

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 581**

21 Número de solicitud: 201500877

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/15 (2015.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.12.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.06.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)

C/ Ancha, 16

11001 Cádiz ES

72 Inventor/es:

DURÁN RUIZ, María Carmen

54 Título: **Procedimiento para el estudio ex-vivo de la respuesta inicial de distintos tipos celulares en aterosclerosis**

57 Resumen:

Procedimiento para el estudio ex-vivo de la respuesta inicial de distintos tipos celulares en aterosclerosis.

La novedad de este modelo reside en la incubación de las células de interés con el secretoma completo de las placas de ateroma para evaluar la respuesta celular. Dicha incubación permite estudiar de forma más directa la respuesta celular frente a los factores secretados por las placas de ateroma, en lugar de emplear factores aislados (VEGF, SDF-1).

Este procedimiento permitiría evaluar estrategias para modular la respuesta celular en respuesta al daño aterosclerótico, por ejemplo en el caso de las células endoteliales progenitoras (ECPs), para potenciar la remodelación vascular en terapias basadas en el uso de estas células, si bien puede aplicarse igualmente a cualquier tipo celular asociado a aterosclerosis. Igualmente permite evaluar el efecto de fármacos en este marco inicial de respuesta celular frente a aterosclerosis.

ES 2 615 581 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA EL ESTUDIO *EX-VIVO* DE LA RESPUESTA INICIAL DE DISTINTOS TIPOS CELULARES EN ATEROSCLEROSIS.

SECTOR DE LA TÉCNICA AL QUE SE REFIERA LA INVENCIÓN.

5 La presente invención consiste en un nuevo modelo de estudio de la respuesta inicial de cualquier tipo celular implicado en el daño aterosclerótico. En concreto, el modelo se ha aplicado para evaluar la respuesta inicial de células endoteliales progenitoras (EPCs) en aterosclerosis.

10 El procedimiento que se presenta permite identificar marcadores proteicos celulares tempranos en respuesta a la patología de aterosclerosis, así como mecanismos de acción celular susceptibles de ser modulados para su uso en terapia celular. La presente invención resulta por tanto de interés para empresas del sector farmacéutico centradas en el desarrollo de tratamientos frente a aterosclerosis, incluyendo fármacos frente a dianas proteicas así como terapias celulares con el mismo fin.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA.

20 La aterosclerosis constituye la principal causa de enfermedades cardiovasculares y por tanto una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Se trata de un proceso patológico que afecta a los vasos sanguíneos en respuesta a diversos factores de riesgo cardiovascular, derivando en la formación de placas de ateroma que se depositan sobre el endotelio de los vasos sanguíneos. La ruptura de la placa provoca la obstrucción de los vasos provocando fenómenos trombóticos o embólicos que suelen desencadenar infartos cerebrales o de miocardio (Libby P, *Nat Med* 2002, 8(11):1257-1262)

25 En los últimos años la terapia celular se ha presentado como una alternativa prometedora a los tratamientos tradicionales para combatir enfermedades cardiovasculares y el proceso aterosclerótico en sí. Actualmente varias estrategias basadas en terapia celular están siendo testadas para el tratamiento tanto de enfermedades cardíacas como de enfermedades vasculares periféricas (Radrizzani M, *J Transl Med* 2014, 12:276).

30

Entre los tipos celulares empleados, las células endoteliales progenitoras (EPCs) se consideran potenciales candidatos en aplicaciones terapéuticas que persiguen revascularización debido a las propiedades regenerativas que se les asigna a estas células. Las EPCs parecen jugar un papel fundamental en la patología de aterosclerosis

y la recuperación arterial tras la lesión (Hristov M, *Curr Opin Lipidol* 2008, **19**(5):491-497), promoviendo la reparación vascular, angiogenesis y manteniendo una superficie inflamatoria resistente (Yeh ET et al. *Circulation* 2003, **108**(17):2070-2073). En aterosclerosis, una disminución del número de EPCs circulantes se asocia con el desarrollo de la enfermedad (Chironi G et al. *Atherosclerosis* 2007, **191**(1):115-120). Mas
5 aún, células con marcadores CD34, KDR y C-kit (propios de células endoteliales) han sido detetadas en zonas de lesión aterosclerótica humanas, sugiriendo su papel en el proceso de remodelado vascular (Torsney E, *J Mol Cell Cardiol* 2011, **50**(2):304-311).

Hasta la fecha existen diversos ensayos para entender cómo se comportan las EPCs en
10 respuesta al daño vascular. Los estudios *in vivo* han demostrado que las EPCs se movilizan rápidamente tras un trauma vascular y contribuyen a la revascularización de vasos dañados en respuesta a los niveles de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) circulantes inducido por citoquinas pro-inflamatorias (Gil M et al, *Circ Res* 2001, **88**(2):167-174; Du F et al, *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012, **17**:2327-2349). Los ensayos
15 *in vitro* se han centrado más en la respuesta de las EPCs frente a citoquinas, moléculas pro-inflamatorias y pro-aterogénicas como GM-CSF y SDF-1, que aumentan la neovascularización en tejidos isquémicos (Du F et al, *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012, **17**:2327-2349; Takahashi T et al, *Nat Med* 1999, **5**(4):434-438).

