[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780051473.2

[51] Int. Cl.
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 101610765A

[51] Int. Cl. (续)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)

[22] 申请日 2007.11.16

[21] 申请号 200780051473.2

[30] 优先权

[32] 2006.12.18 [33] US [31] 60/875,377

[32] 2007.10.29 [33] US [31] 61/000,743

[86] 国际申请 PCT/GB2007/004408 2007.11.16

[87] 国际公布 WO2008/074975 英 2008.6.26

[85] 进入国家阶段日期 2009.8.18

[71] 申请人 卡多兹公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

[72] 发明人 约翰·劳德

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王 旭

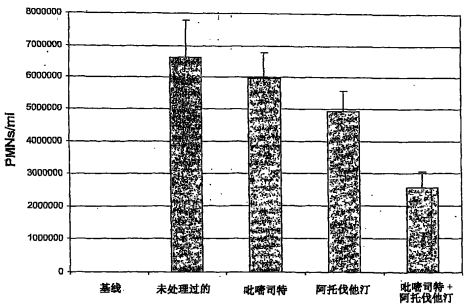
权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用于治疗炎症的新组合物

[57] 摘要

本发明提供组合产品，其包含：(a)吡嘧司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物；和(b)他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物。这些组合产品找到了治疗动脉硬化症和相关疾病方面的特殊用途。



1. 一种组合产品，其包含：

(a)吡嘧司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物；和

(b)他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物。

2. 如权利要求 1 所述的组合产品，其中所述他汀选自匹伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、洛伐他汀、罗苏伐他汀、普伐他汀和阿托伐他汀。

3. 如权利要求 2 所述的组合产品，其中所述他汀选自辛伐他汀、罗苏伐他汀和阿托伐他汀。

4. 如权利要求 3 所述的组合产品，其中所述他汀选自罗苏伐他汀和阿托伐他汀。

5. 如在前权利要求中任一项所述的组合产品，所述组合产品包括药物制剂，所述药物制剂包含：吡嘧司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物；他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物；以及药学可接受的助剂、稀释剂或载体。

6. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的组合产品，所述组合产品包括包含如下组分的多部分的试剂盒：

(A)药物制剂，其包含与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的吡嘧司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物；以及

(B)药物制剂，其包含与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物，

所述组分(A)和(B)各自是以适于彼此结合给药的形式提供的。

7. 一种制备如权利要求 6 所述的多部分的试剂盒的方法，所述方法包括使组分(A)与组分(B)结合，从而使两种组分适于相互结合给药。

8. 一种多部分的试剂盒，其包含：

(I)如权利要求 6 所述的组分(A)和(B)中的一种；以及

(II)将两种组分中的组分彼此结合使用的说明。

9. 如权利要求 1 至 6 中任一项或 8 所述的组合产品，其中所述他汀不是以他汀内酯形式使用。

10. 如权利要求 1 至 6 中任一项或 8 所述的组合产品，其中所使用的

他汀是洛伐他汀内酯或辛伐他汀内酯。

11. 如权利要求 6、权利要求 8 或权利要求 9 或权利要求 10 (从属于权利要求 6 或权利要求 8)中任一项所述的多部分的试剂盒，其中所述组分(A)和(B)适于连续、单独和/或同时用于治疗炎症。

12. 如权利要求 1 至 6 或 8 至 11 中任一项所述的组合产品用于制备治疗炎症的药物的用途。

13. 一种治疗炎症的方法，所述方法包括将如权利要求 1 至 6 或 8 至 11 中任一项所述的组合产品对需要这种治疗的患者给药。

14. 如权利要求 11 所述的多部分的试剂盒、如权利要求 12 所述的用途、或如权利要求 13 所述的方法，其中所述病症选自偏头痛、哮喘、慢性阻塞性肺病、局限性回肠炎、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮或溃疡性结肠炎。

15. 如权利要求 11 所述的多部分的试剂盒、如权利要求 12 所述的用途、或如权利要求 13 所述的方法，其中所述病症是动脉粥样硬化症或相关的心血管病症。

16. 如权利要求 15 所述的多部分的试剂盒、用途和方法，其中所述病症是动脉粥样硬化症。

17. 如权利要求 15 所述的多部分的试剂盒、用途和方法，其中所述与动脉粥样硬化症相关的心血管病症选自主动脉瘤、动脉硬化、末梢动脉阻塞性疾病、冠状动脉病、冠心病、动脉粥样斑破裂、粉瘤破裂和/或不稳定、脉管疾病、动脉疾病、缺血性疾病、局部缺血和中风。

18. 如权利要求 17 所述的多部分的试剂盒、用途和方法，其中所述冠状动脉病选自心绞痛、心肌梗死和心脏病发作。

19. 如权利要求 17 所述的多部分的试剂盒、用途和方法，其中所述冠心病选自心脏病和心脏疾病。

20. 如权利要求 17 所述的多部分的试剂盒、用途和方法，其中所述中风选自脑血管意外和瞬间局部缺血性发作。

21. 如权利要求 11 至 20 中任一项所述的多部分的试剂盒、用途或方法，其中所述患者具有严重的冠状综合症。

用于治疗炎症的新组合物

技术领域

本发明涉及新的药物组合物。

背景技术

心血管病，比如冠心病和中风是死亡、残疾和卫生保健费用损失的主因，特别是在工业化国家中。这些病症常常是动脉粥样硬化症的直接后遗症，在抽烟的对象中优先产生的多因素病症和/或目前危险因素比如高血压、糖尿病 mellitus、高胆固醇血症、高血浆低密度脂蛋白(LDL)和甘油三酯。

通常经过几年，有时经过数十年产生动脉粥样硬化病变(或者动脉粥样斑)。通常涉及诸如在动脉壁中的胆固醇累积量、泡沫细胞形成、炎症和细胞增生的病理过程。

高密度脂蛋白(HDL)、LDL、总胆固醇和甘油三酯的水平是决定产生动脉粥样硬化症和相关的心血管病症比如冠状动脉病(例如心绞痛，心肌梗死等)、中风(包括大脑中枢神经血管病和瞬间局部缺血性发作)和末梢动脉阻塞性疾病的风险的全部指标。

具有高的总胆固醇和/或甘油三酯水平的患者的风险是相当大的，与他们是否还具有有利的 HDL 水平无关。具有正常的总胆固醇水平但是具有较低的 HDL 水平的患者的风险也在增加。近来，还已经指出与高水平的阿朴脂蛋白 B (ApoB；其在极低密度脂蛋白(VLDL)和 LDL)中携带类脂)和/或低水平的阿朴脂蛋白 A-I (ApoA-I；其在 HDL 中携带类脂)相关的心血管病的风险水平是极高的。

降低血清中的 LDL 水平的药物可以降低动脉粥样硬化动脉粥样斑的累积量，并且可以降低(长期)动脉粥样斑破裂和相关的血栓栓塞并发症的风险。有几种药物可以有助于降低血液胆固醇水平。最通常开出的处方是羟甲基戊二酰基-CoA(HMG-CoA)还原酶抑制剂(以下不管它们的类名而一

起定义为“他汀”)，包括辛伐他汀和阿托伐他汀。这些药物直接防止肝中形成胆固醇，因此降低心血管病的风险。

其它处方药类包括树脂(resins)(比如消胆胺和降脂树脂 2 号)，其通过结合胆汁酸起作用，因而使肝产生更多的胆汁酸，并且在该过程中耗尽胆固醇。此外，维生素 B 尼克酸已经被报道除增加 HDL 水平以外，还在高的剂量时降低甘油三酯和 LDL 水平。已知 Fibrate (比如吉非贝齐和非诺贝特)降低甘油三酯并且可以增加 HDL 水平。

胆固醇降低药物比如他汀的引入显著地降低冠心病和中风的死亡率。然而，这些药物所遇到的缺点在于它们对于所有患者的效果并不是相同的，并且已知具有某种负面效应(例如肝功能变化，肌病和横纹肌溶解)，以及动脉粥样硬化症仍然是死亡和残疾的主要原因。事实上，最近的评论文章(Briel 等，*JAMA*，**295**，2046(2006))提出他汀在具有严重的冠状综合症的患者治疗的第一个 4 月过程中并不降低严重的心血管病。

因此对动脉粥样硬化症和相关的心血管病症的更安全和/或更有效的治疗，特别是对具有严重冠状综合症的那些患者存在实际临床需要。

吡嘧司特是用于治疗比如哮喘、过敏性鼻炎和结膜炎的病症的口服活性抗过敏性药物。参见例如美国专利 4,122,274、欧洲专利申请 EP 316 174 和 EP 1 285 921，Yanagihara 等，*Japanese Journal of Pharmacology*，**51**，93 (1989)和 *Drugs of Today*，**28**，29 (1992)。该药物目前在例如日本以钾盐的形式销售。

已经报道涉及吡嘧司特在防止再狭窄方面的潜在应用的研究(Miyazawa 等，*J. Cardiovasc. Pharmacol.*，**30**，157 (1997)和 Ohsawa 等，*Am. Heart J.*，**136**，1081(1998)和 *J. Cardiol.* **42**，13(2003))。还参见欧洲专利申请 EP 766 693，其公开了吡嘧司特对动脉平滑肌细胞的增生表现出抑制作用。

美国专利申请 US 2006/0024365 公开了双倍延迟药物剂量形式，其包括与立即释放低剂量活性成分组合的改性的释放高剂量高溶解度活性成分。包括一些本文中提及的那些在内的许多药物都被列举为用于低剂量活性成分的潜在候选者。

美国专利申请 US 2007/0014733 A1 公开了用于治疗心血管病症的药

物组合物，其包含奈必洛尔的代谢产物。在可以与这种组合物中这样的代谢产物组合的许多活性成分中，列举了各种活性化合物，包括本文中所提及的那些中的一些。

美国专利申请 US 2006/0148830 A1 公开了用于*尤其是*泌尿系统的病症、炎症等的 LPA 受体(尤其是 EDG-2 受体)的新对抗剂。在可以与这种新型化合物组合的许多不同活性成分之中，单独地提及某些活性化合物，包括本文中所提及的那些中的一些。

美国专利申请 US 2006/0084695 公开了用于治疗心血管病，比如动脉粥样硬化症等的 MAP 激酶和/或 HMG-CoA 还原酶的抑制剂。

最后，美国专利申请 US 2005/0181023 A1 公开了包括用于抑制或者防止组织和/或器官表面之间的粘附的吡嘧司特的药物组合物。

具体包含吡嘧司特和他汀的组合产品的应用在上述任何一个文献中均没有具体被公开。此外，这种组合产品在治疗动脉粥样硬化症和相关的心血管病症，特别是具有严重的冠状综合症的患者的用途在这些文献的任何一个中均没有被公开。

发明内容

根据本发明，提供一种组合产品，其包含：

(a) 吡嘧司特(pemirolat)或者其药学可接受的盐或者溶剂化物；和

(b) 他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物，

所述组合产品以下被称为“根据本发明的组合产品”。

术语“他汀”包括一种或多种他汀。术语“他汀”和“HMG-CoA 还原酶抑制剂”在本发明的范围内同义使用，并且包括氟伐他汀、辛伐他汀、洛伐他汀、罗苏伐他汀、匹伐他汀、格仑伐他汀、西立伐他汀、普伐他汀、美伐他汀、柏伐他汀、达伐他汀和阿托伐他汀。

