

(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
25 de abril de 2013 (25.04.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/057357 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/50 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/nº, Edif. de Laboratorios 6º planta, E-41013 Sevilla (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070734

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avda. de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de octubre de 2012 (22.10.2012)

(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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201131699
21 de octubre de 2011 (21.10.2011) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **MORENO LUNA, Rafael**; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/nº, Edif. de Laboratorios 6º planta, E- 41013 Sevilla (ES). **MERINO RODRÍGUEZ, Ana Mª**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Edificio Consultas Externas, Nivel -1, E-14004 Córdoba (ES). **RAMÍREZ CHAMOND, Manuel Rafael**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Edificio Consultas Externas, Nivel -1, E-14004 Córdoba (ES). **VILLAR ORTIZ, José**; Instituto

(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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, 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))

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING DRUGS OF USE IN THE TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASES

(54) Título : MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

(57) Abstract: The present invention relates to methodologies for identifying treatments suitable for cardiovascular pathological conditions, with methods for determining the cardiovascular risk in a subject, with methods for monitoring the response of a subject to a treatment aimed at treating a cardiovascular pathological condition or a pathological condition involving an associated cardiovascular risk by means of the determination of the degree of proliferation and/or differentiation of endothelial precursor cells (EPCs) in the presence of serum from patients to whom said treatment has been given. Also covered are not only pharmacological treatments but also dietary or physical treatments indicated for cardiovascular pathological conditions.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con metodologías para la identificación de tratamientos adecuados para patologías cardiovasculares, con métodos para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto, con métodos para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado mediante la determinación del grado de proliferación y/o diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) en presencia del suero de pacientes a los que se les ha administrado dicho tratamiento. Se contemplan tanto tratamientos farmacológicos como dietéticos o físicos indicados para patologías cardiovasculares.



WO 2013/057357 A1

MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se relaciona con metodologías para la identificación de tratamientos adecuados para patologías cardiovasculares. Para ello, se determina el grado de proliferación y/o diferenciación de un cultivo de células precursoras endoteliales (EPCs) en presencia del suero de un paciente del que se desea saber si responde positivamente a dicho tratamiento. La presente invención contempla tanto tratamientos farmacológicos como dietéticos o físicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad del mundo y se espera que lo sigan siendo debido al aumento de su prevalencia en los países con menos recursos y al envejecimiento de la población. La OMS estima que en 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por enfermedad cardiovascular (ECV), sobre todo por cardiopatías y accidente vascular cerebral (AVC), y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte. En el trastorno cardiovascular interaccionan la susceptibilidad genética del individuo con los factores ambientales (tabaquismo, sedentarismo y dieta).

20

Los factores de riesgo cardiovascular tienen un efecto directo sobre la biología de las células precursoras del endotelio (EPCs) (Everaert *et al.* Journal of Cardiology 2010; 144(3):350-366).

25

Las EPCs son células progenitoras con capacidad de diferenciarse a células endoteliales funcionales y que constituyen una población muy pequeña de las células circulantes. Las EPCs se encuentran en una concentración de alrededor de 2-5 células por mililitro de sangre de cordón umbilical humano, y en una concentración de aproximadamente 0,05 a 0,2 células por mililitro en sangre periférica de adulto. Tanto la baja frecuencia de EPCs en circulación como la falta de un conjunto único de marcadores

30

celulares distintivos han hecho del aislamiento de EPCs por citometría de flujo o de otro tipo de técnicas inmunológicas muy difícil.

La cuantificación, análisis y obtención de las EPCs se ha convertido en uno de los principales retos de la comunidad biomédica. Sin embargo, el proceso para la obtención de EPCs derivadas de la sangre no es sencillo. La mayoría de los estudios originales identifican EPCs circulantes, como las células que expresan CD34, CD133 y VEGFR2. Sin embargo, se sabe ahora que estos marcadores celulares son compartidos por las células hematopoyéticas que pueden ser movilizados en la circulación de la médula ósea a los sitios de origen de la neovascularización. Aunque los tipos de células hematopoyéticas y endoteliales son fundamentalmente diferentes, muchos estudios se han referido a las células adherentes de sangre o de hueso derivadas de la médula ósea que expresan marcadores como CD34, CD133 y VEGFR-2 como EPCs.

Como resultado, la metodología de mayor éxito para aislar EPCs se basa en métodos similares a los descritos originalmente para la obtención de células endoteliales (EC) de sangre periférica (Lin Y *et al.* J Clin Invest 2000; 105:71-77). EPCs obtenidas por esta metodología son fenotípicamente indistinguibles de cultivo EC maduro en términos de la morfología de adoquines y la expresión de moléculas de adhesión y receptores (Melero-Martín JM *et al.* Blood 2007; 109:4761-4768). Sin embargo, en ensayos funcionales, las EPCs exhiben mayor actividad migratoria y proliferativa en comparación con células endoteliales derivadas de la vasculatura existente (Khan ZA *et al.* Blood 2006; 108:915-921).

Teniendo en cuenta el efecto que los factores de riesgo cardiovascular tienen sobre la biología de las EPCs, se han descrito distintas metodologías para la identificación de compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares basados en el estudio de EPCs. Así, Vasa M. *et al* han descrito que las EPCs pueden ser utilizadas como marcadores de disfunción endotelial durante el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Vasa M. *et al* 2001 Circulation Research; 89:E1-7). De igual modo, los documentos WO2004045517 y WO2009075566 describen métodos para el diagnóstico de una enfermedad cardiovascular basados en la detección de EPCs activadas en una muestra de

fluido circulante. US2004110241 y Deschaseaux *et al.* Journal of Pharmacology 2007; 562(1-2):111-118 describen el efecto del tratamiento con fármacos tales como estatinas sobre el grado de activación de las EPCs obtenidas de dichos pacientes. Sin embargo, estos métodos requieren el aislamiento de las EPCs del sujeto objeto de estudio así como el uso de
5 medios de cultivo comerciales de composición desconocida y de alto coste.

Sin embargo, y a pesar de los tratamientos disponibles hasta la fecha, la tasa de incidencia de las enfermedades cardiovasculares es aún elevada. Por lo tanto, debido a la alta prevalencia y a la gravedad de las enfermedades cardiovasculares, es necesario el desarrollo
10 de terapias alternativas a las existentes que permitan reducir la tasa de incidencia y/o los efectos de las enfermedades cardiovasculares.

Por todo ello, a la vista del estado actual de la técnica, se hace necesario proporcionar metodologías que permitan predecir la eficacia de los potenciales tratamientos dirigidos a
15 patologías cardiovasculares o a patologías con riesgo cardiovascular asociado en sujetos que presentan dichas patologías o que tienen un alto riesgo de desarrollarlas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

20 La invención se relaciona en primer aspecto con un método para la identificación de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:

(i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en
25 contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y

(ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es
30 adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

En un segundo aspecto, la invención está relacionada con un método para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:

- 5 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs, en donde una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto
10 tiene un alto riesgo cardiovascular.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende

- 15 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs,
20 en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación
25 de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de
30 células precursoras endoteliales (EPCs) y hasta obtener una población de células endoteliales,

- (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
- (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,

- (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs

en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

En un último aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,

- (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

La **Figura 1** muestra cultivos de células obtenidos a partir de fracción de las células mononucleares (MNC) aisladas de una población control sin antecedentes de riesgo cardiovascular, cultivadas con muestras de suero de los pacientes obtenidas previo al tratamiento y al concluir el mismo, al cabo de 1-2 semanas de cultivo con dicho suero. Se observó que el número de colonias (conocidas como EPC tempranas) del cultivo correspondiente al post-tratamiento es mayor que el número de colonias en el caso del pre-tratamiento, aunque en todo caso no alcanzó el número obtenido en el control sano.

La **Figura 2** muestra una representación gráfica de muestras de cultivos de células obtenidos a partir de fracción de las MNC aisladas de una población control sin antecedentes de riesgo cardiovascular, cultivadas con muestras de suero de los pacientes obtenidas previo al tratamiento y al concluir el mismo, al cabo de 1-2 semanas de cultivo con dicho suero. Se observó que el número de colonias (conocidas como EPC tempranas) del cultivo correspondiente al post-tratamiento es mayor que el número de colonias en el caso del pre-tratamiento, aunque en todo caso no alcanzó el número obtenido en el control sano

La **Figura 3** muestra cultivos de células obtenidos a partir las MNC aisladas de una población control sin antecedentes de riesgo cardiovascular, cultivadas con muestras de suero de los pacientes obtenidas previo al tratamiento y al concluir el mismo, al cabo de 3-4 semanas de cultivo con dicho suero. Se observó que los controles se encontraban recubiertos por una monocapa de células endoteliales maduras con una confluencia de aproximadamente el 95%. En el caso del pretratamiento las células no formaron monocapa, mientras que en el

caso del post-tratamiento hubo zonas de monocapa pero no alcanzaron la confluencia del pocillo control.

La **Figura 4** muestra la representación del análisis por citometría de flujo del porcentaje de expresión de VEGFR2 de células caracterizadas como endoteliales maduras, de células obtenidos a partir de las MNC aisladas de una población control sin antecedentes de riesgo cardiovascular, cultivadas con muestras de suero de los pacientes obtenidas previo al tratamiento y al concluir el mismo, al cabo de 3-4 semanas de cultivo con dicho suero. Se observó un mayor porcentaje de células con expresión de VEGFR2 en los casos donde se utilizó suero post-tratamiento comparado con pre-tratamiento. Los valores no alcanzaron el del caso control.

La **Figura 5** muestra la representación del análisis por citometría de flujo del porcentaje de proliferación celular caracterizadas como endoteliales maduras, en células obtenidos a partir de las MNC aisladas de una población control sin antecedentes de riesgo cardiovascular, cultivadas con muestras de suero de los pacientes obtenidas previo al tratamiento y al concluir el mismo, al cabo de 3-4 semanas de cultivo con dicho suero. Se observó un mayor porcentaje de células proliferando cuando se utilizó el suero en pacientes post-tratamiento comparado con pre-tratamiento, siendo la diferencia estadísticamente significativa.

La **Figura 6** muestra la cuantificación del número de colonias de EPC tempranas obtenidas a partir de un cultivo de MNC obtenidas de un sujeto control en presencia de suero de pacientes SAOS antes del tratamiento (Pre-CPAP) y tras un tratamiento de 3 meses con el suero de pacientes tras el tratamiento con CPAP (Post-CPAP).

La **Figura 7** muestra la cuantificación del grado de confluencia de la monocapa de células endoteliales generadas en cultivo a partir de MNC de un sujeto control en presencia de suero de los pacientes pre-tratamiento (Pre-CPAP) y de suero de pacientes tratados (Post-CPAP).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han determinado que el suero de pacientes sometidos a diferentes tratamientos puede tener un efecto en la viabilidad y el funcionamiento de las células precursoras endoteliales, de modo que es posible identificar qué tratamientos pueden disminuir el daño vascular en diversas poblaciones de riesgo mediante la puesta en contacto del suero del paciente tratado con un cultivo con EPCs. Para ello, los inventores han desarrollado una metodología mediante la cual se cultivan estas células con el suero de pacientes obtenido tras diferentes tratamientos y se determina su capacidad de diferenciación y proliferación.

