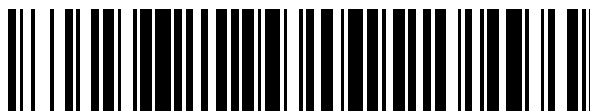


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 120**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007** **E 07848600 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.10.2009** **EP 2107907**

54 Título: **Combinación de pemirolast y ramotrobán para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

20.12.2006 US 875850 P

05.07.2007 US 929623 P

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

08.02.2013

73 Titular/es:

CARDOZ AB (100.0%)

P O BOX 2077

103 12 STOCKHOLM, SE

72 Inventor/es:

RAUD, JOHAN

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 120 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

Combinación de pemirolast y ramatroban para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a una nueva combinación farmacéutica

5 Antecedentes y Estado de la Técnica

[0002] Las enfermedades cardiovasculares, como la enfermedad coronaria y los accidentes cerebrovasculares son las principales causas de muerte, incapacidad y gasto sanitario, en particular en los países industrializados. Estas enfermedades son a menudo secuelas directas de la aterosclerosis, una enfermedad multifactorial que se desarrolla preferentemente en sujetos que fuman y/o presentan factores de riesgo como hipertensión, diabetes,

10 hipercolesterolemia, niveles plasmáticos elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos.

[0003] Las lesiones ateroscleróticas (o placas) a menudo se desarrollan durante varios años y a veces décadas. Normalmente están involucrados procesos patológicos tales como acumulación de colesterol en la pared arterial, formación de células espumosas, inflamación y proliferación celular.

15 [0004] Los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), LDL, total, colesterol y triglicéridos son todos indicadores que determinan el riesgo de desarrollar aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, tales como enfermedades de las arterias coronarias (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, etc.), derrame cerebral (incluyendo un accidente cerebro-vascular y el ataque isquémico transitorio) y enfermedad arterial periférica oclusiva.

20 [0005] Los pacientes con niveles altos de colesterol total y/o triglicéridos tienen un riesgo significativo, con independencia de si tienen o no también un nivel de HDL favorable. Pacientes con niveles normales de colesterol total pero niveles bajos de HDL también tienen mayor riesgo. Recientemente, también se ha observado que el nivel de riesgo de enfermedades cardiovasculares asociado con niveles altos de apolipoproteína B (ApoB, que transporta lípidos en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL), y/o bajos niveles de apolipoproteína AI (ApoA-I, que transporta lípidos en HDL), es extremadamente elevado.

25 [0006] Los medicamentos que reducen los niveles de LDL en el suero pueden reducir la acumulación de placas ateroscleróticas, y pueden reducir (a largo plazo) el riesgo de rotura de la placa asociada a complicaciones tromboembólicas. Existen varios tipos de medicamentos que pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol en sangre. Los más comúnmente son los inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (conjuntamente definidos en lo sucesivo, con independencia de su nombre genérico, como "estatinas"), incluyendo la simvastatina y la atorvastatina. Estos medicamentos evitan directamente la formación de colesterol en el hígado y reducen así el riesgo de enfermedad cardiovascular.

30 [0007] Otras categorías de medicamentos prescritos incluyen resinas (tales como colestiramina y colestipol), que actúan uniéndose a los ácidos biliares, lo que hace que el hígado produzca más de estos últimos, y consumiendo colesterol en el proceso. Además se ha descrito la vitamina B niacina en dosis altas para reducir los niveles de triglicéridos y LDL, además de aumentar los niveles de HDL. Los fibratos (como gemfibrozil y fenofibrato) son conocidos por reducir los niveles de triglicéridos y pueden aumentar los niveles de HDL.

35 [0008] La introducción de medicamentos para bajar el colesterol como las estatinas ha reducido significativamente la mortalidad por enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular. Sin embargo, estos fármacos tienen 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 importante de muerte y discapacidad. De hecho, un reciente artículo publicado (Briel et al, JAMA, 295, 2046 (2006)) sugiere que las estatinas no reducen los episodios cardiovasculares graves durante los cuatro primeros meses de tratamiento en pacientes con síndromes coronarios agudos.

40 [0009] Por lo tanto, existe una necesidad clínica real de tratamientos más seguros y/o más efectivos para la aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, sobre todo en aquellos pacientes con síndromes coronarios agudos.

45 [0010] Pemirolast es un medicamento anti-alérgico activo por vía oral que se utiliza en el tratamiento de afecciones tales como asma, rinitis alérgica y conjuntivitis. Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N ° 4.122.274, Solicitudes de Patente Europea EP 316174 y EP 1285921, Yanagihara et al, Japanese Journal of Pharmacology, 51, 93 (1989) y Drugs of Today, 28, 29 (1992). El fármaco está comercializado actualmente por ejemplo, en Japón como la sal de potasio.

50 [0011] Ramatroban es un antagonista de tromboxano A2 y se sabe que tiene actividad inhibidora de la agregación plaquetaria (véase, por ejemplo, las patentes EE.UU. N° 4.965.258 y 6362214). El fármaco es conocido por tener

una utilidad potencial en el tratamiento de enfermedades alérgicas e inflamatorias, tales como el asma, así como en el tratamiento de prevención de trombosis y tromboembolismo (véase, por ejemplo, Ishizuka et al, Cardiovascular Drug Reviews, 22, 71 (2004)). Ramatroban se comercializa actualmente en, por ejemplo, Japón para el tratamiento de la rinitis alérgica (véase, por ejemplo, Masuyama, Clin. Exp. All. Rev., 4, 27 (2004)).

5 [0012] Se ha informado de estudios que se refieren al uso potencial de pemirolast en la prevención de la restenosis (Miyazawa et al, J. Cardiovasc. Pharmacol., 30, 157 (1997) y Ohsawa et al, Am. Heart J., 136, 1081 (1998) y J. Cardiol. 42, 13 (2003)). Véase también Solicitud de Patente Europea EP 766 693, que describe que pemirolast exhibe un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de músculo liso vascular.

10 [0013] Se ha informado también de estudios que se refieren al uso potencial de ramatroban en la prevención de la restenosis (véase Ishizuka et al, J. Cardiovasc. Pharmacol., 41, 571-8 (2003) y Vascular Disease Prevention, 3, 143 (2006)).

15 [0014] El uso de productos de combinación que comprenden, específicamente, pemirolast y ramatroban no se ha descrito en ninguno de los documentos mencionados anteriormente. Además, el uso de tales productos de combinación en el tratamiento de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, especialmente en aquellos pacientes con síndrome coronario agudo, no se describe en ninguno de estos documentos.

Descripción de la Invención

[0015] De acuerdo con la invención, se proporciona un producto de combinación que comprende:

(a) pemirolast, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y

(b) ramatroban, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,

20 cuyos productos de combinación se denominan en lo sucesivo como "los productos de combinación de acuerdo con la invención".

25 [0016] Sales farmacéuticamente aceptables que se pueden mencionar incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Estas sales pueden formarse por medios convencionales, por ejemplo por reacción una forma de ácido libre o base libre de un ingrediente activo con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiado, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el que la sal es insoluble, seguido de la eliminación de dicho disolvente, o dicho medio, utilizando técnicas estándar (por ejemplo, en vacío, por liofilización o por filtración). Las sales también pueden ser preparadas mediante un procedimiento de intercambio de un contra-ión de un ingrediente activo en forma de sal con otro contra-ión, por ejemplo usando una resina de intercambio iónico adecuada.

[0017] Las sales preferidas de pemirolast incluyen pemirolast sódico y, más preferiblemente, pemirolast potásico.

30 [0018] Los ingredientes activos que se emplean en productos de combinación de acuerdo con la invención (y en particular ramatroban) pueden ser empleados en la 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 proporción mayor que el otro. Por ejemplo, se pueden emplear 35 enantiómeros (por ejemplo, de ramatroban) con purezas ópticas (exceso enantiomérico; ee) superiores a 90%. Los enantiómeros preferidos de ramatroban incluyen el R-enantiómero.

40 [0019] Los productos de combinación de acuerdo con la invención estipulan la administración de pemirolast según se ha definido antes en asociación con ramatroban según se ha definido antes, y por tanto pueden presentarse bien como formulaciones separadas, donde al menos una de esas formulaciones comprende pemirolast, y al menos una comprende ramatroban, o se pueden presentar (es decir, formular) como una preparación combinada (es decir, presentada como una sola formulación que incluye pemirolast y ramatroban).

[0020] De este modo, se proporciona además:

45 (1) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; ramatroban, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, diluyente o vehículo (cuya formulación se denominará en lo sucesivo como una "preparación combinada"); y

(2) un kit de partes compuesto por:

50 (A) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclado con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y

(B) una formulación farmacéutica que incluye ramatroban, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclado con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

cuyos componentes (A) y (B) se proporcionan cada uno en una forma adecuada para la administración conjunta con el otro.