El desarrollo de un modelo experimental para estudiar los mecanismos moleculares y
20 celulares por los cuales las placas de ateroma interaccionan directamente con las EPCs es de gran interés, y podría proporcionar nueva información sobre la relevancia fisiológica o patológica de estas células. Actualmente se desconoce si los factores liberados directamente por las placas de ateroma tienen algún efecto sobre las células EPCs o cualquier otro tipo celular circulante.

25 El modelo que se presenta es una nueva estrategia para determinar la respuesta inicial de las EPCs frente al daño aterosclerótico, lo cual podría permitir su modulación para potenciar la remodelación vascular en terapias basadas en el uso de estas células. No obstante, el procedimiento presentado podría aplicarse igualmente a cualquier tipo celular asociado a aterosclerosis.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El modelo que se presenta permite simular la situación *in vivo* en la que las placas de ateroma secretan factores al medio circulante (la sangre) y estos factores entran en contacto con las células también circulantes o cercanas a la zona de lesión,
5 desencadenando una respuesta inicial frente al daño aterosclerótico (figura 1).

La novedad del procedimiento planteado consiste fundamentalmente en poner en contacto directo, *ex vivo*, el secretoma (fracción secretada) de las placas de ateroma de pacientes ateroscleróticos con distintos tipos celulares implicados en esta patología.

El término "secretoma" de las placas de ateroma hace referencia al conjunto de moléculas, fundamentalmente y sin limitación, factores proteicos, glucídicos y/o lipídicos, liberados por el tejido conteniendo las placas de ateroma al medio en el que están
10 siendo cultivadas.

En concreto, los autores han aplicado el método para estudiar la respuesta inicial de EPCs cultivadas *ex vivo* con el secretoma de las placas de ateroma (figura 2). Hasta la
15 fecha, no se ha descrito si los factores liberados directamente por las placas de ateroma tienen algún efecto sobre las células EPCs o cualquier otro tipo celular circulante.

El desarrollo de este modelo experimental permitirá obtener nueva información sobre la relevancia fisiológica o patológica de estas células en aterosclerosis.

El procedimiento presentado permite la identificación de marcadores moleculares que se expresan como mecanismo de respuesta temprana frente al secretoma de las placas.
20

El procedimiento presentado permite detectar cambios morfológicos y/o funcionales en las células tratadas como mecanismo de respuesta temprana y activación frente al secretoma de las placas.

Este procedimiento permite por tanto evaluar nuevas estrategias para modular a las células de interés como paso previo a su uso en terapia celular aplicada a aterosclerosis.
25

La novedad de la invención radica pues en incubar *ex vivo* las células cultivadas, tómese por ejemplo las EPCs, con el secretoma de las placas de ateroma. Para ello los autores han probado incubaciones directas, sin diluir, o diluyendo 1:1 con el medio de cultivo, y también se han probado distintos tiempos de incubación (1 hora, 24 horas) para ver la
30 respuesta celular.

Para evaluar mejor el efecto producido por el secretoma de las placas de ateroma sobre las células en cultivo, los autores recomiendan incubar en paralelo otro set de las células de interés con un secretoma control, obtenido de cultivar fracciones de tejido que no contengan placa de ateroma. Este secretoma control puede obtenerse, sin limitación,

5 cultivando arterias mamarias o radiales extraídas de individuos durante procesos quirúrgicos, o bien las zonas arteriales adyacentes, no dañadas, a las zonas complicadas con placas de ateroma. Para la obtención de los secretomas control se procede de igual modo que para la obtención del secretoma de las placas de ateroma, incubando los tejidos control 72 horas a 37° C en medio RPMI libre de proteínas.

10 Con objeto de poder evaluar el efecto producido por el contacto del secretoma de las placas de ateroma con las células de interés pueden emplearse, sin limitación, diferentes técnicas conocidas por el estado de la técnica, incluyéndose por ejemplo técnicas para la identificación de marcadores proteicos cuya expresión resulta alterada en la respuesta inicial de las células al contacto con el secretoma de las placas (análisis proteómico, Western blot, ELISA, marcaje celular por inmunofluorescencia, citometría); o bien para detectar cambios morfológicos/funcionales en las células (ensayos de proliferación, migración, análisis por microscopía de los cambios morfológicos, etc).

15 **MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.**

La realización del procedimiento presentado, consistente en la incubación ex vivo de las células cultivadas, tómesese por ejemplo las EPCs, con el secretoma de las placas de ateroma requiere de:

- 20
- La obtención de muestras de tejido afectado por placas de ateroma mediante endarterectomía (carótida, femoral o coronaria).

25 Para obtener el sobrenadante (el secretoma de las placas de ateroma), las arterias complicadas con placas de ateroma se cultivan durante 72 horas a 37° C en una placa de cultivo de plástico que permita un volumen mínimo de 4 ml de medio RPMI sin suero (para asegurar que el tejido está cubierto de dicho medio), siguiendo un protocolo previamente establecido (Alvarez-Llamas G et al, *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**(4):589-600 y Duran MC *Proteomics* 2003, **3**(6):973-978). Al cabo de las 72 horas dicho sobrenadante se puede utilizar para incubar directamente con las células o bien puede guardarse alicotado en tubos de microcentrífuga y congelado a -80°C para su posterior uso. El tejido se descarta pasadas las 72 horas.