Métodos de identificación de tratamientos adecuados para patologías cardiovasculares (primer y segundo método de la invención)

15 Primer método de la invención

La invención se relaciona en un primer lugar con un método (de ahora en adelante primer método de la invención) para la identificación de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

30

El término “tratamiento”, según se usa en el contexto de esta memoria, significa administración de un compuesto y/o aplicación de una terapia para aliviar o eliminar la

patología cardiovascular o la patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha patología. El término “tratamiento” también abarca aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

5 En una realización particular del séptimo método de la invención, el tipo de tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto se selecciona del grupo formado por farmacológico, dietético o físico.

10 La expresión “patología cardiovascular”, según se usa en la presente invención, se refiere a aquella patología del corazón y del sistema de vasos sanguíneos (arterias, capilares y venas) de todo el organismo.

Las patologías cardiovasculares se clasifican en cuatro tipos generales: enfermedades
15 isquémicas del corazón, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades vasculares periféricas y otras enfermedades (Corella, D y Ordovás JM, 2007, Investigación y Ciencia). Las dos primeras, son responsables de más del 60% de la mortalidad cardiovascular total.

Las enfermedades isquémicas del corazón se deben a un estrechamiento progresivo
20 de la luz de las arterias coronarias, causado por la formación de la placa de ateroma. Existen placas frágiles que se rompen con facilidad y otras más resistentes. La obstrucción total de la arteria provoca la interrupción de la circulación de la sangre o isquemia, si este estado se prolonga se destruye el tejido cardíaco dando lugar a la zona de necrosis o infarto.

25 Las enfermedades cerebrovasculares se deben a alteraciones de la circulación cerebral. Se clasifican en isquémicas o hemorrágicas. En las isquémicas se produce una disminución del flujo sanguíneo que llega a alguna región del cerebro, lo que produce necrosis tisular por daño neuronal irreversible (infarto cerebral). En las hemorrágicas existe una extravasación de sangre por rotura de algún vaso.

30

Las enfermedades vasculares periféricas son trastornos de la circulación de los vasos (arterias o venas) que irrigan las piernas o brazos. Enlentecen el flujo sanguíneo y provocan estrechamiento de los vasos, hinchazón y dolor. Puede causar isquemia. Cuando afecta a las

venas se forman coágulos de sangre, o trombos, que provocan oclusión y dan lugar a trombosis venosa. Si ese trombo se desprende, puede transportarse a los vasos de los pulmones y causar defunción por embolia pulmonar.

5 Las patologías cardiovasculares incluyen, sin limitarse, aneurisma, angina, aterosclerosis, apoplejía, enfermedad de la arteria coronaria, infarto, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía, valvulopatía, arritmia, cardiopatía congénita, muerte súbita, amiloidosis, enfermedad de Kawasaki, coartación de aorta, foramen oval permeable, síndrome de Brugada, síndrome de Marfan, ductus arterioso, transposición de grandes
10 vasos, cardiopatía coronaria, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Se define “riesgo cardiovascular” como la probabilidad de tener una enfermedad cardiovascular en un determinado periodo de tiempo. Esa probabilidad depende de los
15 factores de riesgo cardiovascular. Existen unos factores de riesgo modificables y otros que no lo son. Los factores de riesgo cardiovasculares más importantes son: el tabaco, la hipertensión arterial, el colesterol y la diabetes. Además hay otros factores de riesgo que también influyen en el riesgo cardiovascular como son: la edad y sexo del paciente, los antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares a edades tempranas, la obesidad,
20 la falta de ejercicio físico y el consumo excesivo de alcohol. La aparición en un mismo paciente de varios factores de riesgo, aunque sean de baja intensidad, aumenta la probabilidad de padecer enfermedad cardiovascular respecto a si sólo se presenta un único factor de riesgo.

25 Los factores de riesgo cardiovascular incluyen, sin limitarse a: tabaquismo, drogodependencia, colesterol, hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, dieta rica en grasa y colesterol, factores trombogénicos, proteína C-reactiva, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidad, menopausia, factores psicosociales, depresión, nivel de triglicéridos, nivel de homocisteína, consumo de alcohol, edad, sexo y antecedentes familiares.

En el contexto de la invención, una “patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado” es aquella patología que conlleva una alta probabilidad de desarrollar una patología cardiovascular en un determinado periodo de tiempo.

5 Las patologías con riesgo cardiovascular asociado incluyen, sin limitarse a, artritis reumatoide, artritis psoriática, nefropatía crónica, apnea del sueño.

En la presente invención se entiende por “sujeto” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y
10 humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto del primer método de la presente invención, el sujeto es un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular
15 asociado. En una realización preferida de la invención, el sujeto de la invención es un ser humano.

En una primera etapa, el primer método de la invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un
20 tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población.

El término “células mononucleares” o “MNCs” (*mononuclear cells*) hace referencia a
25 células que se caracterizan por la presencia de un núcleo único y redondo e incluyen, entre otros tipos celulares, linfocitos, monocitos, macrófagos, así como células precursoras tales como las células precursoras endoteliales o EPCs.

En una realización particular del primer método de la invención, las células
30 mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del primer método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. Las células mononucleares procedentes de sangre

periférica se denominan células mononucleares de sangre periférica o PBMNCs. En una realización aún más preferida del primer método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera etapa de dicho método.

5

Métodos para la purificación de MNCs son ampliamente conocidos en el estado de la técnica e incluyen, sin limitación, centrifugación en gradiente (por ejemplo, en gradientes de Ficoll tal y como se describe en WO2008077094), mediante filtración según se describe en Hibino et al. (Tissue Eng Part C Methods. 2011 17: 993-8), mediante sedimentación en presencia de agentes del tipo de hidroxietil almidón (Dinsmore RE. et al., Br J Haematol. 1983; 54: 441-449), uso de separadores de células sanguíneas (Pierelli L, et al., Bone Marrow Transplant, 1991; 7: 355-361; Faradji A. et al., Vox Sang., 1988; 55: 133-138; Gilmore MJ et al., Vox Sang. 1983; 45: 294-302 y Davis JM et al., J. Hematother., 1993; 2: 315-320) y tubos Leucosep, etc.

15

El término “suero” se refiere a aquella parte de la sangre o de la linfa que permanece líquida después de haberse producido la coagulación. Métodos de obtención de suero están ampliamente recogidos en el estado de la técnica. En los ejemplos se indica el método utilizado para la obtención del suero de la invención.

20

En la primera etapa del primer método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento cuya eficacia en para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado se desea investigar. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se puede llevar a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del primer método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del primer método de la invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del primer método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

30

Alternativamente, el primer método de la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

El término “placa de cultivo” tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, hace referencia a un soporte, en general de plástico, que comprende una superficie apta para el cultivo celular. La placa de cultivo puede estar formada por una superficie única o bien estar dividida en pocillos.

El término “polímero que promueve la adhesión celular” hace referencia a un compuesto que facilita que las células se adhieran a la superficie de la placa de cultivo. Tales polímeros comprenden, sin limitarse a, colágeno, fibronectina, laminina, poli-lisina y gelatina.

En una realización preferida del primer método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular con el cual se encuentran recubiertas las placas de cultivo es fibronectina.

La fibronectina es una glicoproteína dimérica presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos celulares animales, que está compuesta por dos subunidades muy largas unidas por puentes disulfuro situados cerca del extremo carboxilo. Cada subunidad está formada por una serie de dominios funcionalmente distintos separados por regiones polipeptídicas flexibles. Estos dominios están compuestos por módulos más pequeños que, al repetirse secuencialmente y estar codificados por un exón diferente, sugieren que el exón de la fibronectina se originó por duplicaciones exónicas múltiples.

La fibronectina para cultivo celular se encuentra disponible comercialmente: fibronectina humana (referencia PHE0023 de Invitrogen; ref. 354008 de BD; ref. F2006 de Sigma-Aldrich), fibronectina de plasma bovino (ref. 33010-018 de Invitrogen), etc. Las placas de cultivo recubiertas con fibronectina tienen diferentes aplicaciones, tales como

mejorar la fijación, diferenciación y proliferación de diversos tipos celulares. Métodos para tapizar placas de cultivo con polímeros que favorecen la adhesión celular son conocidos en el estado de la técnica. Tales placas también se encuentran disponibles comercialmente (placas de cultivo celular BD BioCoat fibronectina de VWR, microplacas de cultivo celular cubiertas de fibronectina humana de R&D Systems, placas de cultivo celular cubiertas de fibronectina de Millipore, etc.).

En una realización particular de la primera etapa del primer método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular.

La expresión “suero adecuado para el cultivo celular” según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier suero que contenga los componentes necesarios para promover la diferenciación y/o proliferación de células en cultivo. En una forma preferida de realización, el suero adecuado para el cultivo celular es un suero adecuado para el cultivo de EPCs. Estos sueros incluyen, sin limitación, suero fetal bovino, suero humano, suero de ternero, suero bovino adulto, suero de cabra, suero de pollo, suero porcino, suero de conejo, suero de oveja, suero de caballo, suero de cobaya, suero de ratón, suero de rata así como cualquiera de los anteriores sometidos a tratamiento previo tales como, por ejemplo, sueros inactivados con radiación gamma, mediante adsorción en carbón activo o mediante tratamiento a altas temperaturas, sueros tratados para eliminar total o parcialmente las inmunoglobulinas, suero deslipidizado, suero enriquecido en hierro.

25

La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero adecuado para el cultivo celular se lleva a cabo con dicho suero diluido en el medio de cultivo. En una realización preferida, de la primera etapa del primer método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

30

Alternativamente, el primer método de la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado. El término “plasma” se refiere a la parte líquida y acelular de la sangre.

La puesta en contacto de la población de MNCs con el suero del paciente al que se le ha administrado el tratamiento cuya eficacia se desea comprobar se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de las células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población de MNC.

Los términos “célula precursora endotelial”, “célula progenitora endotelial”, “EPC”, “célula precursora endotelial circulante” y “CEPC” se usan en la presente invención indistintamente para referirse a células progenitoras con capacidad de diferenciarse a células endoteliales funcionales. Pueden obtenerse a partir de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea. Están caracterizadas por su capacidad para formar túbulos y expresar marcadores característicos de células endoteliales. Entre los marcadores de estas células están CD34, CD133, CD146 o el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 (VEGFR2, CD309, KDR) (Urbich C & Dimmeler S *Circ Res* 2004; 95:343-353, Churdchomjan W *et al.* *Endocr Disord* 2010; 10:5). Pueden diferenciarse EPCs tempranas, identificadas como células que expresan CD34, CD133 y VEGFR2, y EPCs tardías, identificadas como células que han perdido la expresión de CD133 y comienzan a expresar marcadores de linaje endotelial, incluyendo vWF (factor von Willebrand), eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial, y Ve-cadherina (vascular endotelial). Las EPCs tempranas tienen una baja capacidad proliferativa y expresan CD14 y CD45, mientras que las EPCs tardías tienen una alta capacidad proliferativa (Napoli C *et al.* *Atherosclerosis* 2011; 215:9-22).

El término “diferenciación celular” de la presente invención se refiere al proceso por el que cada tipo celular expresa un perfil génico característico, que marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. Durante

dicho proceso las células sufren modificaciones citológicas que dan lugar a formas y funciones determinadas durante el desarrollo embrionario o durante la vida de un organismo pluricelular, especializándose en un tipo celular. La diferenciación celular supone un proceso biológico de especialización celular que permite que células con información genética idéntica den lugar a células diferentes entre sí, tanto estructural como funcionalmente, de acuerdo a las necesidades del organismo.

