

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 002**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4174 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09784559 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **06.04.2011 EP 2303251**

54 Título: **Nueva combinación para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

07.04.2008 US 64975 P

07.07.2008 US 129574 P

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

07.02.2013

73 Titular/es:

CARDOZ AB (100.0%)

P O Box 2077

103 12 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

RAUD, JOHAN y

DALSGAARD, CARL-JOHAN

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 002 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

Nueva combinación para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios

Campo de la Invención

5 **[0001]** Esta invención se refiere a una combinación farmacéutica novedosa.

Antecedentes y Estado de la Técnica

10 **[0002]** Las enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedad coronaria y derrame cerebral son causas principales de muerte, discapacidad, y gasto sanitario, especialmente en países industrializados. Tales enfermedades son a menudo secuelas directas de aterosclerosis, una afección multifactorial que se desarrolla preferentemente en sujetos que fuman y/o presentan factores de riesgo tales como hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, elevadas lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma y triglicéridos.

[0003] Las lesiones (o placas) ateroscleróticas se desarrollan a lo largo de muchos años. Procesos patológicos, tales como acumulación de colesterol en la pared arterial, formación de células espumosas, inflamación y proliferación celular están normalmente implicados.

15 **[0004]** Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDLs), LDLs, colesterol total y triglicéridos son todos indicadores para determinar el riesgo de desarrollar aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, tales como enfermedades coronarias (por ejemplo angina de pecho, infarto de miocardio, etc.), derrame cerebral (incluyendo accidente vascular cerebral y ataque isquémico transitorio) y enfermedad arterial periférica oclusiva.

20 **[0005]** Pacientes con niveles altos de colesterol total y/o triglicéridos corren un riesgo significativo, independientemente de si tienen también o no un nivel favorable de HDL. Pacientes con niveles normales de colesterol total pero niveles bajos de HDL corren también un riesgo aumentado. Recientemente, se ha notado también que el nivel de riesgo de enfermedad cardiovascular asociado con altos niveles de apolipoproteína B (ApoB; la cual transporta lípidos en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) y LDLs), y/o niveles bajos de apolipoproteína A-I (ApoA-I; la cual transporta lípidos en HDLs), es extremadamente alto.

25 **[0006]** Los medicamentos que reducen los niveles de LDL en suero pueden reducir la acumulación de placas ateroscleróticas, y pueden reducir (a largo plazo) el riesgo de rotura de placa y complicaciones tromboembólicas asociadas. Existen diversos tipos de medicamentos que pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol en sangre. Los prescritos más comúnmente son los inhibidores de la hidroximetilglutaril- CoA (HMG-CoA) reductasa (en adelante definidos juntos, independientemente de su nombre genérico, como "estatinas"), incluyendo simvastatina y atorvastatina. Estos medicamentos evitan directamente la formación de colesterol en el hígado y de este modo reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular.

30 **[0007]** Otras categorías de medicamentos prescritos incluyen resinas (tales como colestiramina y colestipol), que actúan actuando uniéndose a ácidos biliares, causando de tal modo que el hígado produzca más de los últimos, y consumiendo colesterol en el proceso. Además, se ha informado que la vitamina B niacina en dosis altas reduce los niveles de triglicéridos y LDL además de incrementar los niveles de HDL. Se sabe que los fibratos (tales como gemfibrozilo y fenofibrato) reducen los triglicéridos y pueden incrementar los niveles de HDL.

35 **[0008]** La introducción de medicamentos reductores de colesterol tales como estatinas ha reducido considerablemente la mortalidad por enfermedad coronaria y derrame cerebral. Sin embargo, estos medicamentos sufren la desventaja de que no son igualmente eficaces en todos los pacientes y se sabe que tienen ciertos efectos secundarios (por ejemplo cambios en la función hepática, miopatía y rabdomiolisis), y la aterosclerosis sigue siendo una causa principal de muerte y discapacidad. Es más, un reciente artículo de revista (Briel y otros, JAMA, 295, 2046 (2006)) sugiere que las estatinas no reducen acontecimientos cardiovasculares graves durante los primeros cuatro meses de tratamiento en pacientes con síndromes coronarios agudos.

40 **[0009]** Existe por ello una necesidad clínica real de tratamientos más seguros y/o más eficaces de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, particularmente en aquellos pacientes con síndromes coronarios agudos. Además, no existe tratamiento establecido de medicamentos para la enfermedad arterial aneurisma de aorta abdominal, una enfermedad potencialmente mortal asociada con aterosclerosis.

45 **[0010]** Pemirolast es un medicamento antialérgico oralmente activo que es utilizado en el tratamiento de afecciones tales como asma, rinitis alérgica y conjuntivitis. El medicamento es actualmente comercializado en por ejemplo Japón como la sal de potasio.

[0011] El sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema de hormonas que ayuda a regular la presión sanguínea.

50 **[0012]** El sistema se activa cuando hay una reducción en el volumen sanguíneo o una caída en la presión sanguínea (tal como en una hemorragia). Cuando la perfusión sanguínea de los riñones disminuye, ciertas células de los riñones liberan la enzima renina. La renina escinde un péptido inactivo angiotensinógeno, convirtiéndolo en

angiotensina I. La angiotensina I es entonces convertida en angiotensina II por enzima convertidora de angiotensina (ACE), que se encuentra principalmente en el pulmón. La angiotensina II es un potente vasoconstrictor y es el principal producto bioactivo del sistema renina-angiotensina.

5 **[0013]** Los medicamentos que inhiben la ACE disminuyen la formación de angiotensina II y son utilizados en el tratamiento de hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva y prevención de nefropatía diabética.

10 **[0014]** Se ha sugerido también que los inhibidores de ACE son útiles en el tratamiento de por ejemplo migraña (Tronvik y otros, J. Hypertens., 24, S139 (2006)) y aneurismas de aorta (ver Liao y otros, J. Vasc. Surg., 33, 1057 (2001) y Hackam y otros, Lancet, 368, 659 (2006)). Se ha mostrado también que la angiotensina II tiene acciones inflamatorias y oxidantes que han sido asociadas con aterosclerosis y síndromes coronarios agudos, es decir los antagonistas de angiotensina pueden ser útiles en por ejemplo infarto de miocardio (ver por ejemplo Dandona y otros, Journal of Human Hypertension, 21, 21 (2007)).

[0015] La formación de la angiotensina II puede también ser inhibida por inhibición de renina que escinde angiotensinógeno inactivo en angiotensina I.

15 **[0016]** Los bloqueadores de receptores de Angiotensina (ARBs), o sar-tans, son un grupo de medicamentos que modulan el sistema renina-angiotensina bloqueando la activación de los receptores AT1 de la angiotensina II. Su principal uso es en hipertensión, nefropatía diabética e insuficiencia cardíaca congestiva.

20 **[0017]** La solicitud de patente estadounidense US 2006/0024365 revela formas farmacéuticas de dosificación de retardo doble que comprenden ingredientes activos de liberación modificada de alta solubilidad a dosis alta en combinación con ingredientes activos a baja dosis de liberación inmediata. Una amplia variedad de medicamentos, incluyendo algunos de los mencionados aquí, son listados como potenciales candidatos para los ingredientes activos.

25 **[0018]** La solicitud de patente estadounidense US 2003/0104048 revela formas novedosas de dosificación farmacéutica que comprenden rellenos hidrofílicos que contienen surfactante que incluyen ingredientes activos farmacéuticamente encapsulados por una envoltente. Diversos compuestos activos, incluyendo algunos de los mencionados aquí, son listados entre muchos posibles fármacos para uso en tales formas de dosificación.

[0019] La solicitud de patente estadounidense US 2007/0014733 A1 revela composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cardiovasculares que comprenden metabolitos de nebivolol. Diversos compuestos activos, que incluyen algunos de los mencionados aquí, son listados entre los muchos ingredientes activos que pueden ser combinados con tales metabolitos en dichas composiciones.

30 **[0020]** Se han divulgado estudios en referencia al uso potencial de algunos de los medicamentos aquí descritos en la prevención de reestenosis, que incluyen pemirolast (ver Miyazawa y otros, J. Cardiovasc. Pharmacol., 30, 157 (1997) y Ohsawa y otros, Am. J Heart, 136, 1081 (1998); ver también la solicitud de patente europea EP 766 693, que revela que el pemirolast muestra un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células musculares lisas vasculares), y valsartán (ver por ejemplo Faxon, Circulation, 106, 2296 (2002)).

35 **[0021]** El uso de productos de combinación comprendiendo, específicamente, pemirolast y compuestos que inhiben la formación y/o la acción de la angiotensina II no es específicamente revelado en ninguno de los documentos arriba mencionados. Además, la utilización de tales productos de combinación en el tratamiento de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, en particular en aquellos pacientes con síndromes coronarios agudos o aneurismas de la aorta abdominal, no es revelada en ninguno de estos documentos.

40 Divulgación de la Invención

[0022] Según la invención, se proporciona un producto de combinación que comprende:

(a) pemirolast, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable; y

(b) losartán, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, a cuyos productos de combinación se hace referencia como "los productos de combinación según la invención".

45 **[0023]** Sales farmacéuticamente aceptables que pueden ser mencionadas incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Tales sales pueden formarse por medios tradicionales, por ejemplo por reacción una forma de un ácido libre o de una base libre de un ingrediente activo con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiados, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el cual la sal sea insoluble, seguido de la eliminación de dicho disolvente, o dicho medio, utilizando técnicas estándar (por ejemplo, al vacío, por liofilización o por filtración). Las sales pueden también prepararse intercambiando un contra-ión de un ingrediente activo en forma de una sal con otro contra-ión, por ejemplo utilizando una resina de intercambio iónico adecuada.

