

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 934 719**

21 Número de solicitud: 202130806

51 Int. Cl.:

**A61K 35/19** (2015.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.08.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.02.2023**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E  
INNOVACIÓN BIOSANITARIA DEL PRINCIPADO  
DE ASTURIAS (FINBA) (50.0%)  
Avda. Hospital Universitario s/n  
33011 Oviedo (Asturias) ES y  
UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ, Laura y  
ACEBES HUERTA, Andrea**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Método para obtener un secretoma derivado de plaquetas y usos del mismo**

57 Resumen:

Método para obtener un secretoma derivado de plaquetas y usos del mismo.

La presente invención se refiere a un método para obtener secretomas de plaquetas y usos del secretoma en medicina regenerativa (con fin terapéutico o estético), en el tratamiento de enfermedades, incluyendo terapia celular, y cultivo celular in vitro. Este método se desarrolla con el objetivo de obtener bioproductos derivados-de-plaquetas enriquecidos en carga granular de plaquetas, ricos en factores de crecimiento y empobrecidos en otras moléculas derivadas-de-plaquetas y plasma para su uso universal (incluyendo independencia-del-donante y seguridad). Además, el procesamiento potencial del producto (nanoencapsulación, liofilización) permitiría aplicaciones clínicas adicionales y resolvería limitaciones de almacenamiento. Este método y la caracterización de secretomas a nivel molecular en salud y enfermedad contribuirán a la identificación de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Por tanto, la presente invención pertenece a los campos de medicina, composiciones médicas y diagnóstico de enfermedad.

ES 2 934 719 A1

## DESCRIPCIÓN

### Método para obtener un secretoma derivado de plaquetas y usos del mismo

5 La presente invención se refiere a un método para obtener secretomas plaquetarios y usos de los mismos en medicina regenerativa (con finalidad terapéutica o estética), en el tratamiento y diagnóstico potencial de enfermedades, y cultivo celular *in vitro*, incluyendo terapia celular. Por tanto, la presente invención pertenece a los campos de la medicina, las composiciones médicas y el diagnóstico de enfermedades.

10

### ANTECEDENTES

Las plaquetas son los componentes sanguíneos anucleados que se encargan de mantener la hemostasia corporal. En los últimos años, se han atribuido nuevas funciones a las plaquetas mostrando que están implicadas en muchos otros procesos fisiológicos y patológicos más allá de la hemostasia, como la inmunomodulación, la separación de vasos sanguíneos y linfáticos durante el desarrollo, la angiogénesis y la metástasis tumoral. En condiciones fisiológicas, la exposición del colágeno y la liberación del factor von Willebrand después de un daño endotelial es reconocida por las plaquetas que se activan y se adhieren al sitio de la lesión.

15 Esta activación induce vías de señalización que conducen a cambios conformacionales y activación de integrinas que favorecen la agregación plaquetaria y la liberación de su carga granular. El secretoma plaquetario (también llamado "contenido plaquetario liberado") contiene una multitud de factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y mediadores inflamatorios, incluido el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-  $\beta$ 1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), por nombrar solo algunos, que participan en las etapas clave de los procesos de cicatrización de heridas y regeneración tisular, incluida la migración celular, diferenciación, proliferación y neovascularización.

30

El papel de las plaquetas en la regeneración tisular y la cicatrización de heridas y el conocimiento de que son un reservorio natural de factores de crecimiento ha dado lugar al desarrollo de bioproductos basados en plaquetas, como el plasma rico en plaquetas (PRP) o los lisados de plaquetas (PL), como terapia adyuvante en medicina regenerativa. El uso terapéutico de bioproductos a base de plaquetas constituye un enfoque relativamente nuevo

35

en la medicina regenerativa con beneficios clínicos en multitud de campos médicos, como cirugía dental y maxilofacial, oftalmología, medicina deportiva, medicina veterinaria y estética, entre otros. Sin embargo, la literatura en el campo refleja la falta de consenso en los métodos de preparación, y la falta de consenso en la descripción del producto utilizado en la práctica clínica diaria (a nivel celular y molecular). El PRP se define como la fracción plasmática que resulta tras la centrifugación diferencial de la sangre y contiene una concentración suprafisiológica de plaquetas. El PRP se puede aplicar fresco (conteniendo así plaquetas vivas), o después de la activación o congelación/descongelación (para permitir la liberación de la carga de plaquetas), sin hacer distinciones de nomenclatura en la literatura. Por otro lado, PL se refiere a productos donde las plaquetas han sido lisadas utilizando diferentes metodologías (mecánica, química). Sin embargo, a menudo no se especifica si el material primario contiene o no plasma antes de inducir la lisis plaquetaria. Además, el uso de PRPs/PLs está indicado generalmente para uso autólogo, y si bien se realizan investigaciones para validar la aplicación potencial de bioproductos derivados de plaquetas homólogos o heterólogos (allogénicos), existe una demanda creciente para producir un producto universal (que proporcione independencia de donante y seguridad).

El resultado terapéutico de las terapias basadas en plaquetas sigue siendo muy controvertido debido a la falta de consenso mencionada anteriormente sobre los métodos de preparación, procesamiento, almacenamiento y aplicación de PRP o PL, lo que da como resultado una composición altamente variable de PRP en términos de número de plaquetas, presencia o no de glóbulos blancos y posterior concentración de factores de crecimiento y actividad de moléculas bioactivas, que también carece de caracterización. Además, el PRP y los PLs contienen una mezcla de proteínas plasmáticas y plaquetarias además de las moléculas bioactivas reales (es decir, las contenidas en los gránulos de plaquetas), que representan una sub-fracción del producto. Además, también se ha informado que ciertas condiciones patológicas pueden influir en la calidad y reactividad de las plaquetas, y el uso de productos autólogos puede no ser siempre la fuente terapéutica más adecuada y puede generar incertidumbre sobre los resultados esperados debido a la patología subyacente. Por lo tanto, existe una demanda clínica creciente para el desarrollo de nuevos productos derivados de plaquetas que podrían usarse universalmente y serían más específicos o dirigidos a la patología que se está tratando en un esfuerzo por mejorar el beneficio clínico de la terapia.

Para generar un bioproducto derivado de plaquetas enriquecido en biomoléculas activas, la lógica indicaría aislar y lavar las plaquetas del plasma y resuspenderlas en una concentración

óptima en una solución osmótica. La activación de las plaquetas con agonistas del receptor plaquetario desencadenará su degranulación activa, dejando en la fracción sobrenadante el secretoma plaquetario, enriquecido en moléculas procedentes de los gránulos plaquetarios.

5 Trabajos recientes han utilizado este enfoque para obtener secretomas plaquetarios con diferentes propósitos. El documento de patente estadounidense US5599558 describe un método para estudiar la capacidad del secretoma plaquetario *in vitro*, sin especificar la metodología (salvo mencionar que utilizan el secretoma obtenido a partir de  $10^9$  plaquetas en 1 mL). Asimismo, el documento WO2018091713 describe un método para preparar  
10 composiciones de factores de crecimiento que contienen el secretoma plaquetario y el uso de tales composiciones en medicina regenerativa.

A pesar de la existencia de documentos que describen métodos para la producción de bioproductos derivados de plaquetas, como los PLs descritos en los documentos  
15 WO2013113024, EP2389942, EP2757879, o como soluciones de factor de crecimiento obtenidas a partir de sangre total descritas en el documento US8734854, estos son distintos de los productos obtenidos con el método aquí descrito.

Por tanto, existe la necesidad de métodos alternativos para obtener secretomas plaquetarios  
20 exclusivamente tras su activación, libre de plasma y otros componentes plaquetarios.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La invención describe una metodología para obtener secretomas derivados de plaquetas  
25 resultantes de la activación de plaquetas con agonistas específicos. Los inventores han observado que la composición de los secretomas plaquetarios puede alterarse debido a la activación de las plaquetas, no por contacto con agonistas plaquetarios, sino por cambio en las propiedades físicas de las plaquetas durante el proceso de obtención del secretoma plaquetario. Por lo tanto, los inventores desarrollaron un método, aquí descrito, para obtener  
30 secretoma derivado de plaquetas en donde la muestra rica en plaquetas solo se activa por la acción de los agonistas plaquetarios y no por cambio en las propiedades físicas de las plaquetas durante el proceso de obtención del secretoma. Además, los inventores descubrieron que la composición del secretoma depende del agonista plaquetario utilizado para inducir la degranulación plaquetaria.

35

Método de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un método *in vitro* para la producción de un secretoma derivado de plaquetas, de aquí en adelante el método de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- 5           a) obtener una suspensión de plaquetas no activadas aislando y resuspendiendo en solución tampón las plaquetas procedentes de una fuente biológica que comprende plaquetas o muestra rica en plaquetas;
- b) inducir la degranulación plaquetaria incubando en constante agitación la suspensión plaquetaria obtenida en la etapa a) con un agonista plaquetario obteniendo una
- 10           suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas; y
- c) recolectar el secretoma derivado de plaquetas centrifugando la suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas obtenidas en la etapa b) para eliminar plaquetas y otros restos celulares,

15           en donde la etapa b) se realiza entre 35°C y 40°C y todas las demás etapas se realizan a temperatura ambiente.

La expresión "secretoma derivado de plaquetas" tal y como se usa aquí se refiere al contenido granular de plaquetas que se secreta, un proceso también llamado "degranulación", cuando dichas plaquetas son activadas por agentes de activación, denominados "agonistas". El

20           término "plaquetas", como se usa en este documento, se refiere a plaquetas sanguíneas. Las plaquetas se pueden describir como los elementos celulares discoides de la sangre que ayudan a la coagulación de la misma y que ocurre en la sangre de los vertebrados.

La primera etapa del método de la invención comprende la obtención de una suspensión de

25           plaquetas no activadas. Como tal, la expresión "obtener una suspensión de plaquetas no activadas aislando y resuspendiendo en solución tampón las plaquetas procedentes de una fuente biológica que comprende plaquetas o muestra rica en plaquetas" de la etapa a) del método de la invención se refiere al proceso de separación de la partes constituyentes de una fuente biológica que comprende plaquetas o muestra rica en plaquetas mediante

30           centrifugación y/o filtración, lo que lleva a la formación de fracciones, una de tales fracciones comprende principalmente plaquetas, por lo que se aísla la fracción plaquetaria que luego se resuspende en una solución tampón apropiada para llevar a cabo las etapas restantes del método de la invención. La etapa a) del método de la invención permite la eliminación de constituyentes solubles y/o contaminantes no deseados, obteniendo una fracción plaquetaria

35           compuesta preferiblemente por, al menos, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de plaquetas

no activadas. Por tanto, en una realización preferida, el proceso de aislamiento de la etapa a) del método de la invención se realiza mediante centrifugación y/o filtración. En una realización más preferida, la centrifugación se realiza entre 3500 y 4500 rpm durante 3 a 10 minutos. En otra realización preferida, la centrifugación se lleva a cabo a 4000 rpm durante 5 minutos. En otra realización preferida, el proceso de aislamiento de la etapa a) del método de la invención se lleva a cabo mediante filtración con filtros de depleción de leucocitos. La expresión "filtros de depleción de leucocitos", como se usa en el presente documento, se refiere a filtros compuestos en los que se prepara material de microfibras sintéticas como una tela no tejida. El material del filtro puede modificarse en la superficie para alterar la tensión superficial o la carga para mejorar el rendimiento en la eliminación de leucocitos de la sangre.

