

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 094**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2007 PCT/EP2007/009449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08061612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07819483 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2083812**

54 Título: **Uso de inhibidores de arginasa en el tratamiento del asma y rinitis alérgica**

30 Prioridad:

21.11.2006 EP 06024111

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

19.09.2017

73 Titular/es:

**RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN (100.0%)
BROERSTRAAT 5
9712 CP GRONINGEN, NL**

72 Inventor/es:

**MEURS, HERMANUS;
ZAAGSMA, JOHAN;
MAARSINGH, HARM y
VAN DUIN, MICHEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 633 094 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

Uso de inhibidores de arginasa en el tratamiento del asma y rinitis alérgica

La presente invención se refiere al tratamiento profiláctico de mantenimiento del asma alérgica, asma no alérgica y rinitis alérgica.

5 El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias. Las características distintivas de esta enfermedad son las reacciones obstructivas bronquiales precoces y tardías inducidas por alérgenos, asociadas a la infiltración y activación de células inflamatorias en las vías respiratorias - en particular eosinófilos y linfocitos Th2 - y el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias a una diversidad de estímulos, que incluyen alérgenos, agentes irritantes químicos, aire frío y agentes farmacológicos como histamina y metacolina.

10 Las alteraciones del control neurógeno y no neurógeno de la función del músculo liso de las vías respiratorias, así como los cambios físicos en las vías respiratorias, que incluyen la lesión epitelial, el engrosamiento de la mucosa debido al edema y la vasodilatación local, y las secreciones mucosas en la luz de las vías respiratorias, pueden estar implicadas en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias tras las reacciones asmáticas precoces y tardías en el asma aguda.

15 En el asma crónica, la remodelación de las vías respiratorias debida a cambios estructurales irreversibles de la pared de las vías respiratorias, que incluyen el engrosamiento de la membrana basal, hipertrofia de las glándulas mucosas, fibrosis subepitelial y masa incrementada de músculo liso en las vías respiratorias, pueden estar implicadas de manera importante en la hiperreactividad persistente de las vías respiratorias y la disminución de la función pulmonar.

20 Todos estos cambios se inducen mediante una cascada compleja de reacciones inflamatorias que implican diversos mediadores alérgicos, neurotransmisores, citocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

La rinitis alérgica es un grupo de síntomas, predominantemente nasales, provocados por partículas atmosféricas de polvo, caspa, o pólenes de plantas en personas alérgicas a estas sustancias. Cuando estos síntomas están provocados por el polen, la rinitis alérgica se conoce habitualmente como "rinitis polínica". La rinitis alérgica es un problema habitual que puede estar asociado al asma. En los pacientes con asma, la rinitis descontrolada parece empeorar el asma.

Debido a la incidencia relativamente elevada del asma en la población, la carga económica resultante del absentismo laboral o incluso de la incapacidad de trabajar, así como de los gastos médicos directos y de las medicaciones, es elevada. Por lo tanto, es deseable prevenir los síntomas. Además, la calidad de vida de los pacientes de asma y alérgicos mejoraría mucho en caso de que se pudiera evitar del desarrollo de los síntomas por medio de un tratamiento profiláctico.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento profiláctico de mantenimiento nuevo para el asma y la rinitis alérgica.

35 La investigación que condujo a la presente invención demostró por primera vez la importancia de la arginasa en la patofisiología del asma *in vivo*. Mediante el uso de un modelo en conejillos de Indias de asma alérgica, los presentes inventores demostraron que la inhalación del inhibidor de arginasa específico, no selectivo de isoenzima, ABH invirtió de manera aguda la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos (AHR) después de la reacción asmática precoz (EAR) y tardía (LAR) inducida por alérgenos, mientras el pretratamiento con el inhibidor de arginasa redujo considerablemente la sensibilidad de las vías respiratorias al alérgeno inhalado y protegió contra el desarrollo de EAR y LAR inducidas por alérgenos, y AHR después de ambas reacciones.

Se descubrió de manera más específica que el pretratamiento con ABH inhalado provocó una reducción considerable de la sensibilidad de las vías respiratorias al alérgeno inhalado (profilaxis). El pretratamiento con ABH protegió contra el desarrollo de obstrucciones bronquiales inducidas por alérgenos y AHR cuando los animales se expusieron a una dosis de alérgeno que provocó obstrucción de las vías respiratorias en los controles tratados con solución salina.

Además, cuando los animales se expusieron a la obstrucción de las vías respiratorias mediante el uso de una dosis mayor del alérgeno que los controles tratados con solución salina, el pretratamiento con ABH inhalado todavía protegió contra el desarrollo de AHR después de la reacción asmática precoz y tardía. Además, ABH invirtió de manera aguda la AHR inducida por alérgenos establecida después de la reacción asmática precoz y también después de la tardía.

Los efectos anteriores de la inhibición de arginasa se pueden explicar mediante un incremento de la producción de NO en las vías respiratorias, debido a la biodisponibilidad incrementada de L-arginina para cNOS y/o iNOS, y de ese modo se atenúa la activación de mastocitos inducida por alérgenos, y se induce la broncoprotección contra los estímulos contráctiles. En particular, después de la reacción asmática tardía, este último efecto implicará también

una producción mediada por iNOS reducida de peroxinitrito, el metabolito procontráctil y proinflamatorio de NO.

El mecanismo de acción anteriormente mencionado es atractivo, ya que combina propiedades antialérgicas (y antiinflamatorias) con una broncoprotección (aguda) contra los estímulos contráctiles. Además, basándose en la inhibición de la síntesis mediada por arginasa de poliaminas y L-prolina, ABH puede inhibir la remodelación de las vías respiratorias asociada a la disminución irreversible de la función pulmonar en el asma crónica.

ABH es especialmente eficaz en pacientes con asma alérgica. Dado el efecto protector hacia la obstrucción bronquial inducida por alérgenos y la AHR inducida por alérgenos, la terapia de inhalación con ABH se dirige principalmente a pacientes con asma alérgica persistente que usan con regularidad broncodilatadores (de acción corta) para tratar los síntomas, es decir, un tratamiento profiláctico de mantenimiento para prevenir la obstrucción bronquial inducida por alérgenos y el desarrollo de AHR. En la terapia del asma, la AHR es una característica clave en la que centrarse, ya que es un factor determinante importante de la gravedad del asma. La terapia con ABH se destina a pacientes con asma persistente leve, moderada así como grave, ya que los estudios de Morris et al. (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 170 : 148-153) han indicado un papel importante de la arginasa en los pacientes con exacerbaciones del asma grave.

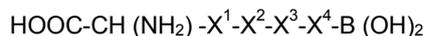
Dado su efecto antialérgico, los efectos beneficiosos de ABH en los pacientes con rinitis alérgica (a menudo asociada al asma alérgica) también son parte de esta invención.

En la presente memoria se describe el uso de un inhibidor de arginasa para la preparación de un medicamento para la terapia profiláctica de mantenimiento de un paciente asmático o alérgico previniendo la obstrucción de las vías respiratorias superiores e inferiores, en particular la obstrucción bronquial inducida por alérgenos y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias.

La invención se refiere a un inhibidor de arginasa para el uso en la terapia profiláctica de mantenimiento de un paciente asmático o alérgico reduciendo la sensibilidad de las vías respiratorias a un alérgeno inhalado y protegiendo contra el desarrollo de una reacción asmática precoz (EAR) y reacción asmática tardía (LAR) inducidas por el alérgeno, en el que el inhibidor de arginasa se administra mediante inhalación tópica.

El paciente a tratar es en particular un paciente alérgico que tiene una actividad de arginasa elevada como síntoma o causa de su trastorno. Los pacientes que tienen una actividad de arginasa elevada son normalmente asmáticos o tienen rinitis alérgica, pero también pueden ser pacientes asmáticos no alérgicos que tienen una actividad de arginasa elevada en las vías respiratorias como síntoma o causa de este trastorno.

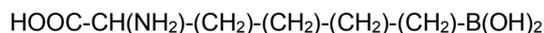
En principio, se puede usar cualquier inhibidor de arginasa según la invención. Los inhibidores de arginasa preferidos para el uso en la invención son los descritos en el documento US 6.723.710 que tienen la fórmula:



en la que cada X^1 , X^2 , X^3 , X^4 se selecciona del grupo que consiste en $-(\text{CH}_2)-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-(\text{NH})-$, y $-(\text{N-alquilo})$. El término "alquilo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier esqueleto de carbono de C_1 a C_{20} , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido, por ejemplo con F, S, O, o N, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de inhibidores de arginasa según la fórmula general anterior, en la que uno de X^1 , X^2 , X^3 o X^4 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-(\text{NH})-$, y el resto de X^1 , X^2 , X^3 o X^4 son $-(\text{CH}_2)-$, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Según una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de arginasa según la fórmula:



y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Este compuesto también se denomina ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico o ABH. La preparación de ABH y los compuestos correspondientes se describe, por ejemplo, en el documento US 6.723.710, especialmente como se describe en la columna 25, línea 34 a la columna 26, línea 67, y la Fig. 6.

