(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 739 811**

(51) Int. CI.:

A61K 38/43 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
A61K 38/50 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026481**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160390**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14775400 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2968479**

(54) Título: **Composiciones terapéuticas de ceramidasa ácida y métodos de fabricación y uso de ellas**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361784594 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2020

(73) Titular/es:

ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI (100.0%)
One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US

(72) Inventor/es:

SCHUCHMAN, EDWARD, H.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Composiciones terapéuticas de ceramidasa ácida y métodos de fabricación y uso de ellas

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con composiciones terapéuticas de ceramidasa ácida y métodos de fabricación y uso de ellas.

Antecedentes de la Invención

Debido a su participación en el trastorno genético humano, la lipogranulomatosis de Farber ("FD"), la ceramidasa ácida ("AC"; *N*-acilesfingosina deacilasa, Enzima IUBMB núm. EC 3.5.1.23) es el miembro más ampliamente estudiado de la familia de enzimas ceramidasas. La proteína se ha purificado de varias fuentes, y se han obtenido los ADNc y los genes de humanos y de ratón (Bernardo y otros, "Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 270:11098-102 (1995); Koch y otros, "Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. Identification of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease," J. Biol. Chem. 2711:33110-5 (1996); Li y otros, "Cloning and Characterization of the Full-length cDNA and Genomic Sequences Encoding Murine Acid Ceramidase," Genomics 50:267-74 (1998);Li y otros, "The Human Acid Ceramidase Gene (ASAH): Chromosomal Location, Mutation Analysis, and Expression," Genomics 62:223-31 (1999)). El creciente interés en la biología de esta y otras ceramidasas se debe al hecho de que estas enzimas desempeñan un papel central en el metabolismo de las ceramidas.

La ceramida es un lípido de señalización que se produce en respuesta a diversos estímulos y factores extrínsecos, que incluyen la privación de suero y el tratamiento con muchos medicamentos de quimioterapia, así como también en muchas enfermedades humanas (Hannun, "Function of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress," Science 274: 1855-9 (1996); Spiegel y otros, "Signal Transduction Through Lipid Second Messengers," Curr. Opin. Cell. Biol. 8: 159-67 (1996)). Dentro de las células, la ceramida puede influir en el crecimiento y la diferenciación, regular la secreción de proteínas, inducir la fragmentación del ADN y la apoptosis, y aumentar la síntesis y la secreción de citoquinas. Normalmente presente en cantidades bajas, en respuesta a estos factores, la ceramida se produce rápidamente en la superficie celular, lo que lleva a una reorganización de la membrana y una señalización derivada que resulta en apoptosis. Después de la estimulación, la AC y/u otras ceramidasas pueden hidrolizar la ceramida en los componentes individuales de ácidos grasos y esfingosina (Gatt, "Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramide", J. Biol. Chem. 238: 3131-3 (1963);Gatt, "Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids. 1. Hydrolysis and Synthesis of Ceramides by an Enzyme from Rat Brain," J. Biol. Chem. 241: 3724-31 (1966);Hassler & Bell, "Ceramidase: Enzymology and Metabolic Roles," Adv. Labio. Res. 26: 49-57 (1993)). Debido a que la degradación de la ceramida es la única fuente de esfingosina intracelular (Rother y otros, "Biosynthesis of Sphingolipids: Dihydroceramide and Not Sphinganine Is Desaturated by Cultured Cells," Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 14-20 (1992)), estas enzimas pueden ser también de etapas limitantes por la velocidad en la determinación de los niveles intracelulares de este compuesto. Es importante destacar que un derivado de la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato ("SIP"), puede contrarrestar los efectos apoptóticos de la ceramida (Cuvillier y otros, "Suppression of Ceramide-mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-phosphate," Nature 381: 800-3 (1996)), lo que conduce a la sugerencia de que las ceramidasas pueden ser "reóstatos" que mantienen un equilibrio adecuado entre el crecimiento y la muerte celular (Spiegel & Merrill, "Sphingolipids Metabolism and Cell Growth Regulation," FASEB J. 10: 1388-97 (1996)).

La AC hidroliza el enlace amida que une las porciones de esfingosina y ácido graso de la ceramida lipídica (Park y Schuchman, "Acid Ceramidase and Human Disease," Biochim. Biofis Acta. 1758 (12): 2133-2138 (2006)). La ceramida, la esfingosina (y su derivado fosforilado S1P) son lípidos bioactivos y, por lo tanto, la actividad de la AC se debe regular cuidadosamente en las células (Young y otros, "Sphingolipids: Regulators of Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy," J. Lipid Res. 54:5-19 (2013). Un mecanismo importante mediante el cual se regula la actividad de AC es la escisión del polipéptido precursor inactivo en la enzima activa que consiste en una subunidad alfa y beta unidas a través de enlaces disulfuro (Shtraizent y otros, "Autoproteolytic Cleavage and Activation of Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 283: 11253-11259 (2008)). Se ha demostrado anteriormente que la AC recombinante producida en células de ovario de hámster chino ("CHO") y secretada en el medio es una mezcla de precursor inactivo y enzima activa (escindida)He y otros, "Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 278: 32978-32986 (2003)).

La presente invención se dirige a superar estas y otras deficiencias de la técnica.

Resumen de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición terapéutica que incluye una mezcla de ceramidasas y un portador farmacéuticamente aceptable. La mezcla de ceramidasas incluye un precursor de ceramidasa ácida inactiva y una ceramidasa ácida activa, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad detectable de esfingomielinasa ácida.

Se describe además un método de tratamiento con ceramidasa ácida, el método incluye formular la ceramidasa ácida usada en dicho tratamiento como una mezcla de ceramidasas, donde la mezcla de ceramidasas incluye un precursor de ceramidasa ácida activa y una ceramidasa ácida activa.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir una composición terapéutica. El método incluye proporcionar un medio que contenga un precursor de ceramidasa ácida activa e incubar el medio en condiciones efectivas para transformar una porción del precursor de ceramidasa ácida activa en ceramidasa ácida activa a través de escisión autoproteolítica, en donde dicha incubación se lleva acabo a un pH de 4 a 6,5 y una temperatura de 30 °C, 35 °C o 37 °C durante 3 horas, y comprende además calentar dicho medio en condiciones efectivas para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida. El medio incubado se recupera como una mezcla de ceramidasas recombinantes que comprende el precursor de ceramidasa ácida activa y una ceramidasa ácida activa, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad detectable de esfingomielinasa ácida.

La presente invención describe una composición óptima de AC recombinante (rAC). La presente invención describe además el nuevo hallazgo de que, contrariamente a lo esperado, la forma completamente activa de la enzima no es la mejor forma para promover la supervivencia celular. Más bien, las preparaciones de rAC purificadas con mayores cantidades de precursor de ceramidasa ácida activa frente a AC activa procesada son más efectivas para promover la supervivencia celular y/o mejorar el fenotipo celular. Se obtuvieron dos preparaciones de AC recombinante que contenían diferentes proporciones de precursor y enzima activa. Después se usaron para evaluar los efectos sobre la supervivencia de los ovocitos en cultivo. Contrario a lo esperado, la preparación que contiene una mayor proporción de precursor inactivo tuvo un mayor efecto sobre la supervivencia celular. Se plantea la hipótesis de que esto se debe al hecho de que la enzima completamente activa tiene una vida media más corta en las células y en los medios de cultivo celular. Las mismas dos preparaciones se probaron con el uso de condrocitos primarios cultivados. Al igual que con los ovocitos, la preparación de AC recombinante con menos de la forma activa tuvo un mayor efecto sobre la expresión de colágeno 2, un marcador de condrogénesis.

La rAC se encuentra en uso experimentalmente en varios sistemas celulares y modelos animales para retardar la muerte celular relacionada con la ceramida y/o mejorar el fenotipo de las células usadas para el trasplante de células. Además se encuentra en estudio en varios modelos de enfermedad. La presente invención describe la preparación óptima de rAC para usar para estos fines, que tiene numerosas implicaciones prácticas potenciales (*por ejemplo*, fertilización *in vitro*, reparación de cartílagos y tratamiento de la fibrosis quística).

En otro derivado de la presente invención, se desarrolló un nuevo método para la purificación de AC recombinante. En este método se usó inactivación por calor para eliminar la esfingomielinasa ácida y otras proteínas contaminantes de las preparaciones de AC recombinante. Trabajos anteriores han demostrado que la esfingomielinasa ácida, una hidrolasa lipídica relacionada, se une fuertemente a la AC y se purifica junto con ella (Bernardo y otros, "Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 270: 11098-11102 (1995)). Ahora se ha encontrado que, a diferencia de la mayoría de las proteínas, la actividad de AC es completamente estable cuando se calienta a 60 °C. Así, después de la cromatografía en columna puede usarse la inactivación por calor para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida de la preparación de AC recombinante.

Juntos, estos dos nuevos hallazgos con respecto a (i) la importancia de mantener una relación óptima de precursor y AC activa, y (ii) el uso de la inactivación por calor para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida y otras proteínas contaminantes de la preparación, constituyen observaciones únicas e importantes respecto a la composición de la AC recombinante.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C muestran que las preparaciones de rAC con menos ceramidasa activa se desempeñan mejor que aquellas con más ceramidasa activa. La Figura 1A es un análisis de transferencia Western que muestra las cantidades relativas de rAC activa (alfa/beta) frente al precursor inactivo en dos corridas de biorreactores diferentes (Lote 6 y Lote 7). La Figura 1B resume los resultados que muestran la capacidad de los Lotes 6 y 7 para formar embriones de ratones sanos. La Figura 1C representa los resultados del Lote 6 y del Lote 7 después de las pruebas con el uso de condrocitos de rata cultivados. A las dos semanas, la cantidad de expresión de colágeno 2 se analizó con el uso de transferencia Western.
La Figura 2 ilustra una curva de respuesta en el tiempo de la actividad de AC y de esfingomielinasa ácida en el Lote 7. La actividad de la esfingomielinasa ácida se eliminó sin afectar la actividad de AC.
La Figura 3 es un gráfico de la actividad de la ceramidasa ácida en (nmol/ml/hora) contra el tiempo de incubación (en días).
La Figura 4 es una transferencia Western que muestra la conversión de ceramidasa ácida inactiva en ceramidasa ácida activa.
Las Figuras 5A-B son unas transferencias Western que muestra la conversión de ceramidasa ácida inactiva en ceramidasa ácida activa.

Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición terapéutica que incluye una mezcla de ceramidasas y un portador farmacéuticamente aceptable. La mezcla de ceramidasas incluye un precursor inactivo de AC y una AC activa, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad detectable de esfingomielinasa ácida.

Las ceramidasas hidrolizan el enlace amida de las ceramidas para generar ácidos grasos libres y bases esfingoides (Nikolova-Karakashian y otros, "Ceramidases", Methods Enzymol. 311:194-201 (2000); Hassler y otros, "Ceramidases: Enzymology and Metabolic Roles, "Adv. Lipid Res. 26: 49-57 (1993) Existen tres tipos de ceramidas descritas hasta la fecha (Nikolova-Karakashian y otros, "Ceramidases", Methods Enzymol. 311: 194-201 (2000)). Estas se clasifican en ceramidasas ácidas, neutras y alcalinas de acuerdo con su pH óptimo de actividad enzimática.

Las AC tienen una actividad enzimática óptima a un pH <5. La AC humana fue la primera ceramidasa clonada (Koch y otros, "Molecular Cloning and Characterization of a Full-Length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. Identification Of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease, J. Biol. Chem. 271: 33110-33115 (1996)). Se localiza en el lisosoma y es responsable principalmente del catabolismo de la ceramida. La disfunción de esta enzima debido a un defecto genético conduce a una enfermedad de esfingolipidosis llamada lipogranulomatosis o enfermedad de Farber (Koch y otros, "Molecular Cloning and Characterization of a Full-Length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. Identification Of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease," J. Biol. Chem. 271: 33110-33115 (1996)Young y otros, "Sphingolipids: Regulators of Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy," J. Lipid. Res. 54: 5-19 (2013)).

Los precursores inactivos de AC y las AC activas adecuadas para uso en las mezclas de ceramidasas de este y todos los aspectos de la presente invención pueden ser homólogos (es decir, derivados de la misma especie) o heterólogos (es decir, derivados de una especie diferente) al tejido, células, y/o sujeto que sea tratado. Las proteínas precursoras de ceramidasas (*por ejemplo*, AC) experimentan escisión autoproteolítica en la forma activa (compuesta de subunidades α y β). El mecanismo de la escisión y activación de la AC humana se informa enShtraizent y otros, "Autoproteolytic Cleavage and Activation of Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 283(17): 11253-11259 (2008)). Esto se estimula por el ambiente intracelular, y basado en secuencias altamente conservadas en el sitio de escisión de las proteínas precursoras de ceramidasas a través de las especies, se espera que ocurra en la mayoría, si no en todos, los tipos de células. Así, la ceramidasa como se usa en la presente incluye tanto ceramidasas activas como proteínas precursoras de ceramidasas, donde las proteínas precursoras de ceramidasas se convierten en proteínas ceramidasas activas a través de escisión autoproteolítica. Se contemplan modalidades en las cuales la proteína precursora es captada por la célula de interés y se convierte en ceramidasa activa, así como también modalidades en las que la proteína precursora se convierte en ceramidasa activa por una célula o agente diferentes (presente, por ejemplo, en un medio de cultivo).

La proteína AC (*N*-acilesfingosina desacilasa, Enzima IUBMB núm. 3.5.1.23) se ha purificado de varias fuentes, y se han obtenido los ADNc y los genes de humanos y ratones.*Ver* Bernardo y otros, "Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase," J. Biol. Chem. 270:11098-102 (1995); Koch y otros, "Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. Identification of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease," J. Biol. Chem. 2711:33110-5 (1996); Li y otros, "Cloning and Characterization of the Full-length cDNA and Genomic Sequences Encoding Murine Acid Ceramidase," Genomics 50:267-74 (1998); Li y otros, "The Human Acid Ceramidase Gene (ASAH): Chromosomal Location, Mutation Analysis, and Expression," Genomics 62:223-31 (1999). Esta se produce a través de la escisión de la proteína precursora de AC (*ver* Ferlinz y otros, "Human Acid Ceramidase: Processing, Glycosylation, and Lysosomal Targeting," J. Biol. Chem. 276 (38): 35352-60 (2001)), que es el producto del gen *Asah1* (identificador del gen de UniGene NCBI núm. 427). La proteína AC [*Homo sapiens*] (Número de acceso AAC50907) se muestra más abajo en la SEQ ID NO: 1.

```
1   mpgrscvalv llaaavscav aqhappwted crkstyppsg ptyrgavpwy tinldlppyk
61  rwhelmldka pmlkvivnsl knmintfvps gkvmqvvdek lpgllgnfpg pfeeemkgia
121 avtdiplgei isfnifyelf tictsivaed kkghlihgrn mdfgvflgwn inndtwvite
181 qlkpltvnld fqrnnktvfk assfagyvgm ltgfkpglfs ltlnerfsin ggylgilewi
241 lgkkdamwig fltrtvlens tsyeeaknll tktkilapay filggnqsge gcvitrdrke
301 sldvyeldak qgrwyvvqtn ydrwkhpffl ddrrtpakmc lnrtsqenis fetmydvlst
361 kpvlnkltvy ttlidvtkgq fetylrdcpd pcigw (SEQ ID NO: 1)
```

La subunidad alfa de la AC comienza en el aminoácido en la posición 22 y continúa hasta la posición 142 (como se muestra en negrita en la SEQ ID NO: 1), mientras que la subunidad beta de la AC comienza con el aminoácido en la posición 143 y continúa hasta la posición 395 (como se muestra en cursiva en la SEQ ID NO: 1).

Las AC activas y las proteínas precursoras inactivas de AC que pueden usarse en este y todos los aspectos de la presente invención incluyen, sin limitación, los que se exponen en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1. Miembros ilustrativos de la familia de las ceramidasas ácidas

Homo sapiens		*Caenorhabditis elegans*	
UniProt	Q13510, Q9H715, Q96AS2	UniProt	045686
OMIM	228000	IntAct	045686
Gen NCBI	427	Gen NCBI	173120
RefSeq NCBI	NP_808592, NP_004306	RefSeq NCBI	NP_493173
RefSeq NCBI	NM_177924, NM_004315	RefSeq NCBI	NM_060772
UniGene NCBI	427	UniGene NCBI	173120
Acceso NCBI	Q13510, AAC73009, AAC50907	Acceso NCBI	O45686, CAB0**5556**
Mus musculus		*Danio rerio*	
UniProt	Q9WV54, Q3U8A7, Q78P93	UniProt	Q5XJR7
Gen NCBI	11886	Gen NCBI	450068
RefSeq NCBI	NP_062708	RefSeq NCBI	NP_001006088
RefSeq NCBI	NM_019734	RefSeq NCBI	NM_001006088
UniGene NCBI	11886	UniGene NCBI	450068
Acceso NCBI	AK151208, AK034204	Acceso NCBI	AAH83231, CB360968
Gallus Gallus		Rattus norvegicus	
UniProt	Q5ZK58	UniProt	Q6P7S1, Q9EQJ6
Gen NCBI	422727	Gen NCBI	84431
RefSeq NCBI	NP_001006453	RefSeq NCBI	NP_445859
RefSeq NCBI	NM_001006453	RefSeq NCBI	NM_053407
UniGene NCBI	422727	UniGene NCBI	84431
Acceso NCBI	CAG31885, AJ720226	Acceso NCBI	AAH61540, AF214647
Pan troglodytes			
Gen NCBI	464022		
RefSeq NCBI	XP_519629		
RefSeq NCBI	XM_519629		
UniGene NCBI	464022		

En algunas modalidades, la mezcla de ceramidasas de la composición terapéutica puede contener una cantidad mayor del precursor inactivo de AC que de AC activa. Alternativamente, la mezcla de ceramidasas de la composición terapéutica puede, en algunos casos, contener una cantidad menor de precursor inactivo de AC que de AC activa.

En algunas modalidades, una cantidad efectiva del precursor inactivo de AC en comparación con la AC activa en la mezcla varía de aproximadamente 5 a 95 % en peso del precursor inactivo de AC y 95 a 5 % en peso de AC activa; 20 a 80 % en peso del precursor inactivo de AC y 80 a 20 % en peso de AC activa; 30 a 70 % en peso del precursor inactivo de AC y 70 a 30 % en peso de AC activa; 40 a 60 % en peso del precursor inactivo de AC y 60 a 40 % en peso de AC activa; 55 a 95 % en peso del precursor inactivo de AC y 45 a 5 % en peso de AC activa; 70 a 95 % en peso del precursor inactivo de AC y 30 a 5 % en peso de AC activa; y puede variar alternativamente de 80 a 90 % en peso del precursor inactivo de AC y 20 a 10 % en peso de AC activa. Una cantidad efectiva del precursor inactivo de AC es de 90 % en peso, mientras que la ceramidasa activa es de 10 % en peso de la mezcla. Una modalidad alternativa puede incluir 80 % en peso del precursor inactivo de ceramidasa y 20 % en peso de la AC activa en la mezcla de ceramidasas. En aún una modalidad

adicional, la mezcla de ceramidasas puede contener 60 % en peso de precursor inactivo de ceramidasa y 40 % en peso de ceramidasa activa.

La composición terapéutica puede incluir además adyuvantes, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, y puede estar en forma sólida o líquida, tal como tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, flagelina, adyuvante completo o incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsión de aceite, dinitrofenol, iscomatrix y partículas policatiónicas de ADN de liposomas.

Se describe además un método de tratamiento con AC, el método incluye formular la AC usada en dicho tratamiento como una mezcla de ceramidasas, donde la mezcla de ceramidasas incluye un precursor inactivo de AC y una AC activa.

El tratamiento de acuerdo con este aspecto se lleva a cabo con el uso de métodos que serán evidentes para el experto en la técnica. Para una discusión de AC en el contexto de la enfermedad humana,*ver* Park y otros, "Acid Ceramidase and Human Disease", Biochim. Phiophys. Act. 1758:2133-2138 (2006) y Zeidan y otros, "Molecular Targeting of Acid Ceramidase: Implications to Cancer Therapy," Curr. Drug Targets 9(8):653-661 (2008)).

En algunas modalidades, el tratamiento se lleva a cabo mediante la introducción de una proteína ceramidasa en las células. Un enfoque para el suministro de proteínas o agentes polipeptídicos (*por ejemplo*, ceramidasa activa, proteínas precursoras de ceramidasa inactiva) implica la conjugación de la proteína o polipéptido deseado en un polímero que se estabiliza para evitar la degradación enzimática de la proteína o polipéptido conjugado. Las proteínas o polipéptidos conjugados de este tipo se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,681,811 de Ekwuribe.

Otro enfoque más para la administración de proteínas o agentes polipeptídicos implica la preparación de proteínas quiméricas de acuerdo conla Patente de Estados Unidos núm. 5,817,789 de Heartlein y otrosLa proteína quimérica puede incluir un dominio de ligando y el agente polipeptídico *(por ejemplo,* rAC, AC activa, otra ceramidasa, proteína precursora inactiva de AC, otras proteínas precursoras de ceramidasa). El dominio de ligando es específico para receptores situados en una célula objetivo. Así, cuando la proteína quimérica se suministra a la célula, la proteína quimérica se adsorberá a la célula objetivo y la célula objetivo internalizará la proteína quimérica.

Otras modalidades del presente aspecto se refieren a métodos de tratamiento para una determinada enfermedad o trastorno. Estos métodos implican formular la AC usada en el tratamiento como una mezcla de ceramidasas que incluye un precursor inactivo de ceramidasa y una AC activa.

En una modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno articulares y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la enfermedad o trastorno articulares. Los tipos ilustrativos de enfermedades o trastornos articulares incluyen, sin limitación, osteoartritis, artritis reumatoide, mucopolisacaridosis, enfermedad articular degenerativa, lesión articular y lipogranulomatosis de Farber.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno neurodegenerativos y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la enfermedad o trastorno neurodegenerativos. Los tipos de enfermedades o trastornos neurodegenerativos ilustrativos incluyen, sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, la demencia frontotemporal, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad por priones, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la atrofia sistémica múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la miositis por cuerpos inclusión, miopatía degenerativa, atrofia espinocerebelosa, neuropatía metabólica, neuropatía diabética, neuropatía endocrina, hipotensión ortostática, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular y enfermedades de las neuronas motoras, como la atrofia muscular espinal.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno cardíaco y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la enfermedad o trastorno cardíaco. Los tipos ilustrativos de enfermedades o trastornos cardíacos incluyen, sin limitación, enfermedades cardíacas, lesiones cardíacas, aterosclerosis, trombosis, apoptosis de cardiomiocitos, hipercardia, infarto cardíaco, regurgitación mitral, regurgitación aórtica, defecto septal y síndrome de taquicardia-bradicardia.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es diabetes y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la diabetes.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es una infección patógena en un sujeto que tiene fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o una herida abierta, y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la infección patógena. Los tipos ilustrativos de infecciones patógenas incluyen, sin limitación, virales, fúngicas, priónicas y bacterianas.

Los sujetos que padecen fibrosis quística, COPD y/o una herida abierta, pueden poseer una alta susceptibilidad para adquirir infecciones patógenas agudas y/o crónicas, tales como, por ejemplo, infecciones patógenas bacterianas, virales, fúngicas, protozoarias y/o priónicas. Los patógenos bacterianos incluyen, sin limitación, *Bacillus anthracis, Bordetella*

*pertussis, Borrelia burgdorferi, Campylobacter jejuni, Chlamydia trachomatis, Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Corynebacterium diptht*heriae, *Escherichia coli, E. coli enterohemorrágica, E. coli enterotoxigénica, Haemophilus influenzae* tipo B y no tipificable, *Helicobacter pylori, Legionella pneumophila, Listeria monocytogenes, Mycobacterium spp., Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pneumococcus spp., Pseudomonas aeruginosa, Rickettsia, Salmonella spp., Shigella spp., Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, Streptococcus spp., Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus B,*Grupo A beta hemolítico *Streptococcus, Streptococcus mutans, Treponema pallidum, Vibrio cholerae,* y *Yersinia pestis.* En algunas modalidades, la infección patógena es una infección por *Pseudomonas*.

Los patógenos virales incluyen, sin limitación, virus de ARN, virus de ADN, adenovirdiae (*por ejemplo*, mastadenovirus y virus aviadeno), herpesviridae (*por ejemplo*, virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, virus de herpes simplex 5, y virus de herpes simplex 6), leviviridae (*por ejemplo*, levivirus, *enterobacteria* fago MS2, allolevirus), poxiridae (*por ejemplo*, chordopoxyirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipox virus, y entomopoxyirinae), papovaviridae (*por ejemplo*, polyomavirus y papillomavirus), paramyxoviridae (*porejemplo*, paramyxovirus, virus 1 de parainfluenza, mobillivirus tal como virus de sarampión, rubulavirus (tal como virus de paperas), pneumonoviridae (*por ejemplo*, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), metapneumovirus (*por ejemplo*, pneumovirus aviar y metapneumo virus humano), picornaviridae (*por ejemplo*, enterovirus, rhinovirus, hepatovirus tal como virus de hepatitis A humano, cardiovirus, y apthovirus), reoviridae (*por ejemplo*, orthoreo virus, orbivirus, rotavirus, cypo virus, fijivirus, phytoreo virus, y oryzavirus), retroviridae (*por ejemplo*, retrovirus tipo B de mamíferos, retrovirus tipo C de mamíferos, retrovirus tipo C aviar, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (tal como virus 1 de inmunodeficiencia humana y virus 2 de inmunodeficiencia humana; y spuma virus), flaviviridae (*porejemplo*, virus de hepatitis C), hepadnaviridae (*por ejemplo*, virus de hepatitis B), togaviridae (*por ejemplo*, alphavirus - tal como sindbis virus y rubivirus, tal como virus de rubéola), rhabdoviridae (*por ejemplo*, vesiculovirus, lyssavirus, virus efímera, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (*por ejemplo,* arenavirus, virus de coriomeningitis linfocítica, Ippy virus, y lassa virus), y coronaviridae (*porejemplo*, coronavirus y torovirus), Cytomegalovirus (mononucleosis), virus del Dengue (fiebre del dengue, síndrome de choque), Epstein-Barr virus (mononucleosis, linfoma de Burkitt), virus linfotrópico de células T humano tipo 1 (leucemia de células T), Influenza A, B, y C (enfermedad respiratoria), virus de encefalitis japonesa (neumonía, encefalopatía), Poliovirus (parálisis), Rhinovirus (catarro común), virus de la rubéola (malformaciones fetales), Vaccinia virus (infección generalizada), virus de la fiebre amarilla (ictericia, fallo renal y hepático), y virus de Varicella zoster (varicela).

Los hongos patógenos incluyen, sin limitación, los géneros Aspergillus (*porejemplo*, Aspergillus fumigates), Blastomyces, Candida (*porejemplo*, Candida albicans), Coccidiodes, Cryptococcus, Histoplasma, Phycomyces, Tinea corporis, Tinea unguis, Sporothrix schenckii y Pneumocystis carinii. Los protozoos patógenos incluyen, sin limitación, Trypanosome spp., Leishmania spp., Plasmodium spp., Entamoeba spp. y Giardia spp. como la giardia lamblia.

Como se describe en la presente descripción, una "herida abierta" se refiere a un tipo de lesión en la cual una capa epitelial, es decir, la piel, se rasga, se corta y/o se perfora. En algunas modalidades, una herida abierta se refiere a una lesión aguda que daña la dermis de la piel y aumenta concomitantemente la posibilidad de adquirir una infección. El término "herida abierta" abarca además quemaduras.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es una infección causada por la acumulación de ceramidas y la mezcla de ceramidasas de acuerdo con los métodos se administra a un sujeto para tratar al sujeto por la infección por acumulación de ceramidas.

Los métodos pueden, en otras modalidades, usarse para tratar la enfermedad de Farber.

En al menos una modalidad, el tratamiento se lleva a cabo*in vitro.* En esta modalidad, puede tomarse una mezcla de ceramidasas del sujeto o de un segundo sujeto y después administrarse al primer sujeto (*por ejemplo*, mediante inyección de la mezcla en el primer sujeto). En al menos una modalidad, el tratamiento se lleva a cabo *in vivo.*

Los sujetos mamíferos de acuerdo con estos aspectos incluyen, por ejemplo, sujetos humanos, sujetos equinos, sujetos porcinos, sujetos felinos y sujetos caninos. Los sujetos humanos son particularmente preferidos.

En todas las modalidades que implican administrar la mezcla de ceramidasas a un sujeto, puede administrarse cualquier combinación de ceramidasa activa, proteína precursora de ceramidasa y/o ácido nucleico que codifica proteína precursora de ceramidasa/ceramidasa. La administración puede llevarse a cabo ya sea *mediante* administración sistémica al sujeto o*mediante* administración dirigida a tejidos, órganos y/o células afectados. La mezcla de ceramidasas puede administrarse en un área no dirigida junto con uno o más agentes que facilitan la migración de la mezcla de ceramidasa a (y/o la captación por) un tejido, órgano o célula objetivos. Adicionalmente y/o alternativamente, la mezcla de ceramidasas en sí misma puede modificarse para facilitar su transporte hacia (y captación por) el tejido, órgano o célula deseados, como será evidente para un experto en la técnica.

Típicamente, la mezcla de ceramidasas se administrará a un sujeto en un vehículo que suministra la ceramidasa a la célula, tejido u órgano objetivos. Las vías de administración ilustrativas incluyen, sin limitación, por vía oral, por inhalación, inoculación intratraqueal, aspiración, instilación de vías respiratorias, aerosolización, nebulización, instilación intranasal,

instilación nasogástrica o oral, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, inyección intraarterial (como*a través de*la arteria pulmonar), inyección intramuscular, instilación intrapleural, intraventricular, intralesional, intratecal, por aplicación a membranas mucosas (como la de la nariz, garganta, bronquios, genitales y/o ano), o implantación de un vehículo de liberación sostenida.

En algunas modalidades, la mezcla de ceramidasas se administra por vía oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o por inhalación de aerosol. En algunas modalidades, la mezcla de ceramidasas se administra*a través de* inhalación de aerosol. En algunas modalidades, la mezcla de ceramidasas puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración, como se describe en la presente descripción.

La mezcla de ceramidasas puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte, o con un portador comestible asimilable, o puede envolverse en cápsulas de cubierta dura o blanda, o puede comprimirse en tabletas, o puede incorporarse directamente con comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, la mezcla de ceramidasas puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1 % de ceramidasa. El porcentaje de mezcla de ceramidasas en estas composiciones puede, por supuesto, variar y convenientemente puede estar entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 60 % del peso de la unidad. La cantidad de la mezcla de ceramidasas en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

Las tabletas, cápsulas, y similares pueden contener también un aglutinante tal como la goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrador tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un edulcorante tal como sacarosa, lactosa, o sacarina. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como aceite graso.

La mezcla de ceramidasas puede administrarse además por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de ceramidasas pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un surfactante, tal como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicol líquido, y mezclas de éstos en aceites. Los aceites ilustrativos son los de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, o aceite mineral. En general, el agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son los portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen las dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto de que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol *(por ejemplo,* glicerol, propileno glicol, y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales.

La mezcla de ceramidasas puede administrarse además directamente a las vías respiratorias en forma de un aerosol. Para uso como aerosoles, la ceramidasa en solución o suspensión puede envasarse en un contenedor de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes de hidrocarburos como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. La mezcla de ceramidasas puede administrarse además en una forma no presurizada.

Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, sin limitación, nebulizadores, atomizadores, liposomas (que incluyen técnicas de administración de fármacos tanto activa como pasiva) (Wang y otros, "pH-Sensitive Immunoliposomes Mediate Target-cell-specific Delivery and Controlled Expression of a Foreign Gene in Mouse", Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7851-5 (1987); Bangham y otros, "Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids", J. Mol. Biol. 13:238-52 (1965); Patente de Estados Unidos núm. 5,653,996 de Hsu; Patente de Estados Unidos núm. 5,643,599 de Lee y otros; Patente de Estados Unidos núm. 5,885,613 de Holland y otros ; Patente de Estados Unidos núm. 5,631,237 de Dzau y otros; y Patente de Estados Unidos núm. 5,059,421 de Loughrey y otros; Wolff y otros "The Use of Monoclonal Anti-Thyl IgG1 for the Targeting of Liposomes to AKR-A Cells in Vitro and in Vivo", Biochim. Biofis Acta 802:259-73 (1984)), parches transdérmicos, implantes, composiciones de depósito de proteínas implantables o inyectables y jeringas. Pueden emplearse además otros sistemas de suministro conocidos por los expertos en la técnica para lograr el suministro deseado de ceramidasa al órgano, tejido o células deseados.

La administración puede llevarse a cabo con la frecuencia que sea necesaria y durante un período adecuado para proporcionar un tratamiento efectivo. Por ejemplo, la administración puede llevarse a cabo con una formulación de dosificación de liberación sostenida sola o con múltiples dosis diarias.

El tratamiento puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo. Los tratamientos in vivo* incluyen, por ejemplo, modalidades en las que la población de células está presente en un sujeto mamífero. En tales modalidades, la población de células puede

ser autóloga (producida por el sujeto), homóloga o heteróloga. Los sujetos adecuados de acuerdo con estas modalidades incluyen mamíferos, *por ejemplo*, sujetos humanos, sujetos equinos, sujetos porcinos, sujetos felinos y sujetos caninos.

En una modalidad, uno o más agentes adicionales que reducen los niveles de ceramidas pueden administrarse con la mezcla de ceramidasas. Esto incluye, sin limitación, los inhibidores de la esfingomielinasa ácida (*por ejemplo*, amitriptilina (Becker y otros, "Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide and Inflammation in Cystic Fibrosis," Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 42:716-724 (2010), que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad) e inhibidores de ceramida sintasas (*porejemplo*,Shiffmann y otros, "Inhibitors of Specific Ceramide Synthases," Biochimie 94:558-565 (2012))).

La cantidad efectiva de un agente terapéutico/población celular administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad o trastorno y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los medicamentos. Además, dependerá del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad o trastorno. El experto será capaz de determinar las dosis apropiadas en dependencia de estos y otros factores.

En una modalidad, el método incluye tratar una o más células de mamífero *ex vivo*con dicha mezcla de ceramidasas para favorecer la supervivencia celular. Las células cuya supervivencia puede estimularse de acuerdo con este aspecto incluyen, sin limitación, aquellas que utilizan la vía de la apoptosis de la ceramidasa, que incluye una amplia variedad de células (Obeid y otros, "Programmed Cell Death Induced by Ceramide," Science 259: 1769-71 (1993)),*por ejemplo*, hepatocitos (Arora y otros, "Ceramide Induces Hepatocyte Cell Death Through Disruption of Mitochondrial Function in the Rat,", Hepatol. 25: 958-63 (1997)), fibroblastos de la piel (Mizushima y otros, "Ceramide, a Mediator of Interleukin 1, Tumour Necrosis Factor α, as Well as Fas Receptor Signalling, Induces Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Synovial Cells,", Ann. Reuma. Dis. 57: 495-9 (1998)), condrocitos (MacRae y otros, "Ceramide Inhibition of Chondrocyte Proliferation and Bone Growth Is IGF-I Independent," J. Endocrinol. 191 (2): 369-77 (2006)), epitelio pulmonar (Chan y Goldkorn, "Ceramide Path in Human Lung Cell Death,", Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22 (4): 460-8 (2000)), eritrocitos (Lang et al., "Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death," Cell. Physiol. Biochem. 15:195-202 (2005)), cardiomiocitos (Parra y otros, "Changes in Mitochondrial Dynamics During Ceramide-induced Cardiomyocyte Early Apoptosis," Cardiovasc. Res. (2007)), y linfocitos (Gombos y otros, "Cholesterol and Sphingolipids as Lipid Organizers of the Immune Cells' Plasma Membrane: Their Impact on the Functions of MHC Molecules, Effector T-lymphocytes and T-cell Death," Immunol. Lett. 104(1-2):59-69 (2006)), óvulos, embriones, neuronas, espermatozoides, fibroblastos sinoviales y células madre embrionarias. Los tipos celulares preferidos son óvulos (fertilizados o no fertilizados), embriones, células primarias*(por ejemplo,*neuronas), espermatozoides, fibroblastos sinoviales y células madre embrionarias. Además, la vía de la apoptosis de la ceramida parece conservarse en todas las especies de mamíferos (Lee & Amoscato, "TRAIL and Ceramide", Vitam. Horma 67:229-55 (2004); *ver además*, Samadi, "Ceramide-induced Cell Death in Lens Epithelial Cells," Mol. Vis. 13:1618-26 (2007) (humanos); Parra y otros, "Changes in Mitochondrial Dynamics During Ceramide-induced Cardiomyocyte Early Apoptosis", Cardiovasc. Res. (2007) (rata); de Castro E Paula y otros, "Ceramide Inhibits Development and Cytokinesis and Induces Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos," Mol. Reprod. Devel., DOI No. 10.1002 / mrd.20841 (2007) (vacas)). Por lo tanto, se espera que, para cada uno de los tipos de células enumerados anteriormente, las células adecuadas incluyan las de humanos, monos, ratones, ratas, cobayas, vacas, caballos, ovejas, cerdos, perros y gatos. Este método puede usarse además para prolongar la supervivencia de óvulos y/o embriones durante procedimientos *in vitro* de fertilización, lo que facilita la identificación y selección de embriones sanos para reimplantación, especialmente para hembras humanas mayores y para procedimientos de cría veterinaria.

Las células de acuerdo con este aspecto pueden proporcionarse por métodos que serán evidentes para el experto en la técnica. A manera de ejemplo, las células pueden obtenerse de un animal o de una fuente animal existente *ex vivo* (*por ejemplo*, una muestra de tejido, un cultivo celular, etc.) con el uso de técnicas estándar. El tratamiento de celulas *ex vivo* incluye el tratamiento de células presentes en un cultivo homogéneo, así como también células presentes en un cultivo heterogéneo (*por ejemplo*,una muestra de tejido).

Los precursores inactivos de AC y las AC activas que pueden usarse para preparar la mezcla de ceramidasas en este y en todos los aspectos de la presente invención incluyen, sin limitación, los expuestos en la Tabla 1, *más arriba.* En este y en todos los aspectos de la presente invención (que incluyen los métodos*in vivo* que se discuten más abajo), la AC puede ser homóloga (es decir, derivada de la misma especie) o heteróloga (es decir, derivada de una especie diferente) a una o más de las células que se tratan.

Una modalidad del presente aspecto del tratamiento con AC se refiere a un método para producir condrocitos con la mezcla de ceramidasas. Este método implica seleccionar una población de células que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos y tratar la población celular seleccionada con la mezcla de ceramidasas para transformar una o más de las células en la población seleccionada en condrocitos.

Las células que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos incluyen células de la médula ósea, fibroblastos, células madre mesenquimales y/o fibroblastos (*ver* Mizushima y otros, "Ceramide, a Mediator of Interleukin 1, Tumour Necrosis Factor α, as Well as Fas Receptor Signaling, Induces Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Synovial Cells," Ann. Reuma. Dis. 57: 495-9 (1998)).

Los condrocitos de acuerdo con este aspecto incluyen, sin limitación, condrocitos articulares, condrocitos nasales, condrocitos traqueales, condrocitos meniscales y condrocitos aurales. Estos incluyen, por ejemplo, condrocitos de mamíferos,*por ejemplo*, condrocitos humanos, condrocitos equinos, condrocitos porcinos, condrocitos felinos y condrocitos caninos. Preferentemente, los condrocitos son condrocitos primarios.

Las células adecuadas de acuerdo con este y todos los demás aspectos de la presente invención incluyen células de mamíferos,*por ejemplo*, células humanas, células equinas, células porcinas, células felinas y/o células caninas. Las células humanas son particularmente preferidas.

En este y en todos los aspectos de la presente invención que involucran poblaciones de células, se contemplan modalidades en las que todas las células son de un solo tipo, así como también modalidades en las que la población es una mezcla de dos o más tipos de células.

La mezcla de ceramidasas y los métodos para tratar las poblaciones de células con la mezcla de ceramidasas incluyen todos los expuestos *supra.*

Una modalidad del presente aspecto del tratamiento con AC se refiere a un método para estimular la condrogénesis con la mezcla de ceramidasas. En una modalidad, este método incluye además seleccionar una población de células madre que necesitan diferenciación en condrocitos, tratar la población de células madre con la mezcla de ceramidasas para enriquecer las células madre mesenquimales dentro de la población de células madre y tratar la población de células madre mesenquimatosas enriquecidas con la mezcla de ceramidasas para promover la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos.

Las poblaciones de células adecuadas de acuerdo con este aspecto incluyen poblaciones de células de mamíferos, *por ejemplo*, poblaciones de células humanas, poblaciones de células equinas, poblaciones de células porcinas, poblaciones de células felinas y/o poblaciones de células caninas. Las poblaciones de células humanas son particularmente preferidas.

Las células madre adecuadas de acuerdo con este y todos los demás aspectos de la presente invención incluyen células de médula ósea, adipocitos y células de la piel. Las células madre adicionales de acuerdo con este aspecto incluyen, sin limitación, células madre embrionarias, células madre somáticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes. Las células madre ilustrativas incluyen, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neurales, células progenitoras endoteliales, células madre epiteliales, células madre epidérmicas, adipocitos y células madre cardíacas. Las células madre adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, *por ejemplo,* células de la médula ósea de humanos, equinos, porcinos, felinos y caninos, adipocitos y células de la piel. Las células humanas son particularmente preferidas.

Los condrocitos adecuados son consistentes con los descritos *más arriba.* Las células madre mesenquimales diferenciadas pueden ser, alternativamente, células primarias como, por ejemplo, neuronas, hepatocitos, células óseas, células pulmonares y células cardíacas.

En al menos una modalidad, el número de células diferenciadas en la población celular se mantiene. En al menos una modalidad, el número de células diferenciadas en la población celular se incrementa. Como será evidente para el experto en la técnica, mantener o aumentar el número total de células diferenciadas en la población puede lograrse mediante disminución o prevención de la desdiferenciación de células en la población que ya están diferenciadas, mediante estimulación de la diferenciación de células no diferenciadas en la población, o ambos.

La mezcla de ceramidasas y los métodos para tratar las poblaciones de células con la mezcla de ceramidasas incluyen todos los expuestos *supra.*

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir una composición terapéutica. El método incluye proporcionar un medio que contenga un precursor inactivo de AC; incubar el medio en condiciones efectivas para transformar una porción del precursor inactivo de AC en AC activa a través de escisión autoproteolítica, en donde dicha incubación se lleva acabo a un pH de 4 a 6,5 y una temperatura de 30 °C, 35 °C o 37 °C durante 3 horas, y comprende además calentar dicho medio en condiciones efectivas para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida; y recuperar el medio incubado como una mezcla de ceramidasas recombinantes que comprende el precursor inactivo de AC y una AC activa, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad detectable de esfingomielinasa ácida.

La composición terapéutica de la presente invención contiene una proteína recombinante que incluye tanto el precursor inactico de AC como la AC activa. La proteína recombinante de la presente invención puede prepararse para su uso en los métodos descritos anteriormente de la presente invención con el uso de métodos estándar de síntesis conocidos en la técnica, que incluyen síntesis de péptidos en fase sólida (estrategias Fmoc o Boc) o síntesis de péptidos en fase de solución. Alternativamente, las proteínas de la presente invención pueden prepararse con el uso de sistemas de expresión recombinantes.

Generalmente, el uso de sistemas de expresión recombinante implica la inserción de la molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido deseado en un sistema de expresión en el que la molécula es heteróloga (es decir, normalmente no está presente). Pueden insertarse en el vector una o más moléculas de ácido nucleico deseadas que codifican un péptido de la invención. Cuando se insertan múltiples moléculas de ácido nucleico, las múltiples moléculas de ácido nucleico pueden codificar los mismos péptidos o diferentes. La molécula de ácido nucleico heteróloga se inserta en el sistema de expresión o en el vector en el sentido apropiado (5'→ 3'), orientación con relación a al promotor y cualquier otra molécula reguladora 5', y el marco de lectura correcto.

La preparación de constructos de ácido nucleico puede llevarse a cabo con el uso de procedimientos de clonación estándar bien conocidos en la técnica, tal como se describe enJoseph Sambrook y otros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Springs Harbor 1989)..La patente de Estados Unidos núm. 4,237,224 de Cohen y Boyer, describe la producción de sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes con el uso de la escisión de enzimas de restricción y la ligadura con ADN ligasa. Estos plásmidos recombinantes se introducen después por medio de transformación en una célula huésped adecuada.

Una variedad de señales genéticas y eventos de procesamiento que controlan muchos niveles de expresión génica (*por ejemplo* la transcripción del ADN y la traducción del ARN mensajero ("ARNm") pueden incorporarse en el constructo de ácido nucleico para maximizar la producción de péptidos. Para los fines de expresar una secuencia de ácido nucleico clonada que codifica una proteína recombinante deseada, es ventajoso usar promotores fuertes para obtener un alto nivel de transcripción. En dependencia del sistema huésped utilizado, puede usarse cualquiera de una serie de promotores adecuados. Por ejemplo, cuando la clonación es en *E. coli*, sus bacteriófagos, o plásmidos, pueden usarse promotores tales como el promotor del fago T7, promotor *lac*, promotor *trp*, promotor *rec*A, promotor de ARN ribosomal, los promotores P_Ry P_L de colifago lambda y otros, que incluyen, pero sin limitarse a, *lac*UV5, *omp*F, *bla*, *lpp* y similares, para dirigir altos niveles de transcripción de segmentos de ADN adyacentes. Adicionalmente, puede usarse un promotor híbrido *trp-lac*UV5 (*tac*) u otros promotores de *E. coli* producidos por ADN recombinante u otras técnicas de ADN sintético para proporcionar la transcripción del gen insertado. Los promotores comunes adecuados para dirigir la expresión en células de mamíferos incluyen, sin limitación, SV40, MMTV, metalotioneína-1, adenovirus Ela, CMV, temprano inmediato, promotor e intensificador de la cadena pesada de inmunoglobulina, y RSV-LTR. Las células de mamífero que pueden usarse para la fabricación de la proteína recombinante de la presente invención incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de plantas, huevos de gallina y fibroblastos humanos.

Existen otras señales de iniciación específicas requeridas para la transcripción y traducción eficientes de genes en células procarióticas que pueden incluirse en el constructo de ácido nucleico para maximizar la producción de péptidos. En dependencia del sistema de vectores y del huésped utilizados, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y/o traducción adecuados, que incluyen los promotores constitutivos, inducibles y reprimibles, así como también elementos promotores mínimos 5', potenciadores o secuencias líder. Para una revisión sobre la maximización de la expresión génica verRoberts y Lauer, "Maximizing Gene Expression On a Plasmid Using Recombination In Vitro," Methods in Enzymology 68: 473-82 (1979)).

Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de la presente invención, una molécula promotora de elección, que incluye, sin limitación, potenciadores y secuencias líder; una región reguladora 3' adecuada para permitir la transcripción en el huésped, y cualquier componente adicional deseado, como los genes indicadores o marcadores, se clonan en el vector de elección con el uso de procedimientos de clonación estándar en la técnica, como se describe enJoseph Sambrook y otros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Springs Harbor 1989); Frederick M. Ausubel, SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Wiley 1999), y patente de Estados Unidos núm. 4,237,224 de Cohen y Boyer.

Una vez que la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido se ha clonado en un vector de expresión, está lista para incorporarse en un huésped. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en las células, sin limitación, mediante transfección (si el huésped es un eucariota), transducción, conjugación, movilización o electroporación, lipofección, fusión de protoplastos, movilización o bombardeo de partículas, con el uso de procedimientos estándar de clonación conocidos en la técnica, como se describió porJOSEPH SAMBROOK y otros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Springs Harbor 1989).

Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector adecuados para expresar la proteína o polipéptido recombinante. Principalmente, el sistema vector debe ser compatible con el huésped usado. Los sistemas huésped-vector incluyen, sin limitación, lo siguiente: bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido; microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; sistemas celulares de mamíferos infectados con virus (*porejemplo*virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insectos infectados con virus (*porejemplo*, baculovirus); y células vegetales infectadas por bacterias.

Los péptidos purificados pueden obtenerse mediante varios métodos fácilmente conocidos en la técnica, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, filtración en gel y cromatografía de fase inversa. El péptido se produce preferentemente en forma purificada (preferentemente al menos aproximadamente 80 % u 85 % puro, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % o 95 % puro) mediante técnicas convencionales. En dependencia de si la célula huésped recombinante se produce para secretar el péptido en el

medio de crecimiento (*ver* la patente de Estados Unidos núm. 6,596,509 de Bauer y otros), el péptido puede aislarse y purificarse por centrifugación (para separar los componentes celulares del sobrenadante que contiene el péptido secretado) seguido de precipitación secuencial con sulfato de amonio del sobrenadante. En una modalidad de la presente invención, las células pueden transformarse con ADN que codifica AC y después cultivarse en condiciones efectivas para producir el medio que contiene un precursor inactivo de AC. La fracción que contiene el péptido se somete a filtración en gel en una columna de dextrano o poliacrilamida del tamaño apropiado para separar los péptidos de otras proteínas. Si es necesario, la fracción peptídica puede purificarse adicionalmente mediante otra cromatografía.

En una modalidad de la presente invención, la incubación se lleva a cabo en condiciones efectivas para reducir la velocidad de transformación del precursor inactivo de AC en la AC activa en comparación con la velocidad de transformación lograda cuando dicha incubación se lleva a cabo a un pH de 4 y una temperatura de 4 °C o 37 °C, durante 24 horas, bajo condiciones de cualquier otra manera constantes.

La mezcla de ceramidasas durante la incubación tiene un pH de 4,0 a 6,5. La mezcla puede tener, por ejemplo, un pH de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5. La temperatura de la mezcla de ceramidasas durante dicha incubación es de 30 °C, 35 °C o 37 °C. La mezcla se puede incubar en condiciones de 37 °C con un pH de 4,0. La mezcla se incuba durante un período de 3 horas.

Durante la incubación de este aspecto de la presente invención, el medio puede calentarse en condiciones efectivas para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida. En esta modalidad, el medio puede calentarse a 60 °C durante un período de tiempo que incluye, pero sin limitarse a, menos de 20 minutos, 20-40 minutos, 40-60 minutos, o más de 60 minutos.

Debe apreciarse que ciertos aspectos, modos, modalidades, variaciones y características de la presente invención se describen con varios niveles de detalle para proporcionar una comprensión sustancial de la tecnología actual. Se proporcionan además las definiciones de ciertos términos como se usan en esta descripción. A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen, generalmente, el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar modalidades de la presente invención, pero de ninguna manera pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1- Materiales y Métodos.

Preparación de rAC (Lote 6 y Lote 7)- Se generaron células de ovario de hámster chino que sobreexpresan el gen Asah1 humano y se purificó rAC de los medios (He y otros, "Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase. Catalytic Reactions and Interactions With Acid Sphingomyelinase," J. Biol. Chem. 278:32978-32986 (2003)). No se llevó a cabo manipulación *in vitro* después de la purificación del Lote 6 (mayor cantidad de precursor inactivo de AC). Después de la purificación de la enzima del Lote 7, la rAC se incubó en tampón fosfato citrato a pH 4 a 37 °C durante tres horas.

Comparación de los lotes 6 y 7 para la producción de embriones de ratón- Los métodos para usar rAC para la producción de embriones de ratón se describen en Eliyahu y otros, "Acid Ceramidase Improves the Quality of Oocytes and Embryos and the Outcome of In Vitro Fertilization," FASEB J. 24: 1229-1238 (2010). Los espermatozoides y los ovocitos maduros se obtuvieron de ratones Black C57 y se llevó a cabo fertilización *in vitro* con el uso de cantidades iguales de enzimas de los lotes 6 y Lote 7.

Comparación del Lote 6 y el Lote 7 para mejorar el fenotipo condrogénico de los condrocitos articulares de rata- Se añadieron cantidades iguales de rAC del Lote 6 y del Lote 7 a los medios de los condrocitos articulares primarios aislados de fémures. El cartílago se digirió y las células se colocaron en cultivo con y sin la complementación con rAC. Después de tres días, los medios se cambiaron a medios sin rAC. Las células se cultivaron durante dos semanas adicionales y los niveles de colágeno 2 (marcador de condrocitos articulares maduros) se determinaron mediante transferencia Western.

Ejemplo 2: rAC con menos AC activa se desempeña mejor que aquellos con más AC activa.

Las preparaciones de rAC con menos ceramidasa activa se desempeñan mejor que aquellas con más ceramidasa activa (Figuras 1A-1C). Como se indica en la Figura 1A, un análisis de transferencia Western mostró las cantidades relativas de rAC activa (alfa/beta) frente al precursor inactivo en dos corridas de biorreactores diferentes (Lote 6 y Lote 7). El Lote 7 tenía más rAC activa que en el Lote 6. Los ejemplos *in vitro* (IVF y condrocitos) compararon dos preparaciones de rAC con relaciones de aproximadamente 90:10 (inactiva: activa) (Lote 6) frente a aproximadamente 80:20 (inactiva:activa) (Lote 7) (Figura 1A). La apoptosis se determinó a las 24 horas con el uso de métodos morfológicos estándar (*por ejemplo*, la integridad de la membrana, etc.) (Eliyahu y otros, "Acid Ceramidase Improves the Quality of Oocytes and Embryos and the Outcome of In Vitro Fertilization," FASEB J. 24: 1229-1238 (2010)).

La Figura 1B resume los resultados de la capacidad para formar embriones de ratones sanos en el Lote 6 y Lote 7. El Lote 7 (que contiene más rAC activa) produjo más embriones apoptóticos que el Lote 6 (que contiene menos rAC activa). Como puede verse en la Figura 1B, la preparación con menos enzima activa (Lote 6) proporcionó mejores resultados en la IVF (menos embriones apoptóticos). Esto fue inesperado.

El Lote 6 y el Lote 7 se probaron además con el uso de condrocitos de rata cultivados (Figura 1C). A las dos semanas, la cantidad de expresión de colágeno 2 se analizó con el uso de transferencia Western. Las células cultivadas con el Lote 7 (rAC más activo) produjeron menos colágeno 2. El Lote 6 fue mejor para mantener el fenotipo de condrocitos después de la expansión (Figura 1C, basado en la expresión de colágeno 2). Esto fue inesperado.

Se plantea como hipótesis que la mejora del rendimiento de la rAC que contiene menos AC activa se debe a la vida media más corta de la enzima activa en las células cultivadas (contrario a la vida media más larga del precursor).

Con el fin de manipular la relación de enzima inactiva con la activa, el pH se ajustó a 4,0 y la preparación se incubó a 37 °C. En estas condiciones, se observó un aumento de aproximadamente 10 % de enzima activa por cada 3 horas de incubación. Así, para encubrir una preparación que es 90:10 inactiva:activa a 100 % activa, la preparación se incuba durante 27 horas.

Una variable importante aquí es la temperatura. Si las preparaciones se mantienen congeladas (pH ajustado), no hay conversión. Si las preparaciones se mantienen a 4 °C (en un refrigerador), la conversión continúa pero a 1 % de eficiencia de la de 37 °C (10 % de aumento en la enzima activa requiere 300 horas frente a 3). Si la preparación se mantiene a temperatura ambiente (25 °C), esta prosigue a 10 % de eficiencia (el aumento de 10 % requiere 30 horas). Si el pH no está acidificado, no hay conversión a 4 °C y solo se requiere una tasa de conversión de 1% (se requieren 300 horas para un aumento de 10 %) a temperatura ambiente.

Ejemplo 3 - Eliminación de la actividad de la esfingomielinasa ácida contaminante de rAC.

Se desarrollaron métodos para eliminar la actividad de la esfingomielinasa (ASM) contaminante de las preparaciones de rAC. Esto requiere la incubación de las preparaciones finales de rAC a 60 °C durante 10-20 minutos. Esta incubación no afecta a rAC (actividad o relación de inactiva con activa), pero elimina toda la actividad de ASM, que es esencial para la fabricación (Figura 2).

Ejemplo 4 - Incubación de Medios que Contienen Ceramidasa Ácida Humana Recombinante a 37 °C para Longitudes variables f de Tiempo

Los medios acondicionados (DMEM, pH 6,8 que contienen 10 % de suero fetal de ternera) se recolectaron de células de ovario de hámster chino que sobreexpresan y secretan ceramidasa ácida humana recombinante (rhAC) (He y otros, "Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase. Catalytic Reactions and Interactions With Acid Sphingomyelinase,"J. Biol. Chem. 278:32978-32986 (2003)). Las células se cultivaron hasta ~100 % de confluencia en matraces T-75 mm, y después se recogieron los medios después de 4 días de crecimiento adicional. El medio recogido se filtró a través de membranas de 0,22 mm para eliminar los residuos y se colocó en una incubadora a 37 °C durante períodos de tiempo variables. Al final del período de incubación, los medios se congelaron a -20 °C antes del ensayo. La actividad de AC (Figura 3) se determinó como se describió anteriormente (He y otros, Anal Biochem, 274:264 (1999)): las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante una hora. Transferencia Western de AC (Figura 4): 6,5 µl/carril, se desarrolló con el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-AC humana (1:300, # SC136275, Santa Cruz) contra la subunidad alfa. Este dato muestra que la incubación *in vitro* de medios que contienen rhAC a 37 °C durante 3-17 días, resulta en la conversión del precursor inactivo en enzima activa (representada por la subunidad alfa y un aumento en la actividad enzimática).

Ejemplo 5 - Conversión in vitro de Ceramidasa Ácida Humana Recombinante Purificada a 37 °C

La AC humana recombinante purificada (rhAC; 4 µg/µl en EMEM, pH 6,8) se aisló de los medios de sobreexpresión de células de ovario de hámster chino como se describió anteriormente (He y otros, "Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase. Catalytic Reactions and Interactions With Acid Sphingomyelinase," J. Biol. Chem. 278:32978-32986 (2003)). Transferencia Western de AC (Figura 5): 6,5 µl/carril, se desarrolló con el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-AC humana contra la subunidad alfa (1:300, # SC136275, Santa Cruz). Este dato muestra que la incubación *in vitro* de rhAC purificada a 37 °C durante 24 h (Figura 5A) resultó en la conversión completa del precursor en la forma activa. La incubación de 1-8 horas (Figura 5B) mostró una progresión lineal de conversión.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición terapéutica, el método comprende:

proporcionar un medio que contiene un precursor de ceramidasa ácida inactiva recombinante;
incubar el medio en condiciones efectivas para transformar una porción del precursor de ceramidasa ácida inactiva en ceramidasa ácida activa a través de la escisión autoproteolítica, en donde dicha incubación se lleva acabo a un pH de 4 a 6,5 y una temperatura de 30 °C, 35 °C o 37 °C durante 3 horas, y comprende además calentar dicho medio en condiciones efectivas para eliminar la actividad de la esfingomielinasa ácida; y
recuperar el medio incubado como una mezcla de ceramidasa recombinante que comprende el precursor de ceramidasa ácida activa y una ceramidasa ácida activa, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad detectable de esfingomielinasa ácida.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha provisión de un medio comprende:

proporcionar células transformadas con ADN que codifica ceramidasa ácida y
cultivar las células transformadas en condiciones efectivas para producir el medio que contiene el precursor de ceramidasa ácida activa.

3. Una composición terapéutica que comprende:
una mezcla de ceramidasas recombinantes que comprende:
un precursor de ceramidasa ácida activa y
una ceramidasa ácida activa; y
un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la mezcla de ceramidasas no tiene actividad de esfingomielinasa ácida detectable.

4. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la mezcla de ceramidasas comprende 55 a 95 % en peso del precursor de ceramidasa ácida inactiva y 45 a 5 % en peso de la ceramidasa ácida activa, 70 a 95 % en peso del precursor de ceramidasa ácida inactiva y 30 a 5 % en peso de la ceramidasa ácida activa, o 80 a 90 % en peso del precursor de ceramidasa ácida inactiva y 20 a 10 % en peso de la ceramidasa ácida activa.

5. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende, además:
un adyuvante.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha incubación se lleva a cabo a un pH de 4 y a una temperatura de 37 °C.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho calentamiento se lleva a cabo a una temperatura de 60 °C entre 10 y 20 minutos.

8. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en flagelina, adyuvante completo o incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsión de aceite, dinitrofenol, iscomatrix y partículas policatiónicas de ADN en liposomas.

9. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha mezcla de ceramidasa recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ceramidasa.

10. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha mezcla de ceramidasas recombinante está en una forma seleccionada de tabletas, cápsulas, elixires, suspensiones, una solución, una dispersión o jarabes.

11. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha mezcla de ceramidasas recombinantes está en forma de aerosol.

12. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además un agente adicional seleccionado de inhibidores de la esfingomielinasa ácida, inhibidores de ceramida sintasas, o una combinación de los mismos.

13. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la mezcla de ceramidasas comprende UniProt Q13510, UniProt Q9H715, UniProt Q96AS2, OMIM 228000, NCBI Gen 427, NCBI RefSeq NP_808592, NCBI RefSeq NP_004306, NCBI RefSeq NM_177924, NCBI RefSeq NM_004315, NCBI UniGene 427, Acceso NCBI Q13510, Acceso NCBI AAC73009, NCBI Accession AAC50907 o una combinación de los mismos.

14. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la mezcla de ceramidasas comprende UniProt Q13510.

15. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la mezcla de ceramidasas comprende NCBI RefSeq NP_808592.

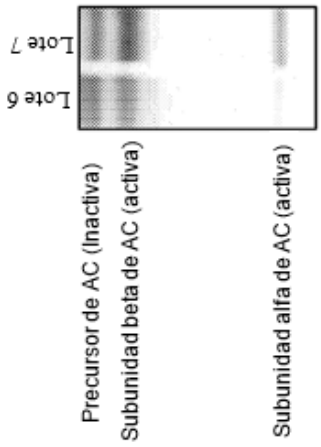

Figura 1A

Embriones apoptóticos @24H:
Sin rAC (Control) : 67%
Lote 6 : 13%
Lote 7 : 46%

Figura 1B

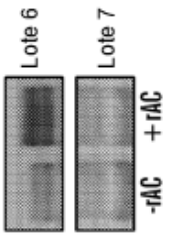

Figura 1C

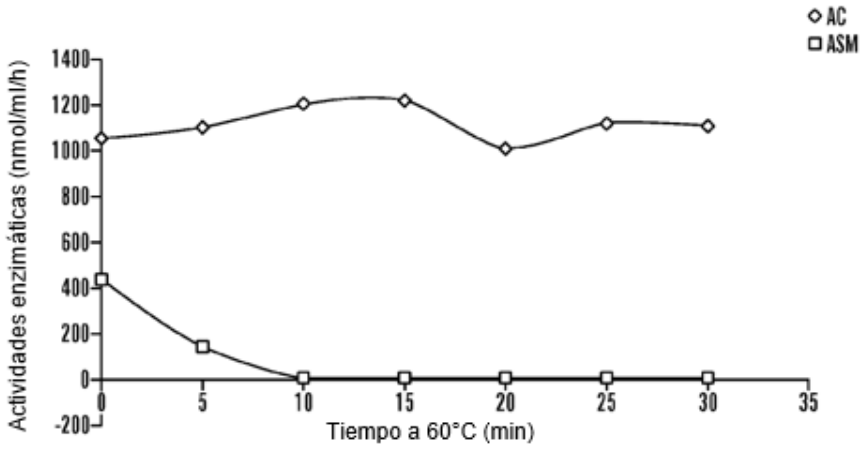

Figura 2

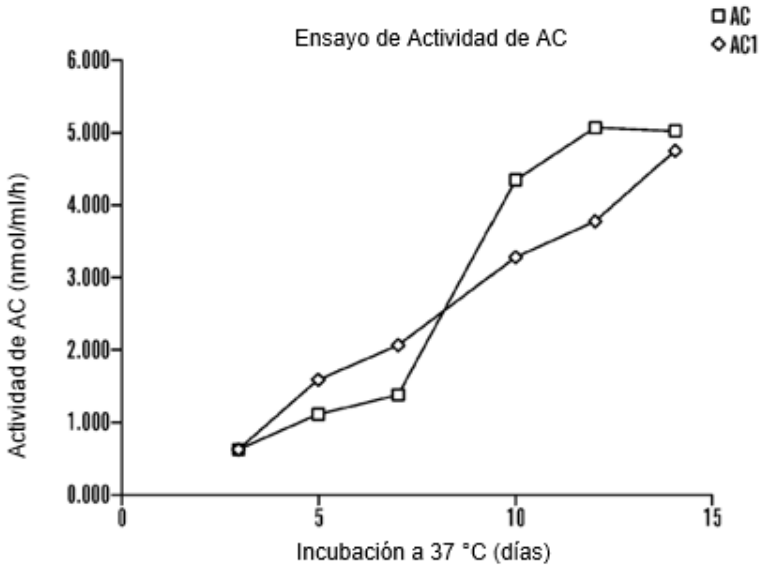

Figura 3

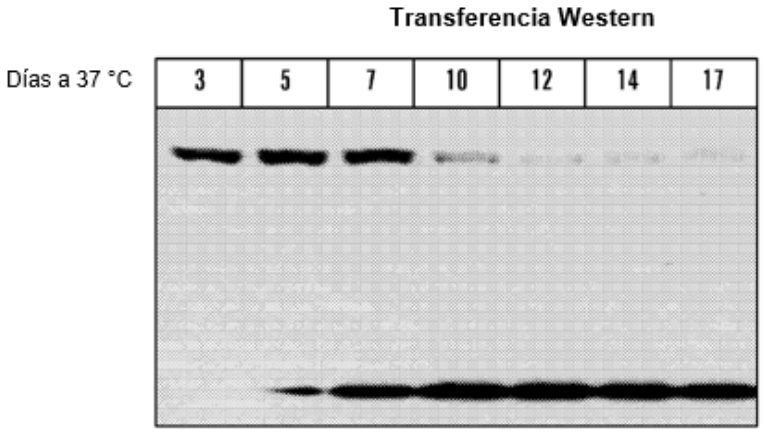

Figura 4

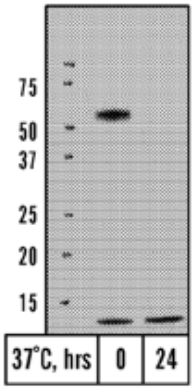

Figura 5A

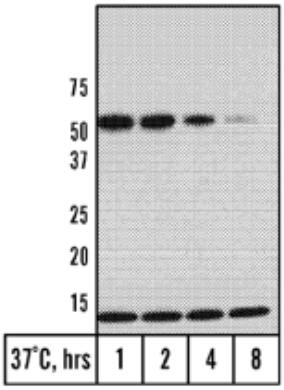

Figura 5B