

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 760**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/US2012/054316**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036875**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12830086 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2753346**

54 Título: **Ceramidasas y diferenciación celular**

30 Prioridad:

07.09.2011 US 201161531917 P

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

05.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHUCHMAN, EDWARD, H. y
SIMONARO, CALOGERA, M.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 791 760 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

Ceramidasa y diferenciación celular

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a la ceramidasa y la diferenciación celular.

10 Antecedentes de la invención

10

La terapia basada en células para la reparación de cartílagos ha ganado una popularidad creciente desde los primeros informes de implantación exitosa de condrocitos autólogos (ACI) hace más de 10 años (Minas y otros, "Chondrocyte Implantation in the Repair of Chondral Lesions of the Knee: Economics and Quality of Life", *Am. J. Orthop.* 27(11):739-44 (1998)). En la ACI, los condrocitos primarios se obtienen de pequeñas biopsias de cartílago articular sano, se expanden y después se colocan en andamios tridimensionales para su uso posterior en la cirugía de reparación de cartílagos (*ver* Vavken y otros, "Effectiveness of Autologous Chondrocyte Implantation in Cartilage Repair of the Knee: A Systematic Review of Controlled Trials", *Osteoarthritis Cartilage* 18(6):857-63 (2010)). Actualmente, la ACI se usa en aproximadamente 10 % de todos los procedimientos de reparación de cartílagos realizados en todo el mundo donde las lesiones tienen menos de 2-4 cm² (Cole y otros, "Outcomes After a Single-Stage Procedure for Cell-based Cartilage Repair: A Prospective Clinical Safety Trial With 2-year Follow-up", *Am. J. Sports Med.* 39(6):1170-79 (2011)). La ACI se ha usado además en medicina veterinaria para mejorar el resultado de la cirugía de reparación de cartílagos en animales grandes (equinos) y pequeños (perros) (Breinan y otros, "Autologous Chondrocyte Implantation in a Canine Model: Change in Composition of Reparative Tissue With Time", *J. Orthop. Res.* 19(3):482-92 (2001); Frisbie y otros, "Evaluation of Autologous Chondrocyte Transplantation Via a Collagen Membrane in Equine Articular Defects: Results at 12 and 18 Months", *Osteoarthritis Cartilage* 16(6):667-79 (2008)). Ha habido muchos informes que documentan la eficacia clínica mejorada de la ACI en comparación con otros procedimientos de reparación de cartílagos, y actualmente están en marcha varios estudios clínicos de gran tamaño en múltiples sitios (Ebert y otros, "Clinical and Magnetic Resonance Imaging-based Outcomes to 5 Years After Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation to Address Articular Cartilage Defects in the Knee", *Am. J. Sports Med.* 39(4):753-63 (2011)). Sin embargo, una limitación importante de este procedimiento es el requisito de dos cirugías invasivas, la primera de las cuales requiere la extracción de células del tejido cartilaginoso sano y la segunda para implantar las células que se han expandido *ex vivo*. Por lo tanto, la investigación reciente se ha centrado en el uso de fuentes alternativas de condrocitos donde las células se pueden obtener de manera menos invasiva (por ejemplo, nasoseptal (Bichara y otros, "Porouspoly (Vinyl Alcohol)-alginate Gel Hybrid Construct for Neocartilage Formation Using Human Nasoseptal Cells", *J. Surg. Res.* 163(2):331-6 (2010))), la generación de condrocitos a partir de células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales (MSC) de la médula ósea o tejido adiposo), y/o el uso de las MSC directamente para trasplante (Augello y otros", *Mesenchymal Stem Cells: A Perspective From In Vitro Cultures to In Vivo Migration and Niches*", *Eur. Cell Mater.* 20:121-33 (2010); Chanda y otros, "Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Diseases of the Skeleton", *J. Cell Biochem.* 111(2):249-57 (2010); Hildner y otros, "State of the Art and Future Perspectives of Articular Cartilage Regeneration: A Focus on Adipose-derived Stem Cells and Platelet-derived Products", *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5(4):e36-51 (2011)).

35

30

40

45

50

55

60

Un factor clave en el desarrollo de cualquier terapia basada en células es encontrar métodos seguros y eficaces para expandir rápidamente las células autólogas de una manera que conserven su fenotipo y potencial de reparación *in vivo*. Para la ACI, la investigación se ha concentrado en definir los medios de cultivo y los factores de crecimiento usados para la expansión de los condrocitos articulares, así como también el diseño y formulación mejorados de los andamios usados para adherir las células y prepararlas para la reimplantación quirúrgica. Actualmente, la mayoría de los medios de cultivo usados para expandir los condrocitos articulares primarios contienen suero complementado con factores de crecimiento, que incluyen los miembros del factor de crecimiento transformante (TGF) ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) y las familias morfogénicas óseas (BMP) (2,4,6,12,13), factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y otros (*ver* Umlauf y otros, "Cartilage Biology, Pathology, and Repair", *Cell Mol. Life Sci.* 67(24):4197-211 (2010)). De manera similar, numerosos factores de transcripción influyen en la condrogénesis, que incluyen Sox9, β -catenina, las Smad y otros, lo que produce una expresión óptima de marcadores específicos de condrocitos. Sox9 en particular se requiere para la condensación previa al cartílago y la diferenciación de células condroprogenitoras en condroblastos (Lee y otros, "Sox9 Function in Craniofacial Development and Disease", *Genesis* 49(4):200-8 (2011)).

La evaluación de la calidad de los condrocitos de estos varios procedimientos de cultivo celular generalmente se basa en documentar la expresión de marcadores específicos de condrocitos, que incluyen diversos colágenos (por ejemplo, I y II), componentes de la matriz extracelular (por ejemplo, agrecano) y factores de crecimiento y de transcripción conocidos por influir en la condrogénesis. Desafortunadamente, aunque se han usado muchos sistemas de cultivo diferentes para evaluar la condrogénesis *in vitro* no existe un método de consenso y los procedimientos actuales no son muy eficaces para mantener el fenotipo condrogénico durante el período de expansión.

65

De manera similar, se han usado muchos métodos diferentes para expandir y diferenciar las MSC en condrocitos. Dado que las MSC representan una fracción muy pequeña de la población total de células de la médula ósea (BM), deben enriquecerse mediante técnicas tales como la citometría de flujo o expandirse en cultivo para obtener suficientes células para el trasplante. Estos procedimientos aumentan el riesgo de transformación y/o contaminación de la población de

células madre. Además, después de la expansión inicial, deben someterse a un período de diferenciación *in vitro* de varias semanas adicionales, y el potencial condrogénico de estos condrocitos "inducidos" permanece en duda (Dashtdar y otros, "Preliminary Study Comparing the Use of Allogenic Chondrogenic Pre-differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Full Thickness Articular Cartilage Defects in Rabbits", J. Orthop. Res. 29(9): 1336-42 (2011)).