- 30
- El tipo celular que se quiera estudiar. Puede tratarse de cultivos primarios o de líneas celulares relacionadas. En el modelo presentado, los autores han trabajado con EPCs aisladas de individuos sanos a partir de la fracción mononuclear de sangre periférica (PBMCs). Actualmente existen diversos métodos ampliamente conocidos en el

estado de la técnica, incluyendo entre otros, y sin limitación, métodos de centrifugación en gradiente (por ejemplo el gradiente con Ficoll, W02008077094) o el uso de separadores de células sanguíneas (Pierelli L. et al, Bone Marrow Transplant, 1991, 7, 355-361)

5 Para la obtención de células EPCs, las células PBMCs aisladas se incuban en placas de cultivo que pueden ser de diversos tamaños, constituidas por una superficie única o dividida en varios pocillos. En el método presentado se han utilizado placas de 48 pocillos individuales, para emplear menor cantidad de células (10^6 cells/0.5 ml por pocillo), menor cantidad de sobrenadante (100-200 microlitros/pocillo) y poder evaluar
10 varias condiciones en una misma placa.

Las células PBMCs aisladas se incuban en placas de cultivo preferiblemente tratadas con un polímero que promueva la adhesión celular a la placa de cultivo. En el método presentado se han tratado las placas con fibronectina, procediendo de acuerdo a protocolos descritos previamente (Pula, G. et al. *Circulation research* **104**, 32-40, 2009;
15 23 Vasa, M. et al. *Circulation research* **89**, E1-7, 2001) , si bien existen varios polímeros tales como colágeno y sin limitarse a, fibronectina, colágeno o poli-lisina.

Las células PBMCs aisladas se incuban durante 7 días a 37° C y 5% CO₂ en un medio enriquecido en factores que favorecen la diferenciación de las PBMCs a EPCs. A día 4 se reemplaza el medio de cultivo por el mismo medio pero fresco, con objeto de
20 descartar las células no adherentes, y se continúan creciendo hasta día 7 en las mismas condiciones, 37° C y 5% CO₂. En el mercado existen varios medios actualmente disponibles para el crecimiento diferencial de EPCs. Por ejemplo, en el procedimiento presentado, se ha utilizado el medio EBM-2V (Endothelial basal médium 2-vascular) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5% y conteniendo factores de crecimiento
25 incluidos en el kit EGM-2 Single Quots (Lonza).

Una vez obtenidos ambos elementos (células de interés y secretoma), se procede a realizar la primera parte del procedimiento presentado, consistente en incubar ex vivo las células en cultivo con el secretoma de las placas de ateroma.

Para ello se retira el medio en el que están incubadas las células. Las EPCs son células
30 adherentes por lo que se descarta directamente el medio. Si fuesen células en suspensión tendrían que centrifugarse previamente para resuspenderlas después en el sobrenadante de las placas. Sobre las células se añade el sobrenadante. Los autores han probado a añadir el sobrenadante directamente, sin diluir, o realizando una dilución 1:1 con el medio de crecimiento antes de añadirse a de las células. Se ha optado por
35 diluir 1:1 el secretoma con el medio de crecimiento celular para simular mejor la situación

en la que los factores secretados por las placas son liberados al medio circulante que contiene a las células.

El volumen que se añade a las células debe ser proporcional a las dimensiones de la placa de cultivo. En el caso de una placa de 48 pocillos, los autores añaden 200
 5 microlitros de la mezcla 1:1 para ensayos de respuesta corta (1hora) o 400 microlitros cuando el tiempo de incubación es de 24 horas.

A continuación se incuban las células en incubador de CO₂, en las condiciones óptimas de las células (Ej, las EPCs se incuban a 37° C al 5% CO₂). El tiempo de incubación dependerá del tipo de respuesta que se quiere analizar (respuesta temprana, 1hora,
 10 respuesta tardía, más de 24 horas). Los autores han probado respuestas a 1 hora y a 24 horas, observando variaciones entre ambos tiempos en la expresión proteica.

Como control, a otro grupo de las mismas células cultivadas se le elimina el medio y se le añade medio fresco en igual cantidad que lo que se añadió a las células tratadas (por ejemplo 200 o 400 microlitros para incubaciones de 1 hora o 24 horas respectivamente)
 15 y se incuban a 37° C y 5% CO₂. Adicionalmente, y en paralelo, un tercer grupo de las células de interés se pueden incubar con el secretoma de arterias no dañadas con placas de ateroma (secretoma control), para detectar el efecto exclusivo de las placas. En este caso se procederá como anteriormente. Tanto las células tratadas como las células control deben incubarse al mismo tiempo y en las mismas condiciones.

20 El procedimiento planteado podrá aplicarse para evaluar a posteriori los cambios moleculares/celulares producidos en respuesta de las células al contacto con el sobrenadante de las arterias complicadas con placas de ateroma. De este modo, el análisis podrá centrarse, como ejemplos en:

- La identificación/detección de marcadores proteicos cuya expresión resulta
 25 alterada en la respuesta inicial de las células al contacto con el secretoma de las placas. Para ello podrán utilizarse, sin limitación, diversas técnicas conocidas en el estado de la técnica (análisis proteómico, Western blot, ELISA, marcaje celular por inmunofluorescencia, citometría).