Una vez aisladas, las plaquetas se resuspenden en tampón apropiado. Dichas soluciones tampón son ampliamente conocidas en el campo de la invención y el experto en el campo conocerá dichas soluciones tampón y cómo utilizarlas. En una realización preferida, el proceso de resuspensión de las etapas a) del método de la invención se lleva a cabo con un tampón seleccionado de una lista que consiste en: solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), tampón de glucosa HEPES, solución de Tyrode tamponada con HEPES. En otra realización preferida, la fracción de plaquetas se resuspende a una concentración de 100 a 500 x 10<sup>6</sup> plaquetas por mL. En otra realización preferida, la fracción de plaquetas se resuspende a una concentración de 200 x 10<sup>6</sup> plaquetas por mL.

El término "muestra rica en plaquetas", tal y como se usa aquí, se refiere a muestras que contienen concentraciones suprafisiológicas de plaquetas en un vehículo, como plasma o un tampón. Ejemplos de muestras ricas en plaquetas son plasma rico en plaquetas, concentrado de plaquetas, plaquetas aisladas y plaquetas producidas *ex vivo*. En una realización preferida del método de la invención, la muestra rica en plaquetas se selecciona de una lista que consiste en: plasma rico en plaquetas (PRP), concentrado de plaquetas, plaquetas aisladas y plaquetas producidas *ex vivo*.

El término "fuente biológica que comprende plaquetas" se refiere a una parte, fracción, porción o subvolumen que se considera representativo de un volumen mayor de sangre total anticoagulada. En una realización preferida del método de la invención, la fuente biológica que comprende plaquetas es sangre total anticoagulada. La expresión "sangre total anticoagulada", tal y como se usa aquí, se refiere a la sangre en sí, extraída de un cuerpo vivo con heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), o cualquier otra sustancia que evite la

coagulación, en donde dicha sangre no se ha separado en sus partes o componentes constituyentes, como suero y plasma. La sangre total anticoagulada se puede obtener mediante flebotomía venosa o arterial en tubos de recolección anticoagulados, donaciones de sangre completas o interrumpidas de donantes sanos, muestras de sangre de cordón umbilical u otros tejidos o muestras de las que se pueden aislar plaquetas, como médula ósea. En una realización preferida, la sangre total anticoagulada es sangre venosa, sangre arterial o sangre del cordón umbilical. En otra realización preferida, la sangre total es de un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano de cualquier género y edad.

5

El término "muestra", tal y como se usa aquí, se refiere a una parte, fracción, porción o subvolumen que se considera representativo de un volumen mayor del material/objeto/volumen que se va a muestrear.

15

Los términos "plasma rico en plaquetas" o "PRP" como se usan en este documento se refieren a una concentración suprafisiológica de plaquetas en plasma. Por ejemplo, la concentración de plaquetas puede ser 5 veces, 10 veces, 100 veces o más la concentración normal en sangre. Además de las plaquetas, el PRP puede comprender trazas de otros componentes sanguíneos. Los componentes no plaquetarios, además del plasma, pueden ser glóbulos blancos, eritrocitos y/o cualquier otro componente presente en la sangre del donante. El término "plasma", como se usa en este documento, se refiere a la porción líquida de sangre donde están suspendidos los componentes celulares. El plasma constituye aproximadamente el 55% de la sangre total y contiene proteínas como albúminas, globulinas y fibrinógeno, agua, iones y nutrientes.

20

El término "concentrados de plaquetas", como se usa en el presente documento, pretende abarcar el producto de transfusión que comprende plaquetas, ya sea procedente de mezcla de donaciones de sangre total o plaquetoféresis.

25

El término "plaquetas aisladas" como se usa en este documento se refiere a plaquetas que se han aislado de su vehículo biológico natural (por ejemplo, plasma) y están contenidas en un vehículo artificial (por ejemplo, solución tampón).

30

El término "plaquetas producidas *ex vivo*", como se usa en este documento, se refiere a plaquetas generadas a partir de diversos orígenes biológicos, incluyendo células madre

hematopoyéticas, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas o cualquier otro cultivo de células madre que sea adecuado para ser inducido a diferenciarse en células plaquetarias. En la literatura se encuentran disponibles ejemplos y métodos de cómo producir plaquetas *ex vivo* (Buduo, C.A. *et al.*, 2016, *Thrombosis and Haemostasis*, 115 (02), 250-256; Di Buduo C.A., *Blood* 2015, 125: 2254-2264; Nakagawa Y. *et al.*, *Exp Haematol* 2013; 41: 742-748; Schlinker A. *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 2015; 112: 788-800).

Como se describe actualmente, la muestra rica en plaquetas se puede obtener tanto de fuentes biológicas tales como animales, como de fuentes *in vitro/ex vivo*, tales como cultivos celulares, específicamente cultivos de células madre. De acuerdo a esto, en una realización preferida del método de la invención, la muestra rica en plaquetas procede de un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano de cualquier edad, sexo o raza. En otra realización preferida del método de la invención, la muestra rica en plaquetas procede de un cultivo celular, preferiblemente cultivo de células madre, más preferiblemente cultivo de células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias y células madre hematopoyéticas.

Como se ha dicho, una de las posibles muestras ricas en plaquetas es el PRP que, en su forma más común, se obtiene de sangre total. Como tal, en una realización preferida, el método de la invención comprende además una etapa opcional de obtener una muestra rica en plaquetas procedente de una fuente biológica que comprende plaquetas mediante centrifugación diferencial sin desaceleración forzada, en donde la etapa opcional se realiza antes de la etapa a). La expresión "obtener una muestra rica en plaquetas procedente de una fuente biológica que comprende plaquetas mediante centrifugación diferencial sin desaceleración forzada" se refiere al proceso de separación o concentración de las plaquetas contenidas en una fuente biológica. Para obtener el PRP de una muestra de sangre anticoagulada, se deben separar las partes constituyentes de la muestra de sangre. Dicha separación se realiza "por centrifugación diferencial sin desaceleración forzada". La centrifugación de la muestra de sangre anticoagulada, también llamada fraccionamiento de sangre, aplicará fuerzas físicas a la muestra que conducirán a que las partes constituyentes de la sangre sedimenten a diferentes velocidades dependiendo de su densidad y masa, formando capas o fracciones distintas, que tienen diferentes composiciones. Una de esas fracciones es la fracción de PRP que puede recolectarse y retenerse para su posterior procesamiento. En una realización preferida, la centrifugación se lleva a cabo entre 100 y 500 g de fuerza durante 10 a 20 minutos. En otra realización preferida, la centrifugación se lleva a

cabo a 193 g de fuerza durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación activa, la muestra debe detenerse. La expresión "sin desaceleración forzada", como se usa en este documento, se refiere al proceso de ralentizar la muestra centrifugada hasta que se detiene por completo utilizando nada más que los efectos de la gravedad y las fuerzas de fricción dentro de la centrífuga y su mecanismo. Dicho proceso es importante para el método de la invención, ya que los inventores encontraron que la desaceleración forzada puede conducir a la activación de las plaquetas. Además, el método de la invención no contempla el uso de inhibidores de la agregación plaquetaria tales como apirasa y prostaglandina E2 (PGE2).

10 Como se describe en el presente documento, la muestra rica en plaquetas se puede obtener a partir de diferentes materiales de origen, tales como sangre total de donde se obtienen PRP o concentrados de plaquetas o cultivo *in vitro* de precursores de células plaquetarias. Dichos materiales de origen pueden tratarse previamente con tecnología de reducción de patógenos para reducir o eliminar los agentes causantes de enfermedades que pueden estar presentes en dichos materiales de origen. En una realización preferida del método de la invención, la muestra rica en plaquetas se obtiene de una muestra tratada con tecnología de reducción de patógenos. El término "tecnología de reducción de patógenos" como se usa en este documento se refiere al método de reducir/eliminar posibles patógenos causantes de enfermedades añadiendo riboflavina al material de origen de la muestra e irradiando la riboflavina más el material fuente con luz ultravioleta.

Una vez obtenida, la suspensión de plaquetas no activadas debe estimularse o activarse para liberar el contenido de los gránulos en el tampón de suspensión. La expresión "inducir la degranulación plaquetaria incubando en constante agitación la suspensión plaquetaria obtenida en la etapa a) con un agonista plaquetario obteniendo una suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas" de la etapa b) del método de la invención se refiere a dicha estimulación o activación, por el que el contacto de un agente activador plaquetario o agonista con las plaquetas conduce a la liberación por parte de las plaquetas de su contenido granular en la suspensión, un proceso también llamado degranulación, que origina la "suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas", una expresión que tal como se usa aquí, se refiere a una suspensión que comprende tanto las plaquetas como el contenido de los gránulos de las plaquetas, el secretoma de plaquetas, dispersos en el medio de suspensión. Para garantizar una activación uniforme y fuerte de todas las plaquetas en la solución, la activación se realiza con agitación constante. En una realización preferida la etapa b) del método de la invención se lleva a cabo bajo agitación constante de 500 a 1500 rpm (velocidad de mezcla o rotación)

durante 3 a 10 minutos a 35 a 40 grados Celsius (°C), preferiblemente agitación constante de 1000 rpm durante 5 minutos a 37 °C.

5 Los términos "agente activador de plaquetas" y "agonista plaquetario" tal y como se usan aquí se refieren a un compuesto que es capaz de activar plaquetas iniciando así la reacción de liberación de plaquetas o degranulación así como su agregación. En una realización preferida del método de la invención, el agente activador de plaquetas usado en la etapa b) se selecciona de una lista que consiste en: péptido activador del receptor de trombina 6 (TRAP6), convulxina, colágeno, forbol miristato acetato (PMA), agretina A, adenosín difosfato (ADP),  
10 epinefrina, ácido araquidónico y trombina.

En otra realización del método de la invención, el agente activador de plaquetas se conjuga con un marcador. Dicho marcador puede usarse para extraer posteriormente el agente activador del secretoma o detectar el agente activador en el secretoma.

15 El término "marcador", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas que pueden generar una señal que es detectable mediante un método adecuado para tal detección. Los métodos de detección de marcadores incluyen, pero no se limitan a, microscopía de fluorescencia, luz, confocal y electrónica, resonancia magnética y espectroscopía, fluoroscopia, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones, ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas, cromatografía de exclusión por tamaño con detección de fluorescencia, ensayo de flujo lateral, radioinmunoensayo, radiomarcaje, técnica de western blot, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia,  
20 inmunoprecipitación e *inmunospots* de tipo enzimático. Los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones o péptido etiqueta de hexahistidina. Además, los marcadores pueden ser bi o multifuncionales y detectables mediante más de uno de los métodos enumerados. El  
30 marcador puede ser, por ejemplo, un compuesto cromogénico, fluorogénico, magnético, electrodenso, radiactivo y/o quimioluminiscente. En una realización preferida del método de la invención, el marcador se selecciona de la lista que consiste en: isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofocianina (APC) o cualquier otro colorante fluorescente relevante en citometría de flujo, péptido etiqueta de hexahistidina, biotina, peroxidasa de rábano (HRP),  
35 perlas de oro y hierro paramagnético.

Dichos marcadores se conjugan o se unen al agente de activación para formar una unión estable y funcional. Dicha "conjugación" o "unión" se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica para conectar funcionalmente los dominios del agente activador a un marcador que produce una señal capaz de ser detectada por una o más de las técnicas mencionadas en el párrafo anterior, en la que dichos métodos para conectar dominios incluyen, sin limitar a, fusión recombinante con o sin dominios intermedios, fusión mediada por proteínas, asociación no covalente y enlace covalente, por ejemplo, enlace anticuerpo-disulfuro, enlace de hidrógeno, enlace electrostático y enlace conformacional, por ejemplo, asociaciones biotina-avidina. La conjugación con un marcador puede ocurrir por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos se refieren a una reacción entre el agente activador y el marcador de tal manera que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una sola molécula.

