

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 940**

51 Int. Cl.:

A61K 31/167 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01) **A61K 31/47** (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08718957 .7**

96 Fecha de presentación: **31.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2129368**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **COMBINACIÓN PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS.**

30 Prioridad:
30.03.2007 US 920596 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.08.2012

73 Titular/es:
**CARDOZ AB
P O BOX 2077
103 12 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:
RAUD, Johan

74 Agente/Representante:
Urizar Anasagasti, José Antonio

ES 2 385 940 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

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

Antecedentes y estado de la técnica

- 5 [0002] Las enfermedades cardiovasculares, tal como la cardiopatía coronaria y el ictus son causas importantes de muerte, invalidez, y coste sanitario, particularmente en países industrializados. Tales enfermedades son a menudo secuelas directas de aterosclerosis, una afección multifactorial que se desarrolla preferentemente en sujetos que fuman y/o presentan factores de riesgo tales como hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, lipoproteína de baja densidad y triglicéridos elevados en plasma (LDL).
- 10 [0003] Lesiones aterocleróticas (placas) a menudo se desarrollan a lo largo de varios años y a veces décadas. Procesos patológicos tales como acumulación de colesterol en la pared arterial, formación de la pared arterial, formación de célula espumosa, inflamación y proliferación celular están normalmente implicados.
- 15 [0004] Los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDLs), LDLs, colesterol total y triglicéridos son todos indicadores al determinar el riesgo de desarrollar aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, tales como arteriopatías coronarias (por ejemplo angina de pecho, infarto de miocardio, etc...), ictus (incluyendo accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio) y enfermedad obstructiva arterioperiférica.
- 20 [0005] Los pacientes con colesterol total y/o niveles de triglicéridos altos están en importante riesgo, sin distinción de si o no tienen un nivel favorable de HDL. Los pacientes con niveles totales de colesterol normales pero niveles bajos de HDL son también de riesgo incrementado. Recientemente, se ha notado que el nivel de riesgo de cardiopatía vascular asociada con altos niveles de apolipoproteína B (ApoB; la cual transporta lípidos en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) y LDLs), y/o bajos niveles de apolipoproteína A-I (ApoA-I; la cual transporta lípidos en HDLs), es extremadamente alto.
- 25 [0006] Los medicamentos que reducen los niveles de LDL en suero pueden reducir los niveles de acumulación de placas, y pueden reducir (a largo plazo) el riesgo de ruptura de placa y complicaciones trombo-embólicas asociadas. Existen diversos tipos de medicamentos que pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol en la sangre. Los más prescritos comúnmente son los inhibidores de la reductasa hidroximetilglutaril- CoA (HMG-CoA) (más adelante definidos conjuntamente, sin distinción de su nombre genérico, como "estatinas"), incluyendo simvastatina y atorvastatina. Estos medicamentos evitan directamente la formación de colesterol en el hígado y de ese modo reducen el riesgo de cardiopatía vascular.
- 30 [0007] Otras categorías de medicamentos prescritos incluyen resinas (tales como colestiramina y colestipol) las cuales actúan por ligantes de ácidos biliares, causando así que el hígado produzca más de éstos, y acabando con el colesterol en el proceso. Además, se ha informado que la vitamina B niacina en altas dosis reduce los niveles de triglicéridos y LDL además de incrementar los niveles de HDL. Los fibratos (tales como gemfibrozilo y fenofibrato) son conocidos por reducir los triglicéridos y pueden aumentar los niveles de HDL.
- 35 [0008] La introducción de medicamentos reductores de colesterol tales como estatinas ha reducido la mortalidad por cardiopatía coronaria e ictus de manera significativa. Sin embargo, estos medicamentos sufren la desventaja que no son igualmente efectivos en todos los pacientes y es conocido que tienen efectos secundarios (por ejemplo cambios en el funcionamiento del hígado, miopatía y la aterosclerosis continua siendo una de las principales causas de mortalidad e invalidez. En efecto, un reciente artículo de revista (Briel et al, JAMA, 295, 2046 (2006)) sugiere que las estatinas no reducen los casos serios cardiovasculares durante los primeros cuatro meses de tratamiento en pacientes con síndromes coronarios agudos.
- 40 [0009] De ese modo hay una verdadera necesidad clínica de tratamientos más seguros y/o efectivos de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, particularmente en pacientes con síndromes coronarios agudos.
- 45 [0010] El suplatast es un inhibidor de citocina Th2 que inhibe la liberación IL-4 y IL-5 de células Th2 así como la liberación de mediadores químicos de mastocitos. El suplatast es por tanto indicado en el tratamiento de afecciones tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, cistitis intersticial y prostatitis crónica o bacteriana. Ver por ejemplo, Tamoaki, Allergology International, 53, 55 (2004) y Suwaki et al, International Immunopharmacology, 1, 2163 (2001). El suplatast se ha indicado también en el posible tratamiento de miocarditis eosinofílica aguda (ver Umemoto et al, Heart Vessels, 18, 100 (2003)).
- 50 [0011] La solicitud de patente estadounidense US 2007/0014733 revela composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cardiovasculares comprendiendo metabolitos de nebevivolol. El suplatast está listado entre los muchos ingredientes activos que pueden ser combinados con tales metabolitos en tales composiciones.
- [0012] Las solicitudes de patentes estadounidenses US 2006/0135577 y US 2006/0148830 revelan antagonistas novedosos del receptor LPA (y especialmente el receptor EDG-2) para uso entre otros en trastornos del sistema

urinario, inflamación etc. El suplatast y las estatinas son mencionados separadamente entre los muchos diferentes ingredientes activos que pueden ser combinados con tales compuestos novedosos.

[0013] La solicitud de patente estadounidense US 2003/0104048 revela nuevas formas de dosificación farmacéutica comprendiendo llenadores hidrófilicos conteniendo tensioactivos que contienen ingredientes farmacéuticamente activos encapsulados por una cáscara. Varios compuestos, incluyendo algunos de los aquí mencionados, están listados entre muchos medicamentos candidatos posibles para uso en tales formas de dosificación.

[0014] Finalmente, la solicitud de patente estadounidense US 2006/0084695 revela inhibidores de MAP cinasa y/o HMG-CoA reductasa para usar en el tratamiento de afecciones cardiovasculares, tales como aterosclerosis y similares.

[0015] El uso de loa productos de combinación comprendiendo, específicamente, suplatast y una estatina no es revelado específicamente en ninguno de los documentos arriba mencionados. Además, el uso de tal productos de combinación en el tratamiento de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, particularmente en aquellos pacientes con síndromes coronarios agudos no es revelado en ninguno de estos documentos.

Revelación de la invención

[0016] Según la invención, se proporciona un producto de combinación comprendiendo:

(a) suplatast, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y

(b) una estatina, o sal o solvato farmacéuticamente permitidos de los mismos,

a cuyos productos de combinación se hace referencia en adelante como "loa productos de combinación según la invención".

[0017] El término "una estatina" incluye una o más estatinas. Los términos "estatina" e "inhibidor de reductasa HMG-CoA" son empleados sinónimamente en el contexto de la presente invención e incluyen fluvastatina, simvastatina, lovastatina, rosuvastatina, pitavastatina, glevastatina, cerivastatina, pravastatina, mevastatina, bervastatina, dalvastatina y atorvastatina.

[0018] Otas estatinas que pueden ser mencionadas incluyen Acetimato, benfluorex, Clestin, colestolona, dihidromevinolina, meglutol, rawsonol, así como los compuestos con los siguientes códigos de nombre: ATI-16000, BAY-10-2987, BAY-x-2678, BB-476, BIO-002, BIO-003, BIO-2, BMS-180431, CP-83101, DMP-565, FR-901512, GR-95030, HBS-107, KS-01-019, L-659699, L-669262, NR-300, P-882222, PTX-023595, RP 61969, S-2468, SC-32561, sc-45355, SDZ-265859, SQ-33600, U-20685, y estatinas liberadoras/mejorantes de NO, tales como NCX-6560 (nitropravastatina).

[0019] Las estatinas más preferidas incluyen pitavastatina (Por ejemplo Livalo®, Pitava®) y, más preferentemente fluvastatina (Por ejemplo Lescol®), simvastatina (Por ejemplo Zocor®, Lipex®), lovastatina (Por ejemplo Mevacor®, Altacor®), rosuvastatina (por ejemplo Crestor®), pravastatina (por ejemplo Pravachol®, Selektine®, Lipostat®) y atorvastatina (por ejemplo Lipitor®, Torvast®). Estatinas particularmente preferidas incluyen simvastatina, más particularmente atorvastatina y, especialmente, rosuvastatina.

[0020] Las sales farmacéuticamente aceptables que pueden ser mencionadas incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Tales sales pueden ser formadas por medios convencionales, por ejemplo por reacción de un ácido libre o en forma de base libre de un ingrediente activo con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiado, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en que la sal es insoluble, seguido por la eliminación de dicho disolvente, o dicho medio, usando técnicas estándar (por ejemplo in vacuo, por liofilización o por filtración). Las sales puede también ser preparadas intercambiando un contra-ión de un ingrediente activo en forma de sal con otro contra-ión, por ejemplo usando una resina adecuada de intercambio de iones.

[0021] Las sales preferidas de suplatast incluyen tosillato de suplatast.

[0022] Las sales preferidas de estatinas incluyen sales sodio, potasio y calcio, tales como pitavastatina de calcio, fluvastatina de sodio, pravastatina de sodio, rosuvastatina de calcio y atorvastatina de calcio.

[0023] Los ingredientes activos que son empleados en productos de combinación según la invención (y en particular suplatast) pueden ser empleados en forma diastereoméricamente enriquecida y/o enantioméricamente enriquecida. Por "diastereoméricamente enriquecida" y "enantioméricamente enriquecida" queremos decir, respectivamente, cualquier mezcla de los diastereoisómeros/ enantiómeros de un ingrediente activo, en el que está presente un isómero en una mayor proporción que el otro. Por ejemplo, enantiómeros (de por ejemplo suplatast) con purezas ópticas (exceso enantiomérico; e.e.) de más que el 90% pueden ser empleados.

[0024] Loa productos de combinación según la invención proporcionan la administración de suplatast como antes definido en conjunción con una estatina como antes definida, y pueden presentarse bien como formulaciones separadas, en donde al menos una de esas formulaciones comprende suplatast, y al menos una comprende una

estatina, o pueden ser presentados (es decir formulados) como una preparación combinada (por ejemplo como una sola formulación incluyendo suplastast y una estatina).