Para la identificación de proteínas mediante análisis proteómico las células deben
 30 lisarse previamente con tampón de lisis. La lisis puede realizarse retirando la mezcla secretoma: medio de cultivo tras el tiempo de incubación y añadiendo directamente sobre los pocillos tampón de lisis (unos 100 microlitros/pocillo en una placa de 48 pocillos), tras lo cual se recogen las células en un mismo tubo de microcentrifuga (un tubo por condición analizada, esto es, células tratadas con el secretoma de las placas,
 35 células control). La opción seleccionada por los autores es recoger primeramente las células en un tubo, tras tripsinización para separarlas de la superficie de la placa, y tras

2-3 lavados con fosfato buffer salino (PBS), las células se centrifugan y el pellet celular se resuspende en 100 microlitros de tampón de lisis. A continuación se realiza la cuantificación de proteínas utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica, y sin limitación, como el método de Lowry o usando el reactivo de Bradford, y se procede al análisis proteómico e identificación por espectrometría de masas. Alternativamente las proteínas del lisado celular pueden analizarse por western-blot para cuantificar la presencia/ausencia de proteínas de interés en respuesta a la incubación de las células, por ejemplo, las EPCs, con el secretoma de la placa de ateroma.

- Ensayos de potencia/funcionales para determinar el efecto del secretoma de las placas de ateroma sobre las células de interés. Para ello se pueden realizar métodos conocidos en el estado de la técnica, entre ellos, y sin limitación, ensayos de proliferación, migración, angiogénesis, permeabilidad, etc.

Entre los ensayos de potencia/funcionales se pueden detectar cambios en la movilidad celular en respuesta al contacto directo con el secretoma de las placas de ateroma. Para ello se plantea una modificación del procedimiento en cuanto a que las células se disponen dentro de un sistema del tipo Boyden (Boyden, S.V. *J Exp Med* 1962. 115 (3): 453 – 66), consistente en dos compartimentos separados por una membrana porosa. Las células, en medio conteniendo 0.5-1% de FBS se añaden al compartimento superior previamente tratado con un polímero de adhesión, entre otros y sin limitación, fibronectina o colágeno (para el caso de células adherentes como las EPCs) o directamente sobre la cámara superior en el caso de células en suspensión. En la cámara inferior se añade el sobrenadante/secretoma de las placas de ateroma diluido 1:1 en medio basal EBM-2V 5% FBS, en volumen suficiente para que la cámara inferior quede cubierta de dicho medio (700-800 microlitros para placas de 24 pocillos). En paralelo otro grupo de células se añade a otra cámara boyden pero en la cámara inferior se añade medio basal de crecimiento y adicionalmente, un tercer grupo de células puede ponerse en contacto con el secretoma control de arterias no dañadas por las placas de ateroma. Las cámaras se incuban, sin limitación, durante un mínimo de 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas o 48 horas.

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Evaluación del efecto del secretoma de las placas en las células EPCs sanas sobre la expresión de la proteína ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) implicada en procesos pro-inflamatorios

35

Para determinar si el contacto directo del secretoma de las placas de ateroma afecta a la expresión proteica de las EPCs, a día 7 de su extracción de la sangre de individuos sanos éstas se incubaron durante 1 hora y 24 horas con el sobrenadante de las placas, tal como se ha descrito previamente, a 37° C y 5% CO₂. Tras este tiempo se lisaron con Laemmli buffer 1x (50 mM Tris pH 6.8, 10% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.1% w/v bromophenol blue) y se separaron en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana Immobilon-FL (IPFL00010 Millipore, MA). Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos frente a ICAM-1 y α -tubulina como control de carga. Como anticuerpos secundarios se usaron IRDye 800 CW Goat anti Rabbit y IRDye 800 CW Goat anti Mouse (LI-COR).

Las membranas se analizaron utilizando un sistema Odyssey (LI-COR).

Resultado ejemplo 1:

La proteína ICAM-1 es una molécula de adhesión esencial en interacciones célula-célula y también entre célula-matriz extracelular, y está implicada en los pasos iniciales de la respuesta inflamatoria. Los datos obtenidos señalan que el cultivo ex vivo de las EPCs de individuos sanos con el secretoma de carótidas complicadas con placas de ateroma provoca un aumento en la expresión de la proteína ICAM-1, tras 1 hora de incubación, y dicho incremento se mantiene tras 24 horas de incubación (figura 3). Como control de carga se utilizó la proteína α -tubulina.