En otra realización del método de la invención, el agente activador de plaquetas se une a una superficie. El término "superficie", tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier superficie, material o compuesto al que se puede unir el agente activador de plaquetas y que no interfiera de ninguna manera con la función activadora del agente o con las propias plaquetas. Ejemplos de dichas superficies incluyen, sin limitar a, columnas de afinidad, nanopartículas y componentes lipídicos decorados covalentemente con el agente activador.

Como se usa en la presente descripción, el término "columna de afinidad" se refiere a un dispositivo de fraccionamiento molecular que comprende perlas con química especializada para separar o reaccionar con biomoléculas. Las columnas de afinidad a las que se refiere la presente invención, permiten conjugar el agonista plaquetario con las perlas para activar las plaquetas a medida que fluyen a través de la columna.

El término "nanopartícula", tal y como se usa aquí, se refiere a una partícula que tiene una dimensión a nanoescala y no expresa ninguna restricción de forma particular. En particular, el término "nanopartícula" incluye nanoesferas, nanotubos, nanocajas, nanogrupos, nanobarras y similares. En algunas realizaciones, las nanopartículas y / o núcleos de nanopartículas proporcionados de acuerdo con la presente invención generalmente tienen una geometría poliédrica o esférica. Tener el agente activador de plaquetas conjugado a una superficie permite la activación de las plaquetas así como facilitar la eliminación del agente de la suspensión que contiene tanto las plaquetas como el secretoma derivado de plaquetas.

35

Ejemplos de componentes lipídicos son 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [metoxi (polietilenglicol) -1000] (DSPE-mPEG1000), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [maleimida (polietilenglicol) -2000] (DSPE-PEG2000-Mal) y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [azido (polietilenglicol) -2000] (DSPE-PEG2000-Azida), entre otros.

Una vez que las plaquetas se degranulan, el secretoma derivado de las plaquetas se obtiene separándolo de otros componentes presentes en la solución. La etapa c) del método de la invención, “recolectar el secretoma derivado de plaquetas centrifugando la suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas obtenido en la etapa b) para eliminar plaquetas y otros restos celulares”, se refiere al proceso de limpieza del medio ahora rico en componentes de los gránulos plaquetarios de los restos celulares o agregados plaquetarios mediante centrifugación, aislando el secretoma plaquetario. En una realización preferida, la centrifugación en la etapa d) del método de la invención se lleva a cabo entre 8000 y 13000 g de fuerza durante 1 a 10 minutos. En una realización más preferida, la centrifugación se lleva a cabo a 10000 g de fuerza durante 2 minutos. Una vez centrifugado, el sobrenadante se transfiere a un recipiente.

Para garantizar que la composición de secretoma derivado de plaquetas obtenida en la etapa c) del método de la invención no se altere por factores físicos externos, todas las etapas del método de la invención se realizan a temperatura ambiente, excepto la etapa b) del método de la invención. Además, no se emplea ningún mecanismo, proceso o técnica para detener la activación de las plaquetas realizada en la etapa b) del método de la invención antes de realizar la etapa c) del método de la invención. Ejemplos no limitantes de tales mecanismos, procesos o técnicas son el choque a baja temperatura, por ejemplo, colocar la muestra en hielo, o el choque químico, por ejemplo, el tratamiento con aspirina o prostaglandina.

El secretoma derivado de plaquetas obtenido se puede usar inmediatamente, es decir, usarse después de ser obtenido, o almacenarse para uso posterior. Dependiendo del uso planificado del secretoma derivado de plaquetas obtenido por el método de la invención, se pueden aplicar procedimientos de esterilización. En una realización preferida, el método de la invención comprende una etapa opcional que comprende el filtrado y/o nanofiltrado del secretoma derivado de plaquetas obtenido en la etapa c). Se pueden aplicar diferentes grados de procedimientos de filtrado. Los procedimientos de filtrado se realizan para filtrar-esterilizar el secretoma derivado de plaquetas, con el fin de eliminar cualquier contaminante bacteriano

y/o viral no deseado antes del almacenamiento. En una realización preferida, el filtrado se realiza con un filtro de 0,22 micras. El término "nanofiltración", como se usa en este documento, se refiere al proceso de filtración con membranas con poros de tamaño nanométrico que pueden eliminar la contaminación viral.

5

Se conocen varios métodos de almacenamiento en la técnica que se pueden aplicar a los secretomas derivados de plaquetas obtenidos; los ejemplos incluyen, sin ninguna limitación, congelación, liofilización, secado en frío, deshidratación, encapsulación y nanoencapsulación. Dichos métodos permiten el almacenamiento del producto obtenido en volúmenes fáciles de usar que son fáciles de reconstituir, además de proporcionar a los secretomas derivados de plaquetas una mayor estabilidad y accesibilidad a tejidos y/u órganos. Por tanto, en una realización preferida del método de la invención, el secretoma derivado de plaquetas obtenido en la etapa c) se almacena mediante congelación, liofilización, secado en frío, deshidratación, encapsulación o nanoencapsulación.

10  
15

#### Secretoma derivado de plaquetas y sus usos

La presente invención describe un método para obtener secretomas derivados de plaquetas cuyos constituyentes dependen únicamente de rutas de señalización que son activadas por el agente o agentes activadores de plaquetas y la fuente biológica de las plaquetas.

20

Por tanto, otro aspecto de la presente invención es un secretoma derivado de plaquetas, de aquí en adelante el secretoma de la invención, obtenido por el método de la invención.

25 El término "secretoma derivado de plaquetas" se ha definido previamente con respecto al método de la invención y dicha definición es válida para los presentes aspectos y sus realizaciones.

El secretoma de la invención contiene, en relación con un método alternativo del estado de la técnica (por ejemplo, PRP), una concentración acumulada aumentada de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios, moduladores inmunológicos, así como un menor contenido de factores relacionados con la apoptosis/necrosis celular. Métodos para determinar la composición del secretoma derivado de plaquetas de la invención y los parámetros para aplicar tales métodos son bien conocidos por el experto en la materia.

35 Dichos métodos incluyen, sin limitación, inmunoensayos multiplex, ensayos de espectrometría

de masas, cromatografía, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo. La expresión "determinar la composición", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección de la presencia de una molécula o sustancia y/o cuantificación de dicha molécula o sustancia en el secretoma de la invención.

5

El término "factor de crecimiento" como se usa en este documento se refiere a proteínas que estimulan la proliferación, supervivencia y/o migración de células al unirse a un receptor específico. Por lo general, los factores de crecimiento solo actúan sobre tipos de células específicos que expresan el receptor respectivo. Ejemplos de factores de crecimiento y otras biomoléculas, metabolitos y/o biomateriales que pueden estar presentes en el secretoma de la invención incluyen, sin limitación, PDGF, PDAF, VEGF, PDEGF, PF-4, TGF-B, FGF-A, FGF- B, TGF-A, IGF-1, IGF-2, BTG, TSP, vWF, PAI-1, IgG, IgM, IgA, KGF, EGF, FGF, TNF, IL-1, KGF-2, fibropéptido A, fibrinógeno, albúmina, osteonectina, gro-alfa, vitronectina, dímero D de fibrina, factor V, antitrombina III, macroglobulina a2, angiogenina, Fg-D, y elastasa. Más detalladamente, los factores de crecimiento, citocinas o similares que pueden estar presentes e incluyen, sin limitación, LIF, factores de crecimiento anticancerosos como IGFBP3, eicosanoides como PG o leucotrienos, IL-1 TNF alfa, INFs, TNF-a, IL-6, IL-1 (a/b), metabolitos prostanoides, componentes del complemento, intermediarios de oxígeno reactivo, metabolitos del ácido araquidónico, factores de coagulación, nitratos, y quimiocinas. Los factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, y hormonas, de origen humano, pueden incluir alfa defensina, alfa sinucleína, beta sinucleína, 4-1 BBL, 6Ckina, FGF ácido, activina A, avtivin Rib, angiopoyetina 2, B-DNF, BAFF, BCA-1 , BCA-1, BD-1, BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPRAI, BDNF, CNTF, CTGF, CTI\_A-4Fc, CXCL1, CXCL2, cardiotrofina-1, Cripto, Cistatina C, Dkk-1, EGF AOF, EGF, EMAP II, ENA-78, EPO, Eotaxina, FGF básico AOF, FGF-10, FGF-16, FGF 17, FGF 18, FGF19, FGF4, FGF6, FGF7, FGF8, FGF8b, FGF9, Flt3, G-CSF, GDNF, GMCSF, HGF, HGH, IFN alfa A, IFN alfa A D, IFN alfa D, IFN alfa a2b, IFN, beta 1A, IFN-gamma, IGF1, IGFI, IGFBP-4, IGFBP6, ILI alfa, IL-1Beta, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17A. IL17F, IL18, IL19, IL2, IL20, IL21, IL23, IL28A, IL28B, IL29, IL3, IL31, IL33, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, ITAC, KGF2, Kallikrein1 1, Kalikreina4, Kalikreina7 , LEFTY-A, LIF, Leptina, MCSF AOF, MCSF, MCP- 1, MCP2, MCP3, MCP4, MDC, MIG, MIP1 alfa, MIP1 beta, MIP3 alfa, MIP3 beta, MIP4, MIP5, midkina, NAP2, NT3, NT4, Neurotactina, neurturina, Oncostatina, osteoprotegerina, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PTN, ligando de RANK, receptor de RANK, RANTES <SCF, SCFAOF, SDF-1 alfa, SDF-1 Beta, CD4, CD40L, TNF-RI, TNFRII, TARC, TECK, TGF alfa, TGFI Betal, TGF Beta2, TGF Beta3, TNF beta/linfotoxina, TNF-alfa, TPO, TRAIL, TWEAK y VEGF.

35

En una realización preferida de la invención, el secretoma de la invención comprende Caspasa-3, EGF, G-CSF/CSF-3, GM-CSF, Granzima B, HGF, ICAM-1, IL-10, MCP-1, MCP-2, MIP-1 $\beta$ , Osteopontina, PECAM, P-Selectina, SDF-1, TNF- $\alpha$ , VCAM-1, CD40L, FGF-2, GITRL, IFN- $\gamma$ , IL-1a, MCP-2, PDGF-BB , TGF- $\beta$ , TPO, VEGF-A, FGF-23, Gro- $\alpha$ , IL-1b, IL-2, 5 IL-6, IL-7, IL-8, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, VEGF -D.

La Tabla 1 abajo describe los rangos de concentración obtenidos por el método de la invención usando diferentes factores como agonistas plaquetarios. Las moléculas analizadas fueron Caspasa-3, EGF, G-CSF/CSF-3, GM-CSF, Granzima B, HGF, ICAM-1, IL-10, MCP-1, MCP- 10 2, MIP-1 $\beta$ , Osteopontina, PECAM , P-Selectina, SDF-1, TNF- $\alpha$ , VCAM-1, CD40L, FGF-2, GITRL, IFN- $\gamma$ , IL-1a, MCP-2, PDGF-BB, TGF- $\beta$ , TPO, VEGF-A , FGF-23, Gro- $\alpha$ , IL-1b, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, VEGF-D y se encuentran en los rangos de concentración descritos en Tabla 1.