Otros inhibidores de arginasa preferidos para el uso según la presente invención son los compuestos seleccionados del grupo que consiste en $\text{N}\omega$ -OH-L-arginina (NOHA), $\text{N}\omega$ -hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA), α -difluorometilornitina (DFMO), L-norvalina, yodoacetil-L-ornitina, yodoacetil-L-lisina, L-lisina, y L-citrulina y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Preferiblemente, el inhibidor de arginasa se usa como el único ingrediente activo del medicamento. El inhibidor de arginasa, en particular ABH, se puede usar como tal sin combinarlo con otros ingredientes activos. El inhibidor de arginasa se combina, sin embargo, con aditivos inactivos adecuados en una formulación profiláctica.

El documento WO2004/073623 describe el tratamiento de afecciones asociadas a la arginina elevada, que incluyen

el asma, por medio de arginina que se combina opcionalmente con un inhibidor de arginina y/o magnesio. Esta publicación se refiere al tratamiento, no a la profilaxis. El tratamiento básico es con arginina. El inhibidor de arginasa se puede añadir como ingrediente activo adicional, pero nunca es el ingrediente principal o el único ingrediente activo.

- 5 El documento WO 2005/003164 describe el uso de sIL-13Ra2.Fc para inhibir la producción de mucosidad inducida por alérgenos y la hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones Balb/C tratados y sin tratar sensibilizados con OVA. Los síntomas asmáticos, sin embargo, no se previenen completamente mediante este antagonista de IL-13.

10 El medicamento profiláctico de la invención se administra mediante inhalación. Las formulaciones de inhalación pueden proporcionar, por ejemplo, el ingrediente activo en forma de un aerosol, gotículas de una solución o suspensión, o un polvo, y se pueden administrar por medio de un dispositivo de inhalación. Los aditivos pueden comprender agentes tensoactivos, conservantes, agentes aromatizantes, agentes tamponadores, etc. La concentración del ingrediente activo se selecciona, por ejemplo, del intervalo de 0,1 µg a 5 mg/inhalación, en particular 1 µg a 2 mg/inhalación, más en particular 10 µg a 1 mg/inhalación. Una dosis adecuada para otras vías de administración comprende de 0,0001 a 25 mg del ingrediente activo por kg de peso corporal.

- 15 El nombre del índice CA de ABH es 6-borono-L-norleucina. Su fórmula estructural se muestra en la Figura 1.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en el Ejemplo siguiente. En el Ejemplo se hace referencia a las figuras siguientes.

Figura 1: Fórmula estructural de ABH.

20 Figura 2: Ilustración esquemática de los protocolos usados en este estudio. OA: exposición a ovoalbúmina; PC₁₀₀: medida de PC₁₀₀ para histamina.

25 Figura 3: Efecto de la inhalación de solución salina (panel izquierdo) o del inhibidor de arginasa ABH (concentración del nebulizador 25 mM; panel derecho) sobre la reactividad basal de las vías respiratorias hacia histamina inhalada y sobre la hiperreactividad hacia histamina después de la EAR y LAR. Se llevaron a cabo dos medidas de PC₁₀₀ posteriores 30 min antes (barras claras) y 30 min después (barras oscuras) de la inhalación de solución salina o ABH. Los datos representan la media ± EEM de 3-5 animales. *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,0001; n.s. = no significativo.

30 Figura 4: Efecto de la inhalación de ABH (concentración del nebulizador 25 mM) sobre la AHR después de la EAR (panel A) y la LAR (panel B). AHR se define como la proporción de los valores de PC₁₀₀ para histamina obtenidos antes (basal) y después de la exposición al alérgeno (después de EAR o LAR, respectivamente). Los datos representan la media ± EEM de 3-5 animales. ***P<0,001 y *P=0,10 frente al pretratamiento.

35 Figura 5: Efecto de la inhalación de solución salina (panel izquierdo) o L-arginina (concentración del nebulizador 1 M; panel derecho) sobre la reactividad basal de las vías respiratorias hacia histamina inhalada y sobre la AHR hacia histamina después de la EAR y LAR. Se llevaron a cabo dos medidas de PC₁₀₀ posteriores 30 min antes (barras claras) y 30 min después (barras oscuras) de la inhalación de solución salina o L-arginina. Los datos representan la media ± EEM de 9 animales. *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,0001.

40 Figura 6: Efecto de la inhalación de L-arginina (concentración del nebulizador 1 M) sobre la AHR después de la EAR (panel A) y la LAR (panel B). AHR se define como la proporción de los valores de PC₁₀₀ para histamina obtenidos antes (basal) y después de la exposición al alérgeno (después de EAR o LAR, respectivamente). Un valor de 1 representa la normorreactividad. Los datos representan la media ± EEM de 9 animales. *P<0,05 y ***P<0,001 frente al pretratamiento.

45 Figura 7: Efecto de la inhalación de solución salina (panel izquierdo) o D-arginina (concentración del nebulizador 1 M; panel derecho) sobre la reactividad basal de las vías respiratorias hacia histamina inhalada y sobre la AHR hacia histamina después de la EAR y LAR. Se llevaron a cabo dos medidas de PC₁₀₀ posteriores 30 min antes (barras claras) y 30 min después (barras oscuras) de la inhalación de solución salina o D-arginina. Los datos representan la media ± EEM de 3 animales. *P<0,05 y **P<0,01.

50 Figura 8: Efecto de la inhalación de solución salina (barras oscuras, panel izquierdo) o ABH (25 mM; concentración del nebulizador; barras oscuras, panel derecho) 0,5 h antes y 8 h después de la inhalación del alérgeno sobre la reactividad de las vías respiratorias hacia histamina después de la EAR (6 h) y LAR (24 h) en comparación con el efecto de la solución salina obtenido en los mismos animales una semana antes (barras claras). Los datos representan la media ± EEM de 5 animales. *P<0,05 y ***P<0,001, n.s. = no significativo.

55 Figura 9: Efecto de la inhalación de solución salina o ABH (concentración del nebulizador 25 mM) 0,5 h antes y 8 h después de la inhalación del alérgeno sobre la AHR hacia histamina después de la EAR (barras oscuras, panel A) y la LAR (barras oscuras, panel B) en comparación con los controles de solución salina (barras claras) obtenidos en los mismos animales una semana antes. AHR se define como la proporción de los valores de PC₁₀₀ para histamina obtenidos antes (basal) y después de la exposición al alérgeno (después de EAR y LAR, respectivamente). Un valor

de 1 representa la normorreactividad. Los datos representan la media \pm EEM de 5 animales. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ frente al control.

Figura 10: Efecto del pretratamiento con solución salina o ABH (concentración del nebulizador 25 mM) sobre la dosis de ovoalbúmina necesaria para inducir la obstrucción de las vías respiratorias (barras oscuras) en comparación con los controles de solución salina (barras claras) obtenidos en los mismos animales una semana antes. Por favor, obsérvese que la dosis de ovoalbúmina se representa logarítmicamente. Los datos representan la media \pm EEM de 5 animales. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$; n.s. = no significativo.

Figura 11: Efecto del tratamiento con solución salina inhalada o ABH (25 mM; concentración del nebulizador) 0,5 h antes y 8 h después de la inhalación del alérgeno sobre la reactividad de las vías respiratorias hacia histamina después de la EAR (6 h después de la exposición al alérgeno) y LAR (24 h después de la exposición al alérgeno). Ambos grupos de tratamiento se expusieron a la misma dosis de alérgeno, que indujo la obstrucción de las vías respiratorias en los animales tratados con solución salina. Los datos representan la media \pm EEM de 5-6 animales. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$.

Figura 12: (a) Registros en línea representativos de P_{pi} en conejillos de Indias conscientes, sin sujeciones, tras la exposición al alérgeno ($t=0$ h). Los animales se trataron con solución salina o ABH 25 mM (concentración del nebulizador) 0,5 h antes y 8 h después de la exposición al alérgeno. Ambos grupos de tratamiento se expusieron a la misma dosis de alérgeno, (b) Efecto del pretratamiento con solución salina o ABH sobre la elevación máxima inicial tras la exposición al alérgeno. Los datos representan la media \pm EEM de 5-6 animales. ** $P < 0,01$ en comparación con los animales tratados con solución salina.

