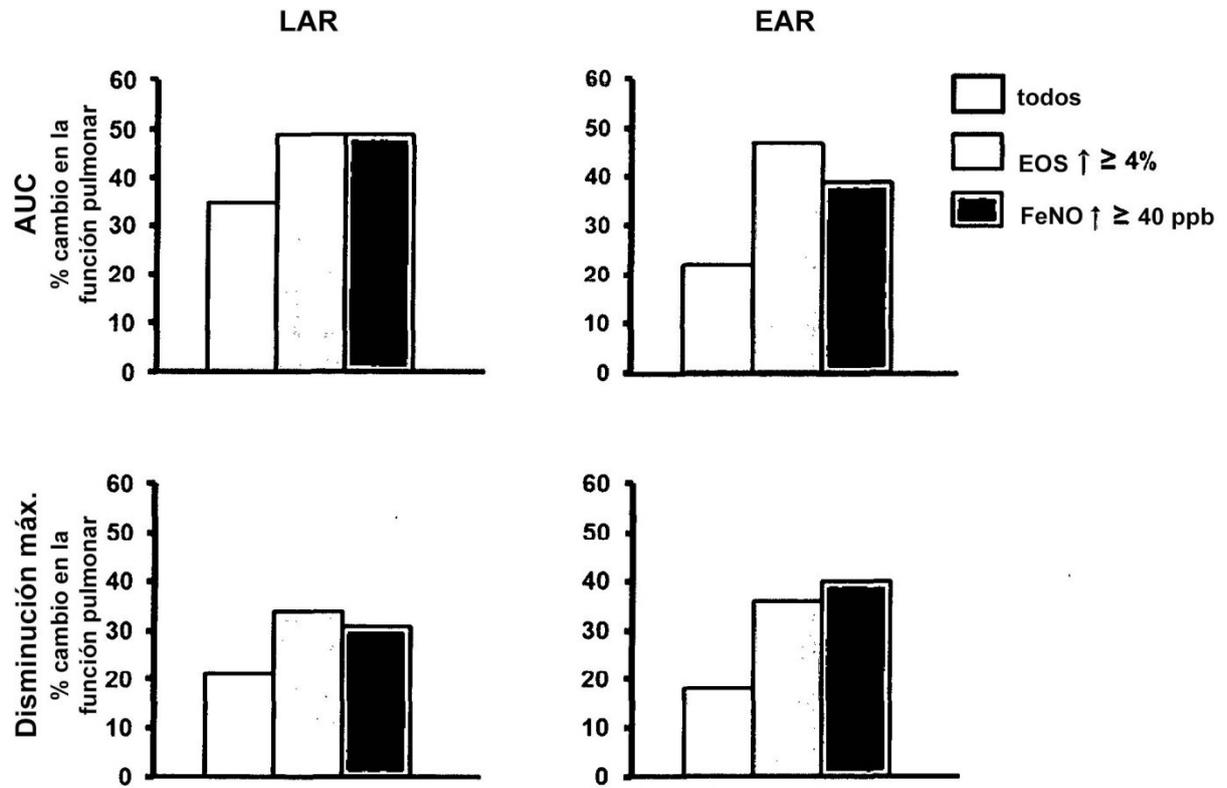


Figura 9 = Figura S5