Ejemplo 2. Efecto del secretoma de las placas de ateroma sobre la capacidad migratoria de células EPCs

Tras el cultivo durante 7 días de células EPCs aisladas a partir de la fracción PBMCs de individuos sanos en placas de fibronectina, a 37° C y 5% CO₂, éstas se tripsinizaron para separarlas de la placa, se centrifugaron y resuspendieron en medio EBM-2V conteniendo 0.5% FBS y se contaron con placa de Neubauer con Tripán blue. A continuación se añadieron 10⁵ células/pocillo en la parte superior de una cámara Transwell (8 μ m tamaño del poro, 153422 Corning), previamente tratadas con fibronectina. A continuación en la cámara inferior se añadieron, en distintos pocillos: 900 μ l de medio EBM-2V conteniendo 5% FBS (EPC cont), 900 μ l de una mezcla 1:1 de medio EBM-2V con 5% FBS y secretoma de las placas (EPC+AP), o 900 μ l de una mezcla 1:1 de medio EBM-2V con 5% FBS y secretoma de arteria mamaria no dañada por las placas de ateroma (EPC+MA). Tras 6 horas de incubación a 37° C y 5% CO₂, las células presentes en el lado inferior de la membrana de la cámara superior del transwell se fijaron con 4% paraformaldehído, y las células en la parte superior fueron descartadas. Los

experimentos se realizaron en triplicado para condición y se repitieron 3 veces con secretomas de placa y con células EPCs de distintos individuos. Para cuantificar la migración celular se tiñeron los núcleos de las células fijadas con DAPI y se contaron manualmente en un microscopio de fluorescencia (10 cuadrantes al azar por inserto).

5 Resultado ejemplo 2:

Los secretomas de las placas de ateroma, promueven un incremento significativo de la migración de EPCs de individuos sanos (EPC+AP) a través de las membrana porosa del sistema Transwell, comparado con las EPCs en condiciones basales (EPC Cont, $p < 0.01$) y también en comparación con las células EPC incubadas con el sobrenadante/secretoma de arterias mamarias sin placa de ateroma (EPC+MA, $p < 0.001$), que produjo un efecto similar a la situación basal, en el que las EPCs estuvieron en contacto con el medio basal EBM-2V 5% FBS (figura 4).

Según esto, solo los factores secretados por las arterias complicadas con las placas de ateroma, y no las arterias mamarias, estimulan específicamente la movilización de células EPCs sanas, presumiblemente mediante un efecto quemo-atrayente sobre estas células.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 **Figura 1.-** Representa la situación *in vivo* en la cual las placas de ateroma que afectan a los vasos sanguíneos secretan proteínas y otras moléculas al medio circulante (sangre). Estos factores entran en contacto con las células circulantes, activándolas y promoviendo una respuesta frente al daño aterosclerótico.

25 **Figura 2.-** Representa el modelo *ex-vivo* que persigue simular esta situación *in vivo*, incubando directamente los factores secretados por las placas de ateroma (secretomas) con las células aisladas (en el caso de las EPCs) o con líneas celulares. Se simula así el contacto y la respuesta inicial al daño aterosclerótico.

30 **Figura 3.-** Efecto del secretoma de las placas sobre la expresión de la proteína ICAM-1 en las EPCs. Los resultados obtenidos por western-blot indican que en respuesta a la incubación *ex vivo* de las EPCs de individuos sanos con el sobrenadante de las placas de ateroma durante 1h y 24h, se produce un aumento de la expresión de la proteína ICAM-1 en las células tratadas en comparación de las EPCs sin incubar con dicho sobrenadante. EPC Cont: Células EPCs control, sin tratar, de dos individuos sanos

distintos (1, 2). EPC+AP: células procedentes de individuos sanos incubadas con el sobrenadante de las placas de ateroma extraídas de dos pacientes distintos (AP1 y AP2) tras 1 hora y 24 horas de incubación.

- 5 **Figura 4.-** La movilización de EPCs en respuesta al contacto con el sobrenadante de las placas de ateroma se evaluó utilizando cámaras Transwell. A) La figura indica la disposición de las EPCs en la cámara superior y su incubación en la parte inferior con el medio basal EBM-2V (EPC Cont), el secretoma de las arterias mamarias (EPC+MA) o el secretoma de las placas de ateroma (EPC+AP). Tras 6 horas, las células que
10 atravesaron la membrana del Transwell se contaron por microscopia de fluorescencia. B) Los datos indican un aumento de la migración de EPCs a través de la membrana al ponerlas en contacto con el sobrenadante de las placas de ateroma (EPC+AP) en comparación con las células EPC Cont (**p-valor<0.01) o las células incubadas con el sobrenadante de arterias mamarias (p-valor<0.001), quienes mostraron una migración
15 similar a las EPCs control.

MANERA EN QUE LA INVENCIÓN ES SUSCEPTIBLE DE APLICACIÓN INDUSTRIAL.

Este procedimiento es aplicable para:

- 20 a) Evaluar, *in vitro* y *ex vivo*, la respuesta al contacto inicial de los factores secretados por las placas de ateroma de cualquier tipo celular asociado al proceso aterosclerótico.
- b) Evaluar *ex vivo* la respuesta inicial de células endoteliales progenitoras (EPCs) aisladas de individuos sanos frente al daño promovido por el secretoma de placas de ateroma extraídas de pacientes ateroscleróticos.
- 25 c) Identificar cambios de expresión proteica que resulten de la interacción directa entre los factores secretados por arterias complicadas con placas de ateroma y los tipos celulares de interés. Los cambios de expresión se compararán con condiciones basales, en las que las células no estén en contacto con dicho secretoma de las placas, esto es, estén en medio basal o bien en contacto con
30 secretoma control, obtenido de arterias no complicadas con placas de ateroma.
- d) Evaluar el efecto de fármacos dirigidos hacia las proteínas cuya expresión proteica se vea afectada en las células en contacto con el secretoma de las placas de ateroma, bien para bloquear su expresión o promover la expresión

proteica cuando estas favorezcan el proceso de regeneración vascular en aterosclerosis.