5 [0021] Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para fabricar un kit de partes según antes se ha definido, método que comprende poner un componente (A), según se define más arriba, en asociación con el otro componente (B), según se define más arriba, haciendo así a los dos componentes adecuados para la administración conjunta de ambos.

10 [0022] Poner cada uno de los dos componentes "en asociación con" el otro, incluye que los componentes (A) y (B) del kit de partes se pueden:

(i) proporcionar como formulaciones separadas (es decir independientemente la una de la otra), que posteriormente se ponen juntas para el uso conjunto de cada una con la otra en terapia de combinación; o

(ii) envasar y presentar juntos como componentes separados de un "paquete de combinación" para el uso conjunto del uno con el otro en terapia de combinación.

15 [0023] De este modo, 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 usar ese componente de forma conjunta con el otro de los dos componentes.

20 [0024] Los kits de piezas descritos aquí pueden comprender más de una formulación incluyendo una cantidad/dosis adecuada de pemirolast/sal/solvato y/o más de una formulación que incluye una cantidad/dosis apropiada de ramatroban/sal/solvato, con el fin de prever dosificaciones repetidas. Si más de una formulación (que comprende cualquiera de los principios activos) está presente, tales formulaciones puede ser las mismas, o pueden ser diferentes en términos de la dosis de cualquiera de los compuestos, composición (es) químicas y/o forma(s) física(s).

25 [0025] Los productos de combinación de acuerdo con la invención tienen utilidad en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Las afecciones inflamatorias se caracterizan por la activación de mecanismos de la defensa inmune, dando como resultado un efecto que es más perjudicial que beneficioso para el huésped. Tales afecciones están generalmente asociadas con diversos grados de enrojecimiento del tejido o hiperemia, hinchazón, hipertermia, dolor, picor, muerte celular y destrucción del tejido, proliferación celular, y/o pérdida de función. Las afecciones inflamatorias que pueden ser mencionadas incluyen cistitis, prostatitis, complicaciones vasculares del diabético, migraña, y, más preferiblemente, alergia (incluyendo conjuntivitis alérgica y rinitis alérgica), espondilitis anquilosante, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis de contacto, artritis gotosa, enfermedad inflamatoria intestinal (como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, osteoartritis, pancreatitis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, tendinitis, bursitis, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, uveítis, urticaria, vasculitis, aterosclerosis asociada a trastornos cardiovasculares.

30 Enfermedades que pueden ser mencionadas incluyen migraña y, más preferiblemente, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, y, más particularmente, aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociado.

40 [0026] El término "aterosclerosis" se entenderá por los expertos en la técnica como cualquier enfermedad caracterizada por acumulación de colesterol en un vaso sanguíneo, especialmente la pared arterial, formación de células espumosas, inflamación y proliferación celular. Los trastornos cardiovasculares "asociados con" aterosclerosis incluyen aneurismas de la aorta (incluyendo aneurisma abdominal y/o de aorta aterosclerótica) y, más preferiblemente, arteriosclerosis, enfermedad arterial oclusiva periférica, 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 enfermedad isquémica del corazón), y también pueden incluir la rotura y/o inestabilidad de la placa o ateroma, enfermedad vascular o arterial, enfermedad isquémica / isquemia y accidente cerebrovascular (incluyendo accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio).

45

50 [0027] Los grupos de pacientes que pueden mencionarse, incluyen aquellos con síndromes coronarios agudos. El término "síndrome coronario agudo" se entiende por la persona experta que incluye cualquier estado anormal miocárdico e isquémico, con frecuencia pero no exclusivamente asociado con, por ejemplo el desarrollo de, dolor en el pecho (por ejemplo, de naturaleza cardíaca) y/o electrocardiograma anormal (ECG). Estos síndromes son la presentación más común de infarto de miocardio (ataque cardíaco). La persona experta apreciará que el término es en gran parte sinónimo del término "angina inestable", en oposición a "angina estable" (es decir, angina de pecho que se desarrolla durante el esfuerzo y se resuelve en reposo). La angina de esfuerzo que se produce con tasa de

empeoramiento ("angina crescendo") será considerada de manera similar por el experto en la materia dentro de la definición de "inestable".

[0028] Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un uso de un producto de combinación de acuerdo con la invención en un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio, y en particular aterosclerosis y/o un trastorno cardiovascular asociado, cuyo método comprende la administración de tal producto de combinación a un paciente que necesita dicho tratamiento.

[0029] Para evitar dudas, en el contexto de la presente invención, los términos "tratamiento", "terapia" y "método terapéutico" incluyen el tratamiento terapéutico o paliativo a un paciente que los necesita, así como el tratamiento profiláctico y/o diagnóstico de los pacientes que son susceptibles de enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.

[0030] Con respecto a los kits de piezas tal como se describe en este documento, por "administración conjuntamente con", incluimos que las formulaciones respectivas que comprenden pemirolast (o sal / solvato del mismo) y ramatroban (o sal / solvato del mismo) se administran, secuencialmente, separadamente y/o simultáneamente, durante el curso del tratamiento de la afección pertinente.

[0031] Así, con respecto al producto de combinación de acuerdo con la invención, el término "administración conjuntamente con" incluye que los dos componentes del producto de combinación (pemirolast y ramatroban) se administran (opcionalmente de manera repetida), bien juntos o lo suficientemente próximos en el tiempo para que haya un efecto beneficioso para el paciente, que es mayor, en el transcurso del tratamiento de la enfermedad pertinente, que si cualquiera de las dos formulaciones, pemirolast o ramatroban, se administran (opcionalmente de manera repetida) solas, en ausencia del otro componente, durante el mismo curso de tratamiento. La determinación de si una combinación proporciona un efecto beneficioso mayor en relación con, y en el transcurso del tratamiento de, una afección particular, dependerá de la enfermedad a tratar o prevenir, pero se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.

[0032] Además, en el contexto de un kit de partes de acuerdo con la invención, el término "conjuntamente con" incluye que una u otra de las dos formulaciones se puede administrar (opcionalmente de manera repetida) antes de, después, y/o al mismo tiempo que, la administración con el otro componente. Cuando se utiliza en este contexto, los términos "administrado simultáneamente" y "administrado al mismo tiempo que" incluyen que las dosis individuales de pemirolast y ramatroban se administran dentro de 48 horas (por ejemplo 24 horas entre uno y otro).

[0033] "Pacientes" incluyen pacientes mamíferos (incluyendo humanos).

[0034] De acuerdo con la invención, se administran preferiblemente pemirolast y ramatroban de forma local o sistémica, por ejemplo por vía oral, intravenosa o intraarterial (incluyendo por stent intravascular y otros dispositivos o formas de dosificación perivasculares), intramuscular, cutánea, subcutánea, transmucosal (por ejemplo, por vía sublingual o bucal), rectal, transdérmica, nasal, pulmonar, (por ejemplo, traqueal o bronquial), tópica, o cualquier otra vía parenteral, en la forma de una preparación farmacéutica que comprende el compuesto (s) en forma(s) de dosificación farmacéuticamente aceptable). Las modalidades preferidas de presentación incluyen por vía oral (en particular), por vía intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular o intraperitoneal.

[0035] Pemirolast y ramatroban generalmente se administrarán juntos o por separado en forma de una o más formulaciones farmacéuticas mezcladas con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser seleccionado teniendo en cuenta la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser químicamente inertes a los compuestos activos y pueden no presentar efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además proporcionar una liberación inmediata, o modificada, de uno u otro principio activo, ya sea administrado conjuntamente en una preparación combinada o en formato de un kit de partes.

[0036] Formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden estar disponibles comercialmente o si no se describen en la literatura, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) and Martindale - The Complete Drug Reference (34th Edition) y los documentos allí referidos. De otra forma, la preparación de formulaciones adecuadas, y en particular preparaciones combinadas incluyendo ambos pemirolast y ramatroban se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.

[0037] 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 se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.

[0038] Dependiendo del trastorno, y del paciente a tratar, así como de la vía de administración, los ingredientes activos se pueden administrar en diferentes dosis terapéuticamente efectivas a un paciente que lo necesita.