El término “condiciones adecuadas para la diferenciación celular”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las condiciones que permiten que se produzca una diferenciación de las células precursoras a células diferenciadas maduras. Condiciones adecuadas para que tenga lugar la diferenciación de EPCs incluyen, sin limitación, el cultivo en presencia de factores de crecimiento y factores de diferenciación conocidos en la técnica por su capacidad para promover la diferenciación de células precursoras. Factores de crecimiento adecuados incluyen, sin limitación factor de crecimiento de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de granulocitos-macrófago (GM-CSF), factor derivado de células del estroma 1, factor de crecimiento vascular endothelial (VEGF), TGFP, factor de creceimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiopietinas (Ang), factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteína morfogénica osea (BMP), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), interleuquinas (IL-3, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 e IL-13), factores estimuladores de colonias, trombopoyetina, eritropoyetina, FLT3 ligand y factor de necrosis tumoral (TNF). Otros ejemplos se describen en Dijke et al., "Growth Factors for Wound Healing", Bio/Technology, 7:793-798 (1989); Mulder GD, Haberer PA, Jeter KF, eds. Clinicians' Pocket Guide to Chronic Wound Repair. 4th ed. Springhouse, PA: Springhouse Corporation; 1998:85; Ziegler T.R., Pierce, G.F., and Herndon, D.N., 1997, International Symposium on Growth Factors and Wound Healing: Basic Science & Potential Clinical Applications (Boston, 1995, Sero Symposia USA), Publisher: Springer Verlag.

En una segunda etapa, el primer método de la invención comprende determinar el efecto del suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado

sobre la diferenciación de EPCs, en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

5

En el contexto del primer método de la invención, por un “aumento en el grado de diferenciación celular” se entiende un incremento de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de diferenciación celular de las EPCs en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular respecto a un cultivo de EPCs en contacto con un suero control.

15

En una realización particular, el primer método de la invención determina el grado de diferenciación celular de las EPCs mediante un método seleccionado del grupo: contaje del número de colonias de EPCs tempranas, y contaje del número de células endoteliales.

20

El término “colonia celular” hace referencia a un grupo de células con similares características que actúan en conjunto, con la excepción de que su función no es formar una unidad estructural mayor.

25

El término “colonias tempranas” en la presente referencia hace referencia a las colonias formadas tras 1 o 2 semanas de cultivo de las células mononucleares. Estas células se caracterizan por presentar algunas características de células endoteliales así como características de monocitos. Estas células expresan eNOS, CD45 y CD14 y son KDR+/bajo y CD144+/bajo. Se diferencian de las denominadas colonias tardías en que estas aparecen más tarde (a las 3 o 4 semanas de cultivo), presentan una morfología de guijarros y tienen una alta capacidad proliferativa. Las EPC tardías se caracterizan por expresar vWF, eNOS, P1H12, trombomodulina, flk-1, VE-cadherin, PECAM-I, CD34, CD36 e integrina α_v y ser KDR+ y CD144+ y por ser CD14⁻.

30

La aparición de colonias tempranas de EPCs puede ser detectado visualmente, es posible confirmar que se trata de colonias de EPCs mediante la determinación de la capacidad de las células de captar LDL acetilado (acLDL) o la capacidad de unir la lectina UEA-1.

Alternativamente, las PEC tempranas se diferencian de las EPC tardías en el tamaño de las colonias que dan lugar. Así, las colonias de EPC tempranas forman colonias menores de 20 μm de diámetro mientras que las colonias de EPC tardías forman colonias que típicamente tienen diámetros de 20-50 μm . Se entiende que se ha producido diferenciación a EPC tempranas cuando al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50% de las colonias son colonias de EPC tempranas que presentan una o varias de las características mencionadas anteriormente.

15

El término “célula endotelial” hace referencia a un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo los capilares, formando parte de su pared (también vasos linfáticos, cavidades corporales, etc). Las células endoteliales constituyen el endotelio, un tipo de epitelio plano monoestratificado. Se denomina endotelio vascular al epitelio que tapiza en interior de los vasos sanguíneos y que en los capilares constituye por sí solo la pared de dichos vasos.

Métodos para el contaje celular son ampliamente conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin limitarse a, recuento en hemocitómetro, recuento en cámara Neubauer, método de exclusión Trypan Blue, contadores automáticos (tales como Countess Automated Cell Counter de Invitrogen y Coulter Counter de Beckman Coulter,), etc.

El término “suero control” empleado en el primer método de la invención se refiere a un suero obtenido de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.

30

En una realización particular, el suero control del primer método de la invención es un suero obtenido a partir de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna. En una realización particular alternativa, el suero control es el suero extraído del sujeto que padece una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado antes de iniciar el tratamiento para dicha patología cardiovascular.

Segundo método de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (de ahora en adelante segundo método de la invención) para la identificación de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:

(i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) y hasta obtener una población de células endoteliales,

(ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,

en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

25

Los términos “sujeto”, “tratamiento”, “patología cardiovascular” y “riesgo cardiovascular” se emplean en el contexto de la segunda invención tal y como han sido definidos anteriormente. En una realización preferida, el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético y un tratamiento físico, tal como han sido descritos anteriormente. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

30

En el contexto del segundo método de la presente invención, el sujeto es aquel al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

5 En una primera etapa del segundo método de la invención, se pone en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) y
10 hasta obtener una población de células endoteliales.

Los términos “célula mononuclear”, “suero”, “célula endotelial”, “célula precursora endotelial” y “diferenciación” se emplean en el contexto de la primera etapa del segundo método de la invención tal y como se han descrito previamente.

15

En una realización particular del segundo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del segundo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del segundo
20 método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares han sido descritos anteriormente.

25 En la primera etapa del segundo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero de lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En
30 una realización particular de la primera etapa del primer método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del primer método de la

invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del primer método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

5 Alternativamente, el segundo método de la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

10 En una realización particular de la primera etapa del segundo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con
15 dicho suero de lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del segundo método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de
20 realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

En una segunda etapa del segundo método de la invención, se pone en contacto la población de células endoteliales obtenido en la primera etapa de dicho método con el suero
25 del sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de
30 que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

El término “suero control” empleado en el segundo método de la invención se refiere a un suero obtenido de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.

5 En una realización particular, el suero control del segundo método de la invención es un suero obtenido a partir de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna. En una realización particular alternativa, el suero control es el suero extraído del sujeto que padece una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado antes de iniciar el tratamiento para dicha patología cardiovascular.

10

El término “proliferación celular” de la invención se refiere al incremento del número de células mediante división celular.

El término “condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales”,
15 según se usa en la presente invención, se refiere a las condiciones (medio de cultivo, temperatura, pH, etc.) que permiten que se produzca un incremento del número de células por división celular. Condiciones adecuadas para que tenga lugar la proliferación de EPCs incluyen, sin limitación, incubación a 37° C y 5% CO₂, en medio de cultivo que contiene EBM-2 (Endothelial cell Basal Medium-2) suplementado con suero fetal bovino
20 descomplementado o con factores de crecimiento tales como los que aparecen en el EGM-2 SingleQuots (Endothelial Growth Medium-2, todos excepto hidrocortisona). Alternativamente, es posible el uso de suero humano, alogénico o autólogo o plasma suplementado con heparina en lugar de suero bovino fetal.

25 Otros métodos para el cultivo y expansión de EPCs han sido descritos por Jonathan M. et al., 2003, NEJM, 348:593-600; Eggermann, 2003, Cardiovasc Res., 58: 478-86; Hristov, et al., 2003, Trends in Cardiovascular Medicine 13: 201-6; Arnelia Casamassimi et.al, 2007, J. Biochemistry, 141: 503-11; la patente en EEUU US5980887 y las solicitudes de patente en EEUU con número de publicación 20030194802, 20060035290, and
30 2006010385, que se incorporan a la presente solicitud por referencia.

Métodos para determinar condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales están ampliamente recogidos en el estado de la técnica e incluyen, sin limitarse a, contaje del número de células en cultivo, medida de la incorporación de un análogo de nucleótido marcado radiactivamente a la síntesis de DNA *de novo*, tinción celular y análisis mediante citometría de flujo, detección de antígenos asociados a proliferación como Ki-67, incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), tinción con yoduro de propidio, reducción de una sal de tetrazolium, etc.

En una realización particular del segundo método de la invención, el grado de proliferación de las células endoteliales se determina mediante contaje del número de células endoteliales. En una realización preferida, el contaje del número de células endoteliales se lleva a cabo mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales. En una realización aún más preferida, el marcador de células endoteliales se selecciona del grupo formado por CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM), VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1), CD144 (*vascular endothelial cadherin*).

En el contexto de la presente invención, por un “aumento en el grado de proliferación celular” se entiende un incremento de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de proliferación celular de un cultivo con EPCs puesto en contacto con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular respecto a un cultivo con EPCs en presencia de un suero control.

Método de determinación del riesgo cardiovascular (tercer y cuarto método de la invención)

30

Tercer método de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (de ahora en adelante tercer método de la invención) para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:

5 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y

(ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs, en donde una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un 10 cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

El término “riesgo cardiovascular” se emplea en el contexto del tercer método de la invención tal como ha sido definido previamente.

15

El término “sujeto” se ha definido anteriormente. En el contexto del tercer método de la presente invención, el sujeto es aquel cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

20

La primera etapa del tercer método de la invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares con el suero del sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población.

25

Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación”, y “condiciones adecuadas para la diferenciación” se utilizan tal como han sido definidos anteriormente. Las condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como los métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos previamente.

30

En una realización particular del tercer método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En

una realización preferida del tercer método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del tercer método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera
5 etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

En la primera etapa del tercer método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular
10 pretende determinarse. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del tercer método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del tercer método de la invención, la placa de
15 cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del tercer método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una
20 realización particular del tercer método de la invención, el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular quiere determinarse se pone en contacto con la población de células mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

25 Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular quiere determinarse.

En una realización particular de la primera etapa del tercer método de la invención, la
30 población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho

suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del tercer método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

La segunda etapa del tercer método de la invención comprende determinar el efecto del suero del sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse sobre la diferenciación de las EPCs, en donde una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

En el contexto del tercer método de la invención, por una “disminución del grado de diferenciación celular” se entiende un descenso de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de diferenciación celular de un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control.

En una realización particular, el tercer método de la invención determina el grado de diferenciación celular de las EPCs mediante un método seleccionado del grupo: contaje del número de colonias de EPCs tempranas, y contaje del número de células endoteliales. Métodos de contaje de colonias de EPCs tempranas y de contaje del número de células endoteliales se han descrito con anterioridad.

El término “suero control” empleado en el tercer método de la invención se refiere a un suero obtenido de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna o de un sujeto que carece de riesgo cardiovascular.

5 Cuarto método de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (de ahora en adelante, cuarto método de la invención) para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:

- 10 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
- 15 (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,
- en donde una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que
- 20 dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

El término “riesgo cardiovascular” se emplea en el contexto del cuarto método de la invención tal como ha sido definido previamente.

25 El término “sujeto” se ha definido anteriormente. En el contexto del cuarto método de la presente invención, el sujeto es aquel cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

30 La primera etapa del cuarto método de la invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares con el suero del sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones

adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales.

Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación”,
5 y “condiciones adecuadas para la diferenciación” se utilizan tal como han sido definidos anteriormente. Las condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como los métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos previamente.

En una realización particular del cuarto método de la invención, las células
10 mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del cuarto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del cuarto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera
15 etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

En la primera etapa del cuarto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular
20 pretende determinarse. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del cuarto método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del cuarto método de la invención, la placa de
25 cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del cuarto método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una
30 realización particular del cuarto método de la invención, el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular quiere determinarse se pone en contacto con la población de células

mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular quiere determinarse.

En una realización particular de la primera etapa del cuarto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del cuarto método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

La segunda etapa del cuarto método de la invención comprende poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la primera etapa de dicho método con el suero del sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

En el contexto del cuarto método de la invención, por una “disminución del grado de proliferación celular” se entiende un descenso de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el

90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de proliferación celular de un cultivo de células endoteliales obtenidas en la primera etapa y puesto en contacto con el suero de un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control.

5

En una realización particular, el cuarto método de la invención determina el grado de proliferación celular de las células endoteliales mediante conteo del número de células endoteliales. En una realización preferida, el conteo del número de células endoteliales se lleva a cabo mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales. En una realización aún más preferida, el marcador de células endoteliales se selecciona del grupo formado por CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM), VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1), CD144 (*vascular endothelial cadherin*).

15

El término “suero control” empleado en el tercer método de la invención se refiere a un suero obtenido de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna o de un sujeto que carece de riesgo cardiovascular.

20 Métodos de monitorización de la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a patologías cardiovasculares (quinto y sexto método de la invención)

Quinto método de la invención

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende

- 30
- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
 - (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs,

en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

5 Los términos “tratamiento”, “patología cardiovascular”, “riesgo cardiovascular”, y “diferenciación” se emplean tal como han sido definidos previamente.

En una realización preferida del quinto método de la invención, el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético
10 y un tratamiento físico.

En una realización particular del quinto método de la invención, el tratamiento de tipo farmacológico incluye, sin limitarse a:

- 15 - fármacos empleados en el tratamiento de las hiperlipoproteinemias, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (itarvastatina, NK-104, pitavastatina, rosuvastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, simvastatina), inhibidores de escualeno sintasa y escualeno ciclase, inhibidores de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (BMS-
20 201030), inhibidores de la reabsorción de ácidos biliares (colesevelam), activadores de la proteína lipasa (NO-1886), inhibidores de ACAT (avasimiba, CS-505, F-12511, F-1394, TS-892), inhibidores de la absorción/reabsorción de colesterol (ezetimiba, fitosteroles, fitostanoles), inhibidores del transporte de ácidos biliares en el íleon (S-8921), aumentadores de la síntesis de HDL (CI-
25 1027), inhibidores de CEPT, agonistas de PPAR α y γ (tiazolidinedionas).
- fármacos empleados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 tales como el inhibidor de la dipeptidil peptidada-4 (DPP-4) sitagliptina,
- fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial tales como
30 diuréticos tiazídicos (clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida, xipamida), diuréticos de asa (furosemida, piretanida, torasemida), diuréticos distales (amiloride, espironolactona, triamterene), betabloqueantes (atenolol, bisoprolol, carteolol, celiprolol, metoprolol, nebivolol, oxprenolol, propanolol), alfa-

- betabloqueantes (carvedilol, labetalol), antagonistas del calcio dihidropiridínicos (amlodipino, barnidipino, felodipino, isradipino, lacidipino, lercanidipino, manidipino, nicardipino, nifedipino, nisoldipino, nitrendipino), antagonistas del calcio no dihidropiridínicos (diltiazem, verapamil), inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina o IECA (benazepril, captopril, cilazapril, enalapril, 5 espirapril, fosinopril, imidapril, perindopril, quinapril, ramipril, trandolapril, zofenopril), antagonistas de los receptores de la angiotensina II o ARA II (candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesaltrán, telmisaltrán, valsartán) y otros tales como alfabloqueantes (doxazosina, prazosina, terazosina, 10 urapidil), fármacos de acción central (alfametildopa, clonidina, moxonidina) y vasodilatadores arteriales (hidralacina, minoxidil)
- fármacos empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca tales como péptidos natriuréticos auriculares (nesiritida, vasonatrida, anaritida, mini ANP), inhibidores de vasopeptidasas (omapatrilato, fasidotriilo, mixanprilo, sampatrilato, 15 CGS30440, MDL100,240, Z13752A, antagonistas de los receptores de la endotelina (darusentán, sitasentán, A127722, BQ-123, EMD1229646/94246, PD151242/182874 para ET_A, A192621, BQ788, IRL2500/2659, Ro468443 para ET_B, bosentán, enrasertán, tazosentán, BQ-610, L749329/745142, PD145065/142983 para ET_A/ET_B), antagonistas de TNF α (pentoxifilina, 20 FR167653, candesartán, β -bloqueantes), antagonistas de los receptores de la vasopresina (conivaptán, tolvaptán (OPC-41061), OPC-31260, VPA-985, SR-121463), antagonistas de la aldosterona (eplerenona), antagonistas de los receptores A1 (BF9714), simpaticolíticos (nepicastat, nolomirona), fármacos que mejoran el metabolismo cardíaco (carnitina, etoxomir, hormona del crecimiento, ranolazina), antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II (candesartán, eprosartán, forasartán, irbesartán, olmesartán, ripisartán, tasesartán, telmisartán), nuevos inotrópicos positivos (levosimendán), inhibidores de metaloproteinasas (hidroxamatos como batimastat, ilomastat, marimastat y prinomastat, β -bloqueantes, glucocorticoides, tetraciclinas, CP-471,474, 25 PD166793), antagonistas de la plasmina.
 - fármacos empleados en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos, tales como anticoagulantes (inhibidores de la antitrombina III como las heparinas de 30

- bajo peso molecular ardeparina, certoparina, nadroparina, logiparina, parnaparina, reviparina y tedelparina, y la antitrombina III recombinante; inhibidores del complejo factor tisular (TF)-factor VIIa tales como mutantes del TF, anticuerpos anti-TF, sobreexpresión del inhibidor de la vía del TFrPI, NaPc2 e inhibidores del factor VII; inhibidores de la trombina tales como los inhibidores del factor Xa antistatina, TAP (tick anticoagulant peptide), DX9065, lefaxina, fondaparinux, terostatina, YM-75466 y ZK-807834, anticuerpos contra el factor IXa y Xa, activadores de la vía de la proteína C e inhibidores selectivos de la trombina como argatrobán, bivaluridina, efegatrán, H376/95, hirugén, inogatrán, melagatrán, napsagatrán, UK-156406 y ximelagatrán), antiagregantes plaquetarios (XV459, roxifibán), fibrinolíticos y fármacos cardioprotectores.
- fármacos empleados en el tratamiento del proceso inflamatorio de la placa de ateroma tales como antagonistas de la interacción leucocito-endotelio, de selectina, integrinas y citoquinas; inhibidores de la expresión de moléculas de adhesión o la activación de NF- κ B.
 - fármacos empleados en el tratamiento de las arritmias tales como bloqueantes selectivos de la I_{Kr} (dofetilida, ibutilida, trecetilida), bloqueantes de la I_{Kr} y de los $R\beta 1$ (sotalol, ersentalida), bloqueantes selectivos de la I_{Kir} y fármacos con múltiples acciones (ambasilida, azimilida, BRL-32872, clofilium, ibutilida, dronedarona, tedisamilo, trecetilida).

En una realización particular del primer método de la invención, el tratamiento de tipo dietético incluye, sin limitarse a: consumo de vino tinto, té verde, astragalus, extracto de GojiBerry, *Lactobacillus fermentum*, ácido elágico, beta-1,3-glucano, vitamina D3 (Stem-Kine, RBC Life), ácidos grasos omega 3, dieta mediterránea y dieta suplementada con flavonoides de cacao.

En una realización particular del primer método de la invención, el tratamiento de tipo físico incluye, sin limitarse a: ejercicio físico, CPAP (presión positiva continua en la vía aérea), stent coronario, trasplante de EPCs autólogas, trasplante de EPCs transcoronarias, infusión intracoronaria de EPCs.

En la presente invención, el término “monitorizar la respuesta” se refiere a un seguimiento de la evolución de una patología, en particular de una patología cardiovascular o de una patología que conlleva un riesgo de patología cardiovascular.

5 En la presente invención se entiende por “sujeto” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto del tercer método de la
10 presente invención, el sujeto es un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

La primera etapa del quinto método de la invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares con el suero del sujeto cuya respuesta a un
15 tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población.

20 Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación”, y “condiciones adecuadas para la diferenciación” se utilizan tal como han sido definidos anteriormente. Las condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como los métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos previamente.

25 En una realización particular del quinto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del quinto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del quinto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de
30 una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

En la primera etapa del quinto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del quinto método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del quinto método de la invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del quinto método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una realización particular del quinto método de la invención, el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse se pone en contacto con la población de células mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

20

Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse.

25

En una realización particular de la primera etapa del quinto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero

30

de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del quinto método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

La segunda etapa del quinto método de la invención comprende determinar el efecto del suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse sobre la diferenciación de las EPCs, en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

En el contexto de la presente invención, por un “aumento del grado de diferenciación celular” se entiende un aumento de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de diferenciación celular de un cultivo con EPCs puesto en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular quiere monitorizarse con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero de dicho sujeto antes de ser tratado.

25

En una realización particular, el quinto método de la invención determina el grado de diferenciación celular de las EPCs mediante un método seleccionado del grupo: contaje del número de colonias de EPCs tempranas, y contaje del número de células endoteliales. Métodos de contaje de colonias de EPCs tempranas y de contaje del número de células endoteliales se han descrito con anterioridad.

30

Sexto método de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (de ahora en adelante sexto método de la invención) para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
 - (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,
- en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

Los términos “tratamiento”, “monitorizar la respuesta”, “patología cardiovascular”, “riesgo cardiovascular”, “diferenciación” y “proliferación” se emplean tal como han sido definidos previamente.

En la presente invención se entiende por “sujeto” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto del sexto método de la presente invención, el sujeto es un sujeto cuyo riesgo cardiovascular pretende determinarse. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

La primera etapa del sexto método de la invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva

un riesgo cardiovascular asociado pretende monitorizarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales.

5

Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación”, y “condiciones adecuadas para la diferenciación” se utilizan tal como han sido definidos anteriormente. Las condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como los métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos previamente.

10

En una realización particular del sexto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del sexto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del sexto método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

20

En la primera etapa del sexto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del sexto método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del sexto método de la invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del sexto método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

30

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una realización particular del sexto método de la invención, el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse se pone en contacto con la población de células mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse.

En una realización particular de la primera etapa del sexto método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular pretende monitorizarse en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con el suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del quinto método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

25

La segunda etapa del sexto método de la invención comprende poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en primera etapa de dicho método con el suero del sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o a una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado pretende monitorizarse, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde un aumento en el grado de proliferación de

30

las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.

En el contexto de la presente invención, por un “aumento del grado de proliferación celular” se entiende un aumento de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de proliferación celular de las células endoteliales en contacto con el suero de un sujeto cuya respuesta a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular quiere monitorizarse con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado

En una realización particular, el sexto método de la invención determina el grado de diferenciación celular mediante conteo del número de células endoteliales. En una realización preferida, el conteo del número de células endoteliales se lleva a cabo mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales. En una realización aún más preferida, el marcador de células endoteliales se selecciona del grupo formado por CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM), VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1), CD144 (*vascular endothelial cadherin*).