- 5
- e) Evaluar el efecto del secretoma de las placas sobre la actividad, funciones y/o morfología de las células de interés. Esto permitirá entender mejor la activación inicial de dichas células en respuesta al daño aterosclerótico y a la vez, permitirá encontrar mecanismos para modular dichas células y usarlas en terapia celular frente aterosclerosis.
 - f) Incorporar este procedimiento dentro de las etapas de validación de un determinado fármaco o terapia celular en aterosclerosis.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, que consiste en poner en contacto directo el secretoma completo de las placas de ateroma con el tipo celular cuya respuesta se quiere evaluar.

- 10 2. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicación 1, donde el secretoma de las placas de ateroma se obtiene de las endarterectomías carotideas, femorales o coronarias aplicadas a pacientes ateroscleróticos.

- 15 3. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicación 1, donde el tipo celular a estudiar consiste en cultivos primarios, obtenidos mediante extracción de sangre de donantes, células de médula ósea, cordón umbilical, o de líneas celulares relacionadas.

- 20 4. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicaciones 2 y 3, donde las células a estudiar se incuban directamente con el sobrenadante de las placas de ateroma.

- 25 5. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicación 4, donde el sobrenadante se añade en el medio celular (1:1), en volumen proporcional al tipo de placa en la que se crezcan las células, para posteriormente incubar las células en incubador de CO₂, durante un tiempo proporcional al tipo de respuesta que se quiere analizar.

- 30 6. Un procedimiento, para el estudio *ex vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según las reivindicación 5, donde la respuesta al contacto con el secretoma de las placas se mide en comparación a

una situación control en la que las células de interés se incuben con el medio de crecimiento basal.

- 5
7. Un procedimiento, para el estudio *ex vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicación 5, donde la respuesta se mide en comparación a una situación control en el que las células de interés se incuben con el secretoma de arterias no complicadas con placas de ateroma, como pueden ser, sin limitación, arterias mamarias o radiales obtenidas en procesos quirúrgicos, o bien zonas adyacentes, no dañadas, al tejido arterial
- 10
- complicado con la placa de ateroma.
8. Uso del procedimiento, para el estudio *ex vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicaciones 6 y 7, en el desarrollo de técnicas para la identificación/detección de marcadores proteicos cuyos niveles de expresión varíen en las células de interés tras el contacto
- 15
- directo con los secretomas de arterias dañadas por las placas de ateroma en comparación con condiciones control.
9. Uso del procedimiento, para el estudio *ex vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicaciones 6 y 7, en el desarrollo de técnicas para determinar cambios morfológicos en las células de
- 20
- interés tras el contacto directo con los secretomas de arterias dañadas por las placas de ateroma en comparación con condiciones control.
- 25
10. Uso del procedimiento, para el estudio *ex vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicaciones 6 y 7, en el desarrollo de técnicas para determinar cambios funcionales tales como, aunque sin limitación, relacionados con la migración, permeabilidad, proliferación, de las células de interés tras el contacto directo con los secretomas de arterias
- 30
- dañadas por las placas de ateroma en comparación con condiciones control.
11. Uso del procedimiento, según reivindicaciones 6 y 7 en cualquier tipo celular asociado al proceso aterosclerótico.
12. Uso del procedimiento, según reivindicaciones 6 y 7, para evaluar la respuesta inicial de células endoteliales progenitoras (EPCs) aisladas de individuos sanos
- 35
- frente al daño promovido por el secretoma de placas de ateroma extraídas de pacientes ateroscleróticos.

13. Un procedimiento, para el estudio *ex-vivo* de la respuesta inicial de distintos tipos celulares implicados en aterosclerosis, según reivindicación 12, caracterizado porque el tiempo de incubación para analizar la respuesta temprana es de entre 1 y 24 horas, preferentemente una hora.
- 5
14. Uso del procedimiento, basándonos en la reivindicación 8, para evaluar la actividad de un determinado fármaco sobre los marcadores proteicos diferencialmente expresados en las células de interés tras el contacto directo con los secretomas de arterias dañadas por las placas de ateroma en comparación con condiciones control.
- 10
15. Uso del procedimiento, basándonos en las reivindicaciones 9 y 10, para evaluar la actividad de un determinado fármaco sobre los cambios morfológicos y/o funcionales que se produzcan en las células de interés tras el contacto directo con los secretomas de arterias dañadas por las placas de ateroma en comparación con condiciones control.
- 15
16. Uso del procedimiento, según reivindicaciones 1 a 15 para demostrar la validez de un determinado fármaco o terapia celular en aterosclerosis.
- 20

