(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 785**

(51) Int. CI.:

A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/80 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
A61K 31/537 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2012 PCT/AU2012/000014**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12094703**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2012 E 12734251 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2663304**

(54) Título: **Terapia de combinación**

(30) Prioridad:

11.01.2011 AU 2011900060
14.01.2011 US 201161432896 P
17.10.2011 AU 2011904279
17.10.2011 US 201161547951 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2020

(73) Titular/es:

DIMERIX BIOSCIENCE PTY LTD (100.0%)
WB Block Queen Elizabeth II Medical Centre
Hospital Avenue
Nedlands, Western Australia 6009, AU

(72) Inventor/es:

PFLEGER, KEVIN DONALD GEORGE;
MCCALL, ELIZABETH y
WILLIAMS, JAMES

(74) Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

Observaciones:

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

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

Terapia de combinación

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a una terapia de combinación, que comprende al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina y al menos un bloqueador del receptor de angiotensina.

Antecedentes de la técnica

Las proteínas no actúan en el aislamiento de una célula, sino en complejos estables o transitorios, siendo las interacciones proteína-proteína determinantes clave de la función proteica (Auerbach *et al.,* (2002), Proteomics 2: 611 -623). Además, las proteínas y los complejos proteicos interactúan con otros componentes celulares tales como ADN, ARN y moléculas pequeñas. La comprensión tanto de las proteínas individuales implicadas en estas interacciones como sus interacciones es importante para una mejor comprensión de los procesos biológicos.

La función fisiológica primaria de las quimioquinas informadas por Allen (Allen, S. *et al.*, (2007) Annual Review Immunology 25: 787-820) es la regulación de la "migración celular durante la vigilancia, inflamación y desarrollo inmunitarios de rutina". Las quimioquinas se liberan como respuesta a las citoquinas proinflamatorias y se unen de forma selectiva a una gran familia de receptores acoplados a proteína G, que median las respuestas fisiológicas a las quimioquinas. Las quimioquinas se denominaron originalmente citoquinas quimiotácticas.

Dado que el descubrimiento de que el sistema de quimioquinas desempeña un papel fundamental en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se han llevado a cabo esfuerzos considerables para comprender mecanismo(s) subyacentes involucrados con el fin de desarrollar estrategias de intervención potenciales (Lusso, P. (2006) EMBO Journal 25: 447-456). Además, cualquier respuesta inmunitaria perjudicial asociada con una afección particular, incluyendo el asma, casi siempre es el resultado de un sistema de quimioquinas disfuncional. También se ha demostrado que la patogénesis de la aterosclerosis involucra rutas de señalización de quimioquinas, con la infiltración de macrófagos en lesiones arteriales que contribuyen directamente a este trastorno inflamatorio anómalo (Boisvert, W. (2004) Trends in Cardiovascular Medicine 14: 161-165).

Los estudios con modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas han demostrado que la inhibición de la unión entre MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1, también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos 1, factor quimiotáctico y de activación de monocitos (MCAF) y ligando 2 de quimioquina (motivo C-C) (CCL2)) y CCR2 (receptor 2 de quimioquinas (motivo C-C)) por un antagonista suprime la respuesta inflamatoria. La interacción entre MCP-1 y CCR2 se ha visto implicada (véase Rollins B J (1996) Mol. Med. Today, 2: 198; y Dawson J, *et al.,* (2003) Expert Opin. Ther. Targets, 7 (1): 35-48) en patologías de enfermedades inflamatorias tales como uveítis, aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, nefritis, rechazo a aloinjerto de órganos, pulmón fibroide, insuficiencia renal, diabetes y complicaciones diabéticas, nefropatía diabética, retinopatía diabética, retinitis diabética, microangiopatía diabética, tuberculosis, sarcoidosis, estafilococia invasiva, inflamación después de cirugía de cataratas, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, urticaria crónica, asma alérgica, enfermedades periodontales, periodonitis, gingivitis, enfermedad de las encías, cardiomiopatías diastólicas, infarto cardiaco, miocarditis, insuficiencia cardiaca crónica, angioestenosis, reestenosis, trastornos de reperfusión, glomerulonefritis, tumores y cánceres sólidos, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin, y carcinomas de vejiga, mama, cuello uterino, colon, pulmón, próstata, o estómago.

La migración de monocitos es inhibida por los antagonistas de MCP-1 (ya sea anticuerpos o fragmentos solubles e inactivos de MCP-1), que han demostrado inhibir el desarrollo de artritis, asma y uveítis. El propagermanio (polímero de ácido 3-oxigermilpropiónico), una molécula que se ha usado como agente terapéutico frente a la hepatitis crónica, también se ha demostrado que inhibe específicamente la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos por MCP-1 a través de un mecanismo que parece requerir proteínas ancladas a glicosil-fosfatidilinositol (GPI) tales como CD 55, CD59 y CD16 (Yokochi, S. (2001) Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 389-398).

Los ratones con desactivación genética (KO) tanto MCP-1 como CCR2 han demostrado que la infiltración de monocitos en las lesiones inflamatorias disminuye de forma significativa. Además, los ratones KO de ese tipo son resistentes al desarrollo de encefalomielitis alérgica experimental (EAE, un modelo de MS humana), asma inducida por alergenos de cucaracha, aterosclerosis y uveítis. Los pacientes con artritis reumatoide y enfermedad de Crohn han mejorado durante el tratamiento con antagonistas del TNF-α (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y receptores solubles) a niveles de dosis correlacionados con disminuciones en la expresión de MCP-1 y el número de macrófagos infiltrantes.

MCP-1 se ha implicado en la patogénesis de la rinitis alérgica estacional y crónica, habiéndose encontrado en la mucosa nasal de la mayoría de los pacientes con alergias a los ácaros del polvo. También se ha encontrado que

MCP-1 induce la liberación de histamina de los basófilos *in vitro*. Durante las afecciones alérgicas, se ha demostrado que tanto los alergenos como las histaminas desencadenan (es decir, regulan de forma positiva) la expresión de MCP-1 y otras quimioquinas en la mucosa nasal de personas con rinitis alérgica, lo que sugiere la presencia de un circuito de retroalimentación positiva en pacientes de ese tipo.

La enfermedad renal está asociada con inflamación crónica caracterizada por la acumulación de macrófagos renales. La producción de proteína quimioatrayente monocítica 1 (MCP-1/CCL2) por los riñones diabéticos se ha identificado como un factor importante que influye en la acumulación de macrófagos en la enfermedad renal que surge de la nefropatía diabética (véase Tesch GH (2008) MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy Am J Physiol Renal Physiol 294: 697-701). En diversos modelos animales, se ha demostrado que la inhibición de CCR2 y/o la inhibición de rutas específicas de CCR2 y/o la inhibición del ligando CCR2 de MCP-1 reducen el daño renal (véase Tesch (2008) mencionado anteriormente; Rao V *et al.,* (2006) Role for Macrophage Metalloelastase in Glomerular Basement Membrane Damage Associated with Alport Syndrome, American Journal of Pathology, Vol. 169 (1) 32-46; Kang YS (2010) CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice Kidney International 78, 883-894; Kitagawa K (2004) Blockade of CCR2 Ameliorates Progressive Fibrosis in Kidney, American Journal of Pathology, Vol. 165 (1) 237-246; Park J (2008) MCP-1/CCR2 system is involved in high glucose-induced fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells, Am J Physiol Renal Physiol 295: F749-F757).

Tesch (2008) señala que se ha demostrado que la focalización selectiva de MCP-1 es un tratamiento eficaz para suprimir modelos animales de enfermedad renal que incluyen nefropatía diabética; sin embargo, las terapias de ese tipo aún no se han validado en la nefropatía diabética humana. Se ha demostrado que los tratamientos que incluyen antagonistas moleculares pequeños de CCR2 (INCB3344, propagermanio, RS-504393) suprimen la inflamación en modelos de ratón de esclerosis múltiple, isquemia y lesión por reperfusión renal, obstrucción del uréter y nefropatía diabética y en un modelo de artritis en ratas; también se ha demostrado que los antagonistas biológicos diseñados de CCR2 son eficaces; se ha encontrado que la infusión subcutánea de células transfectadas con un vector que expresa una forma inactiva truncada de MCP-1 suprime el desarrollo de inflamación renal en un modelo de ratón con nefritis por lupus. De manera similar, la transfección muscular con 7ND (un mutante de MCP-1) reduce la inflamación renal en modelos de ratón de lesión por isquemia-reperfusión renal, nefritis por lupus y nefropatía diabética. Los ensayos en seres humanos de monoterapias de quimioquinas para enfermedades inflamatorias, hasta la fecha, no han dado lugar a la aprobación de fármacos. Anders A-J *et al.,* consideran las razones por las que los tratamientos con antagonistas de quimioquinas individuales no han sido eficaces en los tratamientos de enfermedades y discuten posibles explicaciones que incluyen la redundancia de mediadores de quimioquinas individuales y los patrones de expresión variable de los receptores de quimioquinas, (véase Anders A-J *et al.,* (2009) Questions about Chemokine and Chemokine Receptor Antagonism in Renal Inflammation, Nephron Exp Nephrol 2010; 114: e33-e38). Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de un tratamiento eficaz de las enfermedades causadas por las rutas de CCR2.

El sistema renina-angiotensina (RAS) desempeña un papel importante en el sistema nervioso simpático y la homeostasis de los fluidos. La renina es una enzima proteolítica secretada por los riñones que media la formación de angiotensina I (Angl) a partir de un precursor de globulina, angiotensinógeno (Rang, H.P., *et al.,* Pharmacology: 3ª Edición, 1995, Publicado por Churchill Livingstone, Edimburgo, Reino Unido). Parece que la propia Angl tiene poca importancia fisiológica además de proporcionar un sustrato para una segunda enzima, la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que convierte a Angl en la angiotensina II altamente activa (Angll). Sin embargo, se debería tener en cuenta que Angll se puede generar mediante mecanismos alternativos independientes de ACE. A su vez Angll puede ser metabolizada a AnglII por aminopeptidasas.

Angll es un vasoconstrictor extremadamente potente y, como consecuencia, se ha estudiado ampliamente en el contexto de la cardiopatía y la patogénesis de la hipertensión (Ramasubbu, K. (2007) Cardiology Clinics 25: 573-580).

La enfermedad renal crónica es una causa importante de mortalidad y morbilidad, sin embargo, los sucesos celulares básicos que estimulan su progresión siguen siendo esquivos y es probable que los mediadores proinflamatorios, que conducen a inflamación, hipoxia y aumento de la deposición de la matriz extracelular (ECM) sean una causa importante de la insuficiencia renal (Gilbert (1999) Kidney Int 56: 1627-1637, 1999). Estos sucesos patológicos van acompañados por proteinuria y una disminución en la tasa de filtración glomerular (GFR), lo que por último conduce a una insuficiencia renal terminal. Aunque los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEi) y los bloqueadores del receptor de angiotensina ahora se consideran un tratamiento de primera línea para la enfermedad renal crónica y se ha demostrado claramente que confieren protección renal, la enfermedad renal crónica sigue siendo un trastorno progresivo, que por último conduce a la insuficiencia renal. En el ensayo del grupo de estudio colaborativo (Lewis (1993). The effect of angiotensin converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. New England Journal of Medicine 329: 1456-1462), la terapia con captoprilo, aunque retrasó la disminución de la insuficiencia renal, no detuvo la progresión de la nefropatía diabética en la gran mayoría de los pacientes. En contraste con el entorno clínico, los estudios experimentales de agentes renoprotectores han demostrado principalmente una mejoría completa de las anomalías estructurales y funcionales renales en modelos de nefropatía diabética comúnmente usados. Una ventaja importante de la rata Ren-2 diabética y el modelo de nefrectomía Sub Total (STNx) es que, como se observa en el ser humano, ACEi o bloqueadores del receptor de angiotensina atenúan

pero no previenen el desarrollo de insuficiencia renal (Kelly (1998) Kidney Int 54:343-352, y Kelly (2000) Kidney Int 57: 1882-1894). Además, los modelos de rata Ren-2 diabética y STNx se pueden usar para estudiar terapias adicionales que tienen el potencial de mejorar aún más el pronóstico en la progresión de la enfermedad renal en el contexto del bloqueo simultánea de los receptores ACEi o angiotensina.

El sistema renina-angiotensina (RAS), una cascada hormonal involucrada en el control de la presión arterial, la homeostasis de los electrolitos y el crecimiento y muerte celular, existe en el riñón en dos sitios principales: el glomérulo y los túbulos proximales. El RAS se ha implicado en la progresión de la enfermedad renal ya que el bloqueo de este sistema atenúa la proteinuria y la enfermedad glomerular y tubulointersticial en la diabetes humana y experimental Lewis (1993). El efecto renoprotector de los bloqueadores de RAS se ha atribuido a su capacidad para reducir la presión glomerular (Zatz (1985) Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. PNAS 82: 5963-5967). Sin embargo, se ha reconocido que los aumentos locales en la angiotensina II pueden inducir esclerosis e inflamación a través de sus propiedades promotoras del crecimiento celular (Wolf (1993) Angiotensin II as a renal growth factor. J Am Soc Nephrol 3: 1531-1540). Existe una amplia evidencia de estudios de diversas enfermedades glomerulares en las que Ang II ejerce daño celular por la regulación positiva de otros factores de crecimiento (Ruiz Ortega (1994) Involvement of angiotensin II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. J Hypertens Suppl. 12: S51 -S58) tal como factor β de crecimiento transformante (TGF- β). De hecho, estos factores de crecimiento son producidos por el riñón y aumentan con Ang II, lo que induce la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la muerte, alteraciones en el fenotipo celular y la acumulación de ECM (Kelly (1998), Kelly (2000) y Kelly (2002)). Aunque la evidencia sugiere que Ang II induce una variedad de respuestas mediante la regulación positiva de los factores de crecimiento, muy pocos estudios han descrito cómo Ang II promueve la activación de los factores de crecimiento en el entorno diabético (Naito (2004) Am J Physiol Renal Physiol 286: F278-F287).

La eficacia del bloqueador del receptor de angiotensina, irbesartán (AT_1R, nombre comercial Avapro®, SanofiAventis) en la gestión de la nefropatía diabética en pacientes con hipertensión se ha evaluado en dos ensayos multinacionales grandes (n > 500), realizados de forma aleatoria, con doble ocultación, controlados con placebo, IRMA 2 (Irbesartán Microalbuminuria Type 2 Diabetes in Hypertensive Patients) (Parving (2001) N Engl J Med 345 (12): 870-8 e IDNT (Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial) Lewis (2001) N Engl J Med 345 (12): 851-60).

Para contrarrestar los efectos vasoconstrictores perjudiciales de AngII en pacientes con hipertensión [inicio de enfermedad renal en etapa terminal], se han desarrollado estrategias terapéuticas que intervienen a nivel de la señalización de AngII. En particular, los compuestos que inhiben la actividad de ACE, evitando la conversión de AngI en AngII, y aquellos que bloquean específicamente la activación del receptor de angiotensina (ATR), se han empleado en el tratamiento de afecciones de ese tipo (Matchar, D.B. (2008) Annals of Internal Medicine 148: 16-29).

Los inventores han mostrado la heteromerización del receptor de angiotensina con miembros de la familia de receptores de quimioquinas (documento WO2010/108232). Los inventores han mostrado que el receptor de quimioquinas se asocia con el receptor de angiotensina como un heterodímero / oligómero del receptor de quimioquinas / receptor de angiotensina. Los inventores han mostrado que CCR2 se asocia con AT1R como un hetero-dímero / -oligómero de CCR2 / AT1R.

Previamente se ha demostrado que la angiotensina y las rutas de señalización de CCR2 interactúan. Por ejemplo: angiotensin II effects on vascular pathologies are attenuated by deficiency of the CCR2 receptor (Daugherty A (2010) Clin Sci (Lond). 118 (11): 681-9; Ishibachi M (2004) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24; Tieu (2011) Aortic Adventitial Fibroblasts Participate in Angiotensin-Induced Vascular Wall Inflammation and Remodelling J Vasc Res 48 (3) 261-272).

Además, la angiotensina II, que induce la expresión de MCP-1, aumenta con la edad dando como resultado una regulación positiva de MCP-1 y su receptor CCR2. Esta regulación positiva también se puede producir en diversas enfermedades. (Spinetti G (2004) Arterioscler Thromb Vasc Biol 24 (8): 1397-402).

Se ha mostrado que los bloqueadores del receptor de angiotensina inhiben la expresión de MCP-1 y CCR2 (Dai (2007) British Journal of Pharmacology 152, 1042-1048).

Los inventores han descubierto de forma sorprendente que la administración de un bloqueador del receptor de angiotensina junto con un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina supera algunas o todas las deficiencias de la técnica anterior.

