

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 523**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010 E 10814423 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2473615**

54 Título: **Producción en cultivo celular (no bovino, no porcino) de GM1**

30 Prioridad:

01.09.2009 US 238775 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.09.2016

73 Titular/es:

**LZ THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
490 Lapp Road
Malvern PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, JAY S.;
HENWOOD, GERRI;
FLORENTINE, ROBERT y
BARBER, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 581 523 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción en cultivo celular (no bovino, no porcino) de GM1

5 **Campo**

En el presente documento están descritos métodos de producción basados en cultivo celular de gangliósido GM1 aislado a partir de tejido que no es bovino ni porcino.

10 **Antecedentes**

La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno neurodegenerativo lento pero constantemente progresivo, que da lugar a un empeoramiento con el tiempo de los síntomas clínicos. Síntomas clínicos incluyen temblor, bradiquinesia (movimiento ralentizado), músculos rígidos, postura y equilibrio deteriorados, pérdida de movimientos automáticos, y cambios en el lenguaje. Si bien existe variabilidad clínica considerable entre pacientes el armamento actual de fármacos anti-PD mejora de forma efectiva, si bien temporalmente, la mayor parte de los signos y síntomas de Parkinson en la mayoría de los pacientes. A pesar de las mejoras sintomáticas transitorias de las terapias con fármacos tradicionales, la discapacidad funcional empeora con el tiempo.

El advenimiento de terapia con levodopa se ha asociado con una prolongación de la supervivencia en pacientes con PD si bien esta terapia no ralentiza la progresión de los síntomas. Levodopa, un precursor metabólico de dopamina (L-3, 4-dihidroxifenilalanina), es en la actualidad el agente más efectivo en el tratamiento de PD. Administrado junto con levodopa para evitar la catabolización de levodopa administrada por vía oral se encuentran los inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT) tales como tolcapone y entacapone; por tanto, se aumenta la vida media en plasma y el porcentaje de levodopa que alcanza el CNS. Un problema continuo con la terapia de levodopa es que tras un prolongado periodo de eficacia en pacientes la efectividad en la reducción de los síntomas dura menos tras cada dosis. Adicionalmente con el tiempo tiene lugar la disquinesia. Estos efectos de uso continuado de levodopa son una consecuencia de la degeneración progresiva por dopamina.

No se ha identificado aún fármaco que ralentice o detenga de forma definitiva la progresión de PD o prevenga de forma sustancial el declive funcional inevitable en pacientes con PD.

Son seriamente necesarios fármacos que puedan modificar la progresión clínica, remediar los déficits motores o cognitivos, restablecer o mejorar la función de partes residuales del sistema de dopamina ("DA") o activar mecanismos compensatorios. No obstante, no hay agente estudiado hasta la fecha que haya dado evidencia convincente de neuroprotección o modificación de la enfermedad y no hay estudio de agente como un agente neurorestaurativo.

Estudios *in vitro* e *in vivo* preclínicos han demostrado que GM1 rescata neuronas de DA dañadas, estimula la supervivencia y reparación de neuronas dopaminérgicas y rebrota terminales dopaminérgicas funcionales, aumenta niveles de DA en el núcleo estriado y sobrerregula la capacidad sintética de DA de neuronas residuales. Véase, por ejemplo, "GM1 Ganglioside in the Treatment of Parkinson's Disease," Schneider, Ann. N.Y. Acad. Sciences 845, 363-73 (feb. 2006). Estudios clínicos preliminares de GM1 en pacientes con PD también mostraron mejoras clínicas en pacientes con uso a corto plazo de GM1 y progresión mínima de síntomas en un subgrupo de pacientes tras cinco años de uso de GM1 seguido de progresión significativa de síntomas tras interrupción de uso de GM1 a largo plazo.

Por lo tanto un enfoque potencialmente fructífero para el tratamiento de PD consiste en la administración de agentes tales como GM1, que puedan estabilizar neuronas DA dañadas o moribundas, estimulen el rebrote de nuevas fibras y terminales dopaminérgicos, o mejoren la función de neuronas dopaminérgicas residuales o estimulen o mantengan los procesos compensatorios.

GM1, un monosialogangliósido, es un constituyente normal de las membranas celulares del nervio, y es conocido por modular un número de actividades de la superficie celular y del receptor así como también jugar papeles importantes en diferenciación y desarrollo neuronal, fosforilación de proteína, y función sináptica. En numerosos estudios preclínicos el tratamiento crónico con GM1 tras diferentes tipos de lesiones para el sistema nervioso central ha dado lugar a la recuperación bioquímica y comportacional y estos efectos han sido particularmente visibles en el sistema DA dañado.

Hasta ahora la única forma de GM1 usado clínicamente se ha derivado de cerebro bovino. La cantidad limitada de GM1 obtenida por cerebro y el coste asociado con procedimientos de extracción del cerebro han limitado su desarrollo como un producto comercial. Además, el uso de cerebro de vaca como una fuente de GM1 da lugar a inquietudes justificables sobre enfermedades de priones tales como encefalopatía espongiiforme bovina ("enfermedad de las vacas locas").

Persiste una necesidad continua y no satisfecha de nuevos y mejores métodos para la extracción y purificación de GM1, en particular métodos que usen fuentes no bovinas.

El documento EP 2011799 describe un proceso para obtener GM1 que comprende la separación de una mezcla lipídica usando cromatografía en columna de intercambio iónico.

5 La patente de Estados Unidos nº 5.532.141 describe que GM1 se puede aislar de cerebro completo de oveja de oveja aquejada de gangliosidosis.

10 Ledeen y col. Acta Neurobiol Exp. 50: 439-449 (1990) describe la adición de GM1 "administrada exogéneamente" a una variedad de sistemas de cultivo neuronales para estudiar los efectos neuritogénicos y/o neuronotrópicos en las células.

15 Ladisch y col. Cancer Research 43: 3808-3813 (1983) describe la síntesis de gangliósidos por células de linfoma YAC-1. GM1 se expresa entre otros gangliósidos y la muestra se lleva a cromatografía de capa delgada (TLC). Sin embargo, las diversas bandas de gangliósido nunca se aíslan del gel de TLC.

Sumario

20 Se proporciona en el presente documento un método de aislamiento de gangliósido GM1 mediante la preparación de tejidos no bovino y no porcinos que comprenden células productoras de GM1 que incluye el aislamiento de tejidos de la célula que produce gangliósido GM1; expansión de célula productora de GM1 en cultivo en condiciones adecuadas para facilitar la expansión de dichas células; expresar la expresión de gangliósido GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas; aislamiento de gangliósido GM1 del cultivo. Las células que producen GM1 son células neurales, células de fibroblasto, células de tejido de núcleo cerebral, o células progenitoras. Tal como se usa en el presente documento células productoras de GM1 son células que expresan GM1 bien basalmente o en un nivel

25 elevado en comparación con células normales.

30 En otra realización el método puede comprender el aislamiento de GM1 de célula neural que se deriva de células de fibroblasto no bovinas y no porcinas cosechadas en sujetos con GM1-gangliosidosis tipo I. Por tanto la GM1 está libre de contaminantes de BSE.