Métodos de terapia personalizada (séptimo y octavo métodos de la invención)

25

Séptimo método de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

30

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs

5 en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

10 Alternativamente, la invención se relaciona con un compuesto terapéutico vascular para su uso en el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs

15 en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

20

25 Alternativamente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho tratamiento se aplica a un sujeto identificado mediante un método que comprende

- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población y
- (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs
- 30

en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

5 Los términos “tratamiento”, “patología cardiovascular” y “riesgo cardiovascular se emplean en el contexto del séptimo método de la invención tal como han sido definidos anteriormente.

10 En el contexto del séptimo método de la presente invención, el sujeto es aquel identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

15 El término “compuesto terapéutico vascular” se define como aquel compuesto que es utilizado para aliviar o eliminar la patología cardiovascular o la patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha patología, o aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

20 En la primera etapa del séptimo método de la invención, se pone en contacto una población de células mononucleares con el suero del sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular, en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población.

25 Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación celular” y “condiciones adecuadas para la diferenciación celular” han sido definidos previamente. Condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos anteriormente.

30 Los modos de administración de un compuesto incluyen, sin limitarse a, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular. La vía de administración más adecuada en cualquier caso dado depende de la duración del estado del sujeto, la longitud del tratamiento deseado, la naturaleza y la gravedad del estado

que está tratándose, y la formulación particular que está usándose. Una revisión de diferentes métodos de administración de compuestos, principios activos, excipientes que van a usarse y procedimientos para producirlos pueden encontrarse en “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

5

En una realización particular del séptimo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del séptimo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del séptimo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la primera etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

15 En la primera etapa del séptimo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero del sujeto se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del séptimo método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del séptimo método de la invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del séptimo método de la invención, el polímero que
20
25 promueve la adhesión celular es fibronectina.

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una realización particular del séptimo método de la invención, el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular se pone en contacto con la población de células mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

30

Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular.

5

En una realización particular de la primera etapa del séptimo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en
10 contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del séptimo método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2,
15 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

En la segunda etapa del séptimo método de la invención, se determina el efecto de del suero del sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el
20 compuesto terapéutico vascular sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs, en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación celular de las células EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

25 En el contexto de la presente invención, por una “disminución del grado de diferenciación celular” se entiende un descenso de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al
30 menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de diferenciación celular de las EPCs con respecto al grado de diferenciación resultante de la puesta en contacto de dicha población con un suero control.

En una realización particular, el séptimo método de la invención determina el grado de diferenciación celular de las EPCs mediante un método seleccionado del grupo: contaje del número de colonias de EPCs tempranas, y contaje del número de células endoteliales.

5 Métodos de contaje de colonias de EPCs tempranas y de contaje del número de células endoteliales se han descrito con anterioridad.

El término “suero control” empleado en el séptimo método de la invención se refiere a un suero obtenido a partir de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.

En una realización particular del séptimo método de la invención, el tipo de tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto se selecciona del grupo formado por farmacológico, dietético o físico.

En una realización preferida, el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado para el que se usa un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento es de tipo farmacológico.

20

En una realización particular del séptimo método de la invención, el tratamiento de tipo farmacológico incluye, sin limitarse a:

- fármacos empleados en el tratamiento de las hiperlipoproteinemias,
- 25 - fármacos empleados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2,
- fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial,
- fármacos empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca,
- fármacos empleados en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos,
- fármacos empleados en el tratamiento del proceso inflamatorio de la placa de
- 30 ateroma,
- fármacos empleados en el tratamiento de las arritmias,

tales como los indicados anteriormente.

Alternativamente, el séptimo método de la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, en donde dicho tratamiento puede ser de tipo dietético o físico.

En una realización particular del séptimo método de la invención, el tratamiento de tipo dietético incluye, sin limitarse a: consumo de vino tinto, té verde, astragalus, extracto de GojiBerry, *Lactobacillus fermentum*, ácido elágico, beta-1,3-glucano, vitamina D3 (Stem-Kine, RBC Life), ácidos grasos omega 3, dieta mediterránea y dieta suplementada con flavonoides de cacao.

En una realización particular del séptimo método de la invención, el tratamiento de tipo físico incluye, sin limitarse a: ejercicio físico, CPAP (presión positiva continua en la vía aérea), stent coronario, transplante de EPCs autólogas, transplante de EPCs transcoronarias, infusión intracoronaria de EPCs.

Octavo método de la invención

La invención se relaciona en un último lugar con el uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

(iii) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,

(iv) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,

en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

5 Alternativamente, la invención se relaciona con un compuesto terapéutico vascular para su uso en el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende

10 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,

15 (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,

en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

20

Alternativamente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho tratamiento se aplica a un sujeto identificado mediante un método que comprende

25 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,

30 (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,

en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

5 Los términos “tratamiento”, “compuesto terapéutico vascular”, “patología cardiovascular” y “riesgo cardiovascular se emplean en el contexto del octavo método de la invención tal como han sido definidos anteriormente.

En la presente invención se entiende por “sujeto” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y
10 humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto del octavo método de la presente invención, el sujeto es un sujeto identificado mediante el método de la invención y
15 al que se administra el compuesto terapéutico vascular. En una realización preferida, el sujeto de la invención es un ser humano.

En la primera etapa del octavo método de la invención, se pone en contacto una población de células mononucleares con el suero del sujeto identificado mediante el método
20 de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular, en condiciones adecuadas para la diferenciación de de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales.

Los términos “célula mononuclear”, “célula precursora endotelial”, “diferenciación
25 celular” y “condiciones adecuadas para la diferenciación celular” han sido definidos previamente. Condiciones adecuadas para la diferenciación celular, así como métodos para determinar la diferenciación celular han sido descritos anteriormente.

En una realización particular del octavo método de la invención, las células
30 mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical. En una realización preferida del octavo método de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre. En una realización aún más preferida del octavo método

de la invención, las células mononucleares proceden de una muestra de sangre autóloga o de una muestra de cordón umbilical autóloga con respecto al suero que se usa en la octava etapa de dicho método. Métodos para la purificación de células mononucleares se han indicado anteriormente.

5

En la primera etapa del octavo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con dicho suero del sujeto se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo. En una realización particular de la primera etapa del octavo método de la invención, la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo. En una realización preferida de la primera etapa del octavo método de la invención, la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular. En una realización aún más preferida de la primera etapa del octavo método de la invención, el polímero que promueve la adhesión celular es fibronectina.

El término “suero” se emplea tal como ha sido definido anteriormente. En una realización particular del séptimo método de la invención, el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular se pone en contacto con la población de células mononucleares. La puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo.

25 Alternativamente, la invención también contempla que la población de células mononucleares se ponga en contacto con el plasma de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular.

30 En una realización particular de la primera etapa del octavo método de la invención, la población de células mononucleares se pone en contacto con el suero de un sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular en presencia de un suero adecuado para el cultivo celular. La puesta en

contacto de la población de células mononucleares con dicho suero se lleva a cabo con dicho suero diluido en medio de cultivo. El suero adecuado para el cultivo celular comprende, sin limitarse a, suero fetal bovino y suero de caballo. En una realización preferida, de la primera etapa del octavo método de la invención, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 10:1; 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10 (v/v). En una forma preferida de realización, la relación del suero del sujeto y el suero adecuado para el cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).

En la segunda etapa del octavo método de la invención, se pone en contacto la población de células endoteliales obtenidas en primera etapa de dicho método con el suero del sujeto identificado mediante el método de la invención y al que se administra el compuesto terapéutico vascular, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde el sujeto selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

En el contexto de la presente invención, por una “disminución del grado de proliferación celular” se entiende un descenso de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o incluso más en el grado de proliferación celular de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.

El término “suero control” empleado en el séptimo método de la invención se refiere a un suero obtenido a partir de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.

30

En una realización particular, el octavo método de la invención determina el grado de diferenciación celular mediante conteo del número de células endoteliales. En una

realización preferida, el conteaje del número de células endoteliales se lleva a cabo mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales. En una realización aún más preferida, el marcador de células endoteliales se selecciona del grupo formado por CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM),
5 VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1), CD144 (*vascular endothelial cadherin*).

En una realización particular del octavo método de la invención, el tipo de tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un
10 riesgo cardiovascular asociado en un sujeto se selecciona del grupo formado por farmacológico, dietético o físico.

El tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado para el que se usa un compuesto terapéutico vascular para la
15 preparación de un medicamento es de tipo farmacológico.

En una realización particular del octavo método de la invención, el tratamiento de tipo farmacológico incluye, sin limitarse a:

- 20 - fármacos empleados en el tratamiento de las hiperlipoproteinemias,
- fármacos empleados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2,
- fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial,
- fármacos empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca,
- fármacos empleados en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos,
- 25 - fármacos empleados en el tratamiento del proceso inflamatorio de la placa de ateroma,
- fármacos empleados en el tratamiento de las arritmias,

tales como los indicados anteriormente.

30 Alternativamente, el octavo método de la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, en donde dicho tratamiento puede ser de tipo dietético o físico.

En una realización particular del octavo método de la invención, el tratamiento de tipo dietético incluye, sin limitarse a: consumo de vino tinto, té verde, astragalus, extracto de GojiBerry, *Lactobacillus fermentum*, ácido elágico, beta-1,3-glucano, vitamina D3 (Stem-
5 Kine, RBC Life), ácidos grasos omega 3, dieta mediterránea y dieta suplementada con flavonoides de cacao.

En una realización particular del octavo método de la invención, el tratamiento de tipo físico incluye, sin limitarse a: ejercicio físico, CPAP (presión positiva continua en la vía
10 aérea), stent coronario, trasplante de EPCs autólogas, trasplante de EPCs transcoronarias, infusión intracoronaria de EPCs.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

15

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

20 Células y sueros empleados en los ensayos

En la realización de los ensayos se emplean:

- células mononucleadas de sangre periférica o de cordón umbilical de sujetos sanos para el cultivo de las células precursoras del endotelio (EPCs). La diferencia entre utilizar
25 células mononucleadas de sangre periférica o de cordón umbilical es que en el caso de cordón umbilical las EPCs se obtienen antes

- suero de sujetos sanos como control del experimento

- suero de pacientes con una patología relacionada con un aumento del estrés oxidativo o con un proceso inflamatorio crónico como pueden ser: insuficiencia renal
30 crónica, apnea del sueño, artritis reumatoide, preclampsia, hipertensión, enfermedad cardiovascular, etc.

Medios empleados para el aislamiento de EPCs

Se emplearon suero fisiológico o PBS 1X, disolución 6% ACD (22,3 g de glucosa, 22 g de citrato sódico y 8 g ácido cítrico para 1 l de disolución), tampón de aislamiento (50 ml de disolución 6% ACD, 2,5 g BSA, 450 ml de PBS para 0,5 l de disolución) y medio de aislamiento o medio K (395 ml de EBM-2, 90 ml suero fetal bovino descomplementado, 5 ml glutamina-penicilina-estreptomicina 100x y EGM-2 SingleQuots (todos excepto hidrocortisona) para 0,5 l de disolución).