- [0039] Sin embargo, la dosis administrada a un mamífero, particularmente un humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para producir una respuesta terapéutica en el mamífero durante un tiempo razonable. Un experto en la técnica reconocerá que la selección de la dosis y composición exactas y la pauta de administración más adecuada también se verá influida, por entre otras cosas las propiedades farmacológicas de la formulación, la naturaleza y severidad de la enfermedad a tratar, la condición física y la agudeza mental del receptor, así como la potencia del compuesto específico, la edad, estado, peso corporal, sexo y respuesta del paciente a tratar, y la etapa / gravedad de la enfermedad, así como de las diferencias genéticas entre los pacientes.
- [0040] La administración de los ingredientes activos puede ser continua o intermitente (por ejemplo, mediante inyección en bolo). La dosificación también puede ser determinada por los tiempos y frecuencia de administración.
- [0041] Las dosis adecuadas de ingredientes activos incluyen las mencionadas en la literatura médica, como Martindale - The Complete Drug Reference (34^a Edición) y los documentos a que se refieren. Las dosis adecuadas de los ingredientes activos están por tanto, en el intervalo de cerca de 0,01 mg/kg de peso corporal a 1.000 mg/kg de peso corporal. Los intervalos preferidos son cerca de 0,1 mg / kg a cerca de 20 mg / kg, tal como cerca de 1 mg / kg a cerca de 10 mg / kg al día, cuando se administran por vía oral.
- [0042] Sin embargo, son conocidas dosis adecuadas de pemirolast son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, límites inferiores adecuados de los intervalos de dosis diarias son unos 2 mg, por ejemplo cerca de 5 mg, tal como cerca de 10 mg, y más preferiblemente cerca de 20 mg; y los límites superiores de los intervalos de dosis diarias son cerca de 200 mg, por ejemplo cerca de 100 mg, tal como cerca de 80 mg, y más preferiblemente cerca de 50 mg, tal como cerca de 5 mg y cerca de 40 mg, y preferiblemente cerca de 10 mg y cerca de 30 mg. Las dosis individuales adecuadas pueden ser de cerca de 20 mg, o cerca de 40 mg, por día. Los anteriores intervalos de dosis/dosificación son todos independientes de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como se ha descrito anteriormente.
- [0043] Del mismo modo, las dosis adecuadas de ramatroban son conocidas por los expertos en la técnica. Las dosis perorales están por tanto en el intervalo de cerca de 0,5 mg a cerca de 400 mg, tal como cerca de 2 mg a cerca de 200 mg, preferiblemente cerca de 20 mg a cerca de 150 mg, por ejemplo cerca de 80 mg (por ejemplo, 100 mg) a cerca de 150 mg, por día, con independencia de si la formulación empleada es una preparación combinada o kit de partes como se ha descrito anteriormente.
- [0044] En cualquier caso, el médico, u otra persona experta, podrá determinar rutinariamente la dosificación real, que será la más adecuada para cada paciente. Las dosificaciones antes mencionadas son ejemplos de un caso medio; puede, por supuesto, ejemplos individuales en los que se consideren intervalos de dosificación mayores o menores, y tales intervalos están dentro del alcance de esta invención.
- [0045] Siempre que la palabra "cerca de" se emplea 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 $\pm 1\%$) de los números especificados en este documento.
- [0046] El producto de combinación descrito en este documento puede tener la ventaja de que, en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente, puede ser más conveniente para el médico y/o del paciente que, ser más eficaz que, ser menos tóxico que, tener una actividad de mayor alcance que, ser más potente que, producir menos efectos secundarios que, o puede tener otras propiedades farmacológicas útiles respecto a, tratamientos similares conocidos en la técnica para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios (tales como aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares asociadas) u otros.
- [0047] La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.
- Ejemplos
- Ejemplo 1**
- Ensayos de Liberación de Mediador Inflamatorio de Células MonoMac-6**
- [0048] Las células MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al, Int.. J. Cancer, 41, 456 (1988)) son cultivadas (37°C / $5\% \text{CO}_2$) en medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio 1 mM, 1 x aminoácidos no esenciales, 1-100 μg / ml de insulina, ácido oxalacético 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μg / ml de estreptomycin y suero bovino fetal 10% (v / v). Para diferenciación, se añaden TGF β (2 ng / ml) y $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 nM), por lo general durante unos 2-4 días.
- [0049] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), se incuban células MM6 diferenciadas o no diferenciadas (a $1-15 \times 10^6/\text{mL}$; 0,5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con ácido araquidónico 25-50 μM y ionóforo de calcio A23187 2-10 μM (también se puede utilizar A23187 sin ácido araquidónico). Las células MM6 también pueden ser estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido

araquidónico como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de MM6 citadas anteriormente también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación MM6:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se paran con dos volúmenes de metanol frío y se añade la prostaglandina B₂ (PGB₂) 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 se ajusta a 3-4. Se extraen metabolitos de ácido araquidónico del sobrenadante en columnas de fase sólida C18 preacondicionadas (1 ml de metanol seguido de 1 ml de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyen con metanol, tras lo cual se añade un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL de H₂O (pueden utilizarse también otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8x10 se eluye con metanol/acetonitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0,01 v / v) a 1,2 ml / min. La absorbancia del eluato se monitoriza a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir LTB₄ de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s) del equipo. Usando los kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes procedentes de las incubaciones/estimulaciones de MM6 anteriores pueden también analizarse con respecto al contenido de los mediadores de inflamación tales como prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂).

[0050] Se preparan soluciones madre de pemirolast y ramatroban en etanol, DMSO, N-metil-2-pirrolidona, PEG 400, propilenglicol y/o agua desionizada o solución salina fisiológica, con sonicación, calentando y ajustando el pH como sea necesario (también se pueden usar otros vehículos). Las células se incuban (a 37°C/5% de CO₂ en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 para la liberación de mediadores de la inflamación (los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de MM6). Los fármacos son añadidos para alcanzar unas concentraciones finales de 1 µM a 100 µM (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos).

[0051] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias como IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, se incuban células MM6 diferenciadas o no diferenciadas (1-10 x 10⁶/mL) (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un 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 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo de calcio A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de MM6 también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación MM6:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incuban (a 37°C/5% de CO₂ en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo; como antes respecto a soluciones madre y concentraciones) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de MM6). Después de centrifugar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquinas y quimiocinas humanas en los sobrenadantes son cuantificadas por Citometría de Matriz de Bolas (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar los kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citoquinas y quimiocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). Los sedimentos celulares se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 2

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de células de Sangre periférica humana

[0052] Células mononucleares (PBMC) o células polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica humana fueron aisladas con Lymphoprep o separación por Ficoll-Paque (con o sin separación con Polymorphoprep y/o sedimentación con dextrano) a partir de sangre de donantes sanos usando los protocolos establecidos.

[0053] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio se incuban leucotrieno B₄ (LTB₄), PBMC o PMN (de 1-15 x 10⁶/mL; 0,5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y ionóforo de calcio 2-10 µM A23187 (A23187 también se puede utilizar sin ácido araquidónico). Los PBMC o PMN pueden también estimularse con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN citadas anteriormente también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación PBMC/PMN: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se paran con dos volúmenes de metanol frío y se añade prostaglandina B₂ (PGB₂) 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 se ajusta a 3-4. Se extraen los metabolitos del ácido araquidónico del

sobrenadante en columnas C18 de fase sólida preacondicionadas (1 ml de metanol seguido de 1 ml de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyen con metanol, tras lo cual se añade un volumen de agua al eluato. Los metabolitos se eluyeron con metanol, tras lo cual se añade un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL de H₂O (también pueden utilizarse otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8x10 se eluye con etanol/acetonitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0,01 v / v) a 1,2 ml / min. La absorbancia del eluato se controla a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir LTB₄ de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s) del equipo. Usando kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes procedentes de las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN anteriores pueden también analizarse respecto al contenido de los mediadores de inflamación prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 0-10%) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para liberación de mediadores de inflamación (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones madre y concentraciones de los fármacos (los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de PBMC/PMN). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos.