35 En otra realización se proporciona un método de preparación de una composición de gangliósido GM1 en el que la composición de gangliósido GM1 se produce mediante el proceso descrito en el presente documento que comprende la preparación de tejidos no bovinos y no porcinos que comprenden células productoras de GM1 como se definió anteriormente; aislamiento de dichos tejidos de la célula que produce gangliósido GM1; expansión de dicha célula productora de GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas para facilitar la expansión de dichas células; expresar la expresión de gangliósido GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas; y aislamiento de dicho gangliósido GM1 de dicho cultivo. Por tanto, el gangliósido GM1 está sustancialmente libre de o libre de contaminantes de BSE.

40 Se pueden entender características adicionales haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 ilustra una tabla que enumera las estadísticas de expansión de células de hipocampo de oveja en cultivo con bajo contenido de O₂ en medio tipo 1 como se describe en el presente documento.

La figura 2 ilustra un gráfico lineal de doblamientos de población acumulativa de células progenitoras neurales del hipocampo.

50 La figura 3 ilustra una tabla que enumera doblamientos totales y rendimientos de células de hipocampo en cultivo de bajo contenido en O₂ en medio tipo 1 como se describe en el presente documento.

La figura 4 ilustra una tabla que enumera las estadísticas de expansión de células de fibroblasto de oveja en cultivo de bajo contenido de O₂ en medio tipo 1 como se describe en el presente documento.

55 La figura 5 ilustra un gráfico lineal de doblamientos de poblaciones acumulativas de células de fibroblasto de oveja.

La figura 6 ilustra un gráfico de barras que ilustra expansión de tejido de pulmón frente a tejido conectivo epidural.

60 La figura 7 ilustra una tabla que enumera la expansión de tejido de pulmón de fibroblasto frente a tejido conectivo.

Descripción detallada

65 Se describen en el presente documento nuevos métodos para la purificación y extracción de gangliósido GM1 de células derivadas de oveja aquejada con gangliosidosis GM1 o de células derivadas de pacientes humanos con gangliosidosis GM1 como fuentes estables y renovables de GM1.

Se proporciona en el presente documento un método de aislamiento de gangliósido GM1 mediante preparación de tejidos no bovinos ni porcinos que comprenden células productoras de GM1 que incluye el aislamiento de tejidos de células de producción de gangliósido GM1; expansión de célula productora de GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas para facilitar la expansión de dichas células; expresar la expresión de gangliósido GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas; aislamiento de gangliósido GM1 del cultivo. Las células de producción de GM1 son células neurales, células de fibroblasto, células de tejido de núcleo cerebral, o células progenitoras. Como se usa en el presente documento, las células productoras de GM1 son células sobreproductoras que expresan GM1 a un nivel elevado en comparación con células normales. En particular tales células se pueden derivar de oveja y/o humanos aquejados de gangliosidosis.

Los tejidos de los que se aíslan y se preparan las células incluyen el centro semioval, córtex del cerebelo, hipocampo, núcleo caudado, lóbulo frontal, córtex parietal, o pared ventricular, zona subgranular o regiones de revestimiento ventricular del cerebro. Cualquier combinación de células extraídas de estas regiones diferentes se puede expandir y cultivar en el presente método. Las células productoras de GM son células de fibroblasto derivadas de tejidos epidérmicos o tejido de pulmón, donde las células productoras de GM1 incluyen células de tejido de núcleo cerebral o células progenitoras.

También se describe un método de preparación de tejidos no bovinos o no porcinos mediante escisión de porciones de tejidos; fijación de dichos tejidos en un medio de transporte, donde el medio puede ser DMEM con alto contenido en glucosa; L-glutamina 4 mM, 5-10%, 10-20%, o suero bovino fetal al 20-30%, solución IX de aminoácidos no esenciales MEM, penicilina 100 U/ml, estreptomina; amfomicina, y gentamicina; y tejidos refrigerantes a una temperatura suficiente para mantener la expansión de dichas células.

En una realización la célula neural se deriva de un tejido cerebral donde se sobreexpresa gangliósido GM1, o se deriva de un cerebro afectado por gangliosidosis GM1. Las células neurales pueden presentar una deficiencia en β -galactosidasa que conducen a sobreexpresión en GM1 en comparación con lo normal. Las células neurales usadas en el método pueden presentar actividad de α -neuraminidasa parcial.

En otra realización el método puede comprender el aislamiento de GM1 de células de fibroblasto no bovino y no porcino cosechadas en sujetos humanos con gangliosidosis GM1 tipo 1. Por lo tanto el GM1 está libre de contaminantes BSE. Contaminantes BSE como se usa en el presente documento significa cualquier proteína de biomolécula, proteína de prión (PrP) o cualquier biomolécula que se puede detectar mediante anticuerpos en proteínas PrP. De forma típica fuentes comercialmente disponibles de GM1 son de origen bovino y se puede encontrar en forma irradiada para eliminar posibles contaminantes, sin embargo se mantiene el riesgo terapéutico de una fuente de este tipo. Tales fuentes de GM1 típicas incluyen Sigma Aldrich.

En otra realización se proporciona un método de preparación de una composición de gangliósido GM1 en la que la composición de gangliósido GM1 se produce mediante el proceso descrito en el presente documento que comprende preparación de tejidos no bovino y no porcinos que comprenden células productoras de GM1; aislamiento de dichos tejidos de la célula que produce gangliósido GM1; expansión de dicha célula productora de GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas para facilitar la expansión de dichas células; expresar la expresión de gangliósido GM1 en cultivo bajo condiciones adecuadas; y aislamiento de dicho gangliósido GM1 de dicho cultivo. Por lo tanto el gangliósido GM1 está sustancialmente libre de o libre de contaminantes BSE.

Esta invención implica el uso de células derivadas de oveja aquejada de gangliosidosis GM1 o células derivadas de humanos con gangliosidosis GM1 para obtener, mediante cultivo celular, cantidades comercialmente viables de gangliósido GM1 para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos. Los gangliósidos se pueden administrar solos o junto con cuidados médicos convencionales para pacientes PD, o pacientes con otros tipos de enfermedades neurodegenerativas incluyendo, pero sin limitarse a esta, enfermedad de Huntington, etc.)

Se puede administrar GM1 solo o en combinación con otros gangliósidos por inyección por vía subcutánea o por vía intravenosa o por administración nasal o mucosal, entre otras. Esto puede incluir también formas de dosificación de acción prolongada y se pueden administrar gangliósidos usando formulaciones de liberación controlada (liposomas, nanopartículas, microesferas) para prolongar la actividad del fármaco. Estas se pueden conjugar también en moléculas transportadoras apropiadas con el fin de cruzar la barrera cerebral sanguínea.

En la patente de Estados Unidos nº 5.532.141 se describen ovejas aquejadas de gangliosidosis GM1 y la extracción de GM1 y otros gangliósidos del cerebro de tales animales. La enfermedad en estos animales se caracteriza por una deficiencia en la actividad de la β -galactosidasa y actividad de α -neuraminidasa parcial, que da lugar a animales con acumulación de grandes cantidades de gangliósido GM1 en tejido cerebral (aumento de hasta 40 veces en comparación con animales no afectados). Con procedimientos de extracción optimizados se estima que un único cerebro de oveja con gangliosidosis daría de 1-2 gramos de GM1. Se estima adicionalmente que 1 kg de cerebro afectado daría aproximadamente 15 g de GM1. En comparación, 1 kg de cerebro de porcino se estima que da 250 mg de GM1. Sin embargo incluso a estos niveles mayores de expresión serían necesarias varios cientos de ovejas al año para obtener cantidades comerciales de GM1.