50 **[0024]** Sales preferidas incluyen, por ejemplo, hidrocloreuro, bisulfato, maleato, mesilato, tosilato, sales de metal alcalinotérrico, tal como calcio y magnesio, o sales de metal alcalino, tales como sales sódicas y potásicas. Tales

sales pueden ser preparadas utilizando técnicas de rutina para compuestos. Las sales de metal alcalinotérreo, y más específicamente sales de metal alcalino se prefieren para losartán, de las cuales las sales preferidas incluyen sales de calcio, magnesio, potasio y, particularmente, sodio. Sales preferidas de pemirolast incluyen sales de metal alcalinotérreo, y más específicamente alcalino, , tales como sales de calcio, magnesio, sodio y, particularmente, potasio (por ejemplo potasio de pemirolast).

[0025] Ingredientes activos que se emplean en productos de combinación según la invención pueden ser empleados en forma diastereoméricamente enriquecida y/o enantioméricamente enriquecida. Por "diastereoméricamente enriquecida y "enantioméricamente enriquecida" queremos decir, respectivamente, cualquier mezcla de los diastereoisómeros/enantiómeros de un ingrediente activo, en la que un isómero está presente en una mayor proporción que el otro. Por ejemplo, pueden ser empleados enantiómeros con purezas ópticas (exceso enantiomérico; e.e.) de más del 90%.

[0026] Los productos de combinación según la invención se proporcionan para la administración de pemirolast conjuntamente con losartán, y pueden por ello ser presentados como formulaciones diferentes, en donde al menos una de esas formulaciones comprende pemirolast, y al menos una comprende losartán o pueden ser presentados (por ejemplo formulados) como una preparación combinada (por ejemplo presentados como una única formulación que incluye pemirolast y losartán).

[0027] De este modo, se proporciona además:

(1) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable; losartán, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable (cuya fórmula es en adelante referida como unas "preparaciones combinadas"); y

(2) un kit de partes que comprende componentes:

(A) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable, y

(B) una formulación farmacéutica que incluye losartán, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable,

cada uno de cuyos componentes (A) y (B) está proporcionado en una forma que es adecuada para administración conjuntamente con el otro.

[0028] Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de hacer un kit de partes como se define arriba, cuyo método comprende poner el componente (A), como se define arriba, en asociación con un componente (B), como se define arriba, haciendo así los dos componentes adecuados para administración conjuntamente entre sí.

[0029] Al poner los dos componentes "en asociación" el entre sí, incluimos que los componentes (A) y (B) del kit de partes pueden ser:

(i) provistos como formulaciones distintas (por ejemplo por separado la una de la otra), las cuales son posteriormente juntadas para el uso conjunto entre sí en terapia de combinación; o

(ii) envasados y presentados juntos como componentes separados de un "pack de combinación" para uso conjunto entre sí en terapia de combinación.

[0030] Por ello, se proporciona además un kit de partes que comprende:

(I) uno de los componentes (A) y (B) como se define aquí;

junto con

(II) instrucciones para utilizar ese componente conjuntamente con el otro de los dos componentes.

[0031] Los kits de partes descritos aquí pueden comprender más de una formulación que incluye una cantidad/dosis apropiada de pemirolast/sal/solvato, y/o más de una formulación que incluye una cantidad/dosis apropiada de losartán/sal/solvato, con el fin de facilitar dosificación repetida. Si está presente más de una formulación (comprendiendo cualquier compuesto activo) , tales formulaciones pueden ser iguales o diferentes en términos de la dosis de cualquier compuesto, composición(es) química(s) y/o forma(s) física(s).

[0032] Los productos de combinación según la invención tienen utilidad en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Las afecciones inflamatorias están normalmente caracterizadas por la activación de mecanismos de

defensa inmune, dando lugar a un efecto que es más dañino que beneficioso para el huésped. Tales afecciones están generalmente asociadas con grados variables de enrojecimiento del tejido o hiperemia, hinchazón, hipertermia, dolor, picor, prurito, muerte celular y destrucción de tejido, proliferación celular, y/o pérdida de función. Las afecciones inflamatorias que pueden ser mencionadas incluyen arteritis, diabetes mellitus, síndrome metabólico, endometriosis, acné, quemaduras en la piel, rosácea, dermatitis seborreica, úlceras de piel; preferiblemente síndrome de Marfan y, más preferiblemente, alergia (incluyendo conjuntivitis alérgica y rinitis alérgica), espondilitis anquilosante, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis de contacto, cistitis, artritis gotosa, enfermedad intestinal inflamatoria (tal como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, osteoartritis, pancreatitis, prostatitis, psoriasis, artritis psoriática, artritis reumatoide, tendinitis, bursitis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, uveitis, urticaria, vasculitis, complicaciones vasculares diabéticas, migraña, aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados. Afecciones que pueden ser mencionadas incluyen endometriosis, dermatitis atópica, preferiblemente síndrome de Marfan y, más preferiblemente, migraña, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa y, más particularmente, aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.

[0033] El término "aterosclerosis" se comprenderá por los entendidos en la materia que incluye cualquier enfermedad caracterizada por acumulación de colesterol en un vaso sanguíneo, especialmente una pared arterial, formación de células espumosas, inflamación y proliferación celular. Trastornos cardiovasculares "asociados con" aterosclerosis incluyen aneurismas aórticos (incluyendo aneurismas ateroscleróticos y/o abdominales), arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica oclusiva, enfermedades de las arterias coronarias por ejemplo angina de pecho, infarto de miocardio, ataque cardíaco, etc), enfermedad coronaria (incluyendo enfermedad cardíaca y enfermedad del corazón, tal como la enfermedad cardíaca isquémica), y pueden también incluir rotura y/o inestabilidad de placas o ateromas, enfermedad arterial o vascular, enfermedad isquémica/isquemia y derrame cerebral (incluyendo accidente cerebrovascular vascular y ataque isquémico transitorio).

[0034] Los grupos de pacientes que pueden ser mencionados incluyen aquellos con síndromes coronarios agudos. El término "síndrome(s) coronario(s) agudo(s)" se comprenderá por aquellos con conocimiento en la materia que incluye cualquier estado de miocardio isquémico anormal, a menudo pero no exclusivamente asociado con dolor de pecho y/o un electrocardiograma (ECG) anormal. Tales síndromes son la presentación más común de infarto de miocardio (ataque al corazón). La persona entendida apreciará que el término es ampliamente sinónimo con el término "angina inestable", a diferencia de una "angina estable" (por ejemplo la angina que se desarrolla durante el esfuerzo y se soluciona con descanso. La angina por esfuerzo que ocurre con empeoramiento creciente ("angina crescendo") será contemplada de forma similar por la persona entendida como dentro de la definición "inestable".

[0035] Según un aspecto más de la invención se proporciona un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio, y en particular aterosclerosis y/o un trastorno cardiovascular asociado, cuyo método comprende la administración de un producto de combinación según la invención a un paciente en necesidad de tal tratamiento.

[0036] Para evitar toda duda, en el contexto de la presente invención, los términos "tratamiento", "terapia" y "método de terapia" incluyen el tratamiento terapéutico, o paliativo de pacientes en necesidad del mismo, así como el tratamiento profiláctico y/o diagnóstico de pacientes que son susceptibles a trastornos inflamatorios, tales como aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.

[0037] Con respecto a los kits de partes como los aquí descritos, por "administración conjuntamente con" incluimos que formulaciones respectivas que comprenden pemirolast (o sal/solvato del mismo) y losartán (o sal/solvato del mismo) son administradas, secuencialmente, separadamente y/o simultáneamente, durante el transcurso del tratamiento de la afección relevante.

[0038] De este modo, respecto al producto de combinación según la invención, el término "administración conjuntamente con" incluye que los dos componentes de la combinación de producto (pemirolast y losartán) sean administrados (opcionalmente repetidamente), bien juntos, o suficientemente cerca en el tiempo, para permitir un efecto beneficioso para el paciente, que sea mayor, en el curso del tratamiento de la afección relevante que si una formulación que comprende pemirolast, o una formulación que comprende losartán, son administradas (opcionalmente repetidamente) solas, en ausencia del otro componente, en el mismo curso de tratamiento. La determinación de si una combinación proporciona un mayor efecto beneficioso o no respecto de, y en el curso del tratamiento de, una particular afección dependerá de la afección a tratar o evitada, pero puede ser lograda rutinariamente por la persona experta.

[0039] Además, en el contexto de un kit de partes según la invención, el término "conjuntamente con" incluye que una u otra de las dos formulaciones puede administrarse (opcionalmente repetidamente) antes de, después, y/o al mismo tiempo que, la administración del otro componente. Cuando se usa en este contexto, los términos "administrado simultáneamente" y administrado al mismo tiempo que" incluyen que dosis individuales de pemirolast y losartán se administran dentro de 48 horas (por ejemplo 24 horas) entre sí.

[0040] "Pacientes" incluye pacientes mamíferos (incluyendo humanos).