可以提及的其它他汀包括阿昔替酯、苯氟雷司、Clestin、考来酮、二氢洛伐他汀、美格鲁托、rawsonol 以及具有下列代号的化合物：ATI-16000、BAY-10-2987、BAY-×-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以及NO-增强/释放他汀，比如NC X -6560 (硝基普伐他汀)。

更优选的他汀包括匹伐他汀 (例如 Livalo®，Pitava®)，并且更优选氟伐他汀 (例如 Lescol®)、辛伐他汀(例如 Zocor®, Lipex®)、洛伐他汀(例如 Mevacor®， Altocor®)、罗苏伐他汀(例如 Crestor®)、普伐他汀(例如 Pravachol®, Selektine®, Lipostat®)以及阿托伐他汀(例如 Lipitor®, Torvast®)。特别优选的他汀包括辛伐他汀、更优选罗苏伐他汀并且特别是阿托伐他汀。

可以提及的药学可接受的盐包括酸加成盐和碱加成盐。这样的盐可以通过常规的方法形成，例如通过活性成分的游离酸或游离碱的形式与1当量以上适合的酸或碱任选在溶剂中，或者在其中盐不溶解的介质中反应，随后使用标准技术(例如在真空中，通过冷冻干燥或者通过过滤)除去所述的溶剂或者所述的介质。盐还可以通过例如使用适合的离子交换树脂将盐形式的活性成分的抗衡离子与另一种抗衡离子交换而制备。

优选的吡嗪司特盐包括吡嗪司特钠，更优选吡嗪司特钾。

优选的他汀盐包括钠、钾和钙盐，比如匹伐他汀钙、氟伐他汀钠、普伐他汀钠、罗苏伐他汀钙和阿托伐他汀钙。

在根据本发明的组合产品中使用的活性成分可以以非对映异构体富含形式和/或对映异构体富含形式使用。发明人的用意是通过“非对映异构体富含”和“对映异构体富含”分别表示活性成分的非对映异构体/对映异构体的任意混合物，其中一种同分异构体以比另一种更大的比率存在。例如，可以使用具有大于90%的光学杂质(对映异构体过量；e.e.)的对映异构体。

根据本发明的组合产品提供与他汀结合的如下限定的吡嗪司特的给药，因此可以以分开的多种制剂存在，其中这些制剂中的至少一种包括吡嗪司特，并且至少一种包括他汀，或者可以以组合的制剂形式存在(即，配制的)(即，以包含吡嗪司特和他汀的单一制剂的形式存在)。

因此，进一步提供：

(1)药物制剂，其包含吡嗪司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物；他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物；以及药学可接受的助剂、稀释剂或载体(所述制剂以下被称为“组合制剂”)；以及

(2)包含以下组分的多个部分的试剂盒(a kit of parts):

(A)包含与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的吡嘧司特或其药学可接受的盐或者溶剂化物的药物制剂；以及

(B)包含与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的他汀或其药学可接受的盐或者溶剂化物的药物制剂

所述组分(A)和(B)各自是以适于彼此结合给药的形式提供的。

根据本发明的另一个方面，提供一种制备如上限定的多个部分的试剂盒的方法，所述方法包括使如上限定的组分(A)与如上限定的组分(B)结合，从而使两种组分适于相互结合给药。

使两种组分相互“结合”，发明人认为(include)试剂盒的组分(A)和(B)可以为：

(i)以单独制剂的形式(即相互独立地)提供，随后相互混合在一起以彼此结合用于组合治疗；或

(ii)以“组合包装”的单独组分形式包装并且放置在一起，以相互结合用于组合治疗。

因此，进一步提供一种多个部分的试剂盒，其包含：

(I)如本文中限定的组分(A)和(B)中的一种；以及

(II)将两种组分中的组分彼此结合使用的说明。

本文中所述的试剂盒可以包括多于一种的包含适合量/剂量的吡嘧司特/盐/溶剂化物的制剂，和/或多于一种的包含适合量/剂量的他汀/盐/溶剂化物的制剂，以提供重复配制。如果多于一种制剂(包括活性化合物)存在，则这些的制剂可以相同，或者可以在任何一种化合物的剂量方面、化学组成和/或物理形式方面不同。

优选用于根据本发明的组合产品的他汀不是所谓的“他汀内酯”形式。然而，根据本发明的组合产品可以包括匹伐他汀内酯和美伐他汀内酯，优选氟伐他汀内酯，罗苏伐他汀内酯，普伐他汀内酯和阿托伐他汀内酯，特别是洛伐他汀内酯和辛伐他汀内酯。

根据本发明的组合产品找到了治疗炎症的用途。炎症通常的特征在于免疫防护机制的激活，从而对宿主导致弊大于利的后果。这种病通常伴随有不同程度的组织发红或充血、肿胀、高热症、疼痛、瘙痒、细胞死亡和

组织破坏，细胞增生和/或丧失机能。可以提及的炎症包括膀胱炎、前列腺炎、糖尿病血管并发症、偏头风，更优选敏感症(包括过敏性结膜炎和过敏性鼻炎)、关节强硬性脊椎柱炎、哮喘、特异性皮炎、慢性阻塞性肺病、接触性皮炎、痛风性关节炎、炎症性肠病(比如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎)、多发性硬化、骨关节炎、胰腺炎、牛皮癣、牛皮癣关节炎、类风湿性关节炎、腱炎、粘液囊炎、Sjogren 综合症、全身性红斑狼疮、葡萄膜炎、风疹、血管炎、动脉粥样硬化症和相关的心血管病症。可以提及的病包括偏头风 更优选哮喘、慢性阻塞性肺病、局限性回肠炎、多发性硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、溃疡性结肠炎，更特别是动脉粥样硬化症和相关的心血管病症。

本领域技术人员应理解术语“动脉粥样硬化症”包括特征在于在血管、特别是动脉壁中的胆固醇累积量、泡沫细胞形成、炎症和细胞增生的任何疾病。与动脉粥样硬化症“相关”的心血管病症包括主动脉瘤(包括异常和/或动脉粥样硬化主动脉瘤)，更优选动脉硬化、末梢动脉阻塞性疾病、冠状动脉病(例如心绞痛，心肌梗死心脏病发作等)、冠心病(包括心脏病和心脏疾病，比如缺血性心脏病)，并且还可以包括动脉粥样斑破裂(plaque rupture)或粉瘤破裂和/或不稳定、脉管或动脉疾患，缺血性疾病/局部缺血和中风(包括脑血管意外和瞬间局部缺血性发作)。

优选的患者群包括具有严重的冠状综合症的患者。本领域技术人员应理解术语“严重的冠状综合症”包括任何异常的心肌和缺血状态，但通常不独有地与例如胸部疼痛(例如强心性)和/或异常心电图(ECG)的产生相关。这样的综合症是心肌梗死(心脏病发作)的最普通表现。技术人员应理解该术语很大程度上同与“稳定心绞痛”相反的术语“不稳定心绞痛”同义(即在用力时产生并且在休息时减轻的绞痛)。在恶化状态发生的产生的绞痛(“渐强绞痛”)类似地被技术人员视为在“不稳定”的定义之内。

根据本发明的另一个方面，提供一种治疗炎症，特别是动脉粥样硬化症和/或相关的心血管病症的方法，所述方法包括将根据本发明的组合产品对需要这种治疗的患者给药。

为了避免疑义，在本发明的上下文中，术语“处理”、“治疗”和“治疗方法”包括需要的患者的治疗或者缓解治疗，以及易于炎症比如动脉粥样硬

化症和相关的心血管病症的患者的预防性治疗和/或诊断。

对于如本文中所述的多部分的试剂盒，发明人认为“结合给药”包括：在相关疾病的治疗过程中按序、单独和/或同时地将包含吡嘧司特(或者其盐/溶剂化物)和他汀(或其盐/溶剂化物)的相应制剂给药。

因此，对于根据本发明的组合产品，术语“结合给药”包括将组合产品的两种组分(吡嘧司特和他汀)一起或者时间上非常接近地给药(任选重复地)，以在相关疾病的治疗过程中能够为患者提供有利的作用，而非在治疗的相同过程中将包含吡嘧司特的制剂或者包含他汀的制剂在没有另一种组分的情况下单独地(任选重复地)给药。确定组合是否提供对特殊疾病和其治疗过程提供更大的有利作用将取决于治疗或者预防的条件，但是可以由技术人员常规地实现。

此外，在根据本发明的多部分的试剂盒的上下文中，术语“与.....结合”包括可以将两种制剂中的一种或另一种给药(任选重复地)，在其后、之前和/或同时将另一种组分给药。当在本上下文中使用时，术语“同时给药”和“与....同时给药”包括在 48 小时(例如 24 小时)内将各个剂量的吡嘧司特和他汀相互给药。

“患者”包括哺乳动物(包括人)患者。

根据本发明，优选将吡嘧司特和他汀以药学可接受剂型的包含所述化合物的药物制剂的形式局部地或系统地给药，例如，口服、静脉内或动脉内(包括血管内扩张(stent)和其它血管周围装置/剂型)、肌肉、皮肤、皮下、转化粘液质(transmucosally)(例如舌下或者口腔)、直肠、皮肤(transdermally)、鼻子、肺部(例如气管或者支气管)、局部地、或者任何其它的肠胃外路线给药。优选的供给模式包括口服(很大程度上)、静脉内、皮肤或者皮下、鼻子、肌肉、腹膜内供给。

通常将吡嘧司特和他汀一起或者分别以一种或多种与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的药物制剂形式给药，所述药学可接受的助剂、稀释剂或载体可以是在应有考虑给药和标准药物实践的预期路线的情况下选择。这种药学可接受的载体对活性化合物可以是化学惰性的，并且在使用条件下可以没有不利的负面影响或者毒性。这些药学可接受的载体还可以赋予任一种活性成分的即时或者改进的释放，而不论是以组合制剂还

是以多部分的试剂盒的形式一起给药。

适合的药物制剂可以是商购的，或者另外描述于文献，例如，Remington *The Science and Practice of Pharmacy*，第 19 版，Mack Printing Company， Easton，Pennsylvania (1995)和 *Martindale – The Complete Drug Reference* (第 34 版)以及其中所引用的文献，所有这些文献的相关内容通过引用结合在此。另外，包含吡嘧司特和他汀的适合的制剂并且特别是组合制剂的制备可以由技术人员采用常规技术非创造性地实现。

在一种或多种制剂中的活性成分的量将取决于要治疗的疾病的严重性以及要治疗的患者，以及所使用的一种或多种化合物，但是可以由技术人员非创造性地确定。

根据要治疗的病症以及要治疗的患者，以及给药路线，活性成分可以以对需要它的患者在治疗上有效的不同剂量给药。

然而，在本发明的范围内，对哺乳动物、特别是对人给药的剂量应当足以在合理的时帧(timeframe)内实现哺乳动物的治疗响应。本领域技术人员应认识到精确剂量和组合物以及最适合的供给体系的选择也受到以下因素的影响：尤其是制剂的药物性质、治疗的疾病的性质和严重性和接受者的身体状态和精神敏感性以及特殊化合物的潜能、要治疗的患者的年龄、状态、体重、性别和反应，和疾病的阶段/严重性以及患者之间的基因差别。