Con el uso de técnicas celulares se puede obtener GM1 de diversas fuentes potenciales derivadas de oveja con gangliosidosis GM1. Por ejemplo, se puede cultivar y expandir células precursoras neurales, conducir las hacia un fenotipo neuronal, optimizar su crecimiento y desarrollo (y quizás incluso la producción de GM1 usando diversas manipulaciones, incluyendo pero sin limitarse a esta la inhibición de la producción de gangliósido serie B (por ejemplo, mediante inhibición de la GD3 sintasa) y mantenimiento de la ruta biosintética para gangliósidos serie A en GM1, dirigiendo de esta forma más producción de gangliósido hacia GM1) y luego extraer GM1 de células neurales cultivadas así como también GM1 desprendido por células al medio. Se pueden realizar también otras alteraciones para mejorar el desprendimiento de gangliósido y optimizar adicionalmente la colección de gangliósido de células cultivadas. De forma alternativa o en combinación con el esquema general descrito anteriormente, se pueden cultivar también fibroblastos o hepatocitos en cultivo y usarse como fuentes de GM1.

Se pueden derivar células usadas en el presente método de tejidos cerebrales incluyendo, pero sin limitarse a estos, centro semioval, córtex del cerebelo, hipocampo, núcleo caudado, córtex cerebral, pared ventricular o una combinación de los mismos.

Otra fuente potencial de GM1 son fibroblastos (o hepatocitos) de pacientes con gangliosidosis GM1 de tipo I (infantil). Pacientes con gangliosidosis GM1 de tipo I tienden a presentar menos del 1% de la cantidad normal de β -galactosidasa en sus células y por tanto sus células tienden a producir niveles muy altos de gangliósido GM1. Fibroblastos humanos normales pueden contener aproximadamente 0,7 nmoles de GM1/mg de proteína. Fibroblastos de gangliosidosis GM1 pueden contener hasta 2,85 nmoles de GM1/mg de proteína. La cantidad de GM1 obtenida de fibroblastos con gangliosidosis GM1 humana cultivada se optimizará usando parámetros de crecimiento celular, condiciones de cultivo y alimentación óptimas, y determinando el tiempo óptimo para cosechar células para extracción de GM1. De forma adicional se tamizarán numerosas muestras de donantes pacientes de GM1 de tipo I para encontrar líneas celulares que presenten acumulación de GM1 óptima debido a la severidad de falta de β -galactosidasa, lo que diferirá de un paciente a otro. De forma adicional se pueden usar hepatocitos de los mismos pacientes como una fuente celular alternativa o complementaria de GM1.

Una vez que se tienen las células de oveja con gangliosidosis hay diversos caminos posibles para mejorar adicionalmente el rendimiento en GM1 de estas células. Un método sería tratar las células con bajas concentraciones de cloroquina, una base débil, que provocará una acumulación marcada de GM1 en endosomas y sobre la superficie de las células (Yuyama y col., 2006). Otro método sería tratar las células con sialidasa (neuraminidasa) que las transformará todos los gangliósidos de complejo mayor del cerebro (ej., GD1a, GD1b, y GT1b) en GM1 sobre células intactas (Schauer, y col, 1980). Otro método sería el uso de un método no enzimático que Dowex-50W-H+ para catalizar la desialilación de alta selectividad de gangliósidos de la serie ganglio-N-tetraosa polisialados dando GM1 primario (Schengrund y Kovac, 1999). Usando estos métodos es posible recuperar mayores cantidades de GM1 de células y membranas así como también aumentar la cantidad de GM1 desprendida y recuperada del medio.

Se describe adicionalmente que un medio potencial adicional para la producción de gangliósido GM1 mediante técnicas basadas en células puede incluir programación de células con ingeniería de genoma múltiple y evolución acelerada para inducir *E. coli* a producir gangliósido GM1. Con el uso de ingeniería de genoma múltiple automatizado ("MAGE"), uno puede diseñar la ruta biosintética para GM1 en *E. coli* con el fin de sobreproducir gangliósido GM1. Por ejemplo, uno puede modificar de forma simultánea muchas localizaciones genómicas para modificar la biosíntesis de GM1 con ciertos genes relevantes que presentan expresión sintonizada óptimamente y ser inhibidos u omitidos ciertos genes con el fin de optimizar la producción de GM1 e inhibir la producción de otros gangliósidos. *E. coli* puede ser modificado por métodos conocidos por los especialistas en la técnica con lo que se incorporan genes de gangliósido en el sistema de *E. coli* mediante métodos convencionales como se conoce en la técnica. A modo de ejemplo métodos convencionales incluyen aislamiento de ADN plásmido que se ha modificado para expresar GM1 sintasa para producir GM1 en cultivo. Otros genes que producen gangliósido incluyen GD3 sintasa.

E. coli se puede cultivar en condiciones específicas en las que se encuentran disponibles sustancias precursoras en el medio, según sea necesario, tal como lactosilceramida sintética (LacCer, Fuente de planta) y ácido siálico (disponible de fuente no animal o se puede sintetizar). Se puede sintonizar perfectamente la actividad enzimática (por ejemplo, sialiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, galactosiltransferasa) mediante el proceso MAGE, y se puede proporcionar activador (trifosfato de guanosina para activación del enzima transferasa), así como también N-acetilgalactosamina y galactosa (los azúcares necesarios para ser transformados en sus derivados nucleótido con el fin de servir como donantes de azúcar).

GM1 se extrae en la actualidad de cerebro bovino o porcino, lo que es un proceso caro de bajo rendimiento. La invención actual proporcionaría una producción de gangliósido GM1 segura y eficiente a base de células. Proporcionaría también la primera fuente comercial de gangliósido GM1 humano. Con esta técnica se pueden producir también otras especies de gangliósido además de GM1, y el GM1 y otros gangliósidos pueden presentar usos en una amplia variedad de trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Parkinson.

Ejemplos

EJEMPLO 1

5 Se recibió tejidos de cerebro ovino, que incluyen las siguientes fuentes de tejido: centro semioval; córtex del cerebelo; hipocampo, núcleo caudato, córtex cerebral (ex., frontal, parietal), y paredes ventriculares.

10 Todos los tejidos fueron procesados individualmente mediante el siguiente método: se lavó cada tipo de tejido con solución tampón de PIPES; se digirió cada tejido en un cóctel de Papain/DNase I/Dispase (proteasa neutra) con antibióticos/antimicóticos, se neutralizaron las enzimas y se pasaron células disociadas a través de un filtro celular; se centrifugaron las células y se resuspendieron en DMEM/F12/N2 que contiene FBS al 5% que contiene antibióticos/antimicóticos; se enumeraron las células, luego se sembraron en matraces recubiertos de fibronectina² en: medio tipo nº 1: DMEM/F12/N2 que contiene FBS al 5% que contiene antibióticos/antimicóticos; suplementado con 10 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de EGF. Medio Neurocult Proliferation-A; se cultivaron células en cada tipo de medio en un incubador humidificado a 37° C con bajo nivel de O₂ y alto nivel de O₂ para comparación.