[0041] Según la invención, pemirolast y losartán son preferiblemente administrados localmente o sistémicamente,

- 5 por ejemplo por vía oral, intravenosa o intraarterial (incluyendo por stent intravascular y otras formas de dosificación/dispositivos perivascuales), intramuscular, cutánea, subcutánea, transmucosal (por ejemplo sublingual o bucal), rectal, transdérmica, nasal, pulmonar (por ejemplo, traqueal o bronquial), tópica, o por cualquier otra vía parenteral, en forma de una preparación farmacéutica que comprende el compuesto(s) en forma(s) de dosificación farmacéuticamente aceptable. Modos preferidos de administración incluyen administración oral (particularmente), intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, o intraperitoneal.
- 10 **[0042]** Pemirolast y losartán generalmente serán administrados juntos o por separado en forma de una o más formulaciones farmacéuticas en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, que pueden ser seleccionados teniendo debidamente en cuenta la vía deseada de administración y práctica farmacéutica estándar. Tales portadores farmacéuticamente aceptables puede ser químicamente inertes a los compuestos activos y pueden no tener efectos secundarios perjudiciales o toxicidad bajo las condiciones de uso. Tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden también impartir una inmediata, o una modificada, liberación de cualquier ingrediente activo, sea administrado conjuntamente en una preparación combinada o en forma de un kit de partes.
- 15 **[0043]** Formulaciones farmacéuticamente adecuadas pueden estar comercialmente disponibles o sino se describen en la literatura, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) y Martindale - The Complete Drug Reference (34th Edition) y los documentos referidos aquí. En otro caso, la preparación de formulaciones adecuadas, y en particular preparaciones combinadas incluyendo tanto pemirolast como losartán pueden lograrse no inventivamente por la persona experta utilizando técnicas rutinarias.
- 20 **[0044]** La cantidad de ingredientes activos en la(s) formulación(es) dependerá de la gravedad de la afección, y del paciente, a tratar, así como del compuesto (s) que se emplea(n), pero puede determinarse no inventivamente por la persona experta.
- 25 **[0045]** Dependiendo del trastorno, y del paciente a tratar, así como de la vía de administración, los ingredientes activos pueden administrarse en dosis variables terapéuticamente eficaces a un paciente en necesidad de los mismos.
- 30 **[0046]** Sin embargo, la dosis administrada a un mamífero, particularmente un humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica en el mamífero durante un período de tiempo razonable. Un experto en la materia reconocerá que la selección de la dosis y composición exacta y el régimen de administración más apropiado estarán también influenciados por *inter alia* las propiedades farmacológicas de la formulación, la naturaleza y gravedad de la afección tratada, y la condición física y agudeza mental del destinatario, así como la potencia del compuesto específico, la edad, condición, peso corporal, sexo y respuesta del paciente a tratar, y la etapa/gravedad de la enfermedad, así como las diferencias genéticas entre pacientes.
- 35 **[0047]** La administración de los ingredientes activos puede ser continua o intermitente (por ejemplo por inyección en bolo). La dosificación puede estar también determinada por el programa y la frecuencia de administración.
- 40 **[0048]** Las dosis adecuadas de ingredientes activos incluyen aquellas a las que se refiere la literatura médica, tal como Martindale- The Complete Drug Reference (35th Edition) y los documentos referidos . Las dosis adecuadas de ingredientes activos están por tanto en un intervalo de alrededor de 0,01 mg/kg de peso corporal hasta unos 1.000 mg/kg de peso corporal. Intervalos más preferidos son unos 0,1 mg/kg a unos 20 mg/kg a diario, cuando se dan oralmente.
- 45 **[0049]** Sin embargo, las dosis adecuadas de pemirolast son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo límites inferiores adecuados de intervalos de dosis diarias van desde cerca de de 1 (por ejemplo unos 2) mg, por ejemplo unos 5 mg, tal como unos 10 mg, y más preferiblemente unos 20 mg; y límites superiores adecuados de dosis diarias son unos 200 mg, por ejemplo unos 100 mg, tal como unos 80 mg, y más preferiblemente unos 60 mg. Las dosis orales diarias pueden por consiguiente estar en un intervalo de unos 2 mg y unos 50 mg, tal como unos 5 mg y unos 40 mg, y preferiblemente unos 10 mg y unos 30 mg. Las dosis adecuadas individuales pueden ser de unos 40 mg, o unos 20 mg (tal como unos 10 mg, más preferiblemente unos 6 mg (por ejemplo unos 3 mg), por día. Estos intervalos de dosis son independientes de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como descrito aquí antes.
- 50 **[0050]** Igualmente, las dosis adecuadas de losartán pueden ser de unos 2,5 mg a unos 250 mg, tal como unos 5 mg hasta unos 200 mg, preferiblemente unos 7,5 mg hasta unos 150 mg, por ejemplo unos 10 mg (por ejemplo 12,5 mg) hasta unos 125 mg (por ejemplo 100 mg) por día, independientemente de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como se ha descrito aquí antes.
- 55 **[0051]** En cualquier caso, el profesional médico, u otra persona experta, será capaz de determinar rutinariamente la dosis real que será la más adecuada para un paciente individual. Las dosis arriba mencionadas son a modo de ejemplo del caso promedio; puede, por supuesto, haber ejemplos individuales en los que tengan sentido intervalos mayores o menores, y éstos están dentro del ámbito de esta invención.

[0052] Siempre que las palabras “alrededor de” o “unos” se emplee aquí, por ejemplo en el contexto de dosis de ingredientes activos, se apreciará que tales variables son aproximadas y por ello pueden variar en $\pm 10\%$, por ejemplo $\pm 5\%$ y preferiblemente $\pm 2\%$ (por ejemplo $\pm 1\%$) respecto a los números especificados aquí .

5 [0053] La productos/métodos de combinación descritos aquí pueden tener la ventaja de que, en el tratamiento de las afecciones mencionadas aquí anteriormente, pueden ser más convenientes para el médico y/o paciente que, ser menos tóxicos que, tener un mayor intervalo de actividad que, ser más potentes que, producir menos efectos secundarios que, o pueden tener otras propiedades útiles farmacológicas respecto a, métodos (tratamientos) similares conocidos en el estado de la técnica para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios (tales como aterosclerosis y afecciones cardiovasculares asociadas) o de otro tipo.

10 [0054] La invención es ilustrada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Ensayos de liberación de mediador inflamatorio de células MonoMac-6

15 [0055] Se cultivan células MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock y otros, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) ($37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5%) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 1X aminoácidos no esenciales, 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/m L de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin y 10% (v/v) de suero fetal bovino. Para diferenciación, se añade TGF($2\text{ ng}/\text{ml}$) y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 nM), generalmente durante 2-4 días.

20 [0056] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B_4 (LTB_4), se incuban células MM6 (a $1-15 \times 10^6/\text{mL}$; 0,5-1 mL) diferenciadas o no diferenciadas durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 μM de ácido araquidónico y 2-10 μM de ionóforo de calcio A23187 (A23187 puede también ser utilizado sin ácido araquidónico). Las células MM6 pueden estar también estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), y/o el análogo del tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las incubaciones/estimulaciones de MM6 anteriores pueden ser también realizadas en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sanos) con una proporción MM6:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se paran con dos volúmenes de metanol frío y prostaglandina B_2 (PGB_2) añadidos como estándar interno. Las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes se diluyen con agua hasta alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en columnas de fase sólida C18 preacondicionadas (1 mL de metanol seguido de 1 mL de H_2O) (Sorbert Technology, Reino Unido). Los metabolitos son eluados con metanol, después de lo cual un volumen de agua se añade al eluato. Para la HPLC de fase inversa, se mezclan 76 μL de cada muestra con 39 μL de H_2O (pueden ser también utilizadas otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8X10 es eluada con metanol/acetronitrilo/ H_2O /ácido acético (30:35:35: 0.01 v/v) a 1,2 mL/min. La absorbancia del eluato es controlada a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB_2 y LTB_4 . También pueden usarse kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir LTB_4 según las instrucciones del fabricante(s) del kit. Utilizando kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (EIA/ELISA kits) según instrucciones del fabricante (s), pueden también analizarse sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones de MM6 arriba respecto al contenido de los mediadores inflamatorios prostaglandina E_2 (PGE_2) y/o tromboxano B_2 (TXB_2).

40 [0057] Se preparan soluciones madre de pemirolast y losartán en etanol, DMSO, N-metil-2-pirrolidona, PEG 400, propilenglicol y/o agua desionizada o solución salina fisiológica, con sonicación, calentamiento y ajuste del pH según sea necesario (pueden ser también utilizados otros vehículos). Las células se incuban (a $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5% en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto hasta 24 horas antes de la estimulación de MM6 para la liberación de los mediadores inflamatorios (pueden ser también añadidos fármaco (s) de ensayo simultáneamente con estimulación de MM6). Los fármacos se añaden para alcanzar concentraciones finales de 1 nM hasta 100 μM (como comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos).

50 [0058] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, se incuban células MM6 diferenciadas o no diferenciadas (a $1-10 \times 10^6/\text{mL}$) ($37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5%) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato- 13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA. Las células MM6 pueden también ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo de calcio A23187. y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones de células MM6 pueden también realizarse en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sanos) con una proporción de MM6:plaqueta de 1:10 to 1:10000. Las células son incubadas (a $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5% en RPMI- 1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con fármaco(s) de prueba (pemirolast en combinación con

losartán, pemirolast solo y losartán solo; como antes en cuanto a soluciones madre y concentraciones) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 (como comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos; fármaco(s) de ensayo pueden también añadirse simultáneamente con estimulación de MM6). Después de sedimentar las células por centrifugación tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquina y quimiocina humana en los sobrenadantes se cuantifican utilizando un utilizando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EEUU) según las instrucciones del fabricante. . Kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas pueden también utilizarse según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para los experimentos microarray (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 2

Ensayos de Liberación de Mediador Inflamatorio de Células de Sangre Periférica Humana

[0059] Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) o células polimorfonucleares (PMN) de donantes de sangre sanos por separación Lymphoprep o Ficoll-Paque (con o sin separación Polymorphoprep y/o sedimentación con Dextrano) utilizando protocolos establecidos.

