

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

06-37990

54. TITULO

UNA COMPOSICION FARMACEUTICA QUE COMPRENDE UNA COMBINACION DE
CANDESARTAN Y ROSUVASTATINA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K31/505, 31/4184, A61P9/10

71. SOLICITANTE

ASTRAZENECA UK LIMITED

DOMICILIO

LONDRES, INGLATERRA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 100.802



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-037880-00000-0000 Fax: 2008-04-21 16:11:21
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII Eya 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 40

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL : 26-04-2006

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ASTRAZENECA UK LIMITED

Dirección: 15 Stanhope Gate, London W1K 1LN
Inglaterra

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra

Lugar de Constitución: Inglaterra

Teléfono:

Fax

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Yay Lal Mehta

Dirección: University of Arkansas for Medical Sciences, 4301 W Markham, Slot 532, Little Rock,
AR 72205, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2004/004120 Fecha 22-09-2004

Publicación Internacional No. WO 2005/030215 A3 Fecha 07-04-2005

Título (54): UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE
CANDESARTAN Y ROSUVASTATINA

7 Clasificación Internacional (51) A61M31/505, 31/4184, A61P9/10

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de
Origen

GB

(32) Fecha

26-09-2003

(31) Número de Solicitud

0322552.1

9 Comprobante de pago No. 06-24.270

Fecha 20-04-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

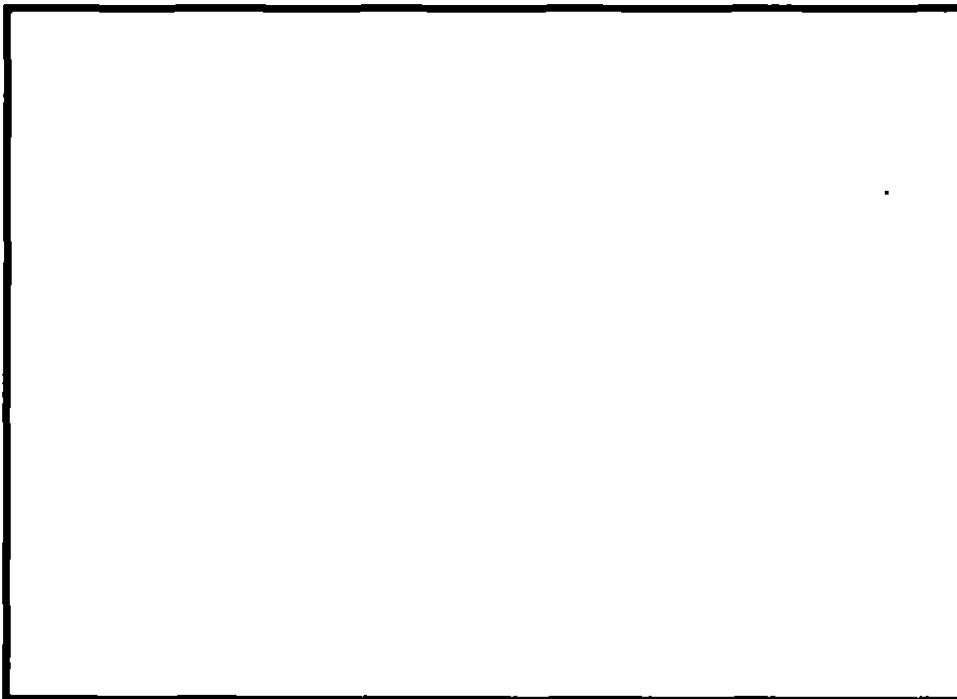
2020-F06 (01-11-15)

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$463.000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia Autenticada
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arie final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patentes o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

Juan Pablo Cadena Sarmiento
C.C. 80.410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-037880- -00000-0000 Fea: 2006-04-21 16:11:21
Dep. 2020 NULCREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYI Eya 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folcs: 40

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 24,270
FECHA : MARZO 28 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	44793612	27/03/2006	21,060,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

VAL: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

folio 4 TARGETER 2

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 April 2005 (07.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/030215 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/505,
31/4184

(21) International Application Number:
PCT/GB2004/004120

(22) International Filing Date:
22 September 2004 (22.09.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0322552.1 26 September 2003 (26.09.2003) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): AS-
TRAZENECA UK LIMITED (GB/GB); 15 Stanhope
Gate, London, Greater London W1K 1LN (GB).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): MEHTA, Jay, Lal
[US/US]; University of Arkansas for Medical Sciences,
4301 W Markham, Slot 532, Little Rock, AR 72205 (US).

(74) Agent: ASTRAZENECA; Global Intellectual Property,
S-151 85 Sodertalje (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: THERAPEUTIC TREATMENT

(57) Abstract: A combination comprising candesartan and rosuvastatin for the prevention or treatment of arteriosclerosis and for the prevention of cardiovascular events is described.

WO 2005/030215 A2

THERAPEUTIC TREATMENT

The present invention relates to a combination comprising candesartan and rosuvastatin.

5 The present invention further relates to pharmaceutical compositions comprising the combination mentioned hereinbefore. The present invention further relates to the use of a combination mentioned hereinbefore in the prevention or treatment of atherosclerosis.

10 Atherosclerosis is a condition mediated by complex pathological processes which result in irregularly distributed lipid deposits in the arteries and is a major contributory factor to coronary heart disease. A reduction in atherosclerosis is therefore a major target for reducing the number of cardiovascular events for example, myocardial infarction, worsening of angina, cardiac arrest, stroke, congestive heart failure and cardiovascular death.

15 Dyslipidemia, particularly increased plasma level of low-density lipoprotein (LDL) is one of the major risk factors in atherosclerosis. Clinical studies have demonstrated that reducing plasma LDL level with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors, commonly known as statins, results in a lower risk of cardiovascular events.

20 Activation of the renin-angiotensin system (RAS) may be considered another important risk factor in atherosclerosis. Activation of RAS with the formation of angiotensin (II) (A (II)) and the activation of A (II) receptors have been implicated in atherogenesis, plaque rupture, myocardial ischemic dysfunction and congestive heart failure (Singh and Mehta, Arch Intern Med, 2003, vol 163, 1296-1304).

25 International Patent Application WO 95/26188 discloses treatment of atherosclerosis with A(II) receptor blockers, optionally in combination with HMGCoA reductase inhibitors. International Patent Application WO 01/76573 discloses the use of a combination of at least two of an A(II) antagonist, an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitor and an HMGCoA reductase inhibitor for the prevention or delay of progression in a list of conditions, amongst which is atherosclerosis.

30 We have surprisingly found that the combination of the A(II) antagonist candesartan and the HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin has a synergistic effect in the reduction of atherosclerosis. This synergistic effect appears to arise from synergistic inhibition of expression of a number of inflammatory mediators involved in the RAS (for example CD40, metalloproteinases (MMPs)) and/or inhibition of the expression of the receptor LOX-1 (which

is a receptor for oxidised LDL on endothelial cells). The synergistic effect provides strong evidence for cross-talk between the RAS and dyslipidemia in atherogenesis.

It will be appreciated that the activity of MMPs may be regulated in-vivo by their tissue inhibitors (TIMPs). We have also shown that the expression of TIMP-1 and TIMP-2 is up-regulated by high-cholesterol diet, and markedly attenuated by the combination of candesartan and rosuvastatin. These data lend credence to the concept that the balance between MMPs and TIMPs is altered by high-cholesterol diet, and that this imbalance can be "normalized" by the combination of an A(II) antagonist and a lipid-lowering agent.

In one aspect of the invention is provided a combination comprising candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the prevention or treatment of atherosclerosis.

In one aspect of the invention is provided a combination comprising candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the prevention of cardiovascular events.

Such a combination may also be useful in the treatment or prevention of other diseases associated with these mediators, for example in inflammatory diseases or conditions, such as ischemia-reperfusion injury (to the heart, brain, kidneys, lungs and liver), radiation-induced injury, burn injury and peripheral vascular disease,

Candesartan may suitably be in the form of candesartan, or in the pro-drug form candesartan cilexetil. These forms may be formulated with a further agent such as a diuretic such as hydrochlorothiazide (for example, as marketed as Atacand Plus™).

Where herein candesartan is referred to, this includes both candesartan and candesartan cilexetil.

Preferably the calcium salt of rosuvastatin, which may be referred to as rosuvastatin calcium, is used in the various aspects of the present invention.

In general, pharmaceutically-acceptable salts include acid addition salts such as methanesulfonate, tosylate, α -glycerophosphate, fumarate, hydrochloride, citrate, maleate, tartrate and (less preferably) hydrobromide. Pharmaceutically-acceptable salts in general also include salts formed with phosphoric and sulfuric acid. Pharmaceutically-acceptable salts generally include base salts such as an alkali metal salt for example sodium, an alkaline earth metal salt for example calcium or magnesium, an organic amine salt for example triethylamine, morpholine, N-methylpiperidine, N-ethylpiperidine, procaine, dibenzylamine, N,N-dibenzylethylamine, tris-(2-hydroxyethyl)amine, tris(hydroxymethyl)methylammonium,

N-methyl d-glucamine and amino acids such as lysine. There may be more than one cation or anion depending on the number of charged functions and the valency of the cations or anions.

Herein, where the term "combination" is used it is to be understood that this refers to simultaneous, separate or sequential administration. In one aspect of the invention

5 "combination" refers to simultaneous administration. In another aspect of the invention "combination" refers to separate administration. In a further aspect of the invention "combination" refers to sequential administration. Where the administration is sequential or separate, the delay in administering the second component should be such that both agents are present in the body so as to produce the synergistic effect of the combination.

