

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 984**

51 Int. Cl.:

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 31/517 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2007 E 07824625 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **25.11.2009 EP 2120919**

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

30 Prioridad:

18.12.2006 US 875377 P
29.10.2007 US 743

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2013

73 Titular/es:

CARDOZ AB (100.0%)
Kornhamnstorg 53
11127 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

RAUD, JOHAN

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 394 984 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva combinación para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios

Campo de la invención

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

5 Antecedentes y técnica anterior

10 [0002] Las enfermedades cardiovasculares, tales como la enfermedad coronaria y los accidentes cerebrovasculares son las principales causas de muerte, incapacidad y gasto sanitario, particularmente en los países industrializados. Estas enfermedades son a menudo secuelas directas de la aterosclerosis, una afección multifactorial que preferentemente se desarrolla en sujetos que fuman y / o presentan factores de riesgo como hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, niveles plasmáticos elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos.

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

15 [0004] Los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), LDL, colesterol total y triglicéridos son todos indicadores que determinan el riesgo de desarrollar aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, tales como enfermedades de la arteria coronaria (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, etc.), apoplejía (incluyendo accidente cerebrovascular y ataque isquémico transitorio) y enfermedad oclusiva arterial periférica.

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

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

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

35 [0008] La introducción de medicamentos para bajar el colesterol como las estatinas ha reducido significativamente la mortalidad por enfermedad coronaria y apoplejía. Sin embargo, estos fármacos tienen la desventaja de que no son igualmente eficaces en todos los pacientes y se sabe que tienen ciertos efectos secundarios (por ejemplo, cambios en la función hepática, miopatía y rabdomiolisis), y la aterosclerosis sigue siendo una causa importante de muerte y discapacidad. De hecho, un reciente artículo de revista (Briel et al, JAMA, 295, 2046 (2006)) sugiere que las estatinas no reducen los episodios cardiovasculares graves durante los cuatro primeros meses de tratamiento en pacientes con síndromes coronarios agudos.

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

45 [0010] Pemirolast es un fármaco anti-alérgico activo por vía oral que se utiliza para tratar enfermedades como el asma, rinitis alérgica y conjuntivitis. Véase, por ejemplo, la patente U.S. N ° 4.122.274, la Solicitudes de Patente Europea EP 316 174 y EP 1 285 921, Yanagihara et al, Japanese Journal of Pharmacology, 51, 93 (1989) y Drugs of Today, 28, 29 (1992). El fármaco se comercializa actualmente en, por ejemplo Japón como la sal de potasio.

50 [0011] Se han publicado estudios que se refieren al uso potencial de pemirolast en la prevención de reestenosis (Miyazawa et al, J Cardiovasc. Pharmacol., 30, 157 (1997) y Ohsawa et al, Am. Heart J., 136, 1081 (1998) y J. Cardiol. 42, 13 (2003)). Véase también la Solicitud de Patente Europea EP 766 693, que describe que pemirolast exhibe un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de músculo liso vascular.

[0012] La solicitud de patente US 2006/0024365 describe formas duales de dosificación farmacéutica de retardo que comprenden ingredientes activos de dosis elevada con alta solubilidad de liberación modificada en combinación con ingredientes activos de liberación inmediata de dosis bajas. Una amplia variedad de fármacos, incluyendo algunos de los mencionados aquí, se enumeran como posibles candidatos para el ingrediente activo de dosis baja.

5 [0013] La solicitud de patente US 2007/0014733 A1 divulga composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cardiovasculares que comprenden metabolitos de nebivolol. Varios compuestos activos, incluyendo algunos de los mencionados aquí, se encuentran entre los muchos ingredientes activos que pueden estar combinados con dichos metabolitos en tales composiciones.

10 [0014] La solicitud de patente US 2006/0148830 A1 divulga nuevos antagonistas del receptor de LPA (y especialmente el receptor EDG-2) para su uso en, entre otro, trastornos del sistema urinario, inflamación, etc. Ciertos compuestos activos, incluyendo algunos de los mencionados aquí, se mencionan por separado entre los diferentes ingredientes activos que se pueden combinar con tales compuestos nuevos.

[0015] La solicitud de patente US 2006/0084695 describe inhibidores de la MAP quinasa y / o de la HMG-CoA reductasa para su uso en el tratamiento de afecciones cardiovasculares, como la aterosclerosis y similares.

15 [0016] Finalmente, la solicitud de patente US 2005/0181023 A1 divulga composiciones farmacéuticas que comprenden pemirolast para su uso en la inhibición o prevención de adherencias entre superficies de tejido y / o de órganos.

20 [0017] El uso de los productos de combinación comprende, específicamente, pemirolast y una estatina no se divulga específicamente en ninguno de los documentos mencionados anteriormente. Además, el uso de tales productos de combinación en el tratamiento de aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados, especialmente en los pacientes con síndrome coronario agudo, no se divulga en ninguno de estos documentos.

Descripción de la invención

[0018] Según la invención, se proporciona un producto de combinación que comprende:

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

25 (b) una estatina, seleccionada entre rosuvastatina y atorvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable,

cuyos productos de combinación se referirán en lo sucesivo como "los productos de combinación según la invención".

30 [0019] El término "una estatina" incluye una o más estatinas. Los términos "estatina" e "inhibidor de la HMG-CoA reductasa" se emplean como sinónimos en el contexto de la presente invención.

[0020] Por tanto, las estatinas incluyen rosuvastatina (por ejemplo, Crestor®) y atorvastatina (por ejemplo, Lipitor®, Torvast®). Particularmente, las estatinas preferidas incluyen rosuvastatina y, especialmente, atorvastatina.

35 [0021] Sales farmacéuticamente aceptables que se pueden mencionar incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Estas sales pueden formarse por medios convencionales, por ejemplo por reacción de una forma de ácido libre o base libre de un ingrediente activo con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiado, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el que la sal es insoluble, seguido de eliminación de dicho disolvente, o dicho medio, usando técnicas estándar (por ejemplo, en vacío, por liofilización o por filtración). Las sales también pueden prepararse mediante por intercambio de un contra-ión del ingrediente activo en forma de sal con otro contra-ión, por ejemplo usando una resina de intercambio iónico adecuada.

40 [0022] Las sales preferidas de pemirolast incluyen pemirolast sódico, y, más preferiblemente, pemirolast potásico.

[0023] Las sales preferidas de estatinas incluyen sales de sodio, potasio y calcio, tales como rosuvastatina de calcio y atorvastatina de calcio

45 [0024] Los ingredientes activos que se emplean en productos de combinación según la invención pueden ser empleados en forma diastereoméricamente enriquecida y / o enantioméricamente enriquecida. Por "diastereoméricamente enriquecida" y "enantioméricamente enriquecida" queremos decir, respectivamente, cualquier mezcla de los diastereoisómeros / enantiómeros de un ingrediente activo, en la que un isómero está presente en una proporción mayor que el otro. Por ejemplo, se pueden emplear enantiómeros con purezas ópticas (exceso enantiomérico; ee) superiores a un 90%.

50 [0025] Los productos de combinación según la invención proporcionan la administración de pemirolast según se define antes en asociación con una estatina, y por lo tanto pueden presentarse ya sea como formulaciones separadas, donde al menos una de esas formulaciones comprende pemirolast, y al menos una comprende la

estatina, o se pueden presentar (es decir, formular) como una preparación combinada (es decir presentarse como una formulación única que incluye pemirolast y la estatina).

[0026] De este modo, se proporciona además:

5 (1) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; una estatina, seleccionada entre rosuvastatina y atorvastatina o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable (cuya formulación se denominará en lo sucesivo como una "preparación combinada"); y

(2) un kit de partes que comprende componentes:

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

(B) una formulación farmacéutica que incluye una estatina seleccionada entre rosuvastatina y atorvastatina, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, mezclada con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

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

[0027] Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para hacer un kit de partes según se define antes, método que comprende poner un componente (A), según se define antes, en asociación con un componente (B), según se define antes, haciendo así a los dos componentes adecuados para administración conjunta con el otro.

[0028] Poner los dos componentes "en asociación" cada uno con el otro, incluimos que los componentes (A) y (B) del kit de partes se pueden:

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

25 (ii) envasar y presentar juntos como componentes separados de un "paquete de combinación" para uso conjuntamente entre sí en terapia de combinación.

[0029] De este modo, se proporciona además un kit de partes que comprende:

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

(II) las instrucciones para usar ese componente de forma conjunta con el otro de los dos componentes..

30 [0030] Los kits de piezas descritos aquí pueden comprender más de una formulación que incluye una cantidad / dosis adecuada de pemirolast / sal / solvato, y / o más de una formulación que incluye una cantidad / dosis adecuada de estatina / sal / solvato, con el fin de tener en cuenta dosificaciones repetidas. Si está presente más de una formulación (que comprende cualquiera de los principios activos), tales formulaciones pueden la misma, o pueden ser diferentes en términos de la dosis de cualquier compuesto, composición química (s) y / o forma física (s).

35 [0031] Se prefiere que las estatinas que se emplean en productos de combinación según la invención no sean en forma de los llamadas " lactonas de estatina". Sin embargo, los productos de combinación según la invención pueden comprender lactona de rosuvastatina y lactona de atorvastatina.

40 [0032] Los productos de combinación según la invención tienen utilidad en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Las afecciones inflamatorias se caracterizan típicamente por la activación de mecanismos de defensa inmune, dando como resultado un efecto que es más perjudicial que beneficioso para el huésped. Tales afecciones están generalmente asociadas con diversos grados de enrojecimiento del tejido o hiperemia, hinchazón, hipertermia, dolor, picor, muerte celular y destrucción del tejido, proliferación celular, y / o pérdida de función. Las enfermedades inflamatorias que pueden mencionarse incluyen cistitis, prostatitis, complicaciones vasculares del diabético, migraña, y, más preferiblemente, alergia (incluyendo conjuntivitis alérgica y rinitis alérgica), espondilitis anquilosante, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis de contacto, artritis gotosa, enfermedad inflamatoria intestinal (como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, osteoartritis, pancreatitis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, tendinitis, bursitis, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, uveítis, urticaria, vasculitis, aterosclerosis asociada a trastornos cardiovasculares. Enfermedades que pueden ser mencionadas incluyen migraña y, más preferiblemente, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, y, más particularmente, aterosclerosis asociada a trastornos cardiovasculares.