15 En una realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando el agonista plaquetario TRAP6 a una concentración de 100  $\mu$ M y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando el agonista 20 plaquetario convulxina a una concentración de 0,625 ng/mL y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando el agonista 25 plaquetario forbol 12-miristato 13-acetato a una concentración de 100 ng/mL y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando el agonista 30 plaquetario agretina A a una concentración de 6,53 nM y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando colágeno como 35 agonista plaquetario a una concentración de 30  $\mu$ g/mL y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el secretoma de la invención se obtiene usando colágeno como agonista plaquetario a una concentración de 90 µg/mL y comprende las moléculas analizadas en los rangos de concentración descritos en la Tabla 1.

5 Tabla 1: Secretoma plaquetario humano (HPS) (Rango pg/ml).

FACTOR	Agonistas Plaquetarios*						
	U	TRAP6	Col-30	Col-90	CVX	PMA	AggA
<i>Caspasa-3</i>	65,5 - 398	126,6 - 360,3	150,6 - 317,7	168,2 - 380,2	137,7 - 326,4	110,1 - 883	124,6 - 285,4
<i>CD40L</i>	3,2 - 31,5	68,6 - 117,4	69,6 - 92,3	75,9 - 99,4	71,1 - 114,3	77,3 - 156,7	70,3 - 109,4
<i>EGF</i>	31,5 - 43,3	69,5 - 90,6	73,3 - 88,7	74,2 - 98	79,3 - 96,6	68,2 - 86	49,9 - 103,6
<i>FGF-2</i>	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9 - 23,2	2,9
<i>FGF-23</i>	252,7 - 511,5	548,5 - 912,7	567,8 - 882	570,8 - 1121,9	569,3 - 945,4	462,4 - 962,8	629 - 991,6
<i>G-CSF/CSF-3</i>	87,2 - 200,7	221,1 - 404,3	235,1 - 414,8	244,2 - 544,7	239,7 - 448,6	154,2 - 468,7	258,2 - 438,6
<i>GITRL</i>	56 - 184,5	223,8 - 427,8	245,4 - 391,4	250,7 - 445,8	237,4 - 490	177,5 - 454,4	281,1 - 459,2
<i>GM-CSF</i>	71,7 - 152,6	181,9 - 296,1	191,4 - 269	196,6 - 341,1	186,1 - 316,2	147,5 - 307,6	211,4 - 332,8
<i>Granzima B</i>	9,8 - 62	73,6 - 96,2	62 - 111	88,6 - 177,2	57,4 - 114,8	9,8 - 62	38,5 - 62
<i>Gro-α</i>	2,1 - 2,1	2,1 - 19,1	2,1 - 23,8	2,1 - 28,2	2,1 - 30	2,1 - 49,3	2,1
<i>HGF</i>	49,9 - 63,2	95,2 - 130,7	87,7 - 132	82,5 - 173,3	90,3 - 147,9	97 - 137,1	90,5 - 137,3
<i>ICAM-1</i>	3022 - 5770	2655,6 - 4833	2303,9 - 4567	2207,7 - 4300,2	2332,4 - 4411	2679,5 - 4825,4	2661,6 - 5272,6
<i>IFN-γ</i>	6 - 35,5	47,1 - 85,9	51,7 - 85,1	46,8 - 99	49,2 - 103,9	27,4 - 92,7	55,2 - 86,6
<i>IL-10</i>	1,8 - 14	14,2 - 26,1	16,9 - 22,4	15,2 - 25,5	14,1 - 31,7	7 - 26,7	16,4 - 27
<i>IL-1a</i>	0,7	0,7 - 9	0,7 - 7	0,7 - 8,6	0,7 - 9,3	0,7 - 10,5	0,7 - 10,4
<i>IL-1b</i>	12,3 - 31	41,3 - 80,3	41,8 - 68,1	40,8 - 91,7	40,3 - 90,1	27,9 - 88	50,2 - 71,1
<i>IL-2</i>	133,3 - 169,1	180 - 227	170,7 - 209,4	175,4 - 245,4	170,3 - 231,4	163,5 - 232,6	191 - 246,1
<i>IL-6</i>	8	24 - 51	10,4 - 36,9	18,2 - 54	10,4 - 57	8 - 60,2	11,8 - 34

ES 2 934 719 A1

	Agonistas Plaquetarios*						
FACTOR	U	TRAP6	Col-30	Col-90	CVX	PMA	AggA
<i>IL-7</i>	17,3 – 32,6	33,3 – 43,9	31 – 41,8	36,6 – 41,4	35,3 – 40,9	35,2 – 44,1	31,8 – 43,8
<i>IL-8</i>	2,4	2,4 – 2,4	2,4	2,4	2,4	2,4 – 15,8	2,4
<i>MCP-1</i>	38,2 – 52,6	67,6 – 95	69,4 – 94,8	67,3 – 111,5	67 – 106,1	59,7 – 98,2	72 – 99,4
<i>MCP-2</i>	69,1 – 135,7	172,8 – 294,5	105,3 – 265,1	126,1 – 263,3	206,5 – 317,7	255,5 – 384,6	149,9 – 318,9
<i>MCP-3</i>	46,1 – 74,4	77 – 105,4	77 – 130,9	72,1 – 148,6	78,4 – 113,6	63,7 – 103,2	78,4 – 104,4
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	1,7 – 11,9	12,8 – 22,3	12,6 – 19,7	11,9 – 23,9	13,8 – 23,9	10,1 – 25,5	16,5 – 21,7
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	7,7	62,6 – 126,3	59,1 – 109,6	68,6 – 127,3	60,7 – 125,8	66,1 – 147,2	81,4 - 141
<i>Osteopontina</i>	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8 – 72,1	11,8
<i>PDGF-BB</i>	271,6 – 5767,2	972,4 – 17119,7	766,3 – 16946,5	999,4 – 16063,6	941,2 – 18505,9	871,6 – 14389	957,1 – 18754,3
<i>PECAM (x10<sup>3</sup>)</i>	40 - 118,5	80,4 – 1817,9	70,8 – 1817,9	73,2 – 1817,9	72,5 – 1817,9	79,1 – 1817,9	76,8 – 1817,9
<i>P-Selectina (x10<sup>3</sup>)</i>	77,2 – 212,1	155,7 – 5523	138,5 – 5523	138,4 – 5523	145,7 – 5523	158,3 – 5523	152,2 – 5523
<i>RANTES</i>	46,4 – 116,3	57 – 129,5	64,3 – 128,1	67,6 – 126,2	59,1 - 99	62,3 – 600,2	53,4 – 106,2
<i>SDF-1</i>	326,9 – 785,4	898,5 – 1307,2	815 – 1120,7	787,9 – 1132,2	827,7 – 1185	979,3 - 1673	959,1 – 1126,1
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	3462,6 – 4002,3	4750,7– 6911,8	4732,2 – 5252,1	4371,4 – 5292,5	4649,1 – 6909,8	4645,2 – 5456,8	4347,8 – 6199
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	39,7 – 66,4	76 – 127,2	77,8 – 110,8	77,6 – 131,5	78 – 134,2	65,3 – 131,7	89,7 – 145,2
<i>TPO</i>	94 – 119,4	119,4 – 404,3	90,1 – 338,9	79,3 – 414,8	79,3 – 407,8	94 – 505,9	169,8 – 293,9
<i>VCAM-1</i>	1551,9 – 2309,8	1489 – 2531,6	1442,9 – 2203,5	1530,4 – 2215,8	1465,9 – 2573,2	1652 – 2405,8	1685,6 – 2801,8
<i>VEGF-A</i>	75,3 - 105	185,3 – 239,2	164,9 – 214,2	165,7 – 248,1	157,3 – 290,1	179,9 – 292,5	157,6 – 292,3
<i>VEGF-D</i>	2,7 – 29,7	33,7 – 72,7	31,5 – 59,7	34,1 – 69,9	31,7 – 87,5	19,6 – 77,6	40,5 – 78,7

\* Los agonistas plaquetarios de la tabla son los siguientes: U - Plaquetas no estimuladas; TRAP6 - péptido activador del receptor de trombina 6; Col-30 y Col-90: colágeno a 30 µg/mL y 90µg/mL, respectivamente; CVX: convulxina; PMA -forbol 12-miristato 13-acetato; AggA - agretina A.

5

Como se mencionó anteriormente, la composición del secretoma de la invención depende de las cascadas de señalización que son activadas por los agentes activadores y del origen y procesamiento de la muestra rica en plaquetas de donde se obtiene el secretoma de la invención. En los casos donde el secretoma de la invención se obtiene a partir de una muestra biológica de un sujeto, el estado fisiológico del sujeto también determina la reactividad plaquetaria y por tanto influirá en la composición final del secretoma derivado de plaquetas. Por lo tanto, la comparación de secretomas derivados de plaquetas de sujetos con diferentes estados fisiológicos, por ejemplo, sujetos sanos versus sujetos con patología, puede usarse en la determinación de biomarcadores de enfermedad. Como tal, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un método de identificación de biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad, de aquí en adelante el uso biomarcador de la invención, que comprende:

- a) obtener el secretoma de la invención de un sujeto; y
  - b) comparar el secretoma derivado de plaquetas de la etapa a) con un secretoma derivado de plaquetas de control,
- en donde la presencia, ausencia o la variación en el nivel de un componente del secretoma obtenida en la etapa a) en comparación con el secretoma derivado de plaquetas de control es indicativa de que dicho componente es un biomarcador.

El término "biomarcador" tal como se usa aquí se refiere a una sustancia, cuya presencia se puede determinar y cuantificar objetivamente en la composición del secretoma de la invención mediante los métodos descritos anteriormente, que se usa como indicador de la presencia/ausencia de la enfermedad o el pronóstico de la misma. Los biomarcadores de enfermedad de la invención se pueden detectar y/o cuantificar, lo que significa que uno puede solo detectar su presencia/ausencia, solo detectar cambios en su cantidad o concentración, o que uno puede detectar tanto su presencia/ausencia como cambios en su cantidad o concentración.

El término "diagnóstico" tal como se utiliza aquí se refiere al procedimiento mediante el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome o cualquier

condición de salud-enfermedad mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos similares. Por "diagnóstico" también se pretende hacer referencia a la provisión de información útil para el diagnóstico.

5

El término "pronóstico" tal y como se usa aquí se refiere al procedimiento mediante el cual la probabilidad o posibilidad de que un sujeto desarrolle una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad se determina analizando una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos similares. Como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación de pronóstico, aunque se prefiere, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a pronosticar. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como portadora de la enfermedad o predispuesta a la enfermedad. El número que es estadísticamente significativo puede ser establecido por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitar a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor P de significancia, prueba de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Preferiblemente, el valor P es menor que 0,1, menor que 0,05, menor que 0,01, menor que 0,005 o menor que 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite predecir correctamente la enfermedad de manera diferencial en al menos el 70%, más preferiblemente en al menos el 80%, mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un grupo dado o población analizada.

25

El término "sujeto", tal y como se usa aquí, se refiere a un animal, preferiblemente un ser humano de cualquier edad y género. Por tanto, en un uso preferido del biomarcador de la invención, el sujeto es un animal, preferiblemente un ser humano.