10 In a further aspect of the invention is provided a pharmaceutical composition which comprises candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier for use in the prevention or treatment of atherosclerosis.

15 In a further aspect of the invention is provided a pharmaceutical composition which comprises candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier for use in the prevention or reduction of risk of cardiovascular events.

The compositions described herein may be in a form suitable for oral administration, for example as a tablet or capsule, for parenteral injection (including intravenous, 20 subcutaneous, intramuscular, intravascular or infusion) for example as a sterile solution, suspension or emulsion, for topical administration for example as an ointment or cream, for rectal administration for example as a suppository or the route of administration may be by direct injection into the tumour or by regional delivery or by local delivery. In other embodiments of the present invention the compounds of the combination treatment may be 25 delivered endoscopically, intratracheally, intralesionally, percutaneously, intravenously, subcutaneously, intraperitoneally or intratumourally. In general the compositions described herein may be prepared in a conventional manner using conventional excipients or carriers that are well known in the art.

Suitable pharmaceutically-acceptable excipients or carriers for a tablet formulation 30 include, for example, inert excipients such as lactose, sodium carbonate, calcium phosphate or calcium carbonate, granulating and disintegrating agents such as corn starch or alginic acid; binding agents such as gelatin or starch; lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid or talc; preservative agents such as ethyl or propyl 4-hydroxybenzoate, and

anti-oxidants, such as ascorbic acid. Tablet formulations may be uncoated or coated either to modify their disintegration and the subsequent absorption of the active ingredient within the gastrointestinal tract, or to improve their stability and/or appearance, in either case using conventional coating agents and procedures well known in the art.

5 Compositions for oral use may be in the form of hard gelatin capsules in which the active ingredient is mixed with an inert solid excipient, for example, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules in which the active ingredient is mixed with water or an oil such as peanut oil, liquid paraffin or olive oil.

Candesartan is commercially available as 'Atacand™' and 'Atacand Plus™'.

10 Rosuvastatin calcium is commercially available as 'Crestor™'. Suitable formulations for the present invention include those which are commercially available.

Suitable dosages of each component of the combination are those of the marketed commercial products. Alternatively, the synergy between the components may allow a lower dosage of one or both components to be used. For example, a dose of 4mg, 8mg, 16mg,
15 32mg, or up to 160mg of candesartan in combination with a dose of 80mg, 40mg, 20mg, 10mg, 5mg or 2.5mg of rosuvastatin may be used. It will be understood that any one of the doses of candesartan may be combined with any suitable dose of rosuvastatin.

In one aspect, 80mg of rosuvastatin is used. In another aspect, 40mg of rosuvastatin is used. In a further aspect, 20mg of rosuvastatin is used. In a further aspect, 10mg of
20 rosuvastatin is used. In a further aspect, 5mg of rosuvastatin is used. In a further aspect, 2.5mg of rosuvastatin is used.

In one aspect, between 32 and 160mg, such as about 64 to 128mg, for example 64 to 112mg, such as about 64-96mg of candesartan is used. Conveniently, about 72mg of candesartan is used. In another aspect, 32mg of candesartan is used. In a further aspect, 16mg
25 of candesartan is used. In a further aspect, 8mg of candesartan is used. In a further aspect, 4mg of candesartan is used.

It will be appreciated that the pharmaceutical composition according to the present invention includes a composition comprising candesartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a
30 pharmaceutically-acceptable excipient or carrier. Such a composition, for example in a single oral formulation conveniently provides the therapeutic combination product of the invention for simultaneous administration in the prevention or treatment of atherosclerosis.

Preferably the two components of the combination are both administered orally.

Preferably the two components of the combination are administered as a single oral formulation.

Preferably the combination is formulated for once-a-day dosing.

Conveniently, the combination is formulated as a single tablet or capsule.

5 The dosages and schedules described hereinbefore may be varied according to the particular disease state and the overall condition of the patient. For example, it may be necessary or desirable to reduce the above-mentioned doses of the components of the combination treatment in order to reduce toxicity. Dosages and schedules may also vary if, in addition to a combination treatment of the present invention, one or more additional
10 chemotherapeutic agents are used. Scheduling can be determined by the practitioner who is treating any particular patient using his professional skill and knowledge.

A pharmaceutical composition according to the present invention also includes separate compositions comprising a first composition comprising candesartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically-acceptable excipient or
15 carrier, and a second composition comprising rosuvastatin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically-acceptable excipient or carrier. Such a composition conveniently provides the therapeutic combination of the invention for sequential or separate administration in the synergistic prevention or treatment of atherosclerosis but the separate compositions may also be administered simultaneously.

20 In another aspect of the invention there is provided a combination comprising candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use as a medicament for the prevention or treatment of atherosclerosis.

In another aspect of the invention there is provided a combination comprising
25 candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use as a medicament for the prevention of cardiovascular events.

In another aspect of the invention there is provided a combination comprising
30 candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the manufacture of a medicament.

In another aspect of the invention there is provided a combination comprising candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a

pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of atherosclerosis.

In another aspect of the invention there is provided a combination comprising candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the manufacture of a medicament for the prevention of cardiovascular events.

In a further aspect of the invention there is provided a method of preventing or treating atherosclerosis in a warm-blooded animal, such as man, which comprises administering a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a further aspect of the invention there is provided a method of preventing cardiovascular events in a warm-blooded animal, such as man, which comprises administering a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

According to a further aspect of the present invention there is provided a kit comprising a combination of candesartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and rosuvastatin; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, optionally with instructions for use in the prevention or treatment of atherosclerosis.

According to a further aspect of the present invention there is provided a kit comprising:

- a) candesartan in a first unit dosage form;
- b) rosuvastatin in a second unit dosage form; and
- c) container means for containing said first and second dosage forms; and optionally
- d) with instructions for use in the prevention or treatment of atherosclerosis.

According to another aspect of the present invention there is provided a method of inhibiting expression of CD40 and/or metalloproteinases (MMPs) by administering a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Particular metalloproteinases are MMP-1, MMP-2 and MMP-9.

According to another aspect of the present invention there is provided a method of treating atherosclerotic patients by inhibition of expression of CD40 and/or metalloproteinases (MMPs) by administering an amount of a combination of candesartan, or a

pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof suitable for inhibition of expression of CD40 and/or metalloproteinases (MMPs).

According to a further aspect of the invention, there is provided a method for normalizing the balance between MMPs and TIMPS by administration of an amount of a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

According to another aspect of the present invention there is provided a method of inhibiting expression of LOX-1 by administering a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

According to another aspect of the present invention there is provided a method of treating atherosclerotic patients by inhibition of expression of LOX-1 by administering an amount of a combination of candesartan, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof suitable for inhibition of expression of LOX-1.

Materials and Methods

Animal Model

Five pairs of C57BL/6J mice and three pairs of homozygous apo-E knockout mice (on C57BL/6J background) were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). They were bred by brother-sister mating and housed in a room lit from 6:00 AM to 6:00 PM and kept at 21°C. The C57BL/6J mice (n=10) were continued on regular diet for the entire study period. The apo-E knockout mice were divided into four groups. Group 1 (n=10) animals were given high-cholesterol diet (1% cholesterol) alone for 12 weeks since the age of 6 weeks; Group 2 (n=10) animals were given high-cholesterol diet with candesartan (1mg/kg/d) for 12 weeks since the age of 6 weeks; Group 3 (n=10) animals were given high-cholesterol diet with the rosuvastatin (1mg/kg/d) for 12 weeks since the age of 6 weeks; Group 4 (n=10) animals were given high-cholesterol diet with candesartan (1mg/kg/d) and rosuvastatin (1mg/kg/d) for 12 weeks since the age of 6 weeks.

At the end of 12-week-treatment, the mice were sacrificed and subject to studies described below. All experimental procedures were performed in accordance with protocols approved

by the Institutional Animal Care and Usage Committee of University of Arkansas for Medical Sciences.

Quantitative Analysis of Atherosclerotic Plaques

At the end of 12-week-treatment, 5 mice from each group were euthanized and the aortas were separated from surrounding tissues. After removal of the adventitial fat tissue, the aortas were opened longitudinally from the aorta arch to the iliac bifurcation, and fixed in 10% formalin for 24 hours. Then the aortas were rinsed in 70% alcohol briefly, stained with Sudan IV solution for 15 minutes, differentiated in 80% alcohol for 20 minutes and washed in running water for 1 hour (Russell L. Techniques for studying atherosclerotic lesion, Lab Invest. 1958; 7:42-47). The aortas were mounted and their pictures were taken with a camera connected to a dissection microscope. The images were analyzed by soft ware (Image Pro Plus, Media Cybernetics).