Tabla 1

Tabla resumen de expansión de células derivadas de tejido cerebral de oveja	
Cultivos de bajo contenido en O ₂ – tipo de medio nº 1	
	Doblamientos totales / Nº de último paso
Centro semioval	16.1/P.2
Córtex del cerebelo	13.8/P.2
Hipocampo	21.1/P.3
Núcleo caudado	8.9/P.1
Córtex frontal - parietal	2.1/P.1
Pared ventricular	6.8/P.1
Centro semioval	P.0
Córtex del cerebelo	P.0
Hipocampo	P.0
Núcleo caudado	P.0
Córtex frontal - parietal	P.0
Pared ventricular	P.0

20 La tabla 1 anterior describe la proliferación y expansión de células en diversas condiciones de cultivo. Se observa que cultivos cultivados en Neurocult Proliferation-A no crecían bien de modo que se congelaban el pequeño número de células cosechadas en P.0 y no se expandían más.

EJEMPLO 2

25 Tejidos ovinos recibidos de aislamiento de fibroblasto, que incluyen las siguientes fuentes de tejido: pulmón (se reunieron pulmones izquierdo y derecho), y tejido conectivo epidural.

30 Todos los tejidos fueron procesados individualmente, usando los siguientes métodos: se lava cada tipo de tejido con solución tampón PIPES. Se digiere cada tejido en colagenasa/hialuranidasa en DMEM con antibióticos/antimicóticos, se neutralizan los enzimas en DMEM que contiene FBS al 10% y se pasan células disociadas a través de un filtro de células. Se centrifugaron y se resuspendieron las células en FGM-2 que contiene antibióticos/antimicóticos. Se enumeraron las células luego se sembraron en matraces y los tejidos restantes se disponen en discos en medio FGM-2. Se cultivaron células en un incubador humidificado a 37° C con bajo contenido en O₂.

Tabla resumen de expansión de fibroblasto de oveja	
	Doblamientos totales / Nº de último paso
Pulmón	20/P.2
Tejido conectivo epidural	7.2/P.1

35

EJEMPLO 3

Digestión. Se recibieron muestras en diversos tubos de centrifuga, se etiquetaron 1-10, y se retiraron de la caja de expedición, se limpiaron y se dispusieron en una rejilla de tubos de 50 ml. Se tomaron imágenes de cada tubo. Cada tubo se pulverizó con etanol, se lavó de nuevo, y luego se transfirió a la cabina de bioseguridad para procesamiento aséptico. Se aspiró cuidadosamente el medio de transporte de cada tubo usando una pipeta de 10 ml limpia y se desecha a un recipiente de residuos. Se transfirió la solución PIPES en exceso (40 ml) a cada tubo, se sustituyó el tapón y se invirtieron ágilmente los tubos y de nuevo se lavan varias veces del medio de transporte residual de los tejidos. Esto se aspiró luego usando una pipeta de 10 ml y se desecha a un recipiente de residuos.

Se transfirió veinte mililitros de medio de digestión cerebral a tubos que contienen tejido cerebral y se etiquetó cada tubo con 1 a 6. Se preparó una clave para identificar posteriormente la zona del cerebro asociada con cada número. Se transfirió veinte mililitros de solución de colagenasa/hialuronidasa (1x) a cada uno de los tubos que contienen tejidos de otros órganos. Con el uso de una pipeta estéril de 25 ml y de 50 ml, pinzas y escalpelo estériles, se transfirió tejidos de cada tubo a un disco de 10 cm estéril, se baña en medio de digestión y se pica en secciones muy pequeñas. Se pipeteó los contenidos de cada disco (piezas de tejido y medio de digestión) con una pipeta de 25 ml o 50 ml y se transfirió de nuevo al tubo apropiado, se tapa y se dispusieron todos en el incubador a 37° C durante 45 minutos. Después de 45 minutos se transfirieron de nuevos los tubos a la campana y se trituró cada uno usando una pipeta estéril de 25 ml y 10 ml, respectivamente. Los tapones fueron reemplazados y se dispusieron de nuevo los tubos en la rejilla de tubos en el incubador a 37° C durante 15 minutos. Tras la incubación se transfirieron asépticamente los tubos a la campana. Se transfirió veinticinco mililitros de medio de neutralización a cada uno de los 10 tubos, se taparon y se invirtieron varias veces cada uno de ellos para mezclarse. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 200g para agregar las células y quedaron los fragmentos de tejidos. Los tubos se transfirieron asépticamente en la campana y se aspiró cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, asegurando que no se aspirase pieza alguna de tejido o células. Los tubos que contienen regiones cerebrales 1-6 recibieron 40 ml de medio tipo nº 1 para resuspender las células y dejar las piezas de tejido. Tubos que contienen pulmón, tejido conectivo epidural y tejido conectivo óseo se resuspendieron en 40 ml de medio de crecimiento de fibroblasto FGM-2. Cada uno de los 10 tubos con células resuspendidas y tejidos se pipetearon a través de un filtro celular de 40 µm y a los nuevos tubos de 50 ml etiquetados. Se llevó a cabo un conteo y viabilidad en cada tubo.

Condiciones de expansión con bajo nivel de O₂. Se sembraron células de seis regiones diferentes del cerebro a 100.000 cm² en seis matraces T80 recubiertos con fibronectina en 15 ml de medio tipo nº 1 o 15 ml de medio tipo nº 2 (medio Neurocult Proliferation-A) y se incubaron en un incubador humidificado a 37° C con baja tensión de oxígeno (O₂ al 4%, CO₂ al 5% y se equilibra con nitrógeno). Cada dos días se reemplaza el 50% del medio de cultivo con medio fresco. Los cultivos no eran homogéneos. Las células formadoras de colonia eran la minoría de las células presentes al principio, pero después de unos días estas células comenzaron a formar colonias y a crecer. Se cosecharon cultivos de paso 0 en el día 9. Véase la tabla 1.0 para rendimientos.

Se sembraron células del paso 1 a 100 células/cm² en dos matraces recubiertos con fibronectina de T225 cm² en 36 ml de medio tipo nº 1 y de medio tipo nº 2 para cada una de las seis regiones. Se alimentaron los cultivos con 100% de medio fresco en el día 5. Los cultivos permanecieron no homogéneos durante este paso pero se limpiaron de forma significativa y hay muchas más células formadoras de colonias al principio en este paso y estas células crecieron más rápidamente que en el paso previo. Se capturaron imágenes a 4x, 100x, 200x en el día 6. Se cosecharon cultivos en el día 6.

Se sembraron células del paso 2 a 100 células/cm² en dos matraces recubiertos con fibronectina de T225 cm² en 36 ml de medio tipo nº 1 y de medio tipo nº 2 para cada una de las seis regiones. Se alimentaron los cultivos con 100% de medio fresco en el día 5. Los cultivos permanecieron ≥ 90% homogéneos. Se cosecharon los cultivos en el día 6. Todos los cultivos mantenidos en medio tipo nº 2 se congelaron luego y no se expandieron más. El cultivo mantenido en medio tipo nº 1 (es decir, progenitores neurales de hipocampo) se subcultivaron luego en el paso seis (a continuación).

Se sembraron células del paso 3 a 100 células/cm² en dos matraces recubiertos con fibronectina de T225 cm² en 36 ml de medio tipo nº 1. Se alimentaron los cultivos con 100% de medio fresco en el día 5. Los cultivos parecieron ser homogéneos en este paso. Se tomaron imágenes a 4x, 100x, 200x en el día 6. Se cosecharon los cultivos en el día 6.