La discusión anterior pretende facilitar únicamente una comprensión de la invención. No se debería interpretar que en modo alguno limita el alcance o la aplicación de la siguiente descripción de la invención, ni se debería interpretar como una admisión de que cualquiera de la información discutida está dentro del conocimiento general común de la persona con experiencia en la técnica apropiada en la fecha de prioridad.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de una enfermedad renal; al menos un bloqueador de AT1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad; al menos un bloqueador de AT1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un bloqueador de AT1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un bloqueador de AT1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las realizaciones de la invención se definen en los siguientes párrafos numerados:

(1). Una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina de tipo 1 (AT_1R) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, y
b) al menos un inhibidor del receptor de quimioquina 2 (CCR2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo elegido entre el listado que consiste en un antagonista de CCR2 directo; un agonista de CCR2 inverso; y un modulador de CCR2 alostérico negativo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, para su uso en el tratamiento de una enfermedad renal seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

(2). Al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, y al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, en una forma de dosificación, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad, opcionalmente en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma simultánea o de forma secuencial, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

(3). El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con el párrafo 2 en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma simultánea.

(4). El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con el párrafo 2 en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma secuencial, opcionalmente en segundos, minutos, días, semanas o meses entre sí.

(5). Al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

(6). Al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

(7). El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con el párrafo 5 o el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con el párrafo 6, en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en una forma de dosificación.

(8). El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo Ibarra o al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 2, 3, 4, o 7, en el que la forma de dosificación comprende de aproximadamente 5 mg a 1 g del bloqueador de AT1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y de aproximadamente 5 mg a 1 g del inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además la composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la composición farmacéutica inhibe o inhibe parcialmente el reclutamiento de arrestina.

En otro aspecto, la composición farmacéutica inhibe o inhibe parcialmente producción de fosfato de inositol.

Además la divulgación proporciona un método para el tratamiento, la mejora o la prevención de una afección o enfermedad que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de (i) un bloqueador del receptor de angiotensina y (ii) un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina.

En un aspecto, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina inhibe o inhibe parcialmente una proteína distinta al receptor de quimioquina, más preferentemente, el inhibidor es un agente que bloquea la migración y activación de monocitos inducida por MCP-1 y la migración quimiotáctica mediante el direccionamiento de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tales como CD55, CD59 y CD16. Preferentemente, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es propagermanio. De forma alternativa, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es RS504393.

Preferentemente, el bloqueador del receptor de angiotensina es irbesartán.

La divulgación también contempla el uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de una forma de dosificación para el tratamiento de una enfermedad.

La composición farmacéutica además puede comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: muestra un gráfico de barras de la mejora de los niveles de proteinuria conseguida en el modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de una enfermedad renal orgánica terminal cuando se trata con una combinación de Irbesartán (Irb), un bloqueador del receptor de angiotensina, y propagermanio (PPG) (un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina) (dosis baja) en comparación con animales sin tratar y animales tratados con el bloqueador del receptor de angiotensina solo como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 2: muestra un gráfico de barras de la mejora de los niveles de proteinuria conseguida en el modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de una enfermedad renal orgánica terminal cuando se trata con una combinación de Irbesartán (Irb), un bloqueador del receptor de angiotensina, y propagermanio (PPG) (un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina) (dosis elevada) en comparación con animales sin tratar, animales tratados con PPG solo, y animales tratados con el bloqueador del receptor de angiotensina solo como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 3: muestra imágenes representativas de contraste de fase de secciones histológicas obtenidas a partir del modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de una enfermedad renal orgánica terminal que se describe en el Ejemplo 1 que presenta muestras renales obtenidas a partir de animales sin tratar o de control (A); STNx solo (B); STNx y propagermanio (C); STNx e Irbesartán (D); y STNx e Irbesartán en combinación (E). Las células teñidas de color marrón intenso en el glomérulo representan podocitos.

Figura 4: muestra un gráfico de barras de la mejora de los números de podocitos conseguida en el modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de una enfermedad renal orgánica terminal cuando se trata con una combinación de Irbesartán (Irb), un bloqueador del receptor de angiotensina, y propagermanio (PPG) (un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina) (dosis elevada) en comparación con animales sin tratar, animales tratados con PPG solo, y animales tratados con Irbesartán (el bloqueador del receptor de angiotensina) solo como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 5: muestra gráficos de barras que indican el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en el reclutamiento de β-arrestina 2 tal como se mide con BRET inducido por ligando y como se describe en el Ejemplo 3. Las células HEK293FT fueron transfectadas de forma transitoria por los plásmidos que codifican β-arrestina 2-Venus y los receptores indicados: CCR2-Rluc8 (panel en la parte superior), AT1R-Rluc8 (panel en la parte media) o AT1R-Rluc8 y CCR2 sin marcar (panel en la parte inferior). 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar la señal de BRET inducido por agonistas en células vivas. Para esto, en primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 μM), RS504393 (10 μM) o ambos combinados. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la señal de BRET se midió. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Figura 6: muestra gráficos de barras que indican el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en producción de fosfato de inositol como se describe en el Ejemplo 4. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que codifican AT1R-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de CCR2 sin marcar. 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar las mediciones de producción de fosfato (IP1) de inositol (1) inducida por agonistas. Para esto, en primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 μM), RS504393 (10 μM) o ambos combinados. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la producción de IP1 se midió. Los datos se normalizan como un porcentaje de la producción de IP1 inducida por AngII en células que expresan AT1R solo. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Figura 7: muestra gráficos de barras que indican el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en el reclutamiento de β-arrestina 2 tal como se mide con BRET inducido por ligando y como se describe en el Ejemplo 5. Las células HEK293FT fueron transfectadas de forma transitoria por los plásmidos que codifican CCR2-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de AT1R marcado con hemaglutinina (HA). 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar la señal de BRET inducido por agonistas en células vivas. Para esto, en primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 μM), EXP3174 (el metabolito activo de Losartán; 10 μM), RS504393 (10 μM) o combinaciones de Irbesartán y RS504393 o de EXP3174 y RS504393. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la señal de BRET se midió.

Figura 8: muestra gráficos de barras que indican el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en la producción de fosfato de inositol como se describe en el Ejemplo 6. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que codifican AT1R-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de CCR2 sin marcar. 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar las mediciones de producción de fosfato (IP1) de inositol (1) inducida por agonistas. Para esto, en primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con EXP3174 (el metabolito activo de Losartán; 10 μM), RS504393 (10 μM) o ambos combinados. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la producción de IP1 se midió. Los datos se muestran como IP1 inducido (unidades arbitrarias).

Figura 9: muestra curvas de dosis-respuesta que indican el efecto de la activación de CCR2 en ausencia y presencia de AT1R activado en términos de acoplamiento a $G\alpha_{i1}$ tal como se mide con BRET inducido por ligando y como se describe en el Ejemplo 7. Las células HEK293FT fueron transfectadas de forma transitoria por los plásmidos que codifican Gαi1-Rluc8 y CCR2-YFP en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de AT1R marcado con hemaglutinina (HA). 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar los datos de la señal de BRET inducido por agonistas en células vivas con diversas concentraciones de MCP-1 o con diversas concentraciones de AngII en presencia de MCP-1 100 nM.

Abreviaturas

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACEi	Inhibidor de enzima convertidora de angiotensina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
AngI	Péptido angiotensina I
AngII	Péptido angiotensina II
AngIII	Péptido angiotensina III
AT_1R	Receptor de angiotensina de tipo 1
AT_2R	Receptor de angiotensina de tipo 2

barr	beta-arrestina.
BP	Presión sanguínea
CCL2	Ligando 2 de quimioquina (motivo C-C)
CCRs	Receptores de quimioquina CC
DOP	Opioides delta
GFR	Tasa de filtración glomerular
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
KOP	Opioides kappa
LPO	Área preóptica lateral
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1, también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos 1
NPY	Neuropéptido Y.
STNx	Nefrectomía subtotal

Descripción de la invención

General

Las publicaciones mencionadas en el presente documento se citan con finalidad de describir y desvelar los protocolos, reactivos y vectores que se informan en las publicaciones y que se pueden usar en relación con la divulgación. En el presente documento nada se debería interpretar como una admisión de que la divulgación no tiene derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de la divulgación previa.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen el plural a menos que el contexto lo indiqué claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "una proteína" incluye una pluralidad de proteínas de ese tipo, y una referencia a "un analito" es una referencia a uno o más analitos, y así sucesivamente.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que comúnmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Aunque cualquier material y método similar o equivalente a los que se describen en el presente documento se puede usar para poner en práctica o someter al ensayo la presente divulgación, a continuación se describen los materiales y métodos preferentes.

En el presente documento la divulgación puede incluir uno o más intervalos de valores (por ejemplo, tamaño, concentración, etc.). Se entenderá que un intervalo de valores incluye todos los valores dentro del intervalo, incluyendo los valores que definen el intervalo, y los valores adyacentes al intervalo que conducen al mismo resultado o sustancialmente al mismo resultado que los valores inmediatamente adyacentes a ese valor que define el límite del intervalo.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el término "comprender" o variaciones, tales como "comprende" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero indicado, o grupo de números enteros, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Descripción detallada de la divulgación

Los estudios recientes han mostrado que los receptores acoplados a proteína G (GPCR) pueden no solo actuar como monómeros sino también como homo- y hetero-dímeros y/o homo- y hetero-oligómeros (también conocidos como homómeros y heterómeros), lo que causa una alteración de la unión ligando, señalización y endocitosis (Rios *et al.,* (2000) Pharmacol. Ther. 92: 71-87). Por lo tanto, el efecto de los fármacos que actúan como agonistas o antagonistas de un receptor específico puede depender de los socios de unión de este receptor. Puede ser deseable limitar el efecto de un fármaco a una respuesta celular mediada por un dímero u oligómero receptor específico.

Se ha informado de casos de diferentes tejidos que tienen diferentes repertorios de hetero-dímeros. Por ejemplo, 6'guanidinoaltrindol, un análogo de un ligando de receptores de opioides kappa (KOP) conocido, se ha identificado como un agonista selectivo de hetero-dímero delta opioide kappa (DOP-KOP), con eficacia como analgésico espinalmente selectivo, lo que lleva a la conclusión de que los heterodímeros DOP-KOP se expresan en la médula espinal, pero no en el cerebro (Waldhoer, M. *et al.,* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 9050-9055). Por lo tanto, el receptor hetero-dimérico o hetero-oligomérico, que comprende al menos una subunidad del receptor de quimioquina asociada con al menos una subunidad del receptor de angiotensina, representa una nueva diana farmacológica.

Al igual que con el 6'guanidinoaltrindol, los ligandos conocidos pueden presentar capacidades diferentes para desencadenar activar un receptor hetero-dimérico, que puede descubrir nuevas aplicaciones para moléculas preexistentes:

- Hilairet S. *et al.,* 2003 (J. Biol. Chem. 278: 23731-23737) ha mostrado recientemente que los antagonistas CB1 suprimen el apetito actuando a través de un par heteromérico CB1/OxR1.

- Se ha mostrado que el receptor SSTR5 de somatostatina se heteromerizará con un receptor D2 de dopamina (Rocheville M. *et al.,* (2000) Science 288: 154-157).

- Previamente se ha mostrado que las rutas de señalización de angiotensina y CCR2 interactúan. Por ejemplo, los efectos de la angiotensina II en las patologías vasculares se atenúan mediante la deficiencia del receptor CCR2 (Daugherty A (2010) Clin Sci (Lond). 118 (11): 681-9; Ishibachi M (2004) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24).

- Los inventores han mostrado la heteromerización del receptor de angiotensina con miembros de la familia de receptores de quimioquina (documento WO2010/108232).

Aunque estos ejemplos muestran la interacción funcional de los receptores, no identifican las formulaciones específicas de terapias combinadas que pueden proporcionar una mejora de los resultados terapéuticos.

Composiciones farmacéuticas

Preferentemente, la terapia de combinación actuará mediante la ruta de receptores de quimioquina y el receptor de angiotensina. Por lo tanto la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La composición farmacéutica puede comprender además opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye al menos los receptores de quimioquina CC acoplados a proteína G (CCR), incluyendo: receptor 1 de quimioquina CC (CCR1), receptor 2 de quimioquina CC (CCR2), receptor 3 de quimioquina CC (CCR3), receptor 4 de quimioquina CC (CCR4), receptor 5 de quimioquina CC (CCR5), receptor 6 de quimioquina CC (CCR6), receptor 7 de quimioquina CC (CCR7), receptor 8 de quimioquina CC (CCR8), receptor 9 de quimioquina CC (CCR9), receptor 10 de quimioquina CC (CCR10). También se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye los receptores de quimioquina CXC acoplados a proteína G (CXCR), incluyendo: receptor 1 de quimioquina CXC (CXCR1), receptor 2 de quimioquina CXC (CXCR2), receptor 3 de quimioquina CXC (CXCR3), receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4), receptor 5 de quimioquina CXC (CXCR5), receptor 6 de quimioquina CXC (CXCR6) y receptor 7 de quimioquina CXC (CXCR7). Además se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye el receptor 1 de quimioquina XC acoplado a proteína G (XCR1). Además se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" el receptor de quimioquina CX3 acoplado a proteína G (CX_3CR1). Además se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" el receptor de quimioquina CCX-CKR acoplado a proteína G (CCX-CKR). Además se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye el receptor de quimioquina D6 acoplado a proteína G (D6). Además se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye el receptor de quimioquina DARC/Duffy acoplado a proteína G (DARC). El listado de receptores de quimioquina se reúne a partir de una revisión de Allen (Allen, S. *et al.,* (2007) Chemokine: Receptor Structure, Interactions and Antagonism. Annual Review Immunology 25: 787-820). Por último, se debe entender que la expresión "receptor de quimioquina" incluye cualquier miembro de la familia CCR/CXCR/XCR/CX3CR/CCX-CKR/D6/DARC recién descubierto.

El receptor de quimioquina se puede seleccionar entre el grupo que comprende el receptor 1 de quimioquina CC (CCR1), receptor 2 de quimioquina CC (CCR2), receptor 3 de quimioquina CC (CCR3), receptor 4 de quimioquina CC (CCR4), receptor 5 de quimioquina CC (CCR5), receptor 6 de quimioquina CC (CCR6), receptor 7 de quimioquina CC (CCR7), receptor 8 de quimioquina CC (CCR8), receptor 9 de quimioquina CC (CCR9), receptor 10 de quimioquina CC (CCR10), receptor 1 de quimioquina CXC (CXCR1), receptor 2 de quimioquina CXC (CXCR2), receptor 3 de quimioquina CXC (CXCR3), receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4), receptor 5 de quimioquina CXC (CXCR5), receptor 6 de quimioquina CXC (CXCR6) y el receptor 7 de quimioquina CXC (CXCR7), el receptor 1 de quimioquina XC acoplado a proteína G (XCR1), el receptor de quimioquina CX3 acoplado a proteína G (CX_3CR1), el receptor de quimioquina CCX-CKR acoplado a proteína G (CCX-CKR), el receptor de quimioquina D6 acoplado a proteína G (D6), el receptor de quimioquina DARC/Duffy acoplado a proteína G (DARC), y un receptor de quimioquina CCR/CXCR/XCR/CX3CR/CCX-CKR/D6/DARC.

Se debe entender que la expresión "ruta del receptor de quimioquina" incluye al menos una cualquiera de las multas desencadenadas por los receptores de quimioquina que se han enumerado anteriormente. Preferentemente, la ruta de receptores de quimioquina es una ruta desencadenada por los receptores de quimioquina CC acoplados a proteína G (CCR), incluyendo el receptor 2 de quimioquina CC (CCR2).

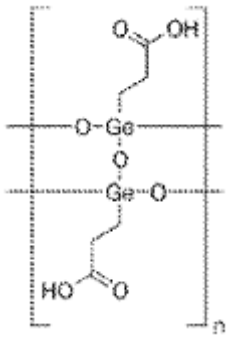
Se debe entender que la expresión "un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina" como se usa en el presente documento, incluye un componente de una cualquiera de las rutas que se han enumerado anteriormente que es desencadenada por uno o más de los receptores de quimioquina que se han enumerado anteriormente, en los que el propio componente no es un receptor de quimioquina como se ha enumerado anteriormente. Preferentemente, el componente es una proteína tal como, pero no limitada a, una proteína de transducción o señalización. El componente de la ruta de receptores de quimioquina puede interactuar directamente con el receptor de quimioquina desencadenante. Alternativamente, el componente de la ruta de receptores de quimioquina puede interactuar indirectamente con el receptor de quimioquina desencadenante por medio de interacción de proteína-proteína o formación de complejos. Alternativamente, el componente de la ruta de receptores de quimioquina puede interactuar directamente con el receptor de quimioquina desencadenante por medio de una cascada de señalización tal como se conoce en la técnica.

La expresión "inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina" pretende incluir cualquier compuesto o agente que inhibe o que inhibe parcialmente una cualquiera de las rutas asociadas con los receptores de quimioquina que se han enumerado anteriormente, incluyendo compuestos por agentes que inhiben componentes de la ruta de receptores de quimioquina distintos al propio receptor de quimioquina. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir o inhibir parcialmente proteínas que se asocian con receptores de quimioquina, o pueden inhibir compuestos o etapas de las rutas antes y/o después del propio receptor de quimioquina. Preferentemente, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es un antagonista de CCR2, agonista inverso de CCR2 o modulador alostérico negativo de CCR2.