RNA Preparation and Analysis by RT-PCR

At the end of 12-week-treatment, 5 mice from each group were euthanized and the aortas (from aorta arch to iliac bifurcation) were separated from surrounding tissues and stored on dry ice. Each aorta was cut into four segments, two of which were used to extract total RNA with the single-step acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method as described earlier (27). One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA with oligo-dT (Promega, Madison, WI, U.S.A.) and Maloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcription (Promega) at 42°C for 1 hour. Two microliters of reverse transcription (RT) material was amplified with Taq DNA polymerase (Promega) and a primer pair specific to mouse LOX-1, CD40 or MMPs (MMP-1, -2, -9). For mouse LOX-1, forward primer: 5'-TTACTCTCCATGGTGGTGCC-3', reverse primer: 5'-AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC-3' were used. 30 cycles of polymerase chain reaction (PCR) were performed at 94°C for 40 seconds (denaturation), 55°C for 1 minute (annealing), and 72°C for 1 minute (extension). The size of polymerase chain reaction (PCR) product was 193 base pairs. For mouse CD40, forward primer 5'-GTTTAAAGTCCCGGATGCGA-3' and reverse primer 5'-CTCAAGGCTATGCTGTCTGT-3' were used. 35 cycles of polymerase chain reaction (PCR) were performed at 94°C for 1 minute (denaturation), 55°C for 1 minute (annealing), and 72°C for 1 minute (extension). The size of PCR product was 408 base pairs. For mouse MMP-1, forward primer 5'-GGACTCTCCCATTCCTTAATGA T-3' and reverse primer 5'-

CCTCTTTCTGGATAACATCATCA AC-3' were used. For mouse MMP-2, forward primer 5'-ATCAAGGGGATCCAGGAGC-3' and reverse primer 5'-GCAGCGATGAAG ATGATAG-3' were used. For mouse MMP-9, forward primer 5'-AGTTTGGTGTGCGCGGAGCAC-3' and reverse primer 5'-

- 5 TACATGAGCGCTTCCGGCAC-3' were used. For all MMPs, 35 cycles of PCR were performed at 94°C for 1 minute (denaturation), 58°C for 1 minute (annealing), and 75°C for 1 minute (extension). The sizes of PCR product were 627, 718 and 753 base pairs, respectively. A primer pair specific to mouse β -actin was used as housekeeping gene (forward primer: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTTG-3', reverse primer: 5'-CACTGTGTTGGCATAGAGGTC-
10 3'). 30 cycles were used at 94°C for 30 seconds (denaturation), 55°C for 1 minute (annealing), and 72°C for 1 minute (extension). PCR product was 560 base pairs. The reverse transcription PCR (RT-PCR)-amplified sample was visualized on 1.5% agarose gel using ethidium bromide.

Protein Preparation and Analysis by Western Blot

- 15 Each mouse aorta was cut into four segments. Two of them were used to extract RNA, and the remaining two were used to extract protein as described previously (14). In brief, the aortic tissues were homogenized and lysed in lysis buffer, then centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. The lysate proteins from aortas (20 μ g/lane) were separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. After incubation in blocking solution
20 (5% non-fat milk, Sigma), membranes were incubated with 1:750 dilution monoclonal antibody to mouse LOX-1, 1:500 dilution polyclonal antibody to mouse CD40 (Santa Cruz), 1 μ g/ml dilution monoclonal antibody to mouse MMP-1 (Oncogene), 1 μ g/ml dilution monoclonal antibody to mouse MMP-2 (Oncogene), 1 μ g/ml dilution monoclonal antibody to mouse MMP-9 (Oncogene), 1:500 dilution polyclonal antibody to mouse TIMP-1 (Santa
25 Cruz), 1:500 dilution polyclonal antibody to mouse TIMP-2 (Santa Cruz), or 1:5000 dilution monoclonal antibody to mouse β -actin (Sigma) for overnight at 4°C. Membranes were washed and then incubated with 1:5000 dilution specific secondary antibody (Amersham Life Science) for 2 hours at room temperature, and the membranes were washed and detected with the ECL system (Amersham Life Science). The relative intensities of protein bands were
30 analyzed by Scan-gel-it software (Li DY, Zhang YC, Sawamura T, Mehta JL. Circ Res. 1999; 84:1043-1049).

Data Analysis

All data represent mean of duplicate samples. Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined in multiple comparisons among independent groups of data in which ANOVA and the F test indicated the presence of significant differences. A P value <0.05 was considered significant.

Results

The synergistic anti-atherosclerotic effect of candesartan and rosuvastatin

Compared with the control mice (C57BL/6J mice fed regular diet), the apo-E knockout mice fed high-cholesterol diet developed extensive atherosclerosis ($P < 0.01$ vs control mice). Although both candesartan and rosuvastatin alone decreased the extent of atherosclerosis ($p < 0.05$ vs high-cholesterol diet alone), the combination reduced atherosclerosis to a much greater extent ($P < 0.05$ vs candesartan or rosuvastatin alone plus high-cholesterol diet). Figure 1 shows results of representative experiments and the extent of atherosclerosis (mean $\pm$ SD) in different groups of animals.

Candesartan and rosuvastatin alone decreased atherosclerosis by about 35% and 25% respectively. The combination reduced atherosclerosis by 70%, demonstrating a synergistic effect. This effect is illustrated graphically in Figure 2.

The synergistic effect of candesartan and rosuvastatin on LOX-1 expression

In the control C57BL/6J mice, the expression of LOX-1 (mRNA and protein) was low. In contrast, LOX-1 expression (mRNA and protein) was markedly increased by high-cholesterol diet in apo-E knockout mice ($P < 0.01$ vs control mice). Both candesartan and rosuvastatin alone decreased the LOX-1 expression (mRNA and protein), albeit modestly ($P < 0.05$ vs high-cholesterol diet alone). The combination of candesartan and rosuvastatin had a dramatic inhibitory effect on the up-regulation of LOX-1 (mRNA and protein) in apo-E knockout mice ($P < 0.01$ vs high-cholesterol diet alone).

The synergistic effect of candesartan and rosuvastatin on CD40 expression

Compared with the expression in control C57BL/6J mice, CD40 expression (mRNA and protein) was markedly increased in apo-E knockout mice fed a high-cholesterol diet in ($P < 0.01$ vs control mice). Although candesartan and rosuvastatin treatment alone slightly

decreased CD40 expression ($P < 0.05$ vs high-cholesterol diet alone), the combination of candesartan and rosuvastatin had a dramatic inhibitory effect on the up-regulation of CD40 (mRNA and protein) in the apo-E knockout mice ($P < 0.01$ vs high-cholesterol diet alone).

The synergistic effect of candesartan and rosuvastatin on MMPs expression

5 Compared with the expression in control C57BL/6J mice, MMP-1, -2 and -9 expression (mRNA and protein) was markedly increased in high-cholesterol diet-fed apo-E knockout mice ($P < 0.01$ vs control mice). Both candesartan and rosuvastatin alone decreased MMP-1, -2 and -9 expression (mRNA and protein), albeit modestly ($P < 0.05$ vs high-cholesterol diet alone). The combination of candesartan and rosuvastatin had a dramatic
10 inhibitory effect on their expression ($P < 0.01$ vs high-cholesterol diet alone).

The effect of candesartan and rosuvastatin on TIMPs expression

TIMP-1 and TIMP-2 protein expression was also increased in apo-E knockout mice by high-cholesterol diet ($P < 0.01$ vs. control mice), but the increase was less than that of MMPs.
15 Both candesartan and rosuvastatin alone reduced TIMP-1 and TIMP-2 expression by a small degree ($P < 0.05$ vs. high-cholesterol diet alone), but the combination of candesartan and rosuvastatin had a greater inhibitory effect on their expression ($P < 0.01$ vs. high-cholesterol diet alone, $P < 0.05$ vs. high-cholesterol diet with candesartan or rosuvastatin).

Claims

1. A combination comprising candesartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof and rosuvastatin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for prevention or treatment of atherosclerosis.

5

2. A pharmaceutical composition which comprises a combination as claimed in Claim 1 in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier for use in the prevention or treatment of atherosclerosis.

10

3. A pharmaceutical composition which comprises a combination as claimed in Claim 1, in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier for use in the prevention of cardiovascular events.

15

4. A combination as claimed in Claim 1 for use in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of atherosclerosis.

5. A combination as claimed in Claim 1 for use in the manufacture of a medicament for the prevention of cardiovascular events.

20

6. A combination as claimed in Claim 1 for use as a medicament for the prevention or treatment of atherosclerosis.

7. A combination as claimed in Claim 1 for use as a medicament for prevention of cardiovascular events.

25

8. A method of preventing or treating atherosclerosis in a warm-blooded animal, such as man, which comprises administering a combination as claimed in Claim 1.