[0054] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, CMSP/PMN (en 1-10 x 10⁶/mL) se incuban (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un 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 PBMC/PMN también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo del calcio A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC / NMP también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación PBMC/PMN: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incuban (a 37°C/5% de CO₂ en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo; como anteriormente) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para la liberación de citocina/quimiocina (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de PBMC/PMN. Después de centrifugar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquina y quimiocina humanas del sobrenadante son cuantificadas por Citometría de Matriz de Bolas (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citoquinas y quimiocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). Los sedimentos celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de mastocitos de ratón

[0055] Mastocitos de ratón (MMC) derivados de células de médula ósea se obtienen por cultivo de células de médula ósea de ratones C57BL/6. Las células de médula ósea (de fémures de ratón lavados con PBS) se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en 10% WEHI-3 o RPMI 1640 condicionado enriquecido en X-63, suplementado con suero fetal bovino 10%, inactivado por calor, 4 mM de L-glutamina, 50 µM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato sódico, 0,1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM Hepes y 100 µg/ml de penicilina / estreptomycin. El desarrollo de los mastocitos (se crecen en suspensión) se confirma por la expresión de Kit (por citometría de flujo) en la superficie celular y/o por tinción con azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

[0056] Se obtienen mastocitos de ratón de tejido conectivo (de tipo TC) derivados de células de médula ósea por cultivo de células de médula ósea de ratones C57BL/6. Las células de médula ósea se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI-1640 que contiene FCS 10% filtrado, 4 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin, 0,1 mM MEM aminoácidos no esenciales y 50 µM 2-ME, suplementado con 50 ng/ml factor recombinante murino de células madre y 1 ng/ml de recombinante murino IL-4. El desarrollo de los mastocitos se confirma por la expresión de Kit (por citometría de flujo) en la superficie celular y/o por tinción con azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

[0057] Pueden también utilizarse líneas celulares de mastocitos de ratones MC/9 (obtenidos de ATCC, Producto nº CRL-8306) y C1.MC/C57.1 (Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9175 (1987)). Las células MC/9 se cultivan de acuerdo con las instrucciones de ATCC (<http://www.atcc.org>), y las células C1.MC/C57.1 se cultivan según se describe en Rumsaeng et al (J. Immunol. 158, 1353 (1997)).

[0058] Para la activación / estimulación por reticulación del receptor de IgE, los mastocitos cultivados son inicialmente sensibilizados durante 90 minutos a 37°C (5% CO₂) con un anticuerpo IgE monoclonal de ratón anti-TNP (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.), utilizado como un sobrenadante de hibridoma 15%. Las células que

se utilizarán en los ensayos de liberación de N-acetilbeta-D-hexosaminidasa (o histamina) o citoquina/quimiocina (véase más adelante) se someten después a dos lavados con PBS y se resuspenden en medio RPMI-1640 suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) 0,2% (Sigma) antes de que las células (en $0.5-10 \times 10^6/\text{mL}$) se activen por adición de 100 ng/ml de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) con una relación de acoplamiento de 9/1. El periodo de incubación ($37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%) con el TNP-BSA es de 30 minutos para el análisis de liberación de beta-hexosaminidasa (o histamina) y 6-24 horas para el análisis de la liberación de citoquina y quimiocina. Las células se incuban ($37^\circ\text{C} / \text{CO}_2$ 5%) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) de 1 minuto a 24 horas antes de la adición de TNP-BSA (véase el Ejemplo 1 anterior para los detalles sobre las soluciones madre de fármacos y concentraciones; el fármaco(s) de ensayo también se puede añadir simultáneamente con la estimulación de TNP-BSA). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Después de las incubaciones o estimulaciones, las muestras se centrifugan y los sobrenadantes se analizan respecto al contenido de beta-hexosaminidasa (o histamina) y/o citoquina y quimiocina como se describe a continuación. Los sedimentos celulares se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12 más adelante).

[0059] Para la detección de la liberación IgE-dependiente de la enzima beta-hexosaminidasa de los mastocitos granulares, se utiliza un ensayo enzimático colorimétrico. Se transfiere 60 μL de cada sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se mezcla con un volumen igual de solución de sustrato (7,5 mM de p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glucosaminida disuelto en 80 mM de ácido cítrico, pH 4,5). La mezcla se incuba sobre una plataforma oscilante durante 2 horas a 37°C . Después de 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 usando un lector de microplacas Emax Precision (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La liberación de beta-hexosaminidasase expresa como un porcentaje de la beta-hexosaminidasa total determinada después de la lisis celular. Para la detección de la liberación IgE-dependiente de histamina de mastocitos granulares, se utilizan kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) disponibles comercialmente para medir histamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s).

[0060] Para la detección de la liberación IgE-dependiente de citoquinas y quimiocinas de mastocitos de ratón como la IL-6, IL-4, el TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, la IL-12p70, IFN γ , se usa Citometría de Matriz de Bolas (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citoquinas y quimiocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s).

[0061] Además de los experimentos de mastocitos anteriores, también se pueden estudiar los efectos inhibidores de mastocitos del fármaco de ensayo (s) (como arriba) utilizando enfoques experimentales y ensayos bien establecidos y documentados para analizar la liberación inducida (por ejemplo, con 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 a partir de mastocitos recién aislados del líquido peritoneal de rata o ratón.

Ejemplo 4

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de células RAW 264.7

[0062] Se cultivan células RAW 264.7 ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$) en DMEM, suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y suero fetal bovino 10%. [0063] Para estimular la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias como IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ , las células RAW 264.7 (en $1-10 \times 10^6/\text{mL}$) se incuban ($37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%) durante 4-24 horas (en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un 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 RAW 264.7 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo del calcio A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de RAW 264.7 también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas de ratón o humanas (de sangre de un donante sano) con una relación RAW 264.7: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incuban (a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5% en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo; como anteriormente respecto a las soluciones madre y concentraciones) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de RAW 264.7 para la liberación de citoquinas / quimiocinas (véase el Ejemplo 1 anterior para los detalles sobre soluciones madre de fármacos y concentraciones; el fármaco(s) de ensayo también se puede añadir simultáneamente con la estimulación de RAW 264.7). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Después de centrifugar las células después de las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquinas y quimiocinas de ratón del sobrenadantes son cuantificadas por Citometría de Matriz de Bolas (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar los kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citoquinas y quimiocinas de acuerdo con las instrucciones del

fabricante(s). Los sedimentos celulares se almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 5

Inflamación de la pata de rata inducido por carragenano

5 [0064] Este ensayo está esencialmente de acuerdo al descrito por Winter et al (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544 (1962)). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratas macho Sprague-Dawley o Wistar con un peso aproximado 150-400 g (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) 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). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se administra una inyección subplantar de una solución al 0,5, 1,0 o 2,0% de carragenano (Tipo IV Lambda, Sigma Chemical Co.) en solución salina 0,9% en una pata trasera de ratas anestesiadas. Antes, y a intervalos indicados de 3-24 horas después de la inyección de carragenano, se mide el volumen de la pata inyectada 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 después de la inyección de carragenano, las ratas se sacrifican y se perfunden con solución salina o PBS (también se puede utilizar otro medio de perfusión). Se recogen biopsias de tejido blando plantar de las patas inflamadas, se pesan, se almacenan congeladas (las muestras para análisis de micromatrices se congelan a -80 ° C en TRIzol, Invitrogen, San Diego, CA), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), se analizan posteriormente en relación a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y/o 2) la expresión génica del tejido utilizando la tecnología de micromatrices. El tejido no inflamado de la pata de las ratas no tratadas proporciona niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas. La inflamación de la pata también puede ser inducida por inyección subplantar del compuesto 48/80 (48/80, 1-5 µg en 50-100 µl. de PBS o solución salina) (en lugar de carragenano), seguido de la medida de la hinchazón inflamatoria de la pata y la recogida de biopsias de tejido para análisis de micromatrices y/o de MPO (como anteriormente) de 30 minutos a 8 horas después de de la inyección de 48/80.

Ejemplo 6

Inflamación del oído de ratón inducida por aceite de crotón

30 [0065] Este ensayo está esencialmente de acuerdo con el descrito por Tonelli et al (Endocrinology 77, 625 (1965)) (también se pueden utilizar otras cepas de ratones). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se aplica tópicamente 10-30 µL de una solución al 2,0 o 4,0% de aceite de crotón en acetona o etanol a uno o ambos oídos. A intervalos indicados de 4-12 horas después de la aplicación del aceite de crotón, se sacrifican los animales, y las biopsias por punción de las orejas se pesan para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (también puede medirse el grosor de la oreja para determinar la hinchazón). Se recogen las biopsias de las orejas inflamadas, se almacenan congeladas (muestras para el análisis de micromatrices se congelan a -80°C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y/o 2) expresión génica del tejido utilizando tecnología de micromatrices. Las biopsias no inflamadas del oído de ratones no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 7

Inflamación del oído de ratón inducida por éster de forbol o ácido araquidónico

50 [0066] Estos ensayos están esencialmente de acuerdo con los descritos por Chang et al (Eur. J. Pharmacol. 142, 197 (1987)) (aunque también se pueden utilizar otras cepas de ratones). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratones macho o hembra. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se aplica tópicamente 1-10 µg de forbol 12-miristato 13-

acetato (PMA), acetato de tetradecanoilforbol (TPA), o 1-5 mg de ácido araquidónico en 10-30 µL de acetona o etanol a uno o ambos oídos. Después de 4-12 horas de la aplicación de PMA o TPA, y de 30 minutos a 6 horas después de la aplicación de ácido araquidónico, se sacrifican los animales, y las biopsias por punción de las orejas se pesan para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (también puede medirse el grosor de la oreja para determinar la hinchazón). Se recogen las biopsias de las orejas inflamadas, se almacenan congeladas se congelan (muestras para el análisis de micromatrices a -80°C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y/o 2) la expresión génica del tejido utilizando tecnología de micromatrices. Las biopsias no inflamadas del oído de ratones no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 8