[0025] De ese modo, se proporciona además:

5 (1) una formulación farmacéutica incluyendo suplastast, o una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable; una estatina, o una sal o solvato de la misma aceptable farmacéuticamente; y un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable, (a cuya formulación se hace referencia más adelante como una "preparación combinada") y

(2) un kit de partes comprendiendo componentes:

10 (A) una formulación farmacéutica incluyendo suplastast, o una sal o solvato del mismo aceptable farmacéuticamente, en mezcla con un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

(B) una formulación farmacéutica incluyendo una estatina, o una sal o solvato de la misma aceptable farmacéuticamente, en mezcla con un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

los componentes (A) y (B) estando cada uno proporcionados en una forma que es adecuada para la administración en conjunción con el otro.

15 **[0026]** De acuerdo a un aspecto adicional de la invención, se provee un método para hacer un kit de partes como antes se define, cuyo método comprende poner el componente (A), como se define arriba, en asociación con un componente (B), como se define arriba, de ese modo haciendo adecuados a los dos componentes para administración en conjunción entre sí.

20 **[0027]** Por poner los dos componentes "en asociación" entre sí, incluimos que los componentes (A) y (B) del kit de partes pueden ser:

(i) proporcionados como formulaciones separadas (es decir, por ejemplo independientemente uno del otro), las cuales son subsecuentemente juntadas para usar en entre sí en terapia de combinación; o

(ii) envasados y presentados juntos como componentes separados de un "paquete de combinación" para usar en conjunción entre sí en terapia de combinación.

25 **[0028]** Así, se provee además un kit de partes comprendiendo:

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

(II) instrucciones para usar este componente en conjunción con el otro de los dos componentes.

30 **[0029]** Los kits de partes descritos aquí pueden comprender más de una formulación incluyendo una cantidad/dosificación apropiada de suplastast/sal/solvato, y/o más de una formulación incluyendo una cantidad/dosificación apropiada de estatina/sal/solvato, con el fin de proporcionar dosificación repetida. Si está presente más de una formulación (comprendiendo cualquier compuesto activo), tales formulaciones pueden ser la misma, o pueden ser diferentes en términos de la dosificación de cualquier compuesto, composición(es) química(s) y/o forma(s) física(s).

35 **[0030]** Las estatinas que son empleadas en productos de combinación según la invención pueden estar preferentemente en forma de las llamadas "lactonas de estatina" Loa productos de combinación según la invención puede comprender lactona de pitavastatina y lactona de mevastatina, preferentemente lactona de fluvastatina, lactona de rosuvastatina, lactona de pravastatina y lactona de atorvastatina, y particularmente lactona de lovastatina y lactona de simvastatina.

40 **[0031]** Loa productos de combinación según la invención encuentran utilidad en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Las afecciones inflamatorias están típicamente caracterizadas por activación de los mecanismos de defensa inmune, resultando en un efecto que es más dañino que benigno al huésped. Tales afecciones están generalmente asociadas con grados variables de enrojecimiento de tejido o hiperemia, hinchazón, hipertermia, dolor, picor, muerte celular y destrucción de tejido, proliferación celular, y/o pérdida de función Las afecciones inflamatorias que pueden ser mencionadas conllevan alergia (incluyendo conjuntivitis alérgica y rinitis alérgica), espondilitis anquilosante, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis de contacto, cistitis, artritis gotosa, enfermedad inflamatoria de intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, osteoartritis, pancreatitis, prostatitis, psoriasis, artritis psoriática, artritis reumatoide, tendinitis, bursitis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, uveitis, urticaria, inflamación de los vasos sanguíneos, complicaciones vasculares diabéticas, migraña, aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados. Las afecciones que pueden ser
45 mencionadas incluyen migraña y, más preferentemente, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa y, más
50 particularmente, aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.

- 5 **[0032]** El término "ateroesclerosis" se entenderá por aquellos expertos en la técnica que incluye cualquier enfermedad caracterizada por la acumulación de colesterol en los vasos sanguíneos, especialmente una pared arterial, formación de célula espumosa, inflamación y proliferación celular. Cardiopatías vasculares "asociadas con" aterosclerosis comprenden aneurismas aórticos (incluyendo aneurismas aórticos aterosclerótico y/o abdominal) y, más preferentemente, arteriosclerosis, arteriopatía periférica obstructiva, arteriopatía coronaria (incluyendo arteriopatía periférica obstructiva, arteriopatías coronarias (por ejemplo angina pectoral, infarto de miocardio, ataque cardíaco, etc.), enfermedad coronaria (incluyendo cardiopatía y enfermedad cardíaca, tal como cardiopatía isquémica), y puede también incluir ruptura y/o inestabilidad de placa o ateroma, enfermedad vascular o arterial, isquémicopatía/isquemia e ictus (incluyendo accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio).
- 10 **[0033]** Grupos de pacientes que pueden ser mencionados incluyen aquellos con síndromes coronarios agudos. El término "síndrome(s) coronario agudo" se entenderá por el experto que incluye cualquier estado miocárdico e isquémico anormal, a menudo pero no exclusivamente asociado con dolor de pecho y/o electrocardiograma anormal (ECG). Tales síndromes son la manifestación más común de infarto de miocardio (ataque cardíaco) La persona entendida apreciará que el término es ampliamente sinónimo con el término "angina inestable", como opuesto a "angina estable" (por ejemplo angina que se desarrolla durante el esfuerzo y se soluciona al descansar). La angina por esfuerzo que sucede con un índice de empeoramiento "angina crescendo ") se contemplará de forma similar por la persona entendida como dentro de la definición "inestable".
- 15 **[0034]** De acuerdo a un aspecto adicional de la invención se proporciona el producto de combinación reivindicado para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, y en particular aterosclerosis y/o trastorno cardiovascular asociado, que comprende la administración de un producto de combinación según la invención para un paciente en necesidad de tal tratamiento.
- 20 **[0035]** Para evitar dudas, en el contexto de la presente invención, los términos "tratamiento", y "terapia" incluyen el producto de combinación reivindicado para uso en el tratamiento terapéutico, o paliativo, tratamiento de pacientes en necesidad de, así como tratamiento profiláctico y/o diagnóstico de pacientes que son susceptibles a, trastornos inflamatorios, tales como aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.
- 25 **[0036]** Con respecto a los kits de partes como se describen aquí, por "administración en conjunción con", incluimos que formulaciones respectivas comprendiendo suplatast (o sal/solvato del mismo) y estatina (o sal/solvato de la misma) son administrados, secuencialmente, separadamente y/o simultáneamente, en el curso del tratamiento de la afección relevante.
- 30 **[0037]** De ese modo, respecto del producto de combinación según la invención, el término "administración en conjunción con" incluye que los dos componentes del producto de combinación (suplatast y estatina) son administrados (repetidamente de manera opcional), bien juntos, o lo suficientemente próximos en el tiempo, para permitir un efecto beneficioso para el paciente, que es mayor, durante el curso del tratamiento de la relevante afección, que o bien una formulación comprendiendo suplatast, o una formulación comprendiendo estatina, son administrados (repetidamente de manera opcional) solos, en la ausencia del otro componente, en el mismo curso del tratamiento. La determinación de si una combinación proporciona un mayor efecto beneficioso respecto a, y en el curso del tratamiento de, una particular afección dependerá de la afección a ser tratada o evitada, pero puede ser alcanzada rutinariamente por la persona entendida.
- 35 **[0038]** Además, en el contexto de un kit de partes según la invención, el término "en conjunción con" incluye que una u otra de las dos formulaciones puede ser administrada (repetidamente de manera opcional) antes de, después de, y/o al mismo tiempo que, la administración del otro componente. Cuando usados en este contexto, los términos "administrado simultáneamente" y "administrado al mismo tiempo que" incluyen que las dosificación individuales de suplatast y estatina son administradas en 48 horas (por ejemplo 24 horas) entre sí.
- 40 **[0039]** "Pacientes" incluye pacientes mamíferos (incluyendo humanos).
- 45 **[0040]** De acuerdo con la invención, suplatast y estatinas son preferentemente administradas localmente o sistémicamente, por ejemplo oralmente, intravenosamente o intrarterialmente (incluyendo por stent intravascular y otros dispositivos perivasculares/formas de dosificación) intramuscularmente, cutáneamente, subcutáneamente, transmucosalmente (por ejemplo por vía sublingual o bucal), por vía rectal, transdérmicamente, de manera nasal, pulmonarmente (por ejemplo traquealmente o bronquialmente), tópicamente, o cualquier otra vía parenteral, en forma de una preparación farmacéutica comprendiendo el compuesto(s) en forma(s) de dosificación farmacéuticamente aceptables. Modos preferidos de administración incluyen suministro oral (particularmente), intravenoso, cutáneo o subcutáneo, nasal, intramuscular, o intraperitoneal.
- 50 **[0041]** Suplatast y estatinas serán generalmente administrados juntos o por separado en forma de una o más formulaciones farmacéuticas en mezcla con un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser seleccionado con debida consideración a las vías de administración pretendidas y prácticas farmacéuticas normales. Tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser químicamente inertes a los compuestos activos y pueden no tener efectos secundarios detrimentales o toxicidad bajo las condiciones de uso. Tales vehículos permitidos farmacéuticamente pueden también impartir una inmediata, o una modificada, liberación de cualquier ingrediente activo,
- 55

sea administrado junto en una preparación combinada o en forma de un kit de partes.

[0042] Formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden estar comercialmente disponibles o de otPharmacy, 19t ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) y Martindale - The Complete Drug Reference (34t Edition) y los documentos aquí referidos. Por lo demás, la preparación de formulaciones adecuadas, y en particular preparaciones combinadas incluyendo tanto suplatast como estatinas puede ser lograda de forma no inventiva por la persona entendida usando técnicas de rutina.

[0043] La cantidad de ingredientes activos en la formulación(es) dependerá de la gravedad de la afección, y del paciente a tratar, así como del compuesto(s) que es/son empleado(s), pero puede ser determinada de manera no inventiva por la persona entendida.

[0044] Dependiendo del trastorno, y del paciente a tratar, así como de la vía de administración, los ingredientes activos pueden ser administrados en dosis variables terapéuticamente efectivas a un paciente en necesidad de los mismos.