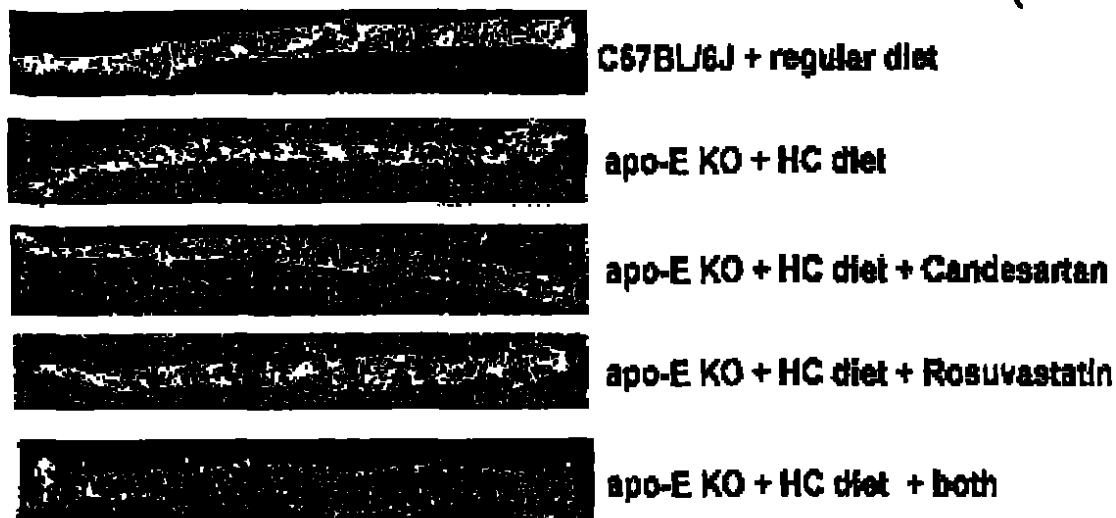
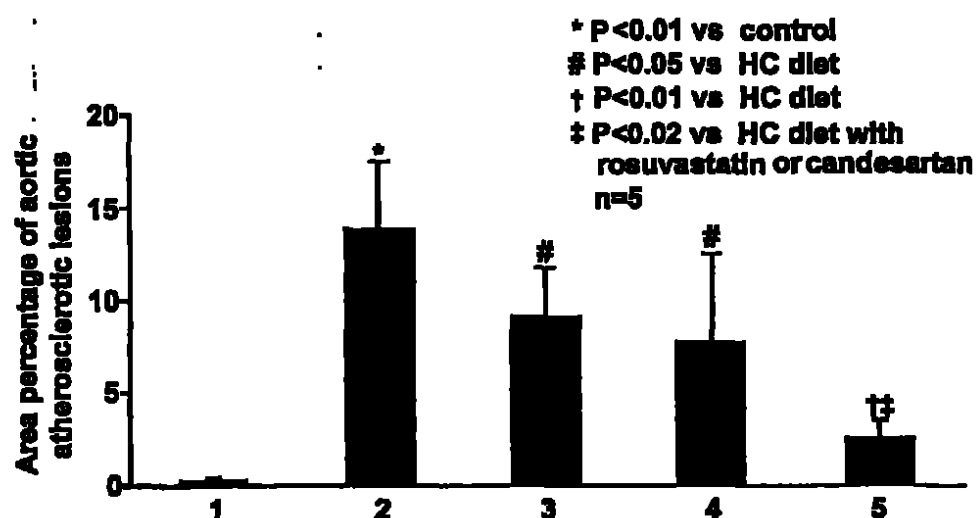
30

9. A method of preventing cardiovascular events in a warm-blooded animal, such as man, which comprises administering a combination as claimed in Claim 1.

10. A kit comprising a combination as claimed in Claim 1; optionally with instructions for use in the prevention or treatment of atherosclerosis.

11. A combination as claimed in Claim 1 wherein candesartan is in the form of candesartan cilexetil.

- 1/1 -

Figure 1**Figure 2**

1. Control mice fed with regular diet
2. Apo-E KO mice fed with HC diet
3. Apo-E KO mice fed with HC diet together with rosuvastatin
4. Apo-E KO mice fed with HC diet together with candesartan
5. Apo-E KO mice fed with HC diet together with rosuvastatin and candesartan

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 April 2005 (07.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/030215 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/505, 31/4184

(21) International Application Number:
PCT/GB2004/004120

(22) International Filing Date:
22 September 2004 (22.09.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0322552.1 26 September 2003 (26.09.2003) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): ASTRAZENECA UK LIMITED [GB/GB]; 15 Stanhope Gate, London, Greater London W1K 1LN (GB).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): MEHTA, Jay, Lal [US/US]; University of Arkansas for Medical Sciences, 4301 W Markham, Slot 532, Little Rock, AR 72205 (US).

(74) Agent: ASTRAZENECA; Global Intellectual Property, S-151 85 Sodertalje (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
2 June 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: THERAPEUTIC TREATMENT

(57) Abstract: A combination comprising candesartan and rosuvastatin for the prevention or treatment of arteriosclerosis and for the prevention of cardiovascular events is described.

WO 2005/030215 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB2004/004120A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/505 A61K31/4184

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHEN JIAWEI ET AL: "Marked upregulation of lipoxygenase-1, a receptor for ox-low-density lipoprotein in atherosclerosis, and its total ablation by candesartan and rosuvastatin given concurrently." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 43, no. 5 Supplement A, 3 March 2004 (2004-03-03), page 498A, XP002319611 & 53RD ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; NEW ORLEANS, LA, USA; MARCH 07-10, 2004 ISSN: 0735-1097 abstract ----- -/-	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 2005

Date of mailing of the international search report

18/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heller, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB2004/004120

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2004/096810 A (PFIZER LIMITED; BELL, ANDREW, SIMON; BROWN, DAVID, GRAHAM; FOX, DAVID,) 11 November 2004 (2004-11-11) claims 1-22	1-11
Y	EP 1 314 425 A (SANKYO COMPANY, LIMITED) 28 May 2003 (2003-05-28) page 1, paragraph 1	1-11
Y	WO 95/26188 A (MERCK & CO., INC; NELSON, EDWARD, B; SWEET, CHARLES, S) 5 October 1995 (1995-10-05) page 1, lines 6-16 claim 1	1-11
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2002, no. 09, 4 September 2002 (2002-09-04) & JP 2002 145770 A (SANKYO CO LTD), 22 May 2002 (2002-05-22) abstract	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB2004/004120

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004096810 A	11-11-2004	WO 2004096810 A1 NL 1026074 A1 US 2005043325 A1	~~11-11-2004~~ ~~01-11-2004~~ 24-02-2005
EP 1314425 A	28-05-2003	AU 8441301 A CA 2420844 A1 EP 1314425 A1 US 2003181500 A1 WO 0217913 A1 JP 2002145770 A	13-03-2002 28-02-2003 28-05-2003 25-09-2003 07-03-2002 22-05-2002
WO 9526188 A	05-10-1995	AU 696868 B2 AU 2127995 A CA 2186606 A1 EP 0754042 A1 JP 9510973 T WO 9526188 A1 US 5663186 A US 5663187 A	17-09-1998 17-10-1995 05-10-1995 22-01-1997 04-11-1997 05-10-1995 02-09-1997 02-09-1997
JP 2002145770 A	22-05-2002	AU 8441301 A CA 2420844 A1 EP 1314425 A1 WO 0217913 A1 US 2003181500 A1	13-03-2002 28-02-2003 28-05-2003 07-03-2002 25-09-2003

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
7 de Abril de 2005 (07.04.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/030215 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes: A61K 31/505, 31/4184

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/GB2004/004120

(22) Fecha de Presentación Internacional:
22 de septiembre de 2004 (22.09.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
0322552.1 26 de septiembre de 2003 (26.09.2003) GB

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con
excepción de US): ASTRAZENECA UK LIMITED
[GB/GB]; 15 Stanhope Gate, London, Greater London
W1K 1LN (GB).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para USA únicamente):
MEHTA, Jay, Lal [US/US]; University of Arkansas for
Medical Sciences, 4301 W Markham, Slot 532, Little
Rock, AR 72205 (US).

(74) Agente: ASTRAZENECA; Global Intellectual Property,
S-151 85 Södertälje (SE)

(81) Países designados (a menos que se indique lo
contrario para cada clase de protección
disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados (a menos que se indique lo
contrario para cada clase de protección
disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eursiática
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda

(88) Fecha de publicación del Informe de búsqueda
Internacional:

2 de Junio de 2005

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase
a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que
aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín
Oficial PCT.

(54) Título: TRATAMIENTO TERAPÉUTICO

(57) Extracto: Se describe una combinación que comprende candesartán y rosuvastatina para la prevención o
tratamiento de arteriosclerosis y para la prevención de eventos cardiovasculares.

WO 2005/030215 A3

TRATAMIENTO TERAPÉUTICO

La presente invención se refiere a una composición que comprende candesartán y rosuvastatina.

La presente invención concierne además a composiciones farmacéuticas que comprenden la combinación mencionada anteriormente. La presente invención se relaciona también con el uso de una combinación mencionada anteriormente en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

La arteriosclerosis es una afección mediada por procesos patológicos complejos, que resultan en depósitos de lípidos distribuidos irregularmente en las arterias, y es un importante factor que contribuye a la cardiopatía isquémica. Por lo tanto, una reducción en la arteriosclerosis es un objetivo esencial para disminuir el número de acontecimientos cardiovasculares por ejemplo, infarto de miocardio, agravamiento de angina, paro cardíaco, apoplejía, insuficiencia cardíaca congestiva y muerte cardiovascular.

La dislipidemia, particularmente una concentración plasmática incrementada de lipoproteína de baja densidad (LDL), es uno de los principales factores de riesgo en la arteriosclerosis. Estudios clínicos han demostrado que la reducción de la concentración de LDL plasmática con inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa, comúnmente conocidas como estatinas, resulta en un menor riesgo de acontecimientos cardiovasculares.

La activación del sistema renina-angiotensina (RAS) puede considerarse otro importante factor de riesgo en la arteriosclerosis. La activación de RAS con la formación de angiotensina (II) (A (II)) y la activación de receptores A (II) han sido implicadas en la aterogénesis, ruptura de placas, disfunción isquémica de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva (Singh and Mehta, Arch Intern Med, 2003, vol 163, 1296-1304).

La Solicitud Internacional de Patente WO 95/26188 divulga el tratamiento de arteriosclerosis con bloqueadores de receptor A (II), opcionalmente en combinación con inhibidores de HMGCofA reductasa. La Solicitud Internacional de Patente WO 01/76573 divulga el uso de una

combinación de por lo menos dos de un antagonista A (II), un ~~inhibidor~~ de ACE (enzima convertidora de angiotensina) y un inhibidor de HMGCoA reductasa para la prevención o retraso de la evolución en un listado de afecciones, entre las cuales se encuentra la arteriosclerosis.