Reacción e inflamación tisular aguda en respuesta a lesión en ratón y rata

[0067] Se utilizan ratones macho NMRI o CBA con un peso aproximado de 15-30 g, o ratas macho Wistar o Sprague-Dawley con un peso aproximado de 150-450 g (pueden utilizarse otras cepas de ratones y ratas). Se consigue lesión tisular aguda e inflamación aguda en la parte distal de la cola o una de las orejas usando un escalpelo en 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. Se administraron los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la primera dosis dada 1 minuto a 24 horas antes de la lesión tisular (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 2-48 horas después de la lesión, los animales son sacrificados y los segmentos lesionados de los tejidos se retiran, se pesan y se almacenan congelados (muestras para análisis de micromatrices se congelan a -80°C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y/o 2) expresión génica del tejido utilizando tecnología de micromatrices. Los correspondientes tejidos sin lesión/sin inflamación de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. Las reacciones tisulares e inflamación en respuesta a una lesión también puede estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 9

Reacción tisular inflamatoria aguda en respuesta a la lesión en rata

[0068] Se usan ratas macho Sprague-Dawley de 350-500 g de peso (aunque otras cepas de ratas pueden utilizarse). Los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno y se logra lesión en los tejidos e inflamación aguda en la arteria carótida común izquierda de la siguiente manera: después de la exposición quirúrgica de las arterias carótidas comunes izquierdas, externa e interna y el cierre temporal del flujo sanguíneo local con ligaduras temporales, se introdujo un catéter de balón (2-French Fogarty) a través de la arteria carótida externa y avanzó hasta la aorta. A continuación, se infla el balón con agua suficiente para distender la arteria carótida común y se retira entonces a la arteria carótida externa. Este procedimiento se repite tres veces y, a continuación se retira el catéter, se liga la carótida externa y se cierra la herida. Se administran los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la primera dosis dada 1 minuto a 24 horas antes de la lesión tisular (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 2-48 horas después de la lesión, los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno y su arteria carótida izquierda se expone. Se colocan unas pinzas en la parte más proximal de las arterias carótidas común e interna, respectivamente, y posteriormente se lava el vaso que está entre las pinzas con cuidado con solución salina estéril y/o TRIzol, se retira, se pesa, y se almacena congelado (muestras para análisis de micromatrices se congelan a -80°C en TRIzol) y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analiza respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y/o 2) expresión génica del tejido utilizando tecnología de micromatrices. Los vasos correspondientes sin lesión/sin inflamación de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. Las reacciones tisulares e inflamación en respuesta a una lesión también pueden estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 10

Acumulación de mieloperoxidasa en tejido inflamado

[0069] La enzima mieloperoxidasa (MPO) es abundante en los leucocitos neutrófilos y se suele utilizar como un marcador para la detección de la acumulación de neutrófilos en un tejido inflamado. Para determinar la acumulación de mieloperoxidasa en la inflamación en tejidos inflamados de ratón y de rata (como se describe en el Ejemplo 5-9 anteriormente), los tejidos se homogenizan en bromuro de hexadeciltrimetil-amonio 0,5%, y se congelan/descongelan. La actividad MPO del sobrenadante se determina por espectrofotometría como el cambio en la absorbancia a 650 nm (25°C) que ocurre en la reacción redox de H₂O₂-tetrametilbencidina catalizada por MPO. Los valores se expresan como unidades de MPO/mg de tejido.

Ejemplo 11

Ensayos de células musculares lisas[0070] Se aíslan células de músculo liso de aorta de rata (RASMCs) como se ha descrito anteriormente (Hedin et al, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 1977 (1997)). Las células se cultivan (37°C/CO₂ 5%) en medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino 10%, 50 µg/ml de ácido L-ascórbico, 50 µg/ml de estreptomycin, 50 UI/ml de penicilina (F-12/suero fetal bovino 10%), se cultivan a confluencia, se pasan en serie por tripsinización, y se usan en experimentos después de 2-6 pasadas. Las células RASMCs se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 4x10⁴ células por pocillo en F-12/suero fetal bovino 10% (también se pueden utilizar placas con un mayor número de pocillos por placa y un número apropiado menor de células por pocillo). Después de 24 horas, las células son sincronizadas en fase G0/G1 por privación en medio Ham F-12 suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) 0,1%, 50 µg/ml de ácido L-ascórbico, 50 µg/ml de estreptomycin y 50 UI/ml de penicilina (F-12/0. BSA 1%) durante 24-48 horas. Para estimar la síntesis de ADN, Las RASMCs privadas se estimulan bien con 10 ng/ml de IGF-1 o con suero fetal bovino 10% durante 12-48 horas (también se pueden utilizar otros mitógenos bien establecidos como PDGF). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) se añaden de 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a soluciones madre y concentraciones de los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Las células son marcadas con 1 µCi [3H] timidina durante 8 horas antes del final del periodo de estimulación. Las placas se lavan a continuación con PBS enfriado en hielo, se incuban una noche con ácido tricloroacético helado al 10% (p / v), se lisan en hidróxido sódico 0,2 M, y la radiactividad se mide en un contador de centelleo líquido. La proliferación estimulada de RASMC puede también analizarse utilizando ensayos comercialmente disponibles de proliferación celular de bromodeoxiuridina (BrdU) (por ejemplo, Cell Proliferation ELISA, BrdU, de Roche Applied Science), y el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) (ambos de acuerdo con las instrucciones del fabricante), o por recuento de células. En experimentos separados (para estudiar la expresión génica), un mayor número de células RASMCs privadas (1-5 x 10⁶ células por pocillo) se estimulan con 10 ng/ml de IGF-1 o suero fetal bovino 10% (o PDGF) como anteriormente, 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 se realizan como se describió anteriormente). Las células se recogen y se almacenan congeladas (-80°C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento por análisis de micromatrices (Véase el Ejemplo 12 más adelante).

[0071] Células del músculo liso bronquial humano (HBSMCs, Promocell, Heidelberg, Alemania) se cultivan en DMEM suplementado con FBS 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0,12 UI/ml de insulina, y con o sin 2 µg/ml de anfotericina B. Antes de los experimentos, se puede detener el crecimiento celular durante 24 horas en medio libre de insulina bajo en FBS (0.3-5%). Para estimular la formación y la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tales como IL-8 y eotaxina, se incuban HBSMCs (a 80% de confluencia, correspondiente a aproximadamente 8 x10⁵/25 cm²) en un matraz durante 24-48 horas (en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con diferentes combinaciones de IL-1 β y TNF-α (ambos a 1-50 ng/ml). Las células se incuban (a 37°C/CO₂ 5%) en DMEM con suero fetal bovino 0.3-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con ramatroban, solo pemirolast y solo ramatroban, como anteriormente) de 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de HBSMC (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a soluciones madre y concentraciones; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de HBSMC). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Después de las incubaciones/estimulaciones, se cuantifican en el sobrenadante las concentraciones de citoquina y quimiocina humana utilizando kits comercialmente disponibles de enzoinmunoensayo (Kits EIA/ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). Las células se recogen y se almacenan congeladas (-80°C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento por análisis de micromatrices (Véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 12

55 Análisis de la expresión génica

[0072] Se aísla ARN total procedente de tejidos de ratón y rata (véase Ejemplo 5 a 9, 15 y 16) utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de limpieza mediante RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) según los protocolos de los fabricantes. El ARN total de las incubaciones/estimulaciones celulares descritas en ejemplos anteriores y posteriores (mastocitos de ratón, MonoMac-6, PBMC, PMN, RAW 264.7, RASMC, HBSMC, NB4, HL-60) se aísla

utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN), con o sin Set RNasa libre de DNasa (Qiagen), según el protocolo(s) del fabricante. Dependiendo de las especies a partir de las que se originan los diferentes tejidos y células, el análisis de micromatrices se realiza utilizando GeneChip® Human Genoma U133 Plus 2,0 Array, GeneChip® Mouse Genoma 430 2.0 o Gene-Chip® Rat Genoma 230 2.0 Array, o la versión más reciente de estos chips (todos los arrays de Affymetrix, Santa Clara, CA) según los protocolos del fabricante. Los datos de micromatrices de expresión se analizan usando, por ejemplo GeneChip Operating Software (Affymetrix) and Bioconductor/R (www.bioconductor.org). Otros programas de software también se pueden utilizar.

