(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
23 de diciembre de 2010 (23.12.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/146215 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/40 (2006.01) *A61K 31/661* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070403

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de junio de 2010 (16.06.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200930321 16 de junio de 2009 (16.06.2009) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL** [ES/ES]; Avda. Fuerzas Armadas, 2, E-18014 Granada (ES). **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **GARRIDO JIMÉNEZ, José Manuel** [ES/ES]; Fundación Para La Investigación Biosanitaria De Andalucía Oriental, Avda. Fuerzas Armadas, 2, E-18014 Granada (ES). **SÁNCHEZ-MONTESINOS GARCÍA, Indalecio** [ES/ES]; Universidad De Granada, Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

WO 2010/146215 A1

(54) **Title**: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING MEDICAL DISORDERS ASSOCIATED WITH ANGIOGENESIS AND CELL PROLIFERATION

(54) **Título** : COMPOSICIÓN PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE PROCESOS PATÓLOGICOS RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR

(57) **Abstract**: The invention relates to a composition which includes a statin and an agent activating the vascular endothelium. Said composition can be used for producing drugs or pharmaceutical compositions, preferably for preventing or treating medical disorders associated with abnormal cell proliferation and with angiogenesis due to a disease or unwanted angiogenesis such as cancer and arteriosclerosis.

(57) **Resumen**: Composición que comprende una estatina y un agente activador del endotelio vascular. Dicha composición se puede utilizar para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas, preferiblemente, para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos asociados a proliferación celular anormal y angiogénesis patológica o no deseada como el cáncer o la arteriosclerosis.

COMPOSICIÓN PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE PROCESOS PATOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere a una composición que comprende una estatina y un agente activador del endotelio vascular y su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos asociados a proliferación celular anormal y angiogénesis patológica o no deseada como por ejemplo el cáncer o la arteriosclerosis.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La angiogénesis es el proceso biológico, merced al cual, se generan vasos sanguíneos, *ex novo,* a partir de estructuras vasculares previas. Para ello, es necesario que se mantenga un acoplamiento sinérgico de los mecanismos de proliferación y organización morfo-funcional. Los procesos implicados en los mecanismos de angiogénesis y vasculogénesis representan un papel fundamental tanto en fenómenos de cicatrización, como en el desarrollo de neoplasias o en la retinopatía diabética (Scholz *et al*. 2001. *Angiogenesis*; 4:246-257; Shukla *et al*. 2007. *Ann Thorac Surg*; 84:43-49; Tang *et al*. 2006. *Eur J Cardiothorac Surg*; 30:353-360).

Existen multitud de patologías asociadas a alteraciones en la vascularización o a proliferación mio-endotelial, ya sea por exceso o por defecto. Uno de los problemas más comunes a este respecto, dentro del contexto histopatológico que representa la aterosclerosis, se da tras la realización de intervenciones quirúrgicas de revascularización (cirugía sobre estructuras vasculares). La cirugía para la eliminación de problemas obstructivos cardiovasculares puede fracasar a corto, medio o largo plazo

debido, en muchos casos, a una sobreproliferación celular (proliferación mio-endotelial en los bordes anastomóticos) y a la aparición de enfermedad aterosclerótica del injerto, lo que provoca la reestenosis del vaso. Del mismo modo, pueden producirse fenómenos de reestenosis tras procedimientos endovasculares de revascularización (también utilizados en arteriopatías periféricas) debido a fenómenos de proliferación mio-endotelial o fenómenos de trombosis del segmento arterial tratado. Estos eventos patológicos se han tratado de solucionar mediante múltiples estrategias, como por ejemplo la aplicación de stents que reducen parcialmente la estenosis (reduce los fenómenos cicatriciales de retracción elástica), pero que no evitan la reestenosis por proliferación mio-endotelial. Esto último se trata de evitar mediante otros mecanismos como los tratamientos farmacológicos (WO/2003/026492).

Otra patología que se caracteriza por una angiogénesis patológica o no deseada es el cáncer. Para el desarrollo de la masa tumoral es necesario un aporte de nutrientes constante. La neovascularización del tumor permite que los nutrientes alcancen las células proliferativas del mismo, permitiendo mantener su tasa proliferativa. Se ha demostrado que la inhibición de esta neovascularización provoca la detención en el desarrollo del tumor. Además, los neovasos formados presentan una estructura y función alteradas, con distorsiones evidentes en la barrera de permeabilidad endotelial, facilitando la diseminación tumoral y la sintomatología añadida a la edematización de los tejidos.

En los últimos años ha ido aumentando el número de moduladores de la angiogénesis y la función endotelial estudiados para el tratamiento de estas patologías, entre ellas las estatinas y moduladores del receptor del ácido lisofosfatídico.

Las estatinas son unos fármacos ampliamente prescritos para la reducción

del colesterol en pacientes con hipercolesterolemia o enfermedades cardiovasculares (Liao *et al.* 2004. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 45:89-118). Actúan fundamentalmente mediante la inhibición competitiva de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima limitante en el proceso de síntesis del colesterol. Estas estatinas presentan además otros efectos no dependientes de la reducción de los niveles de colesterol (efectos pleiotrópicos) como la mejora de la funcionalidad cardiovascular (O'Driscoll *et al.* 1997. *Circulation*; 95:1126-1131), el descenso en la expresión de citocinas proinflamatorias (Mason *et al.* 2004. *Circulation*; 109:II34-II41), o sus efectos sobre el crecimiento y diferenciación tumoral (Wong *et al.* 2002. *Leukemia*; 16;508-519).

Se ha demostrado que las estatinas pueden reducir la muerte por cáncer en pacientes con largos tratamientos para enfermedades cardiovasculares (Pedersen *et al.* 2000. *Am J Cardiol*; 86:257-262). Además presentan la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y activar la apoptosis de células cancerosas (Causal *et al.* 2003. *Endothelium*; 10:49-58) La inhibición del ciclo se produce por múltiples mecanismos estirpe dependientes, como por ejemplo a través de la inhibición de la actividad de la kinasa ciclina dependiente-2 (CDK-2) junto a la activación de inhibidores de CDK. La apoptosis se da preferentemente en células proliferativas y se da mediante el control de diversas rutas de señalización, como la activación de caspasas, la inhibición de la proteína antiapoptótica bcl-2, o la ruta de señalización Raf/MEK/ERK (Agarwal *et al.* 1999. *Clin Cancer Res*; 5:2223-2229; Wu *et al.* 2004. *Cancer Res*; 64:6461-6468). Además se ha demostrado que la capacidad de inhibir la geranilgeranilación proteica es un elemento indispensable para producir la muerte por estatinas en células de leucemia mieloide aguda (Xia *et al.* 2001. Leukemia; 15:1398-1407). Por otro lado también se ha indicado que las estatinas son capaces de inhibir el crecimiento tumoral por la sobreexpresión de la proteína p21 (Ukomadu *et al.* 2003. *J Biol Chem*; 278:43586-43594). Otro efecto

anticancerígeno que se ha demostrado por parte de las estatinas es la inhibición de la función del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) impidiendo el desarrollo de algunos tumores de pulmón (Mantha et al. 2005. Clin Cancer Res; 11:2398-2407).

La aplicación de estatinas al endotelio vascular, dependiendo de la dosis, puede implicar un marcado descenso de la síntesis de VEGF-A, de su receptor específico FLT-1, así como de VEGF-C (Jones *et al*. 1999. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 276:1345-1355). A pesar de ello, las estatinas han demostrado tener un efecto proangiogénico cuando son administradas a concentraciones dentro del rango nanomolar o picomolar, mientras que a altas concentraciones, dentro del rango micromolar, demuestran un efecto claramente antiangiogénico (Dulak *et al*. 2005. *Endothelium*; 12: 233-241; Frick *et al*. 2003. *Atherosclerosis*; 170:229-236).

Otro modulador de la función endotelial es el ácido lisofosfatídico (LPA). Este se encuentra implicado en procesos celulares como la diferenciación o la inhibición de la apoptosis en diversos tipos celulares (Duriex *et al*. 1993. *Trnds Pharmacol Sci*; 14:249-254). Además este compuesto se ha demostrado como un elemento fundamental para el desarrollo vascular en ratones (van Meeteren *et al*. 2006. *Mol Cell Biol*; 26:5015-5022). Este factor también se encuentra implicado tanto en la proliferación como en la migración de células endoteliales (Lee *et al*. 2000. *Am J Physiol Cell Physiol*; 278:C612-C618), lo que demuestra su carácter proangiogénico (Rivera-López *et al*. 2008. *Angiogenesis*; 11:301-310). Este factor además induce la expresión de VEGF-C, lo que promueve la neovascularización (Lin *et al*. 2008. *Cell Signal*; 20:1804-1814). Todo esto se ve refrendado por el hecho de que antagonistas del receptor de LPA se están utilizando como agentes para la prevención de enfermedades proliferativas o asociadas a carcinomas (US2008/0213274).