- 5 [0033] El término "aterosclerosis" se entenderá por los expertos en la técnica como cualquier enfermedad que se caracteriza por acumulación de colesterol en un vaso sanguíneo, especialmente una pared arterial, formación de células espumosas, inflamación y proliferación celular. Los trastornos cardiovasculares "asociados con" aterosclerosis incluyen aneurismas de aorta (incluyendo aneurismas de aorta abdominal y / o ateroscleróticos) y, más preferiblemente, arteriosclerosis, enfermedad arterial oclusiva periférica, enfermedades de arteria coronaria (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, ataque cardíaco, etc.), enfermedad coronaria (incluyendo enfermedad cardíaca y enfermedad del corazón, tal como enfermedad isquémica del corazón), y también pueden incluir ruptura y / o inestabilidad de placa o ateroma, enfermedad vascular o arterial, enfermedad isquémica / isquemia y derrame cerebral (incluyendo accidente cerebro-vascular y ataque isquémico transitorio).
- 10 [0034] Los grupos de pacientes preferidos, incluyen aquellos con síndromes coronarios agudos. El término "síndrome(s) coronario(s) agudo(s) " se entenderá por la persona experta que incluye cualquier estado anormal de miocardio e isquémico, con frecuencia pero no exclusivamente asociado con, por ejemplo el desarrollo de, dolor en el pecho (por ejemplo, de naturaleza cardíaca) y / o un electrocardiograma (ECG) anormal. Estos síndromes son la presentación más común de infarto de miocardio (ataque cardíaco). La persona experta apreciará que el término es en gran parte sinónimo del término "angina inestable", en lugar de "angina estable" (es decir, angina de pecho que se desarrolla durante el esfuerzo y se resuelve en reposo). La angina de esfuerzo que se produce con tasa de empeoramiento ("angina crescendo") será considerada de manera similar por el experto en la materia, como dentro de la definición de "inestable".
- 15 [0035] Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto de combinación según la invención para uso en un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio, en particular, aterosclerosis y / o un trastorno cardiovascular asociado, cuyo método comprende la administración de tal producto de combinación a un paciente que necesita dicho tratamiento.
- 20 [0036] Para evitar dudas, en el contexto de la presente invención, los términos "tratamiento", "terapia" y "método terapéutico" incluyen el tratamiento terapéutico o paliativo, de pacientes que lo necesitan, así como el tratamiento profiláctico y / o diagnóstico de pacientes que son susceptibles de enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis y trastornos cardiovasculares asociados.
- 25 [0037] Respecto a los kits de partes tal como se describe aquí, por "administración conjuntamente con", incluimos que las formulaciones respectivas que comprenden pemirolast (o sal / solvato del mismo) y una estatina (o sal / solvato de la misma) se administran, secuencialmente, separadamente y / o simultáneamente, durante el curso del tratamiento de la enfermedad pertinente.
- 30 [0038] Así, respecto al producto de combinación según la invención, el término "administración conjuntamente con" incluye que los dos componentes del producto de combinación (pemirolast y estatina) se administran (opcionalmente de manera repetida), bien juntos o lo suficientemente cerca en el tiempo para que haya un efecto beneficioso para el paciente, que es mayor, en el transcurso del tratamiento de la enfermedad pertinente, que si una formulación que contiene pemirolast, o una formulación que contiene la estatina, se administran (opcionalmente de manera repetida) solas, en ausencia del otro componente, durante el mismo curso de tratamiento. La determinación de si una combinación proporciona un efecto beneficioso mayor en relación con, y en el transcurso del tratamiento de, una enfermedad particular, dependerá de la enfermedad a tratar o prevenir, pero se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.
- 35 [0039] Además, en el contexto de un kit de partes según la invención, el término "conjuntamente con" incluye que una u otra de las dos formulaciones se pueden administrar (opcionalmente de manera repetida) antes de, después, y / o al mismo tiempo que, la administración con el otro componente. Cuando se utiliza en este contexto, los términos "administrado simultáneamente" y "administrado al mismo tiempo que" incluyen que las dosis individuales de pemirolast y estatina se administran dentro de 48 horas (por ejemplo 24 horas), entre uno y otro.
- 40 [0040] "Pacientes" son pacientes mamíferos (incluyendo humanos).
- 45 [0041] Según la invención, el pemirolast y las estatinas se administran preferiblemente de forma local o sistémica, por ejemplo por vía oral, intravenosa o intraarterial (incluyendo por stent intravascular y otros dispositivos perivasculares o formas de dosificación), intramuscular, cutánea, subcutánea, transmucosa (por ejemplo, por vía sublingual o bucal), rectal, transdérmica, nasal, pulmonar, (por ejemplo, traqueal o bronquial), tópica, o cualquier otra vía parenteral, en la forma de una preparación farmacéutica que comprende el compuesto en forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Las modalidades preferidas de presentación incluyen por vía oral (en particular), por vía intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular o intraperitoneal.
- 50 [0042] El pemirolast y las estatinas generalmente se administrarán en general juntos o por separado en forma de una o más formulaciones farmacéuticas mezcladas con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser seleccionado teniendo en cuenta la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser químicamente inertes a los compuestos activos y pueden no presentan efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso. Tales vehículos farmacéuticamente aceptables además pueden proporcionar una liberación inmediata, o modificada,
- 55

de cualquier principio activo, tanto si se administran juntos en una preparación combinada o en la forma de un kit de partes.

5 [0043] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden estar disponibles comercialmente o de otro modo se describen en la bibliografía, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) y Martindale - The Complete Drug Reference (34th Edition) y los documentos mencionados en el mismo, cuyas descripciones relevantes en todos los documentos se incorporan aquí por referencia. De lo contrario, la preparación de formulaciones adecuadas, y en particular preparaciones combinadas, que incluyen pemirolast y estatinas se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.

10 [0044] La cantidad de ingredientes activos en la formulación (es) dependerá de la gravedad de la enfermedad, y del paciente a tratar, así como el compuesto (s) que emplea(n), pero se puede lograr de forma rutinaria por el experto en la técnica.

[0045] Dependiendo del trastorno, y del paciente a tratar, así como la vía de administración, los ingredientes activos se pueden administrar en diferentes dosis terapéuticamente efectivas a un paciente que lo necesita.

15 [0046] Sin embargo, la dosis administrada a un mamífero, particularmente un humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para producir una respuesta terapéutica en el mamífero en un tiempo razonable. Un experto en la técnica reconocerá que la selección de la dosis y composición exacta y la pauta de administración más adecuada también se verán influidas, por entre otras cosas las propiedades farmacológicas de la formulación, la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar, la condición física y la agudeza mental del receptor, así como la potencia del compuesto específico, la edad, estado, peso corporal, sexo y respuesta del paciente a tratar, y la etapa / gravedad de la enfermedad, así como las diferencias genéticas entre pacientes.

20 [0047] La administración de los ingredientes activos puede ser continua o intermitente (por ejemplo, mediante inyección en bolo). La dosificación también puede determinarse por el tiempo y frecuencia de administración.

25 [0048] Las dosis adecuadas de ingredientes activos incluyen los mencionados en la literatura médica, tal como Martindale - The Complete Drug Reference (34^a Edición) y los documentos mencionados en él, cuyas descripciones relevantes en todos los documentos se incorporan aquí como referencia. Las dosis adecuadas de los ingredientes activos están por tanto, en el intervalo unos 0.01 mg/kg de peso corporal a unos 1000 mg/kg de peso corporal. Los rangos preferidos son de aproximadamente 0.1 mg / kg a aproximadamente 20 mg / kg a diario, cuando se administra por vía oral.

30 [0049] Sin embargo, las dosis adecuadas de pemirolast son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo límites inferiores adecuados de rangos de dosis diarias son unos 2 mg, por ejemplo unos 5 mg, tal como unos 10 mg, y más preferiblemente unos 20 mg; y límites superiores de los rangos de dosis diarias son unos 200 mg, por ejemplo unos 100 mg, tal como unos 80 mg, y más preferiblemente unos 60 mg. Dosis orales diarias pueden por ello estar entre unos 2 mg y unos 50 mg, como unos 5 mg y unos 40 mg, y preferiblemente unos 10 mg y unos 30 mg. Las dosis individuales adecuadas pueden ser de unos 20 mg, o unos 40 mg, por día. Los rangos de dosis son todos con independencia de si la formulación empleada es una preparación combinada o un kit de partes como se ha descrito anteriormente.

40 [0050] Del mismo modo, las dosis adecuadas de estatinas son conocidas por los expertos en la técnica. Las dosis orales están por tanto en el intervalo de unos 2 mg a unos 150 mg, tal como unos 5 mg a unos 100 mg, preferiblemente unos 8 mg a unos 90 mg, por ejemplo unos 10 mg a unos 80 mg, por día, con independencia de si la formulación empleada es una preparación combinada o kit de partes como se ha descrito anteriormente.

[0051] En cualquier caso, el médico, u otra persona experta, podrá determinar rutinariamente la dosificación real, que será la más adecuada para cada paciente. Las dosificaciones antes mencionadas son ejemplos de un caso medio; puede, por supuesto, haber casos individuales en que se requieren intervalos de dosificación mayores o menores, y tales intervalos están dentro del alcance de esta invención.

45 [0052] Siempre que el término "alrededor de/unos" se emplea aquí, por ejemplo en el contexto de dosis de ingredientes activos, se apreciará que tales variables son aproximadas, y como tal pueden variar en $\pm 10\%$, por ejemplo $\pm 5\%$ y preferiblemente $\pm 2\%$ (por ejemplo $\pm 1\%$) de los números especificados en este documento.

50 [0053] Los productos de combinación / métodos descritos aquí pueden tener la ventaja de que, en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente aquí, pueden ser más convenientes para el médico y / o paciente que, ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, tener un rango de actividad más amplio que, ser más potentes que, producir menos efectos secundarios que, o pueden tener otras propiedades farmacológicas útiles respecto a métodos similares (tratamientos) conocidos en la técnica anterior para uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios (tales como la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares asociadas) u otros.