10 Metodología empleada para el aislamiento de EPCs

Las muestras de sangre periférica de adultos se obtuvieron de voluntarios donantes de acuerdo con un protocolo aprobado por el Hospital Universitario Virgen de Rocio y se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y en virtud de un protocolo aprobado por el Comité de Investigación Clínica. Tanto las EPC derivadas de la sangre cordón umbilical como las EPCs derivados de la sangre periférica de adulto se obtuvieron a partir de las fracción de las células mononucleares (MNC).

Se obtuvieron células mononucleadas de sangre periférica tal como se indica en WO2008077094. Para ello, se extrajeron entre 20-40 ml de sangre total, procedente bien de sangre de cordón umbilical, añadiendo 1 ml de heparina en una jeringa antes de extraer la sangre de cordón umbilical, o bien de sangre periférica de adulto, utilizando tubos con heparina al extraer la sangre con agujas con mariposa. Se añadieron, en tubos de 50 ml, 10 ml de tampón de aislamiento por cada 20 ml de sangre empleada. Se prepararon tubos de 50 ml con 15 ml de Ficoll, a los que se añadieron la mezcla de sangre y tampón de aislamiento sin romper el gradiente. Se centrifugó a 2700 rpm durante 15 minutos y sin freno. A continuación se recogió el plasma autólogo, tomando el sobrenadante (unos 10-15 ml) con cuidado de no extraer la capa de células, pudiendo congelarse a -20°C en caso de no utilizarse de inmediato. Se recogió después la capa de células mononucleares (capa blanca) y se transfirió a tubos de 50 ml, añadiéndose 5 ml de tampón de aislamiento por cada 10 ml de células recogidas. Se centrifugó a 2700 rpm durante 5 minutos y a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de tampón de aislamiento para hacer un

lavado (centrifugación durante 10 min a 1200 rpm y eliminación del sobrenadante). Se añadieron 2 ml de tampón de aislamiento para resuspender las células y 6 ml de cloruro de amonio para lisar los eritrocitos. Tras 5-10 min de incubación a 4°C se añadieron 5 ml de tampón de aislamiento, se homogeneizó y centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Se añadieron nuevamente 10 ml de tampón de aislamiento y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el pellet en 12 ml de medio K. Se sembraron 2 ml de esta suspensión celular en placas de 6 pocillas recubiertas con fibronectina, añadiéndose en cada pocillo 300 µl del plasma autólogo anteriormente obtenido. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ durante 48h, tras las cuales se retiró el medio y se añadió medio K fresco. Este último paso se repitió cada 2 o 3 días. Entre los 7 y 14 días después se obtuvieron las EPCs tempranas. Entre los 20 y los 25 días después se obtuvieron las colonias endoteliales.

15 Estudio de la viabilidad y capacidad de diferenciación de las EPCs como método diagnóstico de riesgo cardiovascular

Las células se obtuvieron a partir de muestras de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica de adulto tal como se ha descrito anteriormente, con la diferencia de que fueron finalmente resuspendidas en 3,4 ml de medio de aislamiento 2 o K-2 (395 ml de EBM-2, 15 ml de suero fetal bovino descomplementado, 5 ml de glutamina-penicilina-estreptomicina 100x y EGM-2 SingleQuots (todos excepto hidrocortisona) para 0,5 l de medio) en lugar de medio K como en el caso anterior. Las células se sembraron en placas recubiertas con fibronectina, añadiéndose 1,7 ml de suspensión celular junto con 0,3 ml de suero fetal bovino en el caso del pocillo control o junto con 0,3 ml de suero del paciente en el caso del pocillo a evaluar. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂. Tras 48h en cultivo se retiró el medio y se añadió medio fresco junto con el correspondiente suero como se ha indicado anteriormente, y a continuación se repitió cada 2-3 días. Si las células procedían de muestras de cordón umbilical, las EPCs tempranas aparecieron en los primeros 7 días, y entre 7-14 días después (al menos en el control) se observaron las colonias endoteliales.

30

Opcionalmente, las células se congelaron tras su obtención para su almacenamiento y posterior uso.

Identificación y recuento de las colonias de EPC tempranas.

5

En el día 7, el número de colonias de células adherentes se cuentan por dos observadores en un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse Ti-S, Nikon Instruments Europe BV, Badhoevedorp, Países Bajos).

10 *Caracterización del Fenotipo de las EPC*

Entre las 3 y 4 semanas posteriores caracterizamos el fenotipo de las EPC. Las células fueron separadas mediante un raspado celular, y dispersión mecánica suave por pipeteo. Las células fueron lavadas con medio EBM-2. Un total de 1×10^6 células fueron
15 incubadas durante 30 minutos en la oscuridad a 4 °C con los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) con las concentraciones recomendadas por el fabricante: anti-CD144 MAB marcado con fluoresceína (FITC), (Serotec, 22 de Bankside Enfoque de la estación de Kidlington, Reino Unido), anti-CD34 MAB marcado con PerCp (TC) (Caltag, Invitrogen, San Diego, CA), anti-VEGFR-2 MAB/KDR-PE (RD Systems, Minneapolis). Se utilizaron
20 los controles de isotipo correspondiente. El análisis cuantitativo se realizó en un citómetro de flujo FACS Calibur donde se adquirieron 1×10^5 células por muestra. Los datos fueron analizados utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson). El número de EPC se definió como eventos triple positivo para CD34, CD144, y KDR con baja granularidad citoplásmica.

25

Determinación del grado de proliferación y/o diferenciación de las EPCs en cultivo

La proliferación de las EPC se analizó después de tres semanas de cultivo con los sueros de los sujetos. El efecto de los sueros sobre la proliferación de las EPC, se evaluó
30 mediante el kit de PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) (BD Pharmingen, San Diego, CA) y la cuantificación se realizó por citometría de flujo (Citómetro FACS Calibur, Becton Dickinson, San José, CA).

Los resultados obtenidos en el marcaje con PCNA fueron los siguientes: se observó un 28,3% de células proliferando en muestras de EPCs en pre-tratamiento, frente a un 63,1% de células proliferando en muestras de EPCs en post-tratamiento.

5

Para estudiar el grado de diferenciación se analizó la expresión de diferentes receptores característicos de las diferentes etapas de maduración/diferenciación de las células endoteliales, tales como VEGFR2 (receptor de factor de crecimiento vascular endotelial 2), que se expresa desde etapas muy tempranas, y CD146, que se expresa en etapas más tardías.

10

Entre la semana 2 y 3, se observó que un 26,3% de las células en pre-tratamiento expresaban VEGFR2, frente a un 72,4% de de las células en post-tratamiento, lo cual es indicativo de que el plasma de los pacientes antes del tratamiento dificulta la diferenciación de estas células.

15

RESULTADOS

Análisis de la capacidad de formación de colonias en presencia de suero de los pacientes

20

Al analizar el número de colonias formadas en presencia de una mezcla de sueros de pacientes con una patología antes y después de un tratamiento, se observó que tras el tratamiento hay un aumento significativo del número de colonias respecto a cuando los pacientes no reciben el tratamiento (Figura 1 y 2). Este aumento del número de colonias no llega a alcanzar el de los controles.

25

-Análisis del fenotipado de las EPCs

Se observó un mayor porcentaje de células con expresión de VEGFR2 en los casos donde se utilizó suero post-tratamiento comparado con pre-tratamiento (Figura 4). Los valores no alcanzaron el del caso control.

30

-Evaluación de la Proliferación celular

Se observó un mayor porcentaje de células proliferando cuando se utilizó el suero en pacientes post-tratamiento comparado con pre-tratamiento, siendo la diferencia estadísticamente significativa (Figura 5).

EJEMPLO 1.- Estudio de la evolución vascular en una población con apnea del sueño (SAOS) tras tratamiento con CPAP

Entre la primera y segunda semana de cultivo de las MNC (obtenidas de un sujeto control, sin antecedentes de riesgo cardiovascular), se observó, que tras cultivar estas células con el suero de pacientes SAOS, pre-tratamiento, se generaba un menor número de colonias por pocillo (conocidas como EPC tempranas), frente al mismo cultivo de células, cultivadas con el suero de los mismos pacientes tras el tratamiento con CPAP de tres meses de duración (Figura 6).

Así mismo, se observó entre la 3 y 4 semana, en los pocillos cultivados con el suero de los pacientes tras el tratamiento con CPAP, la formación de una monocapa constituida por células endoteliales maduras de mayor confluencia que las formadas en los pocillos cultivados con el suero de los pacientes pre-tratamiento, en los cuales en algunos pocillos ni siquiera se observó la formación de esta capa (Figura 7).

Entre los parámetros que pueden determinarse tras 4 semanas del cultivo de EPCs se tienen: expresión génica, expresión proteica, caracterización por citometría de flujo y pruebas de migración e inserción en matriz angiogénica. Con resultados similares a los descritos previamente en la población anterior.

EJEMPLO 2.- Estudio de la evolución vascular en una población hipertensa sometida a un tratamiento dietético crónico y agudo

Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos previamente en el estudio de la población SAOS sometida a un tratamiento con CPAP.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:
 - (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
 - (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.
2. Un método según la reivindicación 1 en donde el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético y un tratamiento físico.
3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2 en donde el suero control es el suero de dicho sujeto antes del tratamiento o el suero de un sujeto sano.
4. Un método para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:
 - (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
 - (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs, en donde una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.

5. Un método según la reivindicación 4 en donde el suero control es el suero de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna o de un sujeto que carece de riesgo cardiovascular.
- 5
6. Un método para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende
- 10
- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y
 - (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre la diferenciación de las EPCs, en donde un aumento en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.
- 15
7. Un método según la reivindicación 6 en donde el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético y un tratamiento físico.
- 20
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el grado de diferenciación de las EPCs se mide mediante un método seleccionado del grupo de (i) conteo del número de colonias de EPCs tempranas y (ii) conteo del número de células endoteliales.
- 25
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo.
- 30
10. Un método según la reivindicación 9 en donde la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular.

11. Un método según la reivindicación 10 en donde dicho polímero es fibronectina.
12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la etapa (i) se
5 lleva a cabo en presencia de un suero adecuado para cultivo celular.
13. Un método según la reivindicación 12 en donde la relación de suero del sujeto y suero adecuado para cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).
- 10 14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra del cordón umbilical.
- 15 15. Un método según la reivindicación 14 en donde la sangre o el cordón umbilical son autólogos con respecto al suero que se usa en la etapa (i).
- 16 16. Un método según las reivindicaciones 14 y 15 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre.
- 20 17. Un método para la identificación de un tratamiento adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en un sujeto, que comprende:
 - 25 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de un sujeto al que se le ha aplicado dicho tratamiento, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) y hasta obtener una población de células endoteliales,
 - 30 (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,
en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de

que dicho tratamiento es adecuado para una patología cardiovascular o para una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado.