Se sembraron células del paso 4 a 100 células/cm² en dos matraces recubiertos con fibronectina de T225 cm² en 36 ml de medio tipo nº 1. Se alimentaron los cultivos con 100% de medio fresco en el día 5. Se tomaron imágenes a 4x, 100x, 200x en el día 6. Se cosecharon los cultivos en el día 6.

Fibroblastos. Se sembraron células de la digestión de pulmones de oveja a 100.000/cm² y se sembraron tejido conectivo epidural a 50.000/cm² en medio FGM-2. Se alimentaron cultivos con 50% de medio fresco cada 2 días y se cosechó el paso 0 en el día 5. Ambos cultivos se pasaron a menor densidad y los restos se congelaron y se conservaron.

Se sembraron fibroblastos epidurales y de pulmón del paso 1 a 100/cm² en medio FGM-2 en matraces T225cm². Se alimentaron cultivos con 100% de medio FGM-2 fresco en el día 5 y se cosecharon en el día 7. Se pasaron cultivos de pulmón y se congeló y conservó el resto. Se congelaron y conservaron todos los fibroblastos epidurales.

5 Se sembraron fibroblastos de pulmón del paso 2 a 100/cm² en medio FGM-2 en matraces T225 cm². Se alimentaron los cultivos con 100% de medio FGM-2 fresco en el día 4 debido a que son pesados luego se cosecharon en el día 5. Se pasaron cultivos y el resto se congeló y conservó.

10 Se sembraron fibroblastos de pulmón del paso 3 a 100/cm² en medio FGM-2 en matraces T225 cm². Se alimentaron los cultivos con 100% de medio FGM-2 fresco en el día 5 y se cosecharon en el día 6. Se pasaron cultivos y el resto se congeló y conservó.

15 Condiciones de alto contenido en O₂ (método estándar). Se sembraron células de cada una de las seis regiones en cuatro matraces T25 cm² y uno T80 cm² (todos recubiertos con fibronectina) a 100.000/cm² en 5 ml y 13 ml, respectivamente, de medio tipo n° 1 y medio tipo n° 2 y se incubaron en un incubador humidificado a 37° C con O₂ al 18%, CO₂ al 5% (condiciones estándar). Se alimentaron los cultivos con su respectivo medio en el día 5 luego se cosecharon 24 horas después en el día 6. Se tomaron imágenes a 4x, 100x, 200x en el día 6 antes de la cosecha. Se contaron células de todas las regiones luego se congelaron y se conservaron.

20 Medio de transporte. Medio usado para almacenamiento de tejidos post-mortem y durante el tránsito. Componentes: DMEM de alto contenido en glucosa (Invitrogen); L-glutamina 4 mM (Hyclone); suero bovino fetal al 20% (Hyclone); solución de aminoácidos no esenciales MEM, 1X (Invitrogen, catálogo n° 11140, 100X Soln., Lote n° 672555); penicilina (100 U/ml), estreptomina (µg/ml), Ampho (µg/ml) (Stem Cell Technologies, Inc., catálogo n°, 100X Solution, Lote n°); gentamicina (50 µg/ml).

25 Medio de digestión

30 Cerebro: DMEM:F12 1:1 con alto contenido en glucosa: L-glutamina 4 mM; Dispasa (1 U/ml) (Roche, catálogo n° 04942086001); DNasa (250 U/ml) (Invitrogen, catálogo n° 18047-019); papaína (2,5 U/ml) (Sigma, Catálogo n° 76218); penicilina (100 U/ml), estreptomina (µg/ml), Ampho (µg/ml) (Stem Cell Technologies, Inc., catálogo n°, 100X Solution); gentamicina (50 µg/ml) (Sigma);

35 Pulmón, epidural y hueso: DMEM de alto contenido en glucosa: L-glutamina 4 mM; collagenasa (300 U/ml)/hialuronidasa (100 U/ml) (Stem Cell Technologies); hialuronidasa (Stem Cell Technologies); penicilina (100 U/ml), estreptomina (µg/ml), Ampho (µg/ml) (Stem Cell Technologies, Inc.); gentamicina (50 µg/ml).

Medio de cultivo. Cerebro:

40 a. Medio tipo n° 1. DMEM:F12 1:1 de alto contenido en glucosa; L-glutamina 4 mM; suplemento N2 (100X) líquido (Invitrogen); penicilina (100 U/ml), estreptomina (µg/ml), Ampho (µg/ml) (Stem Cell Technologies, Inc.); gentamicina (50 µg/ml); factor de crecimiento epidérmico, humano, recombinante 20 ng/ml (rh EGF) (Stem Cell Technologies); factor de crecimiento de fibroblasto básico, humano, recombinante 10 ng/ml (rh bFGF) (Stem Cell Technologies).

45 b. Medio de tipo n° 2: medio de proliferación Neurocult NS-A. Medio basal Neurocult NS-A (humano), 450 ml (Stem Cell Technologies); suplementos de proliferación Neurocult NS-A (humano), 50 ml (Stem Cell Technologies); penicilina (100 U/ml), estreptomina (µg/ml), Ampho (µg/ml) (Stem Cell Technologies, Inc.); gentamicina (50 µg/ml); factor de crecimiento epidérmico, humano, recombinante 20 ng/ml (rh EGF) (Stem Cell Technologies); factor de crecimiento de fibroblasto básico, humano, recombinante 10 ng/ml (rh bFGF) (Stem Cell Technologies).

50 EJEMPLO 4

55 En un ensayo clínico de tratamiento de pacientes con enfermedad de Parkinson con GM1, todas las valoraciones funcionales (durante el basal y todas las visitas subsiguientes) tuvieron lugar en la mañana antes de que el paciente tome la primera dosis de medicación anti-Parkinson y al menos 12 horas desde la dosis previa de medicación (considerada que es un periodo definido en la práctica como "off"). Todos los pacientes fueron ensayados en tres ocasiones por separado (dentro de un periodo de dos semanas) para la evaluación basal en las siguientes medidas funcionales: (1) escala de valoración unificada para la enfermedad de Parkinson ("UPDRS"), evaluado independientemente por un evaluador principal y un evaluador secundario; (2) tiempo de ejecución: 20 pronaciones/supinaciones de las manos; 20 taconeos; 20 golpeteos con dedos pulgar e índice; tiempo hasta tocar el pulgar secuencialmente con otros dedos 10 veces; tiempo para caminar 20 pies tan rápido como sea posible, girarse, y volver al punto de partida; valoración del tiempo de reacción simple; (3) ensayo de integración sensorimotor en el que el paciente necesita producir movimientos específicos basados solo en retroalimentación somatosensorial y propioceptiva. El ensayo se llevó a cabo en cuatro visitas consecutivas en el mes.