30

La expresión "comparar el secretoma derivado de plaquetas" de la etapa a) con un "secretoma derivado de plaquetas control" de la etapa b) del uso biomarcador de la invención, se refiere al proceso de comparar dos secretomas derivados de plaquetas obtenidos mediante el método de la invención, en donde un secretoma derivado de plaquetas se obtiene de un sujeto que sufre, puede sufrir o sufrirá de una determinada enfermedad, entidad nosológica,

35

síndrome o cualquier condición de salud-enfermedad, y el otro secretoma derivado de plaquetas se obtiene de un sujeto sano. Ambos secretomas pueden obtenerse del mismo o diferentes sujetos en diferentes etapas de una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome o cualquier condición de salud-enfermedad, o el mismo sujeto en una condición saludable versus afectado por una enfermedad/condición/ síndrome. La expresión “en donde la presencia, ausencia o variación en la concentración de un componente del secretoma” obtenida en la etapa a) en comparación con el secretoma derivado de plaquetas de control es indicativa de que dicho componente es un biomarcador” se refiere al proceso de análisis o comparación del secretoma derivado de plaquetas obtenido en la etapa a) con el secretoma derivado de plaquetas de control, en donde dicho análisis, comparación puede identificar componentes cuya presencia o ausencia cambia de un secretoma a otro, o componentes cuya concentración varía de un secretoma a otro, indicando que estos componentes están afectados por la enfermedad, entidad nosológica, síndrome o condición de salud-enfermedad que se está analizando y, por tanto, son biomarcadores de dicha condición.

Ejemplos de biomarcadores de enfermedades que pueden identificarse son biomarcadores de trastornos vasculares, cánceres de la sangre, trastornos inmunitarios, trastornos de la coagulación, trastornos de modulación del dolor. En una realización preferida, los biomarcadores de enfermedades de la invención se seleccionan de una lista de enfermedades que consiste en: eritromelalgia, enfermedad arterial periférica, estenosis de la arteria renal, enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, coagulación intravascular diseminada, enfermedad cerebrovascular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia mielomonocítica juvenil, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, anemia hemolítica, vasculitis, diabetes tipo 1, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, Síndrome de Goodpasture, anemia perniciosa, miopatía, enfermedad de Lyme, trombofilia, coagulopatía, coagulopatía traumática aguda, trastorno de modulación sensorial, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, Alzheimer, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, diverticulitis, fibromialgia, hepatitis, nefritis, enfermedad de Parkinson, trastornos de la piel y colitis ulcerosa.

Como se mencionó anteriormente, el secretoma de la invención tiene una composición compleja que es particularmente rica en factores de crecimiento. Como tal, el secretoma de la invención es particularmente útil como medio de cultivo y/o suplemento del medio de cultivo.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del secretoma de la invención como medio de cultivo y/o suplemento para medio de cultivo para cultivos celulares y/o cultivos de tejidos *in vitro* y/o *ex vivo*, preferiblemente cultivos de células madre, cultivos primarios de fibroblastos, cultivos de fibroblastos, cultivos de células dendríticas, otras células inmunes y líneas celulares. Dichos cultivos pueden ser para fines de investigación, así como fines de terapia celular.

La expresión "suplemento de medio de cultivo" tal como se usa aquí se refiere a un aditivo del medio que se añade al medio de cultivo para mantener la viabilidad celular y/o estimular la proliferación y/o migración de las células.

Los términos "cultivo celular" y "cultivo de tejidos" se refieren al mantenimiento y propagación de células y células en tejidos, preferiblemente de origen animal (incluyendo células derivadas de seres humanos) *in vitro*.

El término "mantenimiento de las células", tal como se usa aquí, se refiere al mantenimiento de las células en condiciones óptimas. El término "proliferación de células" se refiere a la multiplicación de células, lo que conduce a un aumento en el número de células. El término "migración de células" se refiere a un proceso central en el desarrollo y mantenimiento de organismos multicelulares que requieren el movimiento orquestado de células en direcciones particulares a ubicaciones específicas, por ejemplo, formación de tejido durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y respuestas inmunes.

#### Composiciones farmacéuticas

Como se mencionó anteriormente, el secretoma de la invención es rico en factores de crecimiento que pueden usarse para estimular el crecimiento de células *in vitro*. Asimismo, dichas capacidades de estimulación también pueden usarse *in vivo* y, como tal, el secretoma de la invención tiene usos en medicina regenerativa y tratamiento de daño tisular. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el secretoma de la invención, de aquí en adelante la composición farmacéutica de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina regenerativa y/o el tratamiento del daño tisular.

El término "medicina regenerativa" tal y como se usa aquí se refiere al proceso de reemplazar o regenerar células, tejidos u órganos para restaurar o establecer su función normal.

5 El término "tratamiento" tal y como se usa aquí se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés (como daño tisular) en un sujeto (preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un ser humano), incluyendo:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, por ejemplo, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o condición patológica, por ejemplo causar la regresión de la
- 10 enfermedad o condición patológica o sus síntomas;
- (iii) estabilizar la enfermedad o estado patológico.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica de la invención se usa en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una lista que consiste en:

15 eritromelalgia, enfermedad arterial periférica, estenosis de la arteria renal, enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, coagulación intravascular diseminada, enfermedad cerebrovascular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia mielomonocítica juvenil, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia,

20 anemia hemolítica, vasculitis, diabetes tipo 1, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, Síndrome de Goodpasture, anemia perniciosa, miopatía, enfermedad de Lyme, trombofilia, coagulopatía, coagulopatía traumática aguda, trastorno de modulación sensorial, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, Alzheimer, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, diverticulitis,

25 fibromialgia, hepatitis, nefritis, enfermedad de Parkinson, trastornos de la piel y colitis ulcerosa.

En otra realización preferida de la composición farmacéutica de la invención, el secretoma de la invención es fresco, congelado, liofilizado, encapsulado o nanoencapsulado.

30 En otra realización aún más preferida de la composición farmacéutica de la invención, el secretoma derivado de plaquetas es un secretoma derivado de plaquetas de origen animal, preferiblemente un secretoma derivado de plaquetas de mamífero, más preferiblemente un secretoma derivado de plaquetas humanas.

35

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende además un adyuvante farmacéutico aceptable, un vehículo farmacéutico aceptable y/u otro ingrediente activo.

5 La expresión "adyuvante farmacéutico aceptable", tal y como se usa aquí, se refiere a una sustancia que ayuda en la absorción de los elementos de la composición farmacéutica de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda en la preparación de la composición en el sentido de dar consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así, los excipientes o adyuvantes pueden tener la función de mantener juntos los ingredientes, como  
10 por ejemplo en el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de edulcorante, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo para aislarlo del aire y/o humedad, la función de llenar una tableta, cápsula o cualquier otra forma de presentación, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este  
15 párrafo.

La expresión "vehículo farmacéutico aceptable", tal y como se usa aquí, se refiere a una sustancia usada en la composición para diluir cualquiera de sus partes constituyentes hasta un cierto volumen o peso. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es  
20 inerte o tiene una acción idéntica a cualquiera de los elementos incluidos en la composición farmacéutica de la invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

25 El término "ingrediente activo" se refiere a un compuesto terapéuticamente activo, tal como suero o plasma, así como a cualquier profármaco del mismo y las sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y los profármacos.

La composición de la presente invención también puede tomar la forma de una formulación  
30 de fármaco de liberación sostenida o cualquier otro sistema de liberación convencional, tales como nanopartículas, liposomas o nanoesferas, material polimérico, implante biodegradable o no biodegradable o micropartículas biodegradables, tales como microesferas biodegradables. Esta composición y/o sus formulaciones se pueden administrar a un animal, y por tanto a los seres humanos, de diversas formas, incluyendo intraperitoneal, intravenosa,  
35 intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular e intrasinovial, intratecal, intralesional,

intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutáneo, intraorbital, intracapsular, tópico, oral, mediante parches transdérmicos, percutáneo, aerosol nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión.

- 5 La administración de la composición farmacéutica de la invención se llevará a cabo en una dosis terapéuticamente eficaz, que sea suficiente para demostrar un beneficio para el paciente. Tal beneficio puede implicar la mejora de al menos un síntoma relacionado con la enfermedad o patología que afecta al paciente. La prescripción del tratamiento, es decir, las decisiones sobre las dosis, periodicidad, duración, etc., serán responsabilidad del médico de  
10 cabecera o del especialista que atienda al paciente afectado.

El término "dosis terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cantidad (o cantidad por unidad de masa del individuo a quien se administra) de un fármaco o agente terapéutico que causa un efecto  
15 terapéutico detectable en un individuo o un grupo de individuos a los que se administra, provocando efectos secundarios o toxicidad mínimos. La cantidad terapéuticamente efectiva útil para producir un efecto terapéutico puede determinarse mediante técnicas convencionales bien conocidas por los especialistas en la técnica. El término "dosis terapéuticamente efectiva  
20 50" o "dosis terapéuticamente efectiva 95" incluye un valor estadístico en el que el efecto terapéutico debe ser detectable en el 50% o el 95% de los individuos a los que se administra. Con respecto a los efectos tóxicos del fármaco o compuesto, es preferible que la dosis terapéutica efectiva no provoque ninguno. Sin embargo, aunque a veces pueden producirse efectos tóxicos, se puede llegar a un compromiso en el que estos se consideran preferibles al desarrollo normal de la enfermedad o patología sin la administración del fármaco o compuesto  
25 y, a su vez, pueden tratarse mediante terapias adicionales.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. A.** Ejemplo de un flujo de trabajo de preparación de secretoma. **B.** Mapa de calor que  
30 representa la agrupación jerárquica de muestras de secretoma basadas en su composición diferencial. **C.** Dendrograma clúster y Análisis de Componentes Principales (PCA) de muestras de secretoma. Se utiliza el promedio de secretomas de 4 donantes diferentes. **D.** Análisis mediante citometría de flujo de degranulación de plaquetas estimuladas con diferentes agonistas.

35

**Fig. 2.** Gráficos de barras que representan la suma acumulada de la concentración de factores de crecimiento en muestras de PRP y en muestras de secretoma (diferentes agonistas). La concentración es mayor en secretomas, en comparación con PRP, incluso si el recuento de plaquetas (promedio) es menor.

5

**Figura 3.** Ensayo de cicatrización de heridas y monitorización del cierre de la herida a lo largo del tiempo. Las células MRC-5 se estimularon con Secretomas (10%, n=6), además de suero bovino fetal (FBS) al 10%, como condiciones de cultivo estándar. **A.** Se muestran imágenes representativas de la herida al comienzo del ensayo y 48 h después de la estimulación. **B.** El gráfico que representa la dinámica de cierre de herida de las células MRC-5 estimuladas con los diferentes secretomas en comparación con el control (condiciones de cultivo estándar).

10

**Fig. 4.** Comparación de la capacidad regenerativa *in vitro* entre plasma rico en plaquetas (PRP) y secretomas plaquetarios (PLT-S). Para determinar la capacidad de proliferación celular se realizó un ensayo de cicatrización de heridas en células MRC-5 estimuladas o no con PRP o secretomas al 10% (además de FBS al 10%, condiciones de cultivo estándar). **A.** Se muestran imágenes representativas de la herida en células MRC-5 a tiempo 0 h y 48 h después de la estimulación con PRP o secretoma (obtenido con convulxina). **B.** El gráfico que representa la dinámica de cierre de células MRC-5 estimuladas con PRP o secretoma en comparación con sus respectivas condiciones control (medio de cultivo estándar con o sin heparina).