18. Un método según la reivindicación 17 en donde el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético y un tratamiento físico.
19. El método según la reivindicación 17 o 18 en donde el suero control es el suero de dicho sujeto antes del tratamiento o el suero de un sujeto sano.
20. Un método para la determinación del riesgo cardiovascular en un sujeto que comprende:
- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
 - (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,
- en donde una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con un suero control, es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo cardiovascular.
21. Un método según la reivindicación 20 en donde el suero control es el suero de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna o de un sujeto que carece de riesgo cardiovascular.
22. Un método para monitorizar la respuesta de un sujeto a un tratamiento encaminado a tratar una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado, que comprende

- 5 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
- (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales, en donde un aumento en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto a un cultivo de EPCs puesto en contacto con el suero del sujeto antes de ser tratado es indicativo de que dicho sujeto responde a dicho tratamiento.
- 10 23. Un método según la reivindicación 22 en donde el tipo de tratamiento se selecciona del grupo formado por un tratamiento farmacológico, un tratamiento dietético y un tratamiento físico.
- 15 24. El método según las reivindicaciones 22 o 23 en donde el suero control es el suero de dicho sujeto antes del tratamiento o el suero de un sujeto sano.
- 20 25. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24 en donde la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo.
- 25 26. Un método según la reivindicación 25 en donde la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular.
27. Un método según la reivindicación 26 en donde dicho polímero es fibronectina.
28. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27 en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un suero adecuado para cultivo celular.
- 30

29. Un método según la reivindicación 28 en donde la relación de suero del sujeto y suero adecuado para cultivo celular es de al menos 3:1 (v/v).
30. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 29 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra del cordón umbilical.
31. Un método según la reivindicación 30 en donde la sangre o el cordón umbilical son autólogos respecto al suero que se usa en la etapa (i).
32. Un método según las reivindicaciones 30 y 31 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre.
33. Un método según la reivindicación 32 en donde el grado de proliferación de las células endoteliales se mide mediante contaje del número de células endoteliales.
34. Un método según la reivindicación 33 en donde el contaje de células endoteliales se lleva a cabo usando mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales.
35. El método según la reivindicación 34 en donde dicho marcador se selecciona del grupo formado por CD146, VEGFR2, CD31 y CD144.
36. Uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende
- (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto en condiciones adecuadas para la diferenciación de las EPCs presentes en dicha población y
 - (ii) determinar el efecto de dicho suero sobre el grado de diferenciación celular de dichas EPCs

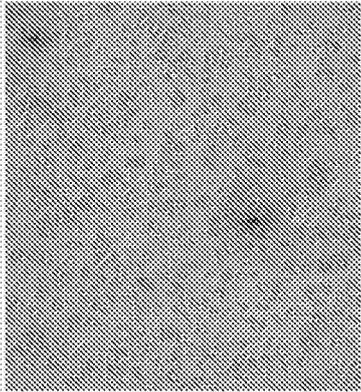
en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de diferenciación de las EPCs con respecto al grado de diferenciación de un cultivo de dicha población puesto en contacto con un suero control.

- 5 37. Uso según la reivindicación 36 en donde el suero control es el suero de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.
38. Uso según la reivindicación 36 o 37 en donde el grado de diferenciación de las EPCs se mide mediante un método seleccionado del grupo de (i) contaje del número de colonias de EPCs tempranas y (ii) contaje del número de células endoteliales.
- 10
39. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38 en donde la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero se lleva a cabo en una placa de cultivo.
- 15
40. Uso según la reivindicación 39 en donde la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular.
41. Uso según la reivindicación 40 en donde dicho polímero es fibronectina.
- 20
42. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41 en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un suero adecuado para cultivo celular.
43. Uso según la reivindicación 42 en donde la relación de suero del sujeto y suero control es de al menos 3:1 (v/v).
- 25
44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 43 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra del cordón umbilical.
- 30
45. Uso según la reivindicación 44 en donde la sangre o el cordón umbilical son autólogos con respecto al suero que se usa en la etapa (i).

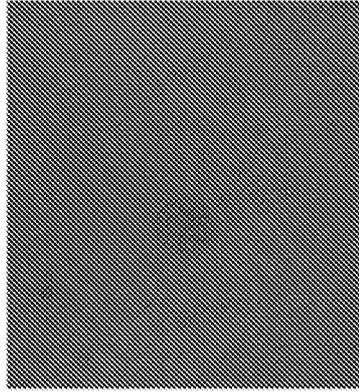
46. Uso según las reivindicaciones 44 y 45 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre.
- 5 47. Uso de un compuesto terapéutico vascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología cardiovascular o una patología que conlleva un riesgo cardiovascular asociado en donde dicho compuesto se administra a un sujeto identificado mediante un método que comprende
- 10 (i) poner en contacto una población de células mononucleares con el suero de dicho sujeto, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la diferenciación de de células precursoras endoteliales (EPCs) presentes en dicha población y hasta obtener una población de células endoteliales,
- 15 (ii) poner en contacto la población de células endoteliales obtenidas en la etapa (i) con el suero de dicho sujeto en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la proliferación de células endoteliales,
- en donde el sujeto se selecciona si el suero provoca una disminución en el grado de proliferación de las células endoteliales con respecto al grado de proliferación de un cultivo de dicha población en contacto con un suero control.
- 20
48. Uso según la reivindicación 47 en donde el suero control es el suero de un sujeto sano o de un sujeto que no padece patología cardiovascular alguna.
49. Uso según las reivindicaciones 47 o48 en donde la puesta en contacto de la población de células mononucleares con el suero de se lleva a cabo en una placa de cultivo.
- 25
50. Uso según la reivindicación 49 en donde la placa de cultivo se encuentra recubierta de un polímero que promueve la adhesión celular.
- 30 51. Uso según la reivindicación 50 en donde dicho polímero es fibronectina.

52. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 47 a 51 en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un suero adecuado para cultivo celular.
53. Uso según la reivindicación 52 en donde la relación de suero del sujeto y suero control es de al menos 3:1 (v/v).
54. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 47 a 53 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra del cordón umbilical.
55. Uso según la reivindicación 54 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre o de una muestra de cordón umbilical.
56. Uso según la reivindicación 55 en donde la sangre o el cordón umbilical son autólogos con respecto al suero que se usa en la etapa (i).
57. Uso según las reivindicaciones 55 o 56 en donde las células mononucleares proceden de una muestra de sangre.
58. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 47 a 57 en donde el grado de proliferación de las EPCs se mide mediante contaje del número de células endoteliales.
59. Uso según la reivindicación 58 en donde el contaje de células endoteliales se lleva a cabo usando mediante inmunodetección usando al menos un anticuerpo específico para un marcador de células endoteliales.
60. Uso según la reivindicación 59 en donde dicho marcador se selecciona del grupo de formado por CD146, VEGFR2, CD31 y CD144.
61. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 60 en donde el sujeto es un ser humano.

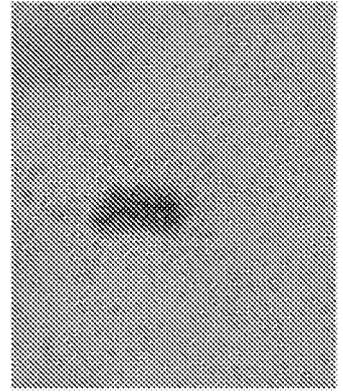
FIG. 1



Control
7 días



Pacientes pre-
tratamiento
7 días



Pacientes post-
tratamiento
7 días

FIG. 2

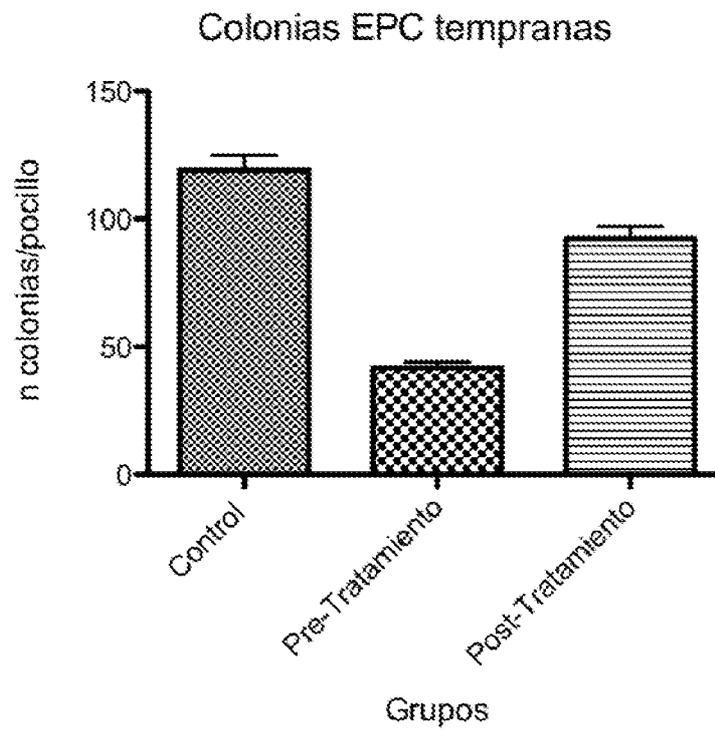
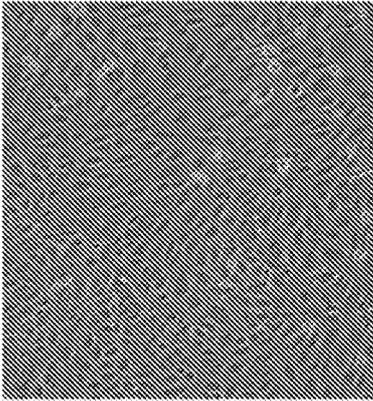
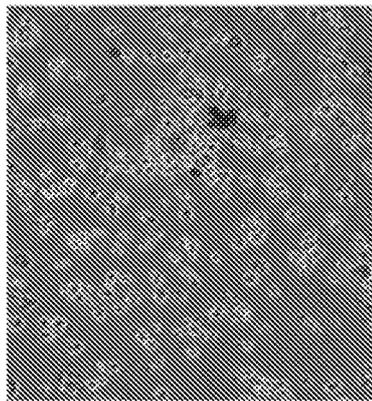


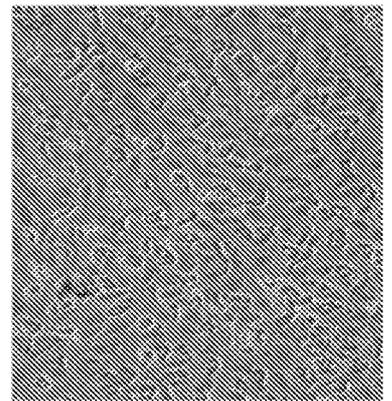
FIG. 3



Control
16 días



Pacientes pre-
tratamiento
16 días



Pacientes post-
tratamiento
16 días

FIG. 4

Celulas Endoteliales (CE)