55 [0054] La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos con referencia a la Figura (Figura 1), en la que la media del número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) por mL en fluidos de lavado peritoneal de ratones sin (línea base), y con, peritonitis, causada por estimulación de 5 horas con zymosan A (zymosan) inyectado por vía

intraperitoneal. Se muestra la acumulación inflamatoria inducida por zymosan de leucocitos PMN en animales sin tratar (sin tratamiento), y en animales tratados con pemirolast solo (Pemiro), atorvastatina sola (Atorva) o pemirolast en combinación con atorvastatina (Pemiro + Atorva).

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de células MonoMac-6

10 [0055] 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 de sodio, 1 x aminoácidos no esenciales, 1-100 µg / mL de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg / mL de estreptomina y suero bovino fetal 10% (v / v). Para diferenciación, se añaden TGFβ (2 ng / ml) y 1,25 (OH)₂D3 (50 nM), por lo general durante unos 2-4 días.

15 [0056] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), las células MM6 diferenciadas o no diferenciadas (de 1-15 x 10⁶/mL; 0,5-1 mL) se incuban durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y 2-10 µM de ionóforo de calcio A23187 (A23187 también se puede utilizar sin ácido araquidónico). Las células MM6 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de MM6 citadas anteriormente, también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación MM6: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones / estimulaciones se detuvieron con dos volúmenes de metanol frío y se añadió la prostaglandina B₂ (PGB₂) como estándar interno. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se diluyeron con agua hasta alcanzar una concentración final de metanol de 30% y el pH se ajustó a 3-4. Se realizó una extracción de los metabolitos del ácido araquidónico del sobrenadante en fase sólida con una columna C18 reacondicionada (1 ml de metanol seguido de 1 ml de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyeron con metanol, tras lo cual se añadió un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezcló con 39 µL de H₂O (otras relaciones de volumen también pueden utilizarse). Una columna Waters RCM 8x10 se eluyó con metanol/acetoniitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0,01 v / v) a 1.2 ml / min. La absorbancia del eluato se supervisó a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar los kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para la medir LTB₄ según las instrucciones del fabricante(s) del equipo. Usando los kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles según las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes de las incubaciones / estimulaciones de MM6 anteriores también pueden ser analizados respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y / o tromboxano B₂ (TXB₂).

35 [0057] Las soluciones stock de pemirolast y estatinas (rosuvastatina o atorvastatina) se prepararon en etanol, DMSO, N-metil-2-pirrolidona, PEG 400, propilenglicol y/o agua desionizada o solución salina fisiológica, con sonicación, calentando y ajustando el pH en caso necesario (otros vehículos también se pueden usar) Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina, pemirolast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 para la liberación de mediadores de la inflamación (los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de MM6). Los fármacos son añadidos para alcanzar unas concentraciones finales de 1 µM a 100 µM (para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos).

45 [0058] Para estimular la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, las células MM6 diferenciadas o no diferenciadas (1-10 x 10⁶/mL) se incuban (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng / ml), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng / ml) o una mezcla de LPS / PMA. Las células MM6 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo del calcio A23187 y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de MM6 también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación MM6: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina, pemirolast solo y estatina sola; como anteriormente respecto a las soluciones stock y concentraciones) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de MM6 (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de MM6). Después de sedimentar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citocinas y quimiocinas humanas de los sobrenadantes son cuantificadas usando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) disponibles comercialmente para medir citocinas y quimiocinas según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT

(QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 2

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

5 [0059] Células mononucleares (PBMC) o células polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica humana se aíslan mediante Lymphoprep o separación Ficoll-Paque (con o sin separación con Polymorphoprep y / o sedimentación con dextrano) a partir de sangre de donantes sanos usando los protocolos establecidos.

10 [0060] Para estimular la liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), PBMC o PMN (de 1-15 x 10⁶/mL; 0,5-1 mL) se incuban durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 25-50 µM de ácido araquidónico y 2-10 µM de ionóforo de calcio A23187 (A23187 también se puede utilizar sin ácido araquidónico). Los PBMC / PMN pueden estimularse también con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como anteriormente. Las incubaciones / estimulaciones de PBMC/PMN citadas anteriormente, también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación PBMC/PMN: plaquetas de 1:10 a 1:10000. 15 Las incubaciones / estimulaciones se detuvieron con dos volúmenes de metanol frío y se añadió la prostaglandina B₂ como estándar interno. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se diluyeron con agua para alcanzar una concentración final de metanol de 30% y el pH se ajustó a 3-4. Se realizó una extracción de los metabolitos del ácido araquidónico del sobrenadante en fase sólida con una columna C18 reacondicionada (1 ml de metanol seguido de 1 ml de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyeron con metanol, tras lo cual se añadió un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezclaron con 39 µL de H₂O (otras relaciones de volumen también pueden utilizarse). Una columna Waters RCM 8x10 se eluyó con metanol /acetonitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0.01 v / v) a 1.2 ml / min. La absorbancia del eluato se monitorizó a 270 nm para detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir LTB₄ según instrucciones del fabricante(s). Usando los kits de 20 inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles según las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes de las incubaciones / estimulaciones de PBMC/PMN anteriores también pueden ser analizados respecto al contenido de mediadores inflamatorios prostaglandina E₂ (PGE₂) y / o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 0-10%) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC/PMN para la liberación de mediadores de la inflamación (véase Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones stock y concentraciones; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de PBMC/PMN). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos.

35 [0061] Para estimular la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PBMC / PMN (en 1-10 x 10⁶/mL) se incuban (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%) con lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100 ng / ml), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng / ml) o una mezcla de LPS / PMA. Las células PBMC / PMN también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo de calcio A23187 y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS 40 como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de PBMC / NMP también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una relación PBMC / PMN: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina, pemirolast solo y estatina sola; como anteriormente) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de PBMC / PMN para la liberación de citocinas / quimiocinas (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de PBMC / PMN. Después de sedimentar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citocinas y quimiocinas humanas de los sobrenadantes son cuantificadas usando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las 45 instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar (los) kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citocinas y quimiocinas según las instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 3

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de mastocitos de ratón

55 [0062] Se obtienen mastocitos (mMC) derivados de médula ósea de ratón cultivados por cultivo de células de médula ósea de ratones C57BL/6. Las células de médula ósea (de fémures de ratón lavados con PBS) se cultivan (37°C/5% CO₂) en 10% WEHI-3 o X-63 enriquecido, RPMI 1640 acondicionado, suplementado con suero fetal bovino 10% inactivado por calor, 4 mM de L-glutamina, 50 µM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 100 µg / ml de penicilina / estreptomina. El desarrollo de los

mastocitos (que crecen en suspensión) se confirma por expresión de Kit (por citometría de flujo) en la superficie celular y/o por tinción con azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

5 [0063] Se obtienen mastocitos derivados de médula ósea de ratón cultivados de tejido conectivo (tipo TC) por cultivo de células de médula ósea de ratones C57BL/6. Las células de médula ósea se cultivan (37°C/5% CO₂) en medio RPMI-1640 que contiene 10% de FCS filtrado, 4 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 UI / mL de penicilina G, 100 µg / ml de estreptomycin, 0.1 mM MEM aminoácidos no esenciales y 50 µM 2-ME, suplementado con 50 ng / ml de factor recombinante murino de células madre y 1 ng / ml de recombinante murino IL-4. El desarrollo de los mastocitos se confirma por la expresión de Kit (por citometría de flujo) en el la superficie celular y/o por tinción con azul de toluidina (generalmente después de al menos 3-5 semanas de cultivo).

10 [0064] Líneas de mastocitos en ratones MC/9 (obtenidas de ATCC, Producto nº CRL-8306) y C1.MC/C57.1 (Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9175 (1987)) también pueden ser utilizadas. Las células MC / 9 se cultivan según instrucciones de ATCC (<http://www.atcc.org>), y las células C1.MC/C57.1 se cultivan según se describe en Rumsaeng et al (J. Immunol. 158, 1353 (1997)).

15 [0065] Para la activación / estimulación a través de reticulación del receptor de IgE, los mastocitos cultivados son inicialmente sensibilizados durante 90 minutos a 37°C (5% CO₂) con un anticuerpo IgE monoclonal de ratón anti-TNP (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.), utilizado como un sobrenadante de hibridoma 15%. Las células que se utilizarán en los ensayos de liberación de N-acetilbeta-D-hexosaminidasa (o histamina) o de citocinas / quimiocinas (véase más adelante) se someten después a dos lavados con PBS y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 0.2% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) antes de activar las células (en 0.5-20 10x10⁶/mL) por adición de 100 ng / ml de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) con una relación de acoplamiento de 9/1. La incubación (37°C/5% CO₂) con TNP-BSA es 30 minutos para el análisis de liberación de beta-hexosaminidasa (o histamina) y de 4-24 para el análisis de la liberación de citocinas y quimiocinas. Las células se incubaron (37°C / 5%CO₂) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) de 1 minuto a 24 horas antes de la adición de TNP-BSA (véase el Ejemplo 1 anterior para más detalles sobre las soluciones stock y concentraciones de fármacos; el fármaco(s) de ensayo también se puede añadir simultáneamente con la estimulación de TNP-BSA). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin fármacos. Después de las incubaciones o estimulaciones, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron respecto al contenido de beta-hexosaminidasa (o histamina) y / o citocinas y quimiocinas como se describe a continuación. Los granulados celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su procesamiento posterior para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12 más adelante).

25 [0066] Para la detección de la liberación dependiente de Ig-E de la enzima beta-hexoaminidasa de los mastocitos granulares, se utiliza un ensayo enzimático colorimétrico. Se transfiere 60 µL de cada sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se mezcla con un volumen igual de solución de sustrato (7.5 mM de p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glucosaminidasa disuelto en 80 mM de ácido cítrico, pH 4.5). La mezcla se incuba sobre una plataforma oscilante durante 2 horas a 37°C. Después de la incubación, se añade 120 µL de glicina (0.2 M, pH 10.7) a cada pocillo y se mide la absorbancia a 405 y 490 nm usando un lector de microplacas Emax Precision (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La liberación de beta-hexosaminidasa se expresa como un porcentaje del total de beta-hexosaminidasa determinado después de la lisis celular. Para la detección de la liberación de IgE-dependiente de histamina de los mastocitos granulares, se utilizan kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir histamina según las instrucciones del fabricante(s).