Situación in vivo

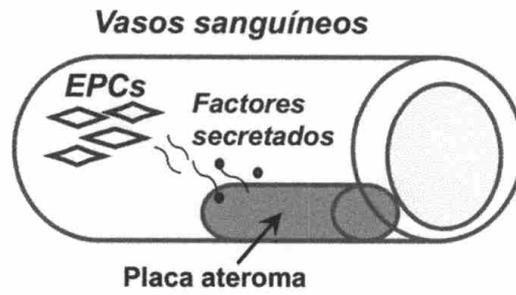


Figura 1

Modelo ex vivo para simular la situación in vivo

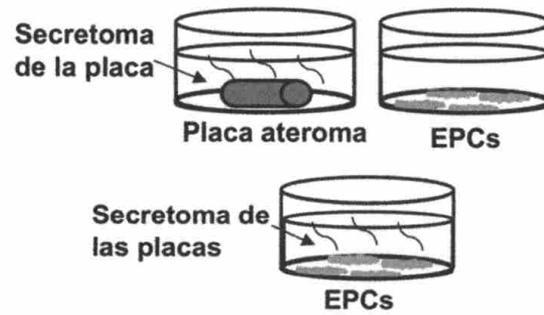


Figura 2

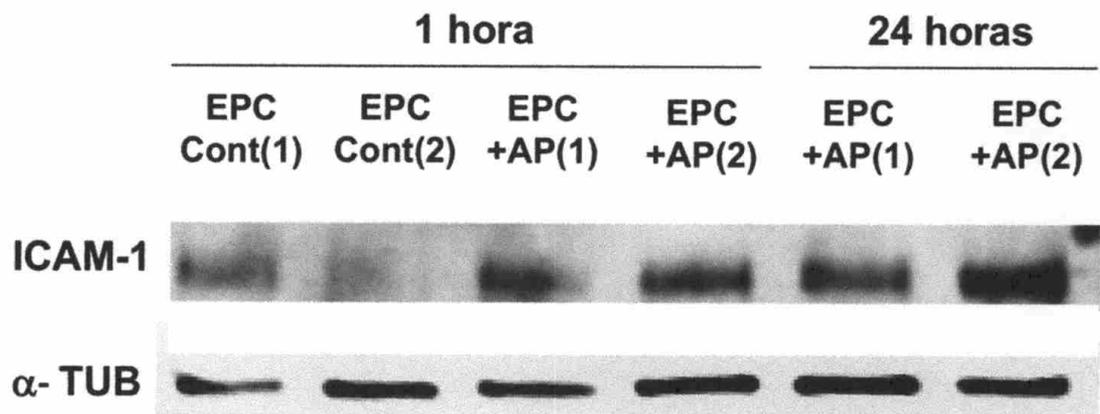


Figura 3

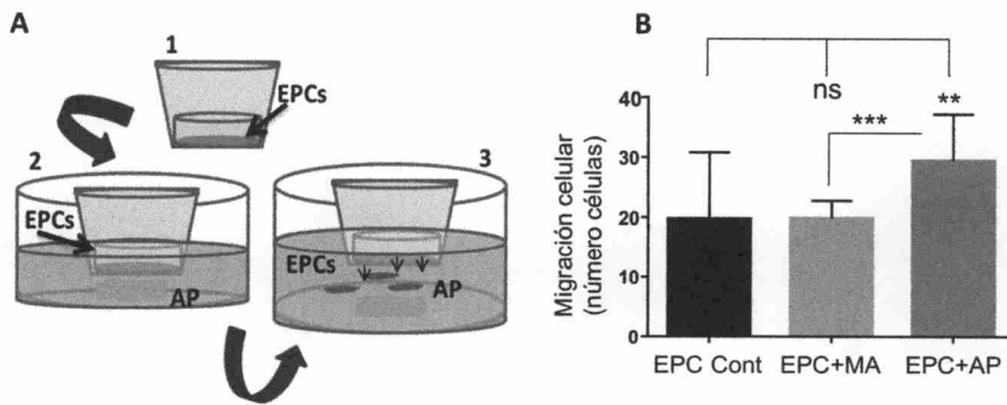


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201500877
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.12.2015
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VINCI MARIA CRISTINA et al. Inflammatory environment and oxidized LDL convert circulating human proangiogenic cells into functional antigen-presenting cells. Journal of Leukocyte Biology SEP 2015 (09.2015) VOL: 98 No: 3 Págs: 409-421 ISSN 0741-5400(print) ISSN 1938-3673(electronic) Doi: doi:10.1189/jlb.3A0814-412RR.	1-16
A	RIahi YAEL et al. Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. Journal of Cellular and Molecular Medicine AGO 2015 (08.2015) VOL: 19 No: 8 Págs: 1887-1899 ISSN 1582-4934(print) ISSN 1582-4934(electronic) Doi: doi:10.1111/jcmm.12561.	1-16
A	STREBLOW D N et al. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: Induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. Current Topics in Microbiology and Immunology 2008 SPRINGER-VERLAG BERLIN, HEIDELBERGER PLATZ 3, D-14197 BERLIN, GERMANY Series : CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY (ISSN 0070-217X(print)) (2008) VOL: Págs: 397-415 ISBN 978-3-540-77348-1(H) Shenk TE; Stinski MF.	1-16
A	WO 2012068474 A2 (UNIV RUTGERS et al.) 24.05.2012, resumen; reivindicación 1.	1-16

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 24.05.2016	Examinador J. Manso Tomico	Página 1/5
---	--------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/071 (2010.01)

A61K35/15 (2015.01)

A61P9/10 (2006.01)