La modulación de la angiogénesis y proliferación no deseada se muestra por lo tanto como un elemento fundamental a la hora de controlar diversas afecciones patológicas que, como el desarrollo de tumores sólidos o la arteriosclerosis, necesitan tanto neovascularización como proliferación mio-endotelial para su desarrollo. Para controlar y tratar estas patologías se han desarrollado numerosos inhibidores de angiogénesis y moduladores endoteliales que han mostrado excelentes resultados en ensayos preclínicos. A pesar de estos prometedores resultados, los ensayos clínicos realizados con posterioridad no han terminado de confirmar las expectativas creadas en torno a estos tratamientos (Sivakumar *et al*. 2004. *JAMA*. 292:972-977). Por lo tanto, existe la necesidad de un tratamiento efectivo para prevenir y tratar las enfermedades relacionadas con el desarrollo anómalo de la angiogénesis y de la proliferación mio-endotelial.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición que comprende una estatina y un agente activador del endotelio vascular y su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos asociados a angiogénesis y proliferación mio-endotelial no deseada como, por ejemplo, el cáncer o la arteriosclerosis.

En los ejemplos de la presente invención se demuestra como la estimulación del endotelio con un activador endotelial, provoca cambios hiperproliferativos en ese endotelio, dando lugar a una situación endotelial alterada. En esta situación alterada se observa un incremento de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, así como en la expresión de citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, la atorvastatina, utilizada en concentraciones del rango micromolar provoca, en el endotelio vascular, una modificación de la expresión génica que hace que el endotelio muestre un estado fisiológicamente normal. Por desgracia el uso de estatinas en el rango micromolar también conlleva un descenso en la viabilidad celular del endotelio con la consiguiente alteración del tejido.

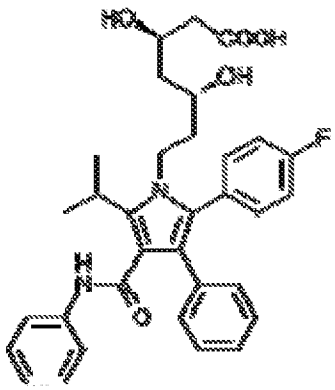
En la presente invención se demuestra que la aplicación de estatinas como la atorvastatina dentro del rango micromolar al endotelio, previa activación con un activador endotelial como el ácido lisofosfatídico, sigue produciendo la reversión del endotelio a un estado fisiológico de forma similar al tratamiento con la estatina de forma independiente. Esta reversión se observa a nivel génico, ya que hay un descenso en las señales proliferativas inducidas por el ácido lisofosfatídico, así como en las señales indicadoras de disfunción endotelial. Sorprendentemente esta pre-incubación del endotelio con ácido lisofosfatídico produce una protección del efecto apoptótico producido por el tratamiento de forma independiente con estatinas en concentraciones micromolares. Por lo tanto esta co-adición de compuestos provoca la reversión de un endotelio activado a uno con funciones fisiológicas normalizadas sin provocar su apoptosis pero frenando su cinética celular al disminuir significativamente su proliferación.

Por lo tanto este tratamiento reduce la toxicidad del uso de altas concentraciones de estatinas, manteniendo sus efectos beneficiosos.

De esta forma, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición (de ahora en adelante, composición de la invención) que comprende una estatina, una sal o un éster de la misma, y un activador endotelial.

Las estatinas son una familia de compuestos inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Además estimulan la absorción de colesterol por parte del hígado, lo que reduce los niveles del mismo, así como de triglicéridos en la sangre circulante. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la estatina se selecciona de la lista que comprende: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, simvastatina, o rosuvastatina.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la estatina es la atorvastatina. La atorvastatina es un compuesto sintético de fórmula (I). Las sales y esteres de atorvastatina también son conocidos por lo que también pueden ser empleados.



(I)

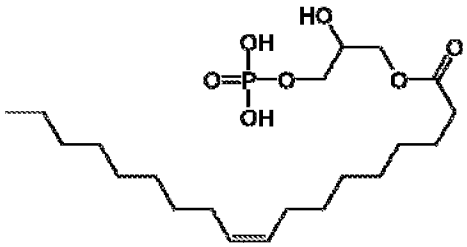
El término "activador endotelial", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un compuesto capaz de desencadenar diversos procesos concretos y reconocibles en el endotelio denominados activación endotelial. Estos efectos en las células endoteliales, consisten generalmente en la sobreexpresión de moléculas como VCAM, ICAM, E-selectina y el factor de Von Willebrand, y un descenso en la producción de AMPc. Esto conlleva una pérdida de la función de barrera del endotelio y a alteraciones en el tono vasomotor. Dentro de los activadores endoteliales,

se encuentran, por ejemplo aunque sin limitarnos TNFα, fuerzas hemodinámicas, así como la esfingosina-1-fosfato, y sus análogos, o el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el activador endotelial se selecciona de la lista que comprende TNFα, esfingosina-1-fosfato, un análogo de la misma, o ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

En una realización aún más preferida, el activador endotelial es el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

El ácido lisofosfatídico, de fórmula (II), es un fosfolípido bioactivo con actividad en diversos tipos celulares. Induce efectos proliferativos y cambios morfológicos celulares. También actúa como mediador en los procesos de síntesis de fosfolípidos de membrana.



(II)

El término ácido lisofosfatídico en la presente memoria incluye una familia de compuestos de formulación 1-acil,2-hidroxil-*sn*-glicerol-3-fosfato, los cuales presentan una cadena de ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) o insaturados (18:1, 18:2, 20:4).

El término “análogo” tal y como aquí se utiliza se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos del ácido lisofosfatídico sin limitarse, esteres grasos saturados, insaturados o poliinsaturados o alquil-éteres. También pueden considerarse análogos del acido lisofosfatídico aquellos compuestos en los que el grupo fosfato del ácido lisofosfatídico se sustituye por compuestos de la lista que comprende, aunque sin limitarnos, fosforomiméticos como metileno, fosfonatos, metilen-fosfonatos, fosfotioatos, o fosfonotioatos. También se consideran análogos aquellos compuestos similares al ácido lisofosfatídico donde los grupos hidroxi en las posiciones sn-1 y sn-2 se sustituyen por flúor o grupos metoxi. También se incluyen aquellos compuestos que sustituyen el grupo O-acil en la posición sn-1 por un grupo O-alquil.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento.

La composición de la presente invención puede ser empleada, aunque sin limitarse, para normalizar la función endotelial en procesos de angiogénesis, proliferación celular no deseada o anormal (como la proliferación mio-endotelial en la aterosclerosis) o en situaciones de disfunción de la barrera endotelial. Por lo tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación celular (mio-endotelial, etc.) anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial.

Se entiende por “angiogénesis y proliferación mio-endotelial anormal” o “no deseada” aquel desarrollo vascular que difiere estructural, morfológica o funcionalmente del desarrollo fisiológico de los vasos y que lleva asociado

un proceso patológico. Este desarrollo anormal conlleva el deterioro de las funciones tisulares normales. Existen multitud de procesos patológicos relacionados con el desarrollo anormal de la angiogénesis y con la proliferación mio-endotelial.

Se entiende por "disfunción de la barrera endotelial" aquella situación en la que el endotelio vascular pierde parcial o totalmente su funcionalidad en el mantenimiento de la integridad de los vasos produciendo una alteración en la permeabilidad de los vasos. Se caracteriza también por un aumento de las señales vasoconstrictoras como la liberación de angiotensina II o el aumento de la expresión de endotelina-1, y por la reducción de las vasodilatadoras como la producción de Oxido nítrico (NO) por la disminución de la expresión y actividad de la enzima oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Además va acompañado de la generación de un entorno proinflamatorio, proliferativo y procoagulatorio que favorece la aterogénesis.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de la composición para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación celular (como la proliferación mio-endotelial) anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial, seleccionado de la lista que incluye arteriosclerosis, cáncer, degeneración macular, glaucoma neovascular, endometriosis, artritis reumatoide, psoriasis, herpes ocular, tracoma, neovascularización de injerto de córnea, queratitis intersticial viral, queratoconjuntivitis microbiana, telangiectasia hipertrófica, adhesiones vasculares, angiofibroma, acné rosácea, fibroplasia retrolental, hipertensión pulmonar primaria o secundaria, pulmón de shock, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, fibrosis, vitreorretinopatía proliferativa, leucemia, colitis ulcerosa, retinopatía de la premadurez, queratoconjuntivitis epidémica, queratitis atópica, queratitis

de los miembros superiores, queratitis seca del pterigio, síndrome de Sjögren, filectenulosis, sífilis, infecciones por Mycobacteria, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, poliarteritis, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, queratotomía radial, anemia de células falciformes, pseudoxantoma elástico, penfigoide, enfermedad de Paget, uveítis crónica, vitritis crónica, enfermedad de Lyme, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, histoplasmosis ocular supuesta, enfermedad de Best, miopía, pozos del nervio óptico, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, complicaciones post-láser, rubeosis, artritis, sinovitis, osteomielitis, asma, dermatitis alérgica, síndrome de DiGeorge, neovascularización de injerto de córnea, verrugas, tumores, enfermedad obstructiva de la carótida, degeneración macular asociada a la edad, o retinopatía diabética.