Ejemplo

INTRODUCCIÓN

Mediante el uso de un modelo de conejillo de Indias de asma alérgica, este ejemplo informa sobre datos *in vivo* que demuestran que la inhalación de ABH invierte de manera aguda la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR y LAR, que se puede imitar mediante L-arginina. Además, se demuestra que el pretratamiento con ABH reduce considerablemente la sensibilidad de las vías respiratorias al alérgeno inhalado y protege contra el desarrollo de EAR y LAR inducidas por alérgenos, y AHR después de ambas reacciones.

MÉTODOS

Animales y procedimiento de sensibilización

En este ejemplo se usaron conejillos de Indias Dunkin Hartley macho genéticamente heterogéneos sin patógenos específicos (Harlan Heathfield, R.U.). Todos los animales, que pesaron aproximadamente 250 g, se sensibilizaron de manera activa con IgE hacia ovoalbúmina como describió Van Amsterdam et al. [Agents Actions 1989, 26:48-51]. Los animales se operaron a las 2 semanas tras la sensibilización y se usaron de manera experimental en las semanas 4 y 5 tras la sensibilización. Los animales se albergaron en jaulas individuales en animalarios con un ambiente controlado, y se les administró agua y alimento a voluntad, mientras se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Todos los protocolos descritos en este estudio fueron aprobados por la Comisión para la Experimentación con Animales de la Universidad de Groningen.

Medida de la función de las vías respiratorias

La función de las vías respiratorias se estudió mediante la medida en línea de la presión pleural (P_{pi}) en condiciones sin sujeción como se describió previamente [Santing et al., Pulm Pharmacol 1992, 5:265-272; Meurs et al., Nature Protocols 2006, 1:840-847].

Brevemente, se implantó quirúrgicamente un pequeño catéter con globo de látex relleno de líquido dentro de la cavidad torácica. El extremo libre del catéter se llevó de manera subcutánea hasta el cuello del animal, en donde se expuso y se unió permanentemente. Por medio de una cánula externa rellena de líquido, se conectó el catéter con globo pleural a un transductor de presión (TXX-R, Viggo-Spectramed, Bilthoven, Países Bajos). Se midió la P_{pi} (en cm H_2O) continuamente mediante el uso de un sistema informático en línea.

Mediante el uso de una combinación de medidas de flujo con un neumotacógrafo, implantado en la tráquea, y la medida de la presión con el catéter con globo pleural, se mostró que los cambios en P_{pi} están relacionados de manera lineal con los cambios de la resistencia de las vías respiratorias, y, por lo tanto, se pueden usar como índice sensible de la broncoconstricción inducida por alérgenos e histamina [Santing et al., anteriormente mencionado]. De esta manera, la función de las vías respiratorias se puede monitorizar repetidamente y continuamente durante periodos prolongados de tiempo, mientras los animales no perciben las medidas que se están tomando.

Durante el protocolo experimental (1-4 semanas tras la cirugía) las medidas basales de P_{pi} permanecieron estables y no se observaron signos de inflamación en los sitios quirúrgicos.

Procedimientos de provocación

Se llevaron a cabo provocaciones con alérgeno e histamina mediante inhalación de soluciones en aerosol. Estas provocaciones se llevaron a cabo en una jaula de perspex especialmente diseñada de 9 l, en la que los conejillos de Indias se podían mover libremente como se describió previamente [Santing et al.; Meurs et al., ambos anteriormente mencionados]. Un nebulizador DeVilbiss (tipo 646) controlado mediante un flujo de aire de 8 l/min proporcionó al aerosol un caudal de 0,33 ml/min. Los animales se habituaron a las condiciones experimentales y al procedimiento de provocaciones al menos una semana tras la cirugía, cuando se restableció el peso preoperatorio, como se describió previamente [Meurs et al., anteriormente mencionado].

En los días experimentales tras el procedimiento de adaptación, se llevaron a cabo las provocaciones con alérgeno y/o histamina como se describe más adelante. Todas las provocaciones fueron precedidas por un periodo de adaptación de al menos 30 min, seguido de dos provocaciones de control consecutivas con solución salina, y cada provocación duró 3 min y estuvieron separadas por intervalos de 7 min. Se calculó un valor basal de P_{pi} hallando la media de los valores de P_{pi} de los últimos 20 min del periodo de adaptación.

Para determinar la reactividad de las vías respiratorias hacia histamina, se llevaron a cabo provocaciones con etapas de concentraciones crecientes (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$) en solución salina. Las provocaciones con histamina duraron 3 min y estuvieron separadas por intervalos de 7 min. Los animales se expusieron hasta que se incrementó P_{pi} en más de un 100% por encima del valor basal durante al menos 3 minutos consecutivos. La concentración de histamina que provocó un 100% de incremento de P_{pi} (PC_{100}) se obtuvo mediante interpolación lineal de la curva de concentración- P_{pi} y se usó como índice de la reactividad de las vías respiratorias hacia histamina. P_{pi} volvió al valor basal en 15 min tras la última provocación con histamina.

Las provocaciones con alérgeno se llevaron a cabo mediante inhalación de concentraciones crecientes de 0,5, 1,0 o 3,0 mg/ml de ovoalbúmina en solución salina, y se interrumpieron cuando se observaron los primeros signos de dificultad respiratoria y se alcanzó un incremento de P_{pi} de más de un 100%.

*PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**25 Inversión de la AHR inducida por alérgenos mediante ABH y L-arginina*

En dos ocasiones diferentes, separadas por un intervalo de una semana, los conejillos de Indias se trataron con vehículo (solución salina) o fármaco (ABH, L-arginina o D-arginina), para establecer los efectos agudos de estos fármacos sobre la reactividad basal de las vías respiratorias a la histamina, así como sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos (AHR) después de la EAR y la LAR (Fig. 2).

En el primer día experimental, se establecieron los efectos inducidos por solución salina o fármaco sobre la reactividad basal hacia histamina. Treinta minutos tras la determinación de la PC_{100} basal para histamina, se inhaló un aerosol de solución salina (control) o ABH 25 mM, L-arginina 1,0 M o D-arginina 1,0 M (concentraciones del nebulizador) durante 15 min. Tras estas inhalaciones, se llevó a cabo una segunda medida de PC_{100} para histamina comenzando 15 min más tarde. En el segundo día, se llevaron a cabo provocaciones con alérgeno. A las 5 h y 23 h después de la provocación con ovoalbúmina, se midieron los valores de PC_{100} para histamina para determinar la AHR inducida por alérgeno después de la EAR y la LAR, respectivamente.

Se llevaron a cabo inhalaciones con solución salina, ABH y L- o D-arginina a las 5,5 h y 23,5 h después de la provocación con ovoalbúmina, y los valores posteriores de PC_{100} para histamina se volvieron a determinar 6 h y 24 h después de la provocación con alérgeno. Las inhalaciones de solución salina y fármaco se alternaron con un intervalo de una semana en un diseño cruzado aleatorio (Fig. 2).

Prevenición de la AHR inducida por alérgeno mediante ABH

En el primer día experimental, se determinó la PC_{100} basal para histamina. Al día siguiente, se inhaló solución salina durante 15 min, 0,5 h antes y 8 h después de la inhalación del alérgeno, y se llevaron a cabo medidas de PC_{100} para histamina 6 y 24 h después de la exposición al alérgeno. Una semana más tarde, se repitió el mismo protocolo con inhalaciones de ABH 25 mM (concentración del nebulizador) o solución salina a $t = -0,5$ y 8 h. Todos los animales se expusieron a dosis crecientes de alérgeno (0,5, 1 y 3 mg/ml) hasta la obstrucción.

En un segundo experimento, los animales se expusieron una vez al alérgeno. En el primer día experimental, se determinó la PC_{100} basal para histamina. Al día siguiente, los animales se pretrataron con solución salina o ABH (25 mM; concentración del nebulizador) 0,5 h antes y 8 h después de la inhalación del alérgeno. Los animales pretratados con ABH se expusieron a la misma dosis de alérgeno que provocó la obstrucción de las vías respiratorias en los conejillos de indias tratados con solución salina. En este protocolo, se midió la EAR inducida por alérgeno (entre 0 y 5 h después de la provocación con alérgeno) y LAR (entre 8 h y 24 h después de la provocación con alérgeno) mediante el registro continuo de P_{pi} , y se determinó la reactividad de las vías respiratorias hacia histamina a las 6 h y 24 h después de la exposición al alérgeno (Fig. 2).