65 Se calculó una valoración basal media para cada paciente y se usó para comparación con valoraciones de

tratamiento. La medida de eficacia principal fue el cambio en el componente motor de la UPDRS, una herramienta de evaluación clínica convencional. El grupo tratado con GM1 (N = 22) mostró mejoras significativas en valoraciones motoras de UPDRS (mejora media de 5,05 puntos en la semana cuatro y 7,53 puntos en la semana 16) mientras que las valoraciones medias para el grupo tratado con placebo no cambiaron esencialmente en las 16 semanas de tratamiento. Los tamaños del efecto de tratamiento en la semana cuatro ($-5,95 \pm 1,12$), semana ocho ($-5,61 \pm 1,39$), semana 12 ($-5,37 \pm 1,30$) y semana 16 ($-6,79 \pm 1,24$) fueron estadísticamente significativos (ANCOVA, $p < 0,0002$). Las evaluaciones secundarias de la función motora mostraron que mientras ambos grupos cometían un número similar de errores en la tarea de integración sensorimotora en el basal (GM1 = $5,3 \pm 2,3$; placebo = $5,4 \pm 3,1$), pacientes tratados con GM1 cometieron significativamente menos errores tras 16 semanas de tratamiento ($0,7$ errores $\pm 0,8$) que pacientes no tratados con placebo ($5,1$ errores $\pm 3,1$, $p = 0,0001$). El grupo tratado con GM1 también llevó a cabo las tareas motoras previstas (es decir, pronación/supinación ($p = 0,0001$), taconeo ($p = 0,0008$), golpeteo con dedos ($p = 0,0001$), golpeteo con dedos secuencial ($p = 0,0001$), y caminar ($p = 2,02$) significativamente más rápido en la semana 16, en comparación con el basal, que los pacientes que fueron tratados con placebo. Al final de los 5 años de uso abierto de GM1, los pacientes presentaban valoraciones motoras por UPDRS inferiores y se reportaron menos problemas con sus actividades en periodo "off" de la vida diaria que en el basal pre-aleatorización.

Una vez se complete el ensayo de la línea base los pacientes recibieron una infusión intravenosa de 1,000 mg de gangliósido GM1 o bien placebo (es decir, diluyente sin GM1) en 50 ml de solución de Ringer estéril. Los pacientes fueron adiestrados para autoadministrarse una inyección subcutánea y se asentaron en el hogar con un suministro para cuatro semanas de gangliósido GM1 (100 mg de GM1 en 2,0 ml de vehículo/vial) o bien placebo, proporcionados en viales de 2,0 ml idénticos. Los pacientes fueron instruidos para administrar los contenidos de dos viales al día, uno en la mañana y otro en la tarde (dosis diaria total = 200 mg de GM1. Se mantuvieron constantes medicaciones concomitantes.

Referencias

- 1 Neeta S. Roy, y col. 2000. J Neurosci 59:321-31.
- 2 Philip H. Schwartz, y col. 2003. J Neurosci; 74:838-51.

REIVINDICACIONES

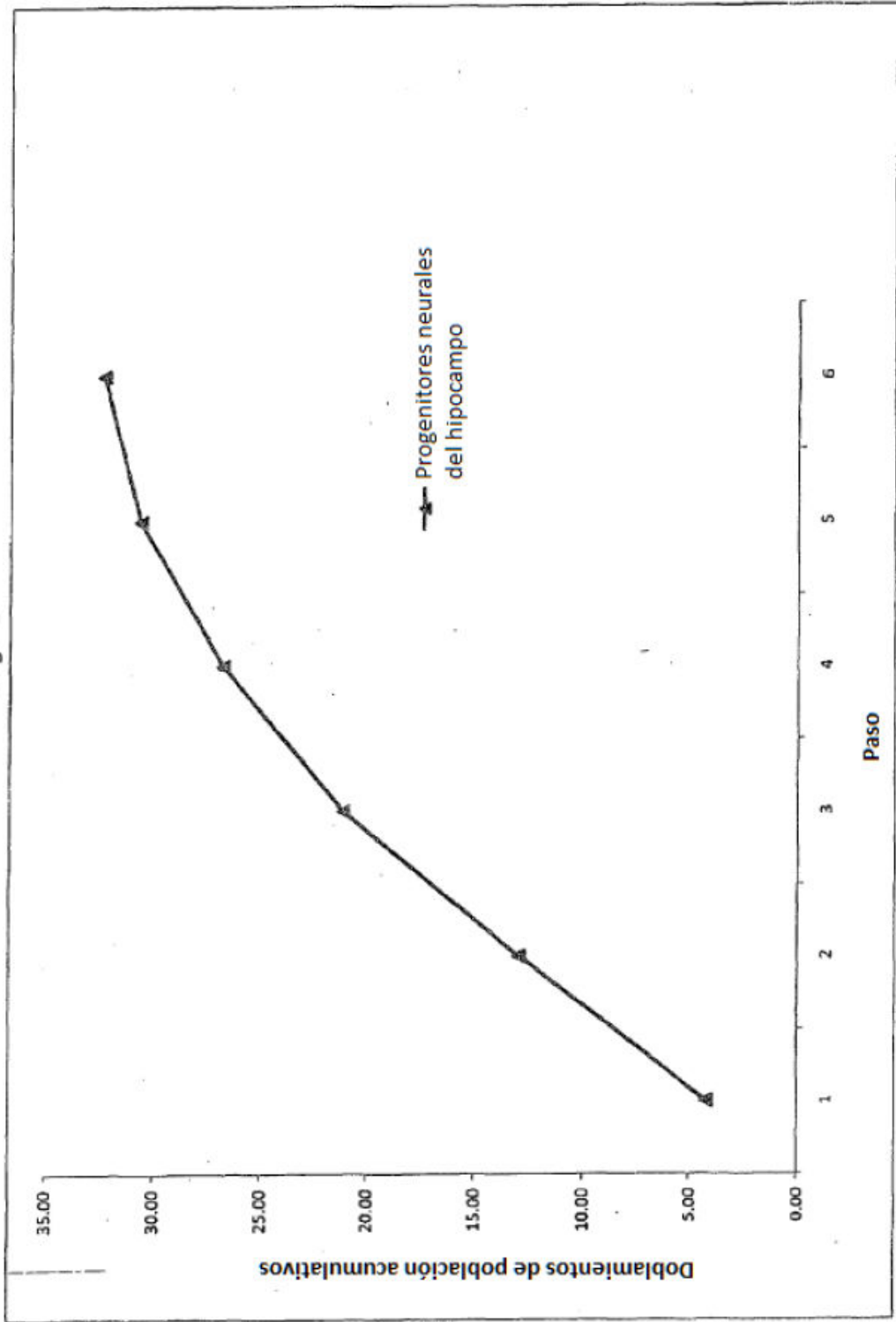
1. Un método de producción basado en cultivo celular de gangliósido GM1 aislado que comprende las etapas de:
- 5 a) obtener células productoras de GM1 derivadas de tejido que no es bovino ni porcino,
b) expandir las células productoras de GM1 de la etapa (a) en cultivo,
10 c) expresar gangliósido GM1 en las células productoras de GM1 de la etapa (b), y
d) aislar gangliósido GM1 expresado en la etapa (c);
- en el que las células productoras de GM1 son células neurales, células de fibroblasto, células de tejido del núcleo cerebral o células progenitoras.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que las células productoras de GM1 de la etapa (a) sobreexpresan GM1.
3. El método de la reivindicación 2, en el que las células productoras de GM1 se obtienen de tejido afectado con gangliosidosis GM1.
- 20 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho GM1 está libre de contaminantes BSE.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de expresión (c) comprende poner en contacto las células productoras de GM1 con bajas concentraciones de cloroquina.
- 25 6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de expansión (b) se lleva a cabo usando condiciones de expansión de O₂ inferiores.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las células productoras de GM1 se derivan de tejidos de oveja o de humano.
- 30 8. Un método de preparación de una composición que comprende GM1 aislado que comprende las etapas de:
- a) obtener células productoras de GM1 derivadas de tejido que no es bovino ni porcino,
35 b) expandir las células productoras de GM1 de la etapa (a) en cultivo,
c) expresar gangliósido GM1 en las células productoras de GM1 de la etapa (b), y
40 d) aislar gangliósido GM1 expresado en la etapa (c);
- en el que las células productoras de GM1 son células neurales, células de fibroblasto, células de tejido de núcleo cerebral, o células progenitoras.
- 45 9. El método de la reivindicación 8 en el que las células productoras de GM1 son células humanas.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que la composición es una composición farmacéutica.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración por la siguientes rutas de administración: subcutánea, inyección, inyección intravenosa, administración nasal y administración mucosal.
- 50 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos.