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

C12N, A61K, A61P

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, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.05.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VINCI MARIA CRISTINA et al. Inflammatory environment and oxidized LDL convert circulating human proangiogenic cells into functional antigen-presenting cells. <i>Journal of Leukocyte Biology</i> SEP 2015 (09.2015) VOL: 98 No: 3 Págs: 409-421 ISSN 0741-5400(print) ISSN 1938-3673(electronic) Doi: doi:10.1189/jlb.3A0814-412RR.	31.08.2015
D02	RIAHY YAEL et al. Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. <i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i> AGO 2015 (08.2015) VOL: 19 No: 8 Págs: 1887-1899 ISSN 1582-4934(print) ISSN 1582-4934(electronic) Doi: doi:10.1111/jcmm.12561.	31.07.2015
D03	STREBLOW D N et al. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: Induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. <i>Current Topics in Microbiology and Immunology 2008</i> SPRINGER-VERLAG BERLIN, HEIDELBERGER PLATZ 3, D-14197 BERLIN, GERMANY Series : CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY (ISSN 0070-217X(print)) (2008) VOL: Págs: 397-415 ISBN 978-3-540-77348-1(H) Shenk TE; Stinski MF.	30.11.2007
D04	WO 2012068474 A2 (UNIV RUTGERS et al.)	24.05.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La reivindicación 1 de la presente solicitud se refiere a un procedimiento caracterizado por poner en contacto el secretoma completo de placas de ateroma con un tipo celular para evaluar una determinada respuesta de las células tras el contacto con ese secretoma. Las reivindicaciones 2 -7, 13 se refieren a algunas de las condiciones en que se lleva a cabo el procedimiento.

La reivindicación 8 se refiere al uso del procedimiento para identificar marcadores proteicos cuyos niveles de expresión varíen en las células tras el contacto con el secretoma.

La reivindicación 9 se refiere al uso del procedimiento para determinar cambios morfológicos en las células tras el contacto con el secretoma.

La reivindicación 10 se refiere al uso del procedimiento para determinar cambios funcionales en las células tras el contacto con el secretoma.

Las reivindicaciones 11 y 12 se refieren al uso en el procedimiento de células que intervienen en el proceso aterosclerótico, y particularmente EPCs

Las reivindicaciones 14-16 se refiere al uso del procedimiento para evaluar la actividad de fármacos frente a marcadores proteicos expresados por las células tras el contacto con el secretoma.

D01 se refiere a un estudio donde se analiza la influencia del microambiente generado por citoquinas presentes en las placas de ateroma, en particular la presencia de factores asociados a la inflamación vascular, en la funcionalidad de algunos tipos celulares como las PACs (células presentadoras de antígenos). Para ello se incubaron células PACs cultivadas en medios adecuados, obtenidas previamente a partir de PMBCs, en presencia de IL-1 α , TNF- β y oxLDL, y se estudió la conversión fenotípica de estas células mediante estudios morfológicos y citofluorométricos.

D02 divulga un estudio donde se pusieron en contacto células primarias endoteliales aórticas bovinas, con el secretoma de células espumosas THP-1 derivadas de monocito para analizar la respuesta de inducción de senescencia.

D03 divulga un estudio donde se analiza el efecto que tiene el secretoma del citomegalovirus humano en la inducción de la angiogénesis y la reparación del daño celular en estudios in vitro.

D04 divulga Un método de evaluación de la actividad de sensibilización de la piel in vivo de un compuesto que comprende: (a) el cultivo in vitro de un tipo de células (B) adición de un compuesto al medio de cultivo que contiene las células; (C) la medición del nivel de secreción de uno o más marcadores de las células; (D) el análisis de correlación de la concentración aplicada en la etapa (b) con el nivel de secreción de medida en la etapa (c); y (e) la determinación en el valor de la sensibilización in vivo basado en el análisis de la etapa (d).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un procedimiento para el estudio de la respuesta de un tipo celular que comprenda el contacto de las células con el secretoma completo de placas de ateroma, por lo que las reivindicaciones 1-16 serían nuevas según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

D01 sería el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de las reivindicaciones 1-16. Este documento tiene por objeto analizar la respuesta de un tipo celular a la exposición de un conjunto de citoquinas presentes en el secretoma de las placas de ateroma, en concreto a las citoquinas: IL-1 α , TNF- β , y oxLDL. La respuestas se analiza mediante la identificación de distintos marcadores (fig. 1), cambios en la morfología celular (fig. 2), o estudios de expresión genómica (figura 4). La diferencia entre este documento y el objeto de la invención sería que el secretoma utilizado para evaluar la respuesta del tipo celular escogido en el procedimiento de la invención es el secretoma completo de la placa de ateroma. Esta diferencia no parece traer consigo efecto técnico alguno, por lo que la selección de este secretoma en concreto no dejaría de ser una selección arbitraria entre las muchas variantes de secretomas que se podrían haber utilizado. Así pues la reivindicaciones 1-7, 13 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986. Tampoco parecen cumplir con el requisito de actividad inventiva las reivindicaciones 8-12, 14-16 puesto que los usos a los que se refieren las reivindicaciones 8 y 10, que encontrando soporte en los ejemplos 1 y 2 se refieren a la identificación de marcadores expresados por el tipo celular y la determinación de la capacidad de migración, serían obvios para el experto en la materia, mientras que el resto de reivindicaciones (9, 11, 12, 14-16) se considerarían de deseo, carentes de actividad inventiva.