Sorpresivamente hemos descubierto que la combinación del antagonista A (II) candesartán y el inhibidor de HMG CoA rosuvastatina posee un efecto sinérgico en la reducción de la arteriosclerosis. Este efecto sinérgico parece surgir de la inhibición sinérgica de la expresión de un número de mediadores inflamatorios involucrados en el RAS (por ejemplo CD40, metaloproteinasas (MMPs)) y/o inhibición de la expresión del receptor LOX-1 (que es un receptor para LDL oxidada en células endoteliales). El efecto sinérgico aporta una fuerte evidencia de superposición ("*cross-talk*") entre el RAS y la dislipidemia en la aterogénesis.

Se observará que la actividad de MMPs puede regularse *in vivo* por sus inhibidores de tejido (TIMPs). Hemos demostrado asimismo que la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 se regula por incremento por una dieta de alto contenido de colesterol, y se atenúa apreciablemente por la combinación de candesartán y rosuvastatina. Estos datos sustentan el concepto de que el equilibrio entre MMPs y TIMPs se altera por una dieta de alto contenido de colesterol, y que este desequilibrio puede "normalizarse" por la combinación de un antagonista A (II) y un agente reductor de lípidos.

En un aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

En un aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para la prevención de acontecimientos cardiovasculares.

Tal combinación puede ser igualmente útil en el tratamiento o prevención de otras enfermedades asociadas con estos mediadores, por

ejemplo en enfermedades o afecciones inflamatorias, tales como lesión por isquemia-revascularización (al corazón, cerebro, riñones, pulmones e hígado), lesión inducida por radiación, lesión por quemaduras e insuficiencia venosa periférica.

El candesartán puede estar convenientemente en la forma de candesartán, o en la forma de profármaco candesartán cilexetil. Estas formas pueden formularse con un agente adicional como un diurético tal como hidroclorotiazida (por ejemplo, comercializada como Atacand Plus™).

Donde aquí se hace alusión al candesartán, éste incluye tanto el candesartán como el candesartán cilexetil.

Preferiblemente la sal de calcio de rosuvastatina, que puede designarse rosuvastatina cálcica, se emplea en los diferentes aspectos de la presente invención.

En general, sales de aceptación farmacéutica incluyen sales de adición de ácido tales como metanosulfonato, tosilato, α -glicerofosfato, fumarato, clorhidrato, citrato, maleato, tartrato y (menos preferiblemente) hidrobromuro. En igual forma, sales de aceptación farmacéutica incluyen sales formadas con ácido fosfórico y sulfúrico. Sales de aceptación farmacéutica incluyen generalmente sales básicas tales como una sal de metal alcalino por ejemplo sodio, una sal de metal alcalinotérreo por ejemplo calcio o magnesio, una sal de amina orgánica por ejemplo trietilamina, morfolina, N-metilpiperidina, N-etilpiperidina, procaína, dibencilamina, N,N-dibenciletilamina, tris-(2-hidroxietil)amina, tris (hidroximetil)metilamonio, N-metil d-glucamina y aminoácidos tales como lisina. Puede haber más de un catión o anión, dependiendo del número de funciones cargadas y la valencia de los cationes o aniones.

Aquí, donde se utiliza el término "combinación" hay que entender que éste se refiere a la administración simultánea, separada o consecutiva. En un aspecto de la invención, "combinación" se refiere a la administración simultánea. En otro aspecto de la invención "combinación" se refiere a la administración separada. En un aspecto adicional de la invención

"combinación" se refiere a la administración secuencial. Donde la administración es consecutiva o separada, la demora en administrar el segundo componente debe ser tal que ambos agentes estén presentes en el cuerpo de modo que produzcan el efecto sinérgico de la combinación.

En un aspecto adicional de la invención se provee una composición farmacéutica que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, en asociación con un diluyente o vehículo de aceptación farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

En un aspecto adicional de la invención se provee una composición farmacéutica que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, un diluyente o vehículo de aceptación farmacéutica para uso en la prevención o reducción del riesgo de acontecimientos cardiovasculares.

Las composiciones descritas aquí pueden estar en una forma apropiada para administración oral, por ejemplo como una tableta o cápsula, para inyección parenteral (incluidas intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o infusión) por ejemplo como una solución estéril, suspensión o emulsión, para administración tópica por ejemplo como un ungüento o crema, para administración rectal por ejemplo como un supositorio o la vía de administración puede ser por inyección directa en el tumor o por administración regional o por administración local. En otras incorporaciones de la presente invención los compuestos del tratamiento de combinación pueden administrarse por vía endoscópica, intratraqueal, intralesional, percutánea, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intratumoral. En general las composiciones descritas aquí pueden prepararse en una manera convencional utilizando excipientes convencionales o vehículos que son bien conocidos en el arte.

Excipientes apropiados de aceptación farmacéutica o vehículos para una formulación en tableta incluyen, por ejemplo, excipientes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes granulantes y desagregantes tales como almidón de maíz o ácido alginico;

agentes aglutinantes tales como gelatina o almidón; agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes preservantes tales como 4-hidroxibenzoato de etilo o propilo, y anti-oxidantes, tales como ácido ascórbico. Formulaciones en tableta pueden ser no cubiertas o recubiertas ya sea para modificar su desagregación y la absorción subsiguiente del ingrediente activo en el tubo digestivo, o para mejorar su estabilidad y/o apariencia, utilizando en cualquiera de los dos casos agentes de recubrimiento convencionales y procedimientos bien conocidos en el arte.

Composiciones para uso oral pueden estar en la forma de cápsulas de gelatina duras, en las cuales el ingrediente activo se mezcla con un excipiente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas, en las cuales el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

El candesartán se obtiene comercialmente como 'Atacand™' y 'Atacand Plus™'. La rosuvastatina cálcica se obtiene comercialmente como 'Crestor™'. Formulaciones apropiadas para la presente invención incluyen aquellas que se obtienen en el comercio.

Posologías apropiadas de cada componente de la combinación son aquellas de los productos comerciales existentes en el mercado. Alternativamente, la sinergia entre los componentes puede permitir una posología menor de uno o ambos componentes a utilizarse. Por ejemplo, puede usarse una dosis de 4mg, 8mg, 16mg, 32mg, o hasta 160mg de candesartán en combinación con una dosis de 80mg, 40mg, 20mg, 10mg, 5mg ó 2.5mg de rosuvastatina. Se entenderá que cualquiera de las dosis de candesartán puede combinarse con cualquier dosis apropiada de rosuvastatina.

En un aspecto, se usan 80mg de rosuvastatina. En otro aspecto, se emplean 40mg de rosuvastatina. En un aspecto adicional, se utilizan 20mg de rosuvastatina. En un aspecto adicional, se usan 10mg de rosuvastatina. En un aspecto adicional, se emplean 5mg de rosuvastatina. En un aspecto adicional, se utilizan 2.5mg de rosuvastatina.

En un aspecto, se usan entre 32 y 160mg, tal como alrededor de 64 a

128mg, por ejemplo 64 a 112mg, tal como alrededor de 64-96mg de candesartán. Convenientemente, se emplean alrededor de 72mg de candesartán. En otro aspecto, se utilizan 32mg de candesartán. En un aspecto adicional, se usan 16mg de candesartán. En un aspecto adicional, se utilizan 8mg de candesartán. En un aspecto adicional, se emplean 4mg de candesartán.

Se observará que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye una composición que comprende candesartán o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina o su sal de aceptación farmacéutica y un excipiente o vehículo de aceptación farmacéutica. Tal composición, por ejemplo en una formulación oral única ofrece convenientemente el producto de combinación terapéutica de la invención para administración simultánea en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

Preferiblemente los dos componentes de la combinación se administran ambos por vía oral.

Preferiblemente los dos componentes de la combinación se administran en una formulación oral única.

Preferiblemente la combinación se formula en una posología de una vez al día.

Convenientemente, la combinación se formula como una sola tableta o cápsula.

Las posologías y programas descritos anteriormente pueden variarse de acuerdo con la enfermedad particular y la condición general del paciente. Por ejemplo, puede ser necesario o deseable reducir las dosis ya mencionadas de los componentes del tratamiento de combinación con el fin de disminuir la toxicidad. Las posologías y programas pueden variar igualmente si, además de un tratamiento de combinación de la presente invención, se emplean uno o más agentes quimio-terapéuticos adicionales. La programación puede determinarse por el médico general que trata a cualquier paciente particular utilizando su habilidad y conocimiento profesionales.

Una combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención

incluye igualmente composiciones separadas que comprenden una primera composición que contiene candesartán o su sal de aceptación farmacéutica y un excipiente o vehículo de aceptación farmacéutica, y una segunda composición que contiene rosuvastatina o su sal de aceptación farmacéutica y un excipiente o vehículo de aceptación farmacéutica. Tal composición ofrece convenientemente la combinación terapéutica de la invención para administración consecutiva o separada en la prevención sinérgica o tratamiento de arteriosclerosis, aunque las composiciones separadas pueden administrarse también en forma simultánea.

En otro aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para uso como un medicamento para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

En otro aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para uso como un medicamento para la prevención de acontecimientos cardiovasculares.

En otro aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para uso en la manufactura de un medicamento.