Cultivo de progenitores neurales de hipocampo de oveja expandido en medio de tipo n° 1, de baja densidad

Tubo n°	Nivel de O ₂	Medio de crecimiento n° 1	Densidad de siembra	Paso	N° de matraces	Fecha de siembra	N° de células sembradas	Conteo de células (cosechadas)	Viabilidad (%)	TVC	Dbl media	Dbl total	Tiempo de paso (hr)	Tiempo Dbl (T _D)	Fecha de cosecha
3	Bajo	Medio tipo n° 1	100.000/cm ²	0	1 (T80)	29-Sept-09	8.000E+06	2,75E+06	-	-	-1,54	-1,54	257	-166,8	9-Oct-09
			100/cm ²	1	2 (T225)	9-Oct-09	4,500E+04	8,58E+05	97,5%	8,37E+05	4,22	4,22	144,5	34,3	15-Oct-09
				2	3 (T225)	15-Oct-09	6,750E+04	2,99E+07	97,7%	2,92E+07	8,76	12,97	144	16,4	21-Oct-09
				3	3 (T225)	21-Oct-09	6,750E+04	2,07E+07	94,5%	1,95E+07	8,18	21,15	144	17,6	27-Oct-09
				4	3 (T225)	27-Oct-09	6,750E+04	3,66E+06	94,5%	3,46E+06	5,68	26,83	143	25,2	2-Nov-09
				5	3 (T225)	2-Nov-09	6,750E+04	1,05E+06	92,9%	9,74E+05	3,85	30,68	167	43,4	9-Nov-09
				6	3 (T225)	09-Nov-09	6,750E+04	2,50E+05	90,2%	2,26E+05	1,74	32,42	188	108,0	17-Nov-09

FIGURA 1

Fig. 2



Cultivo de progenitores neurales de hipocampo expandido en medio de tipo n° 1, de baja densidad, con bajo contenido de O2

Doblamiento totales	
Paso	Progenitores neurales del hipocampo
Paso 0	-1,54
Paso 1	4,22
Paso 2	12,97
Paso 3	21,15
Paso 4	26,83
Paso 5	30,68
Paso 6	32,43

Rendimientos	
Paso	Progenitores neurales del hipocampo
Paso 0	2,75E+06
Paso 1	8,37E+05
Paso 2	2,92E+07
Paso 3	1,95E+07
Paso 4	3,46E+06
Paso 5	9,74E+05
Paso 6	2,26E+05

FIGURA 3

FIG. 4
 Sumario de expansión de fibroblasto de oveja

Nivel de crecimiento O ₂	Medio de crecimiento	Densidad de siembra	Paso	Nº de matraces	Fecha de siembra	Nº de células sembradas	Conteo de células (cosechadas)	Viabilidad (%)	TVC	DbI media	DbI total	Tiempo de paso (hr)	Tiempo DbI (T _D)	Fecha de cosecha	Congelado
Bajo	FGM-2	100.000/c m ²	0	3 (T80)	29-Sept-09	1,250E+07	7,28E+06	-	-	-0,78	-0,78	160	-204,5	5-Oct-09	2 x 3,6e6
		100/cm ²	1	3 (T225)	5-Oct-09	6,750E+04	1,07E+07	90,7%	9,67E+06	7,30	7,30	167,5	22,9	12-Oct-09	8 x 1,2e6
			2	3 (T225)	12-Oct-09	6,750E+04	5,82E+06	93,2%	5,43E+06	6,43	13,73	120	18,7	17-Oct-09	4 x 1,3e6
			3	3 (T225)	17-Oct-09	6,750E+04	5,27E+06	94,6%	4,99E+06	6,29	20,02	146	23,2	23-Oct-09	4 x 1,2e6
			4	3 (T225)	23-Oct-09	6,750E+04	8,50E+06	93,8%	7,97E+06	6,98	27,00	142,5	20,4	29-Oct-09	7 x 1,1e6
			5	3 (T225)	29-Oct-09	6,750E+04	6,30E+06	95,4%	6,01E+06	6,55	33,54	144	22,0	4-Nov-09	5 x 1,1e6
			6	3 (T225)	04-Nov-09	6,750E+04	6,60E+06	97,4%	6,43E+06	6,61	40,15	168	25,4	11-Nov-09	5 x 1,1e6
			7	3 (T225)	11-Nov-09	6,750E+04	5,33E+06	94,2%	5,02E+06	6,30	46,46	165	26,2	19-Nov-09	5 x 1,1e6
			8	3 (T225)	18-Nov-09	6,750E+04	3,60E+06	93,0%	3,35E+06	5,74	52,19	142	24,8	24-Nov-09	3 x 1e6
			9	3 (T225)	24-Nov-09	6,750E+04	3,98E+06	86,2%	3,43E+06	5,88	58,07	171	29,1	1-Dec-09	3 x 1,2e6
			10	3 (T225)		6,750E+04			0,00E+00						
Bajo	FGM-2	100.000/c m ²	0	1 pocillo de un disco de 6 pocillos (3,8 cm ²)	29-Sept-09	1,900E+05	1,33E+05	-	-	-0,51	-0,51	161	-315,1	5-Oct-09	1
		100/cm ²	1	3 (T225)	5-Oct-09	6,750E+04	1,01E+07	94,4%	9,49E+06	7,22	7,22	167,5	23,2	12-Oct-09	6 x 1,4e6