[0060] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B4 (LTB₄), PBMC o PMN (a 1-15X10⁶/mL; 0.5-1 mL) son incubados durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y puede también usarse 2-10 µM de ionóforo de calcio A23187 (A23187 sin ácido araquidónico). El PBMC/ PMN puede ser también estimulado con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN anteriores pueden ser también realizadas en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sano) con una proporción de PBMC/PMN:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se paran con dos volúmenes de metanol frío y prostaglandina B₂ añadida como estándar interno. Las muestras se centrifugan y los sobrenadantes se diluyen con agua para alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en columnas de fase sólida C18 preacondicionadas (1 mL de metanol seguido de 1 mL de H₂O) (Sorbent Technology, Reino Unido). Los metabolitos son eluados con metanol, tras lo que se añade un volumen de agua al eluato. Para HPLC de fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL de H₂O (pueden usarse otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8X10 es eluada con metanol/acetronitrilo/H₂O/ácido acético 30:35:35: 0,01 v/v) a 1,2 mUminuto. La absorbancia del eluato es controlada a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. Pueden también usarse Kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir LTB₄ según las instrucciones del fabricante(s). Utilizando Kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (EIA/ELISA kits) según instrucciones del fabricante (s), los sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones de PBMC/ PMN anteriores pueden ser también analizados respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células son incubadas (a 37°C en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con 0-10% de suero fetal bovino, con fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para liberación de mediadore inflamatorio (ver Ejemplo 1 anterior para detalles en referencia a soluciones madre y concentraciones de fármacos; pueden añadirse también fármaco(s) de ensayo con estimulación de PBMC/ PMN). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos.

[0061] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tales como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, se incuban PBMC/PMN (a 1-10X10⁶/mL) (37°C/CO₂ 5%) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino) con lipopolisacáridos (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato- 13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA. Las células de PBMC/PMN pueden ser también estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo de calcio A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN pueden ser también realizadas en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sano) con una proporción PBMC/PMN:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C/ CO₂ 5% en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino) con fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para la liberación de citoquina/chemoquina (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación de PBMC/PMN). Tras sedimentar las células por centrifugación después de las incubaciones/ estimulaciones, se cuantifican las concentraciones de citoquina y quimiocina humana en los sobrenadantes utilizando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Los kits de limunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas pueden ser también utilizados según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados(-80°C) in tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta un posterior procesamiento para experimentos microarrayexperimentos (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 3**Ensayos de Liberación del Mediador Inflamatorio de Mastocito de Ratón**

5 **[0062]** Se obtienen mastocito(s) cultivadas de la médula espinal (mMCs) cultivando células de médula espinal de ratones C57BU6. Las células de médula espinal (de fémures de ratón lavados con PBS) se cultivan (37°C/ CO₂ 5%) en RPMI 1640 acondicionado enriquecido en, 10% de WEHI-3 o X-63 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 4 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sodio, 0,1 mM de amino ácidos no esenciales, 10 mM de Hepes, y 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. El desarrollo de los mastocitos (que crecen en suspensión) está confirmado por la expresión de Klt (por citometría de flujo) sobre la superficie celular y/o por tinte de azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

10 **[0063]** Mastocitos de ratón cultivados de tipo de tejido conectivo (tipo CT) obtenidos de médula espinal se obtienen cultivando células de médula espinal de ratones C57BU6. Las células de médula espinal se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI-1640 conteniendo 10% de FCS filtrado, 4 mM de Lglutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 100 IU/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales MEM y 50 PM de 2-ME, suplementado con 50 µg/mL de factor recombinante de células madre murinas y 1 ng/mL de IL-4 recombinante murino. El desarrollo de los mastocitos es confirmado por la expresión de Klt ((por citometría de flujo) sobre la superficie celular y/o por manchado de azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

15 **[0064]** Pueden también utilizarse líneas celulares de mastocitos MC/9 de ratón (obtenidas de ATCC, Producto nº CRL-8306) y C1.MC/C57.1 (Young y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9175 (1987)). Las células MC/9 se cultivan según las instrucciones de ATCC (<http://www.atcc.org>), y las células C1.MC/C57.1 se cultivan como se describe en Rumsaeng y otros (J. Immunol. 158, 1353 (1997)).

20 **[0065]** Para la activación/estimulación a través de reticulación del receptor de IgE, los mastocitos cultivados son sensibilizados inicialmente durante 90 minutos a 37°C (CO₂ 5%) con un anticuerpo monoclonal de IgG anti-TNP de ratón (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, EEUU), utilizado como un 15% sobrenadante de hibridoma. Las células a utilizar en los ensayos de liberación de N-acetil-beta-D-hexosaminidasa (o histamina) o citoquina/quimiocina (ver abajo) son entonces sometidas a dos lavados con PBS y resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) antes de que las células (a 0,5-10x10⁶/mL) sean activadas por adición de 100 ng/mL de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) con una proporción de acoplamiento de 9/1. La incubación (37°C/CO₂ 5%) con TNP-BSA es 30 minutos para el análisis de liberación de beta-hexosaminidasa (o histamina) y 4-24 horas para el análisis de liberación de citoquina y quimiocina. Las células son incubadas (37°C/CO₂ 5%) con fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la adición de TNP-BSA (ver Ejemplo 1 arriba para detalle respecto a soluciones madres y concentraciones; los fármaco(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación de TNP-BSA). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos. Tras las incubaciones/ estimulaciones, las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes analizados respecto al contenido de beta-hexosaminidasa (o histamina) y/o citoquinas/quimiocinas como se describe arriba. Los granulados celulares se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12 abajo).

25 **[0066]** Para la detección de la liberación dependiente de IgE de la enzima beta-hexosaminidasa del granulado de mastocitos se utiliza un ensayo colorimétrico enzimático. 60 µL de cada sobrenadante de pocillo se transfieren a una placa con 96 pocillos y se mezclan con un volumen igual de solución de sustrato (7,5 mM p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glucosaminidasa disueltos en 80 mM de ácido cítrico, pH 4,5). La mezcla es incubada en una plataforma basculante durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, se añade 120 µL de glicina (0,2 M, pH 10,7) a cada pocillo y se mide la absorbancia a 405 y 490 nm utilizando un Lector Emax de Microplacas de Precisión (Dispositivos Moleculares, Sunnyvale, CA). La liberación de beta-hexosaminidasa se expresa como un porcentaje de la beta-hexosaminidasa total determinada después de la lisis celular. Para la detección de la liberación dependiente de IgE de histamina de mastocitos granulares, se usan para medir la histamina kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ ELISA) según las instrucciones del fabricante(s).

30 **[0067]** Para la detección de la liberación dependiente de IgE de citoquinas y quimiocinas de mastocitos de ratón tales como IL- 6, IL-4, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, se usa un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Pueden también usarse kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas según instrucciones del fabricante(s).

35 **[0068]** Además de los anteriores experimentos de mastocitos arriba, pueden ser estudiados los efectos inhibitorios de mastocitos de los fármaco(s) de ensayo (ver antes) utilizando enfoques y ensayos experimentales bien establecidos y documentados para analizar la liberación inducida (con por ejemplo anti-IgE (con o sin pretratamiento de las células con IgE de rata o ratón), concanavalina A, proteína L, compuesto 48/80, ionóforo A23187, PMA) de

histamina, beta-hexosaminidasa o triptasa de mastocitos de rata o ratón recientemente aislados.

Ejemplo 4

Ensayos de Liberación del Mediador Inflamatorio de Células RAW 264.7

[0069] Se cultivan células RAW 264.7 (37°C/CO₂ 5%) en DMEM, suplementado con 100 unidades /mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino.

[0070] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tales como IL-6, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, se incuban células RAW 264.7 (en 1-10X10⁶/mL) (37°C/CO₂ 5%) durante 4-24 horas (en DMEM con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con lipopolisacáridos (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13- acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA. Las células RAW 264.7 pueden ser también estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo de calcio A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones de RAW 264.7 pueden ser también realizadas en presencia de plaquetas de ratón o humanas (de donantes de sangre sano) con una proporción RAW 264.7: plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las células son incubadas (at 37°C/CO₂ 5% en DMEM con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de RAW 264.7 para la liberación de la citoquina/quimiocina (ver Ejemplo 1 arriba para detalles respecto a soluciones madre y concentraciones de fármacos; los fármaco(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación de RAW 264.7). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos. Tras sedimentar las células por centrifugación después de las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquina y quimiocina de ratón en los sobrenadantes son cuantificadas utilizando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Pueden usarse los kits De inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 5

Inflamación de Pata de Rata inducida por Carragenanos

[0071] Este ensayo es esencialmente según lo descrito por Winter y otros (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544 (1962)). Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratas Sprague-Dawley o Wistar machos pesando aproximadamente 150-400 g (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse también otros vehículos. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del fármaco, un 0,5, 1,0 o 2.0% de solución de carragenanos (Lambda Tipo IV, Sigma Chemical Co.) en 0,9% de solución salina se inyecta en la región subplantar de una pata trasera de las ratas anestesiadas. Antes, y a intervalos indicados de 3-24 horas tras la inyección de carragenanos, el volumen de la pata trasera se mide con un pletismómetro de desplazamiento conectado a un transductor de presión con un indicador digital. El grado de hinchazón indica el grado de edema inflamatorio. 3-24 horas tras la inyección de carragenanos, las ratas son sacrificadas y perfundidas con solución salina o PBS (pueden usarse otros medios de perfusión). Las biopsias de tejido blando plantar de las patas inflamadas son recogidas, pesadas, almacenadas congeladas (las muestras para análisis microarray son congeladas a -80°C en TRIZOL, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizadas con respecto a 1) la acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación inflamatoria de leucocitos neutrófilos; y/o 2) expresión génica de tejido utilizando tecnología microarray. Los tejidos de pata no inflamados de ratas sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión génica. La inflamación del tejido puede también ser estudiada utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas tradicionales. La inflamación de las patas puede estar también inducida por inyección subplantar del compuesto 48/80 (48/80, 1-5 µg in 50-100 µl PBS o solución salina) (en lugar de carragenanos), seguida de la medición de hinchazón inflamatoria de pata y recogida de biopsias de los tejidos para análisis Microarray y/o MPO (como antes) 30 min a 8 horas después de la inyección del 48/80.

Ejemplo 6.