40 [0067] Para la detección de la liberación dependiente de IgE de citocinas y quimiocinas de los mastocitos de ratón como IL-6, IL-4, el TNF, IL-1 β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ, se usa un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citocinas y quimiocinas según instrucciones del fabricante(s).

45 [0068] Además de los experimentos de mastocitos anteriores, también se pueden estudiar los efectos inhibidores de mastocitos del fármaco de ensayo (s) (como antes) usando enfoques experimentales y ensayos bien establecidos y documentados para analizar la liberación inducida (por ejemplo, con anti-IgE (con o sin el pretratamiento de las células con IgE de rata o ratón), concanavalina A, proteína L, compuesto 48/80, ionóforo A23187, PMA) de histamina, beta hexosaminidasa o triptasa de mastocitos recién aislados del líquido peritoneal de rata o ratón.

Ejemplo 4

Ensayos de liberación de mediadores inflamatorios de células RAW 264.7

55 [0069] Se cultivan células RAW 264.7 (37°C/5% CO₂) en DMEM, suplementado con 100 unidades/ mL de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin y suero fetal bovino 10%.

[0070] Para estimular la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como IL-6, TNF, IL-1 β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN_γ, las células RAW 264.7 (en 1-10 x 10⁶/mL) se incuban (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un lipopolisacárido (LPS, concentración final 1-100

ng / ml), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentración final 1-100 ng / ml) o una mezcla de LPS / PMA). Las células RAW 264.7 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionóforo del calcio A23187 y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin PMA y/o LPS como anteriormente.

- 5 Las incubaciones/estimulaciones de RAW 264.7 también pueden realizarse en presencia de plaquetas de ratón o humanas (de sangre de un donante sano) con una relación RAW 264.7: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incubaron (a 37°C/5% CO₂ en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de RAW 264.7 para la liberación de citocinas / quimioquinas (véase el Ejemplo 1 anterior para los detalles sobre las soluciones stock y concentraciones de fármacos; el fármaco(s) de ensayo también se puede añadir simultáneamente con la estimulación de RAW 264.7). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Después de sedimentar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citocinas y quimioquinas humanas de los sobrenadantes son cuantificadas usando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar (los kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citocinas y quimioquinas según instrucciones del fabricante(s). Los granulados celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase Ejemplo 12 más adelante).

Ejemplo 5

20 Inflamación de pata de rata inducida por Carragenano

- [0071] Este ensayo es esencialmente según lo descrito por Winter et al (Proc. Soc. Exp.. Biol. Med., 111, 544 (1962)). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratas macho Sprague-Dawley o Wistar con un peso aproximado 150-400 g (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. De 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, una solución de carragenano al 1,0 o 2,0% (Tipo IV Lambda, Sigma Chemical Co.) en solución salina 0,9% se inyecta en la región subplantar de una pata trasera de las ratas anestesiadas. Antes, y a intervalos indicados de 3-24 horas después de la inyección de carragenano, se mide el volumen de la pata inyectada con un pletismómetro de desplazamiento conectado a un transductor de presión con un indicador digital. El grado de hinchazón indica el grado de edema inflamatorio. 3-24 horas después de la inyección de carragenano, las ratas se sacrificaron y se perfundieron con solución salina o PBS (otro medio de perfusión también se puede utilizar). Principio del formulario Se recogen biopsias de tejido blando plantar de las patas inflamadas, se pesan, se almacenan congeladas (las muestras para el análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol, Invitrogen, San Diego, CA), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), se analizan posteriormente en relación a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y / o 2) la expresión génica del tejido usando tecnología de microarrays. El tejido no inflamado de pata de ratas no tratadas proporciona niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas. La inflamación de la pata también puede ser inducida por inyección subplantar del compuesto 48/80 (48/80, 1-5 µg en 50-100 µl. de PBS o salino) (en lugar de carragenano), seguido de la medida de la hinchazón inflamatoria de la pata y la recogida de biopsias de tejido para análisis de microarrays y/o de MPO (como anteriormente) de 30 minutos a 8 horas después de de la inyección de 48/80.

45 Ejemplo 6

Inflamación del oído de ratón inducida por aceite de crotón

- [0072] Este ensayo es esencialmente según lo descrito por Tonelli et al (Endocrinology 77, 625 (1965)) (otras cepas de ratones también se pueden utilizar). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. De 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se aplica tópicamente 10-30 µL de una solución al 2.0 o 4.0% de aceite de crotón en acetona o etanol a uno o ambos oídos. A intervalos indicados de 4-12 horas después de la aplicación del aceite de crotón, se sacrifican los animales, y las biopsias por punción de las orejas se pesan para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (el grosor de la oreja también puede ser medido para determinar la hinchazón). Las biopsias de las orejas inflamadas se recogen, se almacenan congeladas (las muestras para el análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de

leucocitos neutrófilos en la inflamación, y / o 2) la expresión génica del tejido usando la tecnología de microarrays. Las biopsias de oído no inflamado de ratones no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

5 Ejemplo 7

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

[0073] Estos ensayos son esencialmente según los descritos por Chang et al (Eur. J. Pharmacol. 142, 197 (1987)) (aunque otras cepas de ratones también se pueden utilizar). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a ratones macho o hembra. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. De 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se aplica tópicamente 1-10 µg de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), acetato de tetradecanoilforbol (TPA), o 1-5 mg de ácido araquidónico en 10-30 µL de acetona o etanol a uno o ambos oídos. 4-12 horas Después de la aplicación de PMA o TPA, y de 30 minutos a 6 horas después de la aplicación de ácido araquidónico, se sacrifican los animales, y las biopsias por punción de las orejas se pesan para determinar la hinchazón inflamatoria de las orejas (el grosor de la oreja también puede ser medida para determinar la hinchazón). Se recogen las biopsias de las orejas inflamadas, se almacenan congeladas (las muestras para el análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizados respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y / o 2) la expresión génica del tejido usando la tecnología de microarrays. Las biopsias del oído no inflamado de ratones no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 8

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

[0074] Se utilizan ratones macho CBA o NMRI con un peso aproximado de 15-30 g, o ratas macho Wistar o Sprague-Dawley con un peso aproximado de 150-450 g, (otras cepas de ratones y ratas pueden ser utilizadas). La lesión tisular aguda y la inflamación aguda se consiguen en la parte distal de la cola o una de las orejas usando un escalpelo en condiciones asépticas. Uno, dos o tres de cortes longitudinales paralelos, de unos 5-15 mm de largo, se hacen a través de todas las capas de la piel. Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, dando la primera dosis de 1 minuto a 24 horas antes de la lesión tisular (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 2-48 horas después de la lesión, los animales son sacrificados y los segmentos lesionados de los tejidos se retiran, se pesan y se almacenan congelados (las muestras para análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol), y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente se analizan respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y / o 2) la expresión génica del tejido usando tecnología de microarrays. Los tejidos correspondientes sin lesión/sin inflamación de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. Las reacciones tisulares e inflamación en respuesta a la lesión también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 9

Reacción e inflamación tisular aguda en respuesta a una lesión en rata

[0075] Se usan ratas macho Sprague-Dawley de 350-500 g de peso (aunque otras cepas de ratas pueden ser utilizadas). Los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno y la lesión tisular e inflamación aguda se realiza en la arteria carótida común izquierda de la siguiente manera: después de la exposición quirúrgica de las arterias carótida común izquierda, externa e interna y el cierre temporal del flujo sanguíneo local con ligaduras temporales, un catéter de balón (2-French Fogarty) se introdujo a través de la arteria carótida externa y se avanzó hasta la aorta. A continuación, se infló el balón con agua suficiente para distender la arteria carótida común y fue retirado entonces de nuevo a la arteria carótida externa. Este procedimiento se repite tres veces y, a continuación se retira el catéter, se liga la carótida externa y se cierra la herida. Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas, dando la primera dosis de 1 minuto a 24 horas antes de la lesión tisular (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los

fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. Principio del formulario 2-48 horas después de la lesión, los animales son anestesiados con isoflurano en oxígeno y su arteria carótida izquierda expuesta. Se colocan unas pinzas en la parte más proximal de las arterias carótidas común e interna, respectivamente, y se lava posteriormente el vaso que está entre las pinzas con cuidado con solución salina estéril y / o TRlzol, se retira, se pesa, y se almacena congelado (las muestras para análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRlzol) y, como se describe más adelante (Ejemplo 10 y 12), posteriormente analizado respecto a 1) acumulación de mieloperoxidasa (MPO), que refleja la acumulación de leucocitos neutrófilos en la inflamación, y / o 2) la expresión génica del tejido usando la tecnología de microarrays. Los vasos correspondientes sin lesión/sin inflamación de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO y de expresión génica. Las reacciones de los tejidos y la inflamación en respuesta a una lesión pueden estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 10

15 Acumulación inflamatoria de mieloperoxidasa en tejido

[0076] La enzima mieloperoxidasa (MPO) es abundante en leucocitos neutrófilos y se suele utilizar como un marcador para la detección de acumulación de neutrófilos en un tejido inflamado. Para determinar la acumulación de mieloperoxidasa inflamatoria en tejidos inflamados de ratón y de rata (como se describe en el Ejemplo 5-9 anteriormente), los tejidos se homogenizan en bromuro de hexadeciltrimetil-amonio 0.5%, y se congelan/descongelan. La actividad MPO del sobrenadante se determina espectrofotométricamente como el cambio en la absorbancia a 650 nm (25 ° C) que ocurre en la reacción redox de H₂O₂-tetrametilbencidina catalizada por MPO. Los valores se expresan como unidades de MPO / mg de tejido.