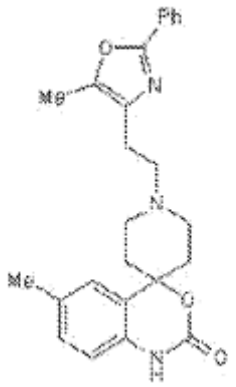
El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se puede seleccionar entre el grupo que comprende un antagonista de CCR2 directo, un agonista de CCR2 inverso, un modulador de CCR2 alostérico negativo; un antagonista de CCR2 indirecto, un agonista de CCR2 inverso indirecto, y un modulador de CCR2 alostérico negativo indirecto.

Más preferentemente la expresión incluye cualquier inhibidor que inhibe o inhibe parcialmente una cualquiera de las rutas de receptores de quimioquina asociada con MCP-1 y/o CCR2, que incluye un antagonista de CCR2 y/o MCP-1 directo, agonista inverso o modulador alostérico negativo; o un antagonista, agonista inverso o modulador alostérico negativo que funciona indirectamente mediante el bloqueo de estas rutas a diferentes niveles.

Más específicamente, la expresión incluye Propagermanio (polímero del ácido 3-oxigermilpropiónico), una molécula que se ha usado como un agente terapéutico frente a hepatitis crónica, y también se ha mostrado que muestra inhibe de forma específica la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos mediante MCP-1 a través de un mecanismo que parece que requiere proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tales como CD 55, CD59 y CD16 (Yokochi, S. (2001) Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 389-398). El propagermanio también se conoce como ácido 3-[(2-carboxietil-oxogermil)oxi-oxogermil]propanoico, proxigermanio, Ge-132, sesquióxido de bis (2-carboxietilgermanio) (CEGS), 2-carboxietilgermasesquioxano, SK-818, germanio orgánico, sesquióxido de germanio, ácido 3,3'-(1,3-dioxo-1,3-digermanoxanodiil)bispropiónico, polímero del ácido 3-oxigermilpropiónico, poli-*trans*-(2-carboxietil) germasesquioxano, proxigermanio, repagermanio y Seroción. El propagermanio tiene la siguiente fórmula:



La expresión también incluye RS504393. RS504393 tiene la siguiente fórmula:



Por lo tanto la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que inhibe un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina.

La composición farmacéutica además puede comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se selecciona entre el grupo que consiste en:

(i) antagonistas de receptores de quimioquina o componentes de la ruta de receptores de quimioquina distintos al receptor de quimioquina;
(ii) agonistas inversos de receptores de quimioquina o componentes de la ruta de receptores de quimioquina distintos al receptor de quimioquina;
(iii) moduladores alostéricos negativos de receptores de quimioquina o componentes de la ruta de receptores de quimioquina distintos al receptor de quimioquina;

Un ejemplo más específico de un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina que se dirige a un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina puede ser un agente que bloquear las rutas asociadas con la migración lúcida por MCP-1, activación de monocitos y migración quimiotáctica. Los agentes de ese tipo que se podrían dirigir incluyen proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), y más específicamente CD55, CD59 y CD16.

Los antagonistas de receptores de quimioquina conocidos incluyen; RS504393, RS102895, MLN-1202 (Millennium Pharmaceuticals), INCB3344, INCB3284 y INCB8696 (Incyte Pharmaceuticals), MK-0812 (Merck), CCX140 (ChemoCentryx), PF-4136309 (Pfizer), BMS-741672 (Bristol-Myers Squibb); Repertaxina (CXCR2), TAK-779 (CCR5), TAK-220 (CCR5), TAK-652 (CCR5), AK692 (CCR5), CMPD167(CCR5), BX-471 (CCR1), AMD3100 (CXCR4), AMD1 1070 (CXCR4), FC131 (CXCR4), MLN3897 (CCR1), CP-481715 (CCR1), GW-873140 (CCR5). El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se puede seleccionar entre el grupo que comprende RS504393, RS102895, MLN-1202, INCB8696, MK-0812, CCX140, PF-4136309, BMS- 741672; Repertaxina (CXCR2), TAK-779 (CCR5), TAK-220 (CCR5), TAK-652 (CCR5), AK692 (CCR5), CMPD167 (CCR5), BX-471 (CCR1), AMD3100 (CXCR4), AMD1 1070 (CXCR4), FC131 (CXCR4), MLN3897 (CCR1), CP-481715 (CCR1), y GW-873140 (CCR5).

En una realización preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es un antagonista de un receptor de quimioquina. En una opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se selecciona entre el grupo que consiste en: RS504393, RS102895, MLN-1202 (Millennium Pharmaceuticals), INCB3344, INCB3284, INCB8696 (Incyte Pharmaceuticals), MK-0812 (Merck), CCX140 (ChemoCentryx), PF-4136309 (Pfizer), BMS-741672 (Bristol-Myers Squibb); Repertaxina (CXCR2), TAK-779 (CCR5), TAK-220 (CCR5), TAK-652 (CCR5), AK692 (CCR5), CMPD167 (CCR5), BX-471 (CCR1), AMD3100 (CXCR4), AMD1 1070 (CXCR4), FC131 (CXCR4), MLN3897 (CCR1), CP-481715 (CCR1) y GW-873140 (CCR5). En una opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina no es RS102895.

En una opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es propagermanio (también conocido como sesquióxido de bis (2-carboxietilgermanio) (CEGS), germanio orgánico, sesquióxido de germanio, ácido 3,3'-(1,3-dioxo-1,3-digermanoxanodiil)bispropiónico, polímero del ácido 3-oxigermilpropiónico, poli-*trans*-(2-carboxietil) germasesquioxano, proxigermanio, repagermanio y Seroción).

En una opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina inhibe la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos inducida por MCP-1. En otra opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de

quimioquina inhibe la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos inducida por MCP-1 mediante un mecanismo que requiere proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tales como CD 55, CD59 y CD16. En otra opción preferente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina estabiliza los complejos CCR2/CD55 y/o CCR2/CD59 y/o CCR2/CD16. El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina puede ser un péptido, polipéptido o entidad química pequeña. Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina puede ser una proteína, proteína de unión o anticuerpo.

El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina puede inhibir la migración y la activación de monocitos inducidas por MCP-1 y la migración quimiotáctica mediante el direccionamiento de una o más proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) seleccionadas entre el grupo que comprende CD55, CD59 y CD16. El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina puede estabilizar los complejos CCR2/CD55 y/o CCR2/CD59 y/o CCR2/CD16.

El propagermanio es un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina, pero no inhibe la unión a MCP-1 y parece que se dirige a proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tales como CD55, CD59 y CD16. (Yokochi (2001) Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 389-398; Yamada (2004) The Journal of Immunology 172: 3869-3875). El propagermanio inhibe la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos por MCP-1 (Yokuchi (2001) Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 389-398).

La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) propagermanio o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) RS504393, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los reguladores de complementos fundamentales CD55 (factor de aceleración de la descomposición) y CD59 (protectina) son ambos proteínas de la membrana plasmática ancladas a GPI (Yokochi (2001) Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 389-398; Yamada (2004) The Journal of Immunology 172: 3869-3875). La regulación defectuosa de inhibidores de complementos y los niveles reducidos de CD55 y CD59 se han mostrado en el número de patologías que incluyen:

i) enfermedades renales y lesión por isquemia y reperfusión renal (Yamada (2004) Critical Protection from Renal Ishemia Reperfusion Injury by CD55 and CD59, The Journal of Immunology 172: 3869-3875);
ii) diabetes, cuando la regulación defectuosa de inhibidores de complementos y niveles reducidos de CD55 y CD59 se puede visualizar como un efecto primario de la diabetes y uno de los mecanismos para la activación de complementos en los vasos diabéticos con la disminución selectiva en estos inhibidores de complementos anclados a GPI lo que sugiere efectos de diabetes en etapas reguladoras comunes en la síntesis o en el procesamiento de estas moléculas. Se ha propuesto que el mecanismo que conduce a la disminución de los niveles de CD59 y CD55 en la diabetes puede ser específico de célula o de tejidos. (Zhang (2002) Diabetes 51: 3499-3504).
iii) enfermedades macrovasculares (Ma (2009) Chinese medical journal, 1 22 (18 2123-2128);
iv) degeneración macular (Bora (2007) The Journal of Immunology, 178 (3) 1783-1790; y Ma K (2010) Invest Ophthalmol Vis Sci. Dec; 51 (12): 6776-83. Epub de agosto de 2010)

Se debe entender que la expresión "receptor de angiotensina" o "ATR" hace referencia a cualquiera del receptor 1 de angiotensina (AT_1R; AT_1R) o el receptor 2 de angiotensina (AT2R; AT_2R), que son receptores acoplados a proteína G. En una opción preferente, son análogos a los descritos por Porrello *et al.,* (Porrello, E. R. *et al.,* (2009) Frontiers in Bioscience, 14: 958-972), que son activados por la angiotensina II (AngII) y/o la angiotensina III (AngIII). Además se debe entender que "receptor de angiotensina" o "ATR" incluye miembros de la familia del receptor de angiotensina recién descubiertos.

Se entiende que la expresión "bloqueador del receptor de angiotensina" se refiere a un agente o compuesto que puede inhibir o que inhibe parcialmente la activación del ATR. Este incluye antagonistas para ATR, agonistas inversos y moduladores alostéricos negativos. Preferentemente, el bloqueador del receptor de angiotensina bloquea AT_1R.

El término "inhibe", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción por debajo de los límites detectables cuando se compara con una referencia. La expresión incluye bloquear, retrasar, o impedir una acción para prevenir un resultado no deseado.

La expresión "inhibe parcialmente" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier reducción dentro de los límites detectables cuando se compara con una referencia. La expresión incluye bloquear, retrasar, o impedir una acción para prevenir un resultado no deseado.

La inhibición o inhibición parcial se puede medir usando los métodos *in vitro* que se exponen en el presente documento, e incluyen, pero no se limitan a, ensayos bioquímicos o celulares para la evaluación de la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos por MCP-1 tal como se conoce en la técnica, así como la medición de la producción de fosfato de inositol, fosforilación de quinasa regulada por vía extracelular (ERK), producción de cAMP, tecnologías sin marca (tal como el uso de impedancia, refracción de luz o redistribución de cargas), acoplamiento a proteína G usando sistemas indicadores de proximidad u otros enfoques, reclutamiento o señalización mediada por β-arrestina, sistemas indicadores basados en factor de transcripción, visualización mediante microscopía usando marcas fluorescentes, uso de anticuerpos para evaluar la localización celular del receptor (tal como ensayos de inmunoabsorción relacionados con enzimas) y clasificación celular activada por fluorescencia.

La inhibición o inhibición parcial se puede medir usando los métodos *in vivo* que se exponen en el presente documento, e incluyen, pero no se limitan a, mediciones en serie de la función renal llevadas a cabo mediante la medición de creatinina plasmática y urea, tal como por medio de un autoanalizador; la medición de proteinuria, la medición de albuminuria tal como por medio de un radioinmunoensayo; y GFR (técnica isotópica de disparo único); la evaluación de puntos finales tales como estructura renal y/o cardiaca y/u ocular, mediante, por ejemplo, microscopía óptica (LM) para la evaluación de hipertrofia glomerular y cardiaca, glomeruloesclerosis y/o fibrosis y/o cambio de podocitos y/o, inmunohistoquímica para medir el grado de deposición de la matriz y la modulación de los factores de crecimiento profibróticos y su actividad; evaluación de la presión arterial sistólica, modulación de la glucosa plasmática en ayunas con insulina, modulación de la hemoglobina A1c; y técnicas de biología molecular para evaluar la estructura renal y cardiaca y ocular de acuerdo con ensayos convencionales tal como se conoce en la técnica. La inhibición o la inhibición parcial pueden estar indicadas mediante una mejora cualitativa en la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular tal como se mide mediante uno o más de los puntos finales mencionados anteriormente.

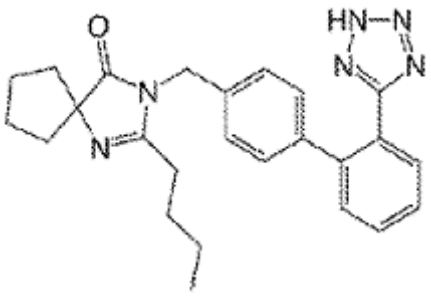
El término "componente" como se usa en el presente documento en el contexto de una composición farmacéutica de la divulgación, se refiere a cualquiera del bloqueador del receptor de angiotensina o el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina.

En una opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina se selecciona entre el grupo que consiste en:

a) un antagonista del receptor de angiotensina;
b) un agonista inverso del receptor de angiotensina; o
c) un modulador alostérico negativo del receptor de angiotensina.

Además en una opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina se selecciona entre el grupo que consiste en: CGP-421 12A (antagonista de AT_2R; Sigma N.º C-160), Eprosartán (AT_1R; nombre comercial Teveten®, Abbott Laboratories USA), Losartán (AT_1R; nombre comercial Cozaar®, Merck & Co), Valsartán (AT_1R; nombre comercial Diovan®, Novartis), Telmisartán (AT_1R; nombre comercial Micardis®, Boehringer Ingelheim), Irbesartán (AT_1R; nombre comercial Avapro®, Sanofi Aventis), Candesartán (AT_1R; nombre comercial Atacand®, AstraZenica), Olmesartán (AT_1R; nombre comercial Benicar®, Daiichi Sankyo Inc), PD123319 (AT_2R, Tocris), ZD-71 15 (AT_1R), Saralasina ((Sar^1-Ala^8)Angll), Sarthran ((Sar^1-Thr^8)Angll) y DuP753 (AT_1R). Como un ejemplo, el bloqueador del receptor de angiotensina puede ser irbesartán. El bloqueador del receptor de angiotensina se puede seleccionar entre el grupo que comprende CGP-421 12A (antagonista de AT_2R), Eprosartán (AT_1R), Losartán (AT_1R), Valsartán (AT_1R), Telmisartán (AT_1R), Irbesartán (AT_1R), Candesartán (AT_1R), Olmesartán (AT_1R), PD123319 (AT_2R), ZD-71 15 (AT_1R), Saralasina ((Sar^1-Ala^8)Angll), Sarthran ((Sar^1-Thr^8)Angll) y DuP753 (AT_1R).

El irbesartán es un antagonista del receptor de angiotensina II también conocido como 2-butil-3-({4-[2-(2(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1,3-diazaespiro[4,4]non-1-en-4-ona. El irbesartán tiene la siguiente fórmula:

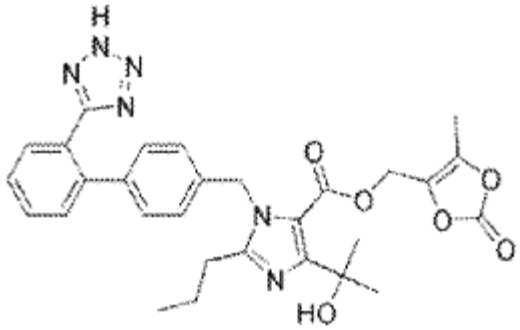


En una opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina no es Olmesartán. En otra opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina no es Olmesartán y el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina no

es RS102895. En otra opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina es Olmesartán y el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es Propagermanio. En otra opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina es Olmesartán y el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina que se dirige a un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina.

El olmesartán es un antagonista del receptor de angiotensina II también conocido como 4-(2-hidroxipropan-2-il)-2-propil-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1*H*-imidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-2H-1,3-dioxol-4-il)metilo.

El olmesartán tiene la siguiente fórmula:



Por lo tanto la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) Olmesartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que inhibe un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina.

Por lo tanto la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) propagermanio o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por lo tanto la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) Olmesartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) propagermanio o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por lo tanto la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) irbesartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) irbesartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) RS504393, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) irbesartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que inhibe un componente de la ruta de receptores de quimioquina distinto al receptor de quimioquina.

En una opción preferente, la eficacia total de la composición farmacéutica es mayor cuando se compara con las eficacias del bloqueador del receptor de angiotensina o del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina cuando cualquier componente se administra sin administración alguna del otro componente. Por lo tanto, la composición combinada se puede administrar en una sola dosis, incluyendo a dosis subterapéuticas, o a menudo menores, de modo que cualquiera de los dos componentes se podría administrar como compuestos individuales.

Preferentemente, la eficacia total de la composición farmacéutica es mayor cuando se compara con la suma de las eficacias del bloqueador del receptor de angiotensina y del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina cuando

cualquier componente se administra sin administración alguna del otro componente. Más preferentemente, un efecto sinérgico en la eficacia se observa cuando el bloqueador del receptor de angiotensina y el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se administran de forma simultánea o de forma secuencial.