En otro aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para uso en la manufactura de un medicamento para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

En otro aspecto de la invención se provee una combinación que comprende candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, para uso en la manufactura de un medicamento para la prevención de acontecimientos cardiovasculares.

En un aspecto adicional de la invención se provee un método de prevenir o tratar arteriosclerosis en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que comprende administrar una combinación de candesartán, o su sal de

aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica.

En un aspecto adicional de la invención se provee un método de prevenir acontecimientos cardiovasculares in un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que comprende administrar una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se provee un botiquín ("*a kit*") que comprende una combinación de candesartán o su sal de aceptación farmacéutica, y rosuvastatina; o su sal de aceptación farmacéutica, en forma opcional con instrucciones para uso en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se provee un botiquín que comprende:

- a) candesartán en una primera forma farmacéutica unitaria;
- b) rosuvastatina en una segunda forma farmacéutica unitaria; y
- c) medios de envase para contener dichas formas farmacéuticas primera y segunda; y, en forma opcional,
- d) con instrucciones para uso en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se provee un método de inhibir la expresión de CD40 y/o metaloproteinasas (MMPs) administrando una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica.

Metaloproteinasas particulares son MMP-1, MMP-2 y MMP-9.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se provee un método de tratar pacientes arterioscleróticos por inhibición de la expresión de CD40 y/o metaloproteinasas (MMPs), administrando una cantidad de una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, apropiados para inhibición de la expresión de CD40 y/o metaloproteinasas (MMPs).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se provee un método para normalizar el equilibrio entre MMPs y TIMPS mediante la

administración de una cantidad de una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se provee un método de inhibir la expresión de LOX-1, administrando una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se provee un método de tratar pacientes arterioscleróticos por inhibición de la expresión de LOX-1 administrando una cantidad de una combinación de candesartán, o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina, o su sal de aceptación farmacéutica, apropiados para inhibición de la expresión de LOX-1.

Materiales y Métodos

Modelo Animal

Cinco parejas de ratones C57BL/6J y tres parejas de ratones con inactivación del gen apo-E, homocigótico ("*homozygous apo-E knockout mice*") (sobre fondo C57BL/6J) se obtuvieron de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Se criaron por apareamiento hermano-hermana y se albergaron en un cuarto iluminado de 6:00 AM a 6:00 PM y se mantuvieron a 21°C. Los ratones C57BL/6J (n=10) continuaron a una dieta regular durante todo el período de estudio. Los ratones con inactivación del gen apo-E se dividieron en cuatro grupos. A los animales del Grupo 1 (n=10) se les administró una dieta de alto contenido de colesterol (1% colesterol) solo durante 12 semanas desde la edad de 6 semanas; a los animales del Grupo 2 (n=10) se les administró una dosis de alto contenido de colesterol con candesartán (1mg/kg/día) durante 12 semanas desde la edad de 6 semanas; a los animales del Grupo 3 (n=10) se les administró una dosis de alto contenido de colesterol con rosuvastatina (1mg/kg/día) durante 12 semanas desde la edad de 6 semanas; a los animales del Grupo 4 (n=10) se les administró una dieta de alto contenido de colesterol con candesartán (1mg/kg/día) y rosuvastatina (1mg/kg/día) durante 12 semanas desde la edad de 6 semanas.

Al final del tratamiento de 12 semanas, los ratones se sacrificaron y se sometieron a los estudios descritos a continuación. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos aprobados por El Comité Institucional de Cuidado y Utilización Animal de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas.

Análisis Cuantitativo y Placas Arterioscleróticas

Al final del tratamiento de 12 semanas, 5 ratones de cada grupo se sometieron a eutanasia y se separaron las aortas de los tejidos circundantes. Luego del retiro del tejido graso adventicio, las aortas se abrieron longitudinalmente del arco de la aorta a la bifurcación ilíaca, y se fijaron en 10% de formalina durante 24 horas. En seguida, las aortas se enjuagaron brevemente en 70% de alcohol, se tñeron con solución Sudan IV durante 15 minutos, se diferenciaron en 80% de alcohol durante 20 minutos y se lavaron en agua corriente durante 1 hora (Russell L. Techniques for studying atherosclerotic lesion, Lab Invest. 1958; 7:42-47). Las aortas se armaron y sus fotos se tomaron con una cámara conectada a un microscopio de disección. Las imágenes se analizaron mediante software (Image Pro Plus, Media Cybernetics).

Preparación de ARN y Análisis por RT-PCR

Al final del tratamiento de 12 semanas, 5 ratones de cada grupo se sometieron a eutanasia y se separaron las aortas (del arco de la aorta a la bifurcación ilíaca) de los tejidos circundantes y se almacenaron en hielo seco. Cada aorta se cortó en cuatro segmentos, dos de los cuales se usaron para extraer el ARN total con el método de paso único ácido-tiocinato de guanidinio-fenol-cloroformo como se describe previamente (27). Un micrograma de ARN total se sometió a transcriptasa inversa ("*was reverse transcribed*") en cADN con oligo-dT (Promega, Madison, WI, U.S.A.) y transcripción inversa (Promega) del virus de leucemia murina Maloney (M-MLV) a 42°C durante 1 hora. Dos microlitros de material de transcriptasa inversa (RT) se amplificó con Taq ADN polimerasa (Promega) y una pareja

25

de cebadores ("*a primer pair*") específico de LOX-1, CD40 ó MMPs (MMP-1, -2, -9) de ratón. Para LOX-1 de ratón, se utilizaron cebador primario: 5'-TTACTCTCCATGGTGGTGCC-3', cebador inverso: 5'-AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC-3'. Se llevaron a cabo 30 ciclos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) a 94°C durante 40 segundos (desnaturalización), 55°C durante 1 minuto (hibridación), y 72°C durante 1 minuto (extensión). El tamaño del producto de reacción en cadena de polimerasa (PCR) fue de 193 pares de bases. Para CD40 de ratón, se emplearon cebador primario 5'-GTTTAAAGTCCCGGATGCGA-3' y cebador inverso 5'-CTCAAGGCTATGCTGTCTGT-3'. Se realizaron 35 ciclos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) a 94°C durante 1 minuto (desnaturalización), 55°C durante 1 minuto (hibridación), y 72°C durante 1 minuto (extensión). El tamaño del producto PCR fue de 408 pares de bases. Para MMP-1 de ratón, se usaron cebador primario 5'-GGACTCTCCCATTCTTAATGA T-3' y cebador inverso 5'-CCTCTTTCTGGATAACATCATCA AC-3'. Para MMP-2 de ratón, se emplearon cebador primario 5'-ATCAAGGGGATCCAGGAGC-3' y cebador inverso 5'-GCAGCGATGAAGATGATAG-3'. Para MMP-9 de ratón, se utilizaron cebador primario 5'-AGTTTGGTGTGCGGAGCAC-3' y cebador inverso 5'-TACATGAGCGCTTCCGGCAC-3'. Para todas las MMPs, se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR a 94°C durante 1 minuto (desnaturalización), 58°C durante 1 minuto (hibridación), y 75°C durante 1 minuto (extensión). Los tamaños del producto PCR fueron de 627, 718 y 753 pares de bases, respectivamente. Una pareja de cebadores específica de la β -actina de ratón se utilizó como gen guardián ("*housekeeping gene*") (cebador primario: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTTG-3', cebador inverso: 5'-CACTGTGTTGGCATAGAGGTC-3'). Se utilizaron 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 55°C durante 1 minuto (hibridación), y 72°C durante 1 minuto (extensión). El producto PCR fue de 560 pares de bases. La muestra amplificada por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) se visualizó en 1.5% de gel de agarosa usando bromuro de etidio.

Preparación de Proteínas y Análisis por Inmunotransferencia ("Western Blot")

La aorta de cada ratón se cortó en cuatro segmentos. Dos de ellos se emplearon para extraer ARN, y los dos restantes se usaron para extraer proteína como se describe previamente (14). En síntesis, los tejidos aórticos se homogeneizaron y disolvieron en tampón de lisis, luego se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas del lisado de aortas (20 µg/pista) se separaron por 10% SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Luego de la incubación en solución bloqueadora (5% de leche sin grasa, Sigma), las membranas se incubaron con anticuerpo monoclonal en dilución 1:750 a LOX-1 de ratón, anticuerpo policlonal en dilución 1:500 a CD40 de ratón (Santa Cruz), anticuerpo monoclonal en dilución 1µg/ml a MMP-1 de ratón (Oncogene), anticuerpo monoclonal en dilución 1µg/ml a MMP-2 de ratón (Oncogene), anticuerpo monoclonal en dilución 1µg/ml a MMP-9 de ratón (Oncogene), anticuerpo policlonal en dilución 1:500 a TIMP-1 de ratón (Santa Cruz), anticuerpo policlonal en dilución 1:500 a TIMP-2 de ratón (Santa Cruz), o anticuerpo monoclonal en dilución 1:5000 a β-actina de ratón (Sigma) de un día para otro a 4°C. Las membranas se lavaron y luego se incubaron con anticuerpo secundario específico en dilución 1:5000 (Amersham life Science) durante 2 horas a temperatura de la sala, y las membranas se lavaron y detectaron con el sistema ECL (Amersham life Science). Las intensidades relativas de bandas de proteína se analizaron por software Scan-gel-it (Li DY, Zhang YC, Sawamura T, Mehta JL. Circ Res. 1999; 84:1043-1049).