55

Análisis de datos

La sensibilidad al alérgeno inhalado se expresó como la cantidad total (mg) de alérgeno nebulizado para obtener la obstrucción de las vías respiratorias, que es una función del tiempo de nebulización (s), la dosis de alérgeno en el nebulizador (mg/ml) y el caudal del aerosol (ml/min).

- 5 Las magnitudes de EAR y LAR se expresaron como el área bajo la curva tiempo-respuesta de P_{pi} (ABC) entre 0 y 5 h (EAR) y entre 8 y 24 h (LAR) después de la provocación con alérgeno. P_{pi} se expresó como el cambio en porcentaje desde el valor basal, y el ABC se calculó mediante la integración trapezoidal a lo largo de periodos de tiempo discretos de 5 min (Santing et al. J. Allergy Clin. Immunol. 1994, 93:1021-1030).

- 10 Todos los datos se expresan como medias \pm EEM. Se determinó la significación estadística de las diferencias mediante el uso de una prueba t de Student bilateral para datos emparejados, y la significación se aceptó cuando $P < 0,05$.

Productos químicos

- 15 Se obtuvo dihidrocloruro de histamina, ovoalbúmina (grado III), hidróxido de aluminio, hidrocloreuro de L-arginina e hidrocloreuro de D-arginina de Sigma Chemical Co. La solución salina se adquirió de Braun (Países Bajos). El ácido 2(S)-amino-6-boronohexanoico lo proporcionó Organon (Oss, Países Bajos).

RESULTADOS*Protocolo de inversión*

- 20 La Fig. 3 muestra que la ovoalbúmina induce una AHR significativa después de la EAR y LAR, tal como se indica mediante los valores de PC_{100} significativamente disminuidos para histamina después de estas reacciones. La inhalación de solución salina no afectó a la reactividad basal respecto de la AHR inducida por histamina ni por alérgeno después de la EAR y LAR.

La inhalación del inhibidor de arginasa ABH no tuvo efecto sobre la reactividad basal de las vías respiratorias, pero invirtió la AHR inducida por alérgeno después de la EAR, tal como se indica mediante el valor de PC_{100} significativamente incrementado en comparación con la medida de control tras esta reacción.

- 25 Además, se observó una tendencia hacia una reducción de la AHR después de la LAR, mientras ya no hubo una AHR significativa después de la inhalación de ABH en comparación con la reactividad basal (Fig. 3).

La Fig. 4 demuestra que ABH reduce la AHR inducida por alérgeno, expresada como la proporción de PC_{100} antes/después de la exposición, de $4,77 \pm 0,56$ veces a $2,04 \pm 0,34$ veces ($P < 0,001$) después de la EAR y de $1,95 \pm 0,23$ veces a $1,56 \pm 0,47$ veces ($P < 0,10$) después de la LAR.

- 30 Como ABH, la inhalación de L-arginina no afectó a la reactividad basal de las vías respiratorias hacia histamina (Fig. 5). De manera notable, la AHR después de la EAR y después de la LAR se invirtió en un grado similar al obtenido con ABH (Figs. 5 y 6).

Como con la solución salina, la inhalación del enantiómero D biológicamente inactivo de arginina no afectó en absoluto a la reactividad basal de las vías respiratorias y la AHR inducida por alérgeno (Fig. 7).

- 35 *Protocolo de protección*

De manera interesante, el pretratamiento con ABH 25 mM 0,5 h antes de la exposición al alérgeno provocó una protección significativa hacia la AHR después de la EAR en comparación con el tratamiento de control con solución salina (Fig. 8). Además, una inhalación adicional de ABH 25 mM 8 h después de la exposición al alérgeno previno casi completamente la AHR después de la LAR. El pretratamiento con solución salina no afectó a la AHR después de la EAR o LAR (Fig. 8).

- 40 La Fig. 9 muestra que ABH redujo significativamente la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR de $6,33 \pm 1,30$ veces (control de solución salina, semana 1) a $3,05 \pm 0,51$ veces ($P < 0,05$) y de $2,08 \pm 0,31$ veces a $1,41 \pm 0,25$ veces ($P < 0,005$) después de la LAR.

- 45 De manera notable, tras el pretratamiento con ABH en la semana 2, fue necesario un pretratamiento con una concentración 32,8 veces mayor de ovoalbúmina ($1,31 \pm 0,69$ mg) para inducir la obstrucción de las vías respiratorias en comparación con el tratamiento con solución salina de los mismos animales en la semana 1 ($0,04 \pm 0,01$ mg; $P < 0,01$), lo que indica que ABH disminuye considerablemente la sensibilidad al alérgeno. No se observó un incremento significativo de la dosis de ovoalbúmina para los animales tratados con solución salina (Fig. 10).

- 50 Para la apreciación completa del efecto de ABH a una carga de alérgeno normalmente obstructiva, se llevaron a cabo provocaciones con dosis iguales de alérgeno en los animales tratados con solución salina (expuestos a la obstrucción) y tratados con ABH. En estas condiciones, el pretratamiento con ABH 0,5 h antes de la exposición al

alérgeno provocó una protección más pronunciada hacia la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR, mientras un tratamiento adicional con ABH 8 h después de la exposición al alérgeno normalizó completamente la reactividad de las vías respiratorias después de la LAR hasta el nivel basal (Fig. 11, Tabla 1). Así, el tratamiento con ABH redujo la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR (desde $4,14 \pm 0,59$ veces (tratamiento con solución salina) hasta $1,58 \pm 0,24$ veces; $P < 0,01$) y previno completamente el desarrollo de AHR después de la LAR (desde $1,68 \pm 0,14$ veces en los animales tratados con solución salina hasta $1,02 \pm 0,02$ veces en los animales tratados con ABH; $P < 0,005$).

Se muestran registros en línea representativos de P_{pi} en conejillos de Indias expuestos al alérgeno en la Fig. 12. En comparación con el tratamiento con solución salina, el tratamiento con ABH a la misma dosis de alérgeno redujo enormemente la EAR, así como la LAR. Como se esperaba, se observó una reducción muy significativa de la respuesta máxima inicial en P_{pi} , lo que refleja la obstrucción bronquial aguda inducida por el alérgeno, ($P < 0,01$, Fig. 12), mientras de forma similar las ABCs de la EAR y LAR se redujeron significativamente (Tabla 1).

Tabla 1

Efecto protector de ABH (concentración del nebulizador 25 mM) sobre las reacciones asmáticas precoces (EAR) y tardías (LAR) inducidas por el alérgeno y la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) después de estas reacciones.

Tratamiento ^I	ABC ^{II} (% x 5 min)		AHR ₁₀₀ (proporción PC ₁₀₀ antes/después de la exposición al alérgeno)	
	EAR	LAR	después de EAR	después de LAR
Solución salina	3687±907	8156±2409	4,14±0,59	1,68±0,14
ABH	983±345*	1697±1043*	1,58±0,24**	1,02±0,02***

^ISe inhaló solución salina (control) o ABH 0,5 h antes y 8 h después de la exposición al alérgeno, mediante el uso de una dosis de alérgeno igual para ambos grupos de tratamiento. ^{II}Las magnitudes de la EAR y la LAR se presentan como las ABCs bajo el % de cambio de la curva tiempo-respuesta de P_{pi} entre 0 y 5 h y entre 8 y 24 h después de la exposición al alérgeno, respectivamente. ^{III}Los valores de PC₁₀₀ para histamina se determinaron 24 h antes y 6 h (tras EAR) y 24 h (tras LAR) después de la exposición al alérgeno. Los datos representan la media \pm EEM de 5-6 animales. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,005$ frente a los animales tratados con solución salina.

CONCLUSIÓN

Mediante el uso del modelo de conejillo de Indias de asma alérgica, en la presente memoria se demostró que la inhalación del inhibidor de arginasa específico, no selectivo de isoenzima, ABH, invirtió de manera aguda la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR y LAR, mientras el pretratamiento con el inhibidor de arginasa redujo considerablemente la sensibilidad de las vías respiratorias al alérgeno inhalado y protegió contra el desarrollo de EAR y LAR inducidas por el alérgeno, y AHR después de ambas reacciones.