[0073] la expresión génica de las diferentes especies también puede analizarse utilizando Human Genome Survey Microarray V2.0 (Encuesta de Microarray del Genoma Humano V2.0), Mouse Genome Survey Microarray V2.0 (Encuesta de Microarray del Genoma de Ratón V2.0) o Rat Genome Survey Microarray (Encuesta de Microarray del Genoma de Rata) (o la versión más reciente de éstos arrays) según los protocolos del fabricante Applied Biosystems (Foster City, CA). Estos datos de micromatrices de expresión se analizan utilizando, por ejemplo, un 1700 Chemiluminiscent Microarray Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) provisto con una base de datos de anotaciones Coracle®, GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y software Microarray Suite version 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix). Otros programas de software también se pueden utilizar.

[0074] La expresión génica (niveles de mRNA) se puede analizar mediante PCR cuantitativa o semicuantitativa. El análisis de la expresión génica a nivel proteico puede ser analizado mediante kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles (de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s)), o Western blot convencional y/o métodos inmunohistoquímicos.

Ejemplo 13

Ensayos de proliferación celular

[0075] La proliferación de mastocitos de ratón, células MonoMac-6, células RAW 264.7, células NB4, células HL-60 y HBSMC estimulada y no estimulada como se ha descrito en los ejemplos anteriores y posteriores (con o sin la detención del crecimiento durante 24-48 horas en 0.1-5% de suero fetal bovino antes de la adición de los fármacos de ensayo respectivos y/o los estímulos descritos en los Ejemplos anteriores y posteriores durante 24-72 horas) se mide utilizando el reactivo de la proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o los ensayos de proliferación celular de bromodesoxiuridina (BrdU) comercialmente disponible (por ejemplo, Cell Proliferation ELISA, BrdU, de Roche Applied Science), según las instrucciones del fabricante. Otros ensayos convencionales de proliferación celular también pueden utilizarse.

Ejemplo 14

Pruebas de agregación plaquetaria

[0076] La agregación de plaquetas de conejo o humanas (en plasma o sangre total rico en plaquetas) inducida por adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, colágeno o el análogo de tromboxano U-46619 se analiza mediante agregometría, por ejemplo como se describe por Bertele et al. (Eur. J. Pharmacol. 85, 331 (1982)). La agregación plaquetaria inducida (como antes descrita) puede también analizarse usando lavados de plaquetas humanas o de conejo y/o con otros métodos establecidos de agregometría u otros métodos para medir la agregación plaquetaria. El fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) se añade 1-120 minutos antes de la inducción de la agregación plaquetaria (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles con respecto a soluciones madre y concentraciones; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la inducción de la agregación plaquetaria. Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos.

Ejemplo 15

Inflamación peritoneal inducida en ratón por Zymosan y otros estímulos

[0077] Este ensayo está esencialmente de acuerdo con el descrito por Rao et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917 (1994)) (también se pueden utilizar otras cepas de ratones). Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se administra una inyección intraperitoneal de 0.5-2 mg de zymosan A (Sigma, cat. N Z4250) en 0.5-1 ml de PBS estéril (sonicado y bien mezclado). En lugar de utilizar Zymosan A, la inflamación peritoneal puede también ser inducida por una inyección intraperitoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos pro-inflamatorios bien establecidos tal como anti-IgE de ratón (con o sin pre-tratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenano, proteosa peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . El fármaco(s) de ensayo puede ser también administrado

simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otro estímulo pro-inflamatorio). Después de 2-24 horas de la inyección de zymosan (o uno o más de otros estímulos pro-inflamatorios), se sacrifican los animales. A continuación, se lava la cavidad peritoneal con 1-3 ml de un tampón de lavado (PBS helado con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades/ml de heparina). El recuento de leucocitos total y diferencial en el líquido de lavado se hace con un hemocitómetro tras una tinción con solución de Türk y/o en preparados de cytospin teñidos con May-Grunwald Giemsa o una tinción de Wright (Diff-Quik) modificada, respectivamente, por microscopía de luz utilizando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar el recuento leucocitario total y diferencial también pueden ser utilizados. El líquido de lavado restante se centrifuga (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el líquido de lavado libre de células sobrenadante se conserva congelado (-20 ° C a -80 °) hasta que se analiza el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o citocinas / 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 anteriores. El contenido de histamina en el líquido de lavado sobrenadante se determina mediante kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) disponibles comercialmente para la medir histamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). La activación inflamatoria de células peritoneales también puede ser estudiada midiendo la actividad de beta-hexosaminidasa en el líquido de lavado utilizando el ensayo para beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los sedimentos celulares del líquido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 ml 0,05 M KHPO₄ pH 6,0 con HTAB 0,5% y se almacenan congelados (-20°C a -80°) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) descrito por Rao et al.(J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Idénticos sedimentos celulares de animales separados se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA), hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con tampón de lavado, se recogen biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y/u otros órganos/tejidos intra- o retroperitoneales) de la cavidad peritoneal inflamada, se pesan, se almacenan congeladas (se congelan muestras para el análisis de micromatrices a -80°C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA) y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente se analizan en lo que respecta a la expresión génica del tejido mediante tecnología de micromatrices. Las cavidades peritoneales no inflamadas de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas y quimiocinas y expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse utilizando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas. **Ejemplo 16**

Inflamación peritoneal inducida en rata por Zymosan y otros estímulos

[0078] Se utilizan ratas macho Wistar o Sprague Dawley con un peso de aproximadamente 150-450 g. Los fármaco(s) de ensayo (pemirolast y ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) a 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 comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, se diluyen soluciones madre de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) según sea necesario en por ejemplo 0,5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se administra una inyección intraperitoneal de 1-100 mg de zymosan A (Sigma, cat. N Z4250) en 1-10 mL de PBS estéril (sonicado y bien mezclado). En lugar de utilizar Zymosan A, la inflamación peritoneal puede también ser inducida por una inyección intraperitoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos pro-inflamatorios bien establecidos tal como Anti-IgE de ratón (con o sin pre-tratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenano, proteosa peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β. El fármaco(s) de ensayo puede ser también administrado simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otro estímulo pro-inflamatorio). Después de 2-24 horas de la inyección de zymosan (o uno o más de otros estímulos pro-inflamatorios), se sacrificaron los animales. A continuación, se lava la cavidad peritoneal con 1-3 ml de un tampón de lavado (PBS helado con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades/ml de heparina). El recuento de leucocitos total y diferencial en el líquido de lavado se hizo con un hemocitómetro tras una tinción con solución de Türk y/o en preparados de cytospin teñidos con May-Grunwald Giemsa o una tinción de Wright (Diff-Quik) modificada, respectivamente, por microscopía de luz utilizando criterios morfológicos estándar. También pueden utilizarse otros métodos establecidos para determinar el recuento leucocitario total y diferencial. El líquido de lavado restante se centrifuga (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el líquido de lavado libre de células sobrenadante se conserva congelado (-20 ° C a -80 °) hasta que se analiza el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o citocinas / quimiocinas de ratón (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 anteriores. El contenido de histamina en el sobrenadante del líquido de lavado se determina mediante kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir la histamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). La activación de células peritoneales inflamatorias también puede ser estudiada midiendo la actividad de beta-hexosaminidasa en el líquido de lavado utilizando el ensayo para beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los sedimentos celulares del líquido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 ml 0,05 M KHPO₄ pH 6,0 con HTAB 0,5% y se almacenan congelados (-20°C a -80°) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) básicamente descrito por Rao et al.(J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Idénticos sedimentos celulares de animales separados se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA), hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con tampón de lavado, se recogen las biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y/u otros órganos/tejidos intra- o retroperitoneales) de la

cavidad peritoneal inflamada, se pesan, se almacenan congeladas (muestras para el análisis de micromatrices se congelan a -80 ° C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA) y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente se analizan en lo que respecta a la expresión génica del tejido mediante tecnología de micromatrices. Las cavidades peritoneales no inflamadas de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas y quimiocinas y expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales.

Ejemplo 17

Ensayos de liberación de mediador inflamatorios de células NB4 y HL-60

[0079] Se cultivan células humanas NB4 (Lanotte et al, Blood, 77, 1080(1991)) (37°C / 5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y suero fetal bovino 10% (v / v). Para diferenciación, se añade 1-5 µM de ácido all-trans-retinoico (ATRA), generalmente cada tres días.