活性成分的给药可以是连续或者间歇的(例如通过快速浓注)。剂量还可能决定于给药的时机和频率。

适合的活性成分剂量包括在医学文献比如 *Martindale – The Complete Drug Reference* (第 34 版)和其中所提及的文献中所提及的那些，所有这些文献的相关内容都通过引用结合在此。因此，适合的活性成分剂量在约 0.01 mg/kg 体重~约 1,000 mg/kg 体重的范围内。在以口服形式给药时，更优选的范围是每天约 0.1 mg/kg 至约 20 mg/kg。

然而，适合的吡嘧司特剂量对于本领域技术人员是已知的。例如，每日剂量范围的适合下限是约 2 mg，例如约 5 mg，比如约 10 mg，并且更优选约 20 mg；而每日剂量范围的适合上限是约 200 mg，例如约 100 mg，比如约 80 mg，并且更优选约 60 mg。因此，每日口服剂量可以在约 2 mg 至

约 50 mg 之间，比如在约 5 mg 至约 40 mg 之间，并且优选在约 10 mg 至约 30 mg 之间。适合的个人剂量可以是约 20 mg/天，或者约 40 mg/天。上述剂量/剂量范围全部与所用制剂是如上所述的组合制剂还是多部分的试剂盒无关。

类似地，适合的他汀剂量对于本领域技术人员是已知的。因此，每天的口服剂量典型地在约 2 mg 至约 150 mg，比如约 5 mg 至约 100 mg，优选约 8 mg 至约 90 mg，例如约 10 mg 至约 80 mg 的范围内，与所用制剂是如上所述的组合制剂还是多部分的试剂盒无关。适合的匹伐他汀剂量按每天计在约 0.5 mg/至约 10 mg，比如约 0.75 mg 至约 5 mg，优选约 1 mg 至约 4 mg，例如约 2 mg 的范围内，与所用制剂是如上所述的组合制剂还是多部分的试剂盒无关。

无论如何，医学专业人员或者其它技术人员能够常规地确定最适合个人患者的实际剂量。上述剂量是平均情况的示例；当然，可能存在更高或者更低的剂量范围是有利的个别情况，并且这些都在本发明的范围内。

无论在本文中是否使用单词“约”，例如在活性成分剂量的上下文中，都应当理解这些变量是近似的，并且同样地，可以从本文中规定的数值变化± 10%，例如± 5%，优选± 2%(例如± 1%)。

本文中所述的组合产品/方法可以具有的优点在于，在上述病的治疗中，与本领域中已知用于治疗炎症(比如动脉粥样硬化症和相关的心血管病)的类似方法(治疗)或者其它方法相比，它们对于医生和/或患者可以更方便、更有效、毒性更小、具有更宽的活性范围、更有效力、产生更少的负面影响，或者它可以具有其它有用的药物性质。

本发明参考附图(图 1)通过下列实施例进行说明，其中腹腔灌洗液中按每 mL 计的多形核白细胞(PMN)的平均数量来自没有(基线)和具有由腹膜内注射的酵母聚糖 A (酵母聚糖)的 5 小时刺激所导致的腹膜炎的老鼠。显示了在未治疗动物(未治疗)和用单独的吡嘧司特(Pemiro)、单独的阿托伐他汀(Atorva)或与阿托伐他汀组合的吡嘧司特(Pemiro+Atorva)治疗的动物的酵母聚糖诱导的发炎 PMN 白细胞累积量。

实施例

实施例 1

莫诺美地-6 (monoMac-6)细胞发炎介体释放化验

在补充有 1 mM 丙酮酸钠、1×非必需的氨基酸、1-100 μg/mL 胰岛素、1 mM 草乙酸、100 单位/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10%(体积/体积)牛胎儿血清的 RPMI-1640 培养基中培养(37°C/5%CO_2)莫诺美地-6 (MM6)细胞(Ziegler-Heitbrock 等, *Int. J. Cancer*, **41**, 456 (1988))。添加 TGFβ (2 ng/ml)和 1,25$(OH)_2$D3 (50 nM)以进行分化，通常要约 2-4 天。

为了刺激发炎介体白细胞三烯 B_4 (LTB_4)的释放，使用 25-50 μM 花生四烯酸和 2-10 μM 钙离子载体 A23187 (还可以在没有花生四烯酸的情况下使用 A23187)，将分化或者未分化的 MM6 细胞(在 1-15×10^6/mL；0.5-1 mL)培育 5-30 分钟(在 37°C，在含钙的 PBS 中)。还可以在有或没有上述的 A23187 和/或花生四烯酸的情况下利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 MM6 细胞。MM6 培育/刺激也可以人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 MM6:血小板比率为 1:10 至 1:10000。使用 2 体积的冷甲醇和作为内标添加的前列腺素 B_2 (PGB_2)停止培育/刺激。将样品离心，并且用水稀释上层清液，以达到 30%的最终甲醇浓度，并且将 pH 调节至 3-4。在预调节的(1 mL 甲醇，随后是 1 mL H_2O) C18 固相柱子(英国的 Sorbent Technology)上萃取上清液中的花生四烯酸代谢产物。使用甲醇洗脱代谢产物，之后将 1 体积的水添加到洗出液中。对于反相 HPLC，将 76 μL 的每一个样品与 39 μL H_2O 混合(也可以使用其它体积比)。使用甲醇/乙腈/H_2O/乙酸(30:35:35:0.01 体积/体积)以 1.2 mL/min 洗脱 Waters RCM 8×10 柱子。在 270 nm 监测洗出液的吸光度以以检测并且量化 PGB_2 和 LTB_4。还可以根据来自试剂盒生产商的说明使用用于测量 LTB_4 的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。根据来自生产商的说明使用可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，还可以分析来自上述 MM6 培育/刺激的上清液中发炎介体前列腺素 E_2(PGE_2)和/或血栓烷 B_2($T\times B_2$)的含量。

利用超声、加热和根据需要的 pH 调节(还可以使用其它手段)，在乙醇、DMSO、N-甲基-2-吡咯烷酮、PEG 400、丙二醇和/或去离子水或生理

盐溶液中制备吡嘧司特和他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或优选地辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)的储备溶液。在用于发炎介体 释放的 MM6 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在不含钙的 PBS 中，或者在含 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中，在有或者没有补充物的情况下)1 分钟至 24 小时(还可以与 MM6 刺激同时添加一种或多种试验药物)。添加药物以达到 1 nM 至 100 μM 的最终浓度(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。

为了刺激发炎细胞因子和趋化因子比如 IL-1β、IL-6、TNF、IL-8、IL-10、IL-12p70、MCP-1 的释放，使用脂多糖(LPS，最终浓度 1-100ng/mL)、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA，最终浓度 1-100 ng/mL)或 LPS/PMA 混合物，将分化或者未分化的 MM6 细胞(在 1-10×10^6/mL)培育(37°C/5%CO_2) 4-24 小时(在具有 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中，具有或者没有补充物)。还可以在有或没有上述的 PMA 和/或 LPS 的情况下利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)、花生四烯酸、钙离子载体 A23187 和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 MM6 细胞。MM6 培育/刺激也可以在人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 MM6:血小板比率为 1:10 至 1:10000。在 MM6 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀；对于储备溶液和浓度，同上)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在含 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中，有或者没有补充物的情况系下)1 分钟至 24 小时(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行；还可以与 MM6 刺激同时添加一种或多种试验药物)。在培育/刺激后离心分离出(spinning down)细胞之后，使用 Cytometric Bead Array(美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen)，根据生产商的说明，量化上层清液中的人细胞因子和趋化因子浓度。还可以根据生产商的说明使用用于测量细胞因子和趋化因子的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。将细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列(microarray)实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

实施例 2

人的末梢血细胞发炎介体释放化验

采用建立的方案，通过 Lymphoprep 或 Ficoll-Paque 分离(使用或者不使用 Polymorphoprep 分离和/或右旋糖酐沉降)，从健康捐赠者血液中分离人末梢血液单核细胞(PBMC)或多形核细胞(PMN)。

为了刺激发炎介体白细胞三烯 B_4(LTB_4)的释放，使用 25-50 μM 花生四烯酸和 2-10 μM 钙离子载体 A23187 (还可以在不使用花生四烯酸的情况下使用 A23187)，将 PBMC 或 PMN (在 1-15×10^6/mL；0.5-1 mL)培育 5-30 分钟(在 37°C，在含钙的 PBS 中)。还可以在有或没有上述的 A23187 和/或花生四烯酸的情况下利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 PBMC/PMN。上述 PBMC/PMN 培育/刺激也可以在人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 PBMC/PMN:血小板比率为 1:10 至 1:10000。使用 2 体积的冷甲醇和作为内标添加的前列腺素 B_2 停止培育/刺激。将样品离心，并且用水稀释上层清液，以达到 30%的最终甲醇浓度，并且将 pH 调节至 3-4。在预调节的(1 mL 甲醇，随后是 1 mL H_2O) C18 固相柱子(英国的 Sorbent Technology)上萃取上层清液中的花生四烯酸代谢产物。使用甲醇洗脱代谢产物，之后将 1 体积的水添加到洗出液中。对于反相 HPLC，将 76 μL 的每一个样品与 39 μL H_2O 混合(也可以使用其它体积比)。使用甲醇/乙腈/H_2O/乙酸(30:35:35:0.01 体积/体积)以 1.2 mL/min 洗脱 Waters RCM 8×10 柱子。在 270 nm 监测洗出液的吸光度以检测并且量化 PGB_2 和 LTB_4。还可以根据来自试剂盒生产商的说明使用用于测量 LTB_4 的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。根据来自生产商的说明使用可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，还可以分析来自上述 PBMC/PMN 培育/刺激的上层清液中的发炎介体前列腺素 E_2(PGE_2)和/或血栓烷 B_2(TXB_2)的含量。在用于发炎介体释放的 PBMC/PMN 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嗪司特，单独的吡嗪司特和单独的他汀)将细胞培育(在 37°C，在不含钙的 PBS 中，或者在含 0-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中)1 分钟至 24 小时(对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；

还可以与 PBMC/PMN 刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。

为了刺激发炎细胞因子和趋化因子比如 IL-1β、IL-6、TNF、IL-8、IL-10、IL-12p70、MCP-1 的释放，使用脂多糖(LPS，最终浓度 1-100ng/mL)、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA，最终浓度 1-100 ng/mL)或 LPS/PMA 混合物，将 PBMC/PMN(在 1-10×10^6/mL)培育(37°C/5%CO_2)4-24 小时(在具有 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中)。还可以在有或没有上述的 PMA 和/或 LPS 的情况下，利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)、花生四烯酸、钙离子载体 A23187 和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 PBMC/PMN 细胞。PBMC/PMN 培育/刺激也可以在人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 PBMC/PMN:血小板比率为 1:10 至 1:10000。在用于细胞因子/趋化因子释放的 PBMC/PMN 刺激(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行；还可以与 PBMC/PMN 刺激物同时添加一种或多种试验药物)之前，使用一种或多种试验药物(与他汀组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀，同上)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在含 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中)1 分钟至 24 小时。在培育/刺激后离心分离出该细胞之后，使用 Cytometric Bead Array(美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen)，根据生产商的说明，量化上层清液中的人细胞因子和趋化因子浓度。还可以根据生产商的说明使用用于测量细胞因子和趋化因子的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。将细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