Inflamación de Oreja de Ratón Inducida por Aceite de Croton

[0072] Este ensayo es esencialmente según lo descrito por Tonelli y otros (Endocrinology 77, 625 (1965)) (pueden utilizarse también otras cepas de ratones). Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen según se

requiera en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse otros vehículos. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del fármaco, 10-30 µL de una solución al 2,0 o 4,0% de aceite de croton en acetona o etanol es aplicada tópicamente a una o dos orejas. A intervalos indicados de 4-12 horas tras la aplicación del aceite de croton, los animales son sacrificados, y son pesadas biopsias con punzón de las orejas para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (el grosor de las orejas puede medirse para determinar la hinchazón). Las biopsias de las orejas inflamadas son recogidas, almacenadas congeladas (las muestras para análisis microarray son congeladas a -80°C en TRIzol), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizadas con respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación inflamatoria de leucocitos neutrófilos; y/o 2) expresión génica del tejido utilizando tecnología microarray. Las biopsias de orejas no inflamadas de ratas sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión génica. La inflamación de tejidos puede ser también estudiada utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 7

Inflamación de Oreja de Ratón Inducida por Éster de Forbol o Ácido araquidónico

[0073] Estos ensayos son esencialmente según los descritos por Chang y otros (Eur. J. Pharmacol. 142, 197 (1987)) (aunque pueden también utilizarse otras cepas de ratones).

[0074] Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratones machos o hembras (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen según se requiera en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse otros vehículos. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del medicamento, se aplica tópicamente 1-10 µg de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), acetato de forbol tetradecanol (TPA), o 1-5 mg de ácido araquidónico en 10-30 µl de acetona o etanol a una o ambas orejas 4-12 horas tras la aplicación del PMA o TPA, y 30 min a 6 horas tras la aplicación de ácido araquidónico, los animales son sacrificados, y son pesadas las biopsias con punzón de las orejas para determinar el hinchazón inflamatorio de las orejas (el grosor de las orejas puede medirse para determinar la hinchazón). Las biopsias de las orejas inflamadas son recogidas, almacenadas congeladas (muestras para análisis microarray son congeladas a -80°C en TRIzol), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizadas con respecto a 1) la acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación inflamatoria de leucocitos neutrófilos; y/o 2) expresión génica de tejido utilizando tecnología microarray. Los tejidos de las orejas no inflamadas de ratas sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión génica. La inflamación de tejidos puede ser también estudiada utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 8

Reacción e Inflamación Aguda del Tejido en Respuesta a Herida en Ratón y Rata

[0075] Son utilizados ratones CBA o NMRI pesando aproximadamente 15-30 g, o ratas Wistar o Sprague-Dawley machos pesando aproximadamente 150-450 g, (pueden utilizarse otras razas de ratones y ratas). Se consigue herida aguda del tejido e inflamación aguda en la parte distal de la cola o en una de las orejas utilizando un escalpelo bajo condiciones asépticas. Uno, dos o tres cortes longitudinales paralelos, de aproximadamente 5-15 mm de largo, se hacen a través de todas las capas de la piel. Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la primera dosis dada 1 minuto a 24 horas antes de la herida del tejido (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen como se requiera en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse otros vehículos. 2-48 horas después de la herida, los animales son sacrificados y el segmento dañado de los tejidos es extraído, pesado y almacenado congelado (muestras para el análisis microarray son congeladas a -80°C en TRIzol), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizado con respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación inflamatoria de leucocitos neutrófilos; y/o 2) expresión génica de tejido utilizando tecnología microarray. Los correspondientes tejidos sin dañar/no inflamados de animales sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión génica. Las reacciones e inflamación de los tejidos en respuesta a la herida pueden ser también estudiadas utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 9

Reacción e Inflamación Aguda del Tejido en Respuesta a Herida en Rata

[0076] Se utilizan ratas Sprague-Dawley macho pesando 350-500 g (aunque pueden utilizarse otras cepas de ratas). Los animales son anestesiados con Isoflurano en oxígeno y se consigue la herida aguda del tejido e inflamación aguda en la arteria carótida común izquierda como sigue: Tras exposición quirúrgica de las arterias carótidas

comunes izquierda externa e interna., y cese temporal del flujo local sanguíneo con ligaduras temporales, un catéter de balón (2-French Fogarty) es pasado a través de la carótida externa a la aorta. Después, el globo es inflado con suficiente agua para dilatar la arteria carótida común y entonces se retira a la carótida externa. Este procedimiento es repetido tres veces, y entonces el catéter se retira, la carótida externa se liga y la herida se cierra. Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán , pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la primera dosis dada 1 minuto a 24 horas antes de la herida del tejido (para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen como se requiera en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también utilizados. 2-48 horas tras la herida, los animales son anestesiados con Isoflurano en oxígeno y sus arterias carótidas izquierdas expuestas. Se colocan abrazaderas en la parte más proximal de las arterias carótidas comunes e internas, respectivamente, y entonces el vaso entre las abrazaderas es cuidadosamente lavado con solución salina estéril y/o TRIZOL, extraído, pesado y almacenado congelado (muestras para el análisis microarray son congeladas a -80°C en TRIZOL), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizado con respecto a 1) la acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación inflamatoria de leucocitos neutrófilos; y/o 2) expresión génica de tejido utilizando tecnología microarray. Los correspondientes tejidos sin dañar/inflamados de ratas sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión génica. Las reacciones e inflamación de los tejidos en respuesta a la herida pueden ser también estudiadas utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

20 **Ejemplo 10**

Acumulación Inflamatoria de Mieloperoxidasa de Tejido

[0077] La enzima mieloperoxidasa (MPO) es abundante en leucocitos neutrófilos es a menudo utilizada como un marcador para la detección de acumulación de neutrófilos en tejido inflamado. Para determinar la acumulación inflamatoria de mieloperoxidasa en tejidos de ratón y rata inflamados (como se describe en los Ejemplos 5-9 arriba), los tejidos son homogeneizados en bromuro de hexadeciltrimetil-amonio 0.5% , y descongelados. La actividad MPO del sobrenadante está determinada espectrofotométricamente como el cambio en absorbancia a 650 nm (25°C) que ocurre en la reacción redox H₂O₂-tetrametilbenzidina catalizada por MPO. Los valores están expresados como unidades MPO /mg de tejido.

30 **Ejemplo 11**

Ensayos de Células de Músculo Liso

[0078] Células de músculo liso aórtico de rata (RASMCs) son aisladas como se ha descrito previamente (Hedin y otros, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 1977 (1997)). Las células se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio Ham F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico, 50 µg/mL de estreptomycin, 50 IU/mL penicilina (F- 12/10% de suero fetal bovino), cultivados hasta confluencia, pasado en serie por tripsinización, y utilizado en experimentos después de 2-6 pasadas. Se siembran RASMCs en placas de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 4x10⁴ células por pocillo en F-12/ suero fetal bovino 10% (pueden usarse placas con mayor número de pocillos por placa y apropiados números menores de células por pocillo). Tras 24 horas, las células son sincronizadas en fase G₀/G₁ por inanición en medio Ham F-12 suplementado con albúmina de suero bovino 0.1% (BSA), 50 µg/mL de ácido L-ascórbico, 50 µg/mL de estreptomycin y 50 IU/mL de penicilina (F-12/ BSA 0.1%) durante 24-48 horas. Para estimar la síntesis de ADN, RASMCs en ayunas son estimuladas con 10 ng/ml de IGF-1 o suero fetal bovino 10% durante 12-48 horas (pueden usarse otros mitógenos establecidos tal como PDGF). Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) se añaden 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación (ver Ejemplo 1 arriba para detalles respecto a soluciones madre y concentraciones de fármacos; los fármaco(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación). Para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos. Las células son etiquetadas con 1 µCi [3H]-timidina durante 8 horas antes del final del periodo de estimulación. Las placas son luego lavadas con PBS congelado, incubadas durante la noche con ácido tricloroacético 10% (p/v congelado) , lisadas en 0,2 M de hidróxido de sodio, y la radioactividad se mide en un contador de centelleo líquido. La proliferación estimulada de RASMC puede también analizarse utilizando ensayos de proliferación celular con bromodeoxiuridina comercialmente disponible (BrdU) (por ejemplo proliferación Celular ELISA, BrdU, de Roche Applied Science), el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) (ambos según las instrucciones del fabricante), o por recuento celular. En experimentos separados (para estudiar la expresión génica), se estimulan mayores números de RASMCs en ayunas (1-5 x 10⁶ células por pocillo) con 10 ng/ml de IGF-1 o suero fetal bovino 10% (o PDGF) como antes, o con LPS (1-100 ng/mL), con suero fetal bovino 1-10% durante 4-48 horas (todos los estímulos con y sin fármaco(s) de ensayo como antes). Las células son entonces recogidas y almacenadas congeladas (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12 abajo).