[0045] Sin embargo, la dosificación administrada a un mamífero, particularmente un humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica en el mamífero en un marco de tiempo razonable. Un experto en la técnica reconocerá que la selección de la dosis y composición exacta y el régimen de suministro más apropiado estarán también influidos por entre otros las propiedades farmacológicas de la formulación, la naturaleza y gravedad de las afecciones tratadas, y la condición física y agudeza mental del receptor, así como la potencia del compuesto específico, la edad, la condición, peso corporal, sexo y respuesta del paciente a tratar, y la etapa/gravedad de la patología, así como las diferencias genéticas entre pacientes.

[0046] La administración de los ingredientes activos puede ser continua o intermitente (por ejemplo por inyección de bolo). La dosificación puede estar también determinada por el ritmo y frecuencia de administración.

[0047] Las dosis adecuadas de ingredientes activos incluyen aquéllas a las que se hace referencia en la literatura médica, tal como Martindale - The Complete Drug Reference (34t Edition) y los documentos a los que aquí se hace referencia. Las dosis adecuadas de ingredientes activos por tanto van desde unos 0.01 mg/kg de peso corporal a unos 1,000 mg/kg de peso corporal. Los rangos más preferidos son de casi 0.1 mg/kg a alrededor de los 20 mg/kg diariamente, cuando dados oralmente.

[0048] Sin embargo, las dosis adecuadas de suplatast son conocidas por los expertos en la técnica. Dosis orales están por tanto en el rango de casi 0.5 mg a casi 1000 mg, tal como unos 2 mg hasta unos 800 mg, preferentemente alrededor de los 20 mg hasta unos 600 mg, por ejemplo alrededor de 200 mg (por ejemplo 300 mg) hasta alrededor de 450 mg, por día, sin distinción de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como descrito antes.

[0049] De modo similar, las dosis adecuadas de estatinas son conocidas por los expertos en la técnica. Las dosis orales están por lo tanto típicamente en el rango de unos 2 mg a alrededor de 150 mg, tal como unos 5 mg a unos 100 mg, preferentemente unos 8 hasta alrededor de los 90 mg, por ejemplo unos 10 mg a unos 80 mg, por día, sin distinción de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como se describe antes. Dosis adecuadas de pitavastatina están en el rango de alrededor los.5 mg a unos 10 mg, tal como alrededor de 0.75 mg hasta unos 5 mg, preferentemente alrededor de 1 mg hasta unos 4 mg, por ejemplo unos 2 mg, por día, sin distinción de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como se describe antes.

[0050] En cualquier caso, el médico prescriptor, u otra persona con conocimientos, será capaz de determinar de manera rutinaria la dosificación real, que será la más adecuada para un paciente individual. Las dosificaciones arriba mencionadas son a modo de ejemplo del caso promedio; pueden, por supuesto haber ejemplos de individuos donde se consideren rangos de dosificación mayores o menores.

[0051] Donde sea que la palabra "unos" sea empleada aquí, por ejemplo en el contexto de las dosis de ingredientes activos, se apreciará que tales variables son aproximadas y como tal pueden variar en $\pm 10\%$, por ejemplo $\pm 5\%$ y preferentemente $\pm 2\%$ (por ejemplo $\pm 1\%$) respecto de los números aquí especificados.

[0052] Los productos de combinación aquí descrita puede tener la ventaja de que, en el tratamiento de las afecciones mencionadas antes, pueden ser más convenientes para el médico y/o paciente que, ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, tener un mayor rango de actividad que, ser más potentes que, producir menos efectos secundarios que, o que puede/pueden tener otras propiedades farmacológicas útiles sobre, tratamientos similares conocidos en el estado de la técnica para usar en el tratamiento de trastornos inflamatorios (tal como aterosclerosis y afecciones cardiovasculares asociadas).

[0053] La invención es ilustrada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos**Ejemplo 1****Ensayos de Liberación de Mediador Inflamatorio Celular MonoMac-6**

5 **[0054]** Células MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) son cultivadas (37°C/5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 1xaminoácidos no esenciales, 1-100 µg/mL de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 10% (v/v) de suero fetal bovino. Para diferenciación, son añadidos TGFβ (2 ng/ml) y 1,25 (OH)₂D3 (50 nM), durante generalmente 2-4 días.

10 **[0055]** Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), se incuban células MM6 diferenciadas u indiferenciadas (en 1-15x10⁶ mL; 0.5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y 2-10 µM de ionóforo cálcico A23187 (A23187 puede ser también usado sin ácido araquidónico). Las células MM6 pueden también ser estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), y/o el análogo tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las anteriores incubaciones/estimulaciones de MM6 pueden ser realizadas en la presencia de plaquetas humanas (de donante de sangre saludable) con un ratio MM6:plaqueta de 1:10 to 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones son paradas con dos volúmenes de metanol frío y prostaglandina B₂ (PGB₂) añadidos como estándar interno. Las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes son diluidos con agua para alcanzar una concentración final de metanol de 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en columnas en fase sólida precondicionadas (1 mL de metanol seguido de 1 mL H₂O) C18 (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos son eluidos con metanol, tras lo cual un volumen del agua es añadido al eluado. Para la fase inversa HPLC, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL H₂O (otros ratios de volumen pueden ser también usados). Una columna Waters RCM 8x10 es eluida con metanol/acetonitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0.01 v/v) a 1.2 mL/min. La absorción del eluato es controlada a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. Kits de inmunoensayo de enzimas disponibles comercialmente (kits EIA/ELISA) para medir LTB₄ pueden ser usados también según las instrucciones del fabricante(s) del kit. Usando kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones del fabricante(s), pueden ser también analizados los sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones MM6 anteriores con respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂).

30 **[0056]** Se preparan soluciones madre de suplastat y estatinas (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina) en etanol, DMSO, N-metil-2-pyrrolidone, PEG 400, propilenglicol y/o agua desionizada o solución salina fisiológica, con sonicación, calentamiento y ajuste del pH según se necesite (otros vehículos pueden ser también usados). Las células son incubadas (a 37°C/5% CO₂ en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplastat en combinación de estatina, suplastat solo y estatina sola) durante 1 minuto hasta 24 horas antes de la estimulación de MM6 para liberación del mediador inflamatorio (pueden ser también añadidos medicamento(s) de ensayo simultáneamente con estimulación de MM6). Los medicamentos son añadidos para alcanzar concentraciones finales de 1 nM a 100 µM (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos).

40 **[0057]** Para estimular la liberación de citoquinas inflamatorias y quimiocinas tales como IL-1β, IL6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, células MM6 diferenciadas o indiferenciadas (a 1-10x10⁶/mL) son incubadas (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA. Las células MM6 pueden ser también estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo cálcico A23187 y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones celulares MM6 pueden ser también realizadas en la presencia de plaquetas humanas (de donante de sangre saludable) con un ratio MM6:plaqueta de 1:10 to 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C/5% CO₂ en RPMI- 1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplastat en combinación con estatina, suplastat solo y estatina sola; como antes respecto a soluciones madre y concentraciones) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación MM6). Después de centrifugar las células tras las incubaciones/estimulaciones, son cuantificadas las concentraciones de citoquina humana y quimiocina en los sobrenadantes usando un Citometric Bead Array (BD Biosciences Farmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA kits) para medir citoquinas y quimiocinas pueden ser usados según las intrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares son almacenados congelados (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos con biochip (ver Ejemplo 12 abajo)

Ejemplo 2**Ensayos de liberación de mediador inflamatorio de célula de sangre periférica humana**

[0058] Células monoclares de sangre periférica humana (PBMC) o células polimorfonucleares (PMN) son aisladas por

separación Lymphoprep o Ficoll-Paque (con o sin separación de Polymorphoprep y/o sedimentación de Dextran) procedentes de donante saludable de sangre usando protocolos establecidos.

5 **[0059]** Para estimular la liberación del mediador inflamatorio, leucotrieno B₄ (LTB₄), PBMC o PMN (a 1-15x10⁶/mL; 0.5-1 mL) son incubados durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y 2-10 µM de ionóforo cálcico A23187 (A23187 puede ser usado también sin ácido araquidónico). El PBMC/PMN puede ser también estimulado con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN anteriores pueden también ser realizadas en la presencia de plaquetas humanas (procedentes de donante saludable de sangre) con un ratio de PBMC/PMN:plaqueta de 1:10 to 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones son paradas con dos volúmenes de metanol frío y prostaglandina B₂ añadidos como estándar interno. Las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes son diluidos con agua para alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en columnas en fase sólida precondicionadas (1 mL de metanol seguido de 1 mL H₂O) C18 (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos son eluidos con metanol, tras lo cual un volumen del agua es añadido al eluado. Para la fase inversa HPLC, 76 µL de cada muestra se mezclan con 39 µL H₂O (otros ratios de volumen pueden ser también usados). Una columna Waters RCM 8x10 es eluida con metanol/acetronitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0.01 v/v) a 1.2 mL/min. La absorción del eluato es controlada a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. Kits de inmunoensayo de enzimas disponibles comercialmente (kits EIA/ELISA) para medir LTB₄ pueden ser usados también según las instrucciones del fabricante(s) del kit. Usando kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones del fabricante(s), pueden ser también analizados los sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones PBMC/PMN anteriores con respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células son incubadas (a 37°C en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con 0-10% del suero bovino fetal) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con la estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente simvastatina, rosuvastatina u atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para liberación del mediador inflamatorio (ver Ejemplo 1 arriba para detalles referentes a soluciones madre y concentraciones de medicamentos; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación PBMC/PMN). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos.