Alternativamente, la eficacia total de la composición farmacéutica es igual a la suma de las eficacias del bloqueador del receptor de angiotensina y del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina cuando cualquier componente se administra sin administración alguna del otro componente. Como una opción preferente adicional de esta alternativa, un efecto aditivo en la eficacia se observa cuando el bloqueador del receptor de angiotensina y el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se administran de forma simultánea o de forma secuencial.

Además en una alternativa, la eficacia total de la composición farmacéutica es inferior a la suma de las eficacias del bloqueador del receptor de angiotensina y del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina cuando cualquier componente se administra sin administración alguna del otro componente. En una opción adicional, aunque la eficacia combinada es inferior a la suma de las eficacias del bloqueador del receptor de angiotensina y del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina cuando cada componente se administra sin administración alguna del otro componente, el tratamiento proporciona una eficacia más elevada en comparación con un solo tratamiento con el bloqueador del receptor de angiotensina o con el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina administrados solos.

Preferentemente los dos componentes se administran de forma simultánea al mismo tiempo (por ejemplo en forma de dos comprimidos tomados juntos, o como un solo comprimido, formulado con cada componente) o de forma secuencial (por ejemplo un comprimido tomado después de otro comprimido). Las dosis de cada componente se pueden tomar juntas (simultáneamente), o de forma secuencial y se toman en segundos, minutos, días, semanas o meses entre sí.

Método de tratamiento

La presente divulgación además proporciona un método para el tratamiento, mejora o prevención de una afección o enfermedad que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de (i) un bloqueador del receptor de angiotensina y (ii) un inhibidor de receptores de quimioquina o sus rutas cadena abajo (un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina).

El inhibidor del receptor de quimioquina o sus rutas cadena abajo (el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina) y el bloqueador del receptor de angiotensina usado en el método de la presente divulgación se puede elegir entre los que se han discutido anteriormente.

Preferentemente, la afección o enfermedad que se va a tratar o prevenir es una enfermedad renal, más particularmente una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal (diabética y no diabética), y afecciones por insuficiencia renal, incluyendo nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerodermia, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria e hipertensión vascular renal.

El método de la divulgación también se puede usar para tratar o prevenir una afección seleccionada entre el grupo que consiste en: enfermedad cardiovascular que incluye, insuficiencia cardiaca congestiva (aguda y crónica), disfunción ventricular izquierda y miocardiopatía hipertrófica, miopatía cardiaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular o aleteo auricular, infarto de miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina (ya sea inestable o estable), insuficiencia cardiaca, angina de pecho, diabetes, aldosteronismo secundario, hiperaldosteronismo pulmonar primario y secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, retinopatía diabética, degeneración macular, trastornos oculares, resistencia a la insulina, manejo de otros trastornos vasculares, tales como migraña, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (como Alzheimer), accidente cerebrovascular, hipercalemia, preeclampsia, sarcoidosis, infección por VIH y patogénesis por SIDA, isquemia y lesión por reperfusión, aterogénesis, crónica enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad renal por asma y alergia, artritis reumatoide.

Generalmente, una variedad de enfermedades que están relacionadas con las quimioquinas se pueden tratar con el método de la presente divulgación, incluyendo dolencias que están relacionadas con el aumento o la disminución de la producción de quimioquinas, y/o el aumento o la disminución de la capacidad de respuesta de las células a las quimioquinas. También se debería entender que una afección relacionada con las quimioquinas se refiere a una afección en el que los receptores de quimioquina presentan características anómalas, son la diana de un patógeno particular o son una diana de una intervención farmacológica. El siguiente listado proporciona algunos ejemplos de enfermedades relacionadas con las quimioquinas:

- Infección por VIH y patogénesis del SIDA.
- Isquemia y lesión por reperfusión;
- Aterogénesis;
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica;

- Asma y alergia;
- Enfermedad renal
- Artritis Reumatoide

Sin embargo, se debería entender que la expresión 'intervenciones relacionadas con quimioquinas' y la expresión 'una enfermedad relacionada con quimioquinas' no se limita a esto.

Una gama de enfermedades que están relacionadas con la angiotensina también se pueden tratar mediante el método de la presente divulgación, incluidas las enfermedades que están relacionadas con el aumento o la disminución de la producción de angiotensina, y/o en aumento o la disminución de la capacidad de respuesta de las células a la angiotensina. A continuación se presenta un listado de una serie de afecciones propuestas que provienen de un sistema de angiotensina desregulado, o que se podrían tratar potencialmente usando intervenciones basadas en angiotensina:

- Insuficiencia cardiaca crónica;
- Aterosclerosis / isquemia;
- Hipertensión;
- Hipercalemia;
- Preeclampsia;
- Diabetes mellitus;
- Retinopatía diabética;
- Sarcoidosis;
- Enfermedad de Alzheimer

La afección o enfermedad que se va a tratar o prevenir puede ser una enfermedad seleccionada entre el grupo que comprende trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerodermia, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria, hipertensión vascular renal, enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva, disfunción ventricular izquierda, miocardiopatía hipertrófica, miopatía cardiaca diabética, arritmias supraventriculares y ventriculares, fibrilación auricular, aleteo auricular, infarto de miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina, insuficiencia cardiaca, angina de pecho, aldosteronismo secundario, hiperaldosteronismo pulmonar primario y secundario, hipertensión primaria y pulmonar, retinopatía diabética, degeneración macular, trastornos oculares, resistencia a la insulina, los trastornos vasculares, migraña, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, hipercalemia, preeclampsia, sarcoidosis, diabetes mellitus; retinopatía diabética, infección por VIH, patogénesis del SIDA, isquemia y lesión por reperfusión, aterogénesis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, alergia, enfermedad renal y artritis reumatoide.

En un aspecto, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina inhibe o inhibe parcialmente una proteína distinta al receptor de quimioquina, más preferentemente, el inhibidor es un agente que bloquea la migración inducida por MCP-1 y la activación de monocitos y la migración quimiotáctica a través del direccionamiento de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tales como CD55, CD59 y CD16. Lo más preferentemente, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es el propagermanio.

Aunque no se pretende quedar limitado a ningún modo de acción particular, en una opción preferente el inhibidor de receptores de quimioquina tiene una mayor afinidad y/o potencia y/o eficacia cuando interactúa con el receptor de quimioquina o modula sus rutas cadena abajo cuando el receptor de quimioquina está asociado con el receptor de angiotensina. Por ejemplo, el receptor de quimioquina y el receptor de angiotensina pueden estar asociados como un hetero-dímero/-oligómero de receptor de quimioquina / receptor de angiotensina. In una opción preferente adicional, cuando el inhibidor del receptor de quimioquina se administra a un sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con un bloqueador del receptor de angiotensina, la afinidad, potencia y/o eficacia combinadas es mayor que cuando se compara con la afinidad, potencia y/o eficacia que se podría haber conseguido cuando el inhibidor del receptor de quimioquina no se administra en combinación (ya sea de forma simultánea o de forma secuencial) con el bloqueador del receptor de angiotensina. Además incluso en una opción preferente, cuando el inhibidor del receptor de quimioquina se administra a un sujeto en combinación (ya sea de forma simultánea o de forma secuencial) con un bloqueador del receptor de angiotensina se logra un efecto sinérgico (medido por afinidad, potencia y/o eficacia).

Aunque no se pretende quedar limitado a ningún modo de acción particular, en una opción preferente el bloqueador del receptor de angiotensina tiene una afinidad y/o potencia y/o eficacia más elevada cuando interactúa con el receptor de angiotensina cuando el receptor de angiotensina está asociado con el receptor de quimioquina. Por ejemplo, el receptor de quimioquina y el receptor de angiotensina pueden estar asociados como un hetero-dímero / -oligómero de receptor de quimioquina / receptor de angiotensina. Además en una opción preferente, cuando el bloqueador del receptor de angiotensina se administra a un sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con un inhibidor de receptores de quimioquina, la combinada, potencia y/o eficacia combinadas es mayor que cuando se compara con la afinidad, potencia y/o eficacia que se habría logrado cuando el bloqueador del receptor de angiotensina no se administra en combinación (ya sea de forma simultánea o de forma secuencial) con el inhibidor

de receptores de quimioquina. Además incluso en una opción preferente, se logra un efecto sinérgico (medido por afinidad, potencia y/o eficacia) cuando el bloqueador del receptor de angiotensina se administra a un sujeto en combinación (ya sea de forma simultánea o de forma secuencial) con un inhibidor de receptores de quimioquina.

Fabricación de un medicamento

La divulgación también proporciona el uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y que al menos un inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de una forma de dosificación para el tratamiento de una enfermedad. La composición farmacéutica además puede comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Formas de dosificación, formulaciones y administración

La forma de dosificación proporcionada por la presente divulgación además puede comprender un vial, cartucho, recipiente, comprimido o cápsula que comprende la composición farmacéutica de la divulgación junto con instrucciones de dosificación para la administración de la forma de dosificación a un sujeto para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad.

Los niveles de dosificación de los compuestos de la divulgación normalmente serán del orden de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, con un intervalo de dosificación preferente entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal al día (de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 3 g por paciente al día). La cantidad de cada principio activo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una sola dosificación variará, dependiendo del hospedador que se va a tratar y el modo de administración en particular. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral para seres humanos puede contener de aproximadamente 5 mg a 1 g de cada compuesto activo con una cantidad apropiada y conveniente de material de vehículo, que puede variar de aproximadamente un 5 a un 95 por ciento de la composición total. Las formas de unidad de dosificación generalmente contendrán entre de aproximadamente 5 mg a 500 mg de principio activo.

Preferentemente, el bloqueador del receptor de angiotensina se proporciona a una dosis entre 50 mg y 500 mg al día. Incluso más preferentemente, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se proporciona a una dosis entre 150 mg y 300 mg al día. Por ejemplo, el bloqueador del receptor de angiotensina es Irbesartán y se administra a una dosis de 300 mg al día.

Preferentemente, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se proporciona a una dosis entre 5 mg y 2000 mg al día. Incluso más preferentemente el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina se proporciona a una dosis entre 5 mg y 50 mg al día. Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina es propagermanio y se proporciona a una dosis de 30 mg al día.

La forma de dosificación puede comprender de aproximadamente 5 mg a 1 g del bloqueador del receptor de angiotensina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y de aproximadamente 5 mg a 1 g del inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La forma de dosificación puede comprender una dosis diaria de bloqueador del receptor de angiotensina de entre aproximadamente 50 mg y 500 mg. El bloqueador del receptor de angiotensina puede ser Irbesartán, y la forma de dosificación puede comprender una dosis diaria de Irbesartán de aproximadamente 300 mg. La forma de dosificación también puede comprender una dosis diaria de inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina de entre aproximadamente 5 mg y 50 mg. El inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina puede ser propagermanio y la forma de dosificación puede comprender una dosis diaria de propagermanio de aproximadamente 30 mg.
Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico usado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad que se somete a terapia en particular.

Los medicamentos de la divulgación, en diversos aspectos, se pueden administrar por inyección, o se pueden preparar para administración oral, pulmonar, nasal o para cualquier otra forma de administración. Preferentemente, los medicamentos se administran, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracraneal, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, bucal, rectal, vaginal, intranasal o por administración mediante aerosol.

El modo de administración es en un aspecto al menos adecuado para la forma en que se ha preparado el medicamento. El modo de administración para la respuesta más eficaz se determina empíricamente en un aspecto y los medios de administración que se describen a continuación se dan como ejemplos, y no limitan el método de administración de la composición de la presente divulgación en modo alguno. Todas las formulaciones mencionadas anteriormente se usan comúnmente en la industria farmacéutica y son conocidas comúnmente por profesionales debidamente cualificados.

Los medicamentos de la divulgación en ciertos aspectos pueden incluir excipientes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables y se pueden administrar mediante cualquier técnica parenteral tal como inyecciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales. Además, las formulaciones pueden contener opcionalmente uno o más adyuvantes. Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéutico" es un disolvente, agente de suspensión, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para administrar los compuestos al sujeto. El vehículo puede ser líquido o sólido, y se selecciona teniendo en cuenta la forma de administración planificada.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen opcionalmente soluciones acuosas estériles (que son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. De forma alternativa, los compuestos de la divulgación están, en ciertos aspectos, encapsulados en liposomas y se administran en soluciones inyectables para ayudar a su transporte a través de la membrana celular. De forma alternativa o además, las preparaciones de ese tipo contienen constituyentes de estructuras de poros de autoensamblaje para facilitar el transporte a través de la membrana celular. El vehículo, en diversos aspectos, es un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se mantiene, por ejemplo y sin limitación, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se produce en ciertos aspectos mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

La divulgación también proporciona una composición farmacéutica inyectable de liberación sostenida que comprende una composición farmacéutica terapéuticamente eficaz de acuerdo con la divulgación, y un retardante de liberación. El retardante de liberación puede ser, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes que se han enumerado anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, la preparación en ciertos aspectos incluye, pero no se limita a, técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente filtrada estéril del mismo.

En el presente documento se contemplan para su uso formas de dosificación sólidas orales, que se describen generalmente en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el capítulo 89. Las formas de dosificación sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, trociscos o pastillas para chupar, sobrecitos o gránulos. Además, la encapsulación liposomal o proteinoide se puede usar para formular las presentes composiciones (tal como, por ejemplo, las microesferas proteinoides que se describen en el documento de patente de Estados Unidos N.º 4.925.673). La encapsulación liposomal se puede usar y los liposomas se pueden derivatizar con diversos polímeros (por ejemplo, documento de patente de Estados Unidos N.º 5.013.556). Una descripción de las posibles formas de dosificación sólidas para el agente terapéutico esta proporcionada por Marshall, en Modern Pharmaceutics, capítulo 10, Banker and Rhodes ed., (1979). En general, la formulación incluirá los compuestos que se describen como parte de la divulgación (o una forma químicamente modificada de los mismos) e ingredientes inertes que permiten la protección frente al en torno del estómago y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

Para el inhibidor de la ruta de receptores de quimioquina o bloqueador del receptor de angiotensina que se desvelan en el presente documento la ubicación de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la materia tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, pero liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte del intestino. En un aspecto, la liberación evitará los efectos nocivos del entorno del estómago, ya sea mediante la protección de la composición o mediante la liberación de los compuestos más allá del entorno del estómago, tal como en el intestino.

La divulgación además proporciona una composición farmacéutica de liberación sostenida oral que comprende una composición farmacéutica terapéuticamente eficaz que se desvela en el presente documento y un retardante de liberación.

En un aspecto de la presente divulgación, el retardante de liberación es un polímero soluble en agua, hinchable en agua y/o insoluble en agua. En particular, los polímeros solubles en agua se seleccionan entre el grupo que comprende etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, un revestimiento entérico; y una membrana semipermeable. En otro aspecto de la divulgación, el retardante de liberación es un retardante de liberación no polimérico. Más particularmente, el retardante de liberación no polimérico es aceite de ricino hidrogenado. Las composiciones que se desvelan en el presente documento se pueden moler o granular y se pueden comprimir formando comprimidos o se pueden en cápsula formando cápsulas de acuerdo con procedimientos convencionales

conocidos en la técnica.

Para garantizar una resistencia gástrica completa, se usa un revestimiento impermeable al menos a pH 5,0. Los ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como revestimientos entéricos son trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos revestimientos se pueden usar como películas mixtas.

Un revestimiento o mezcla de revestimientos también se puede usar en comprimidos, que no están destinados a la protección frente al estómago. Esto incluye, sin limitación, revestimientos de azúcar o revestimientos que hacen que el comprimido sea más fácil de tragar. Las cápsulas a modo de ejemplo consisten en una cubierta dura (tal como gelatina) para la administración de material terapéutico seco, es decir, polvo; para formas líquidas, se puede usar un revestimiento de gelatina blanda. El material del revestimiento de los sobrecitos en ciertos aspectos es almidón grueso u otro papel comestible. Para píldoras, pastillas para chupar, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, también se contemplan técnicas de masa húmeda, sin limitación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "liberación sostenida" se refiere a la liberación gradual pero continua o sostenida durante un periodo relativamente prolongado del contenido del compuesto terapéutico después de la ingesta oral. La liberación puede continuar después de que la composición farmacéutica haya pasado del estómago y hasta y después de que la composición farmacéutica llegue al intestino. La expresión "liberación sostenida" también se refiere a liberación retardada en el que la liberación del compuesto terapéutico no se inicia inmediatamente cuando la composición farmacéutica alcanza el estómago, sino que se retrasa durante un periodo de tiempo, por ejemplo, hasta que la composición farmacéutica llega al intestino. Al llegar al intestino, el aumento del pH puede desencadenar la liberación del compuesto terapéutico de la composición farmacéutica.