Ejemplo 11

Ensayos de células musculares lisas

[0077] Las células de músculo liso de aorta de rata (RASMCs) son aisladas como se ha descrito anteriormente (Hedin et al, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 1977 (1997)). Las células se cultivan (37° C / 5% CO₂) en medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino 10%, 50 µg/ml de ácido L-ascórbico, 50 µg / ml de estreptomycin, 50 UI / mL de penicilina (F-12/ suero fetal bovino 10%), cultivadas a confluencia, pases seriados por tripsinización, y usados en experimentos después de 2-6 pases. Las células RASMCs se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 4x10⁴ células por pocillo en F-12/ suero fetal bovino 10% (placas con mayor número de pocillos por placa y adecuados números más bajos de células por pocillo también se pueden utilizar). Después de 24 horas, las células son sincronizadas en la fase G0/G1 por privación en medio Ham F-12 suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA), 50 µg / ml ácido L-ascórbico, 50 µg / ml de estreptomycin y 50 UI / mL de penicilina (F-12/0.1% de BSA) durante 24-48 horas. Para estimar la síntesis de ADN, las RASMCs privadas se estimulan bien con 10 ng / ml de IGF-1 o con suero bovino fetal 10% durante 12-48 horas (otros mitógenos bien establecidos como PDGF también se pueden utilizar). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) se añaden de 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones stock y concentraciones de los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Las células son marcadas con 1 µCi [3H] timidina 8 horas antes del final del periodo de estimulación. Las placas se lavan a continuación con PBS enfriado en hielo, se incuban una noche con ácido tricloroacético al 10% (w / v) helado, se lisan en hidróxido sódico 0.2 M, y la radiactividad se mide en un contador de centelleo líquido. La proliferación estimulada de RASMC puede también ser analizada usando ensayos comercialmente disponibles de proliferación celular bromodeoxiuridina (BrdU) (por ejemplo, Cell Proliferation 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 de células. En experimentos separados (para estudiar la expresión génica), un mayor número de células RASMCs privadas (1-5 x 10⁵ células por pocillo) se estimulan con 10 ng / ml de IGF-1 o 10% de suero fetal bovino (o PDGF) como anteriormente, o con LPS (1-100 ng / ml), con suero fetal bovino 1-10% durante 4-48 horas (todos los estímulos con y sin fármaco(s) de ensayo se realizan como se describió anteriormente). Las células se recogen y se almacenan congeladas (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento por análisis de microarrays (Véase el Ejemplo 12 más adelante).

[0078] Las células de músculo liso bronquiales humanas (HBSMCs, Promocell, Heidelberg, Alemania) se cultivan en DMEM suplementado con 10% FBS al, 100 unidades / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomycin, 0.12 UI / ml de insulina, y con o sin 2 µg / ml de anfotericina B. Antes de los experimentos, se puede detener el crecimiento celular durante 24 horas en medio bajo en FBS (0.3-5%), libre de insulina. Para estimular la formación y la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias tal como IL-8 y eotaxina, HBSMCs (a 80% de confluencia, correspondiente a aproximadamente 8 x10⁵/25 cm² del matraz) se incubaron (37°C/5% CO₂) durante 24-48 horas (en DMEM con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con diferentes combinaciones de IL-1 β y TNF-α (ambos a 1-50 ng / ml). Las células se incubaron (a 37°C /5%CO₂ en DMEM con suero fetal bovino 0.3-10%, con o sin

suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) de 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de HBSMC (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones stock y concentraciones; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de HBSMC). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos. Después de las incubaciones/estimulaciones, se cuantificaron en el sobrenadante las concentraciones de citoquina y quimioquina humana usando kits disponibles comercialmente de inmunoensayo enzimático (Kits EIA/ELISA) según las instrucciones del fabricante(s). Las células se recogen y se almacenan congeladas (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento por análisis de microarrays (Véase el Ejemplo 12 más adelante).

10 **Ejemplo 12**

Análisis de la expresión génica

[0079] El ARN total procedente de tejidos de ratón y rata (véase Ejemplo 5 a 9, 15 y 16) se aisló usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de limpieza mediante RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) según los protocolos de los fabricantes. El ARN total de las incubaciones /estimulaciones celulares descrito en los ejemplos anteriores y posteriores (mastocitos de ratón, MonoMac-6, PBMC, PMN, RAW 264.7, RASMC, HBSMC, NB4, HL-60) se aisló usando el Mini Kit RNeasy (QIAGEN), con o sin el Set RNase-Free DNase (Qiagen), según el protocolo(s) del fabricante. Dependiendo de las especies a partir de las que se originan los diferentes tejidos y células, el análisis de microarrays se realizó usando GeneChip® Human Genoma U133 Plus 2,0 Array, GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 o Gene-Chip® Rat Genome 230 2.0 Array, o la versión más reciente de estos chips (todos los arrays de Affymetrix, Santa Clara, CA) según los protocolos del fabricante. Los datos de microarrays de expresión se analizan usando, por ejemplo GeneChip Operating Software (Affymetrix) and Bioconductor/R (www.bioconductor.org). Otros programas de software también se pueden utilizar.

[0080] la expresión génica de las diferentes especies también puede ser analizada usando Human Genome Survey Microarray V2.0, Mouse Genome Survey Microarray V2.0 o Rat Genome Survey Microarray (o la versión más reciente de éstos arrays) según los protocolos del fabricante Applied Biosystems (Foster City, CA). Estos datos de microarrays de expresión se analizan usando por ejemplo un 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) suplementado con una base de datos Oracle® de anotaciones, GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y Microarray Suite version 5.0 software (MAS 5.0, Affymetrix). Otros programas de software también se pueden utilizar.

[0081] La expresión genética (niveles de mRNA) se puede analizar mediante PCR cuantitativa o semicuantitativa. El análisis de la expresión génica a nivel proteico puede ser analizado mediante kits comercialmente disponibles de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) (según las instrucciones del fabricante(s)), o Western blot convencional y / o métodos inmunohistoquímicos.

Ejemplo 13

Ensayos de proliferación celular

[0082] La proliferación de mastocitos de ratón, células MonoMac-6, células RAW 264.7, células NB4, células HL-60 y HBSMC estimuladas y no estimuladas descrita en los ejemplos anteriores y posteriores (con o sin detención del crecimiento durante 24-48 horas en suero fetal bovino 0,1-5% antes de la adición de los fármacos de ensayo respectivos y / o los estímulos descritos en los Ejemplos anteriores y posteriores durante 24-72 horas) se mide usando el reactivo de la proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o los ensayos de proliferación celular de bromodesoxiuridina (BrdU) comercialmente disponibles (por ejemplo, Cell Proliferation ELISA, BrdU, de Roche Applied Science), según las instrucciones del fabricante. Otros ensayos convencionales de proliferación celular también pueden ser utilizados.

Ejemplo 14

Pruebas de agregación plaquetaria

[0083] La agregación de plaquetas de conejo o humanas (en plasma rico en plaquetas o sangre total) inducida por adenosina difosfato (ADP), ácido araquidónico, colágeno o el análogo de tromboxano U-46619 se analizó mediante agregometría, por ejemplo como se describe por Bertele et al.(Eur. J. Pharmacol. 85, 331 (1982)). La agregación plaquetaria inducida (como de describió anteriormente) puede también ser analizada mediante plaquetas humanas o de conejo lavadas y / o con otros métodos establecidos de agregometría u otros métodos para medir la agregación plaquetaria. El fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) se añaden 1-120 minutos antes de la inducción de la agregación plaquetaria (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones stock y concentraciones ; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la inducción de la agregación plaquetaria). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos.

Ejemplo 15

Inflamación peritoneal en ratón inducida por Zymosan y otros estímulos

[0084] Este ensayo es esencialmente según descrito por Rao et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917 (1994)) (otras cepas de ratones también se pueden utilizar). Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0.03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se administra una inyección intraperitoneal de 0.5-2 mg de zymosan A (Sigma, cat. N Z4250) en 0.5-1 ml de PBS estéril (sonicado y bien mezclado) (en lugar de utilizar Zymosan A, la inflamación peritoneal puede ser inducida también por una inyección intraperitoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos pro-inflamatorios bien establecidos tal como Anti-IgE de ratón (con o sin pre-tratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenano, proteosa peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . El fármaco(s) de ensayo puede ser también administrado simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otro estímulo pro-inflamatorio). Después de 2-24 horas de la inyección de zymosan (o uno o más de los otros estímulos pro-inflamatorios), se sacrificaron los animales. A continuación, se lavó la cavidad peritoneal con 1-3 ml de tampón de lavado (PBS enfriado con hielo con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades / ml de heparina). El recuento de leucocitos total y diferencial en el líquido de lavado se hizo con un hemocitómetro después de una tinción con solución de Türk y/o en preparados de cytosporina teñidos con May-Grunwald Giemsa o una tinción de Wright (Diff-Quik) modificada, respectivamente, por microscopía de luz usando criterios morfológicos estándar. Otros métodos establecidos para determinar el recuento leucocitario total y diferencial también pueden ser utilizados. El líquido de lavado restante se centrifugó (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el líquido de lavado libre de células sobrenadante se conservó congelado (-20 ° C a -80 °) hasta que se analizó el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y / o citocinas / quimiocinas de ratón (por ejemplo, IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ) como se describe en el Ejemplo 1 y 4 anteriores. El contenido de histamina en el líquido de lavado sobrenadante se determina mediante kits comercialmente disponibles de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) para la medir histamina según las instrucciones del fabricante(s). La activación de células peritoneales inflamatorias también puede ser estudiada por la medida de la actividad de beta-hexosaminidasa en el líquido de lavado usando el ensayo para beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del líquido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 mL KHPO₄ 0,05 M pH 6,0 con HTAB 0.5% y se almacenan congelados (-20 ° C a -80 °) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) descrito por Rao et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Idénticos granulados celulares separados de animales se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA), hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con tampón de lavado, se recogen biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y / u otros órganos / tejidos intra- o retroperitoneales) de la cavidad peritoneal inflamada, se pesan, se almacenan congeladas (muestras para el análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA) y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas en lo que respecta a la expresión génica del tejido mediante tecnología de microarrays. Las cavidades peritoneales no inflamadas de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO, mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas y expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 16**Inflamación peritoneal en rata inducida por Zymosan y otros estímulos**