30 **[0060]** Para estimular liberación de citoquinas inflamatorias y quimiocinas tales como IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PBMC/PMN (en 1-10_10⁶/mL) son incubadas (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino) con lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla de LPS/PMA. Las células PBMC/PMN pueden ser también estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo cálcico A23187 y/o el análogo tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC/PMN pueden ser también realizadas en la presencia de plaquetas humanas (procedentes de donantes saludables de sangre) con un ratio de PBMC/PMN:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C/5% CO₂ en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina, suplatast solo y estatina sola, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de estimulación de PBMC/PMN para liberación de citoquina/quimiocina (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con la estimulación de PBMC/PMN). Después de centrifugarse las células tras las incubaciones/estimulaciones, son cuantificadas las concentraciones de citoquina y quimiocina humanas en los sobrenadantes usando un Citometric Bead Array (BD Biosciences Farmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA kits) para medir citoquinas y quimiocinas pueden también ser usados según las intrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares son almacenados congelados (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos con biochip (ver Ejemplo 12 abajo)

Ejemplo 3

Ensayos de liberación de mediador inflamatorio de mastocito de ratón

50 **[0061]** Mastocitos de ratón cultivados derivados de médula (mMCs) son obtenidos cultivando células de médula de ratones C57BU6. Las células de médula (procedentes de fémures de ratón flushed con PBS) son cultivadas (37°C/5% CO₂) en RPMI 1640 condicionado enriquecido con 10% WEHI-3 o X-63, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 4 mM L-glutamina, 50 PM 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM Hepes, y 100 µM penicilina/estreptomina. El desarrollo de los mastocitos (los cuales crecen en suspensión) es confirmado por expresión de Kit (por citometría de flujo) sobre la superficie celular y/o por el teñido azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

60 **[0062]** Mastocitos de ratón cultivados derivados de médula de tipo tejido conectivo (tipo CT) son obtenidos por cultivo de células de médula de ratones C57BL/6. Las células de médula son cultivadas (37°C/5% CO₂) en un medio RPMI-1640 conteniendo 10% de FCS filtrado, 4 mM Lglutamine, 1 mM de piruvato sódico, 100 IU/mL penicilina G, 100 µg/mL estreptomina, 0.1 mM MEM de aminoácidos no esenciales y 50 µM 2-ME, suplementado con 50 ng/mL de factor

recombinante de célula madre de ratón y 1 ng/mL de IL-4 recombinante de ratón. El desarrollo de mastocitos es confirmado por expresión de Kit (por citometría de flujo) sobre la superficie celular y/o por teñido azul de toluidina (generalmente tras al menos 3-5 semanas de cultivo).

[0063] Líneas de mastocitos MC/9 de ratón (obtenido de ATCC, Producto nº CRL-8306) y C1.MC/C57.1 (Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9175 (1987)) pueden ser también usadas. Las células MC/9 son cultivadas según las instrucciones de ATCC (<http://www.atcc.org>), y células C1.MC/C57.1 son cultivadas como se describe en Rumsaeng et al (J. Immunol. 158, 1353 (1997)).

[0064] Para la activación/estimulación por medio de reticulación del receptor IgE, los mastocitos cultivados son sensibilizados inicialmente durante 90 minutos a 37°C (5% CO₂) con un anticuerpo de IgE de ratón monoclonal (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, USA), usado como un sobrenadante 15% de hibridoma. Las células a ser usadas en los ensayos de liberación de N-acetil-beta-D-hexosaminidasa (o histamina) o citoquina/quimiocina (ver abajo) son entonces sometidas a dos lavados con PBS y resuspendidas en un medio de RPMI-1640 suplementado con 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) antes de que las células (a 0.5-10x10⁶/mL) sean activadas por adición de 100 ng/mL TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) con un ratio de acoplamiento de 9/1. La incubación (37°C/5% CO₂) con TNP-BSA es de 30 minutos para el análisis de liberación de **beta-hexosaminidasa** (o histamina) y 6-24 horas para el análisis de liberación de citoquina y quimiocina. Las células son incubadas (37°C/5% CO₂) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la adición de TNP-BSA (ver Ejemplo 1 arriba para detalle referente a soluciones madre y concentraciones de medicamentos; pueden ser también añadidos medicamento(s) de ensayo simultáneamente con estimulación de TNP-BSA). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos. Tras las incubaciones/estimulaciones, las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes analizados respecto al contenido de beta-hexosaminidasa (o histamina) y/o citoquinas/quimiocinas como descrito abajo. Los granulados celulares son almacenados congelados (-80°C) en buffer de RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12 abajo).

[0065] Para la detección de liberación dependiente de IgE de la enzima beta-hexosaminidasa granular de mastocito, es usada un ensayo enzimático colorimétrico. Se transfiere 60 µL de cada pocillo sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se mezcla con un volumen igual de solución sustrato (7.5 mM p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glucosaminida disuelto en 80 mM ácido cítrico, pH 4.5). La mezcla es incubada sobre una plataforma articulada durante 2 horas a 37°C. Tras incubación, se añade 120 µL de glicina (0.2 M, pH 10.7) a cada pocillo y se mide la absorción en 405 y 490 nm usando un Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La liberación de beta-hexosaminidasa se expresa como un porcentaje de beta-hexosaminidasa total determinado después de lisis celular. Para la detección de liberación dependiente de IgE de histamina granular de mastocito, kits de inmunoensayo de enzima comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para medir la histamina se usan según las instrucciones del fabricante(s).

[0066] Para la detección de liberación dependiente de IgE de citoquinas y quimiocinas de mastocito de ratón tales como IL-6, IL-4, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, se usa un Citometric Bead Array (BD Biosciences Farmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Pueden también ser usados kits comercialmente disponibles de inmunoensayo de enzima (kits de EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas según las instrucciones del fabricante(s).

[0067] Además de los experimentos anteriores de mastocitos, los efectos inhibitorios en mastocitos del medicamento(s) de ensayo (como antes) pueden también ser estudiados usando enfoques y ensayos experimentales bien establecidos y documentados para analizar la liberación inducida (con por ejemplo anti-IgE (con o sin pretratamiento de las células con IgE de rata o ratón), concanavalin A, proteína L, compuesto 48/80, ionóforo A23187, PMA) de histamina, beta-hexosaminidasa o tripsina procedentes de mastocitos peritoneales de rata o ratón recién aislados.

45 **Ejemplo 4**

Ensayos de liberación de mediador inflamatorio de célula RAW 264.7

[0068] Células RAW 264.7 son cultivadas (37°C/5% CO₂) en DMEM, suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino.

[0069] Para estimular la liberación de citoquinas and quimiocinas inflamatorias tales como IL-6, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, células RAW 264.7 (en 1-10x10⁶/mL) son incubadas (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en DMEM con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng/mL) o una mezcla LPS/PMA. Las células RAW 264.7 pueden también ser estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, ionóforo cálcico A23187 y/o análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como antes. Las incubaciones/estimulaciones de RAW 264.7 pueden también ser realizadas en la presencia de plaquetas de ratón o humano (procedentes de donante saludable de sangre) con un ratio de RAW 264.7:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C/5% CO₂ en DMEM con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina,

lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplastast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de RAW 264.7 para la liberación de citoquina/quimiocina (ver Ejemplo 1 arriba para detalles relacionados con soluciones madre de medicamento y concentraciones; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con la estimulación de RAW 264.7). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos. Después de centrifugar las células tras las incubaciones/estimulaciones, se cuantifican las concentraciones de citoquina y quimiocina de ratón en los sobrenadantes usando un Citometric Bead Array (BD Biosciences Farmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Kits comercialmente disponibles de inmunoensayos de enzima (EIA/ELISA) para medir citoquinas y quimiocinas puede también ser usado según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados de célula son almacenados congelados (-80°C) en RLT buffer (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 5

Inflamación de pata de rata inducida por carragenano

[0070] Este ensayo es especialmente de acuerdo al descrito por Winter et al (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544 (1962)). Los medicamento(s) de ensayo (suplastast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplastast solo y estatina solo) en dosis de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratas machos Sprague-Dawley o Wistar pesando aproximadamente 150-400 g (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración, soluciones madre de medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son disueltas como se necesite en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden también ser usados. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis de medicamento, se inyecta una solución de carragenano al 0.5, 1.0 o 2.0% (Type IV Lambda, Sigma Chemical Co.) en solución salina 0.9% dentro de la región subplantar de una pata trasera de ratas anestesiadas. Antes, y a intervalos indicados de 3-24 horas tras la inyección de carragenano, el volumen de la pata inyectada es medido con un ómetro de desplazamiento conectado a un transductor de presión con un indicador digital. El grado de hinchazón indica el grado de edema inflamatorio. 3-24 horas después de la inyección de carragenano, las ratas son sacrificadas y perfundidas con solución salina o PBS (puede ser también usado otro medio de perfusión). Son recogidas biopsias de tejido blando plantar de las patas inflamadas, pesadas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de biochip son congelados a -80°C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizadas con respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocito neutrófilo inflamatorio; y/o 2) expresión genética de tejido usando tecnología de biochip. El tejido de pata no inflamada de ratas no tratadas proporciona niveles de base de MPO y expresión genética. La inflamación de tejido puede ser también estudiada usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas. La inflamación de la pata puede ser también inducida por inyección subplantar del compuesto 48/80 (48/80, 1-5 µg in 50-100 µl PBS o solución salina) (en lugar de carragenano), seguido de medición de hinchazón inflamatoria de la pata y recogida de biopsias de tejido para el análisis de biochip y/o MPO (como antes) 30 min a 8 horas tras inyección de 48/80.

Ejemplo 6

Inflamación de oreja de ratón inducida por aceite de crotón

[0071] Esta muestra esta esencialmente de acuerdo al descrito por Tonelli et al (Endocrinology 77, 625 (1965)) (otras cepas de ratones pueden ser también usadas). Medicamento(s) de ensayo (suplastast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina or atorvastatina), suplastast solo y estatina sola) en dosis de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas (como comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración, soluciones madre de los medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son disueltas según se necesite en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también usados. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis del medicamento, 10-30 µL de una solución 2.0 o 4.0% de aceite de crotón en acetona o etanol se aplica tópicamente a uno o ambos oídos. A intervalos indicados de 4-12 horas después de la aplicación del aceite de crotón, los animales son sacrificados, y biopsias de punzonado de las orejas son pesadas para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (puede ser también medido el grosor de la oreja para determinar la hinchazón). Las biopsias de las orejas inflamadas se recogen, se almacenan congeladas (muestras para análisis de biochip son congeladas a -80°C en TRIzol), y, como descrito arriba (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan con respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocito neutrófilo inflamatorio; y/o 2) expresión genética de tejido usando tecnología biochip. Las biopsias de orejas no inflamadas de ratones no tratados proporcionan niveles de línea de base de hinchazón, MPO y expresión genética. La inflamación de tejido puede ser también estudiada usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 7**Inflamación de oreja de ratón inducida por Éster Forbol o ácido araquidónico**

5 [0072] Estas ensayos son esencialmente de acuerdo a los descritos por Chang et al (Eur. J. Farmacol. 142, 197 (1987))
 (sin embargo otras cepas de ratones pueden ser también empleadas). Medicamento(s) de ensayo (suplatast en
 combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina,
 rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) en dosificación de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por
 10 vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratones machos y hembras (como comparación,
 algunos experimentos son realizados sin los medicamentos) Antes de la administración, soluciones madre de
 15 medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son disueltas como se necesita en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en
 agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también
 usados. 1 minuto a 24 horas tras la primera dosis de medicamento, 1-10 µg de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA),
 tetradecanoil forbol acetato (TPA), o 1-5 mg de ácido araquidónico en 10-30 µl de acetona o etanol es aplicado
 20 tópicamente a una o ambas orejas. 4-12 horas después de la aplicación de PMA o TPA, y 30 min a 6 horas después de
 la aplicación de ácido araquidónico, los animales son sacrificados, y las biopsias de punzonado de las orejas son
 pesadas para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (el grosor de la oreja puede ser también medido para
 determinar la hinchazón). Las biopsias de las orejas son recogidas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de
 biochip son congeladas a -80°C en TRIzol), y, como se describe arriba (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizadas
 con respecto a 1) acumulación de (MPO), que refleja acumulación de leucocito neutrófilo inflamatorio; y/o 2) expresión
 genética de tejido usando tecnología biochip. Biopsias de orejas no inflamadas de ratones no tratados proporcionan
 niveles de línea de base de hinchazón, MPO y expresión genética. La inflamación del tejido puede ser estudiada usando
 técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales.