15

20

## Ejemplos

### 25 **Materiales y métodos**

#### Preparación de PRP utilizando un sistema cerrado

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) de donaciones de sangre interrumpidas (n = 14). El fraccionamiento se realizó con el equipo de un banco de sangre certificado (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias - CCSTA). En resumen, se realizó una doble centrifugación diferencial tras conectar la bolsa de sangre a las bolsas colectoras pediátricas: primero una a 1130 rpm durante 5 min sin freno, tras lo cual la fracción de plasma que contiene plaquetas se separa de los glóbulos rojos con una prensa Compomat G5 (Fresenius-Kabi) a una bolsa separada. La segunda centrifugación se realiza a 2500 rpm durante 12 min y freno 4, lo que permite la separación del PRP en una nueva bolsa y posteriormente distribuida en 3

35

colocaron a -40°C para permitir la lisis y el almacenamiento. Las muestras congeladas (PRPx) se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se centrifugaron a 10 krpm durante 2 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de las muestras de PRPx congeladas y descongeladas se recogió para su uso posterior.

5

Preparación del secretoma plaquetario (PLT-S)

Se preparó PLT-S a partir de sangre completa (donaciones interrumpidas), que se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos seguida de recolección de PRP (sistema abierto). La concentración de plaquetas en PRP se midió usando un analizador de CBC (Analizador de Hematología Sysmex XN-10/XN-20). A continuación, se centrifugó el PRP a 4000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se eliminó el sobrenadante del plasma pobre en plaquetas (PPP). Se utilizó tampón de glucosa HEPES (NaCl 132 mM, KCl 6 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, que contiene D-glucosa 5 mM) para resuspender el sedimento de plaquetas a una concentración de 2x10<sup>8</sup> plaquetas/mL. Luego, las plaquetas se activaron usando un agonista de PAR1 (TRAP6; 100 µM; BACHEM H-8365.0005), convulxina (0,625 ng/ml; ENZO Life Sciences ALX-350-100-C050), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich P8139-5MG), agretina A (6.53 nM, amable obsequio del Prof. J. Eble), colágeno (30 µg/mL y 90 µg/mL; Sigma-Aaldrich C4243-20ML), bajo agitación constante durante 5 minutos a 37°C utilizando un Termomezclador (Bloque Mezclador MB-102; BIOER). A diferencia de otros estudios publicados, no detuvimos la reacción incubando las plaquetas en hielo. Finalmente, las plaquetas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante del secretoma se recogió y se filtró con un filtro de poros de 0,22 µm, se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C para su uso posterior. Alternativamente, después de contar y volver a suspender en tampón de glucosa HEPES, las plaquetas se almacenaron a -80°C para permitir la ruptura completa de las plaquetas (es decir, lisado de plaquetas).

15  
20  
25

Control de calidad: análisis de degranulación y activación de la integrina β3.

Las plaquetas se estimularon como se describió anteriormente (preparación de secretoma) y se incubaron con un panel de marcadores de superficie (CD9-Alexa Fluor 647; CD62P-PE; CD63-PECy7) y fibrinógeno conjugado (FBG-Alexa Fluor 488), antes y después de la estimulación, para analizar capacidad de degranulación plaquetaria y activación de la integrina β3 tras la estimulación. Este análisis serviría como nuestro control de calidad de secretomas preparados antes de proceder con el análisis multiplex. Después de la incubación, las plaquetas se analizaron mediante citometría de flujo. Las plaquetas se clasificaron en función

30  
35

de la dispersión frontal/lateral y la positividad de CD9. El punto de corte se estableció en muestras no estimuladas y se midió el aumento de la expresión de CD62P, CD63 y la unión de fibrinógeno. Las muestras se seleccionaron para análisis posteriores cuando la degranulación de las plaquetas fuese óptima (es decir, sin degranulación o unión de FBG sin estímulo, y degranulación y unión de FBG adecuadas tras estímulo). Todos los anticuerpos eran de BD Biosciences. Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo FACS Aria II™ (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.).

#### Inmunoensayo multiplex

Los factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y moléculas inmunomoduladoras contenidas en los diferentes bioproductos plaquetarios se midieron mediante inmunoensayo multiplex de alto rendimiento con Human Procartaplex (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Esta matriz es un sistema de perlas magnético basado en anticuerpos que permite la cuantificación de una amplia gama de biomarcadores utilizando la plataforma de instrumentos Luminex 200 (Luminex Corporation, EE. UU.). El ensayo multiplex se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y las placas se leyeron utilizando el software xPONENT (Luminex Corporation, EE. UU.). Los factores específicos analizados fueron: Caspasa-3, CD40L, EGF, FGF-2, FGF-23, G-CSF (CSF-3), GM-CSF, GITRL, Granzima B, GRO $\alpha$  (KC / CXCL1), HGF, ICAM -1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-10, MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MIP-1 $\beta$  (CCL4), Osteopontina, PDGF-BB, PECAM-1, P-Selectina, RANTES (CCL5), SDF-1 $\alpha$ , Trombopoyetina (TPO), TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , VCAM, VEGF-A y VEGF-D.

#### Ensayo de cierre de heridas y análisis de imagen

Para analizar el potencial regenerativo de PLT-S o PRP, los ensayos de cierre de herida se realizaron con la línea celular de fibroblastos MRC-5. Se sembraron células MRC-5 en Culture-Insert 2 well 24 ibidi Treat ( $\mu$ -Plate 24 Well Black, Ibidi), a  $3,5 \times 10^5$  células/mL (volumen de 70  $\mu$ L por cámara) y se incubaron hasta alcanzar 80-90% de confluencia (aproximadamente 24 horas), y posteriormente, se retiró cuidadosamente el inserto de silicona, dejando un espacio libre de células de 500  $\mu$ m (según el fabricante). Después de lavar las células no adherentes, se añadió medio de cultivo suplementado con 10% de PLT-S o PRP (además de 10% de suero bovino fetal -FBS) al cultivo celular. Para observar el cierre de la herida, se monitorizaron las placas durante 48h utilizando un microscopio Time-Lapse Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Alemania) equipado con un módulo de incubación donde la temperatura y la atmósfera se mantuvieron a 37°C y 5% de CO $_2$ , respectivamente. La captura

de imagen se realizó con un objetivo Plan-Apochromat 10x/0,45 M27 (dt=2,1 mm). Se tomaron imágenes en mosaico (3x3) con una cámara (AxioCam MRm; Carl Zeiss) cada 12 horas. Los campos se seleccionaron con precisión micrométrica (de forma tridimensional, ejes xyz) utilizando la herramienta Tiles (posición z de la configuración de Tiles) del software ZEN Blue (Carl Zeiss).

Las imágenes se analizaron posteriormente utilizando el software Fiji/ImageJ (NIH) *Wound healing tool macro* de Montpellier Ressources Imagerie (MRI) disponible online en [https://github.com/MontpellierRessourcesImagerie/imagej\\_macros\\_and\\_scripts/wiki/Wound-Healing-Tool](https://github.com/MontpellierRessourcesImagerie/imagej_macros_and_scripts/wiki/Wound-Healing-Tool). El complemento informático analizó el área de herida en un tejido celular en una serie de imágenes que representan series temporales que miden la reducción del espacio libre entre los bordes de la herida. Se calculó el porcentaje de cierre de la herida y se comparó entre los controles y los grupos de tratamiento.

#### 15 Análisis estadístico.

Todos los datos se calcularon y expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p > 0,05$ . Los datos se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) con el método de Tukey HSD (diferencia significativa honesta) para comparaciones múltiples. El análisis estadístico y los mapas de calor se realizaron con el paquete R (Rstudio) versión 3.5.2. El Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó tras normalización de escala a intervalo de los valores variables utilizando el software Perseus versión 1.6.7.0.

**Ejemplo 1 - El perfil de secreción plaquetario viene determinado por la vía de señalización de activación / la composición del secretoma derivado de plaquetas se puede modular mediante la estimulación de plaquetas con diferentes agonistas de sus receptores.**

Usamos plaquetas lavadas para generar secretomas plaquetarios libres de plasma. Para ello, se estimularon plaquetas de donantes sanos (n=4) con varios agonistas de receptores (ver materiales y métodos) y luego, se cuantificó un total de 37 factores, incluyendo factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y algunos mediadores inmunes, utilizando un inmunoensayo humano multiplex. Previo a la caracterización por multiplex, medimos la activación plaquetaria mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de CD62p (gránulos alfa), CD63 (gránulos densos y lisosomas) y fibrinógeno como control de calidad de la degranulación de carga.

La caracterización de proteínas mostró un patrón de secreción diferente que depende de la activación de plaquetas inducida por agonista.

5 A continuación, con todas las variables medidas por Multiplex se realizó un PCA para visualizar la agrupación de las muestras, después de normalizar los datos (como se describe en M&M). Este análisis reveló que el perfil de secreción de TRAP6 se agrupaba con colágeno (dosis baja) y Agretina A, que el perfil de secreción de convulxina se agrupaba con colágeno (dosis alta) y el secretoma de PMA estaba ligeramente distante del resto.

### 10 **Ejemplo 2: El secretoma derivado de plaquetas está más enriquecido en factores de crecimiento que el PRP clásico**

A continuación, comparamos la composición de PLT-S ( $200 \times 10^3$  PLTs/ $\mu$ l) con la composición de PRPx (rango de PLT 262-728  $\times 10^3$  PLTs/ $\mu$ l). Observamos que la mayoría de los analitos tenían mayor concentración en PLT-S en comparación con PRP, incluso considerando que  
15 las muestras de PRP tienen una mayor densidad de plaquetas. De forma llamativa, los principales factores de crecimiento implicados en la regeneración tisular como FGF, VEGF, HGF y PDGF-BB, entre otros, se encontraban a concentraciones más elevadas en las muestras de PLT-S. Es de destacar, que la concentración de EGF mostró un amplio rango (HPS 49,938 a 103,581; PRPx 90,424 a 472,029) y fue el único factor que mostró una fuerte  
20 correlación con el número de plaquetas en cada muestra de PRPx ( $r = 0,82$ ).

Del mismo modo, las citocinas, quimiocinas y las moléculas de adhesión PECAM1 (CD31) y P-selectina se detectaron en mayor proporción en las muestras de PLT-S. Por el contrario, ICAM-1 y VCAM-1 se detectaron en mayor proporción en muestras de PRPx, así como  
25 RANTES (188 veces), Caspasa-3 (12 veces) y osteopontina (no detectada en muestras de PLT-S) que engloban ciertos mediadores inmunes y moléculas de adhesión que están presentes principalmente en la fracción plasmática.

### 30 **Ejemplo 3: La capacidad regenerativa de los secretomas es diferente según el agonista usado para inducir la degranulación plaquetaria**

Con el fin de evaluar el potencial regenerativo *in vitro* de PLT-S, realizamos ensayos de cicatrización de heridas en células MRC-5 (fibroblastos) estimuladas o no con los diferentes PLT-S y se monitorizó el cierre de la brecha/herida durante un período de 48 horas utilizando un microscopio *Time-Lapse*. Nuestros resultados muestran que la dinámica de cierre de  
35 heridas depende en gran medida de la composición del bioproducto, que a su vez depende

del agonista usado para activar la degranulación de la carga plaquetaria. El secretoma obtenido mediante la estimulación de GPVI por Convulxina ha dado como resultado la respuesta más mitogénica alcanzando un 95% de cierre de la herida en comparación con el 66% del control. Se obtuvieron resultados similares con colágeno en dosis altas (90 µg/ mL).