[0085] Se utilizan ratas macho Wistar o Sprague Dawley con un peso de aproximadamente 150-450 g. Los fármaco (s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) a dosis de 0,03 a 50 mg/kg, se administraron por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal u oral cada 2-24 horas a los animales. (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos). Antes de la administración, las soluciones stock de los fármacos (véase el Ejemplo 1 anterior) se diluyen según sea necesario en por ejemplo 0.5% o 1% de metilcelulosa en agua (para tratamiento oral) o solución salina (para administración parenteral). Otros vehículos también pueden ser utilizados. 1 minuto a 24 horas después de la primera dosis del fármaco, se administra una inyección intraperitoneal de 1-100 mg de zymosan A (Sigma, cat. N Z4250) en 1-10 mL de PBS estéril (sonicado y bien mezclado). En lugar de utilizar Zymosan A, la inflamación peritoneal puede también ser inducida por una inyección intraperitoneal de concentraciones pro-inflamatorias de otros estímulos pro-inflamatorios bien establecidos tal como Anti-IgE de ratón (con o sin pre-tratamiento intraperitoneal con IgE de ratón durante 1-3 días), concanavalina A, carragenina, proteosa peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1 β . El fármaco(s) de ensayo puede ser también administrado simultáneamente con la inyección intraperitoneal de zymosan u otro estímulo pro-inflamatorio). Después de 2-24 horas de la inyección de zymosan (o uno o más de otros estímulos pro-inflamatorios), se sacrificaron los animales. A continuación, se lavó la cavidad peritoneal con 1-3 ml de un tampón de lavado (PBS enfriado con hielo con o sin 3-5 mM EDTA o 5-10 unidades / ml de heparina). El recuento de leucocitos total y diferencial en el líquido de lavado se hizo con un hemocitómetro tras una tinción con solución de Türk y/o en preparados de cytosporina teñidos con May-Grunwald Giemsa o una tinción de Wright (Diff-Quik) modificada, respectivamente, por microscopía de luz usando criterios morfológicos estándar.

Otros métodos establecidos para determinar el recuento leucocitario total y diferencial también pueden ser utilizados. El líquido de lavado restante se centrifugó (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), y el líquido de lavado libre de células sobrenadante se conservó congelado (-20 ° C a -80 °) hasta que se analizó el contenido de mediadores inflamatorios LTB₄, PGE₂, TXB₂ y / o citocinas / quimiocinas de ratón (por ejemplo, IL-4, IL-6, TNF, IL-1 β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFN γ) esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 y 4 anteriores. El contenido de histamina en el líquido de lavado sobrenadante se determina mediante kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles (kits EIA/ELISA) para la medir histamina según las instrucciones del fabricante(s). La activación de células peritoneales inflamatorias también puede ser estudiada por la medida de la actividad de beta-hexosaminidasa en el líquido de lavado usando el ensayo para beta-hexosaminidasa descrito en el Ejemplo 3. Los granulados celulares del líquido de lavado son resuspendidos en 0.1-1.0 ml 0.05 M KHPO₄ pH 6,0 con 0.5% HTAB y se almacenan congelados (-20 ° C a -80 °) hasta el análisis del contenido de mieloperoxidasa (MPO) básicamente descrito por Rao et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Idénticos granulados celulares separados de animales se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (Qiagen, Valencia, CA), hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12). En el momento de lavar la cavidad peritoneal con tampón de lavado, se recogen las biopsias de tejido (pared peritoneal, intestinos y / u otros órganos / tejidos intra- o retroperitoneales) de la cavidad peritoneal inflamada, se pesan, se almacenan congeladas (muestras para el análisis de microarrays se congelan a -80 ° C en TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA) y, como se describe en el Ejemplo 12, posteriormente analizadas en lo que respecta a la expresión génica del tejido mediante tecnología de microarrays. Las cavidades peritoneales no inflamadas de los animales no tratados proporcionan niveles basales de MPO, mediadores inflamatorios, citocinas / quimiocinas y expresión génica. La inflamación tisular también puede estudiarse usando técnicas convencionales histológicas e inmunohistoquímicas.

Ejemplo 17

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

[0086] Se cultivaron células humanas NB4 (Lanotte et al, Blood, 77, 1080(1991)) (37°C / 5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina y suero fetal bovino 10% (v / v). Para diferenciación, se añadió 1-5 µM de ácido todo-trans-retinoico (ATRA), generalmente cada tres días.

[0087] Se cultivaron células humanas HL-60 (Steinhilber et al, Biochim. Biophys. Acta 1178, 1 (1993)) (37 ° C / 5% CO₂) en medio RPMI-1640 suplementado con 100 unidades /ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina y suero fetal bovino 10-20% (v / v). Para diferenciar, se añadió ATRA (1-5 µM), DMSO (1-2%), PMA (100-500 ng / ml) o vitamina D3 (1-15 µM) durante 5 días.

[0088] Para estimular la formación y liberación del mediador inflamatorio leucotrieno B₄ (LTB₄), las células NB4 o HL-60 diferenciadas o no diferenciadas (a 1-15 x 10⁶/mL; 0,5-1 mL) se incuban durante 5-30 minutos (a 37°C en PBS con calcio) con 10-40 µM de ácido araquidónico y / o 2-10 µM de ionóforo de calcio A23187. Las células NB4 y HL-60 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), fMLP y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin A23187 y/o ácido araquidónico como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de NB4 y HL-60 citadas anteriormente, también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una proporción NB4/HL-60: plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las incubaciones/estimulaciones se pararon con 1 mL de metanol frío y se añadió la prostaglandina B₂ (PGB₂) como estándar interno. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se diluyeron con agua para alcanzar una concentración final de metanol del 30% y el pH se ajustó a 3-4. Se realizó una extracción de los metabolitos del ácido araquidónico del sobrenadante en fase sólida con una columna C18 reacondicionada (1 mL de metanol seguido de 1 mL de H₂O) (Sorbent Technology, U.K.). Los metabolitos se eluyeron con metanol, tras lo cual se añadió un volumen de agua al eluato. Por HPLC en fase inversa, 76 µL de cada muestra se mezcló con 39 µL de H₂O (otras proporciones de volumen también pueden utilizarse). Una columna Waters RCM 8x10 se eluyó con metanol/acetronitrilo/H₂O/ácido acético (30:35:35:0,01 v / v) a 1.2 ml / min. La absorbancia del eluato se monitorizó a 270 nm para la detección y cuantificación de PGB₂ y LTB₄. También se pueden utilizar los kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para la medir LTB₄ según las instrucciones del fabricante(s) del equipo. Usando los kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles según las instrucciones del fabricante(s), los sobrenadantes procedentes de las incubaciones/estimulaciones de NB4/HL-60 anteriores pueden también analizarse respecto al contenido de los mediadores de la inflamación tales como prostaglandina E₂ (PGE₂) y/o tromboxano B₂ (TXB₂). Las células se incubaron (a 37°C en PBS sin calcio o en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal 1-20%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina (rosuvastatina o atorvastatina), pemirolast solo y estatina sola) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 o HL-60 para la liberación de mediadores de la inflamación (véase el Ejemplo 1 anterior para obtener más detalles respecto a las soluciones stock y concentraciones de los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de NB4 o HL-60). Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos.

[0089] Para estimular la formación y liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias y mediadores como IL-1 β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PAF, C5a, células NB4 o HL-60 diferenciadas o no diferenciadas (a 1-10 x 10⁶/mL) se incuban (37°C/5% CO₂) durante 4-24 horas (en RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con un lipopolisacárido (LPS 1-100 ng / ml), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 1-100 ng / ml) o

ionóforo de calcio A23187 (1-10 μM), o combinaciones de éstos estímulos. Las células NB4 y HL-60 también pueden ser estimuladas con concentraciones documentadas biológicamente activas de adenosina difosfato (ADP), y / o el análogo de tromboxano U-46619, con o sin LPS, PMA y / o A23187 como anteriormente. Las incubaciones/estimulaciones de las células NB4 y HL-60 también pueden realizarse en presencia de plaquetas humanas (de sangre de un donante sano) con una proporción NB4/HL-60:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Las células se incubaron (a 37°C/5% de CO₂ en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino 1-10%, con o sin suplementos) con el fármaco(s) de ensayo (pemirolast en combinación con estatina, pemirolast solo y estatina sola, como anteriormente) durante 1 minuto a 24 horas antes de la estimulación de NB4 o HL-60 para la liberación de citocina/quimiocina/mediador (Para comparación, algunos experimentos se realizan sin los fármacos; los fármaco(s) de ensayo se pueden añadir también simultáneamente con la estimulación de NB4/HL-60). Después de sedimentar las células tras las incubaciones/estimulaciones, las concentraciones de citocinas y quimiocinas humanas de los sobrenadantes son cuantificadas usando un Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) según las instrucciones del fabricante. También se pueden utilizar (los) kits de inmunoensayo enzimático (kits EIA/ELISA) comercialmente disponibles para medir citocinas y quimiocinas según las instrucciones del fabricante(s). Los (sedimentos) granulados celulares se almacenan congelados (-80 ° C) en tampón RLT (QIAGEN, Valencia, CA) hasta su posterior procesamiento para experimentos de microarrays (véase el Ejemplo 12 más adelante).

[0090] Además de estudiar los efectos de los fármacos anteriores en la liberación de mediadores de quimiocinas/citocinas de las células similares a los neutrófilos como NB₄ y HL-60, los efectos de los fármacos sobre la adhesión espontánea o estimulada y / o la migración de estas células también puede ser analizada (también se pueden utilizar células sanguíneas humanas polimorfonucleares recién aisladas (PMN) aisladas según protocolos estándar). La adhesión espontánea o estimulada (con fMLP, IL-8, PAF, LTB₄ u otros factores de activación de PMN relevantes) de los PMN u otras células similares a los neutrófilos como por ejemplo, células endoteliales cultivadas o superficies artificiales recubiertas de proteína se estudian mediante establecidos y documentados métodos experimentales y ensayos. La migración (estimulada con fMLP, IL-8, el PAF, LTB₄ u otros factores relevantes de quimiotaxis de PMN) de los PMN u otras células similares a los neutrófilos se estudian mediante establecidos y documentados métodos experimentales y ensayos, la migración, por ejemplo, a través de membranas recubiertas de proteínas comercialmente disponibles diseñadas para tales estudios de migración.