Dado que en el presente documento se usa la expresión "retardante de liberación", se refiere a una sustancia que reduce la tasa de liberación de un compuesto terapéutico de una composición farmacéutica cuando se ingiere por vía oral. El retardante de liberación puede ser un polímero o un no polímero. El retardante de liberación se puede usar de acuerdo con uno cualquiera de varios sistemas de liberación sostenida que incluyen, por ejemplo, un sistema de difusión, un sistema de disolución y/o un sistema osmótico.

En ciertos aspectos, el agente terapéutico se incluye en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o microgránulos de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas es, en ciertos aspectos, un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso en forma de comprimidos. En un aspecto, el agente terapéutico se podría preparar mediante compresión.

Opcionalmente se incluyen colorantes y aromatizantes. Por ejemplo, los compuestos se pueden formular (tal como, y sin limitación, mediante encapsulación de liposomas o microesferas) y a continuación se pueden contener en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

El volumen de los agentes terapéuticos, en un aspecto, se diluye o se aumenta con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, alfa-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Ciertas sales inorgánicas también se usan opcionalmente como cargas, incluyendo trifosfato cálcico, carbonato de magnesio y cloruro sódico. Algunos diluyentes disponibles en el mercado son Fast-Flo, Emdex, STARx 1500, Emcompress y Avicell.

En otras opciones, en la formulación del agente terapéutico se incluyen agentes disgregantes en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como agentes disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el agente disgregante comercial a base de almidón, Explotab. También se contemplan glicolato de almidón sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los agentes disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo también se usan opcionalmente como agentes disgregantes y como aglutinantes, y estas incluyen, pero no se limitan a, gomas en polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como agentes disgregantes.

Se contemplan aglutinantes para mantener unidos los compuestos terapéuticos para formar un comprimido duro e incluyen, pero no se limitan a, materiales de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) se contemplan para su uso en soluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

Un agente antifricción se puede incluir opcionalmente en la formulación del agente terapéutico para evitar la adherencia durante el proceso de formulación. Los agentes lubricantes se pueden usar opcionalmente como una capa entre el agente terapéutico y la pared del troquel, y estos pueden incluir, entre otros: ácido esteárico, incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles a modo de ejemplo, tales como laurilsulfato sódico, laurilsulfato de

magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y Carbowax 4000 y 6000.

Opcionalmente se pueden añadir sustancias de deslizamiento que podrían mejorar las propiedades de flujo del compuesto durante su formulación y para ayudar a la reorganización durante la compresión. Las sustancias de deslizamiento pueden incluir, pero no se limitan a, almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el en torno acuoso, en ciertas opciones se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, detergentes aniónicos tales como laurilsulfato sódico, dioctilsulfosuccinato sódico y dioctilsulfonato sódico. Opcionalmente se pueden usar detergentes catiónicos y podrían incluir, sin limitación, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. El listado de posibles detergentes no iónicos que se podrían incluir en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado 10, 50 y 60, monoesterato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Cuando se usan, estos tensioactivos pueden estar presentes en la formulación de los compuestos solos o como una mezcla en diferentes proporciones.

Los aditivos que potencialmente aumentan la absorción de los compuestos son, por ejemplo y sin limitación, los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. Las formulaciones también se contemplan. En ciertos aspectos, los compuestos se podrían incorporar en una matriz inerte que permitiera la liberación por mecanismos de difusión o lixiviación, es decir, gomas. En algunos aspectos, en la formulación también se pueden incorporar matrices que se degeneran lentamente. Otra forma de liberación controlada de este agente terapéutico es mediante un método basado en el sistema terapéutico de Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco está encerrado en una membrana semipermeable que permite que el agua entre y expulse el medicamento a través de una pequeña abertura debido a efectos osmóticos. Algunos revestimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retardada.

En otros aspectos, se podría usar una mezcla de materiales para proporcionar el revestimiento de película óptimo. El revestimiento con película se puede llevar a cabo, por ejemplo y sin limitación, en una bandeja de revestimiento o en un lecho fluidizado o mediante revestimiento por compresión.

En el presente documento también se contempla la administración pulmonar de los compuestos. En estos aspectos, los compuestos se pueden administrar a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hacia el torrente sanguíneo.

Para su uso en la práctica de la presente divulgación se contempla una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para administración pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la materia.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado adecuados para la práctica de la presente divulgación son, por ejemplo y sin limitación, el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación de los compuestos. Por lo general, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo usado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles en la terapia. Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de vehículos.

Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, por lo general comprenderán los compuestos suspendidos en agua. La formulación también puede incluir, en un aspecto, un tampón y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización de proteínas y la regulación de la presión osmótica). En una opción, la formulación del nebulizador también puede contener un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie de los compuestos causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderán, en un aspecto, un polvo finamente dividido que contiene los compuestos suspendidos en un agente propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El agente propulsor puede ser cualquier material convencional usado para esta finalidad, tal como, pero no limitado a, un clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, que incluye triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, trioleato de sorbitán y lecitina de soja. En ciertos aspectos el ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

Las formulaciones que se van a administrar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el compuesto y también pueden incluir un agente de carga, tal como y sin limitación, lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, de un 50 a un 90 % en peso de la formulación. En ciertas opciones, el compuesto(s) se prepara(n) en forma de partículas con un tamaño de partícula promedio de menos de 10 micrómetros, lo más preferentemente de 0,5 a 5 µm, para una administración más eficaz al pulmón distal.

También se contempla la administración nasal de los compuestos. La administración nasal permite el paso de la proteína al torrente sanguíneo directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquellas que contienen, por ejemplo y sin limitación, dextrano o ciclodextrano.

Se observará que en ciertos aspectos, los medicamentos que se desvelan en el presente documento se pueden administrar como una programación de dosis única, o preferentemente, en una programación de dosis múltiple. Una programación de dosis múltiples es aquella en la que un ciclo primario de administración se puede llevar a cabo con 1 a 10 dosis separadas, seguido opcionalmente por otras dosis administradas en los intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener o reforzar el tratamiento. El régimen de dosificación también estará determinado, al menos en parte, por las necesidades del individuo y el criterio del profesional.

Por lo tanto la divulgación proporciona un comprimido que comprende la composición farmacéutica que se desvela en el presente documento; una cápsula que comprende la composición farmacéutica que se desvela en el presente documento y la suspensión inyectable que comprende la composición farmacéutica que se desvela en el presente documento, y una composición para administración pulmonar que comprende la competencia farmacéutica que se desvela en el presente documento.

Evaluación de la eficacia de las composiciones farmacéuticas

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una composición farmacéutica que se desvela en el presente documento, en el que el método incluye una etapa seleccionada entre el grupo que incluye: evaluar la migración quimiotáctica *in vitro* de monocitos por MCP-1 mediante un ensayo bioquímico o celular *in vitro*; medición de la producción de fosfato de inositol, la fosforilación de quinasa regulada por vía extracelular (ERK) o la producción de AMPc; medir el efecto de la composición usando tecnologías sin marcas, tales como el uso de impedancia, refracción de luz o redistribución de carga; medir el acoplamiento de la proteína G usando sistemas indicadores de proximidad u otros enfoques; mediante el reclutamiento o señalización mediada por β-arrestina; medir el efecto de la composición usando sistemas indicadores basados en factor de transcripción; usar técnicas bioquímicas o celulares *in vitro* para medir la localización celular, tal como visualización mediante microscopía usando marcas fluorescentes, uso de anticuerpos (tales como ensayos de inmunoabsorción unidos a enzimas) y clasificación celular activada por fluorescencia; medir los niveles *in vivo* de creatinina y urea plasmáticas, como indicativos de la función renal, tal como por medio de un autoanalizador; medir los niveles de proteinuria, medir los niveles de albuminuria mediante un radioinmunoensayo; medir GFR (técnica isotópica de disparo único); evaluar la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular u otra estructura tisular mediante microscopía óptica (LM); evaluar la presencia y/o grado de hipertrofia glomerular y/o cardiaca, glomeruloesclerosis y/o fibrosis; evaluar el grado de deposición de la matriz, evaluar la modulación de los factores de crecimiento profibróticos y su actividad; evaluar la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular y/u otra estructura tisular; y evaluar la presión arterial sistólica, modulación de glucosa plasmática en ayunas con insulina, y/o modulación de la Hemoglobina A1c.

Además en otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para evaluar la actividad de inhibición o inhibición parcial de una composición farmacéutica que se desvela en el presente documento, en el que la inhibición o inhibición parcial está indicada por una mejora cualitativa en la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular y/u otra estructura tisular tal como se mide mediante uno o más de los siguientes: niveles de creatinina y urea en plasma; niveles de proteinuria, niveles de albuminuria; GFR (usando la técnica isotópica de disparo único); integridad de la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular; el grado de deposición de la matriz; modulación de la actividad de factores de crecimiento profibróticos; microscopía óptica (LM) para la evaluación de hipertrofia glomerular y/o cardiaca, glomeruloesclerosis y/o fibrosis; inmunohistoquímica para medir el grado de deposición de la matriz y modulación de los factores de crecimiento profibróticos y su actividad; y técnicas de biología molecular para evaluar la estructura renal y/o cardiaca y/u ocular.

A continuación la divulgación se describirá adicionalmente solo a modo de referencia con respecto a los siguientes ejemplos no limitantes. Sin embargo se debería entender que los siguientes ejemplos son solo ilustrativos, y no se deberían tomar en modo alguno como una limitación de los términos generales de la divulgación que se ha descrito anteriormente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Reducción de proteinuria en el modelo de STNx (baja dosis de propagermanio)

Cirugía de nefrectomía subtotal (STNx)

Animal

Las ratas Sprague-Dawley (SD) macho, de seis semanas de edad con un peso de 200-250 g se obtienen en el Animal Resources Centre (Australia occidental). El estudio con animales se lleva a cabo con la aprobación del comité de ética animal (Hospital St Vincent y la fundación de salud nacional e investigación médica de Australia). Todas las ratas reciben pienso para rata normal (Dieta para roedores certificada con N.º 5002, LabDiet, USA) y agua potable a voluntad. Todos los animales se alojan en un entorno estable mantenido a 22 ± 1 ºC con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas comenzando a las 6 a.m. La cirugía de STNx se lleva a cabo en el quirófano en la unidad quirúrgica experimental del hospital St Vincent. Todos los procedimientos quirúrgicos se modifican a partir de los que se han descrito previamente (Gilbert, R. E., L. L. Wu, *et al.* (1999). "Pathological expression of renin and angiotensin II in the renal tubule after subtotal nephrectomy. Implications for the pathogenesis of tubulo interstitial fibrosis." Am J Pathol 155 (2): 429-40.; Kelly, D. J., A. J. Edgley, *et al.* (2009). "Protein kinase C-beta inhibition attenuates the progression of nephropathy in non-diabetic kidney disease." Nephrol Dial Transplant 24 (6): 1782-90; Kelly, D. J., C. Hepper, *et al.* (2003). "Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model". Nephrol Dial Transplant 18(7): 1286-92.; Wu, L, A. Cox, *et al.* (1997). "Transforming growth factor β1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: Role of the renin-angiotensin system". Kidney Int 51: 1553-1567).

Cuidados preoperatorios

La tarde anterior a la cirugía, las ratas se pesan y se les administra una dosis de antibióticos (oxitetraciclina, 30 mg/kg) como profilaxis por sonda oral. Las ratas se mantienen en ayunas durante la noche.

Cuidados operatorios

• Anestesia

La anestesia se induce con isoflurano al 2,5 % mezclado con oxígeno en una caja de plástico Perspex.

Una vez anestesiada, la rata se coloca boca arriba sobre una almohadilla térmica (mantenida a 37 ºC), y a continuación se coloca una mascarilla sobre la nariz y la boca de la rata para administrar isoflurano, manteniendo la anestesia con isoflurano al 1-2 %/ oxígeno al 97 % en un volumen corriente de 1 ml/100 g de peso corporal.

• Preparación de la piel

El área abdominal de la rata se afeita desde el esternón hasta el área pélvica usando tijeras. El área afeitada se limpia 3 veces con clorhexidina en alcohol al 70 %, con un movimiento circular, comenzando en el punto de incisión (línea media) y limpiando hacia afuera.

• Cirugía

Una funda quirúrgica fenestrada se coloca sobre el sitio de la incisión y se hace una incisión en la piel de 10 mm por debajo del esternón a 10 mm por encima de los genitales con una hoja de bisturí n.º 23. A continuación, la capa muscular se expone y se levanta con pinzas de tejido para permitir una incisión a lo largo de la línea alba (la fascia que une las capas musculares a lo largo de la línea media). Este aumento de la capa muscular evita que los intestinos se dañen accidentalmente con instrumentos afilados.

Una vez que se hace un pequeño agujero en la capa muscular usando una cuchilla de bisturí, se usan unas tijeras finas para completar la incisión. Con ambas incisiones completas, se coloca una gasa sobre la funda quirúrgica que rodea el sitio de la incisión y se usa solución salina al 0,9 % para humedecer la gasa. Usando bastoncillos de algodón humedecidos, el riñón izquierdo se coloca y se eleva sobre la gasa. Bajo el microscopio, se usan pinzas dentadas y bastoncillos de algodón para diseccionar la grasa de la pelvis renal y exponer las ramas de las arterias renales justo antes al riñón. Las ramas individuales de las arterias renales (3-4) a continuación se aíslan mediante disección roma con pinzas finas. A continuación se pasa seda 4.0 por debajo de las arterias hasta que se aíslen suficientes arterias para incapacitar el flujo sanguíneo a 2/3 del riñón, dejando esta área muerta. Una vez que se determina que no hay sangrado y que 1/3 del riñón sigue funcionando, el riñón se coloca nuevamente en el abdomen.

A continuación el riñón derecho se expone y se extrae la cápsula renal. La seda 4.0 se usa para atar el riñón en la pelvis renal, ligando todo el riñón y el uréter. Se atan tres nudos en un lado, la seda se teje en el otro lado y otros tres nudos se atan en el otro lado. A continuación se corta el riñón. Cuando se determina que no hay sangrado, el muñón vascular se vuelve a colocar en el abdomen. El riñón izquierdo se puede volver a verificar para asegurarse de que el cambio de color sea suficiente y que el 1/3 restante del riñón siga funcionando. Se revisan los uréteres

izquierdo y derecho sin daños, a continuación se colocan 2,0 ml de solución salina al 0,9 % en el abdomen para ayudar a rehidratar a la rata en caso de pérdida de líquido mientras la cavidad estaba abierta.

• Cierre de la herida

A continuación se usan suturas solubles 5.0 (PGA - suturas de ácido poliglicólico) para coser la capa muscular en una puntada continua. A continuación la piel se cose con una puntada continua de seda 4.0. A continuación, el área se limpia con clorhexidina en alcohol al 70 % para eliminar la sangre de la piel. A continuación se retira la máscara anestésica y el aerosol Op-site (pulverización de tejido) se rocía sobre el sitio de la incisión para añadir una barrera adicional para protección frente a la infección. Cuando la rata comienza a despertarse de la anestesia, se administra Buprenorfina (Temgesic) a una dosis de 0,03 mg/kg por vía subcutánea.

• Periodo de recuperación

A continuación se deja que la rata se recupere en una almohadilla térmica mantenida a 37 ºC.

Cuidados postoperatorios

Después de la operación, se administra una solución de glucosa al 5 % en una botella para beber junto con una botella de agua para dar a las ratas la opción de beber una u otra. Los alimentos también se colocan en el fondo de la caja para facilitar la alimentación. De 12 a 24 horas después de la cirugía, si la rata no está comiendo o bebiendo, se administra buprenorfina por vía subcutánea. De 24 a 48 horas después de la cirugía, si la rata parece deprimida, reacia a moverse o está en posición encorvada, esto puede ser el resultado de una insuficiencia renal. En este caso, las ratas se sacrifican usando una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg por vía ip).

Cada 4 semanas, la presión arterial sistólica (SBP) se determinará en ratas conscientes calentadas previamente mediante una pletismografía con manguito de la cola usando un controlador de presión arterial no invasivo (NIBP) y Powerlab (AD instruments, NSW, Australia).

Cirugía simulada

Las ratas de control se someterán a una cirugía simulada que consiste en laparotomía como se ha descrito anteriormente y manipulación de ambos riñones sin diseccionar arterias renales antes del cierre de la herida.

Diseño y procedimientos de estudio

Los tratamientos comienzan 14 días después de la cirugía. Largo plazo (12 semanas)

• Grupos sin tratar

Grupos 1, 2 sin tratar: Control, Diabético

• Grupo de agente único

Grupo 3 STNx + Irbesartán (ARB) (10 mg/kg/día)

• Grupo de combinación

Grupo 4 STNx + Irbesartán (10 mg/kg/día) / Propagermanio (3 mg/kg/día)
n = 16 ratas por grupo

Parámetros clínicos

Las mediciones en serie de la presión arterial sistólica (SBP) y los parámetros clínicos se llevaron a cabo a intervalos de acuerdo con protocolos convencionales para estudios en animales (cada 4 semanas) (Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, T.J. A, *et al*.: A new model of progressive diabetic renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat. Kidney Int. 54: 343-352, 1998).