Sin limitarse por la teoría, se supone que la inhalación de ABH invierte de manera aguda la AHR inducida por el alérgeno después de la EAR y LAR atenuando la deficiencia de sustrato inducida por arginasa para las isoenzimas de NO sintasa en las vías respiratorias. Además, al incrementar la disponibilidad de sustrato para las NO sintasas y posteriormente incrementar la producción de NO, ABH puede atenuar la liberación de mediadores inducida por alérgenos (en particular derivados de mastocitos) en las vías respiratorias. Varios estudios en pacientes asmáticos han indicado que una deficiencia del broncodilatador NO (derivado de cNOS) está implicada en el desarrollo de AHR inducida por alérgenos. Además, se ha observado una expresión o actividad incrementada de arginasa en las vías respiratorias y la sangre de pacientes asmáticos, respectivamente. Así, los resultados anteriores son indicativos de la utilidad del tratamiento profiláctico con ABH en pacientes asmáticos.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de arginasa para el uso en la terapia profiláctica de mantenimiento de un paciente asmático o alérgico reduciendo la sensibilidad de las vías respiratorias a un alérgeno inhalado y protegiendo contra el desarrollo de una reacción asmática precoz (EAR) y reacción asmática tardía (LAR) inducidas por el alérgeno, en el que el inhibidor de arginasa se administra mediante inhalación tópica.
- 5 2. Un inhibidor de arginasa para el uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de arginasa se selecciona del grupo que consiste en ácido 2(S)-amino-6-borohexanoico (ABH), S-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), N ω -OH-L-arginina (NOHA), N ω -hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA), α -difluorometilornitina (DFMO), L-norvalina, yodoacetil-L-ornitina, yodoacetil-L-lisina, L-lisina, L-citrulina.
- 10 3. Un inhibidor de arginasa para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de arginasa es el único ingrediente activo.

Fig. 1

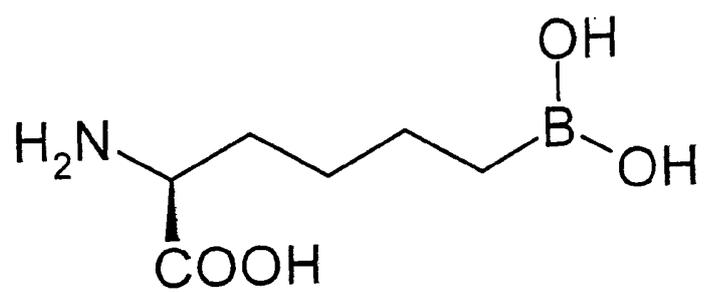


Fig. 2B&C

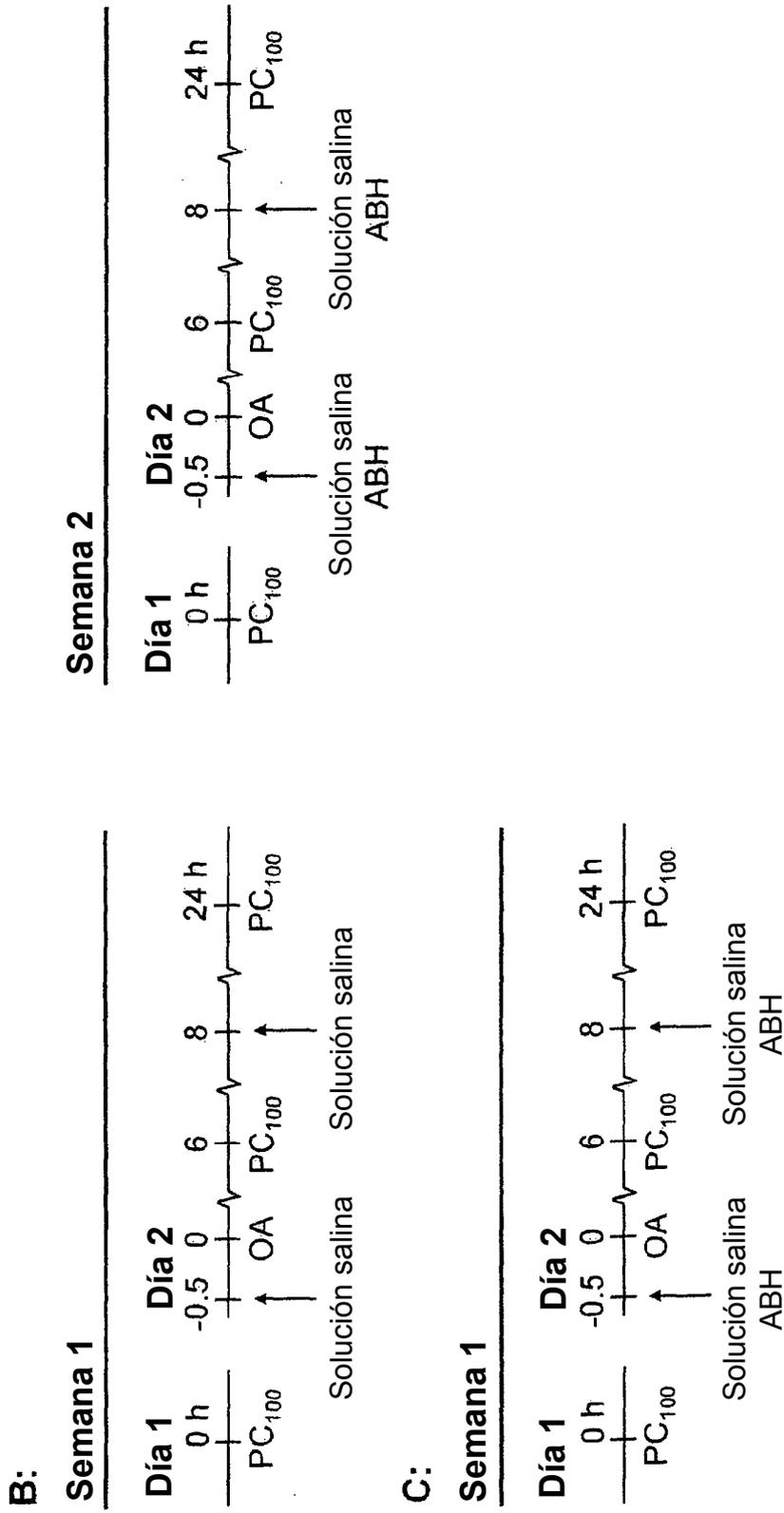


Fig. 3

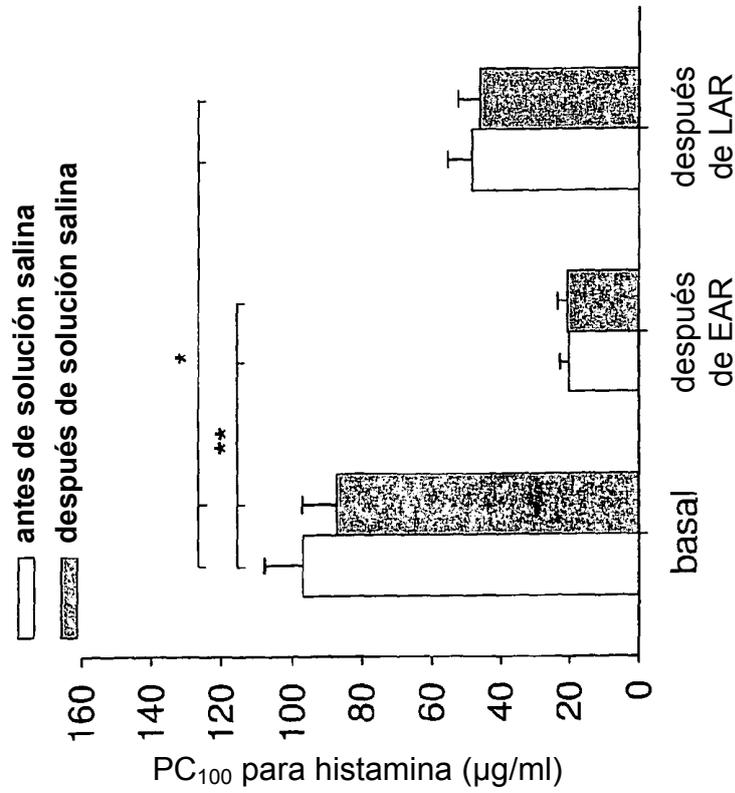
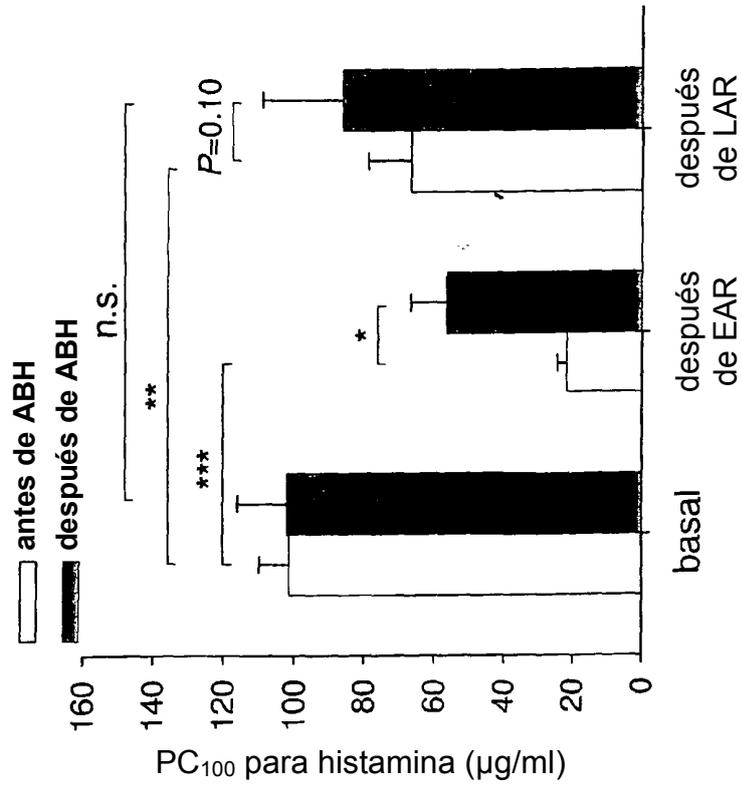