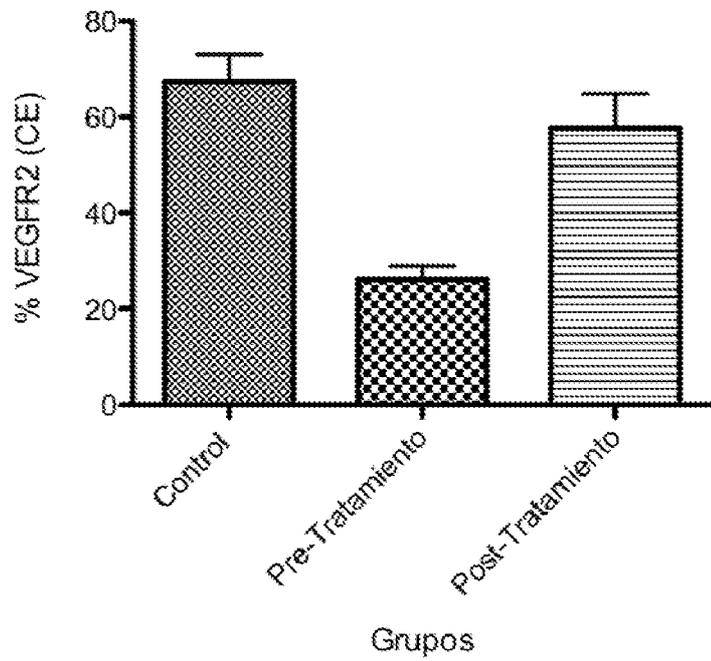


FIG. 5

Proliferacion Celular

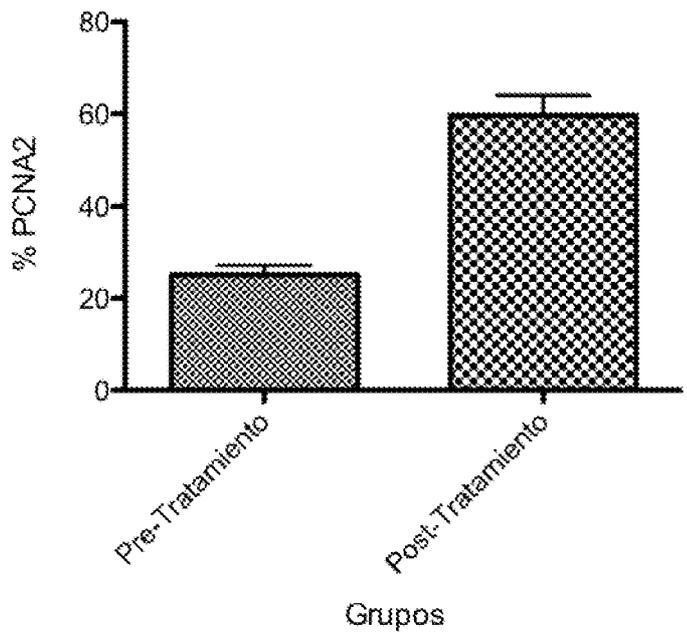


FIG. 6

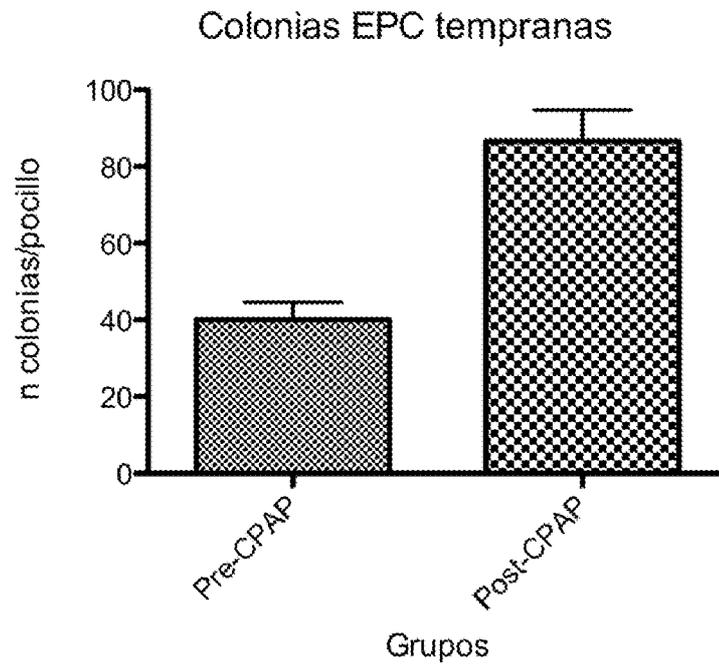
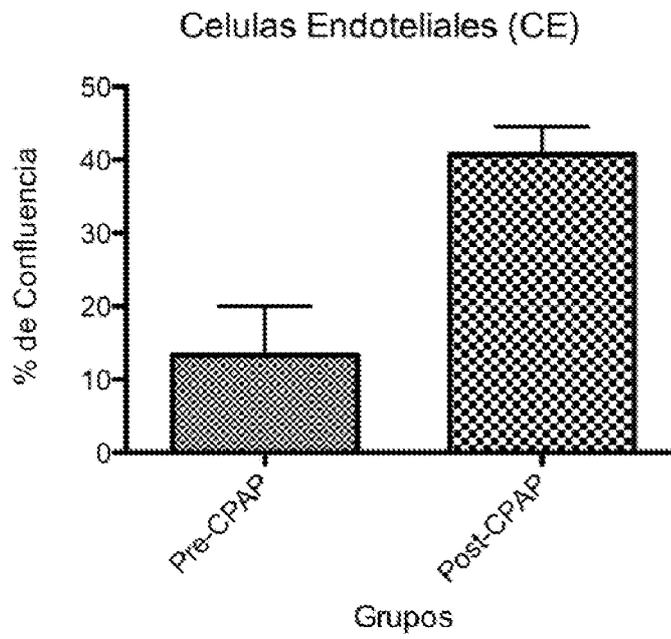


FIG. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070734

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)

G01N, C12N, A61P

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)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004045517 A2 (US GOV HEALTH HUMAN SERV ET AL.) 03/06/2004, the whole document	4-16, 20-35, 61 1-3, 17-19
A X	US 2007161552 A1 (BAHLMANN FERDINAND H ET AL.) 12/07/2007, Págs. 1-3; Pág. 16, col. 2; Pág. 18, ej. 1; Pág. 19, ej. 5; figures 3-7	1-35, 61 36-60
X Y	ZHU GUANGXU et al. Young environment reverses the declined activity of aged rat-derived endothelial progenitor cells: involvement of the phosphatidylinositol3-kinase/Akt signaling pathway.. Annals of vascular surgery 00/07/2009 VOL: 23 No: 4 Pags: 519 - 534 ISSN 1615-5947 (Electronic) Doi: doi:10.1016/j.avsg.2008.11.013	4-16, 20-35, 61 1-3, 17-19

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

27/12/2012

Date of mailing of the international search report

(05/02/2013)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. Martín-Falquina Garre

Telephone No. 91 3495483

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070734

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HILL J M et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, 01/02/2003 VOL: 348 No: 7 Pags: 593 - 600 ISSN 0028-4793 Doi: doi:10.1056/NEJMoa022287	4, 5, 20, 21
X	VASA M et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. CIRCULATION RESEARCH, 06/07/2001 VOL: 89 No: 1 Pags: E1 - E7 ISSN 0009-7330. doi:10.1161/hh1301.093953	4, 5, 20, 21
X A	VASA M et al. Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients With Stable Coronary Artery Disease. CIRCULATION, 19/06/2001 VOL: 103 No: 24 Pags: 2885 - 2890 ISSN 0009-7322 Doi: doi:10.1161/hc2401.092816	36-60 1-35, 61
X A	28/03/2007, DESCHASEAUX et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. European Journal of Pharmacology, 28/03/2007 VOL: 562 No: 1-2 Pags: 111 - 118 ISSN 0014-2999 Doi: doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.045	36-60 1-35, 61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070734

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2004045517 A2	03.06.2004	US2006057072 A1 US7708977 B2 AU2003291536 A1	16.03.2006 04.05.2010 15.06.2004

US2007161552 A1	12.07.2007	JP2010235613 A AU2010200621 A1 KR20070007082 A NO20063716 A ZA200606515 A SG149875 A1 NZ548697 A JP2007518769 A WO2005070450 A2 EP2156843 A2 EP1711201 A2 EA200900874 A1 EA200702523 A1 EA200601359 A1 EA015350 B1 CN101601857 A CN1942200 A CA2554234 A1 BRPI0507048 A AU2005205917 A1 AU2005205917B B2 DE102004063927 A1 DE102004004509 A1	21.10.2010 11.03.2010 12.01.2007 18.10.2006 30.01.2008 27.02.2009 28.01.2011 12.07.2007 04.08.2005 24.02.2010 18.10.2006 30.10.2009 28.04.2008 29.12.2006 30.06.2011 16.12.2009 04.04.2007 04.08.2005 12.06.2007 04.08.2005 18.11.2010 15.12.2005 18.08.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070734

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/50 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

A61P9/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070734

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)

G01N, C12N, A61P

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)

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X Y	WO 2004045517 A2 (US GOV HEALTH HUMAN SERV ET AL.) 03/06/2004, Todo el documento	4-16, 20-35, 61 1-3, 17-19
A X	US 2007161552 A1 (BAHLMANN FERDINAND H ET AL.) 12/07/2007, Págs. 1-3; Pág. 16, col. 2; Pág. 18, ej. 1; Pág. 19, ej. 5; figuras 3-7	1-35, 61 36-60
X Y	ZHU GUANGXU et al. Young environment reverses the declined activity of aged rat-derived endothelial progenitor cells: involvement of the phosphatidylinositol3-kinase/Akt signaling pathway.. Annals of vascular surgery 00/07/2009 VOL: 23 No: 4 Pags: 519 - 534 ISSN 1615-5947 (Electronic) Doi: doi:10.1016/j.avsg.2008.11.013	4-16, 20-35, 61 1-3, 17-19

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.
27/12/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
05 de febrero de 2013 (05/02/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Martín-Falquina Garre

Nº de teléfono 91 3495483

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070734

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	HILL J M et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, 01/02/2003 VOL: 348 No: 7 Pags: 593 - 600 ISSN 0028-4793 Doi: doi:10.1056/NEJMoa022287	4, 5, 20, 21
X	VASA M et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. CIRCULATION RESEARCH, 06/07/2001 VOL: 89 No: 1 Pags: E1 - E7 ISSN 0009-7330. doi:10.1161/hh1301.093953	4, 5, 20, 21
X A	VASA M et al. Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients With Stable Coronary Artery Disease. CIRCULATION, 19/06/2001 VOL: 103 No: 24 Pags: 2885 - 2890 ISSN 0009-7322 Doi: doi:10.1161/hc2401.092816	36-60 1-35, 61
X A	DESCHASEAUX et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. European Journal of Pharmacology, 28/03/2007 VOL: 562 No: 1-2 Pags: 111 - 118 ISSN 0014-2999 Doi: doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.045	36-60 1-35, 61

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070734

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2004045517 A2	03.06.2004	US2006057072 A1 US7708977 B2 AU2003291536 A1	16.03.2006 04.05.2010 15.06.2004
----- US2007161552 A1	----- 12.07.2007	JP2010235613 A AU2010200621 A1 KR20070007082 A NO20063716 A ZA200606515 A SG149875 A1 NZ548697 A JP2007518769 A WO2005070450 A2 EP2156843 A2 EP1711201 A2 EA200900874 A1 EA200702523 A1 EA200601359 A1 EA015350 B1 CN101601857 A CN1942200 A CA2554234 A1 BRPI0507048 A AU2005205917 A1 AU2005205917B B2 DE102004063927 A1 DE102004004509 A1 -----	----- 21.10.2010 11.03.2010 12.01.2007 18.10.2006 30.01.2008 27.02.2009 28.01.2011 12.07.2007 04.08.2005 24.02.2010 18.10.2006 30.10.2009 28.04.2008 29.12.2006 30.06.2011 16.12.2009 04.04.2007 04.08.2005 12.06.2007 04.08.2005 18.11.2010 15.12.2005 18.08.2005 -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070734

CLASIFICACIONES DE INVENCION

G01N33/50 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

A61P9/10 (2006.01)