Ejemplo 8**Reacción e Inflamación aguda de tejido en respuesta a la lesión en ratón y rata**

25 [0073] Ratones macho CBA o NMRI pesando aproximadamente 15-30 g, o ratas machos Wistar o Sprague-Dawley
 pesando aproximadamente 150-450 g, son empleadas (otras cepas de ratones y ratas pueden ser también empleadas).
 La lesión aguda de tejido e inflamación aguda se consigue en la parte distal de la cola o de una de las orejas usando un
 escalpelo en condiciones asépticas. Uno, dos o tres cortes longitudinales paralelos, aproximadamente de 5-15 mm de
 30 largo, son hechos a través de todas las capas de la piel. Los medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con
 estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina or
 atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) en dosis de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea,
 intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la dosis primera dada de un minuto a 24 horas antes de la lesión
 de tejido (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración,
 35 soluciones madre de los medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son disueltas como se necesita en por ejemplo 0.5% o
 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos
 pueden ser también usados. 2-48 horas después de la lesión, los animales son sacrificados y los segmentos lesionados
 del tejido se retiran, pesan y almacenan congelados (muestras para el análisis de biochip son congeladas a -80°C en
 40 TRIzol), y, como se describe abajo (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan con respecto a 1) acumulación de
 mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocito neutrófilo inflamatorio; y/o 2) expresión genética de
 tejido usando tecnología de biochip. Tejidos correspondientes no inflamados/sin lesión provenientes de animales no
 tratados proporcionan niveles de MPO y expresión genética. Las reacciones e inflamación del tejido en respuesta a la
 lesión pueden ser también estudiadas usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 9**Inflamación y Reacción aguda de tejido en respuesta a lesión en rata**

45 [0074] Son empleadas ratas macho Sprague-Dawley pesando 350-500 g (aunque otras cepas pueden ser empleadas
 también) Los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno se consigue una lesión de tejido aguda e
 inflamación aguda en la arteria carótida comun izquierda como sigue:

Tras exposición quirúrgica de las arterias carótidas comunes izquierdas, externa e interna y cesación temporal del flujo
 local sanguíneo con ligaduras temporales, un catéter de balón (2-French Fogarty) es pasado a través de la carótida
 50 externa dentro de la aorta. A continuación, el balón es inflado con suficiente agua para distender la arteria carótida
 comun y entonces retirado a la carótida externa. Este procedimiento es repetido tres veces, y entonces el cateter es
 retirado, la carótida externa ligada y la herida cerrada. Los medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con
 estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o
 atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) en dosificación de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea,
 intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, con la dosis primera dada de un minuto a 24 horas antes de la lesión
 55 de tejido (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración,
 soluciones madre de los medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son disueltas como se necesita en por ejemplo 0.5% o
 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos
 pueden ser también usados. 2-48 horas después de la lesión, los animales son anestesiado con isoflurano en oxígeno y

5 sus arterias carótidas izquierdas expuestas. Se colocan grapas en la parte más proximal de las arterias carótidas comunes e internas, respectivamente, y luego el vaso entre los grapas es lavado cuidadosamente con solución salina estéril y/o TRIZOL, eliminado, pesado y almacenado congelado (muestras para análisis de biochip son congeladas a -80°C en TRIZOL), y, como abajo se describe (Ejemplo 10 y 12), analizado posteriormente con respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja acumulación de leucocito neutrófilo inflamatorio; y/o 2) expresión genética de tejido usando tecnología de biochip. Los vasos correspondientes inflamados/no lesionados de ratas no tratadas proporcionan niveles de línea de base de MPO y expresión genética. Las reacciones e inflamación de tejido en respuesta a la lesión pueden ser también estudiadas usando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales.

10 Ejemplo 10

Acumulación Inflamatoria de Mieloperoxidasa en Tejido

15 [0075] La enzima mieloperoxidasa (MPO) es abundante en leucocitos neutrófilos y es a menudo empleada como un marcador para la detección de acumulación de neutrófilos en tejido inflamado. Para determinar la acumulación de inflamatoria en tejidos inflamados de ratas y ratones (como se describe en el Ejemplo 5-9 arriba), los tejidos son homogeneizados en bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0.5%, y congelados-descongelados. La actividad MPO del sobrenadante es determinada espectrofotométricamente como el cambio en absorción en 650 nm (25°C) sucediendo en la reacción redox de H₂O₂-tetrametilbenzidina catalizada por MPO. Los valores son expresados como unidades MPO/mg de tejido.

Ejemplo 11

20 Ensayos de Células de Músculo Blando

25 [0076] Las células de músculo blando aórtico de rata (RASMCs) son aisladas como se ha descrito previamente (Hedin et al, Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol., 17, 1977 (1997)). Las células son cultivadas (37°C/5% CO₂) en medio Ham F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 Pg/mL de ácido ascórbico L, 50 µg/mL de estreptomicina, 50 IU/mL de penicilina (F- 12/10% de suero fetal bovino), cultivado para confluencia, pasadas en serie para tripsinización, y empleadas en experimentos tras 2-6 pasadas. Se siembran RASMCs en placas de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 4x10⁴ células por pocillo en F-12/10% suero fetal bovino (placas con mayores números de pocillos por placa y números apropiados más bajos de células por pocillo pueden ser también usados). Tras 24 horas, las células son sincronizadas en fase G0/G1 por inanición en medio Ham F-12 suplementado con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA), 50 µg/mL de ácido L-ascórbico, 50 µg/mL de estreptomicina y 50 IU/mL de penicilina (F-12/0.1% BSA) durante 24-48 horas. Para estimar la síntesis de ADN, RASMCs privadas de comida son estimuladas con bien 10 ng/ml IGF-1 o 10% de suero fetal bovino durante 12-48 horas (otros mitógenos bien establecidos tal como PDGF pueden ser también empleados). El medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) son añadidos 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación (ver Ejemplo 1 anterior para detalles relacionados con soluciones y concentraciones madre de medicamento; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con la estimulación). En comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos. Las células son etiquetadas con 1 µCi [3H]-timidina durante 8 horas antes de el final del periodo de estimulación. Las placas son entonces lavadas con PBS congelado, incubadas hasta el día siguiente con 10% (w/v) ácido tricloroacético congelado, lisadas en 0.2 M de hidróxido de sodio, y se mide la radiactividad en un contador en centelleo líquido. La proliferación de RASMC estimuladas puede ser también analizada usando ensayos de proliferación celular de bromodeoxiuridina (BrdU) comercialmente disponibles (por ejemplo Proliferación Celular ELISA, BrdU, de Roche Applied Science), el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) (ambos según las instrucciones del fabricante), o por recuento celular. En experimentos separados (para estudiar expresión genética), números mayores de RASMCs privadas de comida (1-5 x 10⁶ células por pocillo) son estimulados con 10 ng/ml IGF-1 o 10% de suero fetal bovino (o PDGF) como antes, o con LPS (1-100 ng/mL), con 1-10% de suero fetal bovino durante 4-48 horas (todos los estímulos con y sin medicamento(s) de ensayo como antes). Las células son entonces recogidas y almacenadas congeladas (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12 abajo).

50 [0077] Células de músculo blando bronquial humano (HBSMCs, Promocell, Heidelberg, Germany) son cultivadas con DMEM suplementado con 10% FBS, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0.12 IU/mL de insulina, y con o sin 2 µPg/mL de amfotericina B. Antes de los experimentos, el cultivo celular puede ser parado durante 24 horas en medio bajo en FBS (0.3-5%), libre de insulina. Para estimular la formación y liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tal como IL-8 y eotaxina, los HBSMCs (al 80% de confluencia, correspondiente a aproximadamente matraz 8x10⁵/25 cm²) son incubados (37°C/5% CO₂) durante 24-48 horas (en DMEM con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con combinaciones diferentes de IL-1β y TNF-α (ambos en 1-50 ng/mL). Las células son incubadas (a 37°C/ 5% CO₂ en DMEM con 0.3-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina, suplatast solo y estatina sola, como antes) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de HBSMC (ver Ejemplo 1 arriba para detalles referente a las soluciones y concentraciones madre de medicamento; medicamento(s) de ensayo pueden ser añadidos simultáneamente con la

estimulación de HBSMC). Para comparación, algunos experimentos están realizados sin los medicamentos. Tras las incubaciones/estimulaciones, se cuantifican las concentraciones de citoquina y quimiocina humanas en los sobrenadantes usando kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones de los fabricante(s). Las células son entonces recogidas y almacenadas congeladas (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta tratamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12 abajo).