Fig. 4

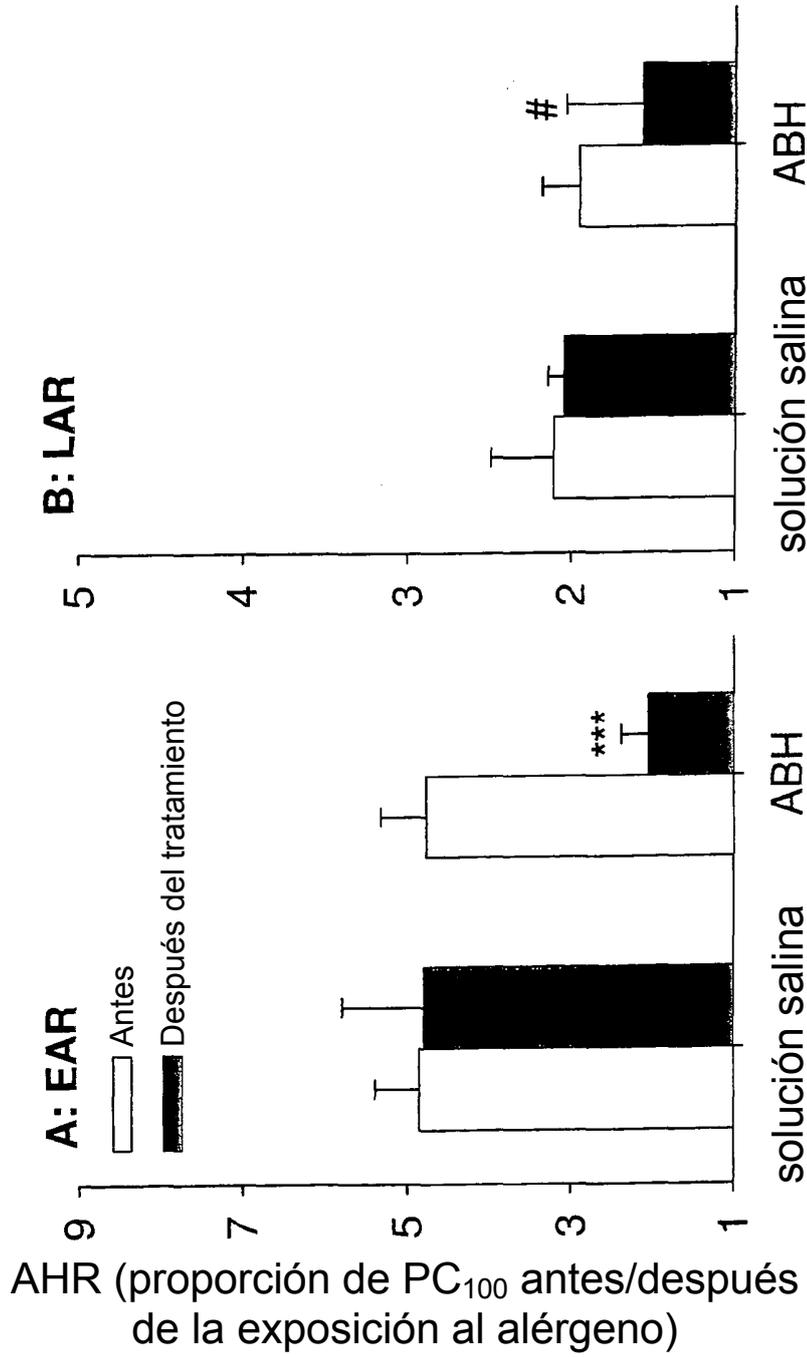


Fig. 5

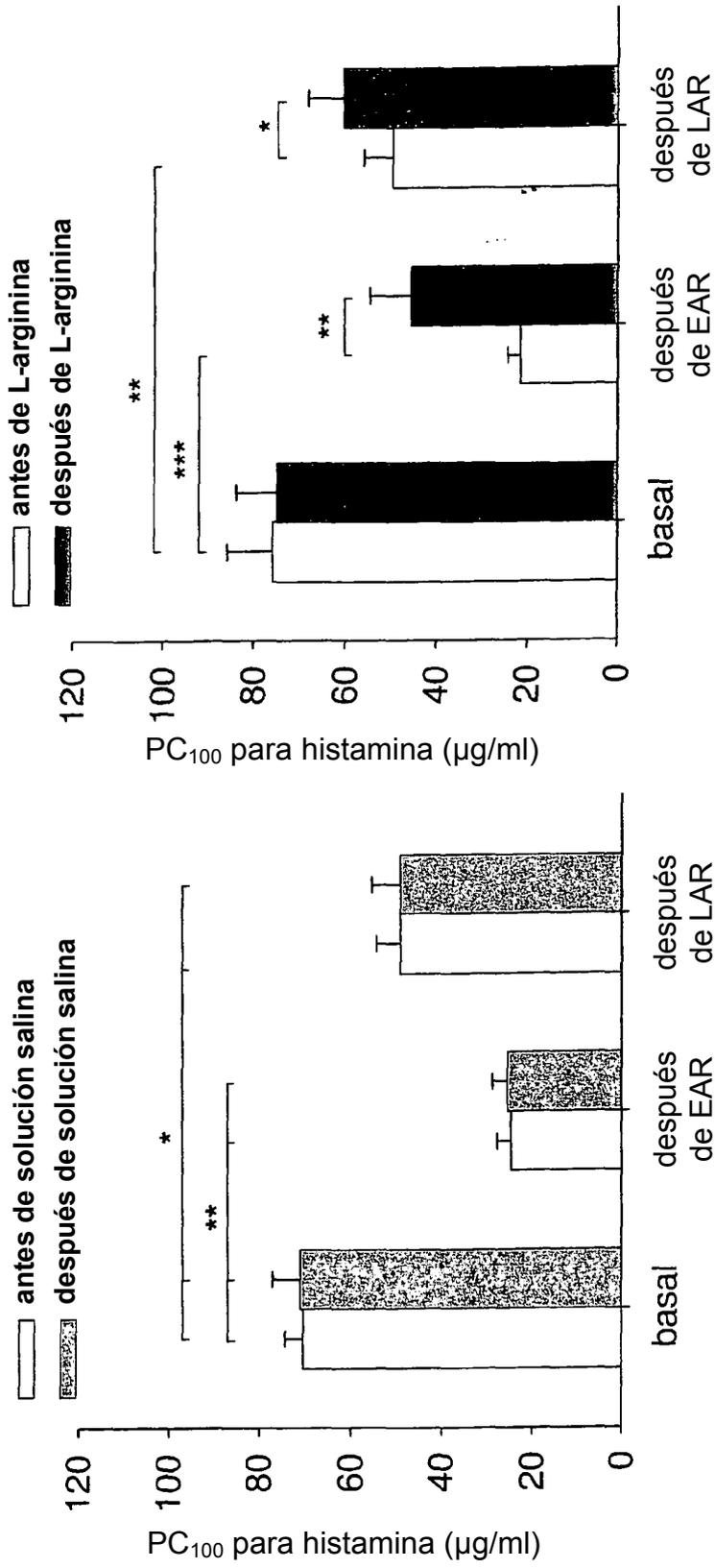


Fig. 6