Dentro de la angiogénesis y proliferación mio-endotelial anormal, uno de las patologías más importantes es la arterioesclerosis que se caracteriza por un engrosamiento y disfunción de las paredes de los vasos. Dentro de ésta, el evento más común y más grave es la formación de la placa de ateroma caracterizada por la acumulación de lípidos a nivel subendotelial. Este evento lleva asociado en multitud de casos isquemia miocárdica, cerebral, músculo-esquelética o esplácnica, por lo que la disminución de la placa sería un evento deseable. Además la inestabilidad de la placa formada puede producir la liberación de lípidos altamente trombogénicos que produzcan eventos cardiovasculares agudos (infarto de miocardio, isquemia aguda de miembros inferiores, isquemia aguda esplácnica, infartos cerebrales, etc.). El tratamiento con estatinas ha mostrado un efecto reductor de la formación de la placa de ateroma, así como estabilizador de la placa. Debido a los potentes efectos anti-arterioscleróticos de las estatinas a elevadas concentraciones (dentro del

rango micromolar) y a la eliminación del efecto citotóxico por la preactivación con LPA, la presente combinación podría ser utilizada por ejemplo, pero sin limitarnos, para la prevención el tratamiento de placas arterioscleróticas, cardiopatías isquémicas, accidentes cerebrovasculares, colitis isquémica, aneurismas aórticos, reestenosis vascular, cicatrización hipertrófica o escleroderma, arteriopatías periféricas, etc.

Por otro lado, también se encuentran los tumores. Para la progresión tumoral es de vital importancia el desarrollo de estructuras vasculares. Debido al rápido crecimiento tumoral y la necesidad de la vasculatura para desarrollarse a dicho ritmo, los vasos desarrollados presentan disfunciones y no se da un correcto desarrollo de la barrera endotelial. En este sentido el tratamiento con estatinas a altas concentraciones junto con la adición del activador endotelial provocaría una detención del crecimiento vascular y por ello la detención del crecimiento tumoral. Además, la refuncionalización del tejido vascular permite la recuperación de la barrera endotelial impidiendo la diseminación de las células tumorales, y por ello la metástasis. Por ello la presente composición sería útil para la prevención y tratamiento tanto de tumores sólidos, como tumores transportados por la sangre, como por ejemplo, pero sin limitarnos, adenomas bronquiales infantiles, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral y glioma maligno infantil, blastoma pleuropulmonar, linfoma de Burkitt, cáncer colorrectal infantil, cáncer de ano, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer de cavidad oral y de labio, cáncer de célula renal, cáncer de cérvix, cáncer de colon, cáncer de cuello del útero, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de glándula salival, cáncer de hígado en adultos (primario), cáncer de hipofaringe, cáncer de intestino delgado, cáncer de laringe, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de mama (seno), cáncer de nasofaringe, melanoma intraocular, cáncer de ojo, retinoblastoma, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas,

cáncer de paratiroides, cáncer de piel (melanoma), cáncer de piel (no melanoma), cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de recto, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de vagina, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vulva, cáncer epitelial de ovarios, cáncer escamoso de cuello con tumor primario oculto metastático, cáncer óseo, osteosarcoma, carcinoma basocelular, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de la corteza suprarrenal, carcinoma tímico y timoma, leucemia, cáncer cerebro y médula espinal, tumor de swing, feocromocitoma, glioma, astrocitoma cerebral, tumores hipofisiarios, histiocitoma fibroso maligno óseo, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, linfoma de células T, síndrome de Sézary, linfoma relacionado con el sida, macroglobulinemia de Waldenstrom, meduloblastoma, mesotelioma, pineoblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, rabdomiosarcoma, cáncer rabdoideo/teratoideo atípico del sistema nervioso central, sarcoma de tejido blando, sarcoma de útero o uterino, síndromes mielodisplásicos, ependimoma, tumor de Wilms, tumor extracraneal de células germinales infantil, tumor extragonadal de células germinales, o macroglobulinemia de Waldenstrom.

Una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de la composición para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a procesos patológicos asociados a una disfunción de la barrera endotelial, seleccionado de la lista que incluye arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares, procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Debido a las elevadas concentraciones (dentro del rango micromolar) en que se requiere administrar la estatina, resultaría interesante, aunque sin limitarse, que la administración de la composición se realizase de forma local preferentemente para su actuación sobre el tejido afectado. Por todo ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la composición en una forma adecuada para la administración local.

El tratamiento del endotelio con los activadores provoca una respuesta característica. Esta respuesta es la que permite a la estatina ejercer sus efectos de normalización fisiológica evitando el efecto proapoptótico y produciendo una inhibición de la proliferación mio-endotelial. Por tanto el uso de la estatina de forma aislada sobre un endotelio ya activado ejercería los mismos efectos que sobre un endotelio tratado con un activador endotelial. Por todo ello, en otro aspecto de la invención se describe el uso de una estatina, una sal o un éster de la misma para la prevención y/o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis y/o proliferación mio-endotelial anormal o no deseada cuando las células endoteliales están activadas (neovasos anormales tumorales).

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de una estatina, sal o éster de la misma para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial, seleccionado de la lista que incluye aunque sin limitarse, arteriosclerosis, cáncer, degeneración macular, glaucoma neovascular, endometriosis, artritis reumatoide, psoriasis, herpes ocular, tracoma, neovascularización de injerto de córnea, queratitis intersticial viral, queratoconjuntivitis microbiana, telangiectasia hipertrófica, adhesiones vasculares,

angiofibroma, acné rosácea, fibroplasia retrolental, hipertensión pulmonar primaria o secundaria, pulmón de shock, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, fibrosis, vitreorretinopatía proliferativa, leucemia, colitis ulcerosa, retinopatía de la premadurez, queratoconjuntivitis epidémica, queratitis atópica, queratitis de los miembros superiores, queratitis seca del pterigio, síndrome de Sjögren, filectenulosis, sífilis, infecciones por Mycobacteria, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, poliarteritis, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, queratotomía radial, anemia de células falciformes, pseudoxantoma elástico, penfigoide, enfermedad de Paget, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis crónica, vitritis crónica, enfermedad de Lyme, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, histoplasmosis ocular supuesta, enfermedad de Best, miopía, pozos del nervio óptico, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, complicaciones post-láser rubeosis, artritis, sinovitis, osteomielitis, asma, dermatitis alérgica, síndrome de DiGeorge, neovascularización de injerto de córnea, verrugas, tumores, enfermedad obstructiva de la carótida, degeneración macular asociada a la edad, o retinopatía diabética.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de la estatina, sal o éster de la misma para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o procesos patológicos asociados a una disfunción de la barrera endotelial, seleccionado de la lista que incluye arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares, procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Una realización aún más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la estatina, sal o éster de la misma en una forma adecuada para la administración local.

Resulta interesante que el activador endotelial y la estatina se administren de forma que el activador endotelial actúe sobre el tejido antes que la estatina ya que de esta forma se obtienen los mejores resultados. Por tanto la preparación combinada de un activador del endotelio vascular y una estatina por separado, de manera secuencial sería útil en la elaboración de un medicamento.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada (de ahora en adelante, preparación combinada de la invención) para su uso secuencial que comprende:

a) primero, un activador endotelial, y
b) segundo, una estatina, o una sal o un éster de la misma.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la estatina se selecciona de la lista que comprende: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, simvastatina, y rosuvastatina. En una realización aún más preferida, la estatina seleccionada es la atorvastatina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, entre los activadores endoteliales se encuentran, aunque sin limitarnos, TNFα esfingosina-1-fosfato, un análogo de la misma, o el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

En una realización aún más preferida, el activador endotelial es el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal del mismo.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo, en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención para la elaboración de un medicamento.

La preparación combinada de la presente invención puede ser empleada, aunque sin limitarse, para normalizar la función endotelial en procesos de angiogénesis, proliferación mio-endotelial no deseada o anormal, o de disfunción de la barrera endotelial. Por lo tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis y/o proliferación mio-endotelial anormal o no deseada.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis y/o proliferación mio-endotelial no deseada, seleccionado de la lista que comprende por ejemplo, aunque sin limitarse, arterioesclerosis, cáncer, degeneración macular, glaucoma neovascular, endometriosis, artritis reumatoide, psoriasis, herpes ocular, tracoma, neovascularización de injerto de córnea, queratitis intersticial viral, queratoconjuntivitis microbiana, telangiectasia hipertrófica, adhesiones vasculares, angiofibroma, acné rosácea, fibroplasia retrolental,

hipertensión pulmonar primaria o secundaria, pulmón de shock, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, fibrosis, vitreorretinopatía proliferativa, leucemia, colitis ulcerosa, retinopatía de la premadurez, queratoconjuntivitis epidémica, queratitis atópica, queratitis de los miembros superiores, queratitis seca del pterigio, síndrome de Sjögren, filectenulosis, sífilis, infecciones por Mycobacteria, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, poliarteritis, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, queratotomía radial, anemia de células falciformes, pseudoxantoma elástico, penfigoide, enfermedad de Paget, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis crónica, vitritis crónica, enfermedad de Lyme, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, histoplasmosis ocular supuesta, enfermedad de Best, miopía, pozos del nervio óptico, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, complicaciones post-láser rubeosis, artritis, sinovitis, osteomielitis, asma, dermatitis alérgica, síndrome de DiGeorge, neovascularización de injerto de córnea, verrugas, tumores, enfermedad obstructiva de la carótida, degeneración macular asociada a la edad, o retinopatía diabética.