实施例 3

老鼠肥大细胞发炎介体释放化验

通过培养来自 C57BL/6 老鼠的骨髓细胞而得到由骨髓得到的培养的老鼠肥大细胞(mMC)。将骨髓细胞(来自用 PBS 冲洗过的老鼠大腿骨)在 10% WEHI-3 或 X-63 富含的经调节的 RPMI 1640(37°C/5%CO_2)中培养，其中补充有 10%热减活的牛胎儿血清、4 mM L-谷氨酰胺、50 μM 2-巯基乙醇、1 mM 丙酮酸钠、0.1 mM 非必需的氨基酸、10 mM Hepes 以及 100

μg/mL 青霉素/链霉素。通过试剂盒在细胞表面上的表达(通过流动血细胞计数)和/或通过甲苯胺蓝染色(通常在培养至少 3-5 周之后)证实肥大细胞(在悬浮液中生长)的发展。

通过培养来自 C57BL/6 老鼠的骨髓细胞获得由骨髓得到的经培养的结缔组织型(CT 型)老鼠肥大细胞。将骨髓细胞在 RPMI 1640 培养基中培养(37°C/5%CO_2),所述 RPMI 1640 培养基含有 10%经过滤的 FCS、4 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、100 IU/mL 青霉素 G、100 μg/mL 链霉素、0.1 mM MEM 非必需的氨基酸和 50 μM 2-ME，补充有 50 ng/mL 的重组体鼠科干细胞因子和 1 ng/mL 鼠科重组体 IL-4。通过试剂盒在细胞表面上的表达(通过流动血细胞计数)和/或通过甲苯胺蓝染色(通常在培养至少 3-5 周之后)证实肥大细胞的发展。

还可以使用老鼠肥大细胞系 MC/9 (由 ATCC 得到，产品号 CRL-8306)和 C1.MC/C57.1 (Young 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. 美国*, **84**, 9175 (1987))。根据来自 ATCC (http://www.atcc.org)的说明培养 MC/9 细胞，并且如在 Rumsaeng 等(*J. Immunol.* **158**, 1353 (1997))中所述培养 C1.MC/C57.1 细胞。

对于通过 IgE-受体的交联的激活/刺激，首先使用被用作 15%杂交瘤上层清液的单克隆老鼠抗-TNP IgE-抗体(IgEl-b4, ATCC，Rockville，MD，美国)将经培养的肥大细胞在 37°C (5%CO_2)敏化 90 分钟。然后在通过添加 100 ng/mL 偶联比率为 9/1 的 TNP-BSA(Biosearch Technologies，San Francisco，CA)激活细胞(在 0.5-10×10^6/mL)之前，使用 PBS 将用于 N-乙酰基-β-D-氨基已糖苷酶 (或组胺)或细胞因子/趋化因子释放化验(参见下面)的细胞进行两次洗涤，并且在补充有 0.2%牛血清白蛋白(BSA)(Sigma)的 RPMI-1640 培养基中重新悬浮。使用 TNP-BSA 的培育(37°C/5%CO_2)对于β-氨基已糖苷酶(或组胺)释放的分析进行 30 分钟，而对于细胞因子和趋化因子释放的分析进行 6-24 小时。在添加 TNP-BSA 之前，使用一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2)1 分钟至 24 小时(对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；还可以与 TNP-BSA 刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。

在培育/刺激之后，将样品离心，并且如下所述分析上层清液的 β-氨基已糖苷酶(或组胺)和/或细胞因子/趋化因子的含量。将细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

为了检测粒状肥大细胞酶 β-氨基已糖苷酶 的 IgE 依赖性释放，使用酶比色分析化验。将每一个令人满意的(well)上层清液的 60 μL 转移到 96 孔板，并且与等体积的底物溶液(7.5mM 对硝基苯基-N-乙酰基-b-D-氨基葡糖苷溶解在 80 mM 柠檬酸中，pH 4.5)混合。将该混合物在摇摆器平台上于 37°C 培育 2 小时。在培育之后，将 120 μL 甘氨酸(0.2 M，pH 10.7)添加至每一个孔内，并且使用 Ema× 精确微板读取器(Emax Precision Microplate Reader) (分子装置，Sunnyvale，CA)测量在 405 和 490 nm 的吸光度。β-氨基已糖苷酶 的释放表示为在细胞溶胞后确定的总 β-氨基已糖苷酶的百分比。为了检测粒状肥大细胞组胺的 IgE 依赖性释放，根据来自生产商的说明，使用用于测量组胺的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。

为了检测老鼠肥大细胞细胞因子和趋化因子比如 IL-6、IL-4、TNF、IL-1β、KC、MCP-1、IL-10、IL-12p70、IFNγ的 IgE 依赖性释放，根据生产商的说明，使用 Cytometric Bead Array (美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen)。还可以根据来自生产商的说明使用用于测量细胞因子和趋化因子的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。

除上述肥大细胞实验以外，还可以使用已经确立并且经证明的用于分析组胺、β-氨基已糖苷酶或类胰蛋白酶从新分离的腹膜大鼠或老鼠肥大细胞的诱导释放(使用例如抗-IgE (在使用或者不使用大鼠或老鼠 IgE 预处理细胞的情况下，或没有该预处理的情况下)伴刀豆球蛋白 A、蛋白质 L、化合物 48/80、离子载体 A23187、PMA)的实验方法和化验，研究一种或多种试验药物(同上)的肥大细胞抑制作用。

实施例 4

RAW 264.7 细胞发炎介体释放化验

将 RAW 264.7 细胞在 DMEM 中培养(37°C/5%CO_2)，DMEM 补充有

100 单位/mL 青霉素以及 100 μg/mL 链霉素和 10%牛胎儿血清。

为了刺激发炎细胞因子和趋化因子比如 IL-6、TNF、IL-1β、KC、MCP-1、IL-10、IL-12p70、IFNγ的释放，使用脂多糖(LPS，最终浓度 1-100ng/mL)、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA，最终浓度 1-100 ng/mL)、或 LPS/PMA 混合物，将 RAW 264.7 细胞(在 1-10×10^6/mL)培育(37°C/5%CO_2)4-24 小时(在具有 1-10%牛胎儿血清的 DMEM 中，具有或者不具有补充物)。还可以在有或没有上述的 PMA 和/或 LPS 的情况下，使用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)、花生四烯酸、钙离子载体 A23187 和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 RAW 264.7 细胞。RAW 264.7 培育/刺激还可以在老鼠或人(来自健康捐赠者血液)的血小板存在下进行，其中 RAW 264.7:血小板的比率为 1:10 至 1:10000。在用于细胞因子/趋化因子释放的 RAW 264.7 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在含 1-10%牛胎儿血清、具有或者不具有补充物的 DMEM 中)1 分钟至 24 小时(对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；还可以与 RAW 264.7 刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。在培育/刺激后离心分离出细胞之后，使用 Cytometric Bead Array(美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen)，根据生产商的说明，量化上层清液中的老鼠细胞因子和趋化因子的浓度。还可以根据生产商的说明使用用于测量细胞因子和趋化因子的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。将细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

实施例 5

由角叉菜胶导致的大鼠脚爪炎症

该化验是基本上根据由 Winter 等(*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**，544 (1962))所述的化验。将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿

托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量每隔 2-24 小时对重量约为 150-400 g 的雄性 Sprague-Dawley 或 Wistar 大鼠进行皮下、静脉内、腹膜内或口腔内给药(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在水(用于口腔治疗)或盐水(用于肠胃外给药)中例如 0.5%或 1%的甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在第一药物剂量之后 1 分钟至 24 小时，将在 0.9%盐水中的 0.5、1.0 或 2.0%角叉菜胶溶液(型号 IV Lambda，Sigma Chemical Co.)注入到麻醉大鼠的一个后爪的下脚底区域。在角叉菜胶注入之前和在角叉菜胶注入后指定的时间间隔 3-24 小时，使用连接至具有数字显示器的压力传感器的移位器官充满度测量器(displacement plethysmometer)测量被注射爪的体积。肿胀程度表示发炎浮肿的程度。在角叉菜胶注射之后的 3-24 小时，大鼠死亡并且灌满了盐水或 PBS(还可以使用其它灌注介质)。将来自发炎爪的脚底软组织活体收集、称重、冷冻保存(用于微阵列分析的样品在 TRIzol，Invitrogen，Carlsbad，CA 中于-80°C 冷冻)，以及如下所述(实施例 10 和 12)，随后对 1)反映发炎嗜中性白细胞累积量的髓过氧化物酶(MPO)累积量和/或 2)使用微阵列技术组织基因表达进行分析。来自未处理大鼠的未发炎爪组织提供了 MPO 的基线水平和基因表达。还可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术研究组织炎症。爪炎症还可能通过化合物 48/80(48/80，在 50-100 μl PBS 或盐水中为 1-5 μg) (代替角叉菜胶)的下脚底注射引起，随后在 48/80 注射后 30 分钟至 8 小时测量发炎爪肿胀，并且收集用于微阵列和/或 MPO 分析(同上)的组织活体。

实施例 6

由巴豆油引起的老鼠耳朵炎症

该化验基本上根据由 Tonelli 等(*Endocrinology* **77**，625 (1965))等所述的化验(还可以使用其它种类的老鼠)。每隔 2-24 小时将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量通过皮下、静脉内、腹膜内或口服方式

给药(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在例如水(用于口腔治疗)或者盐水(用于肠胃外给药)中 0.5%或 1%甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在第一次药物剂量后 1 分钟至 24 小时，将 10-30 μL 在丙酮或乙醇中的 2.0 或 4.0%巴豆油溶液局部地涂敷在一只或两只耳朵上。在巴豆油涂敷之后的规定时间间隔 4-12 小时，动物死亡，并且称量耳朵的穿孔活组织，以确定耳朵的发炎肿胀(也可以测量耳朵厚度以确定肿胀)。收集来自发炎耳朵的活组织、冷冻保存(将用于微阵列分析的样品在-80°C 冷冻于 TRIzol 中)，并且如下所述(实施例 10 和 12)，随后对 1)髓过氧化物酶(MPO)累积量、这反映发炎嗜中性白细胞累积量；和/或 2)利用微阵列技术的组织基因表达进行分析。来自未处理的老鼠的未发炎的耳朵活组织提供了肿胀、MPO 和基因表达的基线水平。组织炎症也可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术进行研究。

实施例 7

由佛波醇酯或花生四烯酸引起的老鼠耳朵炎症

这些化验基本上根据由 Chang 等(*Eur. J. Pharmacol.* **142**, 197 (1987))所述的化验(但是可以使用其它种类的老鼠)。每隔 2-24 小时将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嗪司特、单独的吡嗪司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量通过皮下、静脉内、腹膜内或口服方式对雄性或雌性老鼠给药(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在例如水(用于口腔处理)或者盐水(用于肠胃外给药)中 0.5%或 1%甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在第一次药物剂量后 1 分钟至 24 小时，将在 10-30 μl 丙酮或乙醇中的 1-10 μg 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(PMA)、十四烷酰基佛波醇乙酸酯(TPA)或 1-5 mg 花生四烯酸局部地涂敷在一只或两只耳朵上。在涂敷 PMA 或 TPA 后 4-12 小时以及在涂敷花生四烯酸后 30 min 至 6 小时，动物死亡，并且称量耳朵的穿孔活组织，以确