Función renal y cardiaca (puntos finales primarios)

Las mediciones en serie de la función renal se llevaron a cabo mediante la medición de creatinina y urea plasmáticas (autoanalizador), albuminuria (radioinmunoensayo, cada 4 semanas) y GFR (técnica isotópica de disparo único, 4 y 12 semanas) de acuerdo con protocolos convencionales para estudios en animales (Kelly *et al*., 1998).

Experimentos futuros - estructura renal y cardiaca (puntos finales secundarios)

Los experimentos adicionales que se podrían llevar a cabo incluyen la evaluación de puntos finales secundarios tales como estructura renal y cardiaca. Por ejemplo, la microscopía óptica (LM) se podría usar para medir hipertrofia glomerular y cardiaca, glomeruloesclerosis y fibrosis. La inmunohistoquímica se podría usar para medir el grado de deposición de la matriz y la modulación de los factores de crecimiento profibróticos y su actividad. La biología molecular también se podría usar para evaluar la estructura renal y cardiaca.

Consideraciones estadísticas

Las comparaciones entre grupos de animales se llevaron a cabo usando un ANOVA con un ensayo a posteriori de Fisher. Se ha calculado que la justificación del uso de animales es n = 16 ratas por grupo (n = 8 para histología, n = 8 para biología molecular). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La albuminuria se analizó tras la transformación logarítmica de los datos y las medias geométricas x/÷ factores de tolerancia.

Como se muestra en la Figura 1, se lograron niveles mejorados de proteinuria en el modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de enfermedad renal de órganos terminal cuando los animales fueron tratados con una combinación de un bloqueador del receptor de angiotensina y una dosis baja de propagermanio (STNx + Irb + PPG) en comparación con los animales con STNx sin tratar y animales tratados con el bloqueador del receptor de angiotensina solo (STNx + Irb).

Ejemplo 2 - Reducción de la proteinuria en el modelo de STNx (dosis alta de propagermanio)

Como se ha descrito para el Ejemplo 1 pero con los siguientes tratamientos:

Diseño y procedimientos de estudio

Los tratamientos comienzan 14 días después de la cirugía. Largo plazo (12 semanas)

• Grupos sin tratar

Grupos 1, 2 sin tratar: Control, Diabético

• Grupo de agente único

Grupo 3 STNx + Irbesartán (ARB) (10 mg/kg/día) o STNx + Propagermanio (30 mg/kg/día)

• Grupo de combinación

Grupo 4 STNx + Irbesartán (10 mg/kg/día) / Propagermanio (3 mg/kg/día)
n = 16 ratas por grupo

Como se muestra en la Figura 2, se lograron niveles mejorados de proteinuria en el modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de enfermedad renal de órganos terminal cuando los animales fueron tratados con una combinación de un bloqueador del receptor de angiotensina y una dosis elevada de propagermanio (STNx + PPG + Irb) en comparación con los animales con STNx sin tratar, animales con STNx tratados con una dosis elevada de propagermanio solo (STNx + PPG), y animales con STNx tratados con el bloqueador del receptor de angiotensina solo (STNx + Irb).

Las secciones histológicas se obtuvieron a partir del modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de enfermedad renal de órganos terminal que se ha descrito anteriormente y se tiñeron de acuerdo con procedimentos convencionales para detectar podocitos en el glomérulo. Las secciones histológicas se evaluaron mediante microscopía de contraste de fases. La Figura 3 nuestras células teñidas con un color marrón intenso (podocitos) en el glomérulo de muestras venales obtenidas a partir de animales de control sin tratar (A); STNx en tratar (B); STNx tratados con propagermanio (C); STNx tratados con Irbesartán (D); y STNx tratados con propagermanio e Irbesartán en combinación (E). La Figura 4 muestra un gráfico de barras de la mejora de los números de podocitos detectados. Se puede observar que el nivel de podocitos en animales tratados con una combinación de Irbesartán y propagermanio fue mayor que el de los animales sin tratar sometidos al modelo de nefrectomía subtotal (STNx) de enfermedad renal de órganos terminales y animales con STNx tratados con cualquiera de propagermanio o Irbesartán solo.

Ejemplo 3 - Después de la coexpresión de AT1R y CCR2 mediante transfección transitoria de células HEK293FT, la inhibición combinada de ambos receptores bloquea el reclutamiento de arrestina en mayor medida que la inhibición de cualquier receptor solo

El efecto combinado de la inhibición de CCR2 y AT1R *in vitro* se investigó usando RS504393 en combinación con Irbesartán.

La Figura 5 muestra el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en el reclutamiento de β-arrestina 2. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con plásmidos que codifican β-arrestina 2-Venus y los receptores

indicados: CCR2-Rluc8 (panel en la parte superior), AT1R-Rluc8 (panel en la parte media) o AT1R-Rluc8 y CCR2 sin marcar (panel en la parte inferior).

Las células se recogieron 24 h después de la transfección en medio completo sin rojo fenol tamponado con HEPES que contenía FCS al 5 % y se añadieron a una placa de 96 pocillos de color blanco revestida con poli-L-lisina . 48 h después de la transfección, la placa se incubó a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante 2 horas con EnduRen 30 µM (Promega) para asegurar que se había alcanzado el equilibrio del sustrato.

En primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 µM), RS504393 (10 µM) o ambos combinados. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la señal de BRET se midió.

La detección de BRET se lleva a cabo en células vivas midiendo las emisiones de luz secuenciales a 400-475 nm y 520-540 nm antes y después de la adición de agonista. La señal de BRET se calculó restando la proporción de emisión a 520-540 nm con respecto a la emisión a 400-475 nm para una muestra celular tratada con vehículo de la misma proporción para una segunda alícuota de las mismas células tratadas con ligando (BRET inducido por ligando). Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Como se muestra en la Figura 5 (panel en la parte superior), 10 µM de RS504393 pero no de Irbesartán redujo sustancialmente la señal de BRET inducido por MCP-1 entre CCR2-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus. La combinación de ambos antagonistas no alteró sustancialmente el efecto inhibidor de RS504393 (Figura 5: panel en la parte superior). Por el contrario, en células que coexpresan AT1R-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus, 10 µM de Irbesartán pero no de RS504393 bloqueó sustancialmente la respuesta de BRET inducido por AngII y su combinación no dio ningún efecto negativo tal como se esperaba (Figura 5: panel en la parte media).

Sin embargo, en células que coexpresan AT1R-Rluc8, β-arrestina 2-Venus y CCR2 sin marcar en las que tanto AngII como MCP-1 indujeron aumentos de BRET en diferentes grados, parece que Irbesartán bloquea sustancialmente el BRET inducido por AngII pero no por MCP-1 (Figura 5: panel en la parte inferior). Del mismo modo, RS504393 bloqueó parcialmente la señal de BRET promovida por MCP-1 pero no por AngII (Figura 5: panel en la parte inferior). De manera importante, la combinación de ambos antagonistas redujo la respuesta de BRET a niveles inferiores a los observados con cualquier antagonista individual solo, proporcionando evidencias *in vitro* de una mayor inhibición de la respuesta celular mediada por receptores, en este caso el reclutamiento de β-arrestina, como consecuencia de inhibición de receptores combinada.

Ejemplo 4 - Después de la coexpresión de AT1R y CCR2 mediante transfección transitoria de células HEK293FT, la inhibición combinada de ambos receptores bloquea la señalización de fosfato de inositol en mayor medida que la inhibición de cualquier receptor solo

Para investigar el efecto combinado de la inhibición de CCR2 y AT1R *in vitro* se usó RS504393 en combinación con Irbesartán.

La Figura 6 muestra el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en producción de fosfato de inositol. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que codifican AT1R-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de CCR2 sin marcar. 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar las mediciones de producción de fosfato (IP1) de inositol (1) inducida por agonistas usando el kit IP-One Tb (Cisbio Bioassays, Bagnol sur Ceze, Francia).

En primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 µM), RS504393 (10 µM) o ambos combinados. A continuación las células se incubaron durante un periodo adicional de 30 minutos a 37 ºC en el tampón de estimulación (HEPES 10 mM, pH 7,4, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, KCl 4 mM, NaCl 146 mM, glucosa 5,5 mM, y LiCl 50 mM) que contiene 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos. A continuación las células se sometieron a lisis mediante la adición los reactivos de ensayo HTRF®, el anticuerpo anti-IP1 marcado con Criptato de Terbio , y el análogo de IP1 marcado con d2, diluido previamente en el tampón de lisis que contenía Triton X-10 al 1 %. El ensayo se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y la fluorescencia del Criptato de Terbio y la señal de FRET en tiempo resuelto se midieron 50 µs después de excitación a 340, 620, y 665 nm, respectivamente, usando el lector de placas de múltiples marcas EnVision 2102 (PerkinElmer).

Los datos se normalizan como un porcentaje de la producción de IP1 inducida por AngII en células que expresan AT1R solo. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Como se muestra en la Figura 6 (panel en la parte superior), 10 µM de Irbesartán, pero no de RS504393, anuló sustancialmente la producción de IP1 inducida por AngII en células que expresan AT1R-Rluc8. El efecto del Irbesartán no se vio alterado sustancialmente por su combinación con RS504393 en ausencia de coexpresión de CCR2, lo que demuestra la especificidad del antagonista .

En células que coexpresan tanto AT1R-Rluc8, CCR2, además la respuesta de IP1 mediada por AngII, también parece que MCP-1 estimula una respuesta de IP1 parcial (Figura 6: panel en la parte inferior). De forma interesante, el Irbesartán redujo parcialmente la producción de IP1 inducida por MCP-1, así como la inhibición sustancial de la respuesta inducida por AngII (Figura 6: panel en la parte inferior). Por el contrario, RS504393 tuvo un pequeño efecto en la producción de IP1 inducida por AngII, pero inhibió de forma sustancial y selectiva la respuesta de IP1 inducida por MCP-1 (Figura 6: panel en la parte inferior). De manera más interesante, la combinación de ambos antagonistas anuló sustancialmente la producción de IP1 estimulada tanto por MCP-1 como por AngII ya que los dos receptores se inhiben de forma simultánea (Figura 6: panel en la parte inferior). En conjunto, estos datos indican claramente la especificidad la respuesta de IP1 dependiente de MCP-1 mediante CCR2 e implican que se requiere la activación tanto de AT1R como de CCR2 para una respuesta de ese tipo. Además, estos hallazgos proporcionan evidencias adicionales *in vitro* de una mayor inhibición de la respuesta celular mediada por receptores, en este caso la producción de fosfato de inositol, como consecuencia de la inhibición de receptores combinada.

Ejemplo 5 - Después de la coexpresión de AT1R y CCR2 mediante transfección transitoria de células HEK293FT, la inhibición combinada de ambos receptores bloquea el reclutamiento de arrestina en mayor medida que la inhibición de cualquier receptor solo, tal como se observa usando la orientación opuesta del receptor marcado con respecto al no marcado y usando cualquiera de dos antagonistas de AngII diferentes

El efecto combinado de la inhibición de CCR2 y AT1R *in vitro* se investigó usando RS504393 en combinación con Irbesartán o EXP3174, el metabolismo activo de Losartán.

La Figura 7 muestra el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en el reclutamiento de β-arrestina 2. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria mediante los plásmidos que codifican CCR2-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de AT1R marcado con hemaglutinina (HA).

Las células se recogieron 24 h después de la transfección en medio completo sin rojo fenol tamponado con HEPES que contenía FCS al 5 % y se añadieron a una placa de 96 pocillos de color blanco revestida con poli-L-lisina . 48 h después de la transfección, la placa se incubó a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante 2 horas con EnduRen 30 µM (Promega) para asegurar que se había alcanzado el equilibrio del sustrato.

En primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con Irbesartán (10 µM), EXP3174 (el metabolismo activo de Losartán; 10 µM), RS504393 (10 µM) o combinaciones de Irbesartán y RS504393 o de EXP3174 y RS504393. A continuación las células se estimularon o no durante 30 minutos a 37 ºC con 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos y la señal de BRET se midió.

La detección de BRET se llevó a cabo en células vivas midiendo las emisiones de luz secuenciales a 400-475 nm y 520-540 nm antes y después de la adición de agonista. La señal de BRET se calculó restando la proporción de emisión a 520-540 nm con respecto a la emisión a 400-475 nm para una muestra celular tratada con vehículo de la misma proporción para una segunda alícuota de las mismas células tratadas con ligando (BRET inducido por ligando).

Como se muestra en la Figura 7 (panel en la parte superior), en células que coexpresan CCR2-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus, 100 nM de AngII no tuvieron efecto. 10 µM de RS504393, pero ni Irbesartán ni EXP3174, bloquearon sustancialmente la respuesta de BRET inducido por MCP-1 y su combinación no dio ningún efecto diferente tal como se esperaba (Figura 7: panel en la parte superior).

Sin embargo, en células que coexpresan CCR2-Rluc8, β-arrestina 2-Venus y AT1R marcado con HA en las que tanto AngII como MCP-1 indujeron aumentos de BRET en diferentes grados, RS504393 inhibió sustancialmente el BRET inducido por MCP-1 pero no el inducido por AngII (Figura 7: panel en la parte inferior). Del mismo modo, Irbesartán o EXP3174 bloquearon parcialmente la señal de BRET estimulada por AngII pero no estimulada por MCP-1 (Figura 7: panel en la parte inferior). Sin embargo de manera notable, con el tratamiento combinado de MCP-1 y AngII, una señal de BRET sustancial permaneció a pesar del tratamiento con RS504393. De manera importante, la combinación de Irbesartán o EXP3174 con RS504393 redujo la respuesta de BRET a niveles por debajo de los observados con cualquier antagonista individual solo, proporcionando evidencias *in vitro* de una mayor inhibición de la respuesta celular mediada por receptores, en este caso el reclutamiento de β-arrestina, como una consecuencia de la inhibición de receptores combinada.

Ejemplo 6 - Después de la coexpresión de AT1R y CCR2 mediante transfección transitoria de células HEK293FT, la inhibición combinada de ambos receptores bloquea la señalización de fosfato de inositol en mayor medida que la inhibición de cualquier receptor solo, tal como se demuestra con otro antagonista de AngII, EXP3174, el metabolismo activo de Losartán

RS504393 se usó en combinación con EXP3174 para investigar el efecto combinado de la inhibición de CCR2 y AT1R *in vitro.*

La Figura 8 muestra el efecto del bloqueo de AT1R y CCR2 en la producción de fosfato de inositol. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que codifican AT1R-Rluc8 y β-arrestina 2-Venus en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de CCR2 sin marcar. 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar las mediciones de producción de fosfato (IP1) de inositol (1) inducida por agonistas usando el kit IP-One Tb (Cisbio Bioassays, Bagnol sur Ceze, Francia).

En primer lugar las células se incubaron previamente o no durante 30 minutos a 37 ºC con EXP3174 (10 μM), RS504393 (10 μM) o ambos combinados. A continuación las células se incubaron durante un periodo adicional de 30 minutos a 37 ºC en el tampón de estimulación (HEPES 10 mM, pH 7,4, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, KCl 4 mM, NaCl 146 mM, glucosa 5,5 mM, y LiCl 50 mM) que contenía 100 nM de AngII, MCP-1 o ambos juntos. A continuación las células se sometieron a lisis mediante la adición de los reactivos de ensayo HTRF®, el anticuerpo anti-IP1 marcado con Criptato de Terbio , y el análogo de IP1 marcado con d2, diluido previamente en el tampón de lisis que contenía Triton X-10 al 1 %. El ensayo se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y la fluorescencia del Criptato de Terbio y la señal de FRET en tiempo resuelto se midieron 50 μs después de excitación a 340, 620, y 665 nm, respectivamente, usando el lector de placas de múltiples marcas EnVision 2102 (PerkinElmer). Los datos se muestran como IP1 inducido (unidades arbitrarias). El kit IP-One Tb es un ensayo de competición y por lo tanto la inducción de IP1 da como resultado una disminución de la señal absoluta del ensayo. Por lo tanto, el IP1 inducido (unidades arbitrarias) se genera restando la señal inducida por ligando a partir de la señal basal del ensayo.

Como se muestra en la Figura 8 (panel en la parte superior), 10 μM de EXP3174, pero no de RS504393, anuló la producción de IP1 inducida por AngII en células que expresan AT1R-Rluc8. El efecto de EXP3174 no se alteró sustancialmente por su combinación con RS504393 en ausencia de coexpresión de CCR2, lo que demuestra la especificidad del antagonista .

En células que coexpresan tanto AT1R-Rluc8 como CCR2, además la respuesta de IP1 mediada por AngII, también parece que MCP-1 estimula una respuesta de IP1 parcial (Figura 8: panel en la parte inferior). EXP3174 inhibió sustancialmente la respuesta inducida por AngII (Figura 8: panel en la parte inferior). Por el contrario, RS504393 tenía poco efecto en la producción de IP1 inducida por AngII, pero inhibió de forma sustancial y selectiva la respuesta de IP1 inducida por MCP-1 (Figura 8: panel en la parte inferior). De manera más interesante, la combinación de ambos antagonistas anuló sustancialmente la producción de IP1 estimulada tanto por MCP-1 como por AngII ya que los dos receptores se inhiben de forma simultánea (Figura 8: panel en la parte inferior). Estos hallazgos proporcionan evidencias *in vitro* adicionales para una mayor inhibición de la respuesta celular mediada por receptores, en este caso la producción de fosfato de inositol, como consecuencia de la inhibición de receptores combinada.