Una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de la preparación combinada para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada o a una disfunción de la barrera endotelial, seleccionado de la lista que incluye arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares y/o procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada en una forma adecuada para la administración local.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la preparación combinada de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la preparación combinada de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica,

conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas o minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, spray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

Las composiciones de la presente invención son aptas para su aplicación mediante dispositivos médicos que permitan su liberación en concentraciones adecuadas para el tratamiento. Estos dispositivos deben ser adecuados para la administración del fármaco de forma local que permita que el tratamiento no se disperse y actúe en la zona afectada. Estos dispositivos médicos pueden permitir la liberación del fármaco tanto de forma conjunta como de forma secuencial, liberando primero el

activador endotelial y posteriormente la estatina. Los dispositivos pueden, por ejemplo, pero sin limitarse, llevar los fármacos en su interior o ir recubiertos de los mismos.

Dentro de estos dispositivos se pueden encontrar, por ejemplo, dispositivos de asistencia circulatoria, de procedimientos endovasculares y cirugía cardiovascular, y dentro de estos, por ejemplo, pero sin limitarse, stents, válvulas, anillos, suturas, parches o injertos vasculares.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra la razón $Y = P_{std}/B_{std}. Z^2/A$ como una función de C_{std} para los patrones de S, Na, P, K, Mg y Cl a 10 kV. Cada valor representa la media ± SD de 15 - 20 análisis. Los patrones de calibración fueron preparados de forma idéntica a las células cultivadas sobre rejillas de oro cubiertas con pioloformo. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas se depositaron sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de 0,4 µm) aislados de sus soportes de poliestireno, criofijadas en nitrógeno líquido, criodesecadas y analizadas en un microscopio Philips XL30 utilizando idénticas condiciones instrumentales y analíticas a las indicadas con anterioridad.

Figura 2. Muestra los cambios en las concentraciones de iones en células HUVEC tratados "*in vitro*" analizados mediante microanálisis. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10µM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1µM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10µM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1µM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1µM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10µM durante 90 minutos. Los datos son la media ± SEM. Experimentos realizados por triplicado por condición. *p<0,05 vs. CE

Figura 3. Muestra la relación concentración de potasio/ concentración de sodio (milimoles/kg peso seco) (indicador de viabilidad celular) en células HUVEC analizados mediante microanálisis. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10µM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1µM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10µM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1µM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1µM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10µM durante 90 minutos.

Figura 4. Muestra los cambios en la expresión génica de endotelina-1 (**A**) y eNOS (**B**), genes implicados en la función endotelial en células HUVEC, analizadas mediante *microarrays*. Los resultados se muestran en unidades fluorescentes. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10µM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1µM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10µM durante 90 minutos y posteriormente con

Atorvastatina 1μM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1μM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10μM durante 90 minutos. *p<0,05 vs. CE

Figura 5. Muestra los cambios en la expresión génica de genes implicados en la permeabilidad de la barrera endotelial en células HUVEC analizadas mediante *microarrays*. Los resultados se muestran en unidades fluorescentes. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10μM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1μM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10μM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1μM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1μM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10μM durante 90 minutos. *p<0,05 vs. CE

Figura 6. Muestra los cambios en la expresión génica de de factores de crecimiento en células HUVEC analizadas mediante *microarrays*. Los resultados se muestran en unidades fluorescentes. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10μM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1μM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10μM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1μM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1μM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10μM durante 90 minutos. *p<0,05 vs. CE

Figura 7. Muestra los cambios en la expresión génica de genes implicados en el desarrollo del ciclo celular en células HUVEC analizadas mediante *microarrays*. Los resultados se muestran en unidades fluorescentes. CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos

con ácido lisofosfatídico 10μM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1μM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10μM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1μM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1μM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10μM durante 90 minutos. *p<0,05 vs. CE; ∓ p<0,05 ATS vs. E1

Figura 8. Muestra los cambios en la expresión génica de genes implicados en apoptosis en células HUVEC analizadas mediante *microarrays*. Los resultados se muestran en unidades fluorescentes CE: HUVEC cultivadas en medio standard. LPA: HUVEC cultivadas 90 minutos con ácido lisofosfatídico 10μM y posteriormente 24 horas en medio estándar. ATS: HUVEC cultivadas con Atorvastatina (ATS) 1μM durante 24 horas. LPA+ATS: HUVEC cultivadas con ácido lisofosfatídico 10μM durante 90 minutos y posteriormente con Atorvastatina 1μM durante 24 horas. ATS+LPA HUVEC cultivadas con Atorvastatina 1μM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10μM durante 90 minutos. *p<0,05 vs. CE

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Cultivo de células HUVEC y protocolo de administración de ácido lisofosfatídico 10μM y atorvastatina 1μM.

Para el estudio de los efectos de la activación endotelial, previa a la administración de estatinas, sobre la muerte celular, se utilizaron células HUVEC comercializadas por Sigma Aldrich. Estas células se cultivaron en medio F12K (modificado por Kaighn) con 2 mM glutamina + 1,5 g/l de bicarbonato sódico + 0,10 mg/ml de heparina + 0,03 mg/ml de suplemento de crecimiento endotelial (ECGS) + 20% de suero bovino fetal inactivado (mediante choque térmico a 56ºC durante 30 minutos). El cambio de medio de cultivo se realiza cada 72 horas. La incubación se lleva a cabo a una temperatura de 37ºC y en una atmósfera de 5% CO_2. Se realizan 3 pases de las células previos a su utilización experimental. Este despegue celular se realiza mediante tres lavados con PBS (solución tamponada estéril), con objeto de eliminar los restos de suero fetal bovino. Posteriormente se añade Tripsina-EDTA 0,03% (incubando a 37ºC, 90% de humedad y 5% de CO_2 durante 5-10 minutos, examinando el grado de individualización celular). Una vez obtenida la suspensión y esferización celular se procede a realizar la neutralización de la tripsina-EDTA mediante medio de cultivo. Posteriormente se lleva a cabo un centrifugado a 1000 rpm. durante 10 minutos, al cual se elimina el sobrenadante, y se diluye el precipitado celular añadiendo nuevo medio de cultivo para resembrar en proporción 1:2.

Para la realización del microanálisis, tras el tercer pase, las células se dividen en 5 grupos y se incuban en pocillos de experimentación, sobre rejillas de microanálisis a 37ºC y 5% de CO_2 en las siguientes condiciones:

- GRUPO CONTROL (CE): células endoteliales de vena umbilical, cultivadas en medio estándar
- GRUPO LPA: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas con LPA 10µM durante 90 minutos y posterior incubación durante 24 horas en medio estándar.

- GRUPO ATS: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con Atorvastatina (ATS) 1µM durante 24 horas.
- GRUPO E1: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con LPA 10µM durante 90 minutos y posteriormente con ATS 1µM durante 24 horas.
- GRUPO E2: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con ATS 1µM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10µM durante 90 minutos.

EJEMPLO 2. Efectos del tratamiento con Ácido lisofosfatídico de células HUVEC previo a la administración de atorvastatina 1µM sobre la muerte celular

Para la realización del estudio microanalítico la muestra de células endoteliales ha de estar físicamente sobre las rejillas de oro de microanálisis. Para ello extiende una fina capa de resina *pioloform* en agua ultrapura y colocando sobre la misma, de forma precisa, las rejillas de microanálisis y un cubreobjetos de 11 milímetros de diámetro. Tras la recogida y secado del montaje rejilla-pioloform, se esterilizan mediante irradiación con rayos ultravioleta durante 24 horas. A continuación se depositan 2 rejillas en cada pocillo de experimentación y se procede a la siembra celular.

La siembra celular se realiza según el protocolo seguido en el ejemplo 1. Las células proceden de una tercera tripsinización del cultivo.

El **ensayo experimental**, (tratamiento con LPA, atorvastatina, ambos o sin tratamiento) se llevó a cabo después de **24 horas** de cultivo, asegurando

de esta forma, una correcta *adhesión* y *viabilidad* de las **células endoteliales** utilizadas.

Posteriormente se lavan las rejillas de microanálisis en agua bidestilada autoclavada a 4°C durante 4 segundos, generando un suave movimiento mediante agitador imantado. El exceso de agua se elimina con un rápido secado en papel de filtro.

Posteriormente se criofijan las rejillas de microanálisis, previa retirada de los correspondientes cubrerrejillas. Se fija el material celular por congelación en nitrógeno líquido, descendiendo su temperatura desde los 37°C hasta los -196°C, en un tiempo inferior a 10 segundos.

Las células endoteliales criofijadas son transferidas a una cámara de criodesecación de alto vacío, a 10^{-5} mbar de presión (sistema Emitech K775) para la extracción completa del agua celular por sublimación, siguiendo un protocolo de 6 etapas (Warley *et al*. 2000. *J Microsc*; 198:116-123).

A continuación se cubre la muestra con una película de carbón, empleando para ello, en condiciones de alto vacío, un evaporador Emitech (Watfor, Reino Unido) provisto de un hilo de grafito, lo que facilita el barrido del haz de electrones.