Ejemplo 18

Activación de plaquetas y de leucocitos en sangre entera humana

[0091] Se recoge sangre venosa por punción venosa sin estasis, usando tubos vacutainer siliconizados de volumen 1/10 que contienen 129 mM de citrato trisódico (Becton Dickinson, Meylan, Francia). Se miden en sangre total la expresión de P-selectina en plaquetas (que refleja la actividad de las plaquetas), la expresión de CD11b en leucocitos (que refleja la actividad de leucocitos), recuento de plaquetas individual y microagregados plaqueta-plaqueta, y agregados plaquetas-leucocitos (PLA) usando ensayos de citometría de flujo, esencialmente como se describe anteriormente (ver por ejemplo, Li et al. Circulation 100, 1374 (1999) como referencia). Brevemente, 5 μl de alícuotas de sangre total se añaden a 45 μl de solución salina tamponada con Hepes (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM de MgSO₄, 10 mM Hepes, pH 7,4) que contienen anticuerpos apropiadamente diluidos (ver más abajo) en ausencia o presencia de estímulos de activación de plaquetas tales como difosfato de adenosina (ADP), U-46619, U-44069, factor activador de plaquetas (PAF), ácido araquidónico, colágeno o trombina, y / o estímulos de activación de leucocitos tales como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), ácido araquidónico, PAF, LPS, A23187 o LTB₄. Antes de la exposición de la sangre a los estímulos de activación de plaquetas y / o leucocitos + los anticuerpos, las muestras de sangre (0.1-1 ml) se incuban con el fármaco de ensayo (s) (pemirolast en combinación con estatinas (rosuvastatina o atorvastatina), solo pemirolast y estatina sola) de 1 a 60 minutos (el fármaco de ensayo (s) puede también se pueden añadir simultáneamente con los estímulos anteriores). Para comparación, algunas muestras de sangre son estimuladas como anteriormente sin exposición al fármaco (s). La expresión de P selectina en plaquetas se determina por R-ficoeritina (RPE)-CD62P anticuerpo monoclonal (MAb) AC1.2 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). La expresión de CD11b en leucocitos se determina por isotiocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado OSO MAb 1 (Immunotech, Marsella, Francia). FITC y RPE MABs isotípicos conjugados se utilizaron como controles negativos. Perlas fluorescentes (SPHERO™ Rainbow particles, 1.8-2.2 μm) utilizadas para el recuento de plaquetas son de PharMingen (San Diego, CA, EE.UU.). Las plaquetas se identifican con FITC conjugado anti-CD42a (GP1X) Mab MAb 1 (Becton Dickinson), y los leucocitos se identifican con RPE conjugado anti-CD45 Mab J33 (Immunotech). Las muestras (sangre fármaco-tratada o no tratada + anticuerpos con o sin los estímulos, como anteriormente) se incuban a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min. Después, las muestras se diluyen y se fijan ligeramente con solución salina de formaldehído 0.5% (v / v), y se analizaron 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 la expresión de P selectina en plaquetas se informan como el porcentaje de células positivas para P-selectina en la población de plaquetas y como los recuentos absolutos de plaquetas positivas para P-selectina. La expresión de CD11b en leucocitos se informa como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la población total de leucocitos y de las subpoblaciones de leucocitos. Los agregados plaquetas-leucocitos (PLA) se presentan como ambos recuentos absolutos y porcentajes de plaquetas conjugadas con leucocitos en la población total de leucocitos y entre linfocitos, monocitos y neutrófilos. Otros reactivos relevantes, las condiciones/aproximaciones experimentales, el equipo y los modos de análisis para medir la activación correspondiente de plaquetas y leucocitos en sangre total humana también pueden ser utilizados.

Ejemplo 19**Inhibición en la formación de interferón- γ en mastocitos por Pemirolast y Rosuvastatina**

[0092] Mastocitos (mMC) derivados de médula ósea de ratón cultivados se obtienen por cultivo de células de médula ósea de ratones C57BL/6. Las células de médula ósea (de fémures de ratón lavados con PBS) se cultivan (37°C/5% CO₂) en 10% WEHI-3 o X-63 enriquecido, RPMI 1640 acondicionado, suplementado con suero fetal bovino 10% inactivado por calor, 4 mM de L-glutamina, 50 μ M 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM Hepes, 100 μ g / ml de penicilina y 100 μ g / ml de estreptomina. El desarrollo de los mastocitos fue confirmado por tinción con azul de toluidina. Los experimentos se realizaron después de 6-8 semanas de cultivo. Para activar los mMC a través de reticulación de IgE de la superficie celular de receptores, los mMC cultivados son inicialmente sensibilizados durante 90 minutos a 37°C (5% CO₂) con un anticuerpo IgE monoclonal de ratón anti-TNP (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.), utilizado como un 15% de sobrenadante de hibridoma. Las células se sometieron entonces a dos lavados con PBS y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 0.2 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) antes de que las células (0.5 mL de medio con 10x10⁶ células por mL) se activen por la adición de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) con una relación de acoplamiento de 9/1 (la concentración final de TNP-BSA fue de 100 ng / ml). La incubación (37°C/5% CO₂) con TNP-BSA fue de 24 horas. Antes de la incubación con TNP-BSA, algunas células se trataron / incubaron (37°C/5% CO₂) con los fármacos de ensayo pemirolast (sal de potasio adquirido de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, CA, EE.UU.) y / o rosuvastatina (extraído y purificado de Crestor [®] comercialmente disponible en tabletas y se aisló como sal de calcio como se describe en Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 5, No. 5, pp 437-444, 1997 mediante la adición de CaCl₂) 30 minutos antes de la adición de TNP-BSA (las soluciones stock de los fármacos se realizaron en solución salina estéril). Para comparación, algunos experimentos se realizaron sin los tratamientos farmacológicos. Después de las incubaciones con TNP-BSA, las muestras se centrifugaron a 4 ° C para sedimentar las células y los sobrenadantes se analizaron respecto al contenido de IFN- γ de ratón usando el BD [™] Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit de BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) (el kit se utiliza según las instrucciones del fabricante).

[0093] La concentración de IFN- γ en los sobrenadantes de mMC sin tratar estimuladas con TNP-BSA durante 24 horas (como anteriormente) fue de 1,80 \pm 0,24 pg / ml (media \pm sem, n = 8). La media correspondiente de valores de IFN- γ para las células tratadas con 3 μ M pemirolast, 30 μ M pemirolast, 3 μ M rosuvastatina o 30 μ M rosuvastatina (n = 2 para cada tratamiento) fueron de 2,00 pg / ml, 1,74 pg / ml, 2,26 pg / ml y 1,88 pg / ml, respectivamente. Así, el tratamiento con estas concentraciones de pemirolast o rosuvastatina solos no inhibió los niveles de IFN- γ (es decir, en comparación con las células no tratadas, 30 μ M redujo IFN- γ unos un 3%, mientras que los otros tres tratamientos aumentaron ligeramente IFN- γ). La combinación de pemirolast + rosuvastatina dependiente de la dosis y de forma sinérgica reduce los niveles de IFN- γ . Así, la media de las concentraciones de IFN- γ para mMC tratados con combinaciones de 3 μ M pemirolast + 3 μ M rosuvastatina o 30 μ M pemirolast + 30 μ M rosuvastatina (n = 2 para cada tratamiento) fueron 1,58 pg / ml y 0,55 pg / ml, respectivamente (es decir, 12,3% y 69,4% de inhibición, respectivamente, en comparación con los controles no tratados).

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

[0094] Las células de los macrófagos de línea celular humana MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) se cultivaron (37 ° C CO₂ / 5%) en medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio 1 mM, 1 x aminoácidos no esenciales, 1-100 μ g / mL de insulina, 1 mM de ácido oxalacético, 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g / mL de estreptomina y suero bovino fetal 10% (v / v). Al inicio del experimento, las células MM6 se sembraron en placas de 96 de pocillos a una densidad de 1x10⁵ células / ml (100 μ l por pocillo). La proliferación de las células MM6 se midió usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suecia) o por recuento de células usando un microscopio. El reactivo WST-1 está diseñado para ser utilizado para la cuantificación espectrofotométrica de por ejemplo el crecimiento celular en ensayos de proliferación y se utilizó según las instrucciones de los fabricantes. La longitud de onda para la medición de absorbancia fue 450 nm y la absorbancia de todas las células de control no tratadas expuestas al reactivo WST-1 fue de entre 1.0 y 2.5. Las soluciones stock de pemirolast (sal de potasio; véase el Ejemplo 19 anterior) y rosuvastatina (sal de sodio, véase el Ejemplo 19 anterior) se realizaron en solución salina estéril.

[0095] El número de células MM6 sin tratar MM6 se incrementó de 1x10⁵ células / ml en el inicio del experimento a 1.4 x 10⁵ \pm 0.06 x 10⁵ células / ml y 2.3 x 10⁵ \pm 0.10 x 10⁵ células / ml después de 24 y 48 horas, respectivamente (valores medios \pm sem, n = 4 para cada uno de los tres puntos de tiempo). Los efectos de pemirolast y / o rosuvastatina (añadido en el inicio de los experimentos) sobre la proliferación de células MM6 se estudiaron 48 horas después del inicio de los experimentos usando el reactivo WST-1 descrito anteriormente.

[0096] El tratamiento de las células MM6 con rosuvastatina a una concentración final de 10 μ M, 30 μ M o 100 μ M dio como resultado dependiente de la dosis 16.6%, 22.7% y 66.9%, respectivamente, de inhibición de la proliferación de MM6 (valores medios, n = 5 para cada concentración). En contraste, el tratamiento de las células MM6 con pemirolast a una concentración final de 100 μ M dio lugar a una insignificante media de 9.4% de inhibición de la

proliferación (n = 5) (10 μ M de pemirolast tuvo un efecto muy similar a la de 100 μ M de pemirolast, n = 5, datos no mostrados). Cuando las células MM6 se trataron con pemirolast 100 μ M en presencia de 10 mM, 30 μ M o 100 μ M de rosuvastatina, 100 μ M de pemirolast provocó una inhibición sinérgica de 17.4%, 26.3% y 44.9%, respectivamente, de proliferación de MM6 en comparación con el tratamiento con 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M, respectivamente, de rosuvastatina sola (valores medios, n = 5 para cada una de las tres combinaciones).