Ejemplo 12

Análisis de Expresión Genética

[0078] Se aísla ARN total de tejidos de ratón y rata (ver Ejemplo 5 a 9, 15 y 16) usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido de limpieza por RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo a los protocolos de los fabricantes. El ARN total de las incubaciones/estimulaciones celular descrito en los ejemplos anteriores y posteriores (mastocitos de ratón, MonoMac-6, PBMC, PMN, RAW 264.7, RASMC, HBSMC, NB4, HL-60) es aislado usando el Mini Kit RNeasy (QIAGEN), con o sin set de DNasa libre de RNasa (QIAGEN), de acuerdo al protocolo(s) del fabricante. Dependiendo de las especies de las cuales se originan los diferentes tejidos y células, se realiza análisis de biochip usando GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array, GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array o Gene- Chip® Rat Genome 230 2.0 Array, o la correspondiente versión más nueva de esas chips (todos los chips de Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo a los protocolos del fabricante. Los datos de expresión de biochip se analizan usando por ejemplo GeneChip Operating Software (Affymetrix) y Bioconductor/R (www.bioconductor.org). Otro programa relevante puede ser también empleado.

[0079] La expresión genética de las especies diferentes puede ser también analizada usando Human Genome Survey Biochip V2.0, Mouse Genome Survey Biochip V2.0 o Rat Genome Survey Biochip (o versión más nueva correspondiente de estos biochips) de acuerdo a los protocolos del fabricante Applied Biosystems (Foster City, CA). Estos datos de expresión de biochip son analizados usando por ejemplo. 1700 Chemiluminescent Biochip Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) suministrado con una base de datos Oracle® de anotaciones, GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y Biochip Suite versión 5.0 software (MAS 5.0, Affymetrix). Otro programa relevante puede ser también usado.

[0080] La expresión genética (niveles de mRNA) puede ser también analizada usando PCR cuantitativa o semi-cuantitativa. El análisis de expresión genética al nivel de proteína puede analizarse usando kits de inmunoensayo de enzima comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) (según las instrucciones de los fabricante(s)), o Western blot convencional y/o enfoques inmunohistoquímicos.

Ejemplo 13

Ensayos de proliferación celular

[0081] Se mide la proliferación de mastocitos de ratón estimulados y no estimulados, células MonoMac-6, células RAW 264.7, células NB4, células HL-60 y HBSMC descritas en los ejemplos anteriores y posteriores (con o sin contención de crecimiento durante 24-48 horas en 0.1-5% suero fetal bovino antes de la adición de los medicamentos de ensayo respectivos y/o estímulos descritos en los Ejemplos anteriores y posteriores durante 24-72 horas) usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o ensayos comercialmente disponibles de proliferación celular de bromodeoxiuridina (BrdU) (por ejemplo Cell Proliferation ELISA, BrdU, de Roche Applied Science) según las instrucciones de fabricantes. Otros ensayos convencionales de proliferación pueden ser también usados.

Ejemplo 14

Ensayos de Agregación Plaquetaria

[0082] Se analiza la agregación de plaquetas humanas o de conejo (en plasma o sangre entera ricos en plaquetas) inducida por difosfato de adenosina (ADP), ácido araquidónico, colágeno o el análogo de tromboxano U-46619 usando agregometría, for ejemplo como descrito por Bertele et al (Eur. J. Pharmacol. 85, 331 (1982)). La agregación de plaquetas inducida (como antes) puede analizarse usando plaquetas de conejo o humano lavadas y/o con otra agregometría establecida u otros métodos correspondientes para medir la agregación de plaquetas. Medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) son añadidos 1-120 minutos antes de la inducción de agregación de plaqueta (ver Ejemplo 1 arriba para detalles en referencia a las soluciones madre de medicamentos; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con la inducción de agregación de plaquetas). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos.

Ejemplo 15

Inflamación Peritoneal de Ratón Inducida por Zymosan y Otros Estímulos

[0083] Este ensayo es esencialmente de acuerdo a Rao et al (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917 (1994)) (otras cepas

de ratones pueden ser también empleadas). Medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovas-tatin, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) en dosis de 0.03 to 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración, soluciones madre de medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son diluidas como se necesite en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también usados. De 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis de medicamento, 0.5-2 mg de zymosan A (Sigma, cat. no. Z4250) en 0.5-1 mL PBS estéril (sonicado y bien mezclado) se inyectan intraperitonealmente (en lugar de usar zymosan A, la inflamación peritoneal puede ser también inducida por inyección intraperitoneal de concentraciones proinflamatorias de otros estímulos proinflamatorios bien establecidos tal como IgE anti-ratón (con o sin pretratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenano, peptona proteosa, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . Los medicamento(s) de ensayo pueden ser también administrados simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otros estímulos proinflamatorios). 2-24 horas después de la inyección de zymosan (o uno o más de los otros estímulos proinflamatorios), los animales son sacrificados. La cavidad peritoneal es entonces lavada con 1-3 mL de un lavado buffer (PBS congelado con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades/mL de heparina). Se hacen recuentos de leucocitos total y diferencial en el fluido d lavado con un hemocitómetro seguido de teñido con solución de Türk y/o en preparaciones de citospina teñida con tinte May-Grunwald Giemsa o un tinte modificado de Wright (Diff-Quik), respectivamente, por microcopio óptico usando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar recuentos de leucocitos totales y diferenciales pueden ser también empleados. El fluido de lavado restante es centrifugado (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y sobrenadante de fluido de lavado libre de células es almacenado congelado (-20°C a -80°) hasta que se analice para contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o contenido de citoquinas/quimiocinas de ratón (por ejemplo IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL- 12p70, IFN γ) como se describe en el Ejemplo 1 y 4 antes. El contenido de histamina en el sobrenadante de fluido de lavado es determinado usando kits de inmunoensayo de enzima histamina comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las intrucciones de los fabricante(s). La activación inflamatoria celular peritoneal puede ser también estudiada midiendo la actividad de beta-hexosaminidasa en el fluido de lavado usando el ensayo de beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del fluido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 mL 0.05 M KHPO₄ pH 6.0 con 0.5% HTAB y almacenados congelados (-20°C to -80°) hasta análisis de contenido de mieloperoxidasa (MPO) como descrito por Rao et al (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Los granulados celulares idénticos de animales separados son almacenados congelados (80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta tratamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con buffer de lavado, son recogidas biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y/o otros órganos/tejidos retroperitoneales) de la cavidad inflamada peritoneal, pesadas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de biochip son congeladas a -80°C en TRIZOL, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como descrito en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas respecto a la expresión genética de tejido usando tecnología biochip. Cavidades peritoneales no inflamadas de animales no tratados proveen niveles de línea de base de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas/quimiocinas y expresión genética. La inflamación de tejido puede ser también estudiada usando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales.

Ejemplo 16

40 Inflamación Peritoneal de Rata Inducida por Zymosan y Otros Estímulos

[0084] Se usan ratas macho de Wistar o Sprague Dawley pesando aproximadamente 150-450 g. Los medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) en dosis de 0.03 a 50 mg/kg son administrados por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos). Antes de la administración, soluciones madre de medicamentos (ver Ejemplo 1 arriba) son diluidas como se necesite en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos pueden ser también usados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del medicamento, 1-100 mg zymosan A (Sigma, cat. no. Z4250) en 1-10 mL de PBS esteril (sonicado y bien mezclado) se inyectan intraperitonealmente (en lugar de usar zymosan A, la inflamación peritoneal puede ser también inducida por inyección intraperitoneal de concentraciones proinflamatorias de otros estímulos proinflamatorios bien establecidos tal como IgE anti-ratón (con o sin pretratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenano, peptona proteosa, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . Los medicamento(s) de ensayo pueden ser también administrados simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otros estímulos proinflamatorios). 2-24 horas después de la inyección de zymosan (o uno o más de los otros estímulos proinflamatorios), los animales son sacrificados. La cavidad peritoneal es entonces lavada con 1-3 mL de un lavado buffer (PBS congelado con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades/mL de heparina). Se hacen recuentos de leucocitos total y diferencial en el fluido d lavado con un hemocitómetro seguido de teñido con solución de Türk y/o en preparaciones de citospina teñida con tinte May-Grunwald Giemsa o un tinte modificado de Wright (Diff-Quik), respectivamente, por microcopio óptico usando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar recuentos de leucocitos totales y diferenciales pueden ser también empleados. El fluido de lavado restante es centrifugado (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y sobrenadante de fluido de lavado libre de células es almacenado congelado (-20°C a -80°) hasta que se analice para contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y/o contenido de citoquinas/quimiocinas de ratón (por ejemplo

IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ) como se describe en el Ejemplo 1 y 4 antes. El contenido de histamina en el sobrenadante de fluido de lavado es determinado usando kits de inmunoensayo de enzima histamina comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones de los fabricante(s). La activación inflamatoria celular peritoneal puede ser también estudiada midiendo la actividad de beta-hexosaminidasa en el fluido de lavado usando el ensayo de beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del fluido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 mL 0.05 M KHPO₄ pH 6.0 con 0.5% HTAB y almacenados congelados (-20°C to -80°) hasta análisis de contenido de mieloperoxidasa (MPO) como descrito por Rao et al (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Los granulados celulares identicos de animales separados son almacenados congelados (80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta tratamiento adicional para experimentos de biochip (ver Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con buffer de lavado, son recogidas biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y/o otros órganos/tejidos intra- o retroperitoneales) de la cavidad inflamada peritoneal, pesadas, almacenadas congeladas (muestras para análisis de biochip son congeladas a -80°C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), y, como descrito en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas respecto a la expresión genética de tejido usando tecnología biochip. Cavidades peritoneales no inflamadas de animales no tratados proveen niveles de línea de base de MPO, mediadores inflamatorios, citoquinas/quimiocinas y expresión genética. La inflamación de tejido puede ser también estudiada usando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas convencionales.

Ejemplo 17

Ensayos de Liberación de Mediador Inflamatorio Celular NB4 y HL-60

[0085] Células NB4 humanas (Lanotte et al, Blood, 77, 1080 (1991)) son cultivadas (37°C/5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 10% (v/v) de suero fetal bovino. Para diferenciación, se añade 1-5 μ M de ácido all-trans-retinoico (ATRA), cada tercer día generalmente.

[0086] Células humanas HL-60 (Steinhilber et al, Biochim. Biofis. Acta 1178, 1 (1993)) son cultivadas (37°C/5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10-20% (v/v) de suero fetal bovino. Para diferenciación se añade ATRA (1-5 PM), DMSO (1-2%), PMA (100-500 ng/mL) o vitamina D3 (1-15 PM) para 5 días.