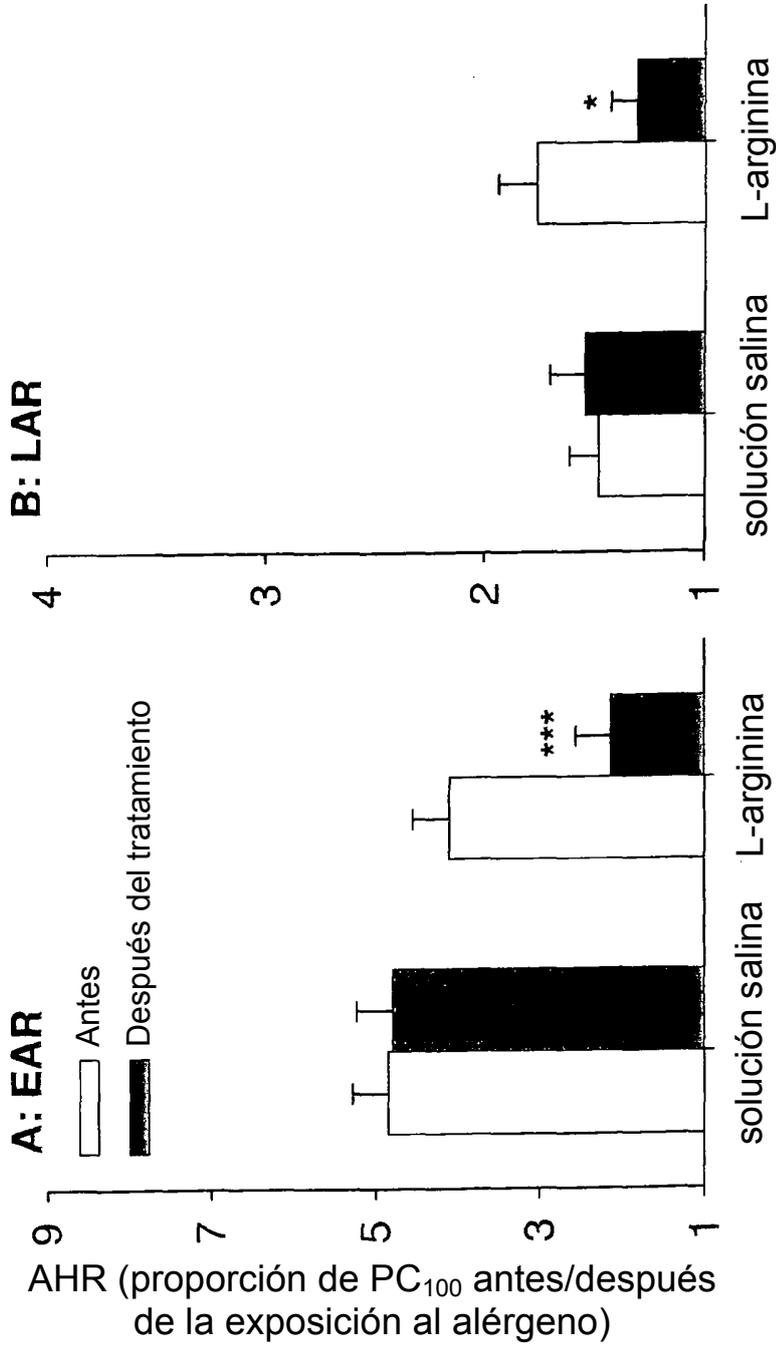


Fig. 7

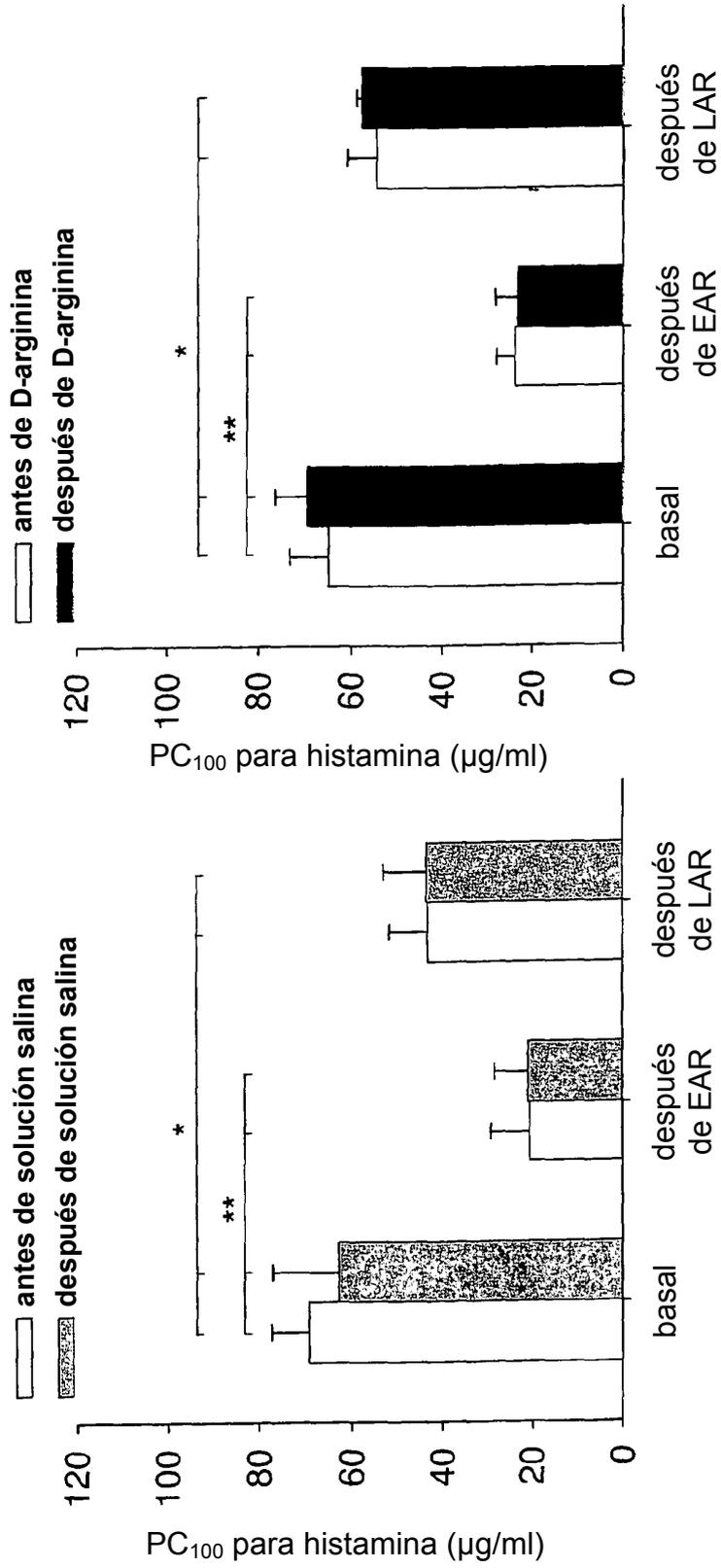
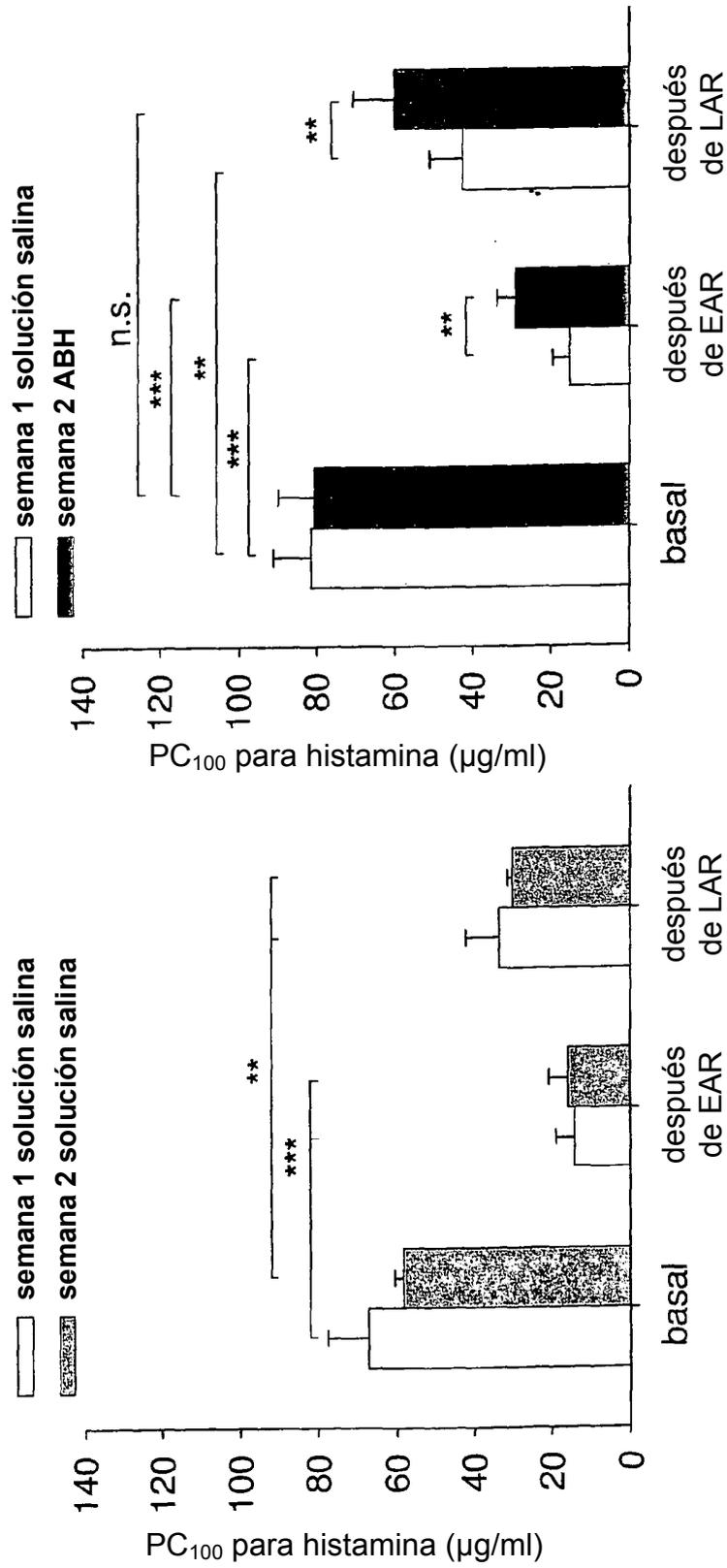