Ejemplo 21

Inhibición de la proliferación de macrófagos por Pemirolast y Atorvastatina

[0097] El procedimiento descrito en el Ejemplo 20 se repitió para atorvastatina (sal de sodio; recibido como atorvastatina cálcica como regalo de Biocon, Ltd., Bangalore, India) y convertida en sal de sodio en primer lugar por conversión de la sal de calcio en el ácido libre mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso y, a continuación, después de aislamiento por extracción, por adición de un equivalente de NaOH acuoso).

[0098] El tratamiento de las células MM6 con atorvastatina a una concentración final de 10 μ M, 30 μ M o 100 μ M dio como resultado dependiente de la dosis 19.9 %, 27.0 % y 54.4 %, respectivamente, la inhibición de la proliferación de MM6 (valores medios, n = 5 para cada concentración). En contraste, el tratamiento de las células MM6 con pemirolast (sal de potasio) a una concentración final de 100 μ M dio lugar a una insignificante media de 9.4% de inhibición de la proliferación (n = 5) (10 μ M de pemirolast tuvo un efecto muy similar a el de 100 μ M de pemirolast, n = 5, datos no mostrados). Cuando las células MM6 se trataron con pemirolast 100 μ M en presencia de 100 μ M de atorvastatina, 100 μ M de pemirolast provocó una inhibición sinérgica de 30.2 % (valor medio n = 5), de proliferación de MM6 en comparación con el tratamiento con atorvastatina 10 μ M sola. En presencia de 30 μ M de atorvastatina, 100 pemirolast μ M inhibió la proliferación en un 7.6% (valor medio, n = 5), y en presencia de atorvastatina 10 μ M, 100 μ M pemirolast no inhibió la proliferación (n = 5, datos no mostrados).

Ejemplo 22

Inhibición de peritonitis zymosan-inducida en ratón por Pemirolast y Atorvastatina

[0099] Cinco grupos de 5-7 ratones exogámicos machos NMRI (Scanbur AB, Sollentuna, Suecia) con un peso 32-37 g se utilizaron para estudiar la inflamación peritoneal (peritonitis) causada por inyección intraperitoneal (ip) de 1 mg zymosan A (zymosan, Sigma-Aldrich) en 0.5 mL de PBS estéril (sonicado y bien mezclado). 24 horas antes y 90 minutos antes de la inyección ip de zymosan, dos grupos de animales fueron tratados con 0.35 mg de atorvastatina de sodio (véase el Ejemplo 21 anterior). La inyección de atorvastatina se administró 24 horas antes de que zymosan se administrara ip y la inyección de atorvastatina se administró 90 minutos antes de que zymosan se administrara por vía subcutánea. Antes de la inyección, la atorvastatina se disolvió a 1 mg / ml en PBS estéril mediante sonicación y calentamiento según sea necesario. Dos grupos de los animales (uno de los cuales había sido pretratado con atorvastatina como anteriormente) fueron tratados con 0.5 mg pemirolast (sal de potasio comprado de American Custom Chemicals Corporation, San Diego, CA, EE.UU.) administrado ip junto con zymosan (es decir, pemirolast se disolvió a 1 mg / ml en la solución de zymosan 2 mg / ml en PBS). 5 horas después de la inyección de zymosan, los animales fueron sacrificados y las cavidades peritoneales inflamadas lavadas con 1.5 ml de PBS enfriado en hielo con 3 mM EDTA (después de la inyección ip del líquido de lavado, el abdomen se masajó suavemente durante 30 segundos antes de abrir cavidad abdominal y recoger aproximadamente 1 ml de fluido). El número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) por ml de líquido de lavado se contaron mediante microscopía de luz (usando criterios morfológicos estándar) después de teñir los núcleos con solución de Türk. El líquido de lavado de las cavidades peritoneales no inflamadas de los animales no tratados proporcionan los niveles basales de leucocitos PMN.

[0100] Como se muestra en la Figura.1 (valores medios \pm eem), casi no había leucocitos PMN peritoneales en los animales que no se estimularon ip con zymosan (basales, n = 5). 5 horas después de la inyección ip de zymosan, por otro lado, había una acumulación inflamatoria pronunciada de leucocitos PMN en la cavidad peritoneal de los animales que no habían sido tratados con pemirolast o atorvastatina (sin tratar, n = 7).

[0101] En los animales tratados con pemirolast solo (Pemirolast, n = 6), la acumulación inducida por zymosan de leucocitos PMN se redujo ligeramente (un 10.1%; NB en este grupo, se considera un animal como sin respuesta y se eliminó del análisis. En este animal, la acumulación de leucocitos PMN 5 horas después de la inyección de zymosan fue sólo 8.4% de la media de acumulación de leucocitos PMN de los otros 6 animales tratados con pemirolast estimulados con zymosan ip. Incluir o excluir este animal sin respuesta en el análisis no cambia la conclusión siguiente).

[0102] En los animales tratados con atorvastatina sola (Atorva, n = 5), la acumulación de leucocitos PMN se redujo también hasta cierto punto (un 25.9%).

[0103] Sin embargo, en los animales tratados con ambos pemirolast y atorvastatina (Pemirolast + Atorva, n = 5), la acumulación inducida por zymosan de leucocitos PMN se redujo en un 61.5% sinérgicamente. Así, mientras que el tratamiento con pemirolast solo sólo redujo la acumulación inducida por zymosan de leucocitos PMN un 10.1% en comparación con los animales no tratados, la acumulación inducida por zymosan de leucocitos PMN en los

animales tratados con pemirolast en presencia de tratamiento con atorvastatina se redujo en un 48.0% en comparación con el tratamiento con atorvastatina sola.

- 5 [0104] Uno o más de los ejemplos descritos anteriormente demuestran un claro efecto sinérgico de la combinación de pemirolast y la estatina relevante (rosuvastatina o atorvastatina). Tales combinaciones son por lo tanto potencialmente útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios, incluyendo la aterosclerosis y enfermedades relacionadas

REIVINDICACIONES

1. Un producto de combinación que comprende:
 - (a) pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, 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.
2. Un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, que comprende una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; 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, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Un producto de combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, que comprende un kit de partes que comprende componentes:
 - (A) una formulación farmacéutica que incluye pemirolast, o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, mezclado con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y
 - (B) una formulación farmacéutica que incluye una estatina seleccionada entre rosuvastatina, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable y atorvastatina, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, mezclada con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,
 cuyos componentes (A) y (B) se proporcionan cada uno en una forma que es adecuada para la administración conjunta con el otro.
4. Un método para fabricar un kit de partes como se define en la Reivindicación 3, cuyo método comprende poner un componente (A) en asociación con un componente (B) haciendo así a los dos componentes adecuados para la administración conjunta de cada uno con el otro.
5. Un kit de partes que comprende:
 - (I) uno de los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 3; junto con
 - (II) instrucciones para usar ese componente de forma conjunta con el otro de los dos componentes.
6. Un producto de combinación como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o 5, en el que la estatina no se emplea en forma de una estatina lactona.
7. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 3 o la Reivindicación 5 (como dependiente de la Reivindicación 3), en el que los componentes (A) y (B) son adecuados un uso secuencial, separado y / o simultáneo en el tratamiento de una trastorno inflamatorio.
8. El uso de un producto de combinación como se ha definido en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, 5 o 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
9. Un producto de combinación como se ha definido en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, 5 o 6, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
10. El uso de los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 3, o la Reivindicación 7 (como dependiente de la Reivindicación 3), para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo procedimiento comprende administrar dichos componentes (A) y (B) a un paciente conjuntamente uno con otro en una terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio.
11. Los componentes (A) y (B) como se define en la Reivindicación 3, o la Reivindicación 7 (como dependiente de la Reivindicación 3) para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cuyo tratamiento comprende administrar dichos componentes (A) y (B) a un paciente en conjunción entre sí en terapia de combinación para tratar el trastorno inflamatorio.
12. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 7, o un uso como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 11, en el que el trastorno se selecciona de migraña, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o colitis ulcerosa.
13. Un kit de partes como se reivindica en la Reivindicación 7, o un uso como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 11, donde el trastorno es aterosclerosis o un trastorno cardiovascular asociado.

14. Un kit de partes o el uso como se reivindica en la Reivindicación 13, en el que el trastorno es aterosclerosis.
15. Un kit de partes o uso como se reivindica en la Reivindicación 13, en el que el trastorno cardiovascular asociado con aterosclerosis se selecciona de un aneurisma de aorta, arteriosclerosis, enfermedad arterial oclusiva periférica, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad coronaria, ruptura y / o inestabilidad de la placa o ateroma, enfermedad vascular, enfermedad arterial, una enfermedad isquémica, isquemia y apoplejía.
- 5
16. Un kit de partes o el uso como se reivindica en la Reivindicación 15, en el que el trastorno cardiovascular es un aneurisma aórtico.
17. Un kit de partes o el uso como se reivindica en la Reivindicación 15, en el que la enfermedad de arteria coronaria se selecciona de angina de pecho, infarto de miocardio y ataque al corazón; la enfermedad coronaria se selecciona de una enfermedad cardíaca y una enfermedad del corazón, y / o la apoplejía se selecciona de accidente cerebrovascular y ataque isquémico transitorio.
- 10
18. Un kit de partes o uso como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 17, en el que el paciente tiene un síndrome coronario agudo.
19. Un producto de combinación como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, 5 a 7, o 11 a 18, un método como el reivindicado en la Reivindicación 4, o un uso como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 18, en el que la estatina es rosuvastatina , o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable
- 15
20. Un producto de combinación como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, 5 a 7, o 11 a 18, un método como el reivindicado en la Reivindicación 4, o un uso como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 18, en el que la estatina es atorvastatina , o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
- 20

Figura 1