FIG. 5

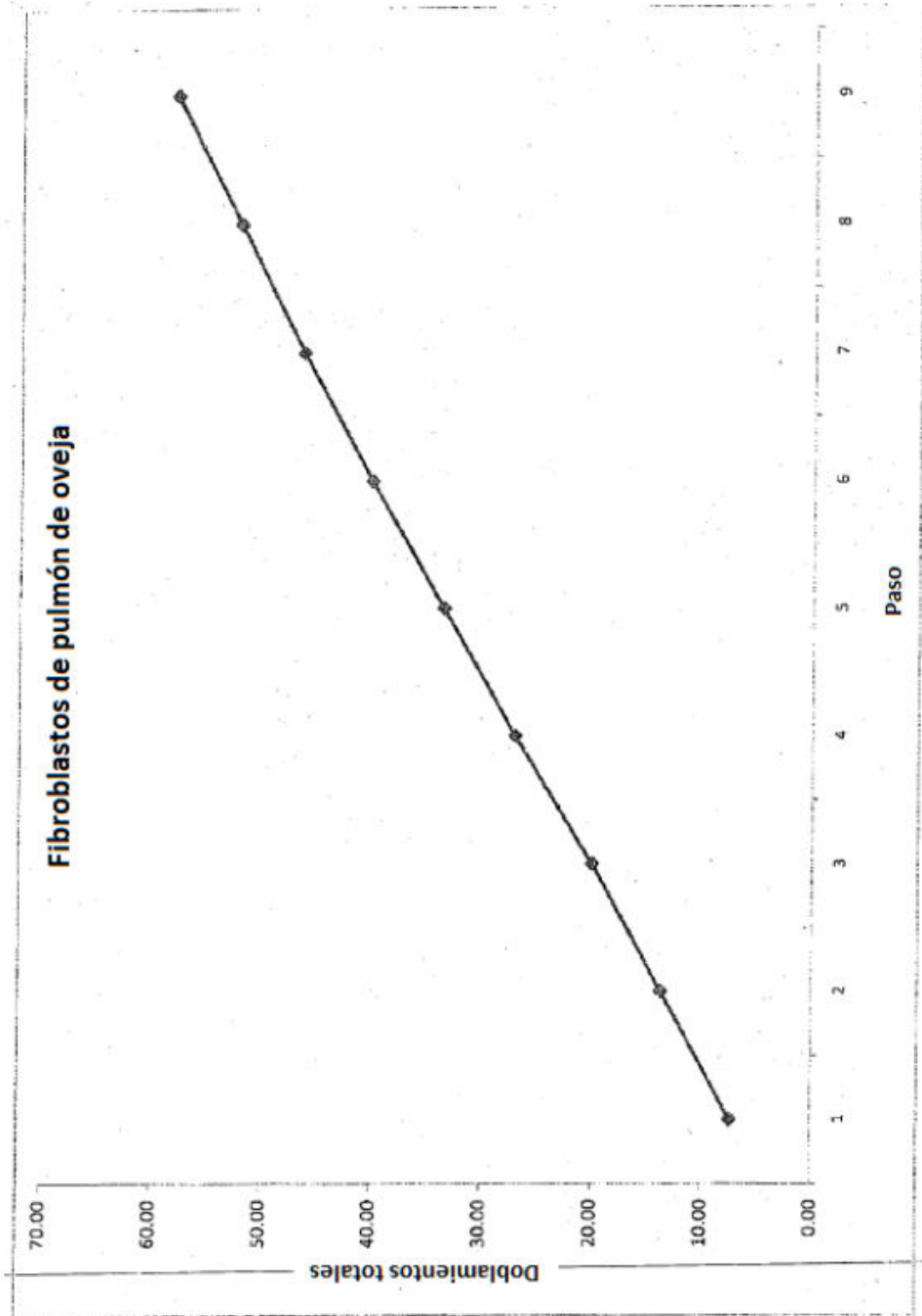
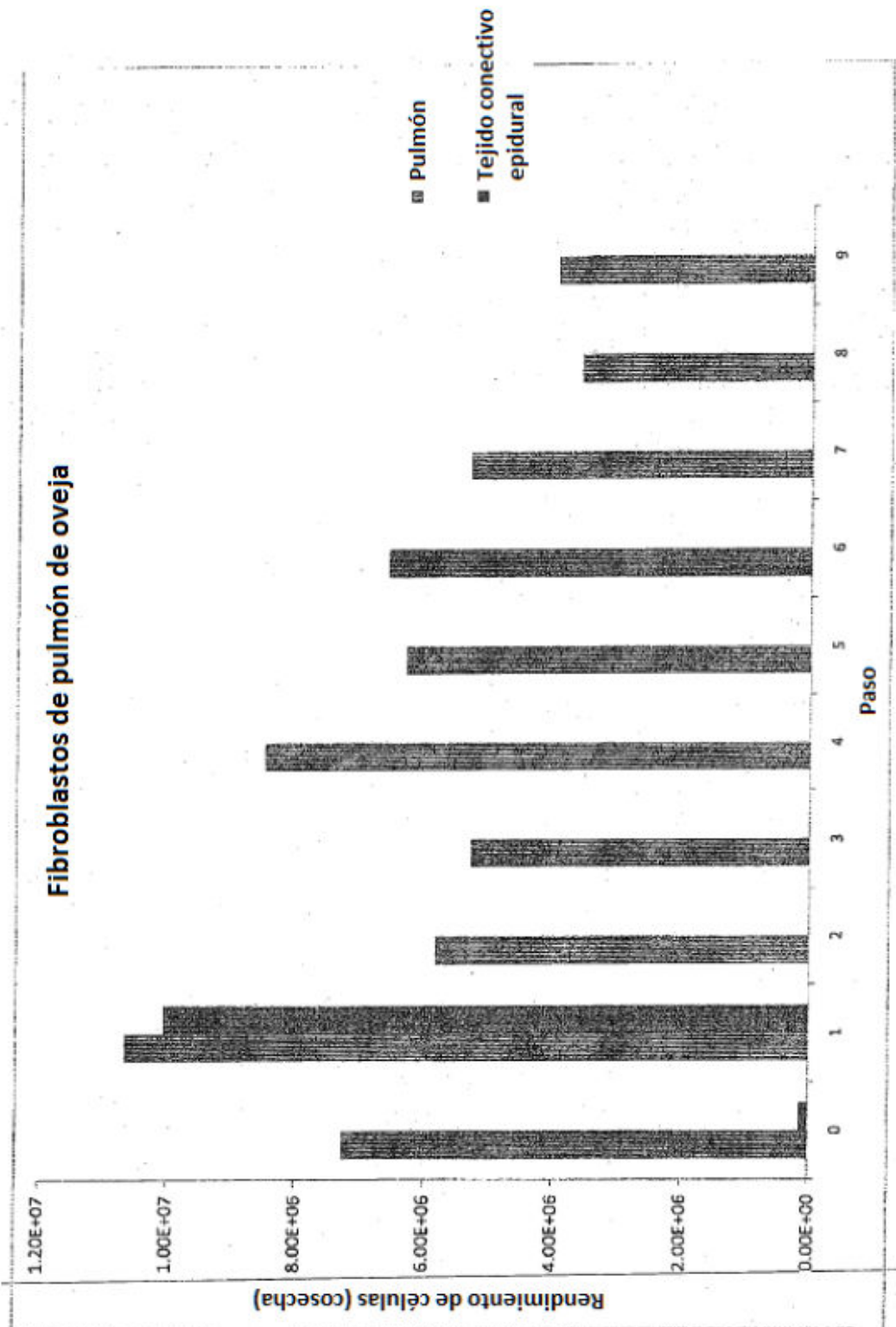


FIG. 6



Estudio de GM1 Lazarus**Fibroblastos de oveja GBT en FGM-2, bajo contenido en O₂ - Sumario**

Doblamiento totales		
Paso	Pulmón	Tejido conectivo epidural
0	-0,78	-0,51
1	7,30	-
2	13,73	-
3	20,02	-
4	27,00	-
5	33,54	
6	40,15	
7	46,46	
8	52,19	
9	58,07	
Rendimientos		
Paso	Pulmón	Tejido conectivo epidural
0	7,26E+06	1,33E+05
1	1,07E+07	1,01E+07
2	5,82E+06	-
3	5,27E+06	-
4	8,50E+06	-
5	6,30E+06	
6	6,60E+06	
7	5,33E+06	
8	3,60E+06	
9	3,98E+06	

FIGURA 7