[0079] Células de músculo liso bronquial humano (HBSMCs, Promocell, Heidelberg, Germany) se cultivan en DMEM suplementado con FBS 10% , 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 0,12 IU/mL de insulina,

y con o sin 2 µg/mL de amfotericina B. Antes de los experimentos, las células pueden ser conservadas con crecimiento detenido durante 24 horas en FBS bajo (0.3-5%), medio sin insulina. Para estimular la formación y liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tales como IL-8 y eotaxina, se incuban HBSMCs (a 80% de confluencia, correspondiente a aproximadamente 8X10⁷/matraz 25 cm²) (37°C/CO₂ 5%) durante 24-48 horas (en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con diferentes combinaciones de IL-1β y TNF-α (ambos a 1-50 ng/mL). Las células son incubadas (a 37°C/CO₂ 5% en DMEM con suero fetal bovino 0.3-10%, con o sin suplementos) con fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de HBSMC (ver Ejemplo 1 arriba para detalles respecto a soluciones madre y concentraciones de fármacos; pueden ser también utilizados fármaco(s) de ensayo simultáneamente con estimulación de HBSMC). Para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos. Tras las incubaciones/estimulaciones, se cuantifican las concentraciones de citoquina y quimiocina humana en los sobrenadantes utilizando kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones del fabricante(s). Las células son entonces recogidas y almacenadas congeladas (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 12

Análisis de Expresión Génica

[0080] Se aísla RNA total de tejidos de ratón, rata y humanos (ver Ejemplo 5 to 9, 15, 16, 19 y 20) utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido de limpieza con RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) según protocolos de los fabricantes. Se aísla RNA total de las incubaciones/estimulaciones celulares descrito en los Ejemplos anteriores y posteriores (mastocitos de ratón, MonoMac-6, PBMC, PMN, RAW 264.7, RASMC, HBSMC, NB4, HL-60) utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN), con o sin equipo RNase-Free DNase (QIAGEN), según el protocolo(s) del fabricante. Dependiendo de las especies de las cuales se originan los diferentes tejidos y células, se realiza el análisis de microarray utilizando GeneChip® Human genome U133 Plus 2.0 Array, GeneChip® Mouse Genome 430 Plus 2.0 Array o GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array, o la correspondiente versión más nueva de estos chips (todas las distribuciones de Affymetrix, Santa Clara, CA) según protocolos del fabricante. Los datos de expresión de microarray se analizan utilizando por ejemplo GeneChip Operating Software (Affymetrix) y Bioconductor/R (www.bioconductor.org). Otro programa relevante puede ser también utilizado.

[0081] La expresión génica de las distintas especies puede ser también analizada utilizando Human Genome Survey Microarray v2.0, Mouse Genome Survey Microarray V2.0 o Rat Genome Survey Microarray V2.0 (o la correspondiente versión más nueva de estas distribuciones) según protocolos del fabricante Applied Biosystems (Foster City, CA). Estos datos de expresión de microarray se analizan utilizando por ejemplo 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) suministrado con una base de datos Oracle® de anotaciones, GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y el programa Microarray Suite versión 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix). Pueden también ser utilizado otros programas relevantes.

[0082] La expresión génica (niveles de ARNm) puede también analizarse utilizando PCR cuantitativo o semicuantitativo. El análisis de la expresión génica a nivel de proteína puede analizarse utilizando kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) (según instrucciones del fabricante(s)), o Western blot tradicional y/o enfoques histoquímicos.

Ejemplo 13

Ensayos de Proliferación Celular

[0083] La proliferación de mastocitos de ratón inestimuladas y estimuladas, células MonoMac-6, células RAW 264.7, células NB4, células HL-60 y HBSMC inestimuladas y estimuladas descritas en los Ejemplos anteriores y posteriores (con o sin detención de crecimiento durante 24-48 horas en suero fetal bovino 0.1-5% antes de la adición de los respectivos fármacos de ensayo y/o estímulos descritos en los Ejemplos anteriores y posteriores durante 24-72 horas) se mide utilizando el reactivo WST-1 de proliferación celular (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o ensayos de proliferación celular de bromodeoxiuridina (BrdU) comercialmente disponibles (por ejemplo Proliferación Celular ELISA, BrdU, de Roche Applied Science) según instrucciones del fabricante. Pueden utilizarse también otras pruebas tradicionales de proliferación celular.

Ejemplo 14

Pruebas de Agregación de Plaquetas

[0084] La agregación de plaquetas de conejo o humanas (en plasma o sangre entera rica en plaquetas) inducida por difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, colágeno o el análogo de tromboxano U-46619 es analizada utilizando agregometría, por ejemplo como se describe por Bertele y otros (Eur. J. Pharmacol. 85, 331 (1982)). La agregación de plaquetas inducida (como antes) puede también analizarse utilizando plaquetas humanas o de conejo lavadas y/o con otra agregometría establecida u otros métodos correspondientes para medir la agregación de

plaquetas. Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) se añaden 1-120 minutos antes de la inducción de la agregación de plaquetas (ver Ejemplo 1 arriba para detalles en relación a la solución madre y concentraciones de fármacos; los fármaco(s) de ensayo pueden también ser añadidos simultáneamente con inducción de agregación de las plaquetas). Para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos.

Ejemplos 15

Inflamación Peritoneal de Raton Inducida por Zimosan y Otros Estímulos

[0085] Este ensayo es esencialmente según Rao y otros (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917 (1994)) (pueden utilizarse también otras cepas de ratones). Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen según se requiera en por ejemplo metilcelulosa 0,5% o 1% en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse otros vehículos. De 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del medicamento, 0,5-2 mg de zimosan A (Sigma, cat. no. Z4250) en 0.5-1 mL de PBS estéril (sonicado y bien mezclado) se inyecta intraperitonealmente (en lugar de utilizar zimosan A, la inflamación peritoneal puede ser también inducida por inyección peritoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos pro-inflamatorios bien establecidos tales como IgE anti ratón (con o sin pretratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenanos, peptona proteasa, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . Los fármaco(s) de ensayo pueden ser también administrados simultáneamente con inyección intraperitoneal de zimosan u otros estímulos proinflamatorios) 2-24 horas tras la inyección de zimosan (o uno o más de los otros estímulos pro-inflamatorios), los animales son sacrificados. La cavidad peritoneal es entonces lavada con con 1-3 mL de un tampón de lavado (PBS congelado con o sin 3-5 mM de EDTA o 5-10 unidades/mL de heparina). Los recuentos totales y diferenciales de leucocitos en el fluido de lavado se hacen con un hemocitómetro después del tinte con solución de Türk y/o preparaciones de citospina teñidas con May-Grunwald Giemsa o un tinte de Wright (Diff-Quik) modificado, respectivamente, por microscopía óptica utilizando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar los recuentos de leucocitos diferenciales y totales pueden ser utilizados. El fluido de lavado remanente es centrifugado (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el sobrenadante del fluido de lavado sin células es almacenado congelado (-20°C to -80°) hasta que se analiza para el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o contenido de citoquinas/quimiocinas de ratón (por ejemplo IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ) como se describe en el Ejemplo 1 y 4 arriba. El contenido de histamina en el sobrenadante del fluido de lavado se determina utilizando Kits de inmunoensayo enzimático de histamina comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según instrucciones del fabricante(s). La activación celular peritoneal inflamatoria puede ser también estudiada midiendo la actividad beta-hexosaminidasa en el fluido de lavado utilizando el ensayo de beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del fluido de lavado son resuspendidos en 0,1-1.0 mL 0,05 M de KHPO₄ pH 6,0 con HTAB 0.5% y almacenados congelados (-20°C a -80°) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) como se describe por Rao y otros (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Granulados celulares idénticos de animales diferentes se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con el tampón de lavado, las biopsias del tejido (pared peritoneal, intestinos y/u otros órganos intra- o retroperitoneales) de la cavidad peritoneal inflamada son recogidas, pesadas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de microarray son congeladas a -80°C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas respecto a expresiones génicas de tejido utilizando tecnología microarray. Las cavidades peritoneales no inflamadas de animales sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas/quimiocinas y expresión génica. La inflamación del tejido puede también ser estudiada utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales

Ejemplo 16

Inflamación Peritoneal de Rata Inducida por Zimosan y Otros Estímulos

[0086] Se utilizan ratas Wistar o Sprague Dawley macho pesando aproximadamente 150-450 g. Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,03 a 50 mg/kg se administran por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 de arriba) se diluyen según se requiera en por ejemplo metilcelulosa 0.5% o 1% en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Pueden usarse otros vehículos. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del medicamento, 1-100 mg de zimosan A (Sigma, cat. no. Z4250) en 1-10 mL de PBS estéril (sonicado y bien mezclado) es inyectado intraperitonealmente (en lugar de utilizar zimosan A, la inflamación peritoneal puede también ser inducida por inyección intraperitoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos proinflamatorios tales como IgE antirata (con o sin pretratamiento intraperitoneal con IgE de rata durante 1-3 días), concanavalina A, proteína L, compuesto 48/80, carragenanos, proteasa peptona, LPS, PMA, tioglicolato,

ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . Los fármaco(s) de ensayo pueden ser también administrados simultáneamente con inyección intraperitoneal de zimosan o los otros estímulos proinflamatorios). 2-24 horas tras la inyección de zimosan (o uno o más de los otros estímulos), los animales son sacrificados. La cavidad peritoneal es entonces lavada con 10-20 ml de un tampón de lavado (por ejemplo PBS congelado con o sin 3-5 mM de EDTA o 5-10 unidades/mL de heparina). Las cuentas de leucocitos totales y diferenciales en el fluido de lavado son hechas con un hemocitómetro después de teñirse con solución de Türk y/o en preparaciones de citospina teñidas con May-Grunwald Giemsa o un tinte de Wright (Diff-Quik) modificado, respectivamente, por microscopía óptica utilizando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar recuentos de leucocitos diferenciales y totales pueden ser utilizados. El fluido de lavado remanente es centrifugado (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el sobrenadante del fluido de lavado sin células es almacenado congelado (-20°C to -80°C) hasta que se analiza para el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o contenido de citoquinas/quimiocinas (por ejemplo IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ) esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 y 4 arriba. El contenido de histamina en el sobrenadante del fluido de lavado se determina utilizando kits de inmunoensayo enzimático de histamina comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según instrucciones del fabricante(s). La activación celular peritoneal inflamatoria puede ser también estudiada midiendo la actividad beta-hexosaminidasa en el fluido de lavado utilizando el ensayo de beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del fluido de lavado son resuspendidos en 0,1-1.0 mL 0,05 M de KHPO₄ pH 6,0 con 0.5% de HTAB y almacenados congelados (-20°C a -80°C) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) básicamente como se describe por Rao y otros (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Granulados celulares idénticos de animales diferentes son almacenados congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con el tampón de lavado, las biopsias del tejido (pared peritoneal, intestinos y/u otros órganos intra- o retroperitoneales) de la cavidad peritoneal inflamada son recogidas, pesadas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de microarray son congeladas a -80°C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas con respecto a expresiones génicas de tejido utilizando tecnología microarray. Las cavidades peritoneales no inflamadas de animales sin tratar proporcionan niveles de línea de base de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas/ quimiocinas y expresión génica. La inflamación del tejido puede también ser estudiada utilizando técnicas tradicionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 17

30 Ensayos de Liberación del Mediador Inflamatorio de Células NB4 y HL-60

[0087] Células humanas NB4 (Lanotte y otros, Blood, 77, 1080 (1991)) se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y suero fetal bovino 10% (v/v). Para diferenciación, se añade 1-5 μ M de ácido retinóico all trans (ATRA), generalmente cada tercer día.