5 Además, los secretomas obtenidos con PMA y Agretina A mostraron la misma capacidad regenerativa, expresada en ambos casos como 92% de cierre de la herida. Finalmente, el secretoma obtenido con TRAP6 tuvo el menor potencial regenerativo. En general, estos resultados son de gran relevancia indicando el potencial de usar los secretomas como tratamiento con fines regenerativos.

10

% Cierre	Colágeno			Colágeno			
	Control	Convulxina	TRAP6	dosis baja	dosis alta	Agretina A	PMA
<b>Herida</b>							
<b>0 h</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>12 h</b>	15,88	27,06	20,26	20,53	18,06	25,16	23,65
<b>24 h</b>	34,18	67,74	42,83	52,36	53,45	61,69	56,88
<b>36 h</b>	50,70	87,34	59,05	76,01	79,68	83,18	78,12
<b>48 h</b>	65,99	94,72	78,89	87,57	91,99	92,38	92,08
				Colágeno	Colágeno		
<b>SEM</b>	Control	Convulxina	TRAP6	dosis baja	dosis alta	Agretina A	PMA
<b>0 h</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>12 h</b>	2,51	1,88	3,37	2,52	2,67	3,45	2,03
<b>24 h</b>	3,73	3,01	4,51	4,97	7,33	6,43	4,41
<b>36 h</b>	4,10	1,94	6,71	4,61	7,00	5,98	3,71
<b>48 h</b>	3,32	1,00	3,15	2,65	3,06	2,56	1,51

Tabla 2. Cierre de la herida (%): Media de repeticiones experimentales y error estándar de la media (SEM) (n = 6). La tabla resume los resultados obtenidos en los ensayos de cicatrización de heridas.

15

	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
<b>AGGA-C</b>	0,2766	0,0055	0,0011	0,0000
<b>Colágeno Alta-C</b>	0,9991	0,1158	0,0046	0,0000
<b>Colágeno Baja-C</b>	0,9088	0,1232	0,0119	0,0000
<b>CVX-C</b>	0,0783	0,0002	0,0001	0,0000
<b>PMA-C</b>	0,4354	0,0239	0,0050	0,0000
<b>TRAP6-C</b>	0,9320	0,8789	0,9127	0,0124
<b>Colágeno Alta -AGGA</b>	0,6556	0,9375	0,9997	1,0000
<b>Colágeno Baja -AGGA</b>	0,9295	0,8629	0,9686	0,8781

CVX-AGGA	0,9996	0,9850	0,9988	0,9978
PMA-AGGA	0,9999	0,9962	0,9959	1,0000
TRAP6-AGGA	0,9071	0,1313	0,0292	0,0127
Colágeno Baja - Colágeno Alta	0,9980	1,0000	0,9995	0,9184
CVX- Colágeno Alta	0,3118	0,4297	0,9552	0,9942
PMA- Colágeno Alta	0,8331	0,9996	1,0000	1,0000
TRAP6- Colágeno Alta	0,9991	0,7668	0,0949	0,0171
CVX- Colágeno Baja	0,6484	0,2821	0,6943	0,4433
PMA- Colágeno Baja	0,9894	0,9966	1,0000	0,8875
TRAP6- Colágeno Baja	1,0000	0,8157	0,2156	0,2160
PMA-CVX	0,9820	0,6998	0,8628	0,9937
TRAP6-CVX	0,6010	0,0096	0,0035	0,0011
TRAP6-PMA	0,9827	0,3910	0,1152	0,0099

Tabla 3. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples aplicada a los resultados de cicatrización de heridas obtenidos con secretomas plaquetarios. \*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,001$ .

5

#### Ejemplo 4 - La capacidad regenerativa de los secretomas es superior al PRP clásico.

Se capturaron imágenes de las heridas en los cultivos monocapa de fibroblastos humanos (hF) (línea celular MRC-5) a las 0 y 48 horas después de inducir la herida para mostrar que la proliferación de hF se aceleró en presencia de PLT-S en comparación con PRP.

p-valor	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
H-C	0,05306299	0,01579964	0,00495476	0,00126844
CVX-C	0,00633986	1,6304E-05	0,00030073	0,0055908
PRP-C	2,7844E-06	0,00135844	0,05428079	0,40781981
CVX-H	5,6811E-06	7,9485E-09	2,2366E-08	6,4024E-08
PRP-H	0,75372194	0,98377852	0,27288598	0,01417463
PRP-CVX	2,534E-12	1,1162E-12	7,791E-10	8,8765E-07

10 Tabla 4. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples aplicada a los resultados de cicatrización de heridas obtenidos con secretomas plaquetarios y PRP. \*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,001$ . H: control de heparina; C: Control.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la producción de un secretoma derivado de plaquetas que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) obtener una suspensión de plaquetas no activadas aislando y resuspendiendo en tampón las plaquetas procedentes de una fuente biológica que comprende plaquetas o muestra rica en plaquetas;
- b) inducir degranulación plaquetaria incubando en constante agitación la suspensión plaquetaria obtenida en la etapa a) con un agonista plaquetario obteniendo una  
10 suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas; y
- c) recolectar el secretoma derivado de plaquetas centrifugando la suspensión de secretoma plaquetario y plaquetas obtenidas en la etapa b) para eliminar plaquetas y otros restos celulares,
- 15 en donde la etapa b) se realiza entre 35°C y 40°C y todas las demás etapas se realizan a temperatura ambiente.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la muestra rica en plaquetas se selecciona de plasma rico en plaquetas, concentrados de plaqueta o plaquetas aisladas en solución.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, que además comprende una etapa de obtener una muestra rica en plaquetas a partir de una muestra biológica mediante centrifugación diferencial sin desaceleración forzada, en donde la etapa opcional se realiza antes de la etapa a).
- 25 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una etapa que comprende la filtración y/o nanofiltración del secretoma derivado de plaquetas obtenido en la etapa c).
- 30 5. Método según la reivindicación 3 o 4, en donde la muestra biológica es sangre total anticoagulada, preferiblemente sangre venosa, sangre arterial o sangre de cordón umbilical.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agonista plaquetario usado en la etapa b) se selecciona de la lista que consiste en: péptido activador del receptor de trombina 6 (TRAP6), convulxina, colágeno, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), agretina  
35 A, ristocetina, difosfato de adenosina (ADP), epinefrina, ácido araquidónico y trombina.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente activador de plaquetas se conjuga a un marcador y/o se une a una superficie, preferiblemente, en donde la superficie es una columna de afinidad.
- 5 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde la muestra biológica es de un mamífero, preferiblemente, el mamífero es un ser humano.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el secretoma derivado de plaquetas obtenido en la etapa c) se almacena mediante congelación, liofilización, congelación y liofilización, deshidratación, encapsulación o nanoencapsulación.
- 10 10. Un secretoma derivado de plaquetas obtenido por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 15 11. Uso del secretoma derivado de plaquetas según la reivindicación 10 como medio de cultivo y/o suplemento de medio de cultivo para cultivo celular y/o cultivos de tejido *in vitro*.
12. Una composición farmacéutica que comprende un secretoma derivado de plaquetas según la reivindicación 10.
- 20 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que además comprende un adyuvante farmacéutico aceptable, un vehículo farmacéutico aceptable y/u otro ingrediente activo.
- 25 14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 para su uso en medicina regenerativa y/o el tratamiento de daño tisular.
15. Un uso *in vitro* de un método para identificar biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que comprende:
- 30 a) obtener el secretoma derivado de plaquetas de un sujeto por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
- b) comparar el secretoma derivado de plaquetas de la etapa a) con un secretoma derivado de plaquetas de control,

en donde la presencia, ausencia o la variación en la concentración de un componente del secretoma obtenido en la etapa a) en comparación con el secretoma derivado de plaquetas de control es indicativa de que dicho componente es un biomarcador.

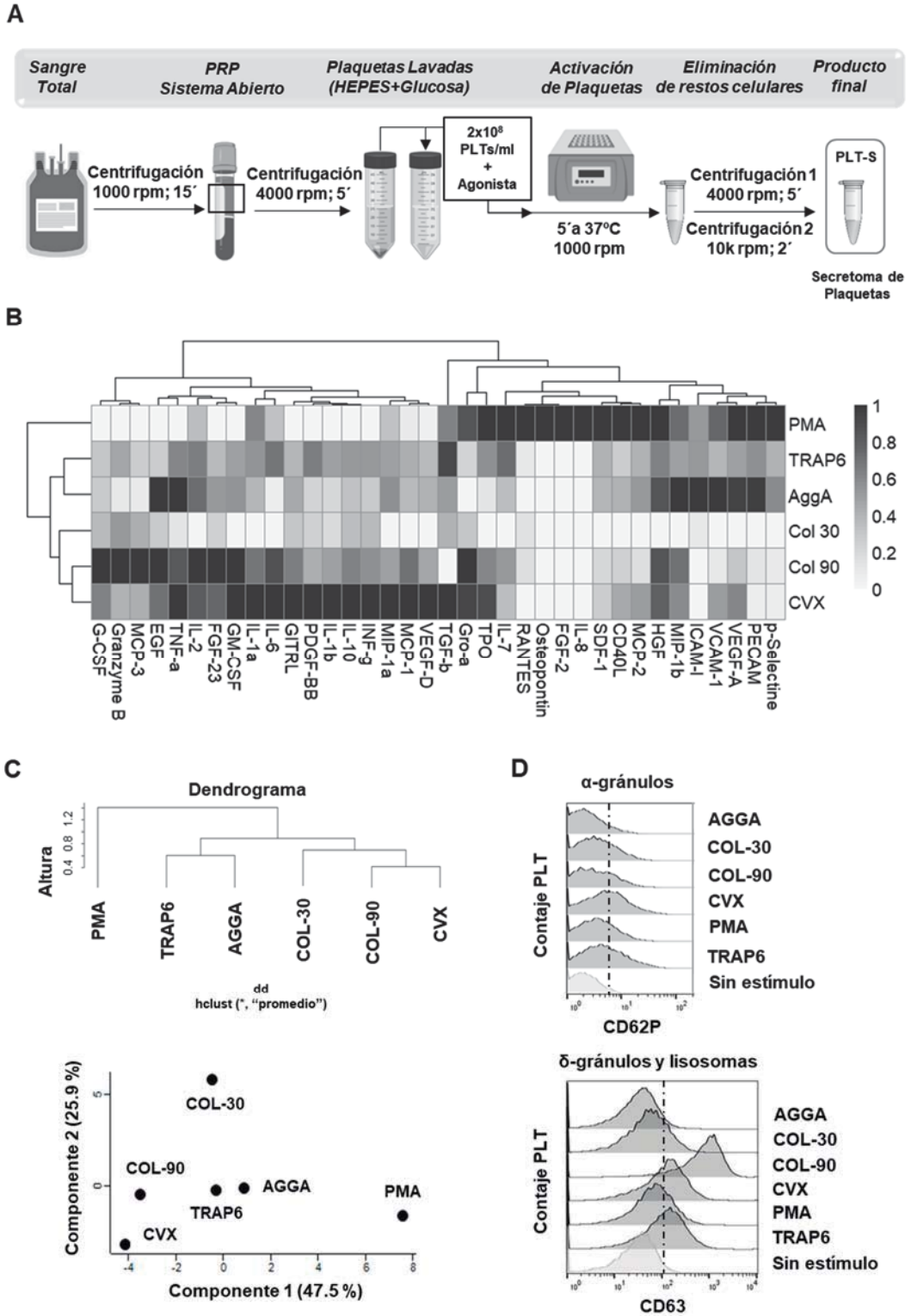
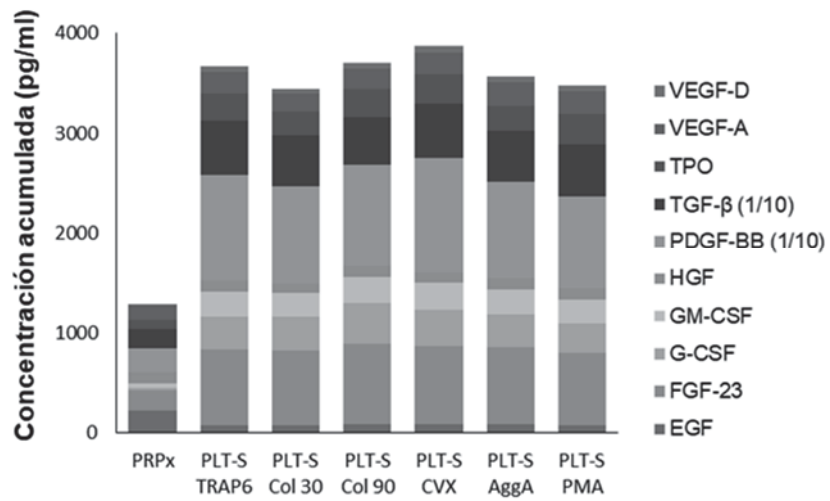