[0087] Para estimular la formación y liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), células diferenciadas o indiferenciadas NB4 o HL-60 (a 1-15x10⁶/mL) son incubadas durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 10-40 μ M ácido araquidónico y/o 2-10 μ M de ionóforo cálcico A23187. Las células NB4 y HL-60 pueden también ser estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP), fMLP, y/o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como antes. Las incubaciones/estimulaciones de NB4 y HL-60 pueden también ser realizadas en la presencia de plaquetas humanas (a partir de un donante saludable de sangre) con un ratio de NB4/HL-60:plaqueta de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones son paradas con 1 mL de metanol frío y prostaglandina B₂ (PGB₂) añadido como estándar interno. Las muestras son centrifugadas y los sobrenadantes son diluidos con agua para alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH es ajustado a 3-4. Los metabolitos de ácido araquidónico en el sobrenadante son extraídos en columnas en fase sólida C18 (Sorbent Technology, U.K.) precondicionadas (1 mL de metanol seguido por 1 mL H₂O). Los metabolitos son eluidos con metanol, tras lo cual un volumen de agua es añadido al eluato. Para la fase inversa HPLC, se mezcla 76 μ L de cada muestra con 39 μ L H₂O (otras proporciones de volúmenes pueden ser también usadas). Una columna Waters RCM 8x10 es eluida con metanol/acetónitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35: 0.01 v/v) a 1.2 mL/min. La absorción del eluato es controlada a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. Kits de inmunoensayo de enzimas disponibles comercialmente (kits EIA/ELISA) para medir LTB₄ pueden ser usados también según las instrucciones del fabricante(s) del kit. Usando kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) según las instrucciones del fabricante(s), pueden ser también analizados los sobrenadantes de las incubaciones/estimulaciones NB4/HL-60 anteriores con respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células son incubadas (a 37°C en PBS sin calcio o en RPMI-1640 con 1-20% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de estimulación de NB4 or HL-60 para liberación del mediador inflamatorio (ver Ejemplo 1 arriba para detalles referente a soluciones madre de medicamento y concentraciones; medicamento(s) de ensayo pueden también añadirse simultáneamente con estimulación de NB4/HL-60). Para comparación, algunos experimentos son realizados sin los medicamentos.

[0088] Para estimular la formación y la liberación de citoquinas, quimiocinas y mediadores inflamatorios tales como IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PAF, C5a, células diferenciadas o indiferenciadas de NB4 o HL-60 (en 1-10_106/mL) son incubadas (37°C, 5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con 1-10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con lipopolisacárido (LPS 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 1-100 ng/mL) o ionóforo cálcico A23187 (1-10 PM), o combinaciones de estos estímulos. Las células de NB4 y HL-60 pueden ser también estimuladas con concentraciones biológicamente activas documentadas de difosfato de adenosina (ADP) y/o análogo de tromboxano U-46619. UIT o sin LPS, PMA y/o A23187 como antes. Las incubaciones/estimulaciones de NB4 y HL-60 pueden también ser realizadas en la presencia de plaquetas humanas (procedentes de donante de sangre saludable) con un ratio NB4/HL-60:plaqueta de 1:10 to 1:10000. Las células son incubadas (a 37°C, 5% CO₂ en RPMI-1640 con 1-

10% de suero fetal bovino, con o sin suplementos) con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina, suplatast solo y estatina sola, como antes) durante 1 minuto hasta 24 horas previa a estimulación de NB4 o HL-60 para liberación de citoquina/quimiocina/mediador (para comparación, algunos experimentos son realizados con medicamentos; medicamento(s) de ensayo pueden ser también añadidos simultáneamente con estimulación de NB4/HL-60). Tras centrifugar las células, las concentraciones del mediador y citoquina/quimiocina humanas en los sobrenadantes son cuantificadas usando un Citometric Bead Array (BD Biosciences Farmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. Kits de inmunoensayo de enzimas comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA kits) para medir las citoquinas / quimiocinas y mediadores pueden ser usados según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares son almacenados congelados (-80°C) en buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta procesamiento adicional para experimentos con biochip (ver Ejemplo 12 anterior)

[0089] Además de estudiar los efectos de los anteriores medicamentos sobre la liberación de los mediadores y quimiocinas/citoquinas de las células NB4 y HL-60 tipo neutrófilo, pueden analizarse los efectos de los medicamentos sobre la adherencia espontánea o estimulada y/o migración de estas células (puede usarse células polimorfonucleares de sangre humana recientemente aislada (PMN) aisladas de acuerdo a los protocolos estándar). La adherencia espontánea o estimulada (con fMLP, IL-8, PAF, LTB4 u otros factores activadores relevantes de PMN) del PMN o de las células tipo neutrófilo a, por ejemplo, células endoteliales cultivadas o superficies artificiales cubiertas por proteína se estudia usando enfoques y ensayos experimentales bien establecidos y documentados. Las migraciones (estimuladas con fMLP, IL-8, PAF, LTB4 u otros factores quimiotácticos PMN relevantes) de PMN o las tipo neutrófilo son estudiadas usando enfoques y ensayos experimentales bien establecidos y documentados, por ejemplo la migración a través de membranas cubiertas por proteínas comercialmente disponibles diseñadas para tales estudios de migración.

Ejemplo 18

Activación de Leucocito y Plaqueta en Sangre Humana Entera

[0090] Se recoge sangre venosa por venopunción sin epistaxis, usando tubos vacutainer siliconizados conteniendo 1/10 volumen de 129 mM citrato trisódico (Becton Dickinson, Meilan, France). La expresión de selectina P de plaqueta de sangre entera (que refleja la actividad plaquetaria), la expresión de leucocito CD11 b (que refleja la actividad de leucocito), el recuento de plaquetas solas y de microagregados plaqueta-plaqueta, y agragados leucocito - plaqueta (PLAs) se miden usando ensayos citométricos de flujo, esencialmente como se ha descrito previamente (ver por ejemplo Li et al. Circulation 100, 1374 (1999) para referencia). Brevemente, alícuotas de 5 µPL de sangre entera son añadidas a 45 µPL de solución salina tamponada Hepes (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, pH 7.4) conteniendo anticuerpos apropiadamente diluidos (ver abajo) en ausencia o presencia de estímulos activadores de plaqueta tales como difosfato de adenosina (ADP), U-46619, U-44069, factor activador de plaqueta (PAF), ácido araquidónico, colágeno o trombina, y/o estímulos activadores de leucocito tales como N-formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP), ácido araquidónico, PAF, LPS, A23187 or LTB4. Antes de exponer la sangre a los estímulos activantes de leucocitos y/o de plaqueta + los anticuerpos, muestras sanguíneas (0.1-1 ml) son incubadas con medicamento(s) de ensayo (suplatast en combinación con estatina (pitavastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o, preferentemente, simvastatina, rosuvastatina o atorvastatina), suplatast solo y estatina sola) durante 1-60 minutos (pueden ser también añadidos medicamento(s) de ensayo simultáneamente con los estímulos anteriores). Para comparación, algunas muestras sanguíneas son estimuladas como antes sin exposición a los medicamento(s). La expresión de selectina P en plaqueta es determinada por anticuerpo monoclonal (MAb) AC1.2 R-ficoeritrin (RPE)-CD62P (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La expresión de leucocito CD11 b se determina por isotiocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado MAb BEAR 1 (Immunotech, Marseille, Francia). MABs isotópicos conjugados con FITC y RPE son usados como controles negativos. Gránulos fluorescentes (partículas SFERO™ Rainbow, 1.8-2.2 Pm) usados para contar plaquetas son de PharMingen (San Diego, CA, USA). Las plaquetas son identificadas con MAb Beb 1 anti- CD42a conjugado con FITC (GPIX) (Becton Dickinson), y los leucocitos son identificados con MAb J33 anti-CD45 conjugado con RPE (Immunotech). Muestras (sangre+ anticuerpos tratada o no tratada con medicamentos con o sin estímulos, como antes) son incubadas a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Más tarde las muestras son diluidas y suavemente fijadas con 0.5% (v/v) de solución salina de formaldehído, y analizada para los diversos parámetros de plaquetas y leucocitos con un citómetro de flujo Beckman-Coulter EPICS XL-MCL (Beckman- Coulter Corp., Hialeah, FL). Los datos de expresión de selectina P de plaqueta son facilitados como los porcentajes de células positivas a selectina P en la población de plaquetas y como recuento absoluto de plaquetas positivas a selectina P. La expresión de leucocito CD11b es reportada como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la población total de leucitos y de subpoblaciones de leucocitos. Los agregados de leucocito en plaqueta (PLAs) se presentan a la vez como recuentos y porcentajes absolutos de leucocitos conjugados con plaqueta en la población total de leucocitos y entre linfocitos, monocitos, y neutrófilos. Otros reactivos, enfoques/condiciones experimentales, equipamiento y modos de análisis relevantes para medir la activación correspondiente de leucocitos y plaquetas en sangre entera humana pueden ser también empleados.

Ejemplo 19

Inhibición por Suplatast y Rosuvastatina de Liberación de factor necrosis de tumor de Macrófagos

[0091] Células de la línea celular de macrófago humano MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al, Int. J. Cancer, 41,

5 456 (1988)) fueron cultivadas (37°C/5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 1 x aminoácidos no esenciales, 10 µg/mL de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg /mL de estreptomycin y 5% (v/v) de suero fetal bovino. Al comienzo del experimento, células MM6 fueron sembradas en placas de pocillos a una densidad de 1x10⁵ células/mL (100 µL por pocillo en experimentos de viabilidad, y 150 µL por pocillo en experimentos de liberación de TNF – ver abajo).

[0092] Se trataron las células de MM6 (condiciones de incubación como antes) con las concentraciones finales indicadas de los medicamentos de ensayo durante 48 horas antes de la cuantificación de la viabilidad / crecimiento o estimulación de célula con forbol-12-miristato-13- liberación acetato (PMA; Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden) seguido de la medida de liberación de TNF inducida por PMA (ver abajo para detalles).

10 [0093] Para estimular la formación y liberación del factor de necrosis de tumor (TNF), las células MM6 fueron incubadas (37°C/5% CO₂) durante cinco horas (en RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino con suplementos como antes) con PMA a una concentración final de 10 ng/mL.

15 [0094] Después de centrifugar las células tras las diferentes incubaciones/estimulaciones de MM6 (ver antes y después), las concentraciones de TNF en los sobrenadantes se cuantificaron usando Human TNF ELISA Kit II de BD Biosciences- Pharmingen (San Diego, USA) según las instrucciones suministradas por el fabricante.