[0088] Células humanas HL-60 (Steinheilber y otros, Biochim. Biophys. Acta 1178, 1 (1993)) se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y suero fetal bovino 10-20% (v/v). Para diferenciación se añade ATRA (1-5 μ M), DMSO (1-2%), PMA (100-500 ng/mL) o vitamina D3 (1-15 μ M) durante 5 días.

[0089] Para estimular la formación y liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), células diferenciadas o sin diferenciar NB4 o HL-60 (en 1-15X10⁶/mL) son incubadas durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 10-40 μ M de ácido araquidónico y/o 2-10 μ M de ionóforo de calcio A23187. Las células NB4 y HL-60 pueden ser también estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP), fMLP, y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las incubaciones/estimulaciones de NB4 y HL-60 arriba pueden también ser realizadas en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sanos) con una proporción NB4/HL-60: plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones son paradas con 1 mL de metanol y prostaglandina B₂ frías (PGB₂) añadidas como estándar interno. Las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes se diluyen con agua para alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en (1 mL de metanol seguido de 1 mL de H₂O) columnas de fase sólida C18 preacondicionadas (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos son eluidos con metanol, tras lo cual un volumen de agua es añadido al eluato. Para HPLC de fase inversa, se mezclan 76 μ L de cada muestra con 39 μ L H₂O (pueden utilizarse otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8X10 es eluada con metanol/acetronitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35: 0.01 v/v) a 1.2 mUmin. La absorbancia del eluato es controlada a 270 nm para detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. Pueden ser también utilizados kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir LTB₄ según instrucciones del fabricante(s) del kit. Utilizando kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones de NB4/HL-60 anteriores pueden ser también analizados respecto al contenido de los mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células son incubadas (a 37°C en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-20%, con o sin suplementos) con los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán), pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 o HL-60 para la liberación del mediador inflamatorio (ver Ejemplo 1 de arriba para detalles en relación con las soluciones madre y concentraciones de las

medicinas; los fármaco(s) de ensayo pueden también ser añadidos simultáneamente con estimulación de NB4/HL-60). Para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos.

[0090] Para estimular la formación y liberación de citoquinas, quimiocinas y mediadores inflamatorio tales como IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PAF, C5a, las células NB4 o HL-60 diferenciadas o sin diferenciar (en 1-10X10⁶/mL) son incubadas (37°C, CO₂ 5%) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10, con o sin suplementos) con lipopolisacáridos (LPS 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 1-100 ng/mL) o ionóforo de calcio A23187 (1-10 μ M), o combinaciones de estos estímulos. Las células NB4 y HL-60 pueden también ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de difosfato de adenosina (ADP) y/o el análogo de tromboxano U-46619, con 38 o sin LPS, PMA y/o A23187 como antes. Las incubaciones/estimulaciones de NB4 y HL-60 pueden también ser realizadas en presencia de plaquetas humanas (de donantes de sangre sanos) con una proporción NB4/HL-60:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C, CO₂ 5% en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán /o solo, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 or HL-60 para la liberación de citoquina/quimiocina/mediador (para comparar, algunos experimentos son realizados sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo pueden también ser añadidos simultáneamente con estimulación de NB4/HL-60). Tras sedimentar las células por centrifugación, las concentraciones de citoquina/quimiocina humana y del mediador en los sobrenadantes son cuantificadas utilizando Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según instrucciones del fabricante. Pueden también usarse kits de inmunoensayo enzimático comercialmente disponibles (EIA/ELISA kits) para medir las citoquinas/quimiocinas y mediadores según las instrucciones por el fabricante(s). Las plaquetas celulares son almacenadas congeladas (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta el procesamiento adicional para experimentos microarray (ver Ejemplo 12 arriba).

[0091] Además de estudiar los efectos de los fármacos anteriores sobre la liberación de mediadores y quimiocinas/citoquinas de las células NB4 y HL-60 tipo neutrófilo, pueden también analizarse los efectos de los fármacos sobre la adherencia y/o migración espontánea o estimulada de estas células (pueden ser también utilizadas células polimorfonucleares humanas aisladas (PMN) según protocolos estándar). La adherencia espontánea o estimulada (con fMLP, IL-8, PAF, LTB₄ u otros factores activadores de PMN relevantes) la adherencia de células PMN o tipo neutrófilo a, por ejemplo, células endoteliales cultivadas o superficies artificiales recubiertas con proteínas son estudiadas utilizando enfoques y ensayos experimentales bien establecidos y documentados. La migración (estimulada con fMLP, IL-8, PAF, LTB₄ u otros factores quimotácticos de PMN) de las células PMN o tipo neutrófilos estudiada utilizando enfoques y ensayos bien establecidos y documentados, por ejemplo la migración a través a través de membranas recubiertas con proteínas comercialmente disponibles diseñadas para tales estudios de migración.

Ejemplo 18

Activación de Plaquetas y Leucocitos en Sangre Humana Entera

[0092] La sangre venosa es recogida por venopunción sin estasis, utilizando tubos vacutainer siliconizados que contienen 1/10 de volumen de 129 mM de citrato trisódico (Becton Dickinson, Meylan, France). La expresión de P-selectina de plaquetas de sangre entera (reflejando la actividad de las plaquetas), la expresión de leucocitos CD11b (reflejando la actividad de leucocitos), el recuento del microragregado plaqueta-plaqueta y de plaqueta sola, y los agregados de plaqueta-leucocito (PLAs) son medidos utilizando los ensayos citométricos de flujo, esencialmente como se describe previamente (ver por ejemplo Li y otros. *Circulation* 100, 1374 (1999) como referencia). Brevemente, alícuotas de 5 μ L de sangre entera se añaden a 45 μ L de solución salina tamponada con Hepes (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, pH 7.4) conteniendo anticuerpos apropiadamente diluidos (ver abajo) en ausencia o presencia de estímulos activadores de plaquetas tales como difosfato de adenosina (ADP), U-46619, U-44069, factor activador de plaquetas (PAF), ácido araquidónico, colágeno o trombina, y/o estímulos activadores de leucocitos tales como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), ácido araquidónico, PAF, LPS, A23187 o LTB₄. Antes de exponer la sangre a los estímulos activadores de plaquetas y/o leucocitos + los anticuerpos, las muestras de sangre (0.1-1 ml) son incubadas con los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1-60 minutos (los fármaco(s) de ensayo pueden también ser añadidos simultáneamente con los estímulos anteriores). Para comparar, algunas muestras de sangre se estimulan como antes sin exposición a los medicamento(s). La expresión de selectina P de plaquetas se determina por R-ficoeritina (RPE)-anticuerpo monoclonal CD62P (MAb) AC1.2 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La expresión de leucocitos CD11b se determina por isotiocianato de fluoresceína (FITC)- MAb BEAR 1 conjugado (Immunotech, Marseille, France). MAb conjugados isotópicos de FITC y RPE son utilizados como controles negativos. Las perlas fluorescentes (Partículas SPHERO™ Raibow, 1.8-2.2 μ m) utilizadas para el recuento de plaquetas son de PharMingen (San Diego, CA, USA). Las plaquetas están identificadas con anti-CD42a FITC conjugado (GPIX) MAb Beb 1 (Becton Dickinson), y los leucocitos son identificados con anti-CD45 MAb J33 RPE conjugado (Immunotech). Las muestras (sangre tratada con fármaco o sin tratar + anticuerpos con o sin los estímulos, como antes) son incubadas a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Después, las muestras se diluyen y fijan ligeramente con solución salina de formaldehído 0.5% (v/v), y analizan para los diversos parámetros de plaquetas y leucocitos con un citómetro de flujo Beckman-Coulter EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter

Corp., Hialeah, FL). Los datos de expresión de selectina P en plaquetas son informados como los porcentajes de células P-selectina positivas en la población de plaquetas y como recuentos totales de plaquetas P-selectina positivas. La expresión de leucocitos CD11b se informa como intensidad de fluorescencia media (MFI) de la población total de leucocitos y de las subpoblaciones de leucocitos. Los agregados plaqueta-leucocito (PLAs) son presentados tanto como cuentas totales como porcentajes de plaquetas conjugadas con leucocitos en la población total de leucocitos y entre linfocitos, monocitos, y neutrófilos. Pueden usarse otros reactivos relevantes, condiciones/enfoques experimentales, equipamiento y modos de análisis para medir la activación de los leucocitos y plaquetas correspondientes en sangre entera humana.