Análisis de los Datos

Todos los datos representan la media de muestras duplicadas. Los datos se presentan como media ± SD. La significación estadística se determinó en comparaciones múltiples entre grupos independientes de datos en los cuales ANOVA y la prueba F indicaban la presencia de diferencias significativas. Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo.

Resultados

El efecto anti-arteriosclerótico sinérgico de candesartán y rosuvastatina

Comparados con los ratones de control (ratones C57BL/6J alimentados con una dieta regular), los ratones con inactivación del gen apo-E, alimentados con una dieta alta en colesterol, desarrollaron arteriosclerosis extensiva ($p < 0.01$ vs ratones de control). Aunque el candesartán y la rosuvastatina solas disminuyeron la magnitud de la arteriosclerosis ($p < 0.05$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola), la combinación redujo la arteriosclerosis en una magnitud mucho mayor ($p < 0.05$ vs candesartán o rosuvastatina sola más dieta de alto contenido de colesterol). Figura 1 muestra los resultados de experimentos representativos y la magnitud de la arteriosclerosis (media $\pm$ SD) en diferentes grupos de animales.

El candesartán y la rosuvastatina solos disminuyeron la arteriosclerosis en alrededor de 35% y 25% respectivamente. La combinación redujo la arteriosclerosis en 70%, demostrando un efecto sinérgico. Este efecto se ilustra gráficamente en Figura 2.

El efecto sinérgico del candesartán y la rosuvastatina sobre la expresión de LOX-1

En los ratones C57BL/6J de control, la expresión de LOX-1 (mARN y proteína) fue baja. En contraste, la expresión de LOX-1 (mARN y proteína) se incrementó notoriamente por la dieta de alto contenido de colesterol en ratones con inactivación del gen apo-E ($p < 0.01$ vs ratones de control). Tanto el candesartán como la rosuvastatina solos disminuyeron la expresión de LOX-1 (mARN y proteína), si bien modestamente ($p < 0.05$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola). La combinación de candesartán y rosuvastatina tuvo un efecto inhibitor dramático sobre la regulación por incremento de LOX-1 (mARN y proteína) en ratones con inactivación del gen apo-E ($p < 0.01$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola).

El efecto sinérgico del candesartán y la rosuvastatina sobre la expresión de

23

CD40

Comparada con la expresión en los ratones C57BL/6J de control, la expresión de CD40 (mARN y proteína) se incrementó notoriamente en ratones con inactivación del gen apo-E, alimentados con una dieta de alto contenido de colesterol ($p < 0.01$ vs ratones de control). Aunque el tratamiento con candesartán y rosuvastatina solos disminuyó ligeramente la expresión de CD40 ($p < 0.05$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola), la combinación de candesartán y rosuvastatina tuvo un efecto inhibitor dramático sobre la regulación por incremento de CD40 (mARN y proteína) en los ratones con inactivación del gen apo-E ($p < 0.01$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola).

El efecto sinérgico del candesartán y la rosuvastatina sobre la expresión de MMPs

Comparada con la expresión en ratones C57BL/6J de control, la expresión de MMP-1, -2 y -9 (mARN y proteína) se incrementó notoriamente en ratones con inactivación del gen apo-E, alimentados con una dieta de alto contenido de colesterol ($p < 0.01$ vs ratones de control). Tanto el candesartán como la rosuvastatina solos disminuyeron la expresión de MMP-1, -2 y -9 (mARN y proteína), si bien modestamente ($p < 0.05$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola). La combinación de candesartán y rosuvastatina tuvo un efecto inhibitor dramático sobre su expresión ($p < 0.01$ vs dieta de alto contenido de colesterol sola).

El efecto de candesartán y rosuvastatina sobre la expresión de TIMPs

La expresión de la proteína TIMP-1 y TIMP-2 se incrementó asimismo en ratones con inactivación del gen apo-E por una dieta de alto contenido de colesterol ($p < 0.01$ vs. ratones de control), pero el aumento fue inferior al de MMPs. Tanto el candesartán como la rosuvastatina solos redujeron la

expresión de TIMP-1 y TIMP-2 en pequeño grado ($p < 0.05$ vs. dieta de alto contenido de colesterol sola), pero la combinación de candesartán y rosuvastatina tuvo un efecto inhibitor mayor sobre su expresión ($p < 0.01$ vs. dieta de alto contenido de colesterol sola, $p < 0.05$ vs. dieta de alto contenido de colesterol con candesartán o rosuvastatina).

38

Reivindicaciones

1. Una combinación que comprende candesartán o su sal de aceptación farmacéutica y rosuvastatina o su sal de aceptación farmacéutica para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.
2. Una composición farmacéutica que comprende una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, en asociación con un diluyente o vehículo de aceptación farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.
3. Una composición farmacéutica que comprende una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, en asociación con un diluyente o vehículo de aceptación farmacéutica para uso en la prevención de acontecimientos cardiovasculares.
4. Una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, para uso en la manufactura de un medicamento para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.
5. Una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, para uso en la manufactura de un medicamento para la prevención de acontecimientos cardiovasculares.
6. Una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, para uso como un medicamento para la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.
7. Una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, para uso como un medicamento para prevención de acontecimientos cardiovasculares.
8. Un método de tratar o prevenir arteriosclerosis en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que comprende administrar una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1.



9. Un método de prevenir acontecimientos cardiovasculares en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que comprende administrar una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1.

10. Un botiquín que comprende una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1; opcionalmente con instrucciones para uso en la prevención o tratamiento de arteriosclerosis.

11. Una combinación como se reivindica en la Reivindicación 1, en donde el candesartán está en la forma de candesartán cilexetil.

37

32

Figura 1

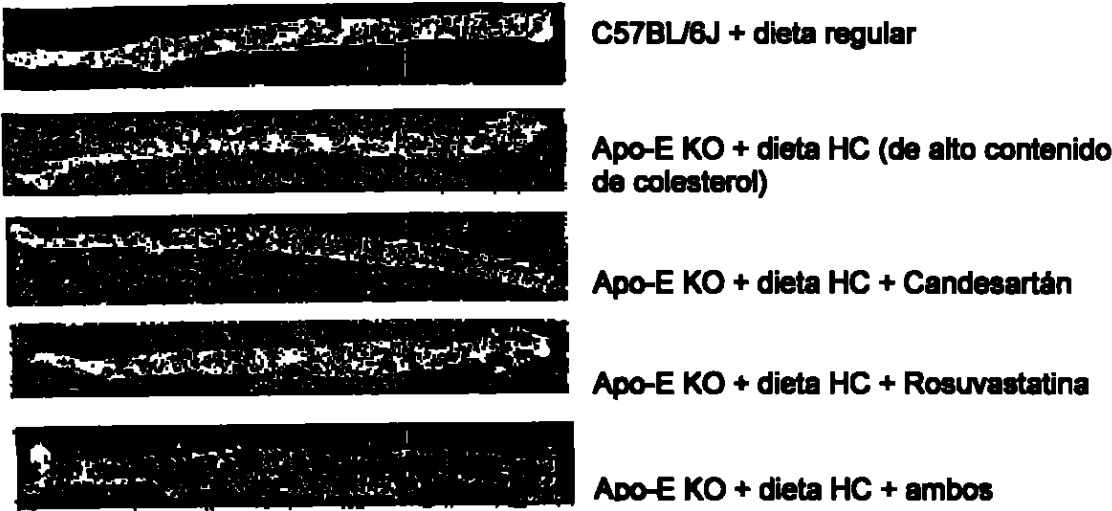
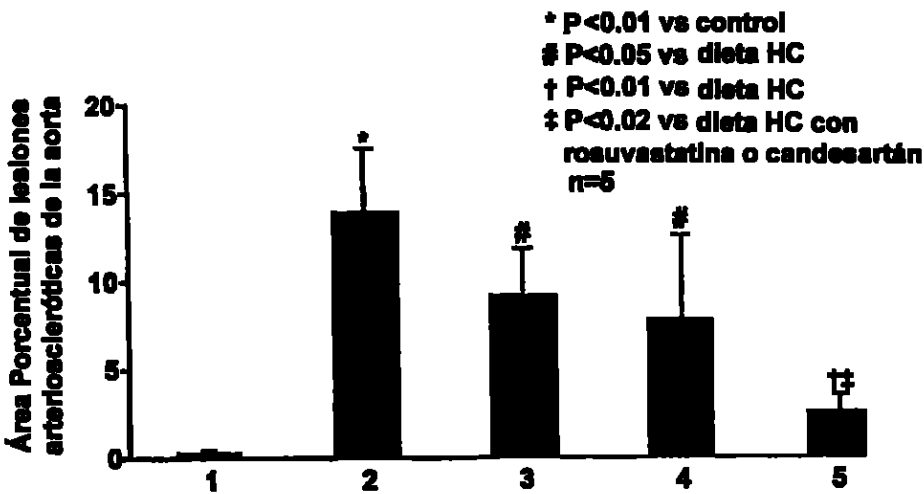


Figura 2



1. Ratones de control alimentados con dieta regular
2. Ratones Apo-E KO alimentados con dieta HC
3. Ratones Apo-E KO alimentados con dieta HC junto con rosuvastatina
4. Ratones Apo-E KO alimentados con dieta HC junto con candesartán
5. Ratones Apo-E KO alimentados con dieta HC junto con rosuvastatina y candesartán