Ejemplo 7 - La activación específica del AT1R inhibe el acoplamiento a Gαi1 mediado por MCP-1 de una manera dependiente de la dosis, proporcionando evidencias in vitro de AT1R modulando la función de CCR2 y proporcionando un razonamiento adicional para la inhibición de CCR2 además de AngII.

La Figura 9 muestra curvas de dosis-respuesta que indican el efecto de la activación de CCR2 en ausencia y presencia de AT1R activado en términos de acoplamiento a Gαi1 tal como se mide con BRET inducido por ligando. Las células HEK293FT se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que codifican $G\alpha_{i1}$-Rluc8 y que CCR2-YFP en ausencia (panel en la parte superior) y presencia (panel en la parte inferior) de AT1R marcado con hemaglutinina (HA). 48 h después de la transfección, las células se usaron para generar los datos de la señal de BRET inducido por agonistas en células vivas a diversas concentraciones de MCP-1 o a diversas concentraciones de AngII en presencia de MCP-1 100 nM.

Después de la adición de sustrato de BRET, la detección de BRET se llevó a cabo en células vivas midiendo las emisiones de luz secuenciales a 400-475 nm y que 520-540 nm antes y después de la adición de agonista. La señal de BRET se calculó restando la proporción de emisión a 520-540 nm con respecto a la emisión a 400-475 nm para una muestra celular tratada con vehículo de la misma proporción para una segunda alícuota de las mismas células tratadas con ligando (BRET inducido por ligando). La activación de CCR2 dio como resultado una disminución de la proporción de BRET, indicando que la activación daba como resultado un cambio de la conformación de una proteína Gαi1 ensamblada previamente con CCR2, como también se ha descrito recientemente para la interacción de PARI-Gαi1 (Ayoub MA, Trinquet E, Pfleger KDG y Pin JP (2010) Differential association modes of the thrombin receptor PARI with Gαi1, Gα12 and β-arrestin 1. FASEB J 24: 3522-3535). Por lo tanto, los datos se han representado como 'Cambio en BRET (% de Control)' de modo que el cambio en la señal de BRET observada con MCP-1 1 μM se designa como un 100 %, y ningún cambio en la señal de BRET se designa como un 0 %.

MCP-1 altera la distancia y/o orientación entre Rluc8 e YFP fusionados con Gαi1 y CCR2 respectivamente de una manera dependiente de la dosis indicativo de activación de receptor y acoplamiento a la señalización mediada por Gαi1. En ausencia de coexpresión de AT1R, el aumento de las dosis de AngII no altera el cambio inducido por MCP-1 en la señal de BRET observada (Figura 9: panel en la parte superior). Por el contrario, cuando AT1R se coexpresa, AngII inhibe el cambio inducido por MCP-1 en la señal de BRET de una manera dependiente de la dosis (Figura 9: panel en la parte inferior).

Este ejemplo proporciona evidencias de la inhibición de AngII de la activación inducida por MCP-1 del acoplamiento de Gαi1 por CCR2. Por lo tanto, se podría esperar que el bloqueo de AngII solo usando un antagonista de AngII eliminara está inhibición de la señalización de Gαi1 inducida por MCP-1. Se podría esperar que el tratamiento con un inhibidor de la ruta de CCR2 en combinación con un antagonista de AngII previniera la activación de Gαi1 mediado por CCR2 que se exacerba por el bloqueo de AT1R.

Por lo tanto este ejemplo además proporciona evidencias *in vitro* que apoyan el razonamiento del uso de una combinación de inhibidor de la ruta de CCR2 y antagonista de AT1R.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

a) al menos un bloqueador del receptor de angiotensina de tipo 1 (AT_1R) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, y
b) al menos un inhibidor del receptor de quimioquina 2 (CCR2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo elegido entre el listado que consiste en un antagonista de CCR2 directo; un agonista de CCR2 inverso; y un modulador de CCR2 alostérico negativo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio,

para su uso en el tratamiento de una enfermedad renal seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

2. Al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, y al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, en una forma de dosificación, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad, opcionalmente en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma simultánea o de forma secuencial, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

3. El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma simultánea.

4. El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma secuencial, opcionalmente en segundos, minutos, días, semanas o meses entre sí.

5. Al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

6. Al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el inhibidor de CCR2 es propagermanio, para su uso en medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad en el que el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial con al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el bloqueador de AT_1R es irbesartán, en el que la enfermedad es una enfermedad renal asociada con proteinuria seleccionada entre el grupo que comprende: trastornos fibróticos en el riñón, enfermedad renal crónica causada por nefropatía diabética, insuficiencia renal, afecciones por insuficiencia renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal primaria.

7. El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o el al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo están en una forma de dosificación.

8. El al menos un bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o al menos un inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, o 7, en el que la forma de dosificación comprende de aproximadamente 5 mg a 1 g del bloqueador de AT_1R o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y de aproximadamente 5 mg a 1 g del inhibidor de CCR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

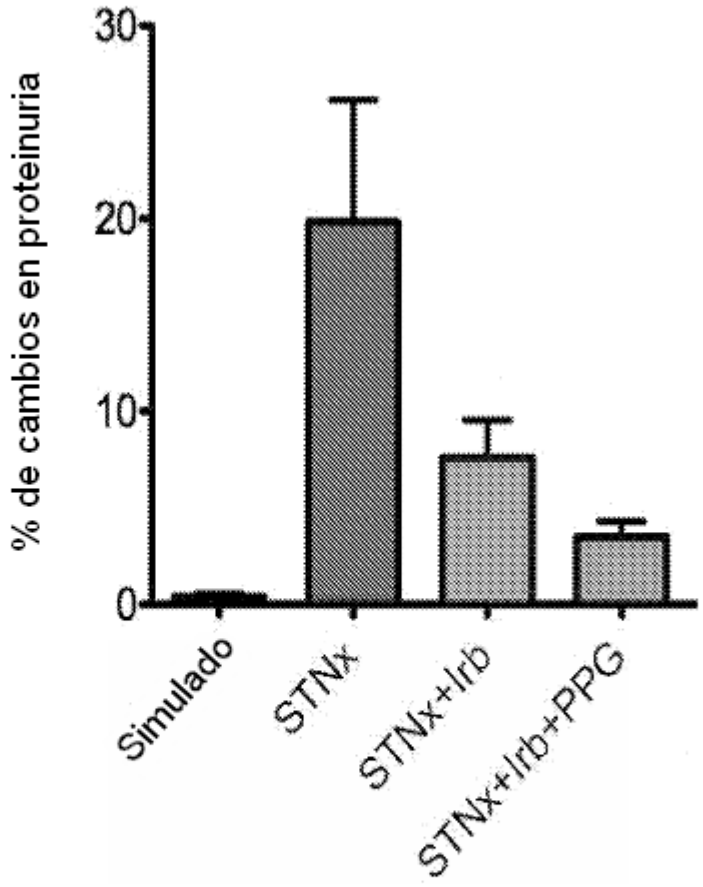
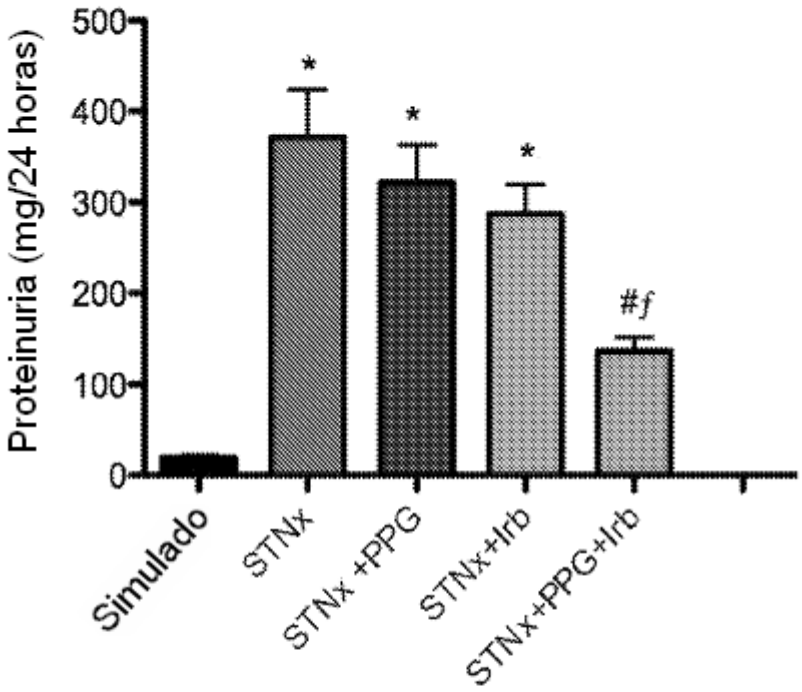

30
20
10
0
% de cambios en proteinuria
Simulado
STNx
STNx+Irb
STNx+Irb+PPG

FIGURA 1



*P < 0,05 con respecto a simulado

#P < 0,05 con respecto a STNx sin tratar

*f*P < 0,05 con respecto a STNx + Irb

FIGURA 2

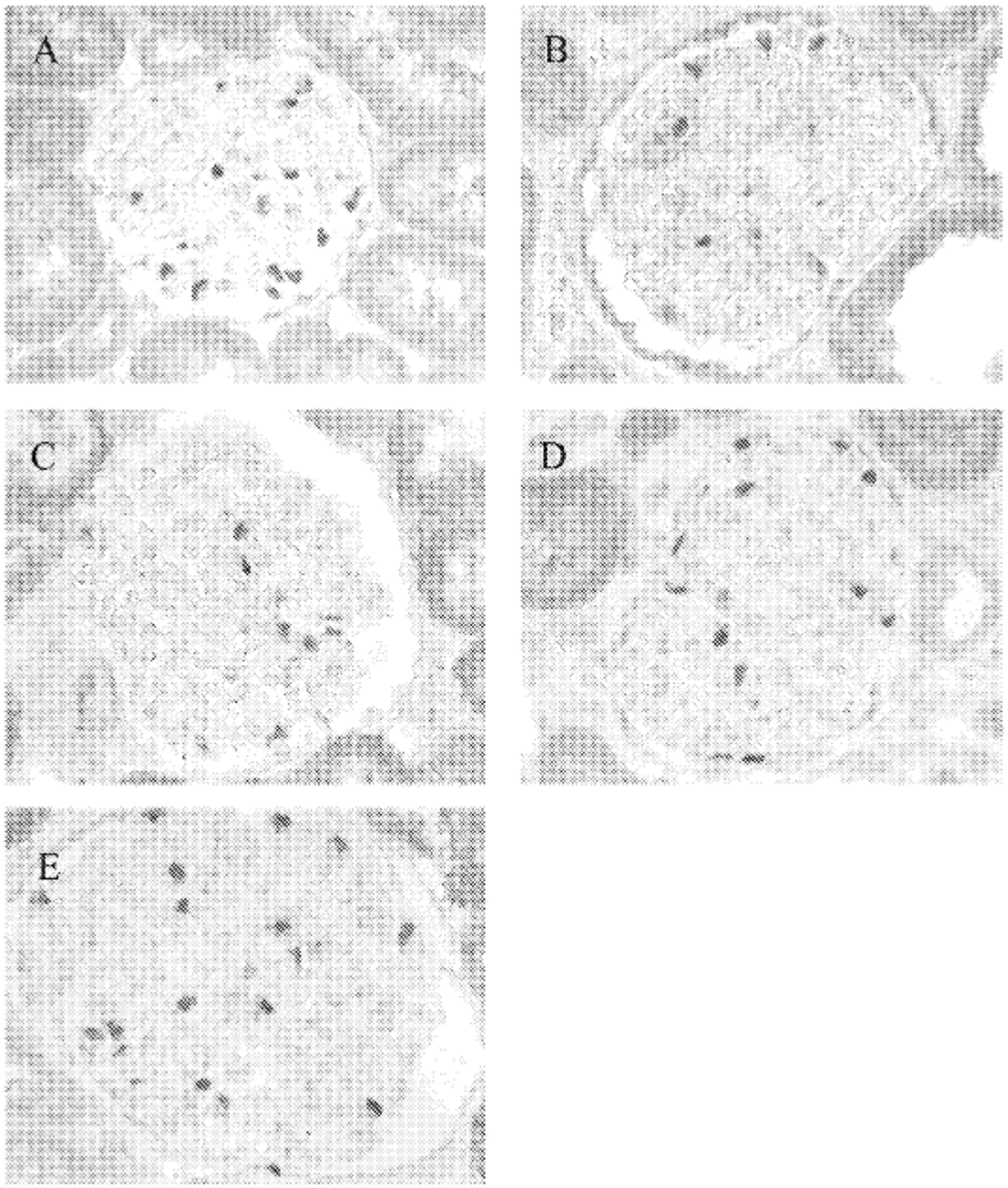
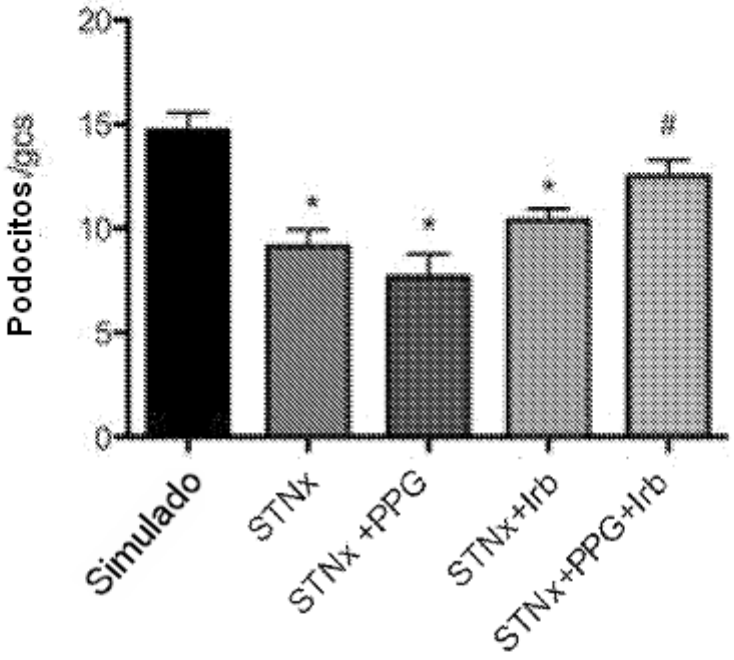