La visualización de las muestras en el microscopio electrónico de barrido mediante electrones secundarios se realizó utilizando los siguientes parámetros analíticos:

- Voltaje del microscopio 10 kV
- Angulación de superficie 0º
- Distancia de trabajo 10 mm

Las condiciones instrumentales fijadas para la detección microanalítica fueron las siguientes:

- Voltaje del microscopio 10 kV
- Aumentos 10000
- Angulación de superficie (tilt) 0º
- Cuentas por segundo (CPS) registradas por el detector 500
- Tiempo de adquisición 200 s
- Tamaño del haz de electrones (spot size) 6
- Distancia de trabajo 10mm
- Área de análisis puntiforme y estática

De forma previa al estudio microanalítico, se realizó una minuciosa evaluación de las células endoteliales mediante microscopía electrónica de barrido, descartando aquellas que, por su especial cercanía o anclaje a la estructura metálica, pudieran generar una distorsión evidente de los patrones de microanálisis.

Para determinar cuantitativamente el contenido elemental de las células, se utilizó el método de la razón pico fondo -método P/B- con referencia a patrones de calibración de matriz orgánica previamente conocidos (Boekestein *et al.* 1980. *Scan Electron Microsc*; pt-2:321-334 y Boekestein *et al*. 1984. *J Microsc*; 134: 327-334; Roomans et al. 1988. *J Electron Microsc Tech*; 9:3-17; Statham 1998. *Microsc Microanal*; 4:605-615). La concentración de cada elemento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{spc} = C_{std} \frac{\left(\frac{P}{B}\right)_{spc} \cdot \frac{\Sigma^2}{A_{spc}}}{\left(\frac{P}{B}\right)_{std} \cdot \frac{\Sigma^2}{A_{std}}}$$

donde:

- C_{spc} es la concentración del elemento a cuantificar.
- P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento.
- B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir, tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica.
- Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado dividido por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano al 20% (patrón estándar) y las células (Warley, 1997. *Practical Methods in Electron Microscopy*).

La preparación de los patrones de calibración se realizó de acuerdo con las pautas prefijadas en el laboratorio de microscopía electrónica analítica del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. (Crespo *et al.* 1993. *Acta Otolaryngol*; 113:176-180; López-Escámez *et al*. 1994. *Scanning Microsc Suppl*; 8:171-185) utilizando diversas sales ($NaHPO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2{\cdot}H_2O$ y K_2SO_4) disueltas en matriz orgánica como patrón de análisis. Para ello, se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell® y se siguió el mismo procedimiento que se expuso para la preparación de las células endoteliales. Los patrones se analizaron en el microscopio electrónico inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, obteniéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las mismas condiciones de análisis previamente considerados, que se utilizaron para las células endoteliales.

El análisis de los patrones de dextrano al 20% que contienen concentraciones conocidas de sales de Na, Cl, Mg, P, S, K y Ca, permitió realizar la calibración de las concentraciones de los citados elementos

frente a la señal P/B. La concentración de cada elemento en el estándar es directamente proporcional a la razón P/B de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{ts} = K \cdot \left(\frac{P_{std}}{B_{std}}\right)$$

donde:

- Cts es la concentración conocida del elemento en el patrón.
- (Pstd/Bstd) es la razón P/B, donde el fondo se ha medido entre el mismo rango de energía de la señal característica obtenida del análisis de los estándares.
- K es la constante de calibración característica para cada elemento y configuración instrumental utilizada.

La relación entre P_{std}/B_{std} frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple. Teniendo en cuenta que la denominada constante de calibración K, depende de la diferencia en el Z^2/A (factor G) entre el estándar y la célula, se hace necesario utilizar la siguiente ecuación para valorar la influencia que este factor ejerce en el ajuste de la curva:

$$Y = \frac{P_{std}}{B_{std}} \cdot \left(\frac{\bar{Z}^2}{\bar{A}_{std}}\right)$$

donde:

- Z^2/A es el promedio del valor de Z^2/A para todos los elementos presentes en el volumen analizado de estándar:

$$\frac{\bar{Z}^2}{\bar{A}} = \sum\left(f_i \cdot \frac{Z_i^2}{A_i}\right)$$

donde:

- Z_i es el número atómico del elemento i.
- A_i es el peso atómico de dicho elemento.
- f_i es la fracción de masa del elemento i expresada como masa elemental dividida entre la masa total (Hall y Gupta, 1986).

En la Tabla 1 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando $Y= P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$, calibrada frente a C_{std}, para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca analizados a 10 kV.

Elemento		
Na	Y= 3 ,75 + 0,032x	(r= 0,99 p<0,001)
Mg	Y= 1,07 + 0,052x	(r= 0,98 p<0,001)
P	Y= 0,64 + 0,042x	(r= 0,99 p<0,001)
S	Y= 1,38 + 0,052x	(r= 0,97 p<0,001)
Cl	Y= 1,42 + 0,036x	(r= 0,99 p<0,001)
K	Y= 3,32 + 0,054x	(r= 0,99 p<0,001)
Ca	Y= 0,60 + 0,063x	(r= 0,99 p<0,001)

Tabla 1: Ecuaciones de regresión obtenidas cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} analizados a 10 kV.

En la tabla 2 se muestran los valores del patrón estándar expresados en moles/kg. de masa seca, para los distintos elementos fueron los siguientes:

Na = 84,771	P = 69,195
Mg = 52,881	Cl = 79,793
S = 54,45	K = 51,271

Tabla 2: Valores del patrón estándar expresados en moles/kg. masa seca.

- Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos, planteamos el siguiente test de hipótesis:
  - $H_o \rightarrow$ no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada elemento en los distintos grupos de experimentación.
  - $H_1 \rightarrow$ existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada elemento en los distintos grupos de experimentación.

El problema planteado es resuelto mediante la utilización del test no paramétrico de Kruskal-Wallis para muestras múltiples, que nos permite realizar el análisis estadístico global.

A continuación realizamos el análisis estadístico de los distintos grupos de experimentación mediante comparaciones dos a dos. Para ello utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney (W. Wilcoxon).

Los datos indican que el tratamiento con Atorvastatina 1µM provoca un descenso de los indicadores de viabilidad celular (relación K/Na,

concentración de cloro intracelular) (Figuras 2 y 3 respectivamente). El tratamiento del cultivo con ácido lisofosfatídico 10µM durante 90 minutos no indujo apenas variaciones en cuanto a la viabilidad celular con respecto al cultivo control. La adición al cultivo de ácido lisofosfatídico 10µM durante 90 minutos posteriormente a la incubación con atorvastatina 1µM durante 24 horas, no produjo variaciones relacionadas con la supervivencia con respecto al tratamiento en solitario con la atorvastatina 1µM. Por el contrario la preactivación del endotelio mediante la preincubación de las células con LPA 10µM durante 90 minutos de forma previa a la administración de Atorvastatina provoca una protección del tejido frente al daño generado por la atorvastatina a concentración 1µM.

EJEMPLO 3. Efecto del tratamiento con Ácido lisofosfatídico de células HUVEC previo a la administración de Atorvastatina 1µM sobre la expresión génica.

El protocolo de cultivo y tratamiento de las células es el mismo seguido en el ejemplo 1. Los grupos experimentales utilizados son:

- GRUPO CONTROL (CE): células endoteliales de vena umbilical, cultivadas en medio estándar
- GRUPO A: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas con LPA 10µM durante 90 minutos y posterior incubación durante 24 horas en medio estándar.
- GRUPO ATS1: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con Atorvastatina (ATS) 1µM durante 24 horas.
- GRUPO E1: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con LPA 10µM durante 90 minutos y posteriormente con ATS 1µM durante 24 horas.

- GRUPO E2: células endoteliales de vena umbilical, procedentes del tercer subcultivo, tratadas farmacológicamente con ATS 1µM durante 24 horas y posteriormente con LPA 10µM durante 90 minutos.

Para el análisis de expresión génica, se extrajo ARN total de cada una de las muestras a analizar utilizando el sistema Trizol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EEUU) y purificación mediante el sistema comercial Qiagen RNeasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Una vez extraído el ARN, se comprobó la integridad y la calidad de éste mediante visualización directa del ARN ribosómico de 28 y 18S mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio.

Para el análisis, todos los ARN fueron transformados en ADNc mediante una transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, EEUU) con un oligonucleótido rico en colas de timina (T7-polyT primer), el cual permitió la amplificación de cualquier ARN mensajero presente en la célula. A continuación, se sintetizaron los ARNc correspondientes a todos los ADNc mediante transcripción in vitro, utilizando para ello UTP y CTP marcados con biotina (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Una vez sintetizados, y para favorecer la hibridación, estos ARNc se fragmentaron químicamente añadiendo una concentración elevada de sales y altas temperaturas. Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los chips que constituyen el sistema de microarray Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0® de la casa comercial Affymetrix, durante 16 horas a 45ºC. Tras un proceso estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados como *unidades fluorescentes*. Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el programa informático *Affymetrix Microarray Suite 5.0* suministrado por la casa comercial *Affymetrix*.

Los resultados representados en la figura 4A muestran que el tratamiento con LPA provoca un incremento en la tasa de expresión de endotelina-1, lo que determina un claro patrón de disfunción endotelial. Este resultado se ve refrendado con la disminución de la expresión de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (figura 4B). Por otro lado, el tratamiento con atorvastatina induce un claro aumento en la expresión de eNOS que también se da en el caso de existir pretratamiento con LPA. Esto indica que la Atorvastatina induce una recuperación de la función endotelial, incluso con una preactivación del tejido endotelial.