PCT REQUEST

Duplicate of Original

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-5	Petition The undersigned requests that the present International application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United Kingdom Patent Office (RO/GB)
0-7	Applicant's or agent's file reference	101223-1 WO
I	Title of Invention	THERAPEUTIC TREATMENT
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	ASTRAZENECA UK LIMITED
II-5	Address	15 Stanhope Gate London Greater London W1K 1LN United Kingdom
II-6	State of nationality	GB
II-7	State of residence	GB
II-8	Telephone No.	+44 1625 230148
II-9	Facsimile No.	+46 8553 28820

PCT REQUEST

Duplicate of Original

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	12	-
IX-3	Claims	2	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	19	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-9	Original separate power of attorney	✓	-
IX-10	Original general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name	ASTRAZENECA	
X-1-2	Name of signatory	BILL, Kevin	
X-1-3	Capacity	Agent	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative		
X-2-1	Name (LAST, First)		
X-2-2	Name of signatory		
X-2-3	Capacity		

PCT REQUEST (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Duplicate of Original

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	Date stamp of the receiving Office	
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex)	
0-4-1	PCT Fee Calculation Sheet Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-9	Applicant's or agent's file reference	101223-1 WO
2	Applicant	ASTRAZENECA UK LIMITED
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier Total amounts (GBP)
12-1	Transmittal fee T	⇒ 55
12-2-1	Search fee S	⇒ 1078
12-2-2	International search to be carried out by	EP
12-3	International filing fee (first 30 sheets) I1	628
12-4	Remaining sheets	0
12-5	Additional amount (X) 0	0
12-6	Total additional amount I2	0
12-7	I1 + I2 = I	628
12-12	EASY Filing reduction R	-45
12-13	Total international filing fee (I-R) I	⇒ 583
12-14	Fee for priority document	
	Number of priority documents requested	1
12-15	Fee per document (X) 22	
12-16	Total priority document fee: P	⇒ 22
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒ 1738
12-18	Mode of payment	authorization to charge deposit account
12-20	Deposit account instructions	
	The receiving Office	United Kingdom Patent Office (RO/GB)
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above	✓
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above	✓
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document	✓
12-21	Deposit account No.	D02934
12-22	Date	17 September 2004 (17.09.2004)
12-23	Name and signature	

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We) ASTRAZENECA UK LIMITED

domicillado(s) en

domiciled in 15 Stanhope Gate, London W1K 1LN
England

Nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO S.

Hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO S.

de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus rórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; penal demands, actions of indemnities for damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they are hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kind of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistír, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO S. domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO S. domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

hoy de

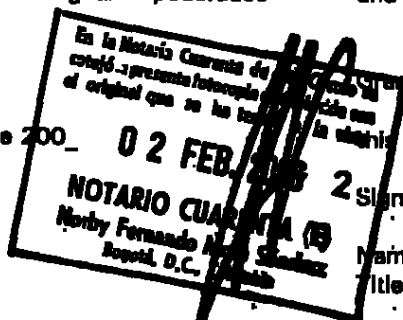
de 200_

02 FEB. 2003

Firma

Nombre

Cargo



Witnessed and signed in Macclesfield, England

day of

Signature

Name

Title

KEVIN BELL

Director, IP Services

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

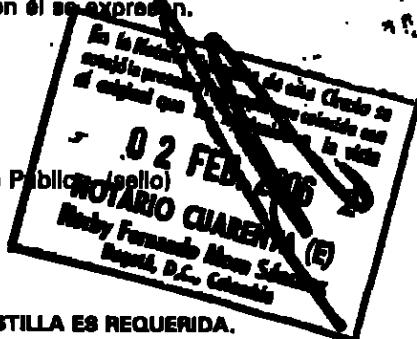
Notario Público (sello)

**CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL**

Hoy de de , compareció(eron)
ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declare(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)



LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 18th day of July 2003 of
personally appeared before me

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

ATTORNEY
ASTRAZANCA UK LIMITED

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that purpose for which this instrument is granted included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of England
under date of 12th June 2001

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Notary Public (Seal)

**NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON**

On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(e) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

38 37

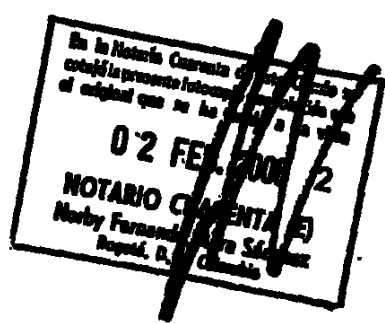
APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord
This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by J R Hodgson
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
Certified/Attesté
6. the/le 13 February 2004
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **G346692**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: W. Glass



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
It should be presented to the consular section of the mission representing that country.



39 38

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del poder otorgado por **ASTRAZENECA UK LIMITED**,
domiciliada en 15 Stanhope Gate, Londres, W1K 1LN, Inglaterra.

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado por **J B Hodgson**

3. actuando en capacidad de **Notario Público**

4. lleva el sello de **elcho Notario Público**

CERTIFICADO

5. en Londres

6. el 13 de Febrero de 2004

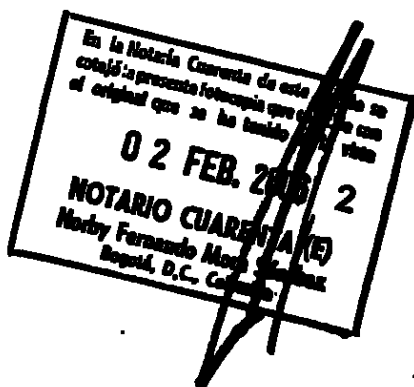
7. por El Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos Extranjeros y
de la Comunidad

8. No. **G348692**

9. Sello

10. Firma: **W. Glass**

Si este documento ha de usarse en un país que no es parte del Convenio de La
Haya del 5 de Octubre de 1961, debe ser presentado a la sección consular de la
misión que representa a ese país.





GAVIRI A

39

ORGANIZACION ELECTORAL
REGISTRADURIA NACIONAL DEL ESTADO CIVIL

REGISTRO CIVIL DE DEFUNCION

Indicativo
Serial

5562241

Datos de la oficina de registro													
Clase de oficina: ..		Registraduría	Notaría	☒	Consulado	Corregimiento	Insp. de Policía	Código	9795				
Lugar de la Defunción: País - Departamento - Municipio - Corregimiento o Inspección de Policía													
COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C.					NOTARIA 32.								
Datos del inscrito													
Apellidos y nombres completos													
CASTRO DUQUE RAMIRO													
Documento de identificación (Clase y número)					Sexo (en Letras)								
C.C. No. 170322 DE BOGOTA					MASCULINO								
Datos de la defunción													
Lugar de la Defunción: País - Departamento - Municipio - Corregimiento o Inspección de Policía													
COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C.													
Fecha de la defunción				Hora		Número de certificado de defunción							
Año	2	0	0	4	Me	1	0	Día	3	0	04:10 PM	A-	2094375.
Presunción de muerte										Fecha de la sentencia			
Juzgado que profiere la sentencia										Año		Me	Día
Documento presentado										Nombre y cargo del funcionario			
Autorización judicial										Certificado Médico		ANDRES DIAZ CAMPOS.- R. M. No. 79982662	
Datos del denunciante										Apellidos y nombres completos			
EDGAR DAVID REGINO H.										Firma			
Documento de identificación (Clase y número)										Firma			
C.C. No. 15.030.154 DE LORICA/ CORDOBA										Firma			
Primer testigo										Apellidos y nombres completos			
Documento de identificación (Clase y número)										Firma			
Segundo testigo										Apellidos y nombres completos			
Documento de identificación (Clase y número)										Firma			
Fecha de inscripción										Nombre y cargo del funcionario que autoriza			
Año	2	0	0	4	Me	1	0	Día	0	2	BLANCA RESTREPO	NOTARIO	
PADRES: ALFONSO CASTRO										ESPACIO PARA NOTAS			
MERCEDES DUQUE.										ESPACIO PARA NOTAS			

ORIGINAL PARA LA FICHA DE REGISTRO

NOTARIA 32

DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, D.C.

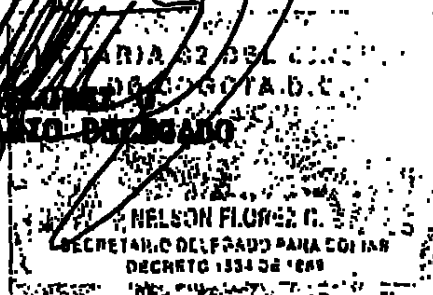
Germán Eleázar Moreno L.
Notario

COMO SECRETARIO DELEGADO DE LA NOTARIA TREINTA Y DOS (32) DEL
CIRCULO DE BOGOTA

CERTIFICO, QUE:

La presente acta es fiel copia del original tomada del registro
civil de defunciones serial indicativo número: **56224**
que expido en la ciudad de Bogotá D.C., hoy: **05 NOV. 2004**

SECRETARIO DELEGADO





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (✓) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente ✓	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. ✓	()	()
-Descripción de la invención. ✓	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes. ✗	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. ✓	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

2006.11.21 de 2006

41
42

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
ASTRAZENECA UK LIMITED

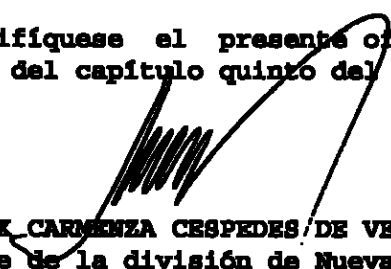
REFERENCIA	Radicación No.	06 37990
	Solicitud internacional	GB2004/004120
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8439

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 AGO. 2006 jramos