FIGURA 3



*p < 0,05 con respecto a simulado

# p < 0,05 con respecto a STNx + Irb

FIGURA 4

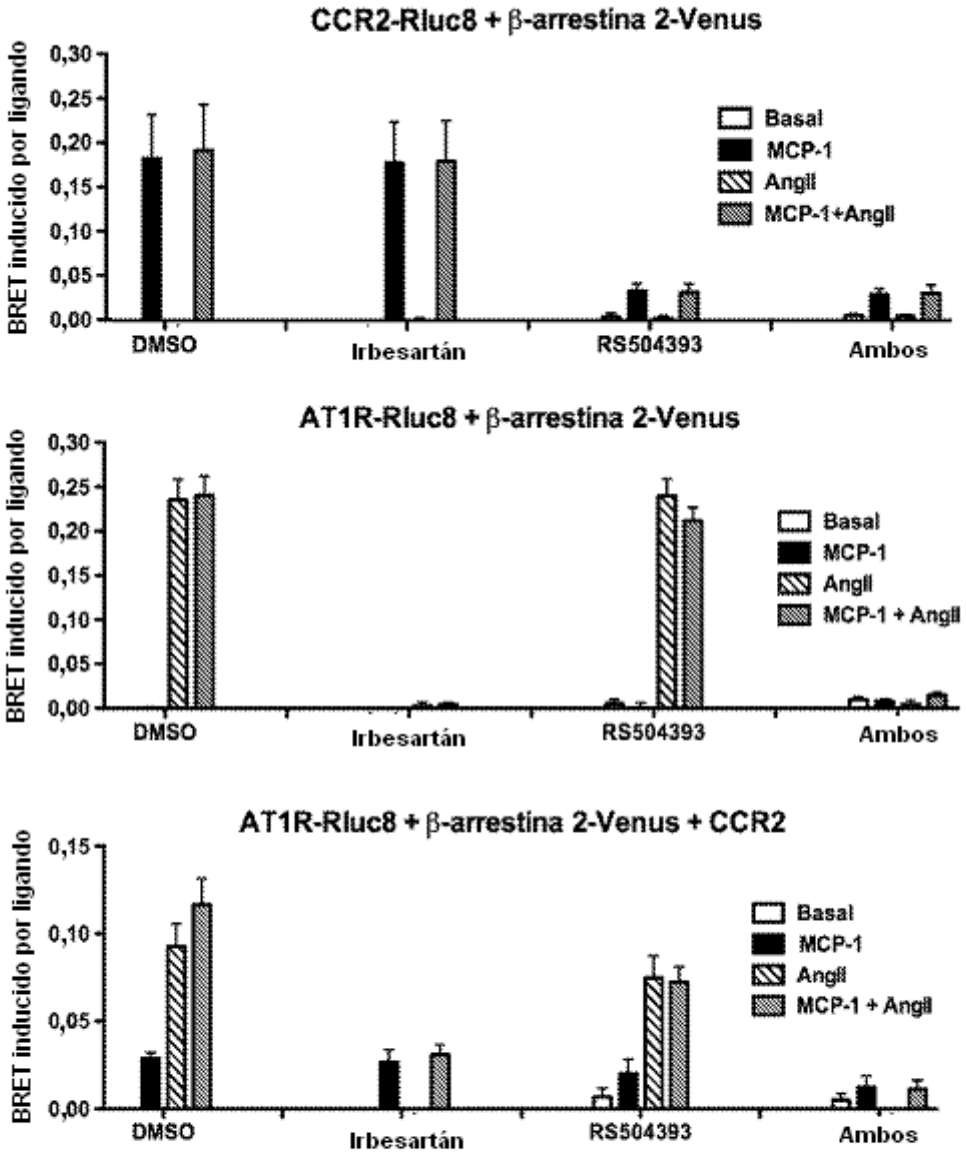

CCR2-Rluc8 + β-arrestina 2-Venus
BRET inducido por ligando
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Basal
MCP-1
AngII
MCP-1+AngII
DMSO
Irbesartán
RS504393
Ambos
AT1R-Rluc8 + β-arrestina 2-Venus
BRET inducido por ligando
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Basal
MCP-1
AngII
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
RS504393
Ambos
AT1R-Rluc8 + β-arrestina 2-Venus + CCR2
BRET inducido por ligando
0,15
0,10
0,05
0,00
Basal
MCP-1
AngII
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
RS504393
Ambos

FIGURA 5

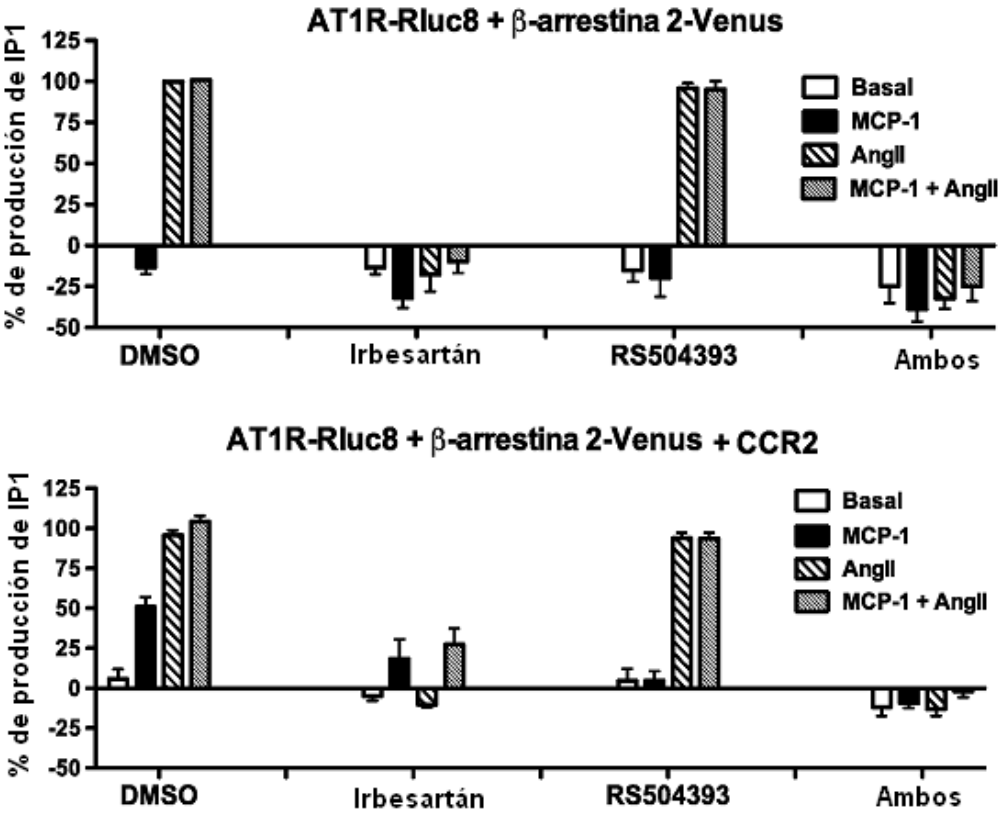

AT1R-Rluc8 + β-arrestina 2-Venus
% de producción de IP1
125
100
75
50
25
0
-25
-50
Basal
MCP-1
AngII
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
RS504393
Ambos
AT1R-Rluc8 + β-arrestina 2-Venus + CCR2
% de producción de IP1
125
100
75
50
25
0
-25
-50
Basal
MCP-1
AngII
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
RS504393
Ambos

FIGURA 6

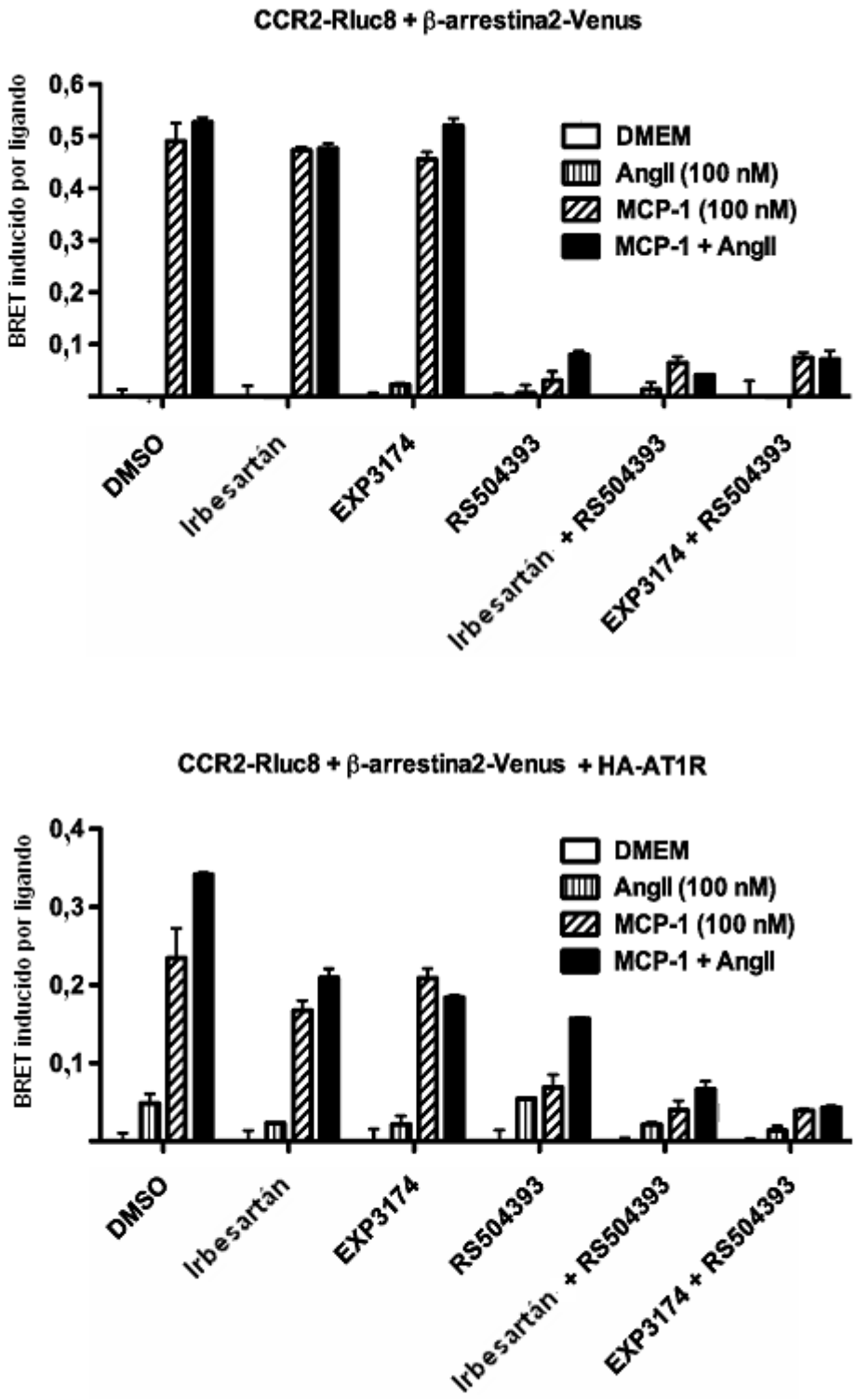

CCR2-Rluc8 + β-arrestina2-Venus
BRET inducido por ligando
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
DMEM
AngII (100 nM)
MCP-1 (100 nM)
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
EXP3174
RS504393
Irbesartán + RS504393
EXP3174 + RS504393
CCR2-Rluc8 + β-arrestina2-Venus + HA-AT1R
BRET inducido por ligando
0,4
0,3
0,2
0,1
DMEM
AngII (100 nM)
MCP-1 (100 nM)
MCP-1 + AngII
DMSO
Irbesartán
EXP3174
RS504393
Irbesartán + RS504393
EXP3174 + RS504393

FIGURA 7

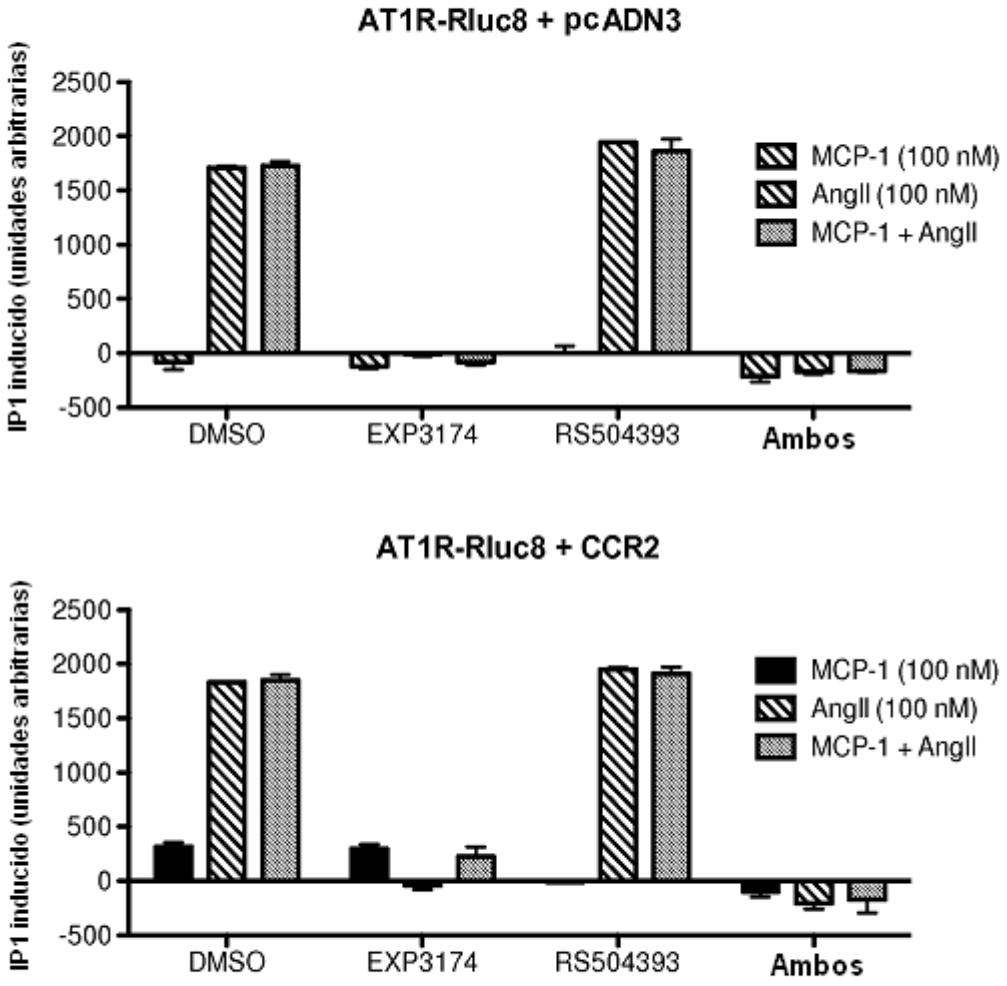
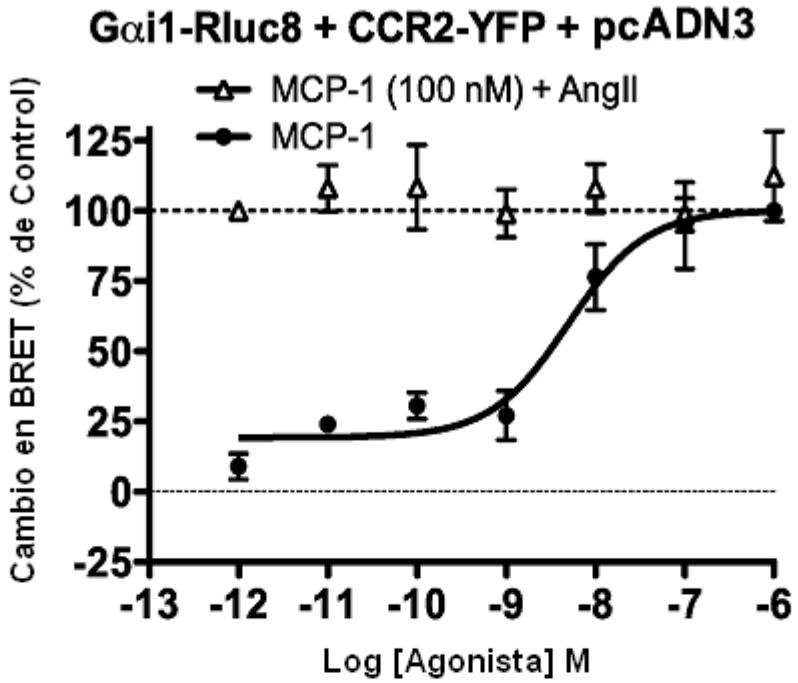

AT1R-Rluc8 + pcADN3
IP1 inducido (unidades arbitrarias)
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
DMSO
EXP3174
RS504393
Ambos
MCP-1 (100 nM)
AngII (100 nM)
MCP-1 + AngII
AT1R-Rluc8 + CCR2
IP1 inducido (unidades arbitrarias)
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
DMSO
EXP3174
RS504393
Ambos
MCP-1 (100 nM)
AngII (100 nM)
MCP-1 + AngII

FIGURA 8


Gαi1-Rluc8 + CCR2-YFP + pcADN3
MCP-1 (100 nM) + AngII
MCP-1
Cambio en BRET (% de Control)
125
100
75
50
25
0
-25
-13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Log [Agonista] M

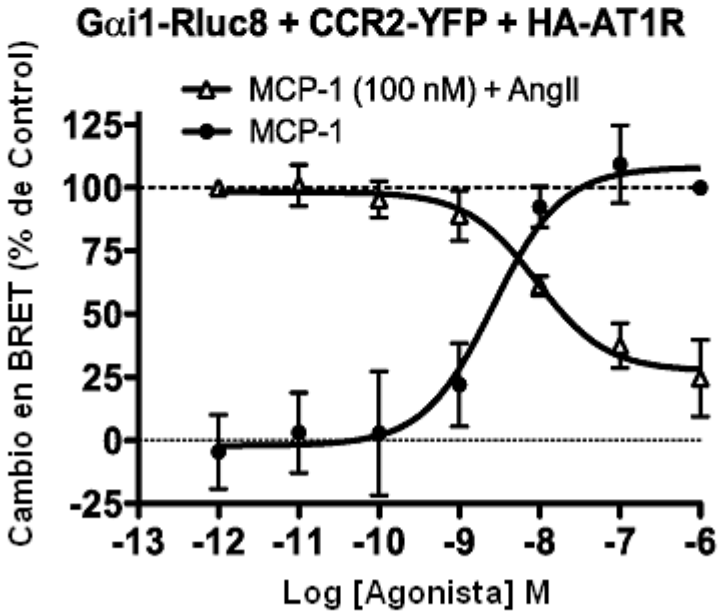

Gαi1-Rluc8 + CCR2-YFP + HA-AT1R
MCP-1 (100 nM) + AngII
MCP-1
Cambio en BRET (% de Control)
125
100
75
50
25
0
-25
-13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Log [Agonista] M

FIGURA 9