[0080] Se cultivan células humanas HL-60 (Steinhilber et al, Biochim. Biophys. Acta 1178, 1 (1993)) (37 ° C / 5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y suero fetal bovino 10-20% (v / v). Para diferenciación, se añade ATRA (1-5 µM), DMSO (1-2%), PMA (100-500 ng / ml) o vitamina D3 (1-15 µM) durante 5 días.

[0081] Para estimular la formación y liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), se incuban células NB4 o HL-60 diferenciadas o no diferenciadas (a 1-15 x 10⁶/mL; 0,5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 10-40 µM de ácido araquidónico y/o 2-10 µM ionóforo de calcio A23187. Las células NB4 y HL-60 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), fMLP y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como anteriormente. Las incubaciones / estimulaciones de NB4 and HL-60 citadas anteriormente, también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación NB4/HL-60:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se paran con 1 mL de metanol frío y se añade prostaglandina B₂ (PGB₂) como estándar interno. Las muestras se centrifugan y los sobrenadantes se diluyen con agua para alcanzar una concentración final de metanol de 30% y el pH se ajusta a 3-4. Se extraen metabolitos del ácido araquidónico del sobrenadante columnas C18 de fase sólida preacondicionada (1 ml de metanol seguido de 1 ml de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyen con metanol, tras lo cual se añade un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL de H₂O (también pueden utilizarse otras relaciones de volumen). Una columna Waters RCM 8x10 se eluye con metanol/ acetoniitrilo/ H₂O/ ácido acético (30:35:35:0,01 v / v) a 1,2 ml / min. La absorbancia del eluato se controla a 270 nm para detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para la medir LTB₄ de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s) del equipo. Usando los kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes procedentes de las incubaciones/estimulaciones de NB4/HL-60 anteriores pueden también analizarse con respecto al contenido de los mediadores de inflamación prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células se incuban (a 37°C en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 1-20%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast combinado con ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 o HL-60 para la liberación de mediadores de inflamación (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones madre y concentraciones de los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de NB4 o HL-60). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos).

[0082] Para estimular la formación y liberación de citoquinas y quimiocinas y mediadores inflamatorios como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PAF, C5a, se incuban células NB4 o HL-60 diferenciadas o no diferenciadas (a 1-10 x 10⁶/mL) (37°C/CO₂ 5%) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un lipopolisacárido (LPS 1-100 ng/ml), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 1-100 ng/ml) o ionóforo de calcio A23187 (1-10 µM), o combinaciones de estos estímulos. Las células NB4 y HL-60 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin LPS, PMA y/o A23187 como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de las células NB4 y HL-60 también pueden llevarse a cabo en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación NB4/HL-60:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incuban (a 37°C/CO₂ 5% en medio RPMI-1640 con suplementos) con el fármaco(s) (pemirolast en combinación con ramatroban, pemirolast solo y ramatroban solo, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 o HL-60 para la liberación de citoquina/ quimiocina/ mediador (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; el fármaco(s) de ensayo se puede añadir también simultáneamente con la estimulación de NB4/HL-60. Después de centrifugar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citoquina / quimiocina y mediador humano en los sobrenadantes son cuantificadas por Citometría de Matriz de Bolas (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar kits de enzimoimmunoensayo (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir las citoquinas / quimiocinas y mediadores de acuerdo con las instrucciones del fabricante(s). Los sedimentos celulares se

almacenan congelados (-80°C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de micromatrices (véase el Ejemplo 12 más adelante).

[0083] Además de estudiar los efectos de los fármacos anteriores en la liberación de mediadores de quimioquinas/citoquinas o de células NB4-tipo neutrófilos y HL-60, los efectos de los fármacos sobre la adhesión y/o migración espontánea o estimulada de estas células también pueden ser analizados (también se pueden utilizar células polimorfonucleares sanguíneas humanas recién aisladas (PMN) aisladas de acuerdo con protocolos estándar). La adhesión espontánea o estimulada (con fMLP, IL-8, PAF, LTB₄ u otros factores relevantes para la activación de PMN) de los PMN u otras células tipo neutrófilos como por ejemplo, células endoteliales cultivadas o superficies artificiales recubiertas de proteína se estudian mediante enfoques experimentales y ensayos bien establecidos y documentados. La migración (estimulada con fMLP, IL-8, el PAF, LTB₄ u otros factores pertinentes de quimiotaxis de PMN) de los PMN o células tipo neutrófilos se estudian mediante métodos experimentales y ensayos establecidos y documentados, por ejemplo, migración a través de membranas recubiertas de proteínas comercialmente disponibles diseñadas para tales estudios de migración.

Ejemplo 18

15 Inhibición de la expresión de MIP-2 por Pemirolast y Ramatroban

[0084] Se usan ratas macho Sprague-Dawley de 370-430 g de peso. Los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno y la lesión en los tejidos y la inflamación aguda se logró en la arteria carótida común izquierda de la siguiente manera: después de exposición quirúrgica de las arterias carótida comunes izquierdas externa e interna y el cierre temporal del flujo sanguíneo local, un catéter de balón (2-French Fogarty) se introdujo a través de la arteria carótida externa y avanzó hasta la aorta. A continuación, se infló el balón con agua suficiente para distender la arteria carótida común y fue retirado entonces de nuevo a la arteria carótida externa. Este procedimiento se repitió tres veces y, a continuación se retiró el catéter y se cerró la herida. Los fármaco (s) de ensayo (5 mg/kg pemirolast y 5 mg/kg ramatroban, 5 mg/kg pemirolast solo y 5 mg/kg ramatroban solo) se administraron por vía subcutánea 60 minutos antes de la lesión tisular. Había 3 ratas en cada uno de estos tres grupos de tratamiento de fármacos. Un grupo de tratamiento de control de 3 ratas recibió solución salina por vía subcutánea 60 minutos antes de la lesión tisular.

[0085] Soluciones de pemirolast mg/ml (sal de potasio comprado de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, EE.UU.) y ramatroban 2,5 mg/ml (comprado de Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.) fueron preparadas en solución salina, con sonicación, calentamiento y, para ramatroban, ajustando el pH (por adición de un equivalente acuoso de NaOH) según sea necesario. La solución final de ramatroban tenía un pH de aproximadamente 7,5.

[0086] 8 horas después de la lesión, los animales se anestesiaron con isoflurano en oxígeno y su arteria carótida izquierda fue expuesta. Se colocó una pinza en la parte más proximal de las arterias carótidas común e interna, respectivamente, y posteriormente se lavó cuidadosamente el vaso entre las pinzas con cuidado con solución salina estéril, se retiró, y se almacenó congelado -80°C en TRIzol, y, como se describe más adelante, posteriormente se analizó respecto a la expresión génica del tejido utilizando tecnología de micromatriz.

[0087] Se aisló ARN total procedente de tejidos de rata (homogeneizados) utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de limpieza mediante RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con los protocolos del fabricante (ARN amplificado y etiquetado según el protocolo de diana de dos ciclos). El análisis de micromatrices se realizó utilizando Gene-Chip® Rat Genome 230 2.0 Array, (Affymetrix, Santa Clara, CA) según los protocolos del fabricante. Los datos de expresión de micromatrices se analizaron usando GeneChip Operating Software (Affymetrix) y Bioconductor/R (www.bioconductor.org). En todas las muestras de tejido, los valores de factor de escala de parámetros, el número de proporción presente y GAPDH estaban dentro de los intervalos recomendados por el fabricante Affymetrix.

[0088] La proteína -2 inflamatoria de macrófago (MIP-2), también designada quimiocina (motivo C-X-C) de ligando 2 (CXCL2), es una quimiocina pro-inflamatoria potente. Los niveles de expresión génica de MIP-2 en los cuatro grupos de tratamiento diferentes se compararon mediante comparación de la intensidad de señal media normalizada del conjunto de sonda MIP-2 ("intensidad de señal MIP-2 ") de cada uno de los cuatro grupos de 3 animales (la señal intensidad, que se expresa como un valor numérico, está directamente relacionada con el nivel de expresión de un gen, y el valor p para cada señal conjunto-sonda individual para MIP-2 era inferior a 0,01 en todos los 12 animales). En el grupo de control tratado con solución salina, la media de intensidad de señal de MIP-2 era 203. En los animales tratados con ambos ramatroban y pemirolast, la correspondiente intensidad media de señal de MIP-2 fue 48, es decir, en comparación con el grupo de control, el tratamiento combinado con ramatroban y pemirolast redujo el MIP-2 de la expresión génica en aproximadamente un 75%. Para comparación, la correspondiente intensidad media de señal de MIP-2 era 326 en el grupo tratado con ramatroban sólo y 710 en el grupo tratado con pemirolast sólo, es decir, en contraste con el tratamiento combinado con ramatroban más pemirolast, sólo ramatroban o sólo pemirolast, no se redujeron los niveles MIP-2 de expresión génica. Por lo tanto, ramatroban y pemirolast en combinación sinérgica inhiben la expresión vascular de MIP-2.