Ejemplo 19

10 Aneurismas Aórticos Abdominales Experimentales

[0093] Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) en dosis de 0,3 a 200 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (los fármacos, hasta 400 mg/kg/día, pueden ser también administrados continuamente por vía subcutánea o intraperitoneal utilizando por ejemplo Bombas Osmóticas Alzet® según las instrucciones del fabricante). (Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los fármacos.) Antes de la administración, las soluciones madre de los fármacos (ver Ejemplo 1 arriba) se diluyen según se necesite en por ejemplo metilcelulosa 0.5% o 1% en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también utilizados. Inmediatamente después o hasta 7 días tras la primera dosis del fármaco, se realiza la producción de aneurismas aórticos abdominales experimentales (y mediciones de los diámetros aórticos) utilizando la aplicación de CaCl₂ periaórtica esencialmente según Longo y otros (J. Clin. Invest., 110, 625, 2002) o utilizando la perfusión de elastasa aórtica esencialmente según Pyo y otros (J. Clin. Invest., 105, 1641 (2000)). (Pueden utilizarse otras cepas de ratones distintas de las utilizadas en Longo y otros y Pyo y otros.) Los efectos de los fármacos sobre los aumentos aneurismáticos inducidos por elastasa o CaCl₂ en el diámetro aórtico son normalmente medidos inmediatamente antes y uno, dos, tres y/o cuatro semanas después del ataque con elastasa o CaCl₂ (pueden usarse otros intervalos de medición). Los efectos de los fármacos en la inflamación (por ejemplo acumulación de leucocitos en el tejido), la expresión génica y la actividad de la proteasa se miden en especímenes del tejido aneurismático aórtico utilizando técnicas establecidas/tradicionales bioquímicas, histológicas, inmunohistoquímicas, inmunológicas, de microarray y zimográficas. Ejemplos de cómo manejar tejidos recogidos y medir la expresión génica de tejido se describen en los Ejemplos 5 y 12 arriba. Los efectos de los fármacos pueden ser también estudiados en correspondientes modelos de ratas de aneurismas aórticos inducidos por la elastasa, por ejemplo esencialmente según Holmes y otros (J. Surg. Res., 63, 305 (1996)), o aneurismas aórticos inducidos por CaCl₂, por ejemplo esencialmente según Isenbarg y otros (Circulation, 115, 1729 (2007)).

Ejemplo 20

Tejido Arterial Humano ex vivo

[0094] Muestras de arterias carótidas o femorales ateroscleróticas humanas o aneurismas aórticos abdominales obtenidos durante cirugía de rutina se utilizan para estudiar los efectos de los fármacos sobre la inflamación espontánea o inducida, expresión génica y actividad de proteasa en los tejidos arteriales enfermos. Antes de las incubaciones/tratamientos siguientes, los tejidos son guardados en hielo en PBS sin Ca y Mg (puede ser utilizado otro medio de tejido establecido).

[0095] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias (por ejemplo IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN γ) y la liberación y/o activación de metaloproteasas matrices (MMPs), tejidos cortado en cubos son incubados (37°C/CO₂ 5%) durante 1-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%; puede ser utilizado otro medio de tejido establecido) con o sin lipopolisacáridos (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA.

[0096] Para estimular la liberación de histamina, triptasa, citoquinas y quimiocinas inflamatorias (ver arriba), y la liberación y/o activación de metaloproteasas de matriz, los tejidos cortados en dados pueden también incubarse (37°C con o sin CO₂ 5%) durante 5 min a 24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10% ; pueden usarse otros medios establecidos) con o sin anti-IgE, concanavalina A, proteína L o compuesto 48/80. La estimulación de la liberación dependiente de IgE de mediadores inflamatorios puede ser también realizada utilizando pre-incubación con anti-TNP IgE seguido de ataque de TNPBSA esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

[0097] Antes de exponer los tejidos a los estímulos inflamatorios anteriores, los tejidos son incubados con los fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con losartán, pemirolast solo y losartán solo) durante 1 minuto a 24 horas (pueden añadirse fármaco(s) de ensayo simultáneamente con los estímulos anteriores). Los fármacos de ensayo permanecen presentes durante las incubaciones con los estímulos proinflamatorios.

[0098] Los efectos de los fármacos en la liberación de mediadores inflamatorios (por ejemplo histamina, triptasa, citoquinas, quimiocinas), expresión génica y proteasa (por ejemplo MMPs tales como MMP2, MMP3, MMP9) actividad en los tejidos vasculares, se examinan utilizando técnicas establecidas/convencionales bioquímicas,

histológicas, inmunohistoquímicas, inmunológicas, de microarray y zimográficas. Ejemplos de cómo manejar tejidos y medir la expresión génica del tejido son descritos en los Ejemplos 5 y 12 arriba, y Ejemplos de cómo medir los mediadores inflamatorios son descritos en los Ejemplos 1 y 3 arriba.

Ejemplo 21**Inhibición por Pemirolast y Losartán de Liberación de Factor de Necrosis Tumoral de Macrófagos**

- 5 **[0099]** Células de la línea celular humana de macrófagos MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock y otros, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) fueron cultivadas (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI- 1640 suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 1 X amino ácidos no esenciales, 10 µg/mL de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y suero fetal bovino 10% (v/v) de . Al comienzo del experimento, se sembraron células MM6 en placas de 96 pocillos a una densidad de 1X10⁵ células/mL (200 µL por pocillo).
- 10 **[0100]** Las células MM6 fueron tratadas (condiciones de incubación como antes) con concentraciones finales indicadas de los fármacos de prueba durante 48 horas antes de la estimulación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden) seguido de medición de la liberación inducida por PMA del factor de necrosis de tumoral (TNF) (ver a continuación para detalles).
- 15 **[0101]** Para estimular la formación y liberación de TNF, las células MM6 fueron incubadas (37°C/CO₂ 5%) durante 5 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 10% con suplementos como antes) con PMA a una concentración final de 10 ng/mL.
- [0102]** Después de sedimentar las células por centrifugación después de las diferentes incubaciones/estimulaciones de MM6 (ver antes y después), las concentraciones de TNF en los sobrenadantes fueron cuantificadas utilizando Kit TNF-α ELISA Humano de Mabtech (Nacka, Sweden) según instrucciones suministradas por el fabricante.
- 20 **[0103]** Se hicieron soluciones madre de pemirolast (sal de potasio; comprada de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, USA) y losartán (sal de potasio; comprada de AK Scientific, Inc., Mountain View, CA, USA) en solución salina estéril.
- [0104]** Las células MM6 que no fueron expuestas a PMA no produjeron niveles detectable de TNF. Sin embargo, después de 5 horas de estimulación con PMA, la concentración media de TNF en los sobrenadantes de células MM6 no tratada era 75,3 pg/mL (n=2).
- 25 **[0105]** Tras el tratamiento de las células MM6 con pemirolast solo en concentraciones finales de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM, las concentraciones medias de TNF tras la estimulación con PMA eran de 66,5 pg/mL, 64,0 µg/mL, 54,3 µg/mL y 72,2 pg/mL, respectivamente (n=2 para cada concentración del fármaco), por ejemplo tras el tratamiento con 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM de pemirolast las concentraciones de TNF eran 88%, 85%, 72% y 96%, respectivamente, de las concentraciones de TNF en las células MM6 sin tratar de control estimuladas con PMA (valores medios, n=2 para cada concentración del fármaco). Tras el tratamiento de las células MM6 con losartán solo en concentraciones finales de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM, las concentraciones medias tras la estimulación con PMA eran de 73,8 pg/mL, 67,5 pg/mL, 74,5 pg/mL y 89,8 pg/mL, respectivamente (n=2 para cada concentración del medicamento, por ejemplo tras el tratamiento con 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM de losartán las concentraciones de TNF eran de 98%, 90%, 99% y 119%, respectivamente, de las concentraciones de TNF en las células MM6 de control estimuladas con PMA (valores medios, n=2 para cada concentración del fármaco).
- 30 **[0106]** Tras la el tratamiento de combinación con 0,1 µM de pemirolast + 0,1 µM de losartán, 1 µM de pemirolast + 1 µM de losartán, 10 µM de pemirolast + 10 µM de losartán y 100 µM de pemirolast + 100 µM de losartán, las concentraciones de TNF eran del 53%, 50%, 46% y 84%, respectivamente, de la concentración de TNF en las células MM6 no tratadas de control estimuladas con PMA (valores medios, n=2 para cada concentración de fármaco)
- 35 **[0107]** Uno o más de los ejemplos antes descritos demuestran un claro efecto sinérgico para la combinación del pemirolast y losartán.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un producto de combinación que comprende:
- (a) pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable ; y
- 5 (b) losartán, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable.
2. Un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 1 que comprende una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; losartán, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, que comprende un kit de partes comprendiendo los componentes:
- (A) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable; y
- 15 (B) una formulación farmacéutica que incluye losartán, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable,
- cuyos componentes (A) y (B) son proporcionados cada uno en una forma que es adecuada para administración conjuntamente con la otra.
4. Un método para hacer un kit de partes como se define en la Reivindicación 3, cuyo método comprende poner el componente (A) en asociación con un componente (B), haciendo así los dos componentes adecuados para administración conjuntamente entre sí.
- 20 5. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 3, en el que los componentes (A) y (B) son adecuados para el uso secuencial, separado y/o simultáneo en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
6. Un producto de combinación como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o 5, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
- 25 7. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 5, o un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 6, en el que el trastorno es aterosclerosis o un trastorno cardiovascular asociado.
8. Un kit de partes, o producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 7, en donde el trastorno es aterosclerosis.
- 30 9. Un kit de partes o producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 8, en donde el trastorno cardiovascular asociado con aterosclerosis se selecciona de un aneurisma aórtico, arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica oclusiva, una enfermedad de arteria coronaria, una enfermedad coronaria, rotura y/o inestabilidad de placa, rotura y/o inestabilidad de ateroma, una enfermedad vascular, una enfermedad arterial, una enfermedad isquémica, isquemia y derrame cerebral.
- 35 10. Un kit de partes o producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 9, en donde la enfermedad de arteria coronaria se selecciona de angina de pecho, infarto de miocardio y ataque cardíaco; la enfermedad coronaria es seleccionada de una enfermedad cardíaca y una enfermedad del corazón; el derrame cerebral es seleccionado de accidente cerebrovascular y ataque isquémico transitorio; y/o el trastorno es rotura y/o inestabilidad de placa; o rotura y/o inestabilidad de ateroma.
- 40 11. Un kit de partes o producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 9, en donde el trastorno es un aneurisma aórtico.
12. Un kit de partes o producto de combinación como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 11, en donde el paciente tiene un síndrome coronario agudo.