En la figura 5 se observa que el tratamiento con atorvastatina potencia la sobreexpresión moléculas implicadas en las uniones intercelulares. Esto indica que la atorvastatina induce una potenciación de la barrera endotelial. Esta potenciación se da tanto en el caso de tratarse el tejido tratado únicamente con atorvastatina como en aquel activado por la preincubación con LPA. Esto indica que los efectos beneficiosos de mejoramiento de la barrera endotelial no son eliminados por la preactivación del tejido.

En la figura 6 se observa que la activación del endotelio con LPA provoca un aumento en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A. Esta inducción se ve revertida por el tratamiento con atorvastatina. La atorvastatina por si misma también produce un descenso en la expresión tanto del factor de crecimiento del endotelio vascular C y en el receptor celular FLT-1 que se mantiene incluso con el pretratamiento de las células con LPA. Esto indica que la atorvastatina es capaz de ejercer una regulación negativa en los mecanismos de proliferación celular autocrinos y paracrinos que no se ve alterado por el pretratamiento con LPA.

En la figura 7 se observa que en los grupos celulares tratados con atorvastatina, ya sea de forma independiente o con pre o post-incubación con LPA, se da una reducción en la expresión de los genes implicados en la progresión del ciclo celular como las ciclinas C1, A1, A2, B1, B2, F y H. También se reduce la expresión de las ciclinas dependientes de Kinasas 1, 2 y 4. Esto indica que el tratamiento con atorvastatina produce un bloqueo del ciclo celular que impide la proliferación de las células tratadas con el compuesto. Este efecto es independiente de la preactivación del endotelio con ácido lisofosfatídico.

En la figura 8 se observa que las células tratadas con atorvastatina 1µM únicamente o con posterior aplicación de LPA, presentan una expresión aumentada de indicadores de perdida de viabilidad como caspasa 3, caspasa 6 caspasa 7, Rac-1 y Cdc-42, con respecto a las células sin tratar. Este aumento se ve limitado o revertido a la situación fisiológica en los casos en que las células han sido preincubadas con LPA previa al uso de atorvastatina. Estos datos refrendan los datos de viabilidad celular obtenidos por microanálisis. Otro gen aumentado en los grupos ATS y ATS+LPA es el gen de muerte celular programada 4 (PDCD-4), que tiene un importante papel en la apoptosis. Su expresión también se ve reducida por el tratamiento con LPA previo a la administración de atorvastatina.

Por lo tanto, aunando los resultados se observa que el tratamiento de células endoteliales con elevadas concentraciones de atorvastatina promueve la recuperación fisiológica de los tejidos endoteliales alterados. El problema se encuentra en que este tratamiento también promueve la apoptosis de gran parte de las células tratadas provocando la desorganización del tejido. La activación del endotelio con LPA previo al tratamiento con altas concentraciones de atorvastatina, provoca modificaciones en el endotelio que conllevan a una reducción de la muerte producida por este compuesto. Por el contrario esta protección no impide

la recuperación del patrón de expresión fisiológico lo que lo convierte en un tratamiento adecuado para la recuperación de tejidos alterados.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

a) un activador endotelial, y

b) una estatina, o una sal o un éster de la misma.

2. Composición según la reivindicación 1 donde la estatina se selecciona de la lista que comprende: pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina, rosuvastatina o lovastatina.

3. Composición según las reivindicaciones 1 a 2 donde la estatina es atorvastatina.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el activador endotelial se selecciona de la lista que comprende TNFα, esfingosina-1-fosfato, un análogo de la misma, o el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

5. Composición según la reivindicación 4 donde el activador endotelial es el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal del mismo.

6. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la elaboración de un medicamento.

7. Uso de la composición según la reivindicación 6 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial.

8. Uso de la composición según la reivindicación 7 donde el proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial, es de la lista que comprende: arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares, procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en una forma adecuada para la administración local.

10. Uso de una composición que comprende una estatina, o una sal o un éster de la misma para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial, cuando las células endoteliales están activadas.

11. Uso de la estatina según la reivindicación 10 donde el proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial es de la lista que comprende: arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares, procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

12. Uso de la estatina según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11 en una forma adecuada para la administración local.

13. Preparación combinada para su uso secuencial que comprende:

c) primero, un activador endotelial, y

d) segundo, una estatina, o una sal o un éster de la misma.

14. Preparación combinada según la reivindicación 13 donde la estatina se selecciona de la lista que comprende: pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina, rosuvastatina o lovastatina.

15. Preparación combinada según las reivindicaciones 13 ó 14 donde la estatina es atorvastatina.

16. Preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15 donde el activador endotelial se selecciona de la lista que comprende TNFα, esfingosina-1-fosfato, un análogo de la misma, o el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal de dicho ácido.

17. Preparación combinada según la reivindicación 16 donde el activador endotelial es el ácido lisofosfatídico, un análogo o una sal del mismo.

18. Uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para la elaboración de un medicamento.

19. Uso de la preparación combinada según la reivindicación 18 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento prevención de un proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial.

20. Uso de la preparación combinada según la reivindicación 19 donde el proceso patológico asociado a angiogénesis, proliferación mio-endotelial anormal o no deseada, o a una disfunción de la barrera endotelial es de la

lista que comprende: arteriosclerosis, reestenosis de injertos cardiovasculares, procedimientos endovasculares, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), tumores sólidos, tumores hematopoyéticos, hipertensión pulmonar, pulmón de shock o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

21. Uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 en una forma adecuada para la administración local.

22. Composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

23. Composición farmacéutica que comprende una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21.

24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 que comprende además otro principio activo.