20 [0095] Se midió el crecimiento/viabilidad celular de MM6 usando el Reactivo de Proliferación Celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia). El reactivo WST-1 está diseñado para ser usado para cuantificación espectrométrica de por ejemplo crecimiento celular y viabilidad y fue usado según las instrucciones del fabricante. La longitud de onda para medir la absorción era de 450 nm y la absorción de todos los pocillos con células MM6 expuestas al reactivo WST-1 era sobre 0.95 (n=3 para cada condición de ensayo).

[0096] Se hicieron en solución salina estéril soluciones madre de suplatast (sales de tosilato compradas de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, USA) y rosuvastatina (sales de sodio; la rosuvastatina fue extraída y purificada a partir de comprimidos Crestor® comercialmente disponibles y aisladas como sales de sodio como se describe en Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 5, No. 5, pp 437-444, 1997).

25 [0097] Células MM6 que no fueron expuestas a PMA no produjeron niveles detectables de TNF. Sin embargo, después de cinco horas de estimulación con PMA, la concentración media de TNF en los sobrenadantes de células MM6 no tratadas era de 41.1 pg/mL (n=2).

30 [0098] Después del tratamiento de las células MM6 con rosuvastatina sola en una concentración final de 10 µM o 30 µM, las concentraciones medias de TNF después de la estimulación de PMA aumentaron (comparadas con las células no tratadas) a 76.7 pg/mL y 84.0 pg/mL, respectivamente (n=2 para cada concentración).

[0099] Después del tratamiento de las células MM6 con suplatast solo en una concentración final de 1 µM o 10 µM, hubo un decrecimiento menor (comparado con las células no tratadas) en los correspondientes concentraciones medias TNF a 39.6 pg/mL (3.8% disminución) y 34.8 pg/mL (15.4% de disminución), respectivamente (n=2 para cada concentración).

35 [0100] Cuando las células MM6 fueron tratadas con 1 µM de suplatast en presencia de 10 µM o 30 µM de rosuvastatina, hubo una inhibición sinérgica de 36.1% y 34.6%, respectivamente, de liberación de TNF inducida por PMA (valores medios, n=2 para cada una de las combinaciones) comparada con el tratamiento con 10 µM o 30 µM, respectivamente, de rosuvastatina sola (ver arriba). Es más, cuando las células MM6 eran tratadas con 10 µM de suplatast en presencia de 10 µM o 30 µM de rosuvastatina, había una inhibición sinérgica de 88.5% y 75.1%, respectivamente, de la liberación de TNF (valores del medio, n=2 para cada una de las combinaciones) comparada con el tratamiento con 10 µM o 30 µM, respectivamente, de rosuvastatina sola (ver arriba).

40 [0101] Comparada con células MM6 no tratadas, la viabilidad de células MM6 (ensayadas usando el ensayo WST-1 como antes) tratadas durante 48 horas con 10 µM o 30 µM de rosuvastatina era de 105% y 102%, respectivamente. Los valores correspondiente para 1 µM o 10 µM de suplatast eran 94% y 92%, respectivamente, y para las cuatro diferentes combinaciones de suplatast en rosuvastatina anteriores los valores eran de 124% (suplatast 1 µM + rosuvastatina 10 µM), 125% (suplatast 1 µM + rosuvastatina 30 µM), 114% (suplatast 10 µM + rosuvastatina 10 µM) y 121% (suplatast 10 µM + rosuvastatina 30 µM). De ese modo, la inhibición sinérgica de la liberación de TNF por las combinaciones suplatast-rosuvastatina no era causada por crecimiento o viabilidad celular disminuida.

Ejemplo 20

50 Inhibición por Suplatast y Atorvastatina de la Liberación de Factor de Necrosis de Tumor de Macrófagos

[0102] El procedimiento del Ejemplo 19 arriba fue repetido para atorvastatina (sal de sodio; recibida como atorvastatina de calcio como regalo de Biocon, Ltd., Bangalore, India y convertida en sales de sodio convirtiendo primeramente las sales de calcio en ácido libre por adición de ácido clorhídrico acuoso y luego, después de aislamiento por medio de extracción, añadiendo un equivalente de NaOH acuoso), en lugar de rosuvastatina.

[0103] Después del tratamiento de las células MM6 con atorvastatina sola en una concentración final de 10 μM o 30 μM , las concentraciones medias de TNF después de la estimulación de PMA aumentada aumentaron (comparado con las células no tratadas) a 133.6 pg/mL y 59.7 pg/mL, respectivamente (n=2 para cada concentración).

5 **[0104]** Cuando las células MM6 fueron tratadas con 1 μM de suplatast en presencia de 10 μM o 30 μM de atorvastatina, hubo una inhibición sinérgica de 35.0% y 76.9%, respectivamente, de la liberación de TNF inducida por PMA (valores medios, n=2 para cada una de las combinaciones) comparado con el tratamiento con 10 μM o 30 μM , respectivamente, de atorvastatina sola (ver arriba). Es más, cuando las células MM6 fueron tratadas con 10 μM suplatast en la presencia de 10 μM o 30 μM de atorvastatina, hubo una inhibición sinérgica de 84.0% y 93.9%, respectivamente, de la liberación de TNF (valores medios, n=2 para cada una de las combinaciones) comparado con el tratamiento con 10 μM o 30 μM , respectivamente, de atorvastatina sola (ver arriba).

10 **[0105]** Comparado con células MM6 no tratadas, la viabilidad de células MM6 (ensayadas usando el ensayo WST-1 como antes) tratadas durante 48 horas con 10 μM o 30 μM de atorvastatina era de 94% y 79%, respectivamente. Los valores correspondientes para las cuatro diferentes combinaciones suplatast - atorvastatina anteriores los valores eran de 110% (suplatast 1 μM + atorvastatina 10 μM), 85% (suplatast 1 μM + atorvastatina 30 μM), 97% (suplatast 10 μM + atorvastatina 10 μM) y 90% (suplatast 10 μM + atorvastatina 30 μM). De ese modo, de nuevo, la inhibición sinérgica de la liberación de TNF por las combinaciones de suplatast-atorvastatina no eran causadas por crecimiento o viabilidad celular disminuidos.

15 **[0106]** Uno o más de los ejemplos descritos arriba demuestran un claro efecto sinérgico para la combinación de suplatast y estatina (por ejemplo simvastatina y, más particularmente, rosuvastatina y/o atorvastatina).

REIVINDICACIONES

1. Un producto de combinación comprendiendo:
- (a) suplatast, o un sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo; y
- (b) una estatina seleccionada de rosuvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y atorvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Un producto de combinación como reivindicado en la Reivindicación 1, en donde la estatina es atorvastatina.
3. Un producto de combinación como reivindicado en la Reivindicación 1, en donde la estatina es rosuvastatina.
4. Un producto de combinación como reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende una formulación farmacéutica incluyendo suplatast, o una sal o solvato del mismo aceptable farmacéuticamente, una estatina seleccionada de rosuvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y atorvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable; y un adyuvante disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Un producto de combinación como reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, la cual comprende un kit de partes que comprende componentes:
- (A) una formulación farmacéutica incluyendo suplatast, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en mezcla con un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- 15 (B) una formulación farmacéutica incluyendo una estatina seleccionada de rosuvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y atorvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un adyuvante, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable,
- 20 cuyos componentes (A) y (B) se proporcionan cada uno en una forma que es adecuada para la administración en conjunción con la otra.
6. Un método de hacer un kit de partes como definido en la Reivindicación 5, cuyo método comprende poner al componente (A) en asociación con un componente (B), de ese modo haciendo los dos componentes adecuados para la administración en conjunción entre sí.
7. Un kit de partes que comprende:
- 25 (I) uno de los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 5; junto con
- (II) instrucciones para usar el componente en conjunción con el otro de los dos componentes.
8. Un producto de combinación como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o 7, en donde la estatina no es empleada en la forma de un estatina lactona.
9. Un kit de partes como se reivindica en cualquiera de la Reivindicación 5, Reivindicación 7, o Reivindicación 8 (como dependiente de la Reivindicación 5 o Reivindicación 7), donde los componentes (A) y (B) son adecuados para uso secuencial, separado y/o simultáneo en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
- 30 10. El uso de un producto de combinación como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
11. Un producto de combinación como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 9, para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
- 35 12. El uso de los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 5, o cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 9 (como dependientes de la Reivindicación 5) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo método comprende la administración de los componentes (A) y (B) a un paciente en conjunción entre sí en terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio
- 40 13. Los componentes (A) y (B) como definido en la Reivindicación 5, o cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 9 (como dependientes de la Reivindicación 5), para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo tratamiento comprende el administrar dichos componentes (A) y (B) a un paciente en conjunción entre sí en terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio.
- 45 14. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 9, o un uso como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 13, en donde el trastorno es seleccionado de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, migraña, enfermedad de Crohn, escleriosis múltiple, psoriasis, artritis reumática, lupus eritematoso sistémico o colitis ulcerosa.

- 15.** Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 9, o un uso como se reivindica en la Reivindicación 10 a 13, en donde el trastorno es aterosclerosis o un transtrono cardiovascular asociado.
- 16.** Un kit de partes o uso como se reivindica en la Reivindicación 15, en donde el trastorno es aterosclerosis.
- 5 **17.** Un kit de partes o uso como se reivindica en la Reivindicación 15, en donde el trastorno cardiovascular asociado con aterosclerosis es seleccionado de un aneurisma aórtico, arteriosclerosis, enfermedad obstructiva arterial periférica, enfermedad de arteria coronaria, una enfermedad coronaria, ruptura y/o inestabilidad de placa, ruptura y/o inestabilidad de ateroma, una enfermedad vascular, una enfermedad arterial, una enfermedad isquémica, isquemia e ictus.
- 18.** Un kit de partes o uso como se reivindica en la Reivindicación 17, en donde el trastorno cardiovascular es un aneurisma aórtico.
- 10 **19.** Un kit de partes o uso como se reivindica en la Reivindicación 17, en donde la arteriopatía coronaria es seleccionada de angina pectoral, infarto de de miocardio y ataque al corazón; la enfermedad coronaria es seleccionada de una enfermedad cardíaca y una cardiopatía; el ictus es seleccionado de un accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio; y/o el trastorno es ruptura y/o inestabilidad de placa, ruptura y/o inestabilidad de ateroma.
- 15 **20.** Un kit de partes o uso como se reivindica en cualquiera de las Reivindicacionesde 9 a 19, en donde el paciente tiene un síndrome coronario agudo.