定耳朵的发炎肿胀(也可以测量耳朵厚度以确定肿胀)。收集来自发炎耳朵的活组织、冷冻保存(用于微阵列分析的样品在-80°C 冷冻于 TRIzol 中)，并且如下所述(实施例 10 和 12)，随后对 1)髓过氧化物酶(MPO)累积量、其反映发炎嗜中性白细胞累积量；和/或 2)利用微阵列技术层组织基因表达进行分析。来自未处理的老鼠的未发炎的耳朵活组织提供了肿胀、MPO 和基因表达的基线水平。组织炎症也可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术进行研究。

实施例 8

在老鼠和大鼠受伤反应中的严重组织反应和炎症

采用重约 15-30 g 的雄性 CBA 或 NMRI 老鼠或重约 150-450 g 的雄性 Wistar 或 Sprague-Dawley 大鼠(还可以采用其它种类的老鼠和大鼠)。在无菌条件下使用解剖刀在尾巴末端部分或一个耳朵处实现严重的组织受伤以及严重的炎症。一个、两个或三个平行的约 5-15 mm 长的纵向切口穿过皮肤的所有层。每隔 2-24 小时将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量通过皮下、静脉内、腹膜内或口服方式给药，其中第一次剂量是在组织受伤前 1 分钟至 24 小时提供的(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在例如水(用于口腔处理)或者盐水(用于肠胃外给药)中 0.5%或 1%甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在受伤后 2-48 小时，动物被杀死，并且将组织的受伤部分取出，称量并且冷冻保存(用于微阵列分析的样品在-80°C 冷冻于 TRIzol 中)，并且如下所述(实施例 10 和 12)，随后对 1)髓过氧化物酶(MPO)累积量、其反映发炎嗜中性白细胞累积量；和/或 2)利用微阵列技术的组织基因表达进行分析。来自未治疗动物的相应的未受伤/未发炎组织提供了 MPO 和基因表达的基线水平。对受伤反应的组织反应和炎症也可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术进行研究。

实施例 9

在大鼠受伤反应中的严重组织反应和炎症

采用重350-500 g的雄性Sprague-Dawley大鼠(但是还可以使用其它种类的大鼠)。动物被氧中的异氟烷麻醉，并且按如下在左边颈总动脉中实现严重的组织受伤和严重的炎症: 在左边颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉的外科暴露和使用临时绷带临时终止局部血液流动之后，使球状导液管(2-法国 Fogarty)穿过颈外动脉进入主动脉。接着，用足够的水使球膨胀以使颈总动脉扩张，然后向后拉到颈外动脉上。该过程重复三次，然后移除导液管，绑扎颈外动脉并且封闭伤口。将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)以 0.03至 50 mg/kg 的剂量在皮下、静脉内、腹膜内或口腔内每隔 2-24 小时给药，在组织受伤之前的 1 分钟至 24 小时给出第一次剂量(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)以例如在水(用于口腔处理)或盐水(用于肠胃外给药)中的 0.5%或 1%的甲基纤维素中进行稀释。还可以使用其它媒介物。在受伤之后 2-48 小时，动物被氧中的异氟烷麻醉，并且暴露它们的左边颈动脉。将夹子分别放在颈总动脉和颈内动脉的很接近部分，然后将夹子之间的脉管轻柔地用无菌盐水和/或 TRIzol 冲洗、移除、称重，并且冷冻保存(用于微阵列分析的样品在 TRIzol 中于-80°C 冷冻)，以及如下所述(实施例 10和 12)那样，随后对 1)反映发炎嗜中性白细胞累积量的髓过氧化物酶(MPO)累积量和/或 2)使用微阵列技术的组织基因表达进行分析。来自未处理大鼠的相应的未受伤/未发炎的脉管提供了 MPO 和基因表达的基线水平。还可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术研究对受伤响应的组织反应和炎症。

实施例 10

组织髓过氧化酶的发炎累积量

酶髓过氧化物酶(MPO)富含于嗜中性白细胞中，通常被用作检测发炎组织中的嗜中性累积量的指标(marker)。为了确定在发炎的老鼠和大鼠组

织中的发炎髓过氧化物酶累积量(如上述实施例 5-9 中所述)，将组织在0.5%溴化十六烷基三甲基铵中均匀化，并且解冻。以在由 MPO 催化的H_2O_2–四甲基联苯胺的氧化还原反应中发生的对 650 nm (25°C)的吸光度变化的方式，光谱学测定上层清液的 MPO 活性。值以 MPO 单位/mg 组织表示。

实施例 11

平滑肌细胞化验

如前所述分离大鼠主动脉平滑肌细胞(RASMC)(Hedin 等，*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 1977 (1997))。将细胞在 Ham 培养基 F-12 中培养(37°C/5%CO_2)，生长至融合，通过胰蛋白酶作用连续地传代(passage)，并且在 2-6 代之后用于实验，所述 Ham 培养基补充有 10%牛胎儿血清、50 μg/mL L-抗坏血酸、50 μg/mL 链霉素、50 IU/mL 青霉素(F-12/10%牛胎儿血清。将 RASMC 以 F-12/10%牛胎儿血清中每个孔约 4×10^4 个细胞的密度种于 24 孔板中(还可以使用每个板具有更大量的孔的板以及每个孔具有适当更少量的细胞的板)。在 24 小时之后，细胞在 Ham 培养基 F-12 中由于饥饿而在 G0/G1 阶段(phase)同步 24-48 小时，所述 Ham 培养基 F-12 补充有 0.1%牛血清白蛋白(BSA)、50 μg/mL L-抗坏血酸、50 μg/mL 链霉素和 50 IU/mL 青霉素(F-12/0.1% BSA)。为了评估 DNA 合成，使用 10 ng/ml IGF-1 或 10%牛胎儿血清在 12-48 小时内刺激饥饿的 RASMC (还可以使用其它良好地确定的促细胞分裂剂比如 PDGF)。在刺激之前 1 分钟至 24 小时，添加一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀) (对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；还可以与刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。在刺激周期结束之前将细胞用 1 μCi [3H]-胸(腺嘧啶脱氧核)苷标记 8 小时。然后将板用冰冷的 PBS 洗涤，采用冰冷的 10%(w/v)三氯乙酸通宵培育，溶解在 0.2 M 氢氧化钠中，并且在液体闪烁计数器中测量放射性。还可以使用可商购的溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增生化验(例如细胞增生 ELISA、BrdU，来自 Roche Applied

Science)、细胞增生试剂 WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB，Bromma，瑞典) (两者都根据生产商说明)或者通过细胞计数分析刺激的 RASMC 增生。在单独的实验(为了研究基因表达)，使用同上的 10 ng/ml IGF-1 或 10%牛胎儿血清(或 PDGF)或者是使用 LPS(1-100 ng/mL)，使用 1-10%牛胎儿血清(所有刺激物含有和不含同上的一种或多种试验药物)在 4-48 小时内刺激更大量饥饿的 RASMC(每个孔 1-5 × 10^6 细胞)。然后将细胞收集并且冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)直至用于微阵列实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

将人的支气管平滑肌细胞(HBSMC，Promocell，Heidelberg，德国)在 DMEM 中培养，所述 DMEM 补充有 10% FBS、100 单位/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、0.12 IU/mL 胰岛素，并且含有或者不含 2 μg/mL 两性霉素 B。在实验之前，在低 FBS(0.3-5%)、无胰岛素的培养基中阻止细胞生长 24 小时。为了刺激发炎的细胞因子和趋化因子比如 IL-8 和 eotaxin 的形成和释放，使用 IL-1β 和 TNF-α (两者均在 1-50 ng/mL)的不同组合，将 HBSMC(在 80%融合处，对应约 8×10^5/25 cm^2 烧瓶)培育(37°C/5%CO_2)24-48 小时(在含有 1-10%牛胎儿血清、具有或者不具有补充物的 DMEM 中)。在 HBSMC 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀，同上)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在含 0.3-10%牛胎儿血清、具有或者不具有补充物的 DMEM 中)1 分钟至 24 小时(对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；还可以与 HBSMC 刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。在培育/刺激后，使用可商购的酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，根据生产商的说明，量化上层清液中的人细胞因子和趋化因子的浓度。然后将细胞收集并且冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见下面的实施例 12)。

实施例 12

基因表达的分析

使用 TRIzol (Invitrogen，Carlsbad，CA)，随后使用 RNeasy 提纯

(QIAGEN，Valencia，CA)，根据生产商的规程，分离来自老鼠和大鼠组织的总 RNA (参见实施例 5 至 9、15 和 16)。使用或不使用不含无 RNase 的 DNase 组(QIAGEN)的 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)的情况下，根据生产商的规程，分离来自在上面和下面的实施例中所述的细胞培育/刺激的总 RNA (老鼠肥大细胞、莫诺美地-6、PBMC、PMN、RAW 264.7、RASMC、HBSMC、NB4、HL-60)。根据不同组织和细胞所来源的物种，使用 GeneChip®人类基因组 U133 Plus 2.0 Array、GeneChip®老鼠基因组 430 2.0 Array 或 GeneChip® 大鼠基因组 230 2.0 Array 或这些芯片的相应新版本(所有阵列来自 Affymetrix, Santa Clara, CA)，根据生产商的规程进行微阵列分析。使用例如基因芯片操作软件(GeneChip Operating Software) (Affymetrix)和 Bioconductor/R (www.bioconductor.org)分析微阵列表达数据。还可以使用其它相关软件。

还可以使用人类基因组测量微阵列(Human Genome Survey Microarray)V2.0、老鼠基因组测量微阵列(Mouse Genome Survey Microarray) V2.0 或大鼠基因组测量微阵列(Rat Genome Survey Microarray)(或者这些阵列的相应最新版本)，根据来自生产商 Applied Biosystems (Foster City，CA)的规程，分析来自不同物种的基因表达。使用例如 1700 化学发光微阵列分析仪(Applied Biosystems，Foster City，CA)分析这些微阵列表达数据，所述分析仪提供有注解(annotation)的 Oracle®数据库 GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)和微阵列套件(Microarray Suite)版本 5.0 软件(MAS 5.0，Affymetrix)。还可以使用其它相关的软件。

还可以使用定量或半定量的 PCR 分析基因表达(mRNA 水平)。可以使用可商购的酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)(根据来自生产商的说明)或常规的蛋白质印迹和/或免疫组织化学方法分析在蛋白质水平的基因表达的分析。

实施例 13

细胞增生化验

使用细胞增生试剂 WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB，Bromma，瑞典)或可商购的溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增生化验(例如来自

Roche Applied Science 的细胞增生 ELISA、BrdU)，根据生产商的说明，测量上述和下述实施例(在上述和下述实施例中添加相应的试验药物和/或刺激物 24-72 小时之前，在 0.1-5%牛胎儿血清中阻止或不阻止生长 24-48 小时)中刺激和未刺激的老鼠肥大细胞、莫诺美地-6 细胞、RAW 264.7 细胞、NB4 细胞、HL-60 细胞和 HBSMC 的增生。还可以使用其它常规的细胞增生试验。