FIG. 1

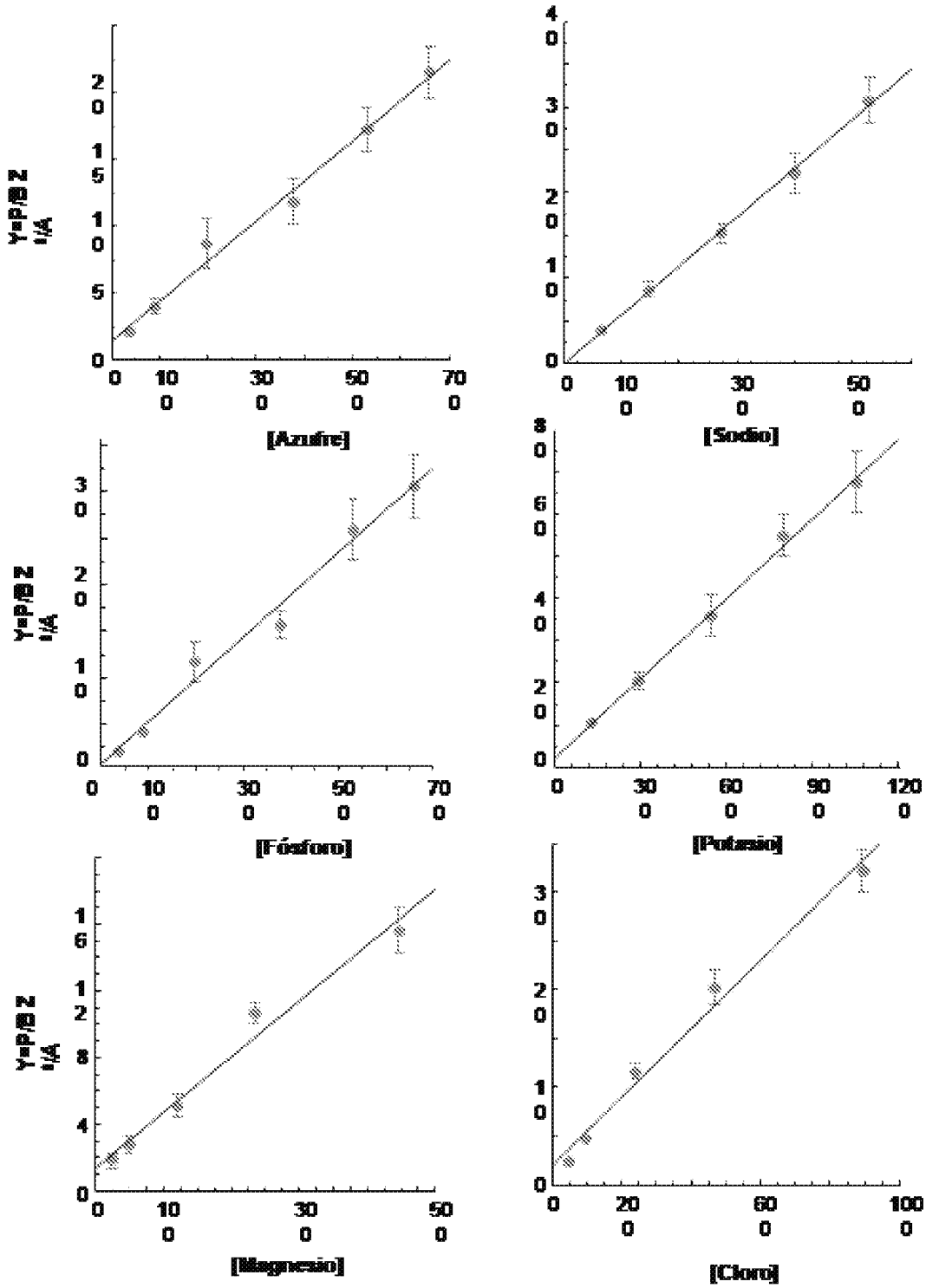


FIG.2

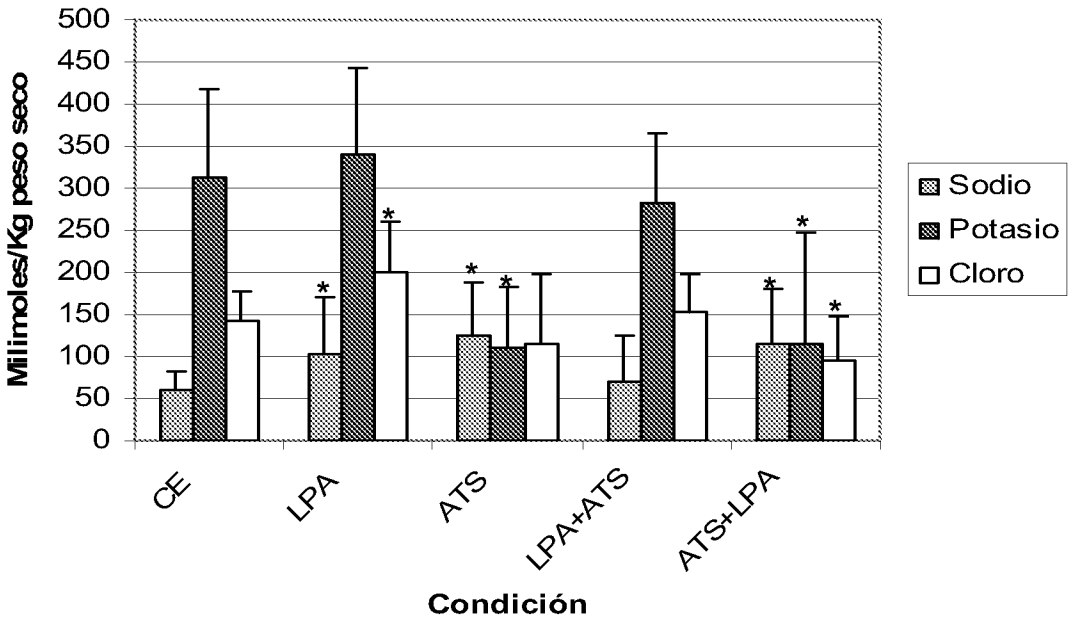

500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Milimoles/Kg peso seco
Sodio
Potasio
Cloro
CE
LPA
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
Condición

FIG.3

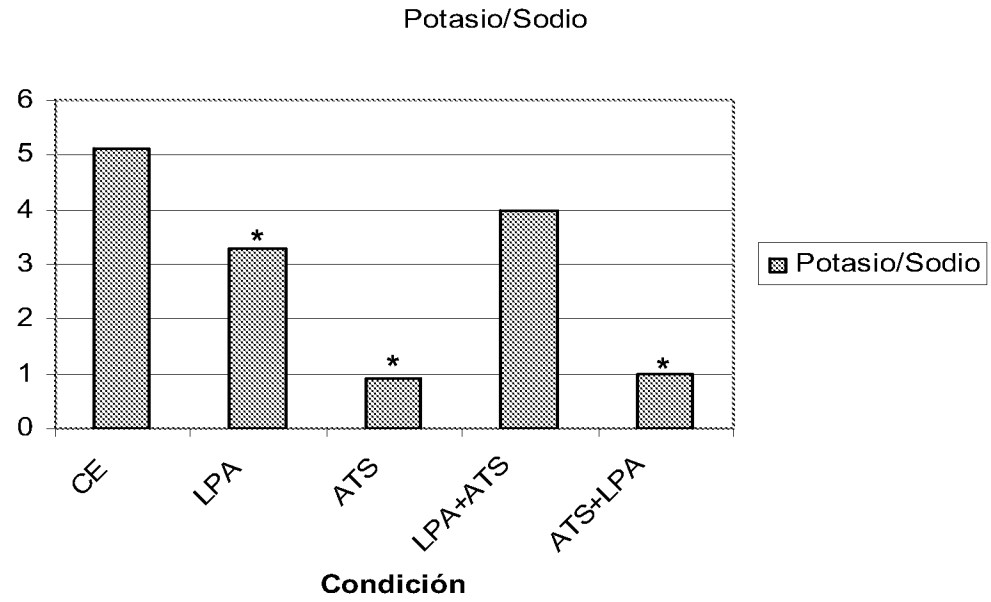

Potasio/Sodio
6
5
4
3
2
1
0
Potasio/Sodio
CE
LPA
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
Condición

FIG.4A

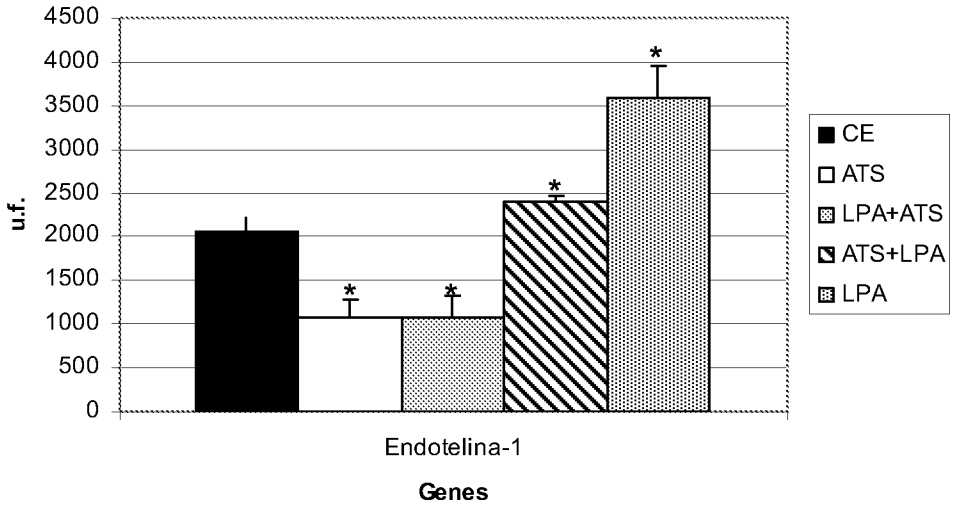

4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
u.f.
*
*
*
*
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA
Endotelina-1
Genes

FIG.4B

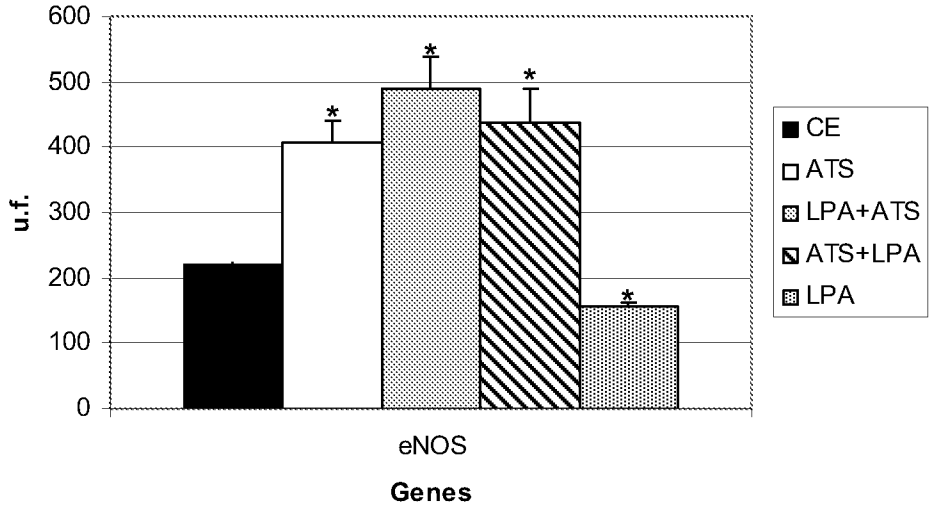

600
500
400
300
200
100
0
u.f.
*
*
*
*
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA
eNOS
Genes

FIG.5

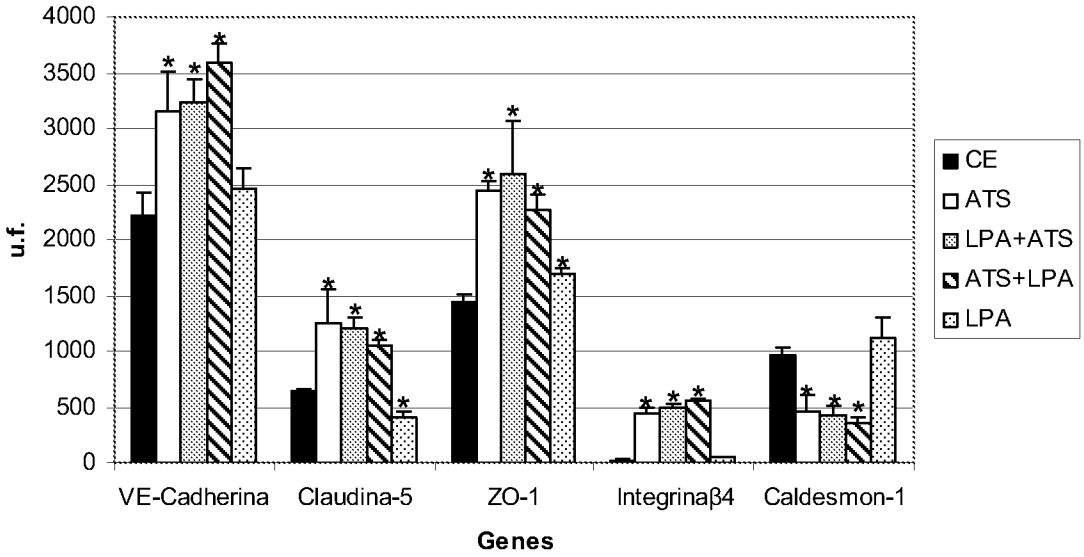

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
u.f.
VE-Cadherina
Claudina-5
ZO-1
Integrinaβ4
Caldesmon-1
Genes
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA

FIG.6

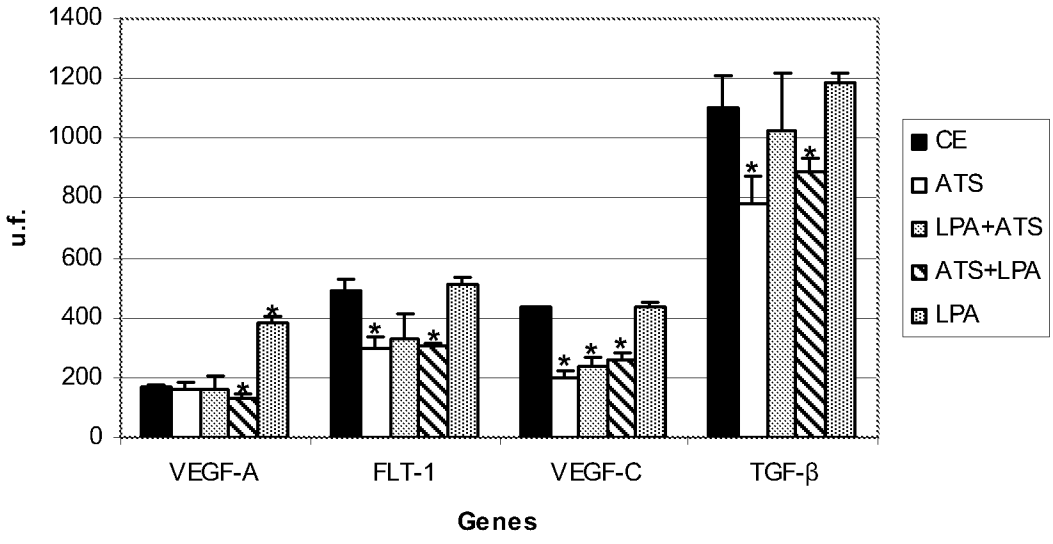

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
u.f.
VEGF-A
FLT-1
VEGF-C
TGF-β
Genes
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA

FIG.7

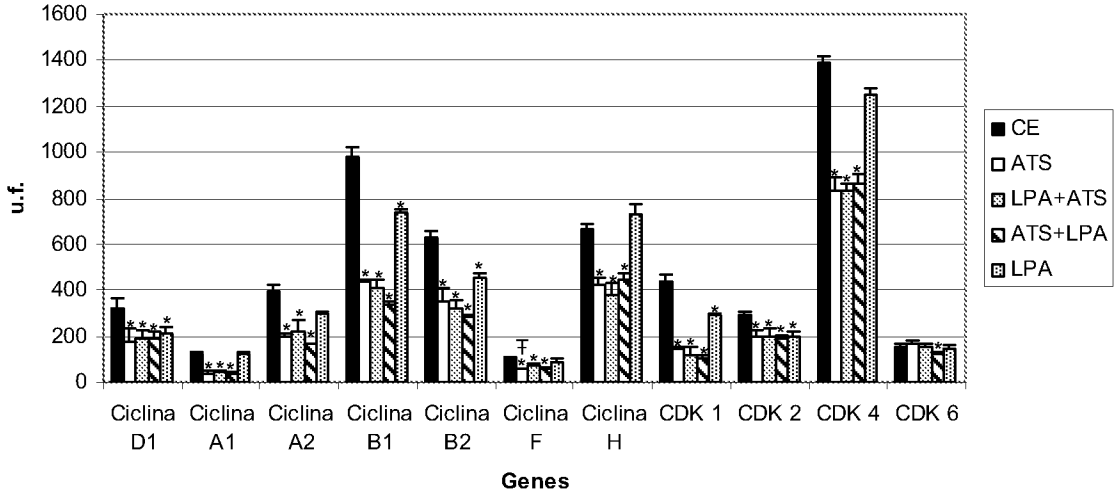
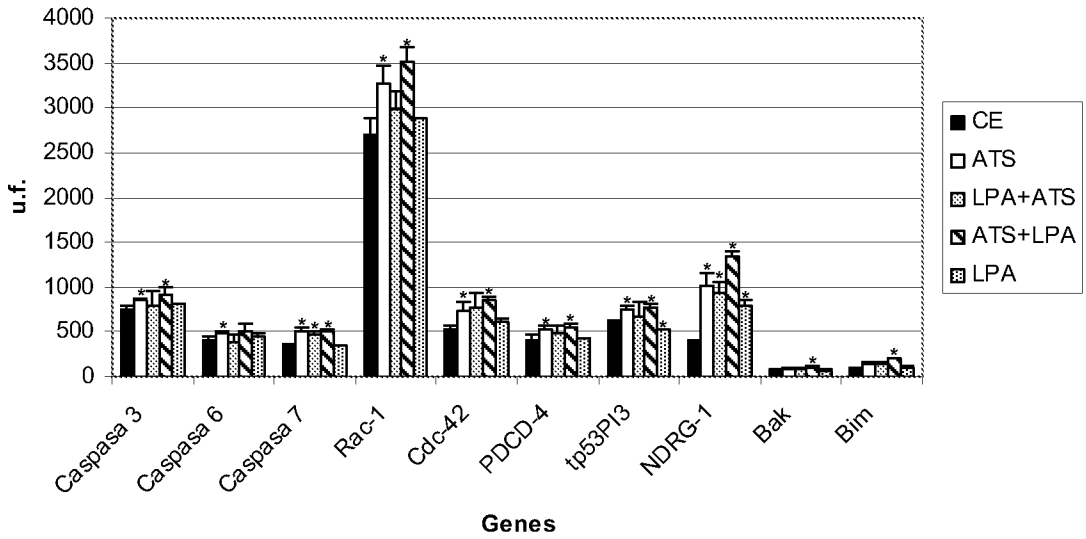

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
u.f.
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA
Ciclina D1
Ciclina A1
Ciclina A2
Ciclina B1
Ciclina B2
Ciclina F
Ciclina H
CDK 1
CDK 2
CDK 4
CDK 6
Genes

FIG. 8


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
u.f.
CE
ATS
LPA+ATS
ATS+LPA
LPA
Caspasa 3
Caspasa 6
Caspasa 7
Rac-1
Cdc-42
PDCD-4
tp53PI3
NDRG-1
Bak
Bim
Genes

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2010/070403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet
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)
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 practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRICK, M. ET AL.:"Statins differentially regulate vascular indothelial growth factor synthesis in indothelial and vascular smooth muscle cells". Atherosclerosis, 2003, vol. 170, pages 229-236, the whole document.	1-12..
Y	RIVERA-LOPEZ, C.M. ET AL.:"Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. Angiogenesis, 2008, vol. 11, pages 301-310, the whole document.	1-12.
Y	DULAK, J. ET AL.:"Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human indothelial cells". Endothelium, 2005, vol. 12, pages 233-241, the whole document.	1-12.

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08.October.2010 (08.10.2010)	**(15/10/2010)**
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer H. Aylagas Cancio Telephone No. +34 91 349 8563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070403

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHI-LOU LIN ET AL.:"Lysophosphatidic acid upregulates vascular indothelial growth factor-C and tube formation in human indothelial cells through LPA 1/3, COX-2, and NF-KB activation and EGFR transactivation dependent mechanisms". Celullar Signalling, 2008, vol. 20, pages 1804-1814, the whole document.	1-12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070403

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/661 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2010/070403

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
Y	FRICK, M. ET AL.:"Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells". Atherosclerosis, 2003, vol. 170, páginas 229-236, todo el documento.	1-12..
Y	RIVERA-LOPEZ, C.M. ET AL.:"Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. Angiogenesis, 2008, vol. 11, páginas 301-310, todo el documento.	1-12.
Y	DULAK, J. ET AL.:"Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells". Endothelium, 2005, vol. 12, páginas 233-241, todo el documento.	1-12.

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
08.Octubre.2010 (08.10.2010)	**15-OCTUBRE-2010 (15/10/2010)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado H. Aylagas Cancio Nº de teléfono +34 91 349 8563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ES 2010/070403

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
Y	CHI-LOU LIN ET AL.:"Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA 1/3, COX-2, and NF-KB activation and EGFR transactivation dependent mechanisms". Celullar Signalling, 2008, vol. 20, páginas 1804-1814, todo el documento.	1-12.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2010/070403

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/661 (2006.01)