Ejemplo 19**Inhibición de la expresión de PDGF por Pemirolast y Ramatroban**

[0089] Se llevaron a cabo pasos preparatorios equivalentes a los descritos en el Ejemplo 18.

[0090] El factor de crecimiento derivado de plaquetas juega un papel en, por ejemplo, la proliferación celular y la migración celular y ha sido relacionado con varias enfermedades, incluyendo aterosclerosis y fibrosis. Los niveles de expresión de genes del factor de crecimiento derivado de plaquetas, alfa (PDGFa) en los cuatro diferentes grupos de tratamiento se compararon mediante comparación de la media normalizada de las intensidades de señal del conjunto-sonda PDGFa ("intensidad de señal PDGFa") de cada uno de los cuatro grupos de 3 animales (la intensidad de señal, que se expresa como un valor numérico, está directamente relacionada con el nivel de expresión de un gen, y el valor p para cada individuo conjunto-sonda de señales para PDGFa fue inferior a 0,01 en todos los 12 animales). En el grupo de control tratado con solución salina, la intensidad de señal media PDGFa fue 528. En los animales tratados con ambos ramatroban y pemirolast, la intensidad de la señal PDGFa media correspondiente fue 392, es decir, en comparación con el grupo control, el tratamiento combinado con ramatroban y pemirolast redujo el PDGFa de la expresión génica aproximadamente un 26%. Para comparación, la intensidad de la señal PDGFa media correspondiente era 566 en el grupo tratado con ramatroban solo y 800 en el grupo tratado con pemirolast solo, es decir, en contraste con el tratamiento combinado con ramatroban más pemirolast, sólo ramatroban o sólo pemirolast, no se redujeron los niveles de expresión génica de PDGFa. Por lo tanto, ramatroban y pemirolast en combinación sinérgica inhiben la expresión vascular de PDGFa.

Ejemplo 20**Inhibición de la proliferación de macrófagos por Pemirolast y Ramatroban**

[0091] Se cultivaron células de la línea celular de macrófagos humanos MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) (37°C/CO₂ 5%) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 1 x aminoácidos no esenciales, 1-100 µg/ml de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y suero fetal bovino 10% (v/v). Al inicio del experimento, se sembraron células MM6 en placas de 96 pocillos, a una densidad de 1x10⁵ células/ml (100 µl por pocillo). La proliferación de células MM6 se midió usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o por recuento celular utilizando un microscopio. El reactivo WST-1 está diseñado para ser utilizado para cuantificación espectrofotométrica de, por ejemplo, crecimiento celular en ensayos de proliferación y se utilizó según las instrucciones del fabricante. La longitud de onda para la medida de la absorbancia fue 450 nm y la absorbancia de todas las células de control no tratadas expuestas al reactivo WST-1 fue entre 0,9 y 2,4. Se hicieron en solución salina estéril soluciones madre de pemirolast (sal de potasio comprado de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, Estados Unidos) y ramatroban (comprado a Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Estados Unidos, como ácido libre y transferido a la sal sódica por adición de un equivalente de NaOH acuoso).

[0092] Se encontró que las células MM6 no tratadas aumentaron de 1x10⁵ células/ml al inicio del experimento a 1.4x10⁵ ± 0.06x10⁵ células/ml y 2.3x10⁵ ± 0.10x10⁵ células/ml después de 24 y 48 horas, respectivamente (valores medios ± d.e., n = 4 para cada uno de los tres puntos de tiempo). Los efectos de pemirolast, y/o ramatroban (añadido al comienzo de los experimentos) sobre la proliferación celular de MM6 se estudiaron 48 horas después del inicio de los experimentos utilizando el reactivo WST-1 antes mencionado.

[0093] El tratamiento de células MM6 con ramatroban en una concentración final de 100 µM dio lugar a una inhibición de 16,8% de la proliferación de MM6 (valor medio, n = 5) (10µM de ramatroban tenían un efecto inhibitor que era menor que el de 100 µM de ramatroban, n = 5, datos no mostrados). Por comparación, el tratamiento de las células MM6 con pemirolast en concentración final de 100 µM dio lugar a una inhibición media de 9,4% de la proliferación (n = 5) (10 µM de pemirolast tenían un efecto inhibitor muy similar a 100 µM de pemirolast, n = 5, datos no mostrados). Cuando las células MM6 fueron tratadas con una combinación de 100 µM de pemirolast y 100 µM de ramatroban, la proliferación de MM6 se redujo de forma sinérgica en un 39,5% (valor medio, n = 5). En otras palabras, en comparación con el 16,8% de inhibición causada por ramatroban solo (véase más arriba), el tratamiento con 100 µM ramatroban en presencia de 100 µM de pemirolast provocó una inhibición sinérgica de 33,2% de la proliferación de MM6 en comparación con el tratamiento con 100 µM de pemirolast solo.

[0094] Uno o más de los ejemplos descritos anteriormente demuestran un claro efecto sinérgico de la combinación de pemirolast y ramatroban. Dicha combinación es por tanto útil en el tratamiento de trastornos inflamatorios, incluyendo la aterosclerosis y enfermedades relacionadas.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de combinación que comprende:
 - (a) pemirolast, o una sal o solvato del mismo aceptable farmacéuticamente, y
 - (b) ramatroban, o una sal o solvato del mismo aceptable farmacéuticamente.
- 5 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; ramatroban 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 que comprende componentes:
 - (A) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, mezclado con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y
 - (B) una formulación farmacéutica que incluye ramatroban, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, mezclado con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 cada uno de cuyos componentes (A) y (B) está proporcionado en una forma que es adecuada para la administración conjunta con el otro.
4. Un método para fabricar un kit de partes como se define en la reivindicación 3, cuyo método comprende poner un componente (A) en asociación con un componente (B), haciendo así a los dos componentes adecuados para la administración conjunta de cada uno con el otro.
- 20 5. Un kit de partes que comprende:
 - (I) uno de los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 3; junto con
 - (II) instrucciones para usar ese componente de forma conjunta con el otro de los dos componentes.
- 25 6. Un kit de partes tal como se reivindica en cualquiera de la Reivindicación 3 o Reivindicación 5, en el que los componentes (A) y (B) son adecuados para uso secuencial, separado y/o simultáneo en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
7. El uso de un producto de combinación tal como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, 5 o 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio
8. Un producto de combinación tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5 o 6 para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
- 30 9. El uso de componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 3 o Reivindicación 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo método comprende administrar conjuntamente dichos componentes (A) y (B) a un paciente en terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio.
- 35 10. Los componentes (A) y (B) como se definen en la Reivindicación 3 o Reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo método comprende administrar conjuntamente dichos componentes (A) y (B) a un paciente en terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio.
- 40 11. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 6, un uso como se reivindica en la Reivindicación 7 o la reivindicación 9, un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 8, o componentes como se reivindican en la Reivindicación 10, donde el trastorno se selecciona entre migraña, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o colitis ulcerosa.
12. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 6, un uso como se reivindica en la Reivindicación 7 o Reivindicación 9, un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 8, o componentes como se reivindican en la Reivindicación 10, donde el trastorno es aterosclerosis o un trastorno cardiovascular asociado.
- 45 13. Un kit de partes, un uso, un producto de combinación o componentes como se reivindica en la Reivindicación 12, donde el trastorno es aterosclerosis.

- 5 14. Un kit de partes, un uso, un producto de combinación o componentes como se reivindica en la Reivindicación 12, donde el trastorno cardiovascular asociado con aterosclerosis se selecciona entre un aneurisma de la aorta, arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica oclusiva, una enfermedad arterial coronaria, una enfermedad coronaria, rotura de la placa, rotura y/o inestabilidad del ateroma, una enfermedad vascular, una enfermedad arterial, una enfermedad isquémica, isquemia y derrame cerebral.
15. Un kit de partes, un uso, un producto de combinación o los componentes como se reivindica en la Reivindicación 14, donde el trastorno cardiovascular es un aneurisma de aorta.
16. Un kit de partes, un uso, un producto de combinación o los componentes como se reivindica en la Reivindicación 14 donde:
- 10 la enfermedad arterial coronaria se selecciona entre angina de pecho, infarto de miocardio y ataque al corazón;
- la enfermedad coronaria se selecciona de una enfermedad cardíaca y una enfermedad del corazón; y/o
- el derrame cerebral se selecciona de accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio.
17. Un kit de partes, un uso, un producto de combinación o los componentes tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 16, donde el paciente tiene un síndrome coronario agudo.