Fig. 8



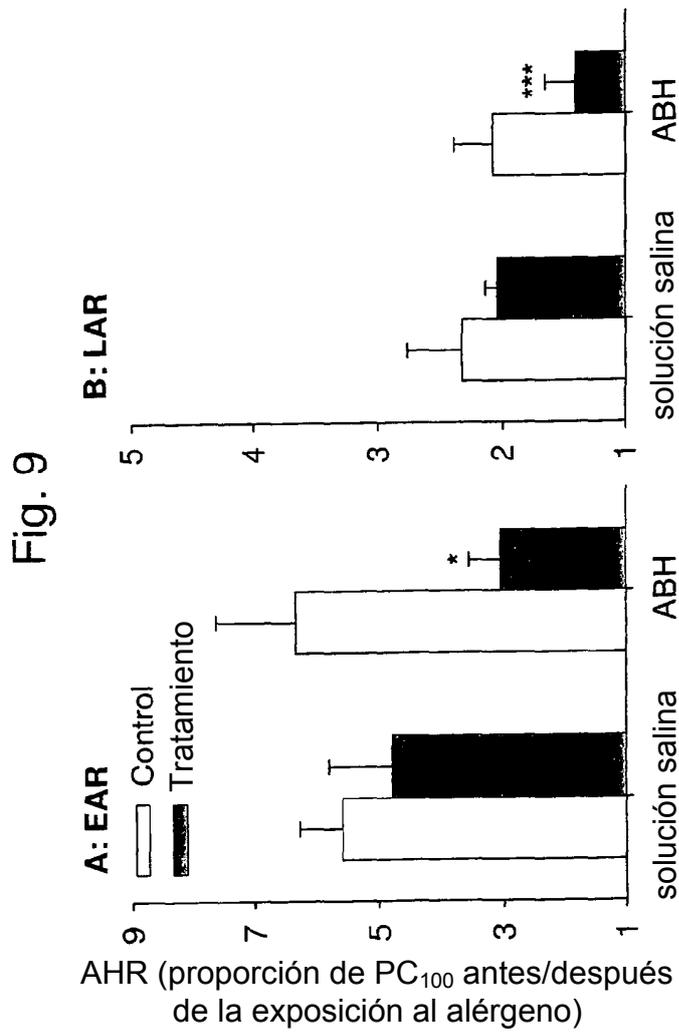


Fig. 10

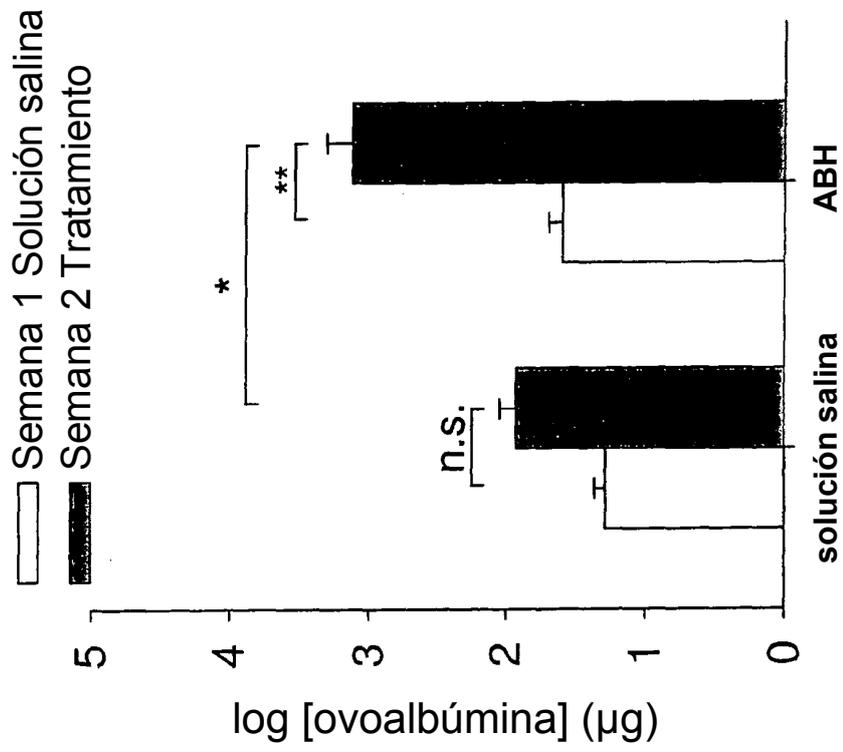


Fig. 11

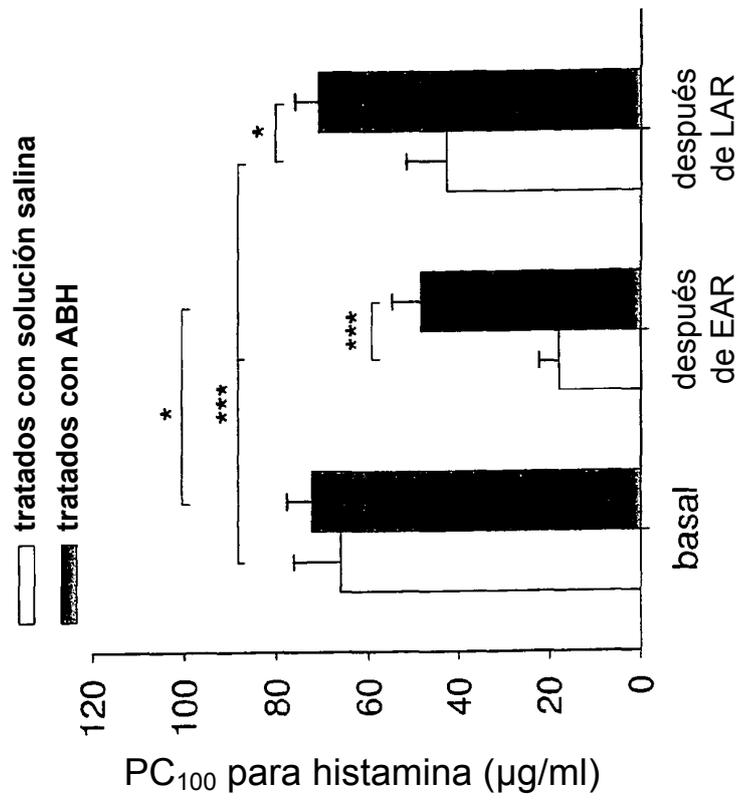


Fig. 12

