

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 387**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4706** (2006.01)

**C12P 19/44** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

**A61K 31/7032** (2006.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/09** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2013 PCT/US2013/022201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13109929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2013 E 13738532 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2804871**

54 Título: **Métodos de producción de gangliósidos**

30 Prioridad:

**20.01.2012 US 20126158882 P**

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

**27.09.2017**

73 Titular/es:

**GARNET BIOTHERAPEUTICS, INC (100.0%)  
7 Great Valley Parkway, Suite 190  
Malvern, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**RAGAGLIA, VANESSA y  
SHARMA, VANDANA MADANLAL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 634 387 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

Métodos de producción de gangliósidos.

Antecedentes de la invención

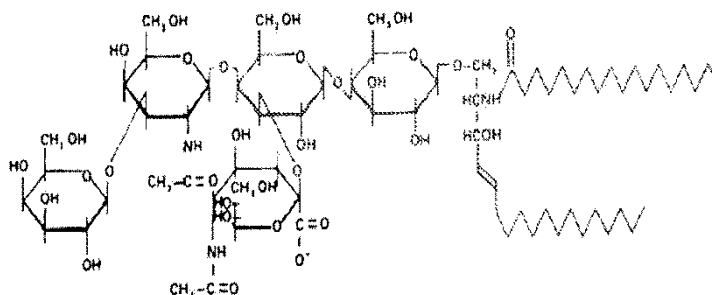
Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a métodos de producción del gangliósido GM1, a partir de células desarrolladas en cultivo. En particular, las células se tratan químicamente y/o manipulan bioquímicamente para inducir la producción del gangliósido GM1, y/o las células se cultivan a largo plazo en alta densidad, sin pases, para acumular el gangliósido GM1.

Antecedentes de la técnica

- 10 Estructura y función del gangliósido GM1

GM1 es un monosialogangliósido que tiene la siguiente estructura:



- 15 GM1 es un constituyente de las membranas de células nerviosas, se sabe que modula una serie de receptores de superficie celular y actividades, y tiene funciones importantes en la diferenciación y desarrollo neuronales, fosforilación de proteínas y función sináptica. Por lo tanto, GM1 tiene impacto en la plasticidad neuronal y mecanismos de reparación, y la liberación de neurotrofinas en el cerebro. Además de su función en el sistema nervioso, GM1 está implicado en la internalización de patógenos, señalización celular, proliferación, supervivencia y diferenciación. Es un componente de las balsas lipídicas, un microdominio dentro de la membrana plasmática que está enriquecido en colesterol y esfingolípidos. Además, GM1 está implicado en la activación de un intercambiador de sodio-calcio en la membrana interna de la envuelta nuclear. Su interacción con el intercambiador de calcio modula el calcio nuclear y celular. Además de su función en la fisiología celular, GM1 actúa en el sitio de unión para la toxina colérica.

- 20 Se ha mostrado que GM1 es eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de lesiones del sistema nervioso central en animales experimentales, dando una recuperación bioquímica y conductual significativa. Además, el pretratamiento con GM1 inhibe el daño que resulta de una variedad de exposiciones a neurotoxinas.

- 25 También se ha mostrado que GM1 es eficaz en el tratamiento a corto plazo de sujetos con enfermedad de Parkinson, dando como resultado una reducción significativa de los síntomas. Schneider et al., *Neurology* 50:1630-1636 (1998). Un estudio más reciente de cinco años indica que el uso de GM1 a largo plazo por sujetos con la enfermedad de Parkinson, es seguro y puede proporcionar algún beneficio clínico para esos sujetos. Schneider et al., *J Neurol. Sci.* 292:45-51 (2010). No está claro cómo ejerce GM1 sus potenciales efectos neuroprotectores, neurorestauradores o neurorescatadores en el sistema de dopamina. Ídem, en 50. Sin embargo, se especula que GM1 incorporado en membranas plasmáticas neuronales puede alterar la estabilidad de las balsas lipídicas y por lo tanto promover una variedad de procesos celulares beneficiosos. Ídem.

Gangliósidos

- 35 Los gangliósidos son glucoesfingolípidos importantes en mamíferos, que contienen cadenas de azúcares con diferentes números de restos de ácido siálico. Existen muchas subespecies diferentes de azúcares en los gangliósidos. Los gangliósidos están implicados en una serie de enfermedades y trastornos, que incluyen la enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y cáncer, entre otros.

- 40 Las biosíntesis de gangliósidos están estrechamente interconectadas por el uso de enzimas biosintéticas y sustratos comunes. Por ejemplo, la producción de GM1 se basa en la enzima galactosiltransferasa II, usada habitualmente para producir otros gangliósidos, p. ej., GA1, GD1b y GT1c. Xu et al., *J Lipid Res.* 51:1643-1675 (2010). Debido a sus características y componentes estructurales comunes, a menudo se sintetizan nuevos gangliósidos a partir de componentes reciclados de gangliósidos degradados, en particular ceramida y esfingosina. Ídem. Por ejemplo, son necesarias moléculas centrales como ceramida, galactosa, GalNAc, ácido siálico, para la síntesis de gangliósidos. Ídem. Como resultado, los factores que influyen en la producción o degradación de un miembro de la familia de

gangliósidos, con frecuencia alteran la producción y degradación de otros gangliósidos. Por ejemplo, debido a que GM1 es un precursor para GD1a, los aumentos de GM1 favorecerán la producción de GD1a para que la célula mantenga su proporción normal o equilibrada de gangliósidos. Mason et al., *Biochem. J.* 388: 537-544 (2005); Miller-Podraza et al., *Biochem.* 21:3260-3265 (1982); Nishio et al., *J. Biol. Chem.* 279:33368-33378 (2004).

- 5 El documento WO 2011/028795 describe métodos para la purificación y extracción del gangliósido GM1 de células derivadas de ovejas afectadas de gangliosidosis GM1 o de células procedentes de pacientes humanos con gangliosidosis GM1, como fuentes estables y renovables de GM1.

10 Yuyama K et al. (*FEBS Letters* 580 (2006) 6972- 6976) describieron el tratamiento de células PC12 con cloroquina, lo que perturba potencialmente el tráfico de membrana desde los endosomas a los lisosomas. El tratamiento con cloroquina inducía la acumulación del gangliósido GM1 (GM1) en endosomas tempranos agrandados positivos para Rab5 y en la superficie celular.

Kwak D-H et al. (*Exp Mol Med*, Vol. 38(6), 668-676, 2006) investigaron la expresión de gangliósidos durante el crecimiento de citoblastos embrionarios de ratón (mESC), citoblastos mesenquimatosos (MSC) y células neuronales diferenciadas, usando cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC).

- 15 Parton et al. (*The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 42(2), 155-166, 1994) investigaron la distribución ultraestructural del gangliósido GM1 en células A4.31. Mediante el uso de la subunidad que se une a la toxina colérica absorbida en oro como una sonda específica para marcador en las secciones, se mostró que GM1 se concentraba en caveolas.

#### Producción de GM1

- 20 Se ha usado clínicamente en el pasado GM1 obtenido de cerebro bovino. Véase, p. ej., Schneider et al., *J. Neural. Sci.* 292:45-51, 46 (2010) ("Los pacientes se autoadministraban... sal sódica de [GM1] derivada de cerebro bovino..."). Sin embargo, el rendimiento limitado de GM1 por cerebro bovino y el coste de producción de GM1 de esta forma, ha limitado la cantidad de GM1 disponible para uso clínico comercial. Además, enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina, es decir, la enfermedad de las vacas locas, ha planteado preocupación en
- 25 relación con la seguridad de esta fuente de GM1. Aunque también se ha descrito la extracción de GM1 de los cerebros de ovejas que padecen gangliosidosis GM1 (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 5.532.141), dicho método plantea problemas similares en relación con el rendimiento, coste y seguridad.

Existe una clara necesidad no satisfecha de una alternativa barata, de alto rendimiento y segura para hacer GM1 para uso clínico comercial.

- 30 Breve resumen de la invención

La invención proporciona un método in vitro para producir el gangliósido GM1 en una célula, que comprende tratar dicha célula con cloroquina ("CLQ") para acumular dicho gangliósido; aislar dicho gangliósido; cuantificar dicho gangliósido, o ambos, a partir de dicha célula tratada con CLQ; en donde dicha célula es una célula de médula ósea humana o una célula de neuroblastoma; en donde dicha célula no es una célula PC 12, una célula HT22, una célula del cerebro de una oveja afectada de gangliosidosis.

35

Se describen además métodos de producción del gangliósido GM1 que comprenden aislar células de médula ósea de oveja; cultivar las células de médula ósea de oveja en medio de inducción neuronal ("NIM") para producir células de médula ósea de oveja de tipo neuronas; tratar las células de médula ósea de oveja de tipo neuronas con CLQ para acumular GM1; y cuantificar el GM1; aislar el GM1, o ambos, de las células de médula ósea de oveja de tipo neuronas.

40

La invención proporciona además un método in vitro para producir el gangliósido GM1 que comprende tratar células de médula ósea humanas con CLQ para acumular el GM1; y aislar el GM1, cuantificar GM1, o ambos, de las células de médula ósea humanas tratadas con CLQ.

- 45 La invención se refiere además a tratar células, p. ej., células de médula ósea, con neuraminidasa para acumular el gangliósido GM1 en las células, y aislar los gangliósidos, cuantificar los gangliósidos, o ambos, de las células tratadas con neuraminidasa.

La invención se refiere además a tratar células, p. ej., células de médula ósea, con glucosamina para acumular el gangliósido GM1 en las células, y aislar los gangliósidos, cuantificar los gangliósidos, o ambos, de las células tratadas con glucosamina.

- 50 La invención se refiere además a la manipulación bioquímica de células, p. ej., células primarias o líneas celulares, para acumular el gangliósido GM1 en las células, y aislar los gangliósidos, cuantificar los gangliósidos, o ambos, de las células modificadas bioquímicamente.

La invención también proporciona métodos para producir el gangliósido GM1, cultivando las células sin pases y en alta densidad para acumular dicho gangliósido.

Se describen además métodos de cuantificación de una cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en una población de células adherentes, que comprenden poner en contacto las células adherentes con toxina colérica B conjugada con un colorante o con una enzima, que genera un producto final coloreado tras el contacto con su sustrato; y medir la luz emitida o absorbida por el colorante o el producto final coloreado, en donde la luz emitida o absorbida se usa para cuantificar la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en la población de células adherentes.

Se describe además un gangliósido GM1, producido por los métodos de la invención.

Se describen además métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos que comprenden administrar el gangliósido GM1, producido por los métodos de la invención, a un sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos/figuras

10 Figura 1A. Se obtuvieron células de la médula ósea de oveja con gangliosidosis GM1 ("células de médula ósea de oveja afectada") y se expandieron en cultivo. Las células de control se mantuvieron en medio de cultivo estándar (paneles superiores). Las células inducidas marcadas "48 h CLQ en NIM" (paneles inferiores) se cultivaron en NIM y después se trataron durante 48 horas con CLQ. Las células se tiñeron con toxina colérica B conjugada con Alexa488 ("CTB-Alexa488"). Se muestran imágenes representativas para demostrar la extensión de la inducción. La tinción indica la presencia de GM1. Las células en los paneles inferiores que fueron tratadas muestran inducción de GM1; la tinción es más prevalente e intensa. Obsérvese la tinción perinuclear en muchas células.

20 Figura 1B. Células obtenidas de médula ósea de oveja normal se expandieron en cultivo. Las células de control se mantuvieron en medio de cultivo estándar (paneles superiores). Las células inducidas marcadas "48 h CLQ en NIM" (paneles inferiores) se cultivaron en NIM y después se trataron durante 48 horas (h) con CLQ. Las células se tiñeron con CTB-Alexa488. Se muestran imágenes de diferentes zonas del cultivo o diferentes pocillos para demostrar la extensión de la inducción. La tinción indica la presencia de GM1. Las células en los paneles inferiores que fueron tratadas muestran inducción de GM1; la tinción es más prevalente e intensa. Obsérvese la tinción perinuclear en muchas células.

25 Figura 2. Células de estroma obtenidas de médula ósea de adulto humanas normales se cultivaron en matraces de cultivo tisular convencionales. Las células de control se mantuvieron en medio de cultivo estándar (paneles superiores). Las células tratadas, marcadas "CLQ" se trataron con CLQ en MEM Alpha durante 48 h (paneles inferiores). Se muestran imágenes representativas para demostrar la extensión de la inducción. Las células se tiñeron con CTB-Alexa488. La tinción indica la presencia de GM1. La señal de GM1 en las células tratadas (paneles inferiores) es abundante e intensa comparada con las condiciones de control.

30 Figura 3. Una línea celular de neuroblastoma humano, SHSY-5Y, células de médula ósea de oveja ("SBM") y células de médula ósea humanas ("HBM") se sometieron cada una a tres regímenes de tratamiento diferentes: (a) medio exento de suero ("SFM"), (b) NIM, o (c) CLQ. La cantidad de GM1 en cada cultivo se determinó usando toxina colérica B conjugada con peroxidasa de rábano picante ("HRP") ("CTB-HRP"). Se midió la cantidad de producto generada por la CTB-HRP que quedaba unida después de incubación y lavado. También se determinó la señal de la tinción con azul Alamar para cada cultivo. La señal de GM1 (medida por CTB-HRP) se normalizó respecto al número de células en el pocillo (medido por azul Alamar). El eje y de la gráfica de barras indica la extensión de la tinción usando CTB-HRP normalizado para el número de células, lo que indica la cantidad de GM1 producido por cada línea celular para cada régimen de tratamiento. Las células de control se dejaron sin tratar y se mantuvieron en medio de cultivo estándar. Los tratamientos con NIM y CLQ mostraron la inducción más fuerte de GM1.

40 Figura 4. Inducción de GM1 en células de neuroblastoma neuro 2A de ratón tratadas con neuraminidasa. Las células neuro 2A se mantuvieron en medio de cultivo estándar (Ctrl) o se trataron durante 3 horas con neuraminidasa. Las células tratadas muestran mayor tinción (véase el panel D) lo que indica mayor acumulación de GM1 por las células tratadas.

45 Figura 5. Inducción de GM1 en células de estroma de médula ósea de adulto humanas (hABM-SC) con neuraminidasa. Las hABM-SC se mantuvieron en medio de cultivo (control) o se trataron durante 3 horas con neuraminidasa (tratadas). Las células tratadas muestran mayor intensidad de tinción, indicando mayor producción de GM1 por las células tratadas.

50 Figura 6. Inducción de GM1 en células de neuroblastoma neuro 2A de ratón por condiciones de cultivo a largo plazo de alta densidad. Las células neuro 2A de ratón se cultivaron con una alta densidad. Un subconjunto de pocillos se fijó y se tiñó el GM1 después de 3 días en cultivo, mientras que otros se mantuvieron durante 9 días antes de fijación y tinción de GM1. La mayor tinción de las células mantenidas durante 9 días indica la mayor producción de GM1.

55 Figura 7. Inducción de GM1 en células obtenidas de cerebro de oveja por condiciones de cultivo a largo plazo de alta densidad. Las células obtenidas de cerebro de oveja se cultivaron en una alta densidad. Un subconjunto de pocillos se fijó y se tiñó el GM1 después de 3 días en cultivo, mientras que otros se mantuvieron durante 9 días antes de fijación y tinción de GM1. La tinción más brillante de las células mantenidas durante 9 días indica la mayor producción de GM1.

Figura 8. Curva de referencia para la cuantificación de GM1 de oveja basado en placa usando CTB-HRP. Una placa basada en ELISA se recubrió con diferentes cantidades de GM1 de oveja. Las placas se lavaron, se bloquearon e incubaron con toxina colérica B-conjugada con HRP. Se añadió sustrato para generar un producto coloreado que se midió usando un lector de placa. La intensidad de la señal se correlacionó con la cantidad de GM1 añadida por pocillo. Esta gráfica representa una curva de referencia generada por este método. Los niveles de GM1 se pueden cuantificar usando esta curva de referencia.

Figura 9. Curva de referencia para para la cuantificación de GM1 de oveja basado en placa usando CTB-Alexa488. Una placa basada en ELISA se recubrió con diferentes cantidades de GM1 de oveja. Las placas se lavaron, se bloquearon e incubaron con CTB-Alexa488. La intensidad de la señal se correlacionó con la cantidad de GM1 añadida por pocillo. Esta gráfica representa una curva de referencia generada por este método. Los niveles de GM1 se pueden cuantificar usando esta curva de referencia.

Figura 10. Inducción de GM1 en líneas de células inmortalizadas con CLQ. Células SHSY-5Y, SHSY-S, SK-N-AS, de ovario de hámster chino (CHO-K1), y de riñón embrionario humano (HEK293) se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células de control se mantuvieron en su respectivo medio de cultivo estándar (Figura 10, Paneles A, C, E, G, I). Las células tratadas, marcadas "CLQ" se trataron con CLQ añadida al medio de cultivo estándar durante 48-120 horas (Figura 10, Paneles B, D, F, H, J). Se muestran imágenes representativas para demostrar la extensión de la inducción. Las células se tiñeron con CTB-Alexa488. La tinción indica la presencia de GM1. La señal de GM1 en las células tratadas es más abundante e intensa comparada con las condiciones de control para todos los tipos de células, aunque la magnitud y distribución varían.

Figura 11. Inducción de GM1 en líneas de células primarias con CLQ. Células de estroma obtenidas de médula ósea de adulto de Garnet BioTherapeutics (GBT-ABMSC), de estroma obtenidas de médula ósea (Lonza BMSC), de estroma obtenidas de tejido adiposo (Lonza ADSC), fibroblastos dérmicos (fb), y fibroblastos de sujetos con gangliosidosis GM1 (GM1 fb) se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células de control se mantuvieron en sus respectivos medios de cultivo estándar (Figura 11, Paneles A, C, E, G, I). Las células tratadas, marcadas "CLQ", se trataron con CLQ añadida a los medios de cultivo estándar durante 48-120 horas (Figura 11, Paneles B, D, F, H, I). Se muestran imágenes representativas para demostrar la extensión de la inducción. Las células se tiñeron con CTB-Alexa488. La tinción indica la presencia de GM1. La señal de GM1 en las células tratadas es más abundante e intensa comparada con las condiciones de control para todos los tipos de células, aunque la magnitud y distribución varían.

Descripción detallada de la invención

#### Introducción

La presente invención proporciona métodos in vitro para producir el gangliósido GM1, a partir de células en cultivo. Por consiguiente, los métodos de la invención proporcionan procedimientos para potenciar o inducir, la producción del gangliósido GM1 en cultivo celular usando diferentes manipulaciones. Los siguientes métodos de la presente invención se describirán con detalle a continuación: (a) cultivo de células con medio de inducción neuronal ("NIM"), seguido de tratamiento con cloroquina ("CLQ"); (b) tratamiento de células cultivadas en cloroquina solo, es decir, sin el tratamiento inicial con NIM; (c) tratamiento de células cultivadas con neuraminidasa; (d) tratamiento de células cultivadas con glucosamina; (e) modificación bioquímica de las células; (f) cultivo a largo plazo de alta densidad de células sin pases para permitir que el gangliósido GM1 se acumule en las células. También se discutirán los tipos de células adecuados para cada método, así como los métodos para aislar células antes del tratamiento con NIM/CLQ o CLQ. En algunas realizaciones no exclusivas, los métodos (a) y/o (c) y/o (d) y/o (e) y/o (f), y los métodos (b) y/o (c) y/o (d) y/o (e) y/o (f), se combinan para potenciar más la producción de gangliósidos en las células cultivadas. Por ejemplo, las células primero cultivadas con NIM/CLQ se cultivan posteriormente con neuraminidasa, o las células tratadas con CLQ, y no NIM, posteriormente se cultivan con neuraminidasa. En algunas realizaciones, después de tratamiento químico, p. ej., con NIM y/o CLQ y/o neuraminidasa, las células se someten a cultivo a largo plazo de alta densidad sin pases para permitir que se acumule el gangliósido GM1, en las células tratadas químicamente. En otras realizaciones, cualquier combinación de los tratamientos como se describe en esta aplicación es posible.

Se describen además métodos de cuantificación de la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en cultivo celular, también descritos con detalle a continuación.

El término "gangliósidos" abarca todos los gangliósidos. En la invención, el gangliósido es GM1.

Producción de gangliósidos por cultivo en medio de inducción neuronal, seguido de tratamiento con CLQ

En realizaciones, las células se inducen para acumular el gangliósido GM1, por cultivo en medio de inducción neuronal, seguido de tratamiento con cloroquina. Este tratamiento de combinación se abrevia en la presente memoria "NIM/CLQ". En realizaciones, las células adecuadas para usar en este método se identifican por su fuente, p. ej., del tipo de animal y la fuente de tejido celular del animal. Las fuentes animales para usar en los métodos de NIM/CLQ de la invención incluyen, pero no se limitan a ser humano, oveja, conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células estromales, p. ej., células obtenidas de médula ósea y tejido adiposo humanas; de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales

citadas antes, en los métodos de NIM/CLQ de la presente invención. Como se usa en la presente invención, las expresiones “células de médula ósea” y “células obtenidas de médula ósea” se usan de forma sinónima. En realizaciones, los métodos de NIM/CLQ de la invención usan las células obtenidas de médula ósea producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno, para aislar la médula ósea de fuentes humanas,

5  
Tipos adicionales de células para usar en los métodos de NIM/CLQ descritos incluyen células inmortalizadas. Otros tipos de células incluyen células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S y SK-N-AS). Los neuroblastomas son ventajosos al menos porque estas células tienen una alta tasa de crecimiento.

En realizaciones, cada tipo de célula usada en los métodos de NIM/CLQ de la invención, se cultiva en métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub>, descritos con detalle más adelante, antes y/o durante y/o después de tratamiento.

15 En realizaciones, las fuentes de células animales de la presente invención están afectadas por gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambos, que es un trastorno del almacenamiento lisosómico caracterizado por la acumulación generalizada de gangliósidos. En realizaciones, se usan células de médula ósea de ser humano, afectadas de gangliosidosis, en los métodos de NIM/CLQ de la presente invención. En otras realizaciones, se usan células de neuroblastoma de ratón, oveja o ser humano y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S y SK-N-AS) en los métodos de NIM/CLQ de la presente invención.

20 En realizaciones, no se usan células PC12, células HT22, células cerebrales de una oveja afectada de gangliosidosis, ni células de fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de NIM/CLQ de la invención.

25 La expresión “medios de inducción neuronal” se refiere a una solución para el crecimiento de células que, en condiciones correctas, produce células que asumen una o más características fenotípicas de una neurona. El grado de fenotipo neuronal inducido por el NIM depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan el tipo de célula de partida, los componentes de los medios, la concentración de los componentes del NIM, y la cantidad de tiempo que las células están en contacto con el NIM. En realizaciones de la presente invención, los medios de inducción neuronales adecuados inducen la expresión del gangliósido GM1, en las células cultivadas, más allá de los niveles expresados por las células en medios de cultivo estándar.

30 En realizaciones, el NIM comprende medio neurobasal, complemento B27 con ácido retinoico, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de fibroblastos. Estos componentes del NIM son ilustrativos y se conocen en la técnica componentes adicionales del NIM.

35 En realizaciones, después de aislarlas de su fuente animal, las células para usar en los métodos de NIM/CLQ de la invención se cultivan primero en medio de cultivo estándar, p. ej., medio de crecimiento Alpha-MEM complementado con suero bovino fetal al 10% (“FBS”); MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales (“NEAA”), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, durante 2 a 24 horas, y preferiblemente durante 4 a 14 horas, y preferiblemente durante 12 horas. En realizaciones, las células se cultivan con una densidad de siembra de células convencional, p. ej., de 2.000 a 20.000 células/cm<sup>2</sup>, y preferiblemente 8.000 células/cm<sup>2</sup>, a aproximadamente 37°C en un incubador humidificado en condiciones atmosféricas estándar (5% de CO<sub>2</sub>). Después de cultivar en medio de cultivo estándar, el medio se sustituye por NIM y las células se cultivan en NIM durante entre 2 y 24 horas, preferiblemente entre 6 y 18 horas, o preferiblemente entre 8 y 14 horas. Después de tratamiento con NIM, se añade CLQ al matraz para inducir que las células cultivadas con NIM produzcan más GM1. La CLQ se ha usado para inducir la acumulación en células PC12 (tumor de medula suprarrenal de rata). Yuyama et al., *FEES Lett.* 580:6972-6976 (2006). Sin embargo, la CLQ solo aumentaba moderadamente los niveles de GM1 en células HT22 (de hipocampo de ratón). Hirata et al., *J Neurochem.* 119:839-847 (2011). En realizaciones, mientras las células se cultivan en NIM, se añade CLQ entre 5 y 100 micromolar, CLQ entre 20 y 60 micromolar, o CLQ entre 40 y 50 micromolar en el matraz de cultivo. En realizaciones, se añade CLQ 50 micromolar al matraz de cultivo. En otras realizaciones, se añade CLQ 30 micromolar al matraz de cultivo. En otras realizaciones, se añade CLQ 25 micromolar al matraz de cultivo. La CLQ se pone en contacto con las células cultivadas entre 4 y 72 horas, preferiblemente entre 20 y 60 horas, y preferiblemente entre 48 y 60 horas. En realizaciones, la CLQ se pone en contacto con las células cultivadas durante 48 horas.

55 Para tipos de células particulares, tales como células de médula ósea de oveja, resulta una muerte celular significativa después de tratamiento con NIM/CLQ. En dichas realizaciones, las células muertas en el matraz se retiran, y el resto de las células que sobreviven se vuelven a suspender en medio de crecimiento de nueva aportación, p. ej., Alpha-MEM complementado con FBS al 10%; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%;

EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, y se cultivan a aproximadamente 37°C en un incubador humidificado en densidades celulares estándar, en condiciones atmosféricas 5% de CO<sub>2</sub>. En realizaciones de la invención, después de se vuelve a suspender en medio de crecimiento de nueva aportación, p. ej., Alpha-MEM complementado con FBS al 10%; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%. Las células restantes que sobreviven se vuelven a tratar con CLQ para inducir más la producción de gangliósidos en las condiciones descritas antes. Si es necesario, las células muertas que flotan se retiran del matraz, y se recogen las células restantes que sobreviven. En realizaciones adicionales, no se lleva a cabo un segundo tratamiento, y las células se recogen. Los métodos descritos también proporcionan que se cuantifica la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular usando los métodos de la presente invención sea después de tratamiento con NIM solo o después de tratamiento con NIM y CLQ (antes y después de tratamiento). En realizaciones, el gangliósido GM1, se aísla y purifica usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la presente memoria.

El tratamiento con NIM/CLQ aumenta la acumulación de todos los gangliósidos. En realizaciones de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ aumenta la acumulación de GM1.

En realizaciones adicionales de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado de 15 a 125 por ciento o aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado de 30 a 100 por ciento o aproximadamente de 30 a 100 por cien más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado de 60 a 80 por ciento o aproximadamente de 60 a 80 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104, y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104, y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con NIM/CLQ da como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con NIM/CLQ.

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención.

Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que necesita tratamiento, por administración del gangliósido GM1, hecho por los métodos de NIM/CLQ de la invención. Por lo tanto, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención, un sujeto que ha tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de NIM/CLQ de la invención.

En esta descripción, los gangliósidos, p. ej., GM1, se acumulan en células obtenidas de médula ósea de oveja normal y células obtenidas de médula ósea de oveja afectada por gangliosidosis. En esta descripción, las células obtenidas de médula ósea de oveja se obtienen por los métodos de baja cantidad de oxígeno, baja densidad descritos más adelante. Dichas células después se cultivan en medio de crecimiento Alpha-MEM, con PBS al 10%, con una densidad de 8.000 células/cm<sup>2</sup>, después de aproximadamente 12 horas, el medio se sustituye por 30 ml de NIM, que comprende medio neurobasal, B27 complementado con ácido retinoico, EGF (25 microgramos/ml) y FGF (10 nanogramos/ml). Después de aproximadamente 10 horas, se añade CLQ 50 micromolar al matraz. Se observa aproximadamente 70% de muerte celular el tercer día. Las células que flotan se separan aclarando con PBS. Las células que sobreviven se recogen por tripsinización, se centrifugan, se vuelven a suspender en medio de nueva aportación y se siembran en un matraz nuevo con 8.000 células/cm<sup>2</sup>. Se separa una parte alícuota y se cultiva en una placa de 24 pocillos para confirmar los gangliósidos, p. ej., GM1, inducción por tinción con las cepas adecuadas, p. ej., CTB-Alexa488. Las células que sobreviven se dejan expandir en el matraz durante 2 días y las células se recogen. En realizaciones, las células que sobreviven se pueden tratar una segunda vez con CLQ 50 micromolar durante 24 horas, antes de recolección. Después de recoger las células, los gangliósidos, p. ej., GM1, se pueden aislar y purificar por los métodos descritos más adelante.

## Producción de gangliósidos por tratamiento con cloroquina

En realizaciones adicionales, la acumulación de gangliósido, p. ej., GM1, es inducida en células que usan tratamiento con cloroquina sin cultivar primero con medio de inducción neuronal. Este método se denomina también "método de tratamiento con CLQ" o "tratamiento con CLQ" en la presente memoria. En realizaciones, las fuentes animales de células para usar en el método de tratamiento con CLQ incluyen, pero no se limitan a humanas, de conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células estromales, p. ej., células de médula ósea y obtenidas de tejido adiposo; de fuentes animales, que incluyen pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, en los métodos de CLQ de la presente invención. Se describen métodos de ejemplo para aislar células de fuentes animales con detalle más adelante. En realizaciones, las células producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritas más adelante se tratan con CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1. En realizaciones, células de médula ósea humanas producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante se tratan con CLQ para inducir la producción del gangliósidos, p. ej., GM1.

En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo humanas y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S y SK-N-AS) en los métodos de CLQ de la invención. En realizaciones adicionales, las células para usar en los métodos de CLQ de la presente invención se obtienen de animales afectados de gangliosidosis, p. ej., seres humanos, gatos o perros afectados de gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambas. En realizaciones adicionales, se usan las células de médula ósea afectadas de gangliosidosis en los métodos de CLQ de la presente invención.

En realizaciones, cada tipo de célula usado en los métodos de CLQ de la invención se cultiva en los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub> descritos con detalle más adelante antes de y/o durante y/o después de tratamiento.

En realizaciones, no se usan células PC 12, células HT22, células cerebrales de ovejas afectadas de gangliosidosis ni fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de CLQ de la invención.

En realizaciones, las células de la fuente deseada se cultivan primero en medio de cultivo estándar, p. ej., medio de crecimiento Alpha-MEM complementado con FBS al 10%; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, con densidad de siembra convencional, p. ej., de 2.000 a 20.000 células/cm<sup>2</sup> y preferiblemente 8.000 células/cm<sup>2</sup>, a 37°C en condiciones atmosféricas y 5% de CO<sub>2</sub>. En realizaciones, las células se cultivan durante 2 a 48 horas, y preferiblemente durante 8 a 36 horas y preferiblemente durante 24 horas. Después de cultivar en medio de cultivo se sustituye opcionalmente por medio estándar complementado con suero; en realizaciones, la cantidad de suero es menor que la cantidad de suero en el medio de cultivo previo. Se añade CLQ al medio de cultivo. En realizaciones, se añade CLQ entre 5 y 100 micromolar, CLQ entre 25 y 75 micromolar, o CLQ entre 40 y 50 micromolar al matraz de cultivo. En realizaciones, se añade CLQ 50 micromolar al matraz de cultivo. En otras realizaciones, se añade CLQ 30 micromolar al matraz de cultivo. En otras realizaciones, se añade CLQ 25 micromolar al matraz de cultivo. La CLQ se pone en contacto con las células cultivadas durante entre 2 y 72 horas, preferiblemente entre 20 y 60 horas, y preferiblemente entre 30 y 50 horas. En realizaciones, la CLQ se pone en contacto con las células cultivadas durante 48 horas. La cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular se cuantifica usando los métodos descritos. Los gangliósidos, p. ej., GM1, se pueden aislar y purificar sustancialmente del cultivo celular usando métodos convencionales tales como los descritos más adelante.

En una realización de ejemplo, las células obtenidas de médula ósea humanas cultivadas en medio de crecimiento Alpha-MEM (con FBS al 10%) se siembran en una densidad de 8.000 células/cm<sup>2</sup>. Después de aproximadamente 24 horas, el medio se sustituye por Alpha-MEM reducido en suero (con FBS al 1%) y se añade CLQ 50 micromolar. Las células se incuban durante aproximadamente 48 horas antes de recogerlas.

El tratamiento con CLQ aumenta la acumulación de todos los gangliósidos. En una realización de la invención, el tratamiento con CLQ aumenta la acumulación de GM1.

En realizaciones adicionales de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha tratado con cloroquina. En otra realización de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado de 15 a 125 por ciento o aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina. En otra realización de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado de 30 a 100 por cien o aproximadamente de 30 a 100 por cien más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina. En otra realización de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado de 60 a 80 por ciento o aproximadamente de 60 a 80 por ciento más de acumulación de gangliósido que



una célula que no se ha tratado con cloroquina. En otra realización de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina. En otra realización de la invención, el tratamiento con CLQ da como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una

5

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención.

Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que necesita dicho tratamiento, por administración del gangliósido GM1, producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención. Por lo tanto, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención, un sujeto que ha tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de tratamiento con CLQ de la invención.

10

15

Producción de gangliósidos por tratamiento con neuraminidasas

En realizaciones adicionales, el exceso de producción de gangliósido GM1 es inducido en células que usan neuraminidasa, sea sola o con CLQ. La combinación del tratamiento con neuraminidasa y cloroquina se abrevia en la presente memoria "neuraminidasa/CLQ." La neuraminidasa es una enzima sialidasa que convierte el complejo cerebral principal de gangliósidos, p. ej., GD1a, GD1b, y GT1b, en GM1 en células intactas. En realizaciones, las fuentes para las células para usar en el método de tratamiento con neuraminidasa incluyen, pero no se limitan a ser humano, oveja, conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, tales como células estromales, p. ej., células obtenidas de la médula ósea y del tejido adiposo, en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la presente invención. En otras realizaciones de la invención, se pueden usar células de médula ósea humanas en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la presente invención. Los métodos de ejemplo para aislar la médula ósea de fuentes animales se describen con detalle más adelante. En realizaciones, las células producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se tratan con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1. En realizaciones, células de médula ósea humanas producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se tratan con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1.

20

25

30

35

40

45

Se usan células inmortalizadas, por ejemplo, células CHO, y células de riñón embrionario humano, p. ej., células CHO-K1 y células HEK293, en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ descritos. En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS) en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención. En realizaciones adicionales, las células para usar en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la presente invención se obtienen de animales afectados de gangliosidosis p. ej., seres humanos, gatos o perros afectados de gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambas. En realizaciones adicionales, se usan células de médula ósea de ser humano afectado de gangliosidosis en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la presente invención.

En realizaciones, cada tipo de célula usado en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención se cultiva con los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub> descritos con detalle más adelante, antes de y/o durante y/o después de tratamiento.

En realizaciones, no se usan células PC 12, células HT22, células cerebrales de ovejas afectadas de gangliosidosis ni fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención.

50

En realizaciones, las células obtenidas de la fuente deseada se cultivan en medio de cultivo estándar, p. ej., medio de crecimiento Alpha-MEM con suero, p. ej. FBS al 10%, complementado adicionalmente con glutamina de 1 a 4 mM, con una densidad de sembrado convencional; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, p. ej., de 2.000 a 20.000 células/cm<sup>2</sup> y preferiblemente 8.000 células/cm<sup>2</sup>, a 37°C en un incubador humidificado, en condiciones atmosféricas estándar (5% de CO<sub>2</sub>). Se añade neuraminidasa

55

al medio de cultivo y las células se tratan con neuraminidasa durante 1 a 5 horas, preferiblemente de 2 a 4 horas, y preferiblemente 3 horas. En realizaciones, se añaden entre 1 y 5 unidades/ml de neuraminidasa al medio de cultivo, y preferiblemente 1 unidad/ml. La cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular se cuantifica usando los métodos descritos. Los gangliósidos, p. ej., GM1, también se pueden aislar y purificar del cultivo celular usando métodos convencionales, tales como los descritos más adelante.

Los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ aumentan la acumulación de todos los gangliósidos. En una realización de la invención, los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ aumentan la acumulación de GM1.

En realizaciones adicionales de la invención, los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ dan como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha tratado con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ dan como resultado de 15 a 125 por ciento o aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ dan como resultado de 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ dan como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ.

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de tratamiento con neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención.

Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que necesita dicho tratamiento, por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1, producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1, producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que ha tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1, producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1, producido por los métodos de neuraminidasa y neuraminidasa/CLQ de la invención.

#### Producción de gangliósidos por tratamiento con glucosamina

En realizaciones adicionales, la producción de exceso de gangliósido GM1 es inducida en células que usan glucosamina sea sola o con CLQ. La combinación del tratamiento de glucosamina con cloroquina se abrevia en la presente memoria como "glucosamina/CLQ". En determinadas condiciones, el tratamiento con glucosamina aumenta los niveles de gangliósidos, por ejemplo, GM1 y GM2, como describen Masson et al. *Biochem. J* 388:537-544 (2005). Las fuentes de células para usar en el método de los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ incluyen, pero no se limitan a ser humano, oveja, conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células estromales, p. ej., células obtenidas de médula ósea y tejido adiposo; de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la presente invención. Se describen métodos de ejemplo para aislar células de fuentes animales más adelante. En realizaciones, las células producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se tratan con glucosamina y glucosamina/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1. En realizaciones, células de médula ósea humanas producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se tratan con glucosamina y glucosamina/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1.

Se usan células inmortalizadas, por ejemplo, células CHO, y células de riñón embrionarias humanas, p. ej., células CHO-K1 y células HEK293, en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ descritos. En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS) en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención. En realizaciones adicionales, las células para usar en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la presente invención se obtienen de animales afectados de gangliosidosis p. ej., seres humanos, gatos o perros afectados de gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambos. En realizaciones adicionales, se usan células de médula ósea de seres humanos afectados de gangliosidosis en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la presente invención.

En realizaciones, cada tipo de célula usado en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención se cultiva con los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub> descritos con detalle más adelante, antes

de y/o durante y/o después de tratamiento.

En realizaciones, no se usan células PC 12, células HT22, células cerebrales de una oveja afectada de gangliosidosis ni fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención.

- 5 En realizaciones, las células obtenidas de la fuente deseada se cultivan en medio de cultivo estándar, p. ej., medio de crecimiento Alpha-MEM complementado con suero, p. ej. FBS al 10%, complementado adicionalmente con glutamina de 1 a 4 mM, con una densidad de sembrado convencional; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM  
10 complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, p. ej., de 2.000 a 20.000 células/cm<sup>2</sup> y preferiblemente 8.000 células/cm<sup>2</sup>, a 37°C en un incubador humidificado, en condiciones atmosféricas estándar (5% de CO<sub>2</sub>). Se añade glucosamina al medio y se cultivan como describen Masson et al. *Biochem. J* 388:537-544 (2005). La  
15 cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular se cuantifica usando los métodos descritos. Los gangliósidos, p. ej., GM1, también se pueden aislar y purificar del cultivo celular usando métodos convencionales, tales como los descritos más adelante.

El tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ aumenta la acumulación de todos los gangliósidos. En una realización de la invención, el tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ aumenta la acumulación de GM1.

- 20 En realizaciones adicionales de la invención, el tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ da como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha tratado con glucosamina y glucosamina/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ da como resultado de 15 a 125 por ciento o  
25 aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con glucosamina y glucosamina/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ da como resultado de 30 a 100 por ciento o aproximadamente de 30 a 100 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con glucosamina y glucosamina/CLQ. En otra  
30 realización de la invención, el tratamiento con glucosamina y glucosamina/CLQ da como resultado 15, 19, 28, 63, 65, 83, 10, y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con glucosamina y glucosamina/CLQ. En otra realización de la invención, el tratamiento con glucosamina y  
35 glucosamina/CLQ da como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado con glucosamina y glucosamina/CLQ.

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención.

- Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que necesita dicho tratamiento, por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido  
40 por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención, un sujeto que ha  
45 tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención. En realizaciones, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención.

Producción de gangliósidos por manipulación bioquímica

- 50 En realizaciones adicionales, la producción de exceso de gangliósido GM1 es inducida en células por manipulación bioquímica sea sola o en combinación con CLQ. La combinación de la manipulación bioquímica con el tratamiento con cloroquina se abrevia en la presente memoria como "manipulación bioquímica/CLQ". En determinadas condiciones, la alteración de determinados niveles de enzimas aumenta los niveles de gangliósidos, produciendo enfermedad. La gangliosidosis GM1 es causada por un nivel elevado de GM1 causado por una deficiencia de la  
55 enzima lisosómica  $\beta$ -galactosidasa, que hidroliza los restos  $\beta$ -galactosilo terminales del gangliósido GM1, glucoproteínas y glucosaminoglucanos. Christie, "Ganglioside," The AOCS Lipid Library, última actualización 23 de julio, 2012. Además, la gangliosidosis GM2 es causada por la actividad insuficiente de una enzima específica, la  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa, que cataliza la degradación de gangliósidos. Ídem. Además, se conocen muchas de las enzimas que convierten los gangliósidos de unas formas en otras. Por lo tanto, la alteración de la expresión y/o

actividad de estas enzimas puede aumentar la producción de un gangliósido particular. Se pueden usar métodos conocidos tales como, pero no limitados a la reducción de la expresión génica, p. ej., reducción de la expresión génica, transfección, p. ej., transitoria o estable, inhibición química, p. ej., molécula pequeña o agente biológico, y anticuerpos, para los métodos de la invención. Las fuentes de células para usar en el método de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ incluyen, pero no se limitan a ser humano, oveja, conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células estromales, p. ej., células obtenidas de médula ósea y tejido adiposo; de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la presente invención. Se describen métodos de ejemplo para aislar células de fuentes animales en detalle más adelante. En realizaciones, las células producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se usan en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1. En realizaciones, células de médula ósea humanas producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se usan en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ para inducir la producción del gangliósido GM1.

Se usan células inmortalizadas, por ejemplo, células CHO, y células de riñón embrionarias humanas, p. ej., células CHO-K1 y células HEK293, en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ descritos. En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS) en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención. En realizaciones adicionales, las células para usar en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la presente invención se obtienen de animales afectados de gangliosidosis p. ej., seres humanos, gatos o perros afectados de gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambas. En realizaciones adicionales, se usan células de médula ósea de seres humanos afectados de gangliosidosis en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la presente invención.

En realizaciones, cada tipo de célula usado en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención se cultiva con los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub> descritos con detalle más adelante, antes de y/o durante y/o después de tratamiento.

En realizaciones, no se usan células PC 12, células HT22, células cerebrales de una oveja afectada de gangliosidosis ni fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de glucosamina y glucosamina/CLQ de la invención.

En realizaciones, las células obtenidas de la fuente deseada se cultivan en medio de crecimiento estándar, p. ej., medio de crecimiento Alpha-MEM complementado con suero, p. ej. FBS al 10%, complementado adicionalmente con glutamina de 1 a 4 mM, con una densidad de sembrado convencional; MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y PBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y PBS al 10%; P-12K complementado con PBS al 10%; EMEM complementado con PBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con PBS al 15%, p. ej., de 2.000 a 20.000 células/cm<sup>2</sup> y preferiblemente 8.000 células/cm<sup>2</sup>, a 37°C en un incubador humidificado, en condiciones atmosféricas estándar (5% de CO<sub>2</sub>). La cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular se cuantifica usando los métodos descritos. Los gangliósidos, p. ej., GM1, también se pueden aislar y purificar del cultivo celular usando métodos convencionales, tales como los descritos más adelante.

Los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ aumentan la acumulación de todos los gangliósidos. En una realización de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ aumentan la acumulación de GM1.

En realizaciones adicionales de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado de 15 a 125 por ciento o aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado de 30 a 100 por cien o aproximadamente de 30 a 100 por cien más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado de 60 a 80 por ciento o aproximadamente de 60 a 80 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19, 28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ. En otra realización de la invención, los métodos de

manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ dan como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha tratado por manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ.

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención.

- 5 Se describen además métodos de tratamiento un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que necesita dicho tratamiento por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que ha tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ de la invención.

Cultivo celular a largo plazo sin tratamiento químico y sin pases

- 20 La invención proporciona además métodos de producción del gangliósido GM1 mediante cultivo de células sin pases y sin medios de inducción neuronal, cloroquina o tratamiento con neuraminidasa. Se ha encontrado sorprendentemente que células cultivadas en alta densidad, por ejemplo, al 60-90% de confluencia en el momento de la siembra, preferiblemente 70-80% de confluencia en el momento de la siembra, durante un periodo largo permanecen viables y acumulan gangliósidos, p. ej., GM1, en cantidades significativas. En realizaciones adicionales, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención se combinan con los tratamientos químicos y/o bioquímicos descritos antes. Por ejemplo, las células cultivadas con NIM/CLQ después se someten a cultivo de alta densidad-largo plazo sin pases, o las células tratadas con CLQ y/o neuraminidasa y/o glucosamina se cultivan en alta densidad a largo plazo sin pases, o las células se cultivan en alta densidad a largo plazo sin pases y después se tratan con NIM/CLQ, CLQ, neuraminidasa y/o glucosamina.
- 30 Las fuentes de células para usar en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención incluyen, pero no se limitan a ser humano, oveja, conejo, ratón, cobaya, caballo, cerdo, gato y perro. En realizaciones de la invención, se pueden usar células estromales, p. ej., células obtenidas de médula ósea y tejido adiposo; de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención. Se describen métodos de ejemplo para aislar células de fuentes animales más adelante. En realizaciones, las células de médula ósea humanas producidas por los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritos más adelante, se usan en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención para inducir la producción del gangliósidos, p. ej., GM1.

- 40 En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS) en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención.

- 45 Se usan células inmortalizadas, por ejemplo, células CHO, y células de riñón embrionarias humanas, p. ej., células CHO-K1 y células HEK293, en los métodos de manipulación bioquímica y manipulación bioquímica/CLQ descritos. En realizaciones adicionales, se usan células de neuroblastoma aisladas de fuentes animales, que incluyen, pero no se limitan a las fuentes animales citadas antes, incluyendo seres humanos, y líneas celulares de neuroblastoma (que incluyen, pero no se limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS) en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención. En realizaciones adicionales, las células para usar en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención se obtienen de animales afectados de gangliosidosis, p. ej., seres humanos, gatos o perros afectados de gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, o ambas. En realizaciones adicionales, se usan células de médula ósea de ser humano afectado de gangliosidosis en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención.

En realizaciones, cada tipo de célula usado en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención se cultiva con los métodos de cultivo de baja densidad/bajo contenido de O<sub>2</sub> descritos con detalle más adelante, antes de y/o durante y/o después de cultivo en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención.

- 55 En realizaciones, no se usan células PC 12, células HT22, células cerebrales de una oveja afectada de gangliosidosis ni células fibroblastos de una oveja afectada de gangliosidosis, en los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención.

En dichos métodos, las células se mantienen para acumular gangliósidos, p. ej., GM1, y el medio de cultivo se

sustituye, o se añade medio de cultivo adicional, según sea necesario para mantener la viabilidad celular. En realizaciones, las células se cultivan en medio de cultivo estándar, tal como Alpha-MEM complementado FBS al 10%, MEM/F-12 complementado con FBS al 10%; EMEM/F-12 complementado con 1% de aminoácidos no esenciales ("NEAA"), L-glutamina 2 mM y FBS al 15%; DMEM complementado con NEAA 0,1 mM y FBS al 10%; F-12K complementado con FBS al 10%; EMEM complementado con FBS al 10%; medio basal MSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal ADSC Lonza complementado con complementos de crecimiento; medio basal de fibroblastos Lonza con complementos; o EMEM complementado con FBS al 15%, durante de 4 días a 4 semanas, de 6 días a 2 semanas, o de 9 días a 12 días a aproximadamente 37°C en un incubador humidificado, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. En una realización de ejemplo, el medio se cambia cada 3 días para mantener la viabilidad celular.

Las células preferidas para usar en esta realización de la invención incluyen células obtenidas de médula ósea. Las células obtenidas de médula ósea preferidas incluyen células aisladas de ser humano usando las condiciones de baja densidad/bajo contenido de oxígeno descritas más adelante. Preferiblemente, las células se obtienen de seres humanos afectados de gangliosidosis. Tipos de células adicionales para usar en esta realización de la invención incluyen células estromales. Tipos adicionales de células incluyen células de neuroblastoma, p. ej., células primarias o líneas celulares, que incluyen, pero no limitan a SHSY-5Y, SHSY-S, y SK-N-AS, En realizaciones, después del cultivo de alta densidad a largo plazo, las células se recogen y el gangliósido GM1, se aísla y purifica de las células. La cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en las células se cuantifica usando los métodos descritos.

Los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo aumentan la acumulación de todos los gangliósidos. En una realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo de la invención aumentan la acumulación de GM1.

En realizaciones adicionales de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado de 10 a 200 por ciento o aproximadamente de 10 a 200 por ciento más de acumulación de gangliósido en una célula comparado con una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo. En otra realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado de 15 a 125 por ciento o aproximadamente de 15 a 125 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo. En otra realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado de 30 a 100 por cien más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo. En otra realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado de 60 a 80 por ciento o aproximadamente de 60 a 80 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo. En otra realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado 15, 19,28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento o aproximadamente 15, 19,28, 63, 65, 83, 104 y 119 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo. En otra realización de la invención, los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo dan como resultado 65 por ciento más de acumulación de gangliósido que una célula que no se ha cultivado en condiciones de cultivo de alta densidad a largo plazo.

Se describe además un gangliósido producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención.

Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que necesita dicho tratamiento por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que tiene una lesión neuronal se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que ha tenido o está teniendo un accidente cerebrovascular se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que tiene el síndrome de Guillain-Barre se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención, un sujeto que tiene cáncer se trata por administración del gangliósido GM1 producido por los métodos de cultivo a largo plazo de la invención.

Gangliósidos producidos por los métodos de la invención y sus métodos de uso

La invención proporciona el gangliósido GM1 producido por los métodos de la invención. Los gangliósidos producidos por la invención difieren de los gangliósidos producidos por métodos previos.

Los gangliósidos existen como una mezcla muy compleja de especies que difieren en los restos tanto hidrófilos como hidrófobos. Sonnino y Chigomo, *Biochim Biophys Acta* 1469:63-77 (2000). Los gangliósidos consisten en un resto lipídico unido a una familia muy grande de estructuras de oligosacáridos que difieren en la posición del enlace glucosídico, conformación del azúcar, contenido de azúcar neutro y ácido siálico. Por ejemplo, los gangliósidos GM1 disponibles en el mercado presentan variaciones en la longitud de cadena base. Véase el ejemplo 13 y la tabla 5. Por consiguiente, existen variaciones en estructura incluso entre los gangliósidos caracterizados como el mismo

gangliósido, p. ej., "GM1". Además, la composición de gangliósidos difiere entre especies y cambia con la edad. Ikeda, et al., *J Lipid Res.* 49:2678-2689 (2008); Masserini y Freire, *Biochem.* 25: 1043-1049 (1986); Taketomi et al., *Acta Biochim. Pol.* 45:987-999. Por ejemplo, el GM1 natural es una mezcla heterogénea que contiene principalmente cadenas base de longitud C18:1 y C20:1. Ídem. En seres humanos, la composición de GM1 cambia con el tiempo. 5 Taketomi et al., *Acta Biochim. Pol.* 45:987-999. Más específicamente, la proporción de d20:1 (icosaesfingosina) y d20 (icosaesfinganina) de las bases de esfingosina totales aumenta rápidamente hasta la adolescencia o edad adulta y después permanece constante a aproximadamente 50%; este valor era mayor que la proporción de d20:1 y d20 de GM1 en diferentes cerebros de mamíferos adultos. Ídem.

Se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que necesite tratamiento que tiene una enfermedad o trastorno, por administración de un gangliósido producido por los métodos. La enfermedad o trastornos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a una lesión neuronal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, síndrome de Guillain-Barre y cáncer. 10

Dichas composiciones se pueden administrar por una vía parenteral (p. ej., inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración enteral o tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal. 15

Los términos "tratar" o "tratamiento" cuando se usan en el contexto del uso de los gangliósidos producidos como se describe, incluyen, pero no se limitan al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan al alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización del progreso, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (sea parcial o total), sea detectable o no detectable. "Tratamiento" en este contexto también significa prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como los que son propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se va a prevenir la manifestación de la afección o trastorno. 20 25

Adicionalmente, el término "tratamiento" cuando se usa en el contexto del cultivo celular, incluye, pero no se limita a la administración o aplicación a células cultivadas de un fármaco, producto químico, técnica, terapia y/o métodos específicos. 30

Por "sujeto", "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se entiende cualquier sujeto, en particular un sujeto mamífero, p. ej., un paciente humano, para el que se desea el diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

Métodos de producción de células o uso en los métodos de la invención

Como se ha indicado antes, en realizaciones las células se usan en los métodos de la invención. En dichas realizaciones, las células se pueden obtener por cultivo en condiciones de bajo contenido de oxígeno, baja densidad. Dichos métodos son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en las publicaciones de EE.UU. nº 2003/0059414, 2007/0224177 y 2009/0053183 (patentado como patente de EE.UU. nº 8.354.370 B2). En una realización, las células obtenidas de médula ósea se usan en los métodos de la invención. En dicha realización, las células obtenidas de médula ósea se pueden obtener por cultivo en condiciones de bajo contenido de oxígeno, baja densidad. 35 40

En una realización de ejemplo, se obtiene el aspirado de médula ósea completa de un ser humano y se cultiva en contacto con una fase sólida. Por ejemplo, se obtienen células de médula ósea humanas de donantes humanos sanos por aspiración de poblaciones de células estromales de la cresta ilíaca y la médula ósea, obtenidas usando técnicas bien asentadas. Si se desea el aspirado de médula ósea completa se puede procesar para dar una fracción de células mononucleares que después se cultiva en contacto con una fase sólida. La fase sólida puede ser, por ejemplo, plástico (p. ej., plásticos tratados por cultivo tisular). 45

La fracción de células mononucleares se puede obtener del aspirado de médula ósea completo mediante un gradiente de densidad por procedimientos asentados. Alternativamente, la fracción de células mononucleares se obtiene por lisis de los glóbulos rojos contenidos en el aspirado de la médula ósea. La lisis se lleva a cabo mezclando el aspirado de médula ósea con cloruro amónico. 50

El aspirado de médula ósea, o una fracción celular del aspirado de médula ósea, se cultiva en contacto con una fase sólida y se aísla una población de células intermedia del cultivo celular resultante basándose en su tendencia a adherirse a la fase sólida. Los aspirados de médula ósea, o una fracción celular del aspirado de médula ósea, se cultivan con una concentración de oxígeno disuelto menor que aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 2% de oxígeno y aproximadamente 7% de oxígeno. En una realización preferida, la concentración de oxígeno disuelto es aproximadamente 5% de oxígeno. La población de células adherentes resultante se expande para dar una población 55

de células sustancialmente homogénea, que coexpresan CD49c y CD90.

La expansión de células de médula ósea se lleva a cabo con una densidad de siembra menor que aproximadamente 2500 células/cm<sup>2</sup>, preferiblemente menor que aproximadamente 1000 células/cm<sup>2</sup> y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup>. En una realización particular, la densidad celular inicial en la etapa de expansión es entre aproximadamente 30 células/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 50 células/cm<sup>2</sup>. Una densidad de siembra sería el número de células adherentes por cm<sup>2</sup> obtenido a partir de las células mononucleares de médula ósea.

Las preparaciones de medios estándar se pueden usar para el cultivo de células de médula ósea. Por ejemplo, el medio puede ser la modificación de Alpha-MEM complementada con L-glutamina 4 mM y FBS de 0 a 10% seleccionado por lotes, preferiblemente aproximadamente FBS al 10%. La etapa de cultivo se puede llevar a cabo durante cualquier periodo razonable, p. ej., entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 días y lo más preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 días.

Se aísla una población de células intermedia del cultivo celular descrito antes, basándose en la tendencia a adherirse a la fase sólida. La población de células intermedias se desarrolla a una concentración celular que estimula a proliferar prácticamente solo las células que se autorrenuevan, denominadas en la presente memoria como unidades formadoras de colonias de células de tipo fibroblastos (UFC-F). Las células derivadas de las UFC-F se subcultivan en condiciones definidas para producir una población de células sustancialmente homogénea. De acuerdo con la invención, la expansión da una población de células sustancialmente homogénea que coexpresa CD49 y CD90.

Métodos para aislar células obtenidas de cerebro de oveja o uso en los métodos descritos

Como se ha discutido antes, las células obtenidas de cerebro de oveja se usan en los métodos descritos. Por ejemplo, las células obtenidas de cerebro de oveja se cultivan usando los métodos de cultivo de alta densidad a largo plazo descritos. Como se ha indicado antes, las células obtenidas de cerebro de oveja se aíslan de ovejas afectadas de gangliosidosis. Las ovejas afectadas de gangliosidosis se han descrito previamente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.532.141. Los métodos de aislamiento y cultivo de células obtenidas de cerebro de oveja están descritos en la técnica, por ejemplo, en Int'l. Appl. No. PCT/US2010/047522, publicado como WO 2011/028795.

En una descripción de ejemplo, las células se aíslan de las siguientes fuentes de tejido cerebral de oveja: centro semioval, corteza cerebelosa, hipocampo, núcleo caudado, corteza cerebral (p. ej., frontal, parietal) y paredes ventriculares. Cada tipo de tejido se lava con tampón PIPES, y se digiere en papaína/DNasa I/Dipasa (proteasa neutra) con antibióticos/antimicóticos. Las enzimas se neutralizan y las células disociadas se pasan por un filtro de células. Las células se centrifugan y se vuelven a suspender en DMEM/F12/N2 complementado con FBS al 5% y antibióticos/antimicóticos. Las células se cuentan y se siembran en matraces recubiertos de fibronectina en DMEM/F12/N2 complementado con FBS al 5% y antibióticos/antimicóticos y complementado adicionalmente con bFGF 10 ng/ml y EGF 20 ng/ml o medio Neurocult Proliferation-A. Las células en cada tipo de medio se desarrollan en un incubador humidificado a 37°C. Por ejemplo, las células se desarrollan en condiciones de bajo contenido de oxígeno, p. ej., 20% o menos, 15% o menos, 10% o menos, y preferiblemente 4% o 5% de oxígeno, antes de usar los métodos descritos.

Métodos de aislamiento de gangliósidos de las células

La extracción y purificación de gangliósidos de los cultivos celulares de la presente invención se lleva a cabo por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se trata con ultrasonidos el sedimento celular en una cantidad mínima de agua durante 30 minutos para homogeneización. Se diluye la muestra a 20 volúmenes de cloroformo:metanol 2:1. Se trata por ultrasonidos durante 30 minutos. Se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos para sedimentar el material celular. Se decanta y guarda el líquido sobrenadante. Se suspende el sedimento en 10 volúmenes de cloroformo:metanol 2:1 que contiene 5% de agua. Se trata por ultrasonidos durante 30 minutos. Se centrifuga y decanta como antes. Se combinan los líquidos sobrenadantes. Adición repetida de cloroformo:metanol, tratamiento con ultrasonidos y centrifugación 2-3 veces adicionales para extraer completamente todos los gangliósidos. La amplia mayoría de los gangliósidos deberían extraerse en los dos primeros ciclos de extracción. Se añaden a los líquidos sobrenadantes combinados 0,2 volúmenes de KCl o NaCl 0,11 N. Se mezcla bien. Se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos para separar las capas. Se guarda la capa superior. A la capa orgánica que queda (inferior), se añaden 0,2 volúmenes de metanol:KCl o NaCl 0,1N 1:1. Se repiten las etapas de adición de KCl o NaCl, centrifugación y extracción. A la capa orgánica que queda (inferior), se añaden 0,2 volúmenes de metanol:agua 1:1. Se combinan las capas superiores guardadas y se concentran. El extracto resultante contiene una mezcla de gangliósidos. Las especies de interés después se pueden aislar adicionalmente usando cromatografía en columna, p. ej., sefarsosa o toxina colérica B.

Cuantificación de la cantidad de gangliósidos en cultivo celular

Se describen además métodos de cuantificación de la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el cultivo celular después de poner en práctica los métodos de producción de gangliósidos de la presente invención. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos para producir una curva de referencia para la cuantificación de



gangliósidos, p. ej., GM1, basada en placa, frente a la que comparar muestras.

5 En algunos ejemplos, se genera una curva de referencia preparando diluciones de gangliósidos, p. ej., GM1, tal como un GM1 de oveja o humano y añadiendo las diluciones a una palca de ELISA, tal como una placa Nunc MaxiSorp<sup>®</sup>. Las placas se incuban para permitir la adsorción de los gangliósidos, p. ej., GM1, a las placas, por ejemplo durante 8 a 24 horas, y preferiblemente de 12 a 16 horas a 4°C. Después de incubación, las placas se lavan y se bloquean, y los gangliósidos, p. ej., GM1, se ponen en contacto con CTB, que está conjugada con un colorante o con una enzima que genera un producto final coloreado tras el contacto con su sustrato. Después del contacto con el conjugado de CTB, se mide la luz emitida por o absorbida por el colorante o el producto final coloreado, en donde las lecturas indican la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, en el gangliósido purificado, p. ej., GM1, que recubre la placa. En un ejemplo, la absorbancia se lee en un lector de placa convencional. Se genera una curva de referencia a partir de los datos de absorbancia, con la cual comparar los datos de ensayo.

10 Posteriormente la curva de referencia se usa para comparar lecturas de los pocillos de ensayo para cuantificar la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, acumulados en las células o, en realizaciones, la cantidad de gangliósidos, p. ej., GM1, después de solubilización. En un ejemplo, los pocillos de ensayo contienen células que contienen gangliósidos adherentes, que se lavan y bloquean de la misma forma que la placa de muestra, anterior. Las células adherentes se ponen en contacto con la CTB, que está conjugada con un colorante o una enzima que genera un producto final coloreado tras contacto con su sustrato. Se mide la luz emitida por o absorbida por el colorante o el producto final coloreado y se compara con la curva de referencia para determinar la cantidad de acumulación de gangliósidos en las células adherentes. Tras completarse esta lectura, los gangliósidos se pueden solubilizar usando, por ejemplo, SDS al 1% en PBS, y las placas se vuelven a leer en el lector de placas. Los gangliósidos pueden estar unidos a otras moléculas en las células, haciendo el sitio de unión de la CTB inaccesible a los agentes de detección, CTB-HRP o CTB-Alexa488, por ejemplo. La solubilización libera el gangliósido unido o agregado para proporcionar un valor de cuantificación adicional.

25 En ejemplos, los colorantes preferidos son colorantes fluorescentes, tales como colorante verde fluorescente. En realizaciones, el colorante es FITC o Alexa488. En ejemplos adicionales, la enzima que se conjuga con la CTB es la peroxidasa de rábano picante ("HRP"). En el caso de un conjugado de CTB-HRP, el reactivo ABTS se pone en contacto con las células adherente para crear un producto coloreado y se mide la absorbancia del producto coloreado.

### Ejemplos

#### 30 Ejemplo 1

Un matraz de cultivo tisular T-225 (Corning, nº de cat. 431081) se sembró con las células obtenidas de médula ósea de oveja (pases 1 o 2) en medio de crecimiento Alpha-MEM (con FBS al 10%) con una densidad de 8.000 células/cm<sup>2</sup>.

35 A la mañana siguiente, el medio se sustituyó por 30 ml de medio de inducción neuronal (NIM): medio neurobasal +B27 complementado con ácido retinoico, EGF (25 ug/ml) y FGF (10 ng/ml).

40 Por la tarde, se añadió cloroquina 50 µM al matraz. Se observó aproximadamente 70% de muerte celular al tercer día. Las células que flotaban se separaron del matraz por lavado con PBS. Las células se tripsinizaron y se recogieron las células que sobrevivieron. Las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio de crecimiento de nueva aportación. Se sembraron matraces nuevos con 8.000 células/cm<sup>2</sup>. Se separó una parte alícuota y se cultivó en una placa de 24 pocillos para confirmar la inducción de GM1 por la tinción con la toxina colérica conjugada con Alexa488. Comparado con las células no tratadas (control), las SBM tratadas con NIM/CLQ (48 h CQ en NIM) tienen una tinción mucho más fuerte para GM1, como se muestra en la figura 1A y 1B.

Las células que sobrevivían se dejaron expandir en el matraz durante 2 días, y se recogieron las células.

45 Alternativamente, las células que sobreviven se pueden tratar una segunda vez con CLQ 50 uM durante 24 h antes de recolección.

#### Ejemplo 2

Se sembraron células de médula ósea de adulto humanas en matraces de cultivo tisular convencionales con una densidad de siembra de 8.000 células/cm<sup>2</sup>, en medio de crecimiento Alpha-MEM (con FBS al 10%).

50 Al día siguiente el medio se sustituyó, si era necesario, y se añadió CLQ 50 uM al matraz. Las células se recogieron después de 48 h. Se observó aproximadamente 10-20% de muerte celular. Las células fijadas se tiñeron con CTB-Alexa488 para visualizar los niveles de GM1. Comparado con el panel superior (control), las células tratadas con CLQ (panel inferior) muestran una acumulación de GM1 significativamente mayor.

#### Ejemplo 3

El objetivo de este ejemplo era la regulación por aumento de la expresión de GM1 en la línea celular de

neuroblastoma humano, SHSY-5Y, células obtenidas de médula ósea de oveja (SBM) y células obtenidas de médula ósea humanas (HBM).

5 En un estudio se sembraron células SHSY-5Y, SBM y HBM en medio de crecimiento con suero al 10% en placas de 24 pocillos. Al día siguiente las células se sometieron a tres regímenes de tratamiento diferentes o se dejaron en el medio de crecimiento (AMEM con FBS al 10%):

Medio exento de suero (SFM)  
Medio de inducción neuronal (NIM)  
Cloroquina 50uM (CLQ)

10 Después de 48 horas, se añadieron 100 ul de colorante azul Alamar a los pocillos y se incubaron durante 1 hora. Se midió la absorbancia del azul Alamar usando un lector de placa. Después, las placas se lavaron, se fijaron y se procesaron para la tinción de GM1 usando CTB-HRP. Los valores de CTB-HRP se normalizaron respecto a los valores de azul Alamar, que son indicativos de las células que sobreviven.

15 Como se muestra en la figura 3, los 3 tipos de células mostraban algo de regulación por aumento de la expresión de GM1 en el NIM (compárese el control con NIM). Las células SHSY-5Y mostraron aproximadamente doble inducción en NIM, mientras que las SBMC mostraron una inducción de aproximadamente 4 veces. La regulación por aumento de la expresión de GM1 más notable, de aproximadamente 8 veces, se observó con el tratamiento con CLQ de las HBMC (compárese el control con CLQ para HBM) (véase la figura 3).

20 En una serie de estudios, células SHSY-5Y, células obtenidas de médula ósea de oveja y células obtenidas de médula ósea humanas se trataron con compuestos que se sabe que afectan a las rutas de los gangliósidos. La cloroquina es un agente acidotrópico que perturba el tráfico de membrana desde los endosomas a los lisosomas. A23187 es un ionóforo de calcio que promueve la secreción de exomas después del tratamiento con CLQ. La N-acetilglucosamina activa la ruta de la hexosamina, que proporciona productos intermedios para la síntesis de glucoconjugados. El cambio a galactosa como una fuente de hidratos de carbono puede modificar la composición de los gangliósidos. Puesto que las neuronas expresan niveles más altos de GM1 comparado con otros tipos de células, las células se llevaron hacia un fenotipo neuronal por tratamiento con compuestos y medios que se sabe que inducen diferenciación neuronal (NIM).

30 Se sembraron células SHSY-5Y con 10.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se trataron de acuerdo con las condiciones citadas en la siguiente tabla 1. Después de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar GM1. La intensidad de la tinción, cantidad de muerte celular y otras observaciones se anotaron y resumieron. Los resultados se presentan en la tabla 1. El tratamiento de SHSY-5Y con medio NIM2 producía la tinción más intensa (5 signos más) y sin muerte celular (un signo menos). Los tratamientos con glucosamina y CLQ más A23187, un ionóforo de calcio, también produjeron una fuerte inducción de GM1 (4 mases) con algo de muerte celular en el grupo de CLQ más A23187. La CLQ sola mostró más tinción que las células tratadas con control.

35 Tabla 1: Inducción de GM1 en células SHSY-5Y por diferentes condiciones de tratamiento

Tratamiento	Tiempo	Intensidad de tinción	Muerte celular	Observaciones
Control		++	-	Tinción brillante en la membrana. Mayoritariamente uniforme
Glucosamina (0,5 mM)	48 h	++++	-	Más brillante, tinción uniforme. Una morfología más diferenciada con axones ramificados cortos
Cloroquina (50 uM)	24 h	+++	+	Acumulación vesicular de tinción observada dentro de las células
Cloroquina + A23187 (1 mM)	24 h + 30 min	++++	+	Acumulación vesicular + algunos parches brillantes en membranas
NIM (Neurobasal+B27+FGF, EGF+ RA)	48 h	+++++	-	Tinción brillante por todas partes, morfología diferenciada con axones cortos no ramificados
Cambio de sin glucosa a galactosa	24 h->48 h	++	-	Más axones, pero no hay aumento de la intensidad de la tinción

40 Las células de médula ósea de oveja afectada (SBM) se sembraron, con 20.000 células/pocillo, en placas de 24 pocillos y se trataron de acuerdo con las condiciones citadas en la siguiente tabla 2. Después de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar GM1. La intensidad de la tinción, cantidad de muerte celular y otras observaciones se anotaron y resumieron. Los resultados se presentan en la tabla 2. El tratamiento de células SBM con CLQ en medio NIM producía la tinción más intensa (4 signos más) y la mayor muerte celular (3 signos más). La CLQ sola también inducía GM1, pero no tanto como CLQ/NIM. Otras condiciones, medio exento de

suero, medio NIM(1), glucosamina y PDGF también indujeron GM1, pero en un grado menor.

Tabla 2: Inducción de GM1 en células de médula ósea de oveja afectada por diferentes tratamientos

Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Grado de tinción de GM1	Grado de muerte celular	Observaciones
Control		+	-	Población mixta. Algunas células son brillantes por todas partes. La mayoría se tiñen débilmente
Medio exento de suero	72 h	++	-	Mayor número de células más brillantes
NIM(1) (neurobasal+ b27+ EGF, FGF)	72 h	++	-	Algún cambio en morfología. Algunas células brillan. No hay diferencia significativa en general en tinción comparado con el control
NIM	72 h	++	-	Más células fusiformes. Las células alargadas finas son más brillantes. Pero en general no hay aumento significativo en la tinción.
Cloroquina	72 h	+++	+	Acumulación vesicular observada en la mayoría de las células. Algunas células son muy brillantes.
Cloroquina en NIM	72 h	++++	+++	La mayoría de las células murieron, pero las que sobreviven son muy brillantes por todas partes.
Glucosamina	72 h	++	-	Un aumento uniforme de la tinción perinuclear. Sitios de adhesión más destacados.
PDGF	72 h	++	-	Aumento de la tinción perinuclear y algunos parches brillantes en la membrana.
Cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina	6 días	+	-	Ligeramente más brillantes que las células desarrolladas en placa de 24 pocillos. Cambios transitorios observados en la morfología (fenotipo neuronal) en NIM

5 Las células de médula ósea humanas (HBM) se sembraron, con 20.000 células/pocillo, en placas de 24 pocillos y se trataron de acuerdo con las condiciones citadas en la siguiente tabla 3. Después de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar GM1. La intensidad de la tinción, cantidad de muerte celular y otras observaciones se anotaron y resumieron. Los resultados se presentan en la tabla 3. El tratamiento de células HBM con CLQ producía la tinción más intensa (5 signos más) y alguna muerte celular (2 signos más). A diferencia de las SBM, el tratamiento con NIM-CLQ produjo la muerte en la mayoría de las células. El medio exento de suero también inducía GM1, pero no tanto como la CLQ.

10

Tabla 3: Inducción de GM1 en células obtenidas de médula ósea humanas por diferentes tratamientos

Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Grado de tinción de GM1	Grado de muerte celular	Observaciones
Control		+	-	Población mixta. Algunas células son brillantes por todas partes. La mayoría se tiñen débilmente. Células más brillantes que las SBM
Medio exento de suero	72 h	++	-	Mayor número de células más brillantes
Cloroquina	48 h	+++++	++	Gran acumulación observada en la mayoría de las células. Muchas células parecen bipolares
Cloroquina en NIM	48 h		++++	La mayoría de las células murieron

Ejemplo 4

15 Se cultivaron células de neuroblastoma Neuro2A de ratón en medio de crecimiento estándar (DMEM F12 con alto contenido en glucosa, glutamina 2 mM, HEPES 25 mM más FBS al 10%). Las células se mantuvieron en medio de cultivo estándar (Ctrl) o se trataron durante 3 horas con neuraminidasa, 1 unidad/ml (Tratadas). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar el gangliósido GM1. Las imágenes de campo luminoso de los cultivos celulares antes de la fijación se muestran en los paneles A y C de la figura 4. Las imágenes fluorescentes que muestran la tinción positiva de GM1 se muestran en los paneles B y D de la figura 4. La tinción de GM1 es notablemente más fuerte en células Neuro2A de ratón después de tratamiento con neuraminidasa (compárese el panel B con D).

20

## Ejemplo 5

Se cultivaron hABM-SC en medio de crecimiento estándar (AMEM, FBS al 10%, glutamina 2 mM). Las células se mantuvieron en medio de cultivo estándar (Control) o se trataron durante 3 horas con neuraminidasa, 1 unidad/ml (Tratadas). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar el gangliósido GM1. Las imágenes fluorescentes que muestran la tinción positiva de GM1 se muestran en la figura 5. GM1 es más abundante en hABM-SC después de tratamiento con neuraminidasa y a menudo se ve como agregados grandes.

## Ejemplo 6

Se sembraron células de neuroblastoma Neuro2A de ratón con una alta densidad, mayor que 40.000/cm<sup>2</sup>, y se cultivaron en medio de crecimiento estándar (DMEM F12 con alto contenido en glucosa, glutamina 2 mM, HEPES 25 mM más FBS al 10%). Las células se mantuvieron en medio de cultivo estándar (Ctrl) durante 3 o 9 días. El medio se cambió cada 3 días. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar el gangliósido GM1. Las imágenes de campo luminoso de los cultivos celulares antes de la fijación se muestran en los paneles A y C. Las imágenes fluorescentes que muestran la tinción positiva de GM1 se muestran en los paneles B y D de la figura 6. Es evidente la extensa acumulación de GM1 en células Neuro2A de ratón mantenidas en cultivo de alta densidad a largo plazo, comparado con los niveles basales de GM1 en células mantenidas en cultivo a menor densidad durante 3 días o menos (compárese el panel B con D de la figura 6).

## Ejemplo 7

Se cultivaron células obtenidas de cerebro de oveja en medio de crecimiento estándar (AMEM, FBS al 10%, glutamina 2 mM). Las células se mantuvieron en medio de cultivo estándar durante 3 o 9 días. El medio se cambió cada 3 días. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar el gangliósido GM1. Las imágenes fluorescentes que muestran la tinción positiva de GM1 se muestran en los paneles B y D de la figura 7. Es evidente la extensa acumulación de GM1 en células obtenidas de cerebro de oveja mantenidas en cultivo de alta densidad a largo plazo, comparado con los niveles basales de GM1 en células mantenidas en cultivo a menor densidad durante 3 días o menos (compárese el panel B con D de la figura 7).

## Ejemplo 8

Se preparan diluciones de GM1 ovino purificado y se añaden (100 µl de cada dilución) a placas Nunc Maxisorp. Las placas se incuban durante la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavan y bloquean. Se añade CTB-HRP (75 µl por pocillo, 1:4000) y las placas se incuban durante 1 h a t.a. en la oscuridad. Las placas se lavan y después se añade reactivo ABTS (100 µl por pocillo). Se deja que se desarrolle el color verde. La reacción se detiene con 66 µl de solución de parada (SDS al 0,1% en PBS). La señal se lee en un lector de placa convencional. Los datos se representan gráficamente y la curva de referencia se muestra en la figura 8. El intervalo de sensibilidad es 3 ng - 0 ng.

## Ejemplo 9

Se preparan diluciones de GM1 ovino purificado y se añaden (100 µl de cada dilución) a placas Nunc Maxisorp. Las placas se incuban durante la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavan y bloquean. Se añade CTB-Alexa488 (1:200) y las placas se incuban durante 1 h a t.a. en la oscuridad. Las placas se lavan y la señal se lee en un lector de placa convencional. Después se añade SDS al 1% en PBS para solubilizar el GM1 durante 10-15 min. Las placas se leen de nuevo en el lector de placas, los datos se representan gráficamente y la curva de referencia se muestra en la figura 9. El intervalo de sensibilidad es 500 µg - 30 µg.

## Ejemplo 10

Se usó un aspirado de médula ósea de un solo donante humano para producir el banco de células primario, MCB105. La recogida de médula ósea la llevó a cabo Cambrex (Gaithersburg, MD) de acuerdo con Cambrex Bioscience Procedures. Se obtuvo un total de 124 ml de médula ósea de aspiraciones bilaterales del hueso pélvico posterior del donante usando procedimientos médicos estándar. El aspirado se puso en una bolsa de sangre estéril que contenía heparina y se puso en un recipiente de transporte con un registrador de temperatura y una compresa fría. El procesamiento se inició en el plazo de 4 horas de la donación de médula ósea.

## Procesamiento de la médula ósea

Todo el procesamiento aséptico del aspirado de médula ósea ocurrió en una cámara de seguridad biológica Clase 100. El aspirado se transfirió desde la bolsa de sangre a un recipiente estéril de 250 ml. Se midió el volumen del contenido de la bolsa de sangre y se separó una muestra del aspirado. Se añadieron 10 volúmenes de solución de ACK-LYS (BioSource International: NH<sub>4</sub>Cl [8,29 g/l], KHCO<sub>3</sub> [1,0 g/l], EDTA [0,037g/l]) al aspirado para la lisis de los glóbulos rojos. La suspensión se centrifugó para aislar las células nucleadas. El líquido sobrenadante se descartó y las células se volvieron a suspender con medio de crecimiento AFG104 (alpha-MEM con suero bovino fetal al 10% (v/v) y L-Glutamina 4 mM) y se lavó dos veces adicionales con medio de crecimiento por dilución y centrifugación.

Después de la etapa de lavado final, las células se volvieron a suspender en medio de crecimiento AFG104. Se separó una muestra de la suspensión después de lisis/lavado y se contaron las células nucleadas y se determinó la viabilidad. Las células mononucleares se aislaron del aspirado de médula ósea y se usaron para sembrar 5 recipientes de cultivo, fábricas de células Nunc Cell Factories, con  $60.000 \pm 2000$  células/cm<sup>2</sup> (3,79 x10<sup>8</sup> células por fábrica). Cada fábrica se complementó con un litro de medio de crecimiento AFG104. Las fábricas de células se incubaron en un incubador a 37°C y los cultivos se airearon con 5% de CO<sub>2</sub> y 4% de O<sub>2</sub>. Se controlaron en los cultivos dos veces al día signos de contaminación y se aseguró que las condiciones de cultivo del incubador estaban dentro de las especificaciones (37° ± 2°C, 4,0% ± 0,5% de O<sub>2</sub>, 5,0% ± 0,5% de CO<sub>2</sub>). Después de 7 días de crecimiento, se separó el medio de cada fábrica y se intercambié con medio de nueva aportación.

Los duplicados de población durante la primera expansión, que producían MCB105, se determinaron que eran 9,4 duplicados de población. MCB105 se cargó como partes alícuotas de 2 ml en crioviales, se conservaron de forma criogénica y se almacenaron a ±130°C en la fase de vapor del nitrógeno líquido. Se produjo el banco de células de trabajo 1 (WCB1) a partir de la expansión de MCB105. El WCB1 se expandió de 7,5 a 9,5 duplicados de población, produciendo duplicados de población acumulativos de 16,9 a 18,9. Las células recogidas se distribuyeron como partes alícuotas de 0,8 a 1 ml (10 a 20 millones de células viables por vial) en crioviales crioconservados y se almacenaron a ±130°C en la fase de vapor del nitrógeno líquido.

La expansión, criocongelación y procedimientos de ensayo se repitieron para WCB2 y WCB3. WCB2 y WCB3 se expandieron cada uno de 7,5 a 9,5 duplicados de población. Esta expansión da como resultado un duplicado de población acumulativo de 24,4 a 28,4 para WCB2 y un duplicado de población acumulativo de 31,9 a 37,9 para WCB3.

Los bancos de células primarios, bancos de células de trabajo (WCB1, WCB2, WCB3) y GBT009 se distribuyeron en partes alícuotas en crioviales, se crioconservaron y almacenaron a -130°C en la fase de vapor del nitrógeno líquido.

#### Sistema de banco de células

El sistema de banco de células consiste en 5 procedimientos diferentes de bancos de células: MCB105, WCB1, WCB2, WCB3 y GBT009. MCB105 era 9,4 duplicados. Cada WCB se expandió de 7,5 a 9,5 duplicados de población dando tres WCB sucesivos para alcanzar el número objetivo de duplicados de población para GBT009. Por lo tanto MCB105 se expandió de 37,5 a 47,5 duplicados de población acumulativos.

Los sistemas de bancos de células permiten la generación de nuevos lotes de WCB1, WCB2, WCB3 y GBT009 a partir de MCB105 cuando un banco queda agotado. Por ejemplo, un WCB2 agotado, lote n° S1, se puede regenerar como lote n° S2 por expansión de un vial a partir del mismo lote de WCB1, lote n° F1-5, usado para producir S1. El banco se descongela y sigue el mismo procedimiento de expansión y duplicados de población. Este proceso de expansión es el mismo para el establecimiento de todos los bancos de células de trabajo. El banco WCB3 actual, lote n° T2, después de agotamiento se reproducirá como lote n° T3 usando el mismo WCB2 que se usó para producir el lote n° T2. Esta metodología permite la producción repetida de WCB1, WCB2, WCB3 y viales del producto final, GBT009, números de lote P5, P6, P7, etc. Este procedimiento permite un grado alto de reproducibilidad, consistencia y calidad en el proceso de fabricación y el producto celular. Todos los bancos de células se almacenan y la fase de vapor de nitrógeno líquido (≤ -130°C).

Después de 5 días de incubación adicional (12 días después de la siembra), la recogida de colonias adherentes se acompañó de tripsinización. Se separó el medio condicionado de los cultivos y se llevó a cabo el ensayo por cultivo de fluido microbiano (no desarrollado) y de micoplasmas (no detectado). Mientras las células estaban unidas a las fábricas de células, se lavaron con 500 ml de dPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio o magnesio). La solución se separó y se descartó como residuo. Se añadió tripsina-EDTA para disociar las células de las fábricas. Las células se transfirieron a un recipiente estéril y la tripsina-EDTA se neutralizó por adición de un volumen de medio de crecimiento AFG104 igual al volumen de células tripsinizadas. La suspensión de células se centrifugó y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en medio de crecimiento.

Se tomó muestra de cada suspensión de células resuspendida y se llevó a cabo el ensayo de recuento celular, viabilidad y pureza. Tras la aceptación de los resultados de ensayo durante el proceso, se mezclaron las suspensiones de células. Se tomó muestra de la suspensión mezclada y se llevó a cabo el ensayo de recuento celular, viabilidad, pureza e identidad. Después la suspensión se centrifugó y el líquido sobrenadante se decantó y se descartó. El sedimento celular se volvió a suspender en tampón de crioconservación, CSM-55 (medio de almacenamiento criogénico compuesto de solución salina equilibrada, dextrosa al 4,5% en p/v, USP, con dimetilsulfóxido al 5% en v/v, USP, y albúmina de suero humana al 5% en v/v, USP). El volumen de CSM-55 estaba dado por el recuento de células de la suspensión. Se añadió CSM-55 para alcanzar una concentración de un millón de células por ml. Después de volver a suspender las células en CSM-55, se tomó muestra de la suspensión para confirmar el número de células, viabilidad, pureza e identidad antes de la crioconservación.

Dentro de la cámara de seguridad biológica clase 100, se cargaron manualmente 259 viales de MCB105 usando técnicas asépticas. Cada vial de 5 ml contenía 2 ml de suspensión de células CSM-55. Durante la operación de carga, se llevaron a cabo comprobaciones de peso cada 30 viales cargados para hacer el seguimiento de la

uniformidad en la operación de carga de viales, y no se observaron discrepancias respecto al volumen objetivo (de 1,8 a 2,2 ml). Tras completarse las operaciones de carga de viales, los viales se congelaron usando un congelador de velocidad controlada. La suspensión de células se enfrió de temperatura ambiente a 4°C. Una vez equilibrados los viales a 4°C, se bajó la temperatura gradualmente a -120°C y se mantuvieron a esta temperatura hasta retirarlos para el almacenamiento permanente. Los viales de MCB105 se almacenaron en la fase de vapor del almacenamiento con nitrógeno líquido (-130°C). Los tanques de almacenamiento tienen acceso restringido.

Preparación de los bancos de células de trabajo (WCB1, WCB2, WCB3)

El procedimiento de fabricación implicaba la producción secuencial de tres WCB. Cada banco de células sucesivo se derivó de una parte alícuota de células crioadmacenadas del banco previo, es decir, MCB105 → WCB1 → WCB2 → WCB3. Todas las manipulaciones del cultivo se llevaron a cabo en una cámara de seguridad biológica clase 100 con un programa de control ambiental activo. La producción de cada banco de células se inició por la descongelación de las células del banco de células precedente adecuada. Se retiró una parte alícuota de células de MCB105 del almacenamiento criogénico, se descongeló y se volvió a suspender en medio de crecimiento AFG104 creando una suspensión madre de células. Se retiró una muestra de la solución madre y se realizó el ensayo de número de células y viabilidad. Los recipientes de cultivo, fábricas de células Nunc, usados para cada banco de células de trabajo se sembraron con  $30 \pm 5$  células por  $\text{cm}^2$  y se cultivaron usando medio de crecimiento AFG104. Las fábricas de células se incubaron en un incubador a 37°C y los cultivos se airearon con 5% de  $\text{CO}_2$  y 4% de  $\text{O}_2$ . Después de 7 días de crecimiento, los medios se retiraron de cada fábrica y se cambiaron por medio de nueva aportación. Se ensayó en los medios condicionados el cultivo de fluido microbiano. Las fábricas se incubaron durante un periodo de tiempo adicional para lograr un duplicado de población de 7,5 a 9,5 duplicados.

El aislamiento (recogida) de colonias adherentes se llevó a cabo por tripsinización. Se retiraron los medios condicionados del cultivo y se llevó a cabo el ensayo de esterilidad por cultivo de fluido microbiano y de micoplasmas. Mientras las células estaban unidas al recipiente de cultivo, las células se lavaron con dPBS. La solución se separó y se descartó como residuo. La separación de las células se llevó a cabo por adición de tripsina-EDTA al cultivo y dejando que las células se disociaran del recipiente de cultivo. Las células se transfirieron a un recipiente estéril y la tripsina-EDTA se neutralizó por adición de medio de crecimiento AFG104 a las células tripsinizadas. La suspensión de células se centrifugó y se volvió a suspender en medio de crecimiento. Se tomaron muestras de la suspensión de células resuspendida de cada fábrica de células y se sometieron a ensayos durante el procedimiento (recuento de células, viabilidad y pureza). Las suspensiones de células de las fábricas individuales cumplen los criterios de aceptación antes de combinarlas en una suspensión de células mezclada. Cuando las suspensiones de células se combinaron, se tomó muestra de la suspensión mezclada para confirmar el número de células, viabilidad, pureza e identidad. La suspensión después se centrifugó. Después de centrifugación, se decantó el líquido sobrenadante y el sedimento celular se volvió a suspender en tampón de crioconservación, CSM-55, para alcanzar una concentración de hasta 20 millones de células por ml. Se tomó muestra de nuevo de la suspensión para confirmar el número de células, viabilidad, pureza e identidad. Los viales se cargaron de forma manual y aséptica en una cámara de seguridad biológica clase 100 en partes alícuotas de  $1,0 \pm 0,2$  ml en crioviales de polipropileno de 2 ml Corning. Se llevaron a cabo comprobaciones de peso cada 25 viales para el seguimiento de la uniformidad en la operación de carga de viales. Tras completarse las operaciones de carga de viales, los viales se congelaron usando un congelador de velocidad controlada. La suspensión de células se enfrió de temperatura ambiente a 4°C y después se bajó la temperatura gradualmente a  $\pm 120^\circ\text{C}$  y se mantuvieron a esta temperatura hasta retirarlos para el almacenamiento en la fase de vapor del almacenamiento con nitrógeno líquido ( $\pm 130^\circ\text{C}$ ).

Ejemplo 11

Se adquirieron de fuentes comerciales células de estroma obtenidas de médula ósea humanas, células de estroma obtenidas de tejido adiposo, fibroblastos dérmicos y fibroblastos de sujetos diagnosticados con gangliosidosis GM1, así como células de neuroblastoma inmortalizadas (SHSY-5Y, SHSY-S y SK-N-AS), células de ovario de hámster chino (CHO-K1), y células de riñón embrionarias humanas (HEK293). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos en medio de cultivo convencional, con una densidad de 2000-20.000 células/pocillo durante la noche y se mantuvieron en medio de cultivo estándar (CONTROL) o se trataron con cloroquina (CLQ) de acuerdo con las condiciones citadas en la siguiente tabla 4. Las células se mantuvieron en un incubador de cultivo tisular a aproximadamente 37°C en una atmósfera humidificada que comprendía aproximadamente 5% de  $\text{CO}_2$  y aproximadamente 21% de  $\text{O}_2$  siendo el resto  $\text{N}_2$ . Después de tratamiento durante 48-120 horas, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con CTB-Alexa488 para detectar el gangliósido GM1. Se muestran imágenes de fluorescencia que muestran la tinción positiva de GM1 en las figuras 10 y 11. La acumulación extensiva de GM1 es evidente en la mayoría de los tipos de células comparada con los controles mantenidos en medio de cultivo estándar solo. (Figuras 10 y 11 y tabla 4).

Tabla 4. Inducción de GM1 en diferentes tipos de células por tratamiento con CLQ

Tipo de célula	Formulación del medio	Densidad de siembra (por pocillo)	% Aumento del grado de tinción con inducción
SHSY-5Y	MEM/F-12 + FBS 10%	20.000	104
SHSY-S	EMEM/F-12 + NEAA 1% + L-glutamina 2 mM + FBS 15%	20.000	19
SK-N-AS	DMEM + NEAA 0,1 mM + FBS 10%	20.000	19
CHO-K1	F-12K + FBS 10%	20.000	83
HEK293	EMEM + FBS 10%	20.000	15
GBT-ABMSC	Alfa-MEM + FBS 10%	20.000	65
BMSC Lonza	medio basal MSC Lonza + complementos de crecimiento	10.000	119
ADSC	medio basal ADSC Lonza + complementos de crecimiento	10.000	28
Fibroblasto dérmico	Medio basal de fibroblastos Lonza + complementos	7000	63
fibroblasto GM1	EMEM + FBS 15%	20.000	28

## Ejemplo 12

Una oveja normal y una afectada (gangliosidosis GM1 ovina), aproximadamente 4 meses de edad, se sacrificaron en la Holler Farm en Dakota del sur. Se recogió una cuchara de 5-10 ml de médula ósea del fémur de cada animal y se puso en tubos cónicos de 50 ml estériles etiquetados por separado. Los tubos se llenaron con solución de transporte (Hibernate A de Brain Bits, 1X Penicilina/ Estreptomicina de Invitrogen). Las muestras se transportaron sobre hielo a Malvern, Pennsylvania en menos de 24 horas. Tras la recepción se limpió el exterior de los tubos y se transfirieron a una cámara de bioseguridad estéril. La solución de transporte se decantó y se añadieron 25 ml de solución tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) a cada médula ósea. De forma suave y repetida las soluciones de médula ósea/DPBS se trituraron para crear una suspensión celular. Cada suspensión celular se dividió en 2 tubos de centrifuga estériles de 500 ml (Corning Life Sciences). Se añadieron a cada tubo de centrifuga 150 ml de solución de lisis ACK (Invitrogen). Las soluciones se mezclaron mediante pipeteo de las suspensiones celulares hacia arriba y hacia abajo 10-20 veces. Se cerró cada uno de los tubos y se agitaron con vórtice durante 2 segundos. Las suspensiones celulares se centrifugaron durante 10 minutos a 1350±50 rpm con freno bajo usando una centrifuga Allegra 6R y tolvas de vaivén. Se aspiró el líquido sobrenadante de cada muestra y se descartó. Cada sedimento celular que quedaba se volvió a suspender en 10 ml de medio de crecimiento AFG104 (AMEM, suero bovino fetal al 10%, glutamax 4 mM, 1X penicilina/ estreptomicina, 1X Gentamicina). Las 2 suspensiones celulares de médula ósea de oveja normal se combinaron en un tubo cónico estéril de 50 ml. Las 2 suspensiones de células de la médula ósea de oveja afectada se combinaron en un tubo cónico estéril de 50 ml separado. Se añadió medio de crecimiento AFG104 a cada suspensión celular hasta un volumen final de 40 ml. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1350 ± 50 rpm con freno bajo usando una centrifuga Allegra 6R y tolvas de vaivén. Los líquidos sobrenadantes se descartaron. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender por separado en 20 ml de medio de crecimiento AFG104. El volumen se ajustó a 40 ml con más medio de crecimiento AFG104. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1350 ± 50 rpm con freno bajo usando una centrifuga Allegra 6R y tolvas de vaivén. Los líquidos sobrenadantes se descartaron y cada sedimento se volvió a suspender en un volumen final de 30 ml de medio de crecimiento AFG104. Se determinó para cada muestra el número total de células y la viabilidad. Las células se sembraron con 60.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T225 en medio de crecimiento AFG104. Las células se cultivaron en un incubador humidificado ajustado a 4% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Los cultivos se alimentaron con medio de crecimiento AFG104 reciente el día 5 y se recogieron el día 8 (células obtenidas de médula ósea de oveja normal) o el día 9 (células obtenidas de médula ósea de oveja afectada). La primera recogida se definió como pase 1 (P1) o banco de células primario (MCB). Se crioconservó una parte de las células. Las células restantes se sembraron con 60 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 5 días en medio de crecimiento AFG104 en incubador humidificado ajustado a 4% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Se alimentaron el día 5 con medio de crecimiento AFG104 y se recogieron el día 9 (células obtenidas de médula ósea de oveja normal) o el día 8 (células obtenidas de médula ósea de oveja afectada). La siguiente recogida se definió como pase 2 (P2) o banco de células de trabajo 1 (WCB1). Se crioconservó una parte de las células. Las células restantes se sembraron con 60 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 5 días en medio de crecimiento AFG104 en incubador humidificado ajustado a 4% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Se alimentaron el día 5 con medio de crecimiento AFG104 y se recogieron el día 10 (células obtenidas de médula ósea de oveja normal). Esta recogida siguiente se definió como pase 3 (P2) o banco de células de trabajo 2 (WCB2). El tiempo de duplicado para las células obtenidas de médula ósea de oveja normal era 22,14, 23,03 y 26,71 horas para MCB, WCB1 y WCB2 respectivamente. El tiempo de duplicado para las células obtenidas de médula ósea de oveja afectada eran 22,19, 22,77 y 26,31 horas para MCB, WCB1 y WCB2 respectivamente. Los duplicados de cultivo por pase eran 8,67, 9,38 y 8,09 para las células obtenidas de médula ósea de oveja normal en MCB, WCB1 y WCB2 respectivamente. Los duplicados de cultivo por pase eran 89,73, 8,43 y 8,21 para las células obtenidas de médula ósea de oveja afectada en MCB, WCB1 y WCB2 respectivamente.

Hay que indicar que es la sección de descripción detallada, y no las secciones de sumario y resumen, las que deben usarse para interpretar las reivindicaciones. Las secciones de sumario y resumen pueden exponer una o varias pero no todas las realizaciones de ejemplo de la presente invención como la contemplan los autores de la invención, y por lo tanto, no se pretende que limiten la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna forma.

5 La presente invención se ha descrito antes con ayuda de bloques estructurales funcionales que ilustran la implementación de funciones específicas y sus relaciones. Los límites de estos bloques estructurales funcionales se han definido arbitrariamente para la conveniencia de la descripción. Se pueden definir límites alternativos siempre que las funciones específicas y sus relaciones se realicen adecuadamente.

10 La descripción anterior de las realizaciones específicas pondrá de manifiesto completamente la naturaleza general de la invención que, aplicando el conocimiento del experto en la técnica, otros podrán modificar y/o adaptar fácilmente para diferentes aplicaciones tales como realizaciones específicas, sin excesiva experimentación, sin salirse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones se pretende que estén dentro del significado y el intervalo de equivalentes de realizaciones descritas, basándose en la enseñanza y guía presentadas en el presente documento. Debe entenderse que las expresiones o terminología de la presente memoria tiene fines de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o expresiones de la presente memoria descriptiva debe interpretarse el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas y la guía.

15 La amplitud y alcance de la presente invención no debe estar limitada por ninguna de las realizaciones de ejemplo descritas antes, sino que debe estar definida solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Ejemplo 13

20 Los siguientes datos de comparación entre GM1 bovino y ovino se generaron mediante el ensayo de materiales de investigación de GM1 disponibles en el mercado (Avanti & Matreya) y material GM1 fabricado por Fidia. Fidia fabricó el mismo material que se usó en ensayos clínicos precios. Todos los ensayos se llevaron a cabo en un entorno de R&D (Equipamiento no GMP/Métodos de ensayo no validados). El trabajo analítico hasta la fecha se llevó a cabo durante el desarrollo de un producto de fármaco GM1 derivado de ovino.

25 Se desarrolló un método de HPLC para determinar las cantidades relativas de las variantes individuales de moléculas de GM1. Los resultados indican que las moléculas de GM1 difieren en la longitud de las cadenas de alquilo que comprenden grupos de cola no polares de cada molécula de GM1. Los resultados del perfil de variación de GM1 se presentan en la siguiente tabla 5. También se observó que en todos los lotes ensayados dos variantes son las dominantes y componen más de 80% de las variantes de GM1 presentes. Estas son las variantes d18:1 C18:0 y d20:1 C18:0.

Tabla 4: Distribución de las especies de GM1 individuales

Proveedor	Lote	Fuente	Número de pico ID provisional	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Avanti	GM1-16	Ovino		ND	ND	0,28	ND	1,08	2,73	ND	0,72	ND	58,20
Fidia	Desconocido	Bovino		0,29	ND	0,18	ND	0,71	0,29	ND	0,75	ND	33,62
Matreya	23012	Bovino		ND	0,81	ND	0,70	0,85	1,91	0,57	0,53	0,3	48,58

Proveedor	Lote	Fuente	Número de pico ID provisional	11	12	13	14		16	17	18	19	20
				AD	AD	d20:1 C18:0	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Avanti	GM1-16	Ovino		2,90	1,22	29,32	1,82	0,11	1,20	0,43	ND	ND	ND
Fidia	Desconocido	Bovino		2,45	2,26	52,65	3,20	0,54	1,43	0,52	0,49	0,5	0,11
Matreya	23012	Bovino		3,10	1,57	36,11	1,87	0,59	1,46	0,26	0,45	0,31	ND

Valores de ensayo = % de área por HPLC

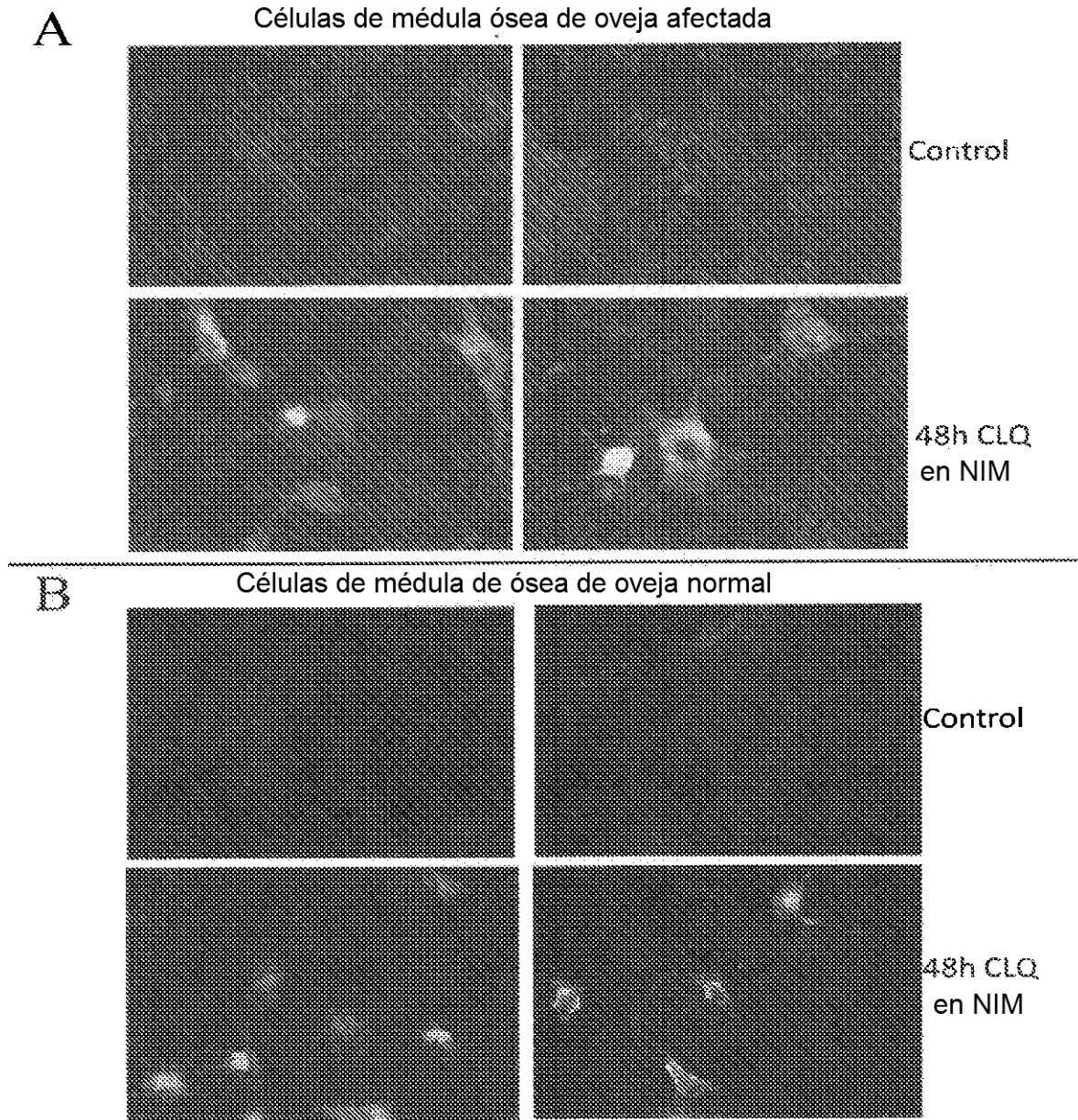
AD = A determinar

ND = No detectado



**REIVINDICACIONES**

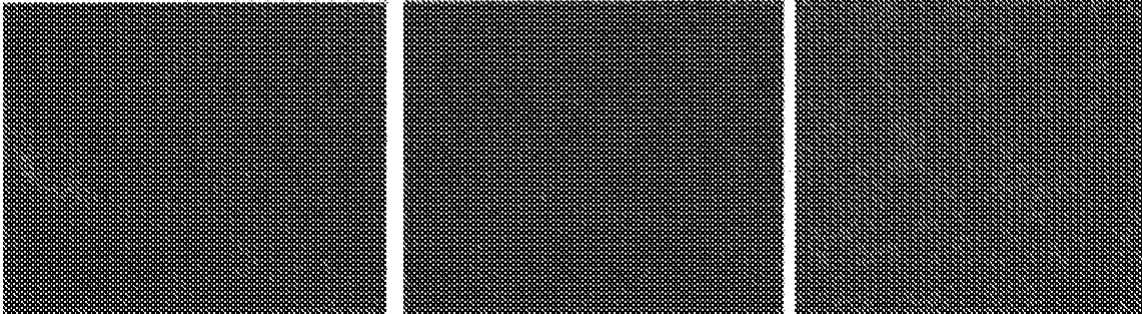
- 1.- Un método in vitro de producción de un gangliósido en una célula, en donde dicho gangliósido es GM1, que comprende:
- (a) tratar dicha célula con cloroquina para acumular dicho gangliósido;
- 5 (b) aislar dicho gangliósido, cuantificar dicho gangliósido, o ambos, de dicha célula tratada con cloroquina; en donde dicha célula es una célula de médula ósea humana o una célula de neuroblastoma: en donde dicha célula no es una célula PC 12, una célula HT22, una célula de cerebro de una oveja afectada de gangliosidosis.
2. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde dicha célula es una célula de neuroblastoma.
- 10 3. El método in vitro de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha célula de neuroblastoma se selecciona del grupo que consiste en SHSY-5Y, SHSY-S y SK-N-AS.
4. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde dicha célula es una célula de médula ósea humana.
5. El método in vitro de la reivindicación 1 o 4, en donde dicha célula de médula ósea humana es una célula de estroma.
- 15 6. El método in vitro de la reivindicación 4 o 5, en donde dicha célula humana se produce por métodos de cultivo de baja densidad y bajo contenido de oxígeno.
7. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde dicha célula produce de 15 a 125 por ciento más de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina,
- 20 en donde opcionalmente dicha célula produce 15, 19,28, 63, 65, 83, 104 o 119 por ciento más de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina, en donde además opcionalmente dicha célula produce 65 por ciento más de gangliósido que una célula que no se ha tratado con cloroquina.
8. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde dicho (a) tratamiento de células de médula ósea humanas con cloroquina, comprende pone en contacto dichas células de médula ósea humanas con cloroquina entre 5 y 100 micromolar, o
- 25 en donde dicho (a) tratamiento de células de médula ósea humanas con cloroquina comprende poner en contacto dichas células de médula ósea humanas con cloroquina durante entre 5 a 72 horas.
9. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde dicha célula de médula ósea humana está afectada de gangliosidosis GM1.
- 30



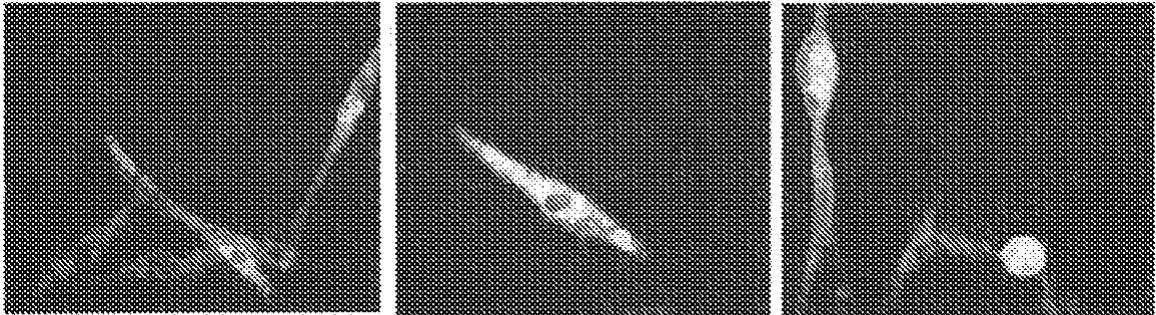
**FIG. 1**

Células de médula ósea humanas normales

Control



CLQ en MEM durante 48 horas



**FIG 2**

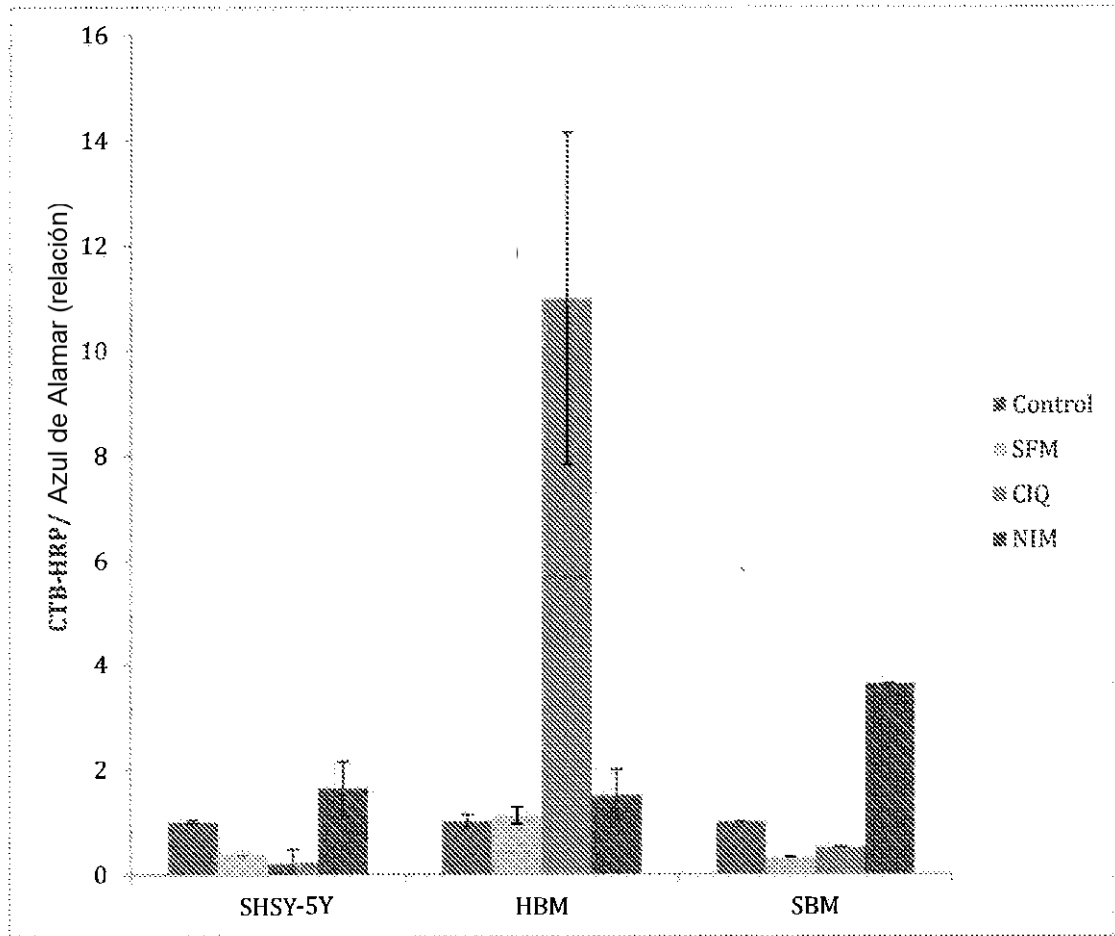
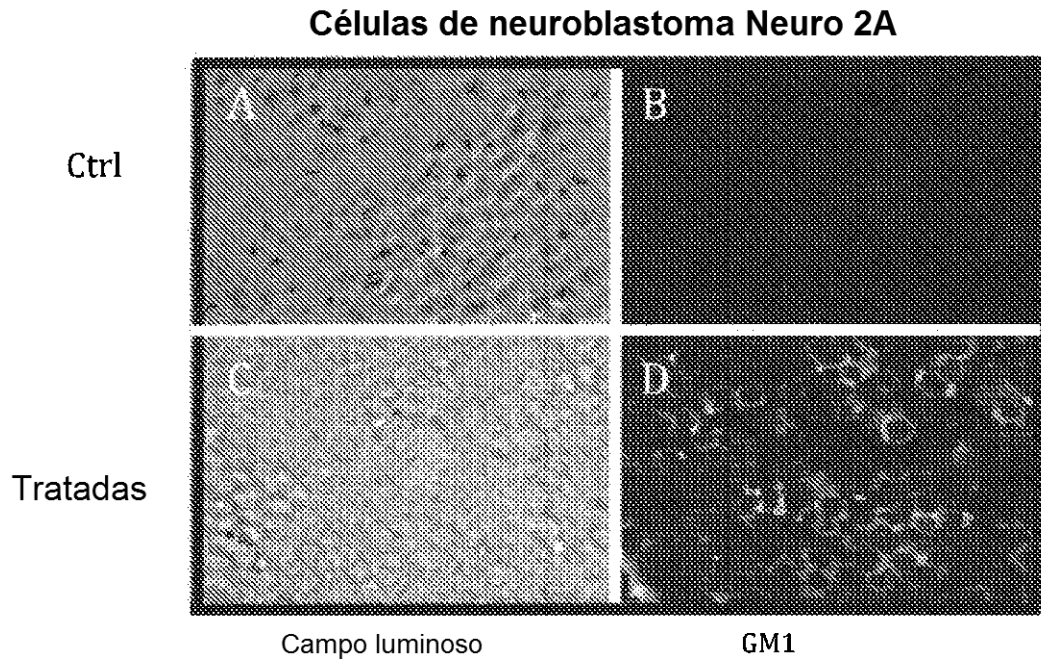
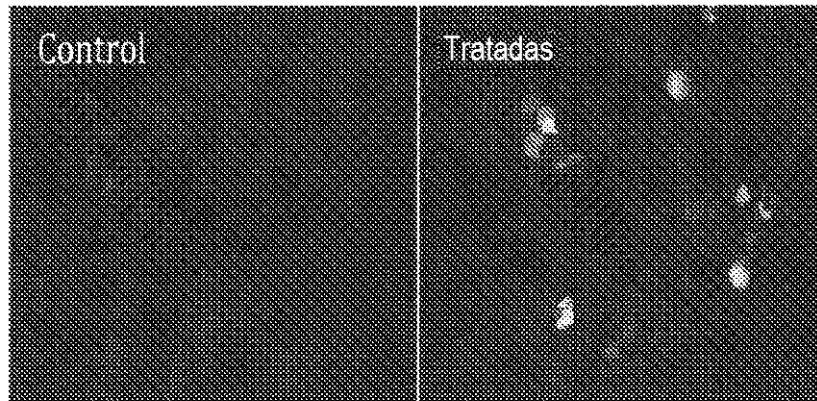


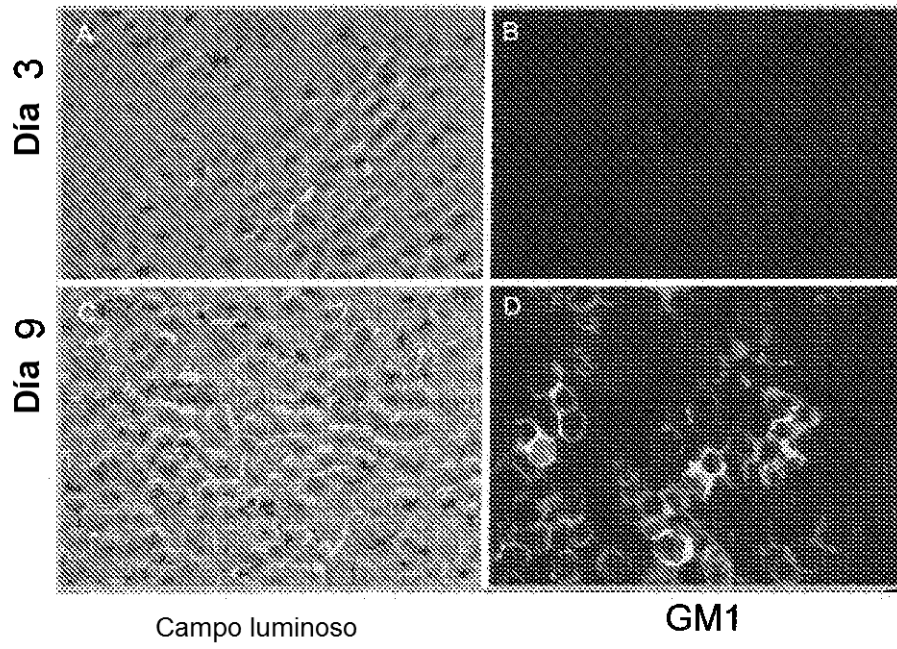
FIG. 3



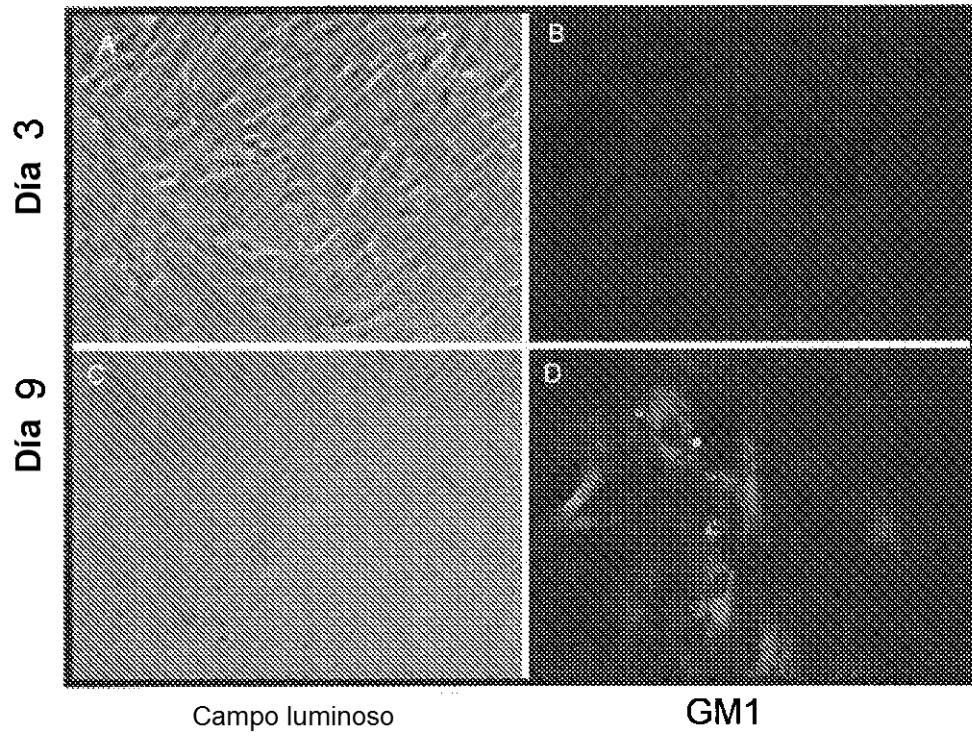
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



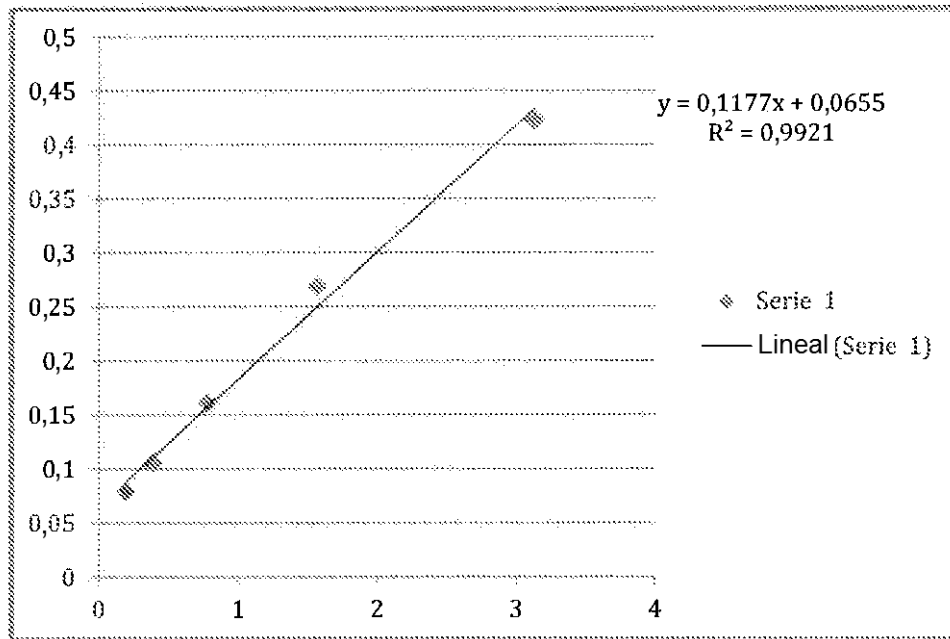
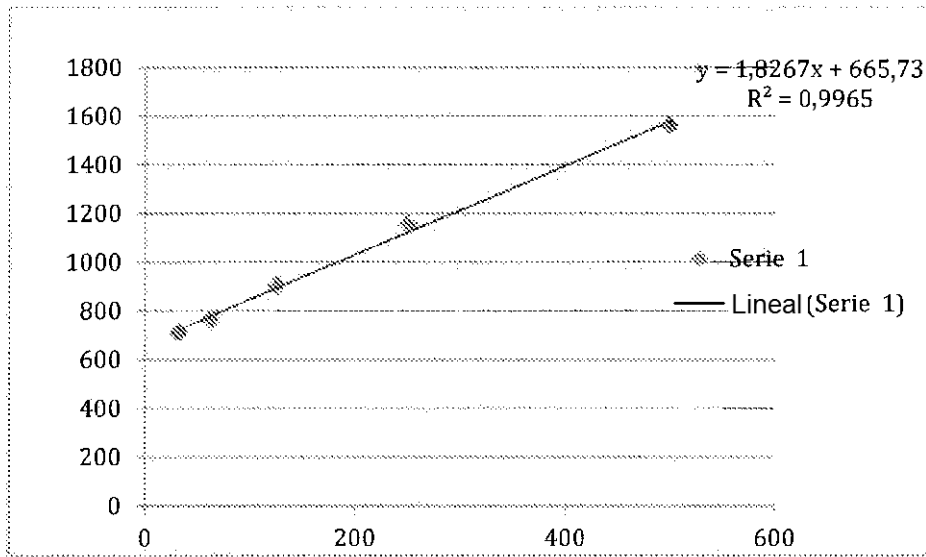


FIG. 8



**FIG. 9**

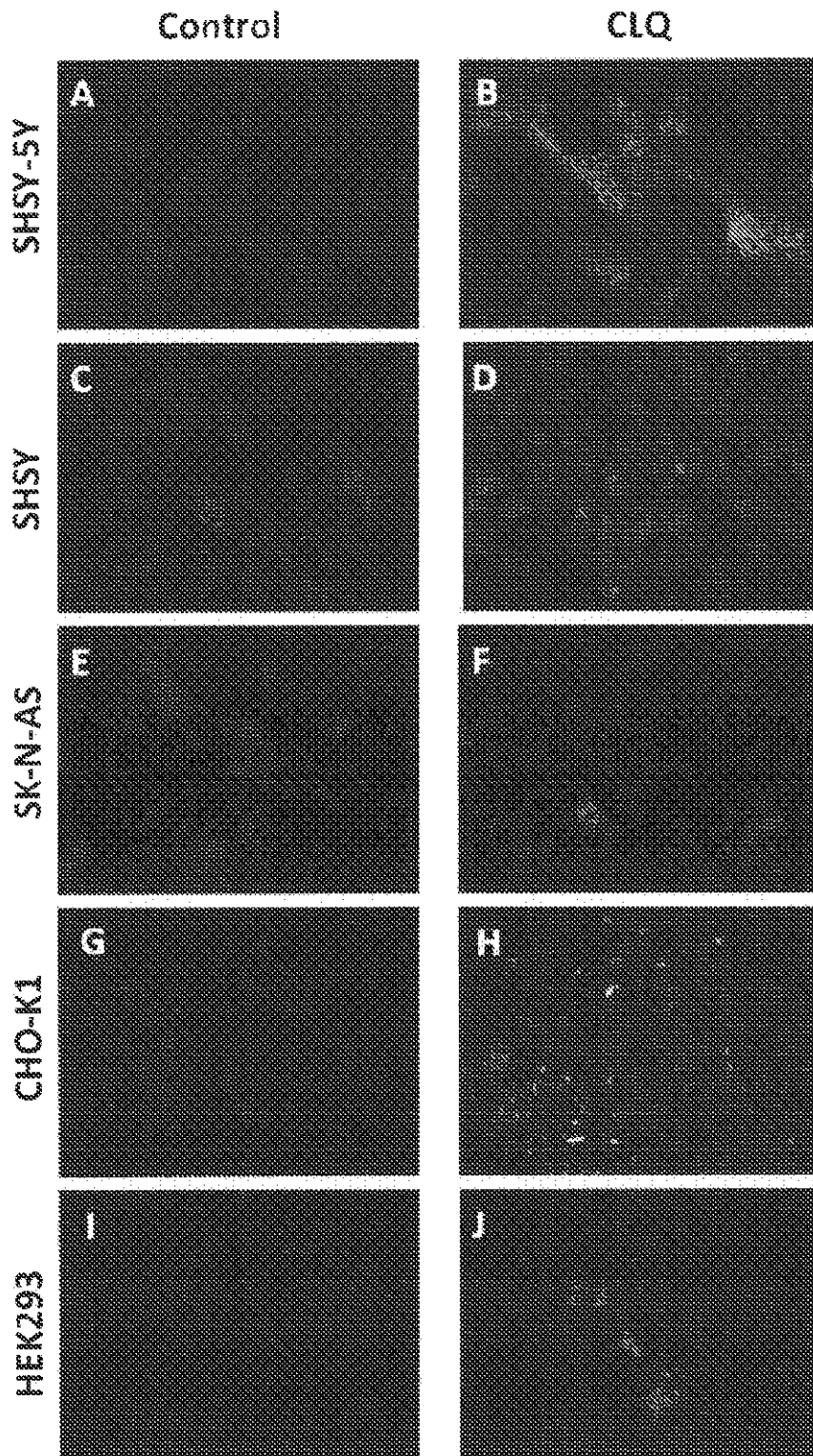


FIG. 10

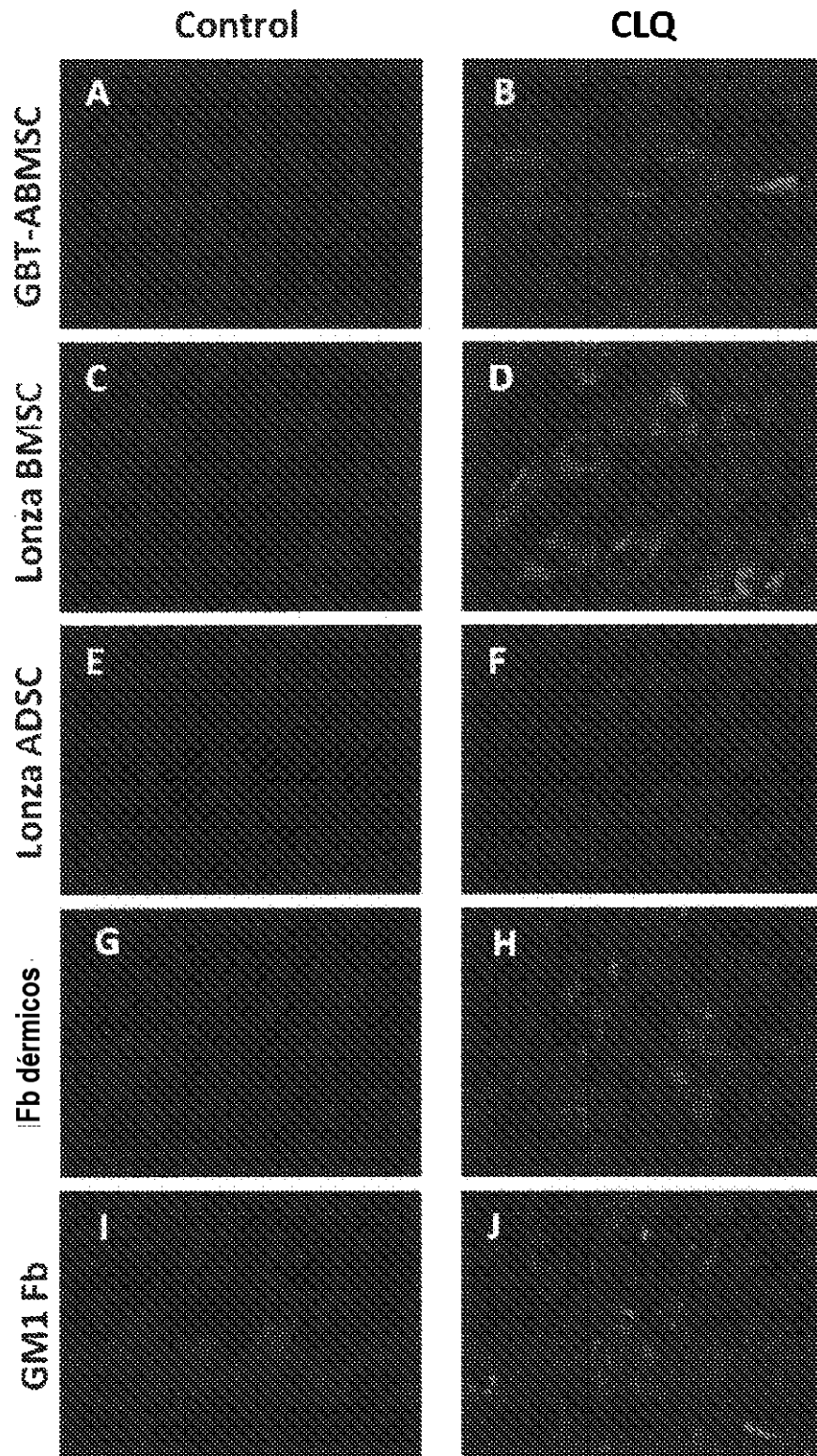


FIG. 11