Fig. 1

**Concentración acumulada de factores de crecimiento y conteaje de secretomas de plaquetas (PLT-S) vs. Plasma-rico en plaquetas (PRP)**



Bioproducto	Contaje de plaquetas (PLTs/ $\mu$ l)
<i>Plasma-Rico en Plaquetas (PRPx)</i>	Rango 262-728 x 10 <sup>3</sup> Media 487,9 +/- 241 x 10 <sup>3</sup>
<i>Secretoma de plaquetas (PLT-S)</i>	200 x 10 <sup>3</sup>

**Fig. 2**

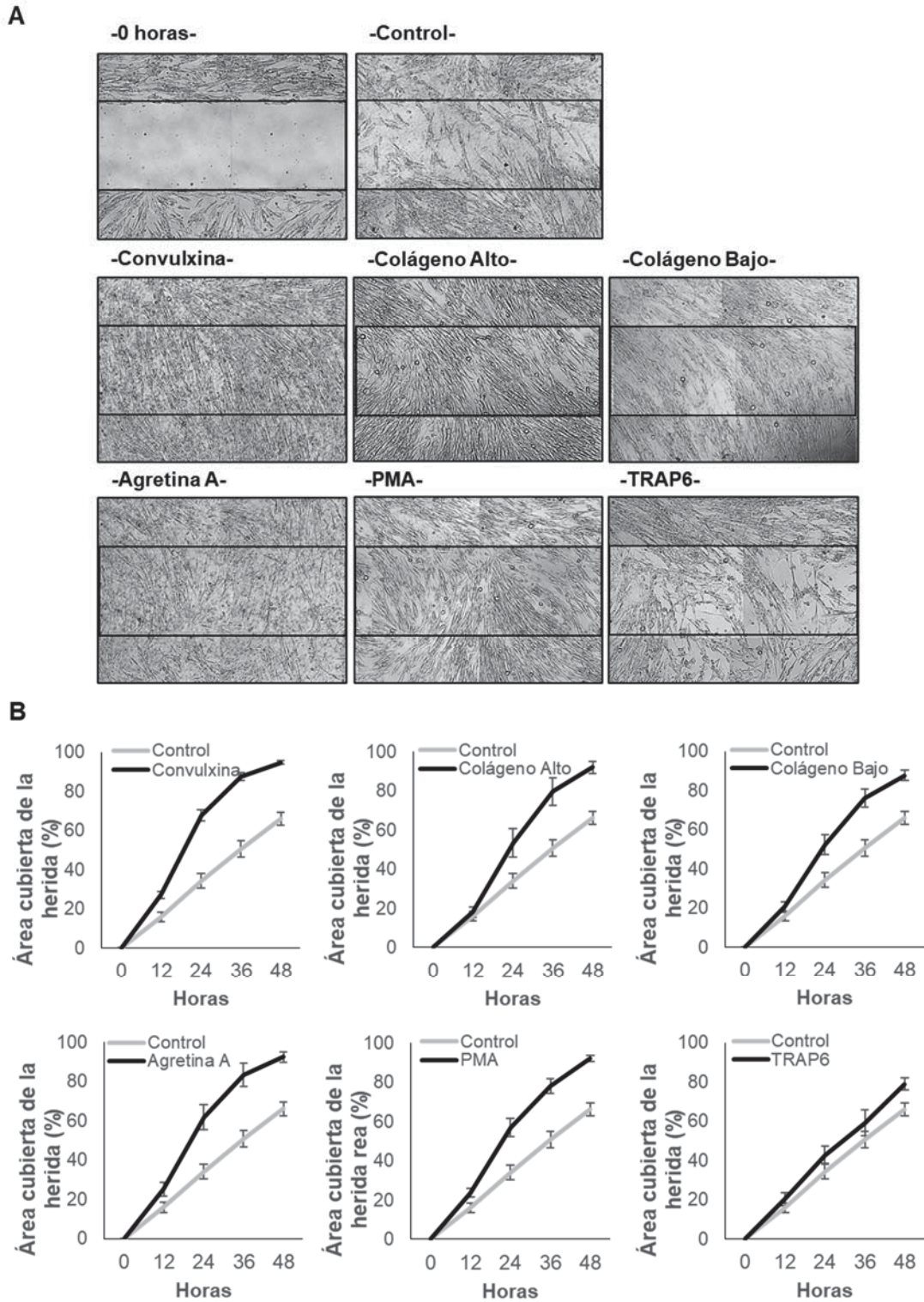


Fig. 3

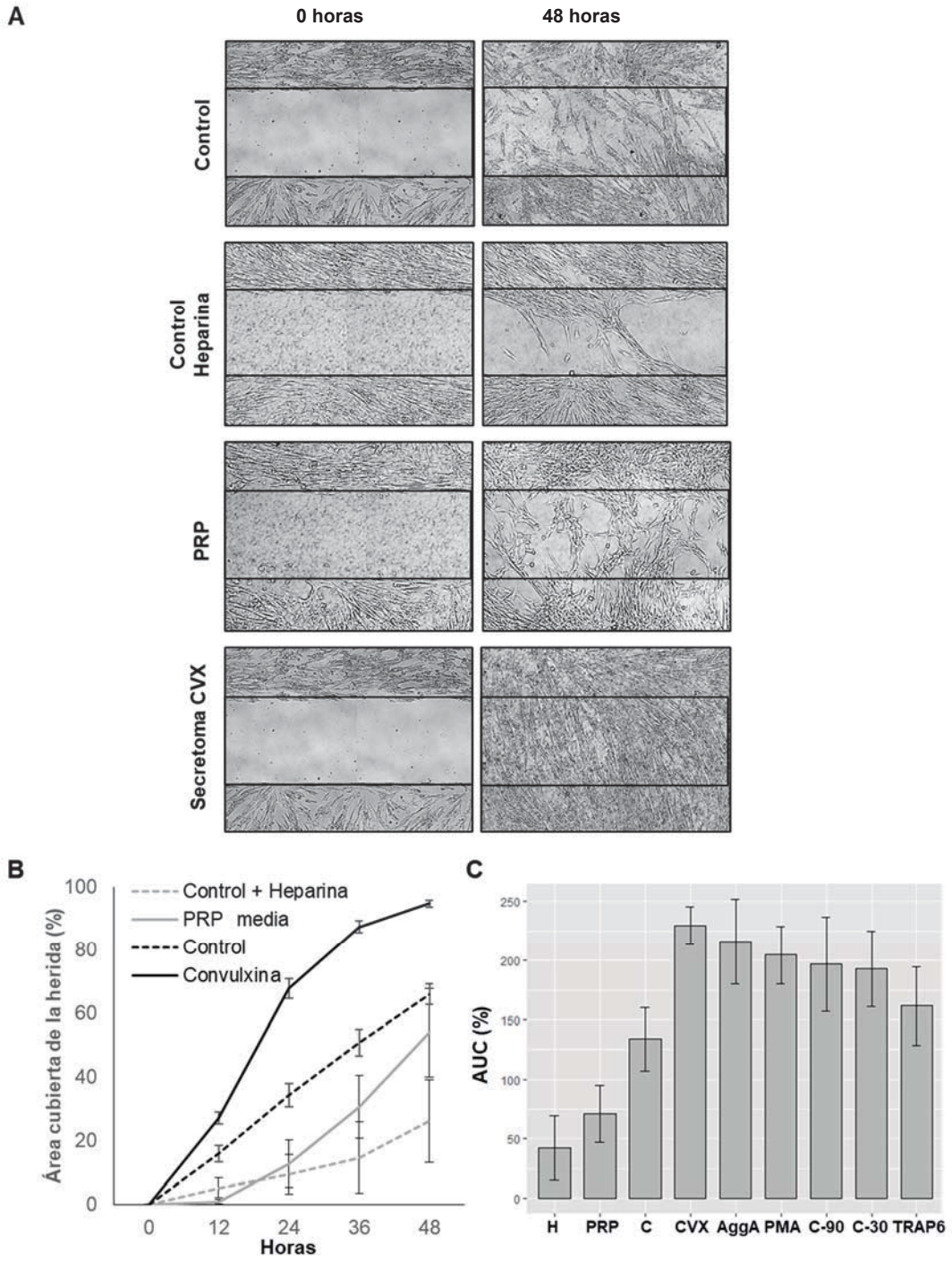


Fig. 4



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202130806  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 24.08.2021  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **A61K35/19** (2015.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PIERSMA S R et al. "Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate". Journal of Proteomics, 20090215 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Morrice Nicholas; Burchmore Richard, 15/02/2009, Vol. 72, N° 1, Páginas 91 - 109 [en línea] [recuperado el 20/07/2022]. , ISSN 1874-3919, <DOI: doi:10.1016/j.jprot.2008.10.009>. (ver puntos 2.2. y 2.5.)	1-10
X	US 5599558 A (GORDINIER RICHARD H et al.) 04/02/1997, (ver abstract y ejemplos).	11-14
X	CINI CHARMAINE et al. "Differences in the resting platelet proteome and platelet releasate between healthy children and adults". Journal of Proteomics, 20150411 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Morrice Nicholas; Burchmore Richard, 11/04/2015, Vol. 123, Páginas 78 - 88 [en línea] [recuperado el 28/07/2022]. ISSN 1874-3919, <DOI: doi:10.1016/j.jprot.2015.04.003>. (ver abstract).	15
A	MARGOLIS D J et al. "Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers." Diabetes care United States Mar 2001. 28/02/2001, Vol. 24, N° 3, Páginas 483 - 488 [en línea] [recuperado el 28/07/2022]. , ISSN 0149-5992 (Print), <DOI: pubmed:11289472>. todo el documento.	1-15
A	ACEBES-HUERTA et al. "Platelet-derived bio-products: Classification update, applications, concerns and new perspectives". Transfusion and Apheresis Science, 31/12/2019, Vol. 59, N° 102716, Páginas 1-9 [en línea] [recuperado el 28/07/2022]. , <DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102716">https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102716</a> >. todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.07.2022

Examinador  
M. d. García Coca

Página  
1/2

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

A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, INSPEC/IEE, XPESP y Bases de Datos TXT