实施例 14

血小板聚集试验

使用例如 Bertele 等(*Eur. J. Pharmacol.* 85, 331 (1982))所述的聚集法(aggregometry)，分析由腺苷二磷酸(ADP)、花生四烯酸、胶原蛋白或血栓烷类似物 U-46619 引起的兔子或人血小板(在富含血小板的血浆或者全血中)的聚集。还可以使用经洗涤的人或兔子血小板和/或使用其它已建立的用于测量血小板聚集的聚集法或其它相应方法分析诱导(同上)的血小板聚集。在诱导血小板聚集之前 1-120 分钟，添加一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嗪司特、单独的吡嗪司特和单独的他汀) (对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1；还可以在诱导血小板聚集的同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。

实施例 15

老鼠腹膜炎症-由酵母聚糖和其它刺激物引起

该化验基本上根据由 Rao 等(*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 917(1994))所述的化验(但是也可以使用其它种类的老鼠)。每隔 2-24 小时将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嗪司特、单独的吡嗪司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量通过皮下、静脉内、腹膜内或口服方式对动物给药(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在例如水(用

于口腔治疗)或者盐水(用于肠胃外给药)中 0.5%或 1%甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在第一次药物剂量后 1 分钟至 24 小时，将 0.5-1 mL 无菌 PBS 中的 0.5-2 mg 酵母聚糖 A (Sigma，目录编号 Z4250)(超声并且混合良好)注射到腹膜内(代替使用酵母聚糖 A 的是，还可以通过腹膜内注射发炎前浓度的其它建立好的发炎前刺激物比如抗老鼠 IgE(使用或不使用老鼠 IgE 进行 1-3 天腹膜内预治疗)、伴刀豆球蛋白 A、角叉菜胶、朊间质胨(proteose peptone)、LPS、PMA、巯基乙酸盐、花生四烯酸、fMLP、TNF、IL-1β)(一种或多种试验药物还可以与酵母聚糖或其它发炎前刺激物的腹膜内注射同时给药)引起腹膜炎症。在注射酵母聚糖(或一种或多种其它发炎前刺激物)之后 2-24 小时，动物死亡。然后使用 1-3 mL 灌洗缓冲液(含或不含 3-5 mM EDTA 或 5-10 单位/mL 肝素的冰冷 PBS)冲洗腹膜腔。在灌洗液中的总白细胞计数和分化白细胞计数在被 Türk 溶液染色之后采用血球计进行和/或在分别用 May-Grunwald Giemsa 或改性的 Wright (Diff-Quik)染色剂染色的细胞离心涂片(cytospin)制剂中，通过使用标准形貌标准的光学显微镜进行。还可以使用用于测定总白细胞计数和分化白细胞计数的其它已确立的方法。将其余灌洗液离心(300-3000 × g，4°C，3-10 min)，并且将无细胞的灌洗液上层清液冷冻保存(-20°C 至-80°)，直至分析发炎介体 LTB_4、PGE_2、TXB_2 的含量和/或如上面实施例 1 和 4 中所述的老鼠细胞因子/趋化因子(例如 IL-4、IL-6、TNF、IL-1β、KC、MCP-1、IL-10、IL-12p70、IFNγ)的含量。通过使用可商购的组胺酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，根据来自生产商的说明确定灌洗液上层清液中的组胺含量。还可以通过使用实施例 3 中所述的 β-氨基已糖苷酶化验测量灌洗液中的 β-氨基已糖苷酶活性，以研究发炎腹膜细胞激活。将灌洗液的细胞血小板重新悬浮在具有 0.5% HTAB 的 0.1-1.0 mL 0.05 M $KHPO_4$ pH 6.0 中并且冷冻保存(-20°C 至-80°)，直至如 Rao 等(*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 917-25 (1994))所述的髓过氧化物酶(MPO)含量的分析。将来自单独的动物的相同细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见实施例 12)。在采用灌洗缓冲液冲洗腹膜腔时，将来自发炎的腹膜腔的组织(腹膜壁、肠和/或其它腹膜内或外器官/组织)活体收集、称重、冷冻保存(用于微阵列分析的样品在

-80°C 下冷冻在 TRIzol，Invitrogen，Carlsbad，CA 中)，并且如实施例 12 所述，随后对使用微阵列技术的组织基因表达进行分析。来自未治疗的动物的未发炎的腹膜腔提供 MPO、发炎介体、细胞因子/趋化因子和基因表达的基线水平。还可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术研究组织炎症。

实施例 16

大鼠腹膜炎症-由酵母聚糖和其它刺激物引起

采用重约 150-450 g 的雄性 Wistar 或 Sprague Dawley 大鼠。每隔 2-24 小时将一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)以 0.03 至 50 mg/kg 的剂量通过皮下、静脉内、腹膜内或口服方式对动物给药(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行)。在给药之前，根据需要将药物的储备溶液(参见上面的实施例 1)在例如水(用于口腔治疗)或者盐水(用于肠胃外给药)中 0.5%或 1%甲基纤维素中稀释。还可以使用其它媒介物。在第一次药物剂量后 1 分钟至 24 小时，将 1-10 mL 无菌 PBS 中的 1-100 mg 酵母聚糖 A (Sigma，目录编号 Z4250) (超声并且混合良好)注射到腹膜内(代替使用酵母聚糖 A 的是，还可以通过腹膜内注射发炎前浓度的其它建立好的发炎前刺激物比如抗鼠 IgE(使用或不使用大鼠 IgE 进行 1-3 天腹膜内预治疗)、伴刀豆球蛋白 A、蛋白质 L、化合物 48/80、角叉菜胶、肮间质胨、LPS、PMA、巯基乙酸盐、花生四烯酸、fMLP、TNF、IL-1β引起腹膜炎症。一种或多种试验药物还可以与酵母聚糖或其它发炎前刺激物的腹膜内注射同时给药)。在注射酵母聚糖(或一种或多种其它发炎前刺激物)之后 2-24 小时，动物死亡。然后使用 10-20 ml 灌洗缓冲液(含或不含 3-5 mM EDTA 或 5-10 单位/mL 肝素的冰冷 PBS)冲洗腹膜腔。在灌洗液中的总白细胞计数和分化白细胞计数在被 Türk 溶液染色之后采用血球计进行和/或在分别用 May-Grunwald Giemsa 或改性的 Wright (Diff-Quik)染色剂染色的细胞离心涂片制剂中，通过使用标准形貌标准的光显微镜进行。还可以使用用于测定总白细胞计数和分化白细胞计数的其它已确立的方法。将其余灌洗液离心(300-3000 × g，

4°C，3-10 min)，并且将无细胞的灌洗液上层清液冷冻保存(-20°C 至-80°)，直至分析发炎介体 LTB_4、PGE_2、TXB_2 的含量和/或基本上如上面实施例 1 和 4 中所述的大鼠细胞因子/趋化因子(例如 IL-4、IL-6、TNF、IL-1β、KC、MCP-1、IL-10、IL-12p70、IFNγ)含量。通过使用可商购的组胺酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，根据来自生产商的说明确定灌洗液上层清液中的组胺含量。还可以通过使用实施例 3 中所述的 β-氨基已糖苷酶化验测量灌洗液中的 β-氨基已糖苷酶活性，以研究发炎腹膜细胞激活。将灌洗液的细胞血小板重新悬浮在具有 0.5% HTAB 的 0.1-1.0 mL 0.05 M $KHPO_4$ pH 6.0 中并且冷冻保存(-20°C 至-80°)，直至如 Rao 等(*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 917-25 (1994))所述的髓过氧化物酶(MPO)含量的分析。将来自单独的动物的相同细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见实施例 12)。在采用灌洗缓冲液冲洗腹膜腔时，将来自发炎的腹膜腔的组织(腹膜壁、肠和/或其它腹膜内或外器官/组织)活体收集、称重、冷冻保存(用于微阵列分析的样品在-80°C 冷冻在 TRIzol，Invitrogen，Carlsbad，CA 中)，并且如实施例 12 所述，随后对使用微阵列技术的组织基因表达进行分析。来自未治疗的动物的未发炎的腹膜腔提供 MPO、发炎介体、细胞因子/趋化因子和基因表达的基线水平。还可以使用常规的组织学和免疫组织化学技术研究组织炎症。

实施例 17

NB4 和 HL-60 细胞发炎介体释放化验

将人的 NB4 细胞(Lanotte 等，*Blood*，**77**，1080 (1991))在 RPMI-1640 培养基中培养(37°C/5%CO2)，所述培养基补充有 100 单位/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10% (体积/体积)牛胎儿血清。为了分化，通常每隔 3 天添加 1-5 μM 全反式视黄酸(ATRA)。

将人的 HL-60 细胞(Steinhilber 等，*BIOchim. Biophys. Acta* **1178**，1 (1993))在 RPMI-1640 培养基中培养(37°C/5%CO2)，所述培养基补充有 100 单位/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10-20% (体积/体积)牛胎儿血清。为了分化，通常添加 ATRA (1-5 μM)、DMSO (1-2%)、PMA (100-500 ng/mL)

或维他命 D3 (1-15 μM) 5 天。

为了刺激发炎介体白细胞三烯 B_4(LTB_4)的形成和释放，使用 10-40 μM 花生四烯酸和 2-10 μM 钙离子载体 A23187，将分化或未分化的 NB4 或 HL-60 细胞(在 1-15×10^6/mL)培育 5-30 分钟(在 37°C，在含钙的 PBS 中)。还可以在有或没有上述的 A23187 和/或花生四烯酸的情况下，利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP)、fMLP 和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 NB4 和 HL-60 细胞。上述 NB4 和 HL-60 培育/刺激也可以在人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 NB4/HL-60:血小板比率为 1:10 至 1:10000。使用 1 mL 的冷甲醇和作为内标添加的前列腺素 B_2 停止培育/刺激。将样品离心，并且用水稀释上层清液，以达到 30%的最终甲醇浓度，并且将 pH 调节至 3-4。在预调节的(1 mL 甲醇，随后是 1 mL H_2O) C18 固相柱子(Sorbent Technology，英国)上萃取上层清液中的花生四烯酸代谢产物。使用甲醇洗脱代谢产物，之后将 1 体积的水添加到洗出液中。对于反相 HPLC，将 76 μL 的每一种样品与 39 μL H_2O 混合(还可以使用其它体积比)。使用甲醇/乙腈/H_2O/乙酸(30:35:35:0.01 体积/体积)以 1.2 mL/min 洗脱 Waters RCM 8×10 柱子。在 270 nm 监测洗出液的吸光度以检测并且量化 PGB_2 和 LTB_4。还可以根据来自试剂盒生产商的说明使用用于测量 LTB_4 的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。使用可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)，根据来自生产商的说明，还可以分析来自上述 NB4/HL-60 培育/刺激的上层清液的发炎介体前列腺素 E_2(PGE_2)和/或血栓烷 B_2(TXB_2)的含量。在用于发炎介体释放的 NB4 或 HL-60 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嗪司特，单独的吡嗪司特和单独的他汀)将细胞培育(在 37°C，具有或者不具有补充物的情况下，在不含钙的 PBS 中，或者在含 1-10%牛胎儿血清的 RPMI-1640 中)1 分钟至 24 小时(对于关于药物储备溶液和浓度的细节，参见上述实施例 1)。(还可以与 NB4/HL-60 刺激同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。

为了刺激发炎细胞因子、趋化因子和介体比如 IL-1β、IL-6、TNF、IL-8、IL-10、IL-12p70、MCP-1、PAF、C5a 的形成和释放，使用脂多糖(LPS

1-100ng/mL)、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA 1-100 ng/mL)、或钙离子载体A23187 (1-10 μM) 或这些刺激物的组合，将分化或未分化的NB4或HL-60 细胞(在 1-10×10^6/mL)培育(37°C/5%CO_2)4-24 小时(在具有 1-10%牛胎儿血清、具有或者不具有补充物的 RPMI-1640 中)。还可以在有或没有上述的 LPS、PMA 和/或 A23187 的情况下，利用经证明的生物活性浓度的腺苷二磷酸(ADP) 和/或血栓烷类似物 U-46619 刺激 NB4 和 HL-60 细胞。NB4 和 HL-60 培育/刺激也可以在人血小板(来自健康捐赠者血液)的存在下进行，其中 NB4/HL-60:血小板比率为 1:10 至 1:10000。在用于细胞因子/趋化因子/介体释放的 NB4 或 HL-60 刺激之前，使用一种或多种试验药物(与他汀组合的吡嘧司特，单独的吡嘧司特和单独的他汀，同上)将细胞培育(在 37°C/5%CO_2，在含 1-10%牛胎儿血清、具有或者不具有补充物的 RPMI-1640 中)1 分钟至 24 小时(为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行；还可以与 NB4/HL-60 刺激同时添加一种或多种试验药物)。在离心分离出细胞之后，使用 Cytometric Bead Array(美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen)，根据生产商的说明，量化上层清液中的人细胞因子/趋化因子和介体浓度。还可以根据生产商的说明使用用于测量细胞因子/趋化因子和介体的可商购酶免疫化验试剂盒(EIA/ELISA 试剂盒)。将细胞血小板冷冻保存(-80°C)在 RLT 缓冲液(QIAGEN，Valencia，CA)中，直至用于微阵列实验的进一步处理(参见上面的实施例 12)。

除研究上述药物对来自类似嗜中性粒细胞的 NB4 和 HL-60 细胞的介体和趋化因子/细胞因子的释放的影响以外，还可以分析药物对这些细胞的自发或受激的粘附和/或迁移的影响(还可以使用根据标准规程分离的刚分离的人类血液多形核细胞(PMN))。使用良好地建立并且经证明的实验方法和化验，研究 PMN 或类似嗜中性粒细胞的细胞对例如培养的内皮细胞或蛋白质包覆的人造表面的自发或受激(使用 fMLP、IL-8、PAF、LTB_4 或其它相关的 PMN 激活因子)的粘附。使用良好地建立并且经证明的实验方法和化验，研究 PMN 或类似嗜中性粒细胞的细胞的迁移(受到 fMLP、IL-8、PAF、LTB_4 或其它相关的 PMN 趋化因子刺激)，例如通过被设计用于这种迁移研究的可商购的蛋白质包覆的膜的迁移。

实施例 18

在人全血中的血小板和白细胞激活

使用含有 1/10 体积的 129 mM 柠檬酸三钠(Becton Dickinson，Meylan，法国)的硅化真空采血管，通过没有郁积的静脉穿刺收集静脉血液。使用基本上如前所述的流动血细胞计数化验(参见例如用于参考的 Li 等，*Circulation* **100**，1374 (1999))测量全血血小板 P-选择蛋白表达(反应血小板活性)、白细胞 CD11b 表达(反应白细胞活性)、单个血小板和血小板-血小板微聚集体计数，以及血小板-白细胞聚集体(PLA)。简言之，在没有或有血小板激活刺激物比如腺苷二磷酸(ADP)、U-46619、U-44069、血小板激活因子(PAF)、花生四烯酸、胶原蛋白或凝血酶和/或白细胞激活刺激物比如 N-甲酰基-甲二磺酰基-亮氨酰基-苯基丙氨酸(fMLP)、花生四烯酸、PAF、LPS、A23187 或 LTB_4 的情况下，将 5 μL 全血等分试样添加到 45 μL 含有适当稀释的抗体(参见下面)的 Hepes 缓冲盐水(150 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgSO4、10 mM Hepes、pH 7.4)中。在将血液暴露于血小板和/或白细胞激活刺激物+抗体之前，使用一种或多种试验药物(与他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合的吡嘧司特、单独的吡嘧司特和单独的他汀)将血液样品(0.1-1 ml)培育 1-60 分钟(还可以与上述刺激物同时添加一种或多种试验药物)。为了比较，在不暴露于药物中的情况下如上述那样刺激一些血液样品。通过 R-藻红蛋白(RPE)-CD62P 单克隆抗体(MAb) AC1.2 (美国加利福尼亚州圣何塞的 Becton Dickinson)确定血小板 P 选择蛋白表达。通过荧光素异硫氰酸酯(FITC)-共轭的 MAb BEAR 1 (Immunotech，Marseille，法国)确定白细胞 CD11b 表达。使用 FITC 和 RPE 共轭的同型 MAb 作为负控制。用于血小板计数的荧光珠子(SPHERO™ Rainbow 粒子，1.8-2.2 μm)来自 PharMingen (美国加利福尼亚州圣地亚哥)。使用 FITC 共轭的抗-CD42a(GPIX)MAb Beb 1 (Becton Dickinson)识别血小板，并且使用 RPE 共轭的抗 CD45 MAb J33 (Immunotech)识别白细胞。在黑暗中，在室温下将样品(含或不含刺激物的药物治疗或未治疗的血液+抗体，同上)培育 20 min。然后，使用 0.5% (体积/体积)甲醛盐水将样品稀释并且温和地固定，并且使用 Beckman-Coulter EPICS XL-MCL 流动细胞计(Beckman-Coulter

Corp.，Hialeah，FL)分析各种血小板和白细胞参数。血小板 P-选择蛋白表达数据以血小板种群中的 P-选择蛋白正性细胞的百分比和以 P-选择蛋白正性血小板的绝对计数的形式报告。白细胞 CD11b 表达以总的白细胞种群和白细胞亚种群的平均荧光强度(MFI)的形式报告。血小板-白细胞聚集体(PLA)以在总的白细胞种群中和在淋巴细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞之中的血小板-共轭的白细胞的绝对计数和百分比的形式表示。还可以使用其它相关的测量人全血中相应的血小板和白细胞激活的试剂、实验条件/方法、分析设备和方式。

实施例 19

通过吡嘧司特和罗苏伐他汀抑制肥大细胞干扰素-γ的形成

通过培养来自雌性 C57BL/6 老鼠的骨髓细胞获得由骨髓得到的经培养的老鼠肥大细胞(mMC)。将骨髓细胞(来自用 PBS 冲洗的老鼠大腿骨)在富含 10% X-63 的经调节的 RPMI 1640 中培养(37°C/5%CO_2)，所述 RPMI 1640 补充有 10%的热减活的牛胎儿血清、4 mM L-谷氨酰胺、50 μM 2-巯基乙醇、1 mM 丙酮酸钠、0.1 mM 非必需的氨基酸、10 mM Hepe、100 单位/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。通过甲苯胺蓝染色以证实肥大细胞的发展。在培养 6 至 8 周之后进行实验。为了通过细胞表面 IgE-受体的交联激活 mMC，首先使用作为 15%杂交瘤上层清液形式使用的单克隆老鼠抗-TNP IgE-抗体(IgEl-b4，ATCC，Rockville，MD，美国)在 37°C (5%CO_2)将培养的 mMC 在敏化 90 分钟。然后将细胞用 PBS 进行两次洗涤，并且在细胞(0.5 mL 含 1×10^6 细胞/mL 的培养基)通过添加偶联比率为 9/1(最终的 TNP-BSA 浓度为 100 ng/mL)的 TNP-BSA (Biosearch Technologies，San Francisco，CA)被激活之前，重新悬浮在补充有 0.2%牛血清白蛋白(BSA)的 RPMI-1640 培养基中。使用 TNP-BSA 培育(37°C/5%CO_2) 24 小时。在使用 TNP-BSA 培育之前，使用试验药物吡嘧司特(钾盐，购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的 American Custom Chemicals Corporation)和/或罗苏伐他汀(如 Bioorganic & Medicinal Chemistry，第 5 卷，第 5 期，第 437-444 页，1997 所述，通过添加 $CaCl_2$ 从可商购的 Crestor®片剂提取并且纯化，并且以钙盐的形式分离)处理/培育(37°C/5%CO_2)一些细胞 30 分钟，之后添加

TNP-BSA (在无菌盐水中制备药物的储备溶液)。为了比较，一些实验在没有药物的情况下进行。在使用 TNP-BSA 培育之后，将样品在 4°C 离心以离心分离出细胞，并且使用来自美国圣地亚哥的 BD Biosciences Pharmingen 的 BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (根据生产商说明使用该试剂盒)分析上层清液的老鼠的 IFN-γ的含量。

来自用 TNP-BSA 刺激 24 小时(同上)的未治疗的 mMC 的上层清液中的 IFN-γ浓度为 1.80 ± 0.24 pg/mL (平均值± sem，n=8)。采用 3 μM 吡嘧司特、30 μM 吡嘧司特、3 μM 罗苏伐他汀或 30 μM 罗苏伐他汀 (对于每一种治疗，n=2)治疗的细胞的相应平均 IFN-γ值分别为 2.00 pg/mL、1.74 pg/mL、2.26 pg/mL 和 1.88 pg/mL。因此，单独使用这些浓度的吡嘧司特或罗苏伐他汀的治疗不抑制 IFN-γ水平(即，与未治疗细胞相比，30 μM 吡嘧司特降低 IFN-γ 约 3%，而其它三种治疗略微增加 IFN-γ)。吡嘧司特 + 罗苏伐他汀的组合剂量依赖性地并且协同地降低 IFN-γ水平。因此，采用 3 μM 吡嘧司特 + 3 μM 罗苏伐他汀或 30 μM 吡嘧司特 + 30 μM 罗苏伐他汀的组合(对于每一种治疗，n=2)治疗的 mMC 的平均 IFN-γ浓度分别为 1.58 pg/mL 和 0.55 pg/mL(即与未治疗对照相比，分别抑制 12.3%和 69.4%)。

实施例 20

通过吡嘧司特和罗苏伐他汀抑制巨噬细胞增生

在 RPMI-1640 培养基中培养(37°C/5%CO_2)来自人的巨噬细胞细胞系莫诺美地-6(MM6) (Ziegler-Heitbrock 等, *Int. J. Cancer*, **41**, 456 (1988))细胞，该 RPMI-1640 培养基补充有 1 mM 丙酮酸钠、1×非必需的氨基酸、1-100 μg/mL 胰岛素、1 mM 草乙酸、100 单位/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10% (体积/体积)牛胎儿血清。在开始实验时，在密度为 1×10^5 细胞/mL (100 μl/孔)的 96-孔板中种入 MM6 细胞的种子。使用细胞增生试剂 WST-1(Roche Diagnostics Scandinavia AB，Bromma，瑞典)或通过使用显微镜的细胞计数测量 MM6 细胞的增生。将 WST-1 试剂设计为用于增生化验中例如细胞生长的分光光度定量化，并且根据生产商的说明使用。用于测量吸光度的波长为 450 nm 并且暴露于 WST-1 试剂中的所有未治疗的对照细胞的吸光度在 1.0 至 2.5 之间。吡嘧司特(钾盐；参见上述实施例 19)

和罗苏伐他汀(钠盐；参见上述实施例 19)的储备溶液是以无菌盐水的形式制备的。

在 24 和 48 小时之后，未治疗的 MM6 细胞从开始实验时的 1×10^5 细胞/mL 分别增加至 $1.4\times10^5 \pm 0.06\times10^5$ 细胞/mL 和 $2.3\times10^5 \pm 0.10\times10^5$ 细胞/mL (平均值± sem，对于三个时间点的每一个，n=4)。在使用上述 WST-1 试剂开始实验之后 48 小时，研究吡嘧司特和/或罗苏伐他汀(在开始实验时添加)对 MM6 细胞增生的影响。

使用最终浓度为 10 μM、30 μM 或 100 μM 的罗苏伐他汀治疗 MM6 细胞分别导致剂量依赖性的 16.6%、22.7%和 66.9%的 MM6 增生抑制(平均值，对于每一种浓度，n=5)。相反，使用最终浓度为 100 μM 的吡嘧司特治疗 MM6 细胞导致不可忽略的平均 9.4%的增生抑制(n=5) (10 μM 的吡嘧司特具有与 100 μM 的吡嘧司特的效果很类似的效果，n=5，数据未显示)。当在 10 μM、30 μM 或 100 μM 罗苏伐他汀的存在下使用 100 μM 吡嘧司特治疗 MM6 细胞时，与分别单独使用 10 μM、30 μM 和 100 μM 的罗苏伐他汀的治疗相比，100 μM 吡嘧司特分别导致协同的 17.4%、26.3%和 44.9%的 MM6 增生抑制(平均值，对于三种组合的每一种，n=5)。

实施例 21

用吡嘧司特和阿托伐他汀抑制巨噬细胞增生

对于阿托伐他汀(钠盐；从印度 Bangalore 的 Biocon, Ltd.接受的赠品阿托伐他汀钙通过以下方法转化为钠盐：首先通过添加盐酸水溶液将钙盐转化为游离酸，然后在通过萃取分离之后，添加 1 当量的 NaOH 水溶液)，重复实施例 20 中所述的步骤。

使用最终浓度为 10 μM、30 μM 或 100 μM 的阿托伐他汀治疗 MM6 细胞分别导致剂量依赖性的 19.9%、27,0%和 54,4%的 MM6 增生抑制(平均值，对于每一种浓度，n=5)。相反，使用最终浓度为 100 μM 的吡嘧司特(钾盐)治疗 MM6 细胞导致不可忽略的平均 9.4%的增生抑制(n=5) (10 μM 的吡嘧司特具有与 100 μM 的吡嘧司特的效果很类似的效果，n=5，数据未显示)。当在 100 μM 阿托伐他汀的存在下使用 100 μM 吡嘧司特治疗 MM6 细胞时，与单独使用 100 μM 阿托伐他汀的治疗相比，100 μM 吡嘧

司特导致协同的30.2%的MM6增生抑制(平均值，n=5)。在30 μM阿托伐他汀的存在下，100 μM 吡嘧司特抑制 7.6%的增生(平均值，n=5)，而在10 μM 阿托伐他汀的存在下，100 μM 吡嘧司特不抑制增生(n=5，数据未显示)。

实施例 22

通过吡嘧司特和阿托伐他汀抑制老鼠的由酵母聚糖引起的腹膜炎

将5组5-7只重32-37 g的远亲繁殖的雄性NMRI老鼠(Scanbur AB，Sollentuna，瑞典)用来研究由0.5 mL无菌PBS中的1 mg 酵母聚糖A(酵母聚糖，Sigma-Aldrich)(超声并且充分混合)的腹膜内(i.p.)注射引起的腹膜炎症(腹膜炎)。在酵母聚糖 i.p.注射之前的24小时和90分钟，使用0.35 mg阿托伐他汀钠(参见上述实施例 21)治疗两组动物。在将酵母聚糖 i.p.给药之前24小时，进行阿托伐他汀注射，并且在皮下注射酵母聚糖之前90分钟进行阿托伐他汀注射。在注射之前，根据需要采用超声和加热将阿托伐他汀以1 mg/mL溶解在无菌PBS中。使用与酵母聚糖一起腹膜内给药的0.5mg 吡嘧司特(钾盐，购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的 American Custom Chemicals Corporation) (即，吡嘧司特以1 mg/mL溶解在PBS溶液的 2 mg/mL 酵母聚糖中)治疗两组动物(其中一组已经采用上述阿托伐他汀预先治疗)。

在注射酵母聚糖后5小时，动物死亡，并且使用含有3 mM EDTA的1.5 mL冰冷PBS灌洗发炎的腹膜腔(在灌洗液的i.p.注射之后，轻柔地按摩腹部30秒，之后打开腹腔并且收集约1 mL液体)。在使用Türk溶液对核染色之后，按每mL灌洗液计的多形核(PMN)白细胞数量用光学显微镜计数(采用标准形貌标准)。来自未治疗动物的未发炎的腹膜腔的灌洗液提供了PMN 白细胞的基线水平。

如图1(平均值± sem)中所示，未用酵母聚糖i.p.刺激的动物(基线，n=5)几乎没有腹膜PMN白细胞。另一方面，在酵母聚糖 i.p.注射之后5小时，未用吡嘧司特或阿托伐他汀治疗的动物(未治疗，n=7)的腹膜腔中有显著的PMN白细胞发炎累积量。

在单独采用吡嘧司特(Pemiro，n=6)治疗的动物中，酵母聚糖引起的

PMN 白细胞累积量略微降低(降低 10.1%；在该组中的 NB，即一种动物被认为无反应，并且从分析中排除)。在这种动物中，在酵母聚糖注射后 5 小时的 PMN 白细胞累积量仅为采用 i.p.酵母聚糖刺激的其它 6 只吡嘧司特治疗的动物的平均 PMN 白细胞累积量的 8.4%。在分析中包括或排除这种无反应动物不改变下述结论)。

在单独采用阿托伐他汀(Atorva，n=5)治疗的动物中，PMN 白细胞累积量也降低至一定程度(降低 25.9 %)。

然而，在同时采用吡嘧司特和阿托伐他汀(Pemiro+Atorva，n=5)治疗的动物中，酵母聚糖诱导的 PMN 白细胞累积量协同地降低 61.5 %。因此，尽管与未治疗动物相比，单独采用吡嘧司特的治疗仅仅使酵母聚糖引起的 PMN 白细胞累积量降低 10.1%，但是与单独采用阿托伐他汀的治疗相比，在阿托伐他汀治疗的存在下采用吡嘧司特治疗的动物的酵母聚糖所引起的 PMN 白细胞累积量降低 48.0%。

上述实施例中的一个或多个证明吡嘧司特和相关他汀(匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀或者优选地，辛伐他汀、罗苏伐他汀或阿托伐他汀)组合具有明显协同效应。因此，这样的组合可能对包括动脉粥样硬化症和相关疾病在内的炎症的治疗有用。

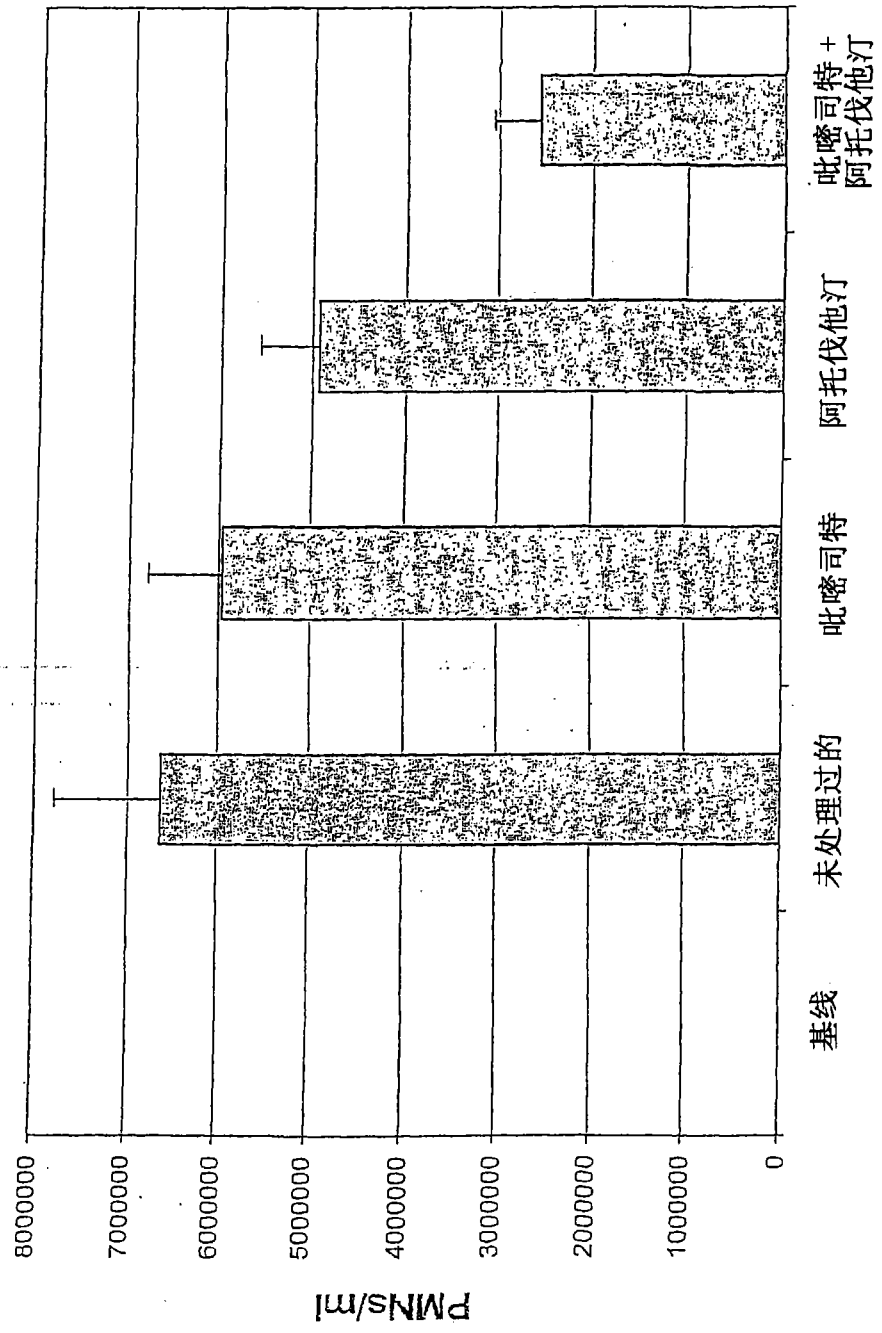

PMNs/ml
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
基线
未处理过的
吡嗪司特
阿托伐他汀
吡嗪司特 + 阿托伐他汀

图 1