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

Resumen de la invención

10 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* de producción de condrocitos. Este método implica seleccionar una población de células de mamífero que tenga el potencial de diferenciarse en condrocitos, seleccionadas de células de médula ósea, fibroblastos y células madre mesenquimales, y tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasa *in vitro* para transformar una o más de las células de la población seleccionada en condrocitos.

15 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para mejorar el fenotipo de una población de condrocitos. Este método incluye seleccionar una población de condrocitos de mamífero que tienen un fenotipo condrocítico pobre caracterizado por una baja expresión de colágeno 2A1, Sox9 y agregano; expresión elevada de colágeno 10; y/o baja tinción de proteoglicanos con Azul Alcian o Safranina O, y tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasa *in vitro* en donde, después de dicho tratamiento, la población seleccionada se caracteriza por una expresión elevada de colágeno 2A1, Sox9 y agregano; expresión reducida de colágeno 10; y/o tinción mejorada de proteoglicanos con Azul Alcian o Safranina O.

20 Se describe, además, un método para promover la condrogénesis. Este método incluye seleccionar una población de células de médula ósea que necesitan diferenciarse en condrocitos, primero tratar la población de células de médula ósea con una ceramidasa para enriquecer las células madre mesenquimales dentro de la población de células de médula ósea, y segundo tratar la población de células madre mesenquimales enriquecidas con una ceramidasa, o una ceramidasa y TGFβ, para promover la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos.

25 Se describe, además, un método para mantener una población de células en un estado diferenciado o aumentar el número de células de una población en un estado diferenciado. Este método incluye seleccionar una población de células que necesita mantenerse en un estado diferenciado o una población de células que necesita un mayor número de células en un estado diferenciado, y tratar la población de células seleccionada con una ceramidasa para mantener o aumentar el número de células diferenciadas en la población de células seleccionada.

30 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* de producción de células condrocíticas. Este método incluye seleccionar una población de células madre capaces de diferenciarse en células condrocíticas, seleccionar un medio de diferenciación capaz de estimular la diferenciación en las células diferenciadas deseadas, y cultivar *in vitro* la población de células madre en el medio de diferenciación y la proteína ceramidasa para estimular la diferenciación en la población de células condrocíticas.

35 La investigación se ha centrado en las enzimas implicadas en el metabolismo de los esfingolípidos, un grupo de más de 100 lípidos que comparten una cadena principal de base esfingoide común (esfingosina) y tienen efectos importantes en la supervivencia y diferenciación celular (por ejemplo, Nikolova-Karakashian y otros, "Sphingolipid Metabolism, Oxidant Signaling, and Contractile Function of Skeletal Muscle", Antioxid. Redox Signal 15(9):2501-17 (2011)). Por ejemplo, la ceramida es un potente lípido proapoptótico que interrumpe y reorganiza las plataformas de señalización incrustadas en la membrana, mientras que la esfingosina-1-fosfato (S1P) es un lípido proliferativo que puede secretarse desde las células y tiene potentes actividades mitogénicas. Un intermediario en la conversión de ceramida a SIP es la propia esfingosina, otro lípido de señalización importante. Las ceramidases son una clase de enzimas que hidrolizan la ceramida en esfingosina, que posteriormente se convierte en SIP (Mao y otros, "Ceramidases: Regulators of Cellular Responses Mediated by Ceramide, Sphingosine, and Sphingosine-1-phosphate", Biochem. Biophys. Acta 1781(9):424-34 (2008)). Es importante destacar que la única forma en que las células pueden generar esfingosina es por hidrólisis de ceramida mediante ceramidases (Okino y otros, "The Reverse Activity of Human Acid Ceramidase", J. Biol. Chem. 278(32):29948-53 (2003)). Por lo tanto, estas enzimas desempeñan funciones críticas en la regulación de estas vías de señalización de lípidos.

40 La ceramidasa ácida (AC, EC# 3.5.1.23) es una de las cinco ceramidases de mamíferos conocidas, cada una de las cuales se ha definido por su pH óptimo único y/o ubicaciones intracelulares. Históricamente, la AC ha sido la ceramidasa más estudiada debido a su participación en el trastorno genético humano resultante de su deficiencia, la lipogranulomatosis de Farber (FD, MIM #228000). La FD es un trastorno extremadamente raro, y los pacientes sobrevivientes a menudo presentan artritis juvenil y enfermedad articular degenerativa asociada con la acumulación de nódulos inflamatorios. Se han descrito además anomalías traqueales, lo que sugiere una función importante de la AC en el desarrollo del cartílago hialino.

65 Varios estudios adicionales han demostrado la importancia de la señalización de esfingolípidos en la homeostasis de los cartílagos. Por ejemplo, un informe temprano (Sabatini y otros, "Effects of Ceramide on Apoptosis, Proteoglycan

Degradation, and Matrix Metalloproteinase Expression in Rabbit Articular Cartilage", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267(1):438-444 (2000)) demostró que un derivado de ceramida sintético (ceramida C2) estimuló la expresión de MMP-1, 3 y 13 en condrocitos articulares de conejo e indujo la apoptosis de condrocitos. Gilbert y otros demostraron además que el tratamiento de condrocitos articulares bovinos con esfingomielinasa, una enzima que produce ceramida por hidrólisis de esfingomielina, disminuyó la expresión de colágeno II (Gilbert y otros, "Sphingomyelinase Decreases Type II Collagen Expression in Bovine Articular Cartilage Chondrocytes Via the ERK Signaling Pathway", *Arthritis Rheum.* 58(1):209-220 (2008)). La ceramida elevada también se ha documentado en pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis (Ciurtin y otros, "Correlation Between Different Components of Synovial Fluid and Pathogenesis of Rheumatic Diseases", *Rom. J. Intern. Med.* 44(2): 171-81 (2006)), y la inhibición de la producción de S1P en modelos inducidos de artritis de roedores ha dado resultados clínicos beneficiosos (Fitzpatrick y otros, "Attenuation of Arthritis in Rodents by a Novel Orally-available Inhibitor of Sphingosine Kinase", *Inflammopharmacology* 19(2):75-87 (2011)).

Además, se ha encontrado que los animales con deficiencias genéticas de enzimas implicadas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAG) (es decir, las mucopolisacaridosis, MPS), tienen numerosas anomalías en el metabolismo de los esfingolípidos en sus tejidos conectivos. Por ejemplo, la apoptosis de condrocitos y la degradación del cartilago en los animales con MPS se asocia con ceramida elevada, mientras que la hiperplasia sinovial se asocia con SIP elevada (Simonaro y otros, "Mechanism of Glycosaminoglycan-mediated Joint and Bone Disease: Implications for the Mucopolysaccharodoses and Other Connective Tissue Diseases", *Am. J. Path.* 172:112-122 (2008)). También puede detectarse una actividad elevada de AC en suero y líquido sinovial de los animales con MPS, probablemente una respuesta a la ceramida elevada.

Para estudiar aún más la función de AC en la señalización celular y la enfermedad, hace varios años se construyó un ratón con silenciamiento génico completo de AC y se descubrió que los embriones que carecían de AC no podían sobrevivir más allá de la etapa de 4 células y experimentaron apoptosis (Eliyahu y otros, "Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival", *FASEB J.* 21(7): 1403-9 (2007)). Esto condujo a la evaluación de los efectos de la AC recombinante (rAC) en la supervivencia de ovocitos y embriones *in vitro* lo que reveló que la complementación de medios con esta enzima podía retrasar la apoptosis y aumentar la supervivencia de células y/o embriones (Eliyahu y otros, "Acid Ceramidase Improves the Quality of Oocytes and Embryos and the Outcome of In Vitro Fertilization", *FASEB J.* 24(4):1229-38 (2010)). Estudios posteriores han evaluado los efectos antiapoptosis de rAC en otras células primarias, que incluyen las neuronas del hipocampo tratadas con la proteína A β (He y otros, "Deregulation of Sphingolipid Metabolism in Alzheimer's Disease", *Neurobiol. Aging* 31(3):398-408 (2010)) y células madre embrionarias de ratón.

Las ceramidases regulan el metabolismo de varios lípidos bioactivos importantes, que incluyen la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato. La presente invención muestra que la adición de rAC recombinante como un complemento del medio mejoró notablemente el fenotipo condrogénico de los condrocitos articulares de rata y caballo expandidos, así como también de los condrocitos humanos obtenidos de pacientes ancianos con osteoartritis. El fenotipo de los condrocitos se evaluó mediante una combinación de tinción histoquímica (Azul Alcian y Safranina O), transferencia Western (por ejemplo, Sox9, agregano, colágeno IIA1, TGF β 1, FGF2, etc.) y/o qPCR. Los efectos de rAC fueron evidentes en cultivos en monocapa y tridimensionales, que incluyeron células cultivadas en andamios de colágeno y geles de fibrina. La rAC redujo además el número de células apoptóticas en algunas condiciones de cultivo, lo que contribuyó a mejorar la calidad de las células en general. En la presente descripción se demuestra que los condrocitos articulares de ratas, equinos y humanos tratados una vez con rAC en cultivos en monocapa o sistemas de andamios tridimensionales tuvieron un fenotipo condrogénico mejorado después de la expansión celular de 2-3 semanas, que incluyó la expresión mejorada de Sox9, FGF2, colágeno II, agregano y otros marcadores condrogénicos.

Además de estos efectos en los condrocitos primarios, la rAC tuvo un impacto significativo en las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea. Aquí, se muestra que las células de médula ósea de rata, felino y equino cultivadas durante solo una semana en presencia de rAC producen aproximadamente dos veces más MSC, y que la rAC condujo a una condrogénesis mejorada de MSC. Cuando se añadió rAC a cultivos de médula ósea recién recolectada, se observó un enriquecimiento de aproximadamente dos veces de las MSC en una semana. La rAC también mejoró la diferenciación condrogénica de las MSC, como lo revelaron la histoquímica y la inmunotinción. Estos efectos se observaron mediante el uso de células de rata y caballo, y fueron sinérgicos con TGF β 1. Estos resultados demuestran que la rAC es un complemento importante que podría usarse para mejorar la calidad de las células usadas para la reparación de cartílagos basada en células, y puede ser útil *in vivo* para inducir la reparación endógena de cartílagos en combinación con otras técnicas. Por lo tanto, la rAC puede incluirse en medios usados para cultivar condrocitos primarios y/o medios de diferenciación de condrocitos para MSC para mejorar la producción y el potencial condrogénico de estas células para la reparación de cartílagos. La rAC también puede añadirse a andamios tridimensionales para inducir y/o mejorar la condrogénesis de las células *in vivo*. Se espera que otras ceramidases también puedan usarse para estos fines.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C son gráficos que ilustran el efecto de rAC sobre la actividad de AC (Figura 1A), ceramida (Figura 1B) y esfingosina (Figura 1C) de condrocitos articulares primarios de rata. Los datos se recolectaron a las 12 horas, 24 horas y 48 horas. Las muestras con rAC (*rAC) se indican con barras grises y las muestras sin rAC (rAC) se indican con barras negras. Los condrocitos articulares primarios de rata se aislaron y se cultivaron en cultivos en monocapa durante 48 horas

con o sin rAC (rAC, 200 U/ml) añadida al medio. En los momentos indicados, se extrajeron proteínas y lípidos de las células, y se determinaron los niveles de actividad de AC (Figura 1A), ceramida (Figura 1B) y esfingosina (Figura 1C). La adición de rAC al medio de cultivo condujo a una actividad de AC notablemente aumentada que se mantuvo durante al menos 48 horas. Además, a las 12 horas los niveles de ceramida fueron elevados, pero significativamente menores en las células tratadas con rAC (es decir, a las 48 horas las células tratadas con rAC no tenían elevación detectable de ceramida). Por último, los niveles de esfingosina, el producto de la hidrólisis de ceramida por AC, eran elevados en las células tratadas con rAC a las 48 horas.

Las Figuras 2A-2C muestran la expresión de marcadores condrogénicos en condrocitos articulares de rata. La Figura 2A ilustra los recuentos celulares totales para cultivos de condrocitos articulares de rata con y sin AC humana recombinante (rAC) (panel a la izquierda), y los resultados de la transferencia Western para Bax, PARP y GAPDH en cultivos de condrocitos articulares de rata con y sin rAC (panel a la derecha). Los condrocitos articulares de rata se obtuvieron de fémures y se cultivaron durante tres semanas en cultivos en monocapa mediante el uso de medio de cultivo estándar con o sin AC humana recombinante (rAC 200 U/ml). Se añadió rAC una vez al inicio de los cultivos. Al final del período de expansión de tres semanas, las células se recolectaron y analizaron. El recuento total de células no reveló diferencias significativas en presencia de rAC. De manera similar, la transferencia Western para dos marcadores de apoptosis (Bax y PARP) no reveló diferencias. La Figura 2B muestra transferencias Western para marcadores condrogénicos de los condrocitos expandidos. Los condrocitos expandidos se analizaron mediante transferencia Western para varios marcadores condrogénicos importantes, que incluyen los colágenos 1A2 y 2A1, agregano, Sox9, FGF-2 y TGFβ1. En todos los casos, estos marcadores de condrocitos estaban elevados en las células tratadas con rAC. El colágeno X se expresa a altos niveles en fibroblastos, pero no en condrocitos (es decir, un marcador "inverso" de condrogénesis). A diferencia de los colágenos 2A1 y 1A2, la expresión de colágeno X no se alteró significativamente por el tratamiento con rAC. La Figura 2C muestra las transferencias Western de condrocitos articulares de caballo para marcadores condrogénicos que incluyen Agregano, Sox9, Colágeno II, Bax y Actina, con y sin rAC. Los condrocitos articulares de caballo se obtuvieron quirúrgicamente de cabezas femorales y se congelaron. Después, las células congeladas se recuperaron y se cultivaron en cultivos en monocapa durante tres semanas sin rAC. A las tres semanas, las células se pasaron y se volvieron a sembrar a una densidad de 1×10^6 , y después se cultivaron durante una semana adicional con o sin rAC. Al final de este período de cultivo de una semana (P1), las células se analizaron mediante transferencia Western, lo que reveló que la expresión de dos marcadores condrogénicos, agregano y Sox9, era muy elevada en las células de caballo tratadas con rAC. Además, la expresión de Bax se redujo en las células rAC, lo que sugiere una reducción en la apoptosis por el tratamiento con rAC. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Las imágenes son representativas de experimentos individuales.

Las Figuras 3A-3B se refieren a la expresión de colágeno 2A1 en condrocitos de rata, con y sin rAC. La Figura 3A muestra la inmunohistoquímica confocal del colágeno 2A1 en condrocitos con y sin rAC (panel a la izquierda), así como también una representación gráfica del porcentaje de colágeno 2A1 en condrocitos con y sin rAC (panel a la derecha), lo que confirma el alto nivel de expresión del colágeno 2A1 en condrocitos de rata tratados con rAC. La Figura 3B muestra la inmunotinción confocal de Sox9 con y sin tratamiento con rAC, que muestra una distribución intracelular diferente de Sox9 dos semanas después del tratamiento con AC. El azul (DAPI) indica los núcleos y el rojo indica colágeno 2A1 y Sox9, respectivamente. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. Las imágenes son representativas de experimentos individuales. Barras de escala: 50 μm. * = $p < 0,05$.

Las Figuras 4A-4B se refieren a marcadores condrogénicos en condrocitos humanos primarios en dos pacientes con osteoartritis. La Figura 4A es un gráfico que compara varios marcadores condrogénicos (colágeno 2A1 (Col2a1), TGFβ, Sox9, agregano (ACAN) y colágeno X (Col10a1)) en el paciente 1, con y sin tratamiento con rAC (izquierda). Los condrocitos humanos primarios obtenidos de la cabeza femoral de una mujer de 74 años con osteoartritis (OA) se expandieron durante tres semanas en cultivo en monocapa con o sin adición de rAC al medio de cultivo (DMEM + FBS al 10 %, rAC se añadió una vez al inicio del cultivo; 170 U/ml de AC). La expresión del ARNm de los marcadores condrogénicos Col2a1, TGFβ1, Sox9 y ACAN se analizó por RT-PCR. Cabe señalar la influencia positiva de rAC en la expresión de estos marcadores. La expresión de Col10a1 no cambió en estos cultivos. El mismo experimento se repitió en un segundo conjunto de células de un paciente con osteoartritis (Paciente 2). La Figura 4B representa un gráfico que compara esos mismos marcadores condrogénicos en el paciente 2, con y sin rAC. El análisis de RT-PCR se realizó tres veces en células cultivadas en pocillos individuales. De acuerdo con los resultados obtenidos con condrocitos de rata y de equino (Figuras 2A-2C), no se encontraron diferencias significativas en el número de células (paneles a la derecha). * = $p < 0,05$.

Las Figuras 5A-5C se refieren a condrocitos cultivados en andamios tridimensionales de colágeno. La Figura 5A muestra imágenes de un andamio tridimensional de colágeno en el que se cultivaron condrocitos primarios de rata. Los condrocitos primarios de rata se sembraron en andamios tridimensionales de colágeno y se cultivaron durante 7 o 14 días con o sin rAC (DMEM que contenía suero al 10 %). Después se analizaron para determinar la morfología y la producción de proteoglicanos mediante tinción con Safranina O. Las células cultivadas con rAC eran más grandes y mantenían un fenotipo redondeado que se tiñó positivamente con Safranina O (flechas). Se muestran imágenes representativas de experimentos realizados tres veces. La Figura 5B representa una representación gráfica que compara la reducción celular en base a la tinción con Safranina O y H&E a los 7 y 14 días, con y sin rAC. La reducción celular se evaluó en base a la tinción con Safranina O y H&E mediante el uso de la siguiente ecuación: Tamaño de la unidad de ADN = π (diámetro del segmento de fibra/2)² × (longitud del segmento de miofibra) /núcleos de miofibra. * = $p < 0,05$. La Figura 5C muestra

condrocitos primarios de rata cultivados en geles de fibrina biodegradables con y sin rAC. Los condrocitos primarios de rata se cultivaron durante 2 semanas en geles de fibrina biodegradables con o sin rAC en el medio de cultivo. La tinción con Azul Alcían, otro marcador de expresión de proteoglicanos, indicó condrogénesis mejorada (color azul más intenso). El experimento se realizó dos veces. * = $p < 0,05$.

5

Las Figuras 6A-D se refieren a células madre mesenquimales (MSC) cultivadas en presencia y ausencia de rAC. En la Figura 6A, se muestra el número de unidades formadoras de colonias en la médula ósea de rata, con y sin rAC. Las células de médula ósea de rata se aislaron y se cultivaron durante una semana con o sin rAC en medios de cultivo estándar. Se añadió rAC a los medios de cultivo una vez en la siembra inicial (5×10^6 células/cm²). El número de las MSC en los cultivos en una semana se determinó mediante dos ensayos: el número de unidades formadoras de colonias similares a fibroblastos (CFU-F) y por citometría de flujo. En la Figura 6B, se muestra la citometría de flujo (CD90+/CD45-) en las MSC de médula ósea de rata, con rAC y sin rAC. Se observó un aumento aproximado de dos a tres veces en el número de las MSC de rata mediante el uso de rAC. La Figura 6C muestra el número de unidades formadoras de colonias en células felinas (sembradas a una densidad de $1 - 5 \times 10^6$ células/cm²), con rAC y sin rAC, mientras que la Figura 6D muestra el número de unidades formadoras de colonias en células equinas (sembradas a 3×10^8 células/cm²), con y sin rAC. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$.

10

15

Las Figuras 7A-D se refieren a células de médula ósea de rata aisladas usadas para preparar poblaciones homogéneas de MSC que se colocaron en medio de diferenciación de condrocitos, con o sin rAC. En la Figura 7A, se muestran los resultados de células de médula ósea de rata en medio de cultivo, con o sin rAC, y con o sin TGFβ1 (panel a la izquierda). La Figura 7A ilustra además una comparación gráfica del área del sedimento de células en presencia o ausencia de rAC con o sin TGFβ1 (panel a la derecha). Las células de médula ósea de rata se aislaron y se expandieron durante tres semanas en medio de cultivo estándar (sin rAC) para preparar poblaciones homogéneas de MSC. Después se colocaron en medio de diferenciación de condrocitos (Tecnología de células madre) con o sin TGFβ1 y/o rAC. Los cultivos en sedimento de células se cultivaron durante tres semanas para preparar condrocitos, y después se fijaron y analizaron mediante tinción con Azul Alcían y Safranina O, marcadores de condrogénesis. Los sedimentos de células pequeños y mal formados en ausencia de TGFβ1 y rAC son evidentes (parte superior izquierda). TGFβ1 es un complemento estándar usado para inducir la diferenciación de las MSC de médula ósea a condrocitos. La adición de TGFβ1 o rAC a los cultivos de forma independiente solo tuvo un efecto modesto sobre el tamaño y la tinción de los sedimentos de células (parte superior derecha e inferior izquierda). Sin embargo, la inclusión de ambas proteínas en el medio de cultivo tuvo un efecto mucho más significativo (parte inferior derecha), tanto en el tamaño de los sedimentos de células como en la intensidad de la tinción. El tamaño de los sedimentos de células es un indicador del número de condrocitos y la intensidad de la tinción es una medida de la deposición de proteoglicanos. Las Figuras 7B-D muestran inmunotinción de células de médula ósea de rata contra Sox9, Agrecano y colágeno 2A1, respectivamente. Los experimentos se realizaron con tres ratas independientes. Se muestran imágenes representativas de un experimento. El azul (DAPI) indica los núcleos y el rojo indica Sox9, Agrecano o Colágeno IIA1, respectivamente. Las imágenes fusionadas están a la derecha. Barras de escala: 50 μm. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$.

20

25

30

35

Las Figuras 8A-E muestran los resultados de células de médula ósea de caballo aisladas usadas para preparar poblaciones homogéneas de MSC que se colocaron en medio de diferenciación de condrocitos, con o sin rAC. En la Figura 8A, las células de médula ósea de caballo se aislaron y se expandieron durante tres semanas en medio de cultivo estándar (sin rAC) para preparar poblaciones homogéneas de MSC. Después se colocaron en medio de diferenciación de condrocitos que contiene TGFβ1, pero con o sin rAC. Los cultivos en sedimento de células se cultivaron durante tres semanas para preparar condrocitos, y después se fijaron y analizaron mediante tinción con Azul Alcían y Safranina O. Los sedimentos de células más pequeños y difusos en ausencia de rAC son evidentes. Los sedimentos de células se sometieron además a inmunotinción contra Sox9 (Figura 8B), Agrecano (Figura 8C) o Colágeno IIA1 (Figura 8D). La mayor intensidad de expresión de Sox9, Agrecano y Colágeno IIA1 en los sedimentos de células es notable. En la Figura 8E, los sedimentos de células se sometieron además a una inmunotinción contra Colágeno X. Puede observarse una expresión disminuida de Colágeno X en los sedimentos de células expuestos a rAC. El azul (DAPI) indica núcleos, y el rojo indica Sox9, Agrecano o Colágeno IIA1, o Colágeno X, respectivamente. Las imágenes fusionadas están a la derecha. Barras de escala: 50 μm. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$.

40

45

50

Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* de producción de condrocitos. Este método implica seleccionar una población de células de mamífero que tenga el potencial de diferenciarse en condrocitos, seleccionadas de células de médula ósea, fibroblastos y células madre mesenquimales, y tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasa *in vitro* para transformar una o más de las células de la población seleccionada en condrocitos.

60

Las células que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos incluyen células de médula ósea, fibroblastos, y células madre mesenquimales (*ver* 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. Rheum. Dis.* 57:495-9 (1998)).

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

5 En este y en todos los aspectos de la presente invención que implican 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.

10 Las ceramidases hidrolizan el enlace amida de las ceramidas para generar ácidos grasos libres y bases esfingoides (Nikolova-Karakashian y otros, *Methods Enzymol.* 311:194-201 (2000), Hassler y otros, *Adv. Lipid Res.* 26:49-57 (1993)). Hay tres tipos de ceramidases descritos hasta la fecha (Nikolova-Karakashian y otros, *Methods Enzymol.* 311:194-201 (2000)). Estas se clasifican en ceramidases ácidas, neutras y alcalinas de acuerdo con su pH óptimo de actividad enzimática.

15 Las ceramidases ácidas tienen una actividad enzimática óptima a un pH de 1-5. La ceramidasa ácida murina fue la primera ceramidasa que se clonó (Koch y otros, *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 enfermedad de Farber (Koch y otros, *J. Biol. Chem.* 271:33110-33115 (1996)).

20 Las ceramidases neutras se han purificado del cerebro de rata (El Bawab y otros, *J. Biol. Chem.* 274:27948-27955 (1999)) y el hígado de ratón (Tani y otros, *J. Biol. Chem.* 275:3462-3468 (2000)), y se clonaron de *Pseudomonas* (Okino y otros, *J. Biol. Chem.* 274:36616-36622 (1999)), micobacterias (Okino y otros, *J. Biol. Chem.* 274:36616-36622 (1999)), ratón (Tani y otros, *J. Biol. Chem.* 275:11229-11234 (2000)) y de humano (El Bawab y otros, *J. Biol. Chem.* 275:21508-21513 (2000)). Estas ceramidases comparten una homología significativa, y esta homología se extiende a proteínas putativas deducidas de secuencias de etiqueta de secuencia expresada (EST) de *Dictyostelium discoideum* y *Arabidopsis thaliana* (Okino y otros, *J. Biol. Chem.* 274:36616-36622 (1999), El Bawab y otros, *J. Biol. Chem.* 275:21508-21513 (2000)). Estas ceramidases tienen un pH óptimo amplio que varía de 5 a 9 para su actividad (Tani y otros, *J. Biol. Chem.* 275:11229-11234 (2000), El Bawab y otros, *J. Biol. Chem.* 275:21508-21513 (2000)). Parecen hidrolizar preferentemente la ceramida insaturada, ligeramente, la ceramida saturada (dihidroceramida) y apenas hidrolizan la fitoceramida (Tani y otros, *J. Biol. Chem.* 275:11229-11234 (2000)). Las ceramidases neutras de *Pseudomonas*, de ratón y de humano tienen una actividad de ceramidasa inversa de catalizar la formación de ceramida a partir de la esfingosina y un ácido graso (Okino y otros, *J. Biol. Chem.* 274:36616-36622 (1999), Tani y otros, *J. Biol. Chem.* 275:11229-11234 (2000), Kita y otros, *Biochim. Biophys. Acta* 1485:111-120 (2000)). El Bawab y otros (El Bawab y otros, *J. Biol. Chem.* 275:21508-21513 (2000)) han demostrado previamente que la ceramidasa neutra humana se localiza en las mitocondrias.

40 Las ceramidases alcalinas tienen una actividad óptima a un pH de 9-14. Se purificaron dos ceramidases alcalinas a partir de epidermis de piel de conejillo de indias. Estas dos enzimas estaban unidas a la membrana, y sus masas moleculares estimadas en SDS-PAGE fueron de 60 y 148 kDa, respectivamente (Yada y otros, "Purification and Biochemical Characterization of Membrane-Bound Epidermal Ceramidases from Guinea Pig Skin", *J. Biol. Chem.* 270:12677-12684 (1995)). No se continuaron otros estudios sobre estas dos proteínas. Dos ceramidases alcalinas de levadura (*S. cerevisiae*), la fitoceramidasa (YPC1p) y la dihidroceramidasa (YDC1p), también se clonaron y se caracterizaron parcialmente (Mao y otros, "Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces Cerevisiae*. An Enzyme with Reverse (CoA-independent) Ceramide Synthase Activity", *J. Biol. Chem.* 275:6876-6884 (2000); Mao y otros, "Cloning and Characterization of a *Saccharomyces Cerevisiae* Alkaline Ceramidase with Specificity for Dihydroceramide", *J. Biol. Chem.* 275:31369-31378 (2000)). YPC1p se clonó como un supresor de copia alta de la inhibición del crecimiento de FB1 ya que tiene actividad ceramida sintasa resistente a fumonisina. La segunda ceramidasa alcalina, YDC1p, se identificó por homología de secuencia con YPC1p. Una búsqueda en bases de datos revela que YPC1p y YDC1p no son homólogas a ninguna proteína con funciones conocidas, pero son homólogas a proteínas putativas de *Arabidopsis*, *C. elegans*, péptidos deducidos de secuencias EST de humano, de ratón, cerdo, pez cebra y de secuencias genómicas humanas. Se identificó una homóloga de humano y se clonó su ADNc. Los resultados preliminares muestran que esta homóloga de humano es además una ceramidasa alcalina que hidroliza selectivamente phytoCer.

55 Las ceramidases adecuadas para el uso en este y todos los aspectos de la presente invención incluyen ceramidasa ácida (AC), ceramidasa neutra, ceramidasa alcalina y otras ceramidases. En todos los aspectos de la presente invención, la ceramidasa puede ser homóloga (*es decir*, derivada de la misma especie) o heteróloga (*es decir*, derivada de una especie diferente) al tejido, células y/o sujeto que se trata. Las proteínas precursoras de ceramidases (*por ejemplo*, AC) experimentan escisión autoproteolítica en la forma activa (compuesta por subunidades α y β). Esto se estimula por el entorno intracelular, y en base a las secuencias altamente conservadas en el sitio de escisión de las proteínas precursoras de ceramidases a través de las especies, se espera que ocurra en la mayoría, si no en todos, los tipos de células. Por lo tanto, la ceramidasa como se usa en la presente descripción incluye tanto ceramidases activas como proteínas precursoras de ceramidases, que se convierten después en proteínas ceramidases activas. Se contemplan modalidades en las cuales la proteína precursora es captada por la célula de interés y de esta manera 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).

Preferentemente, la ceramidasa es una AC (*N*-acilesfingosina desacilasa, Enzima núm. I.U.B.M.B. EC 3.5.1.23). La proteína AC se ha purificado a partir de varias fuentes, y se han obtenido los ADNc y los genes humanos y de ratón. 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. 271:33110-5 (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). Las AC activas y las proteínas precursoras de AC que pueden usarse en este y todos los aspectos de la presente invención incluyen, sin limitación, las que se exponen en la Tabla 1 a continuación.

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

<i>Homo sapiens</i>		<i>Caenorhabditis elegans</i>	
UniProt	Q13510, Q9H715, Q96AS2	UniProt	O45686
OMIM	228000	IntAct	O45686
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	Acceso NCBI	O45686, CAB05556
<i>Mus musculus</i>		<i>Danio rerio</i>	
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
<i>Gallus</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
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
<i>Pan troglodytes</i>			
Gen NCBI		464022	
RefSeq NCBI		XP_519629	
RefSeq NCBI		XM_519629	
UniGene NCBI		464022	

El tratamiento de acuerdo con este aspecto de la presente invención se lleva a cabo al poner en contacto la población de células con la ceramidasa (*por ejemplo*, AC), mediante el uso de métodos que serán evidentes para el experto en la técnica.

En algunas modalidades, el tratamiento se lleva a cabo mediante la introducción de una proteína ceramidasa en las células de la población. Un enfoque para el suministro de proteínas o agentes polipeptídicos (*por ejemplo*, ceramidasa activa, proteínas precursoras de ceramidasa) implica la conjugación de la proteína o polipéptido deseado con 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 adicional para el suministro de proteínas o agentes polipeptídicos implica la preparación de proteínas quiméricas de acuerdo con la patente de Estados Unidos núm. 5,817,789 de Heartlein y otros. La proteína quimérica puede incluir un dominio de ligando y el agente polipeptídico (*por ejemplo*, ceramidasa ácida, otra ceramidasa, proteína precursora de ceramidasa ácida, otras proteínas precursoras de ceramidasa). El dominio de ligando es específico para receptores situados en una célula objetivo. Por lo tanto, 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.

En algunas modalidades, la ceramidasa (*por ejemplo*, AC) puede administrarse mediante la introducción en la célula de una molécula de ácido nucleico que codifica la ceramidasa (ya sea la ceramidasa activa o la proteína precursora de ceramidasa, como se describió anteriormente) (JOSEPH SAMBROOK & DAVID W. RUSSELL, 1-3 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (3ra ed. 2001); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Frederick M. Ausubel y otros Eds., 1999); patente de Estados Unidos núm. 4,237,224 de Cohen & Boyer). Las moléculas de ácido nucleico adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las que se exponen en la Tabla 1, *supra*.

Los agentes de ácido nucleico para el uso en los métodos de la presente invención pueden suministrarse a una célula de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede estar contenido dentro de un vector, *por ejemplo*, un vector que puede transferirse a la(s) célula(s) y proporcionar la expresión del ácido nucleico en la misma. Dichos vectores incluyen vectores cromosómicos (*por ejemplo*, cromosomas artificiales), vectores no cromosómicos y ácidos nucleicos sintéticos. Los vectores incluyen plásmidos, virus y fagos, tales como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores adenoasociados.

Los agentes de ácido nucleico pueden transferirse a la(s) célula(s) mediante el uso de métodos *ex vivo*, como será evidente para el experto en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos y los vectores pueden suministrarse a las células por medios físicos, *por ejemplo*, por electroporación, lípidos, lípidos catiónicos, liposomas, pistola de ADN, precipitación con fosfato de calcio, inyección o suministro de ácido nucleico desnudo.

Como alternativa al suministro no infeccioso de ácidos nucleicos como se describió anteriormente, pueden usarse ADN desnudo o vectores de transformación infecciosos para el suministro, según lo cual el ADN desnudo o el vector de transformación infeccioso contiene un gen recombinante que codifica la ceramidasa ácida/proteína precursora de ceramidasa ácida. La molécula de ácido nucleico se expresa después en la célula transformada.

El gen recombinante incluye, operativamente acoplado entre sí, un promotor aguas arriba operable en la célula en la que se va a expresar el gen y opcionalmente otros elementos reguladores adecuados (*es decir*, elementos potenciadores o inductores), una secuencia codificante que codifica el ácido nucleico y una región de terminación de la transcripción aguas abajo. Puede usarse cualquier promotor constitutivo o promotor inducible adecuado para regular la transcripción del gen recombinante, y un experto en la técnica puede seleccionar y utilizar fácilmente tales promotores, ya sean conocidos o desarrollados en el futuro. Además, el promotor puede ser específico para la expresión en la(s) célula(s) cuya supervivencia se va a promover. Además, los promotores específicos de tejido pueden hacerse inducibles/reprimibles mediante el uso, *por ejemplo*, de un elemento de respuesta TetO. Además, pueden usarse otros elementos inducibles. Pueden utilizarse además técnicas recombinantes conocidas para preparar el gen recombinante, transferirlo al vector de expresión (si se usa) y administrar el vector o el ADN desnudo a la célula. Los procesos ilustrativos se describen en SAMBROOK & RUSSELL, 1-3 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (3ra ed. 2001). Un experto en la técnica puede modificar fácilmente estos procesos, según lo desee, mediante el uso de variaciones conocidas de los procesos descritos en la misma.

Puede usarse cualquier vector de transformación viral o infeccioso adecuado. Los vectores virales ilustrativos incluyen, sin limitación, adenovirus, virus adenoasociados y vectores retrovirales (que incluyen vectores lentivirales).

Los vehículos de suministro de genes de adenovirus pueden prepararse y utilizarse fácilmente dada la descripción proporcionada en Berkner, "Development of Adenovirus Vectors for the Expression of Heterologous Genes", *Biotechniques* 6:616-29 (1988); Rosenfeld y otros, "Adenovirus-mediated Transfer of a Recombinant α 1-antitrypsin Gene to the Lung Epithelium in Vivo", *Science* 252:431-434 (1991); la publicación PCT núm. WO/1993/007283 de Curiel y otros; la publicación PCT núm. WO/1993/006223 de Perricaudet y otros; y la publicación PCT núm. WO/1993/007282 de Curiel y otros. Los tipos adicionales de vectores adenovirus se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,057,155 de Wickham y otros; la patente de Estados Unidos núm. 6,033,908 de Bout & Hoeben; la patente de Estados Unidos núm. 6,001,557 de Wilson y otros; la patente de Estados Unidos núm. 5,994,132 de Chamberlain & Kumar-Singh; la patente de Estados Unidos núm. 5,981,225 de Kochanek & Schniedner; la patente de Estados Unidos núm. 5,885,808 de Spooner & Epenetos; y la patente de Estados Unidos núm. 5,871,727 de Curiel.

Los vehículos de suministro de genes virales adenoasociados pueden construirse y usarse para suministrar a las células un gen recombinante que codifica un ácido nucleico deseado. El uso de vehículos de suministro de genes virales adenoasociados *in vitro* se describe en Chatterjee y otros, "Dual-target Inhibition of HIV-1 in Vitro by Means of an Adeno-associated Virus Antisense Vector", *Science* 258:1485-8 (1992); Walsh y otros, "Regulated High Level Expression of a Human γ -Globin Gene Introduced into Erythroid Cells by an Adeno-associated Virus Vector", *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:7257-61 (1992); Walsh y otros, "Phenotypic Correction of Fanconi Anemia in Human Hematopoietic Cells with a Recombinant Adeno-associated Virus Vector", *J. Clin. Invest.* 94:1440-8 (1994); Flotte y otros, "Expression of the Cystic

Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator from a Novel Adeno-associated Virus Promoter", J. Biol. Chem. 268:3781-90 (1993); Ponnazhagan y otros, "Suppression of Human α -Globin Gene Expression Mediated by the Recombinant Adeno-associated Virus 2-based Antisense Vectors", J. Exp. Med. 179:733-8 (1994); Miller y otros, "Recombinant Adeno-associated Virus (rAAV)-mediated Expression of a Human γ -Globin Gene in Human Progenitor-derived Erythroid Cells", Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:10183-7 (1994); Einerhand y otros, "Regulated High-level Human β -Globin Gene Expression in Erythroid Cells Following Recombinant Adeno-associated Virus-mediated Gene Transfer", Gene Ther. 2:336-43 (1995); Luo y otros, "Adeno-associated Virus 2-mediated Gene Transfer and Functional Expression of the Human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor", Exp. Hematol. 23:1261-7 (1995); y Zhou y otros, "Adeno-associated Virus 2-mediated Transduction and Erythroid Cell-specific Expression of a Human β -Globin Gene", Gene Ther. 3:223-9 (1996).

Los vectores retrovirales que se han modificado para formar sistemas infecciosos de transformación pueden usarse además para suministrar un gen recombinante que codifica un producto de ácido nucleico deseado en una célula objetivo. Uno de estos tipos de vectores retrovirales se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,849,586 de Kriegler y Perez. Además, pueden utilizarse vectores de lentivirus, que incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,790,657 de Aryay la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0170962 de Kafri y otros y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0147026 de Arya.

La cantidad de ceramidas a usar variará, por supuesto, en dependencia de las condiciones particulares. Generalmente, la ceramidas se usa en una cantidad suficiente para producir condrocitos. La cantidad requerida para obtener el efecto deseado puede variar en dependencia del tipo de célula, las condiciones de cultivo y la duración en la que se desea que se produzcan condrocitos. Las cantidades eficaces pueden determinarse empíricamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, esto puede implicar ensayos en los que se administran cantidades variables de ceramidas a las células en cultivo y se calcula la concentración eficaz para obtener el resultado deseado.

El tratamiento con ceramidas *por ejemplo*, AC) puede llevarse a cabo con la frecuencia que se requiera y durante un tiempo que sea adecuado para promover la diferenciación en condrocitos. Por ejemplo, el tratamiento puede llevarse a cabo una vez o múltiples veces.

En al menos una modalidad, el método incluye además tratar la población de células seleccionada con uno o más factores de crecimiento transformantes beta ($TGF\beta$) junto con ceramidas. Las proteínas $TGF\beta$ regulan varios aspectos del desarrollo embrionario y se expresan en el entorno de las células progenitoras simpaticosuprarrenales (Wall y otros, "TGF-beta Related Genes in Development", Curr. Opin. Genet. Dev. 4:517 (1994)). Las proteínas $TGF\beta$ son reconocibles por la homología del polipéptido C-terminal y su señalización mediante las proteínas similares a las madres contra el decantaplégico (SMAD) después de unirse a los receptores de $TGF\beta$. Los ejemplos incluyen $TGF\beta$ 1-3, proteínas morfogénicas óseas (BMP), etc. En algunos sistemas, el $TGF\beta$ regula la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Pateder y otros, "PTHrP Expression in Chick Sternal Chondrocytes is Regulated by TGF-beta Through Smad-mediated Signaling", J. Cell Physiol. 188:343 (2001)). Se cree que las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDF) desempeñan una función central durante la esqueletogénesis, que incluye la formación de articulaciones (Francis-West y otros, "BMP/GDF-signalling Interactions During Synovial Joint Development", Cell Tissue Res. 296(1):111-119 (1999); ver la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2011/0129867 de Thies).

En al menos una modalidad, el tratamiento implica cultivar la población de células en un medio de cultivo que contiene la ceramidas, una molécula de ácido nucleico que codifica la ceramidas, y/o una célula que contiene (y expresa) la molécula de ácido nucleico y que secreta la ceramidas en el medio de cultivo.

El tratamiento de acuerdo con este y todos los aspectos de la presente invención se lleva a cabo *in vitro*. 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 al menos una modalidad, el tratamiento se lleva a cabo sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, sin limitación, soportes de cultivo en monocapa, andamios tridimensionales de tejidos, hidrogeles y andamios de espuma fabricados de biomateriales reabsorbibles. Un andamio tridimensional de células debe poseer suficiente resistencia mecánica para mantener su forma y estructura en respuesta a la presión ejercida por el tejido circundante tras la implantación *in situ* y a la tensión ejercida sobre el andamio por las células en el interior del andamio. El objetivo de la estructura del andamio y las células en el interior del andamio o las células nativas del tejido circundante, es realizar la función de las células o tejidos nativos que deben complementar o reemplazar. En consecuencia, el andamio tridimensional debería proporcionar un entorno que permita el crecimiento y la diferenciación de las células del andamio en el tejido. Se conocen bien varios andamios para la implantación en un receptor (ver, *por ejemplo*, las publicaciones de patente de Estados Unidos núm. 2004/0126405 de Sahatjian y otros, 2005/0107868 de Nakayama y otros, 2006/0039947 de Schmidmaier y otros y la publicación PCT núm. WO/2008/003320 de Ulrich-Vinther y otros). El tratamiento puede llevarse a cabo además en matriz de gel, tal como un hidrogel. Los ejemplos de matrices de gel que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, gel de colágeno, pegamento de fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, gel de óxido de

5 polietileno, gel de alginato o alginato de calcio, poli-(metacrilato de 2-hidroxiétilo) (es decir, un hidrogel), poliortoéster, ácido hialurónico, polianhídrido, quitosana, gelatina, agarosa y otros materiales bioreabsorbibles y biocompatibles tales como los descritos en el documento EP 0705878 A2 de Burns y otros y la patente de Estados Unidos núm. 8153117 de Binette y otros. Para promover la proliferación y función de los condrocitos, el gel biológico puede contener adicionalmente nutrientes apropiados (por ejemplo, suero, sales tal como cloruro de calcio, ácido ascórbico y aminoácidos) y factores de crecimiento (por ejemplo, somatomedina, factor de crecimiento básico de fibroblastos, factor de crecimiento transformante β (como se describió *supra*), factor de crecimiento de cartilago, factor de crecimiento derivado de huesos o combinaciones de estos).

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para mejorar el fenotipo de una población de condrocitos. Este método incluye seleccionar una población de condrocitos que tienen un fenotipo condrocítico pobre caracterizado por una baja expresión de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; expresión elevada de colágeno 10; y/o baja tinción de proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O, y tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasas *in vitro* en donde, después de dicho tratamiento, la población seleccionada se caracteriza por una expresión elevada de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; expresión reducida de colágeno 10; y/o tinción mejorada de proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O.

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

25 El fenotipo condrocítico se determina mediante la evaluación de uno o más marcadores de condrocitos, *es decir*, una sustancia cuya localización o expresión en un condrocito ayuda a la identificación del condrocito. Estos incluyen, por ejemplo, colágeno 2A1, colágeno 10, colágeno tipo IX, colágeno tipo XI, Sox9, agrecano, GAPDH, TGF β 1, FGF-2, proteoglicano de cartilago (aglicano) o componentes de estos, ácido hialurónico y condromodulina.

30 Un fenotipo condrogénico pobre se caracteriza por una baja expresión de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; expresión elevada de colágeno 10; baja tinción de proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O; y/o baja expresión de otros factores de crecimiento específicos de condrocitos. En al menos una modalidad, un fenotipo condrogénico mejorado se caracteriza por una expresión elevada de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; baja expresión de colágeno 10; tinción mejorada de proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O; y/o expresión elevada de otros factores de crecimiento específicos de condrocitos.

35 Las ceramidasas y métodos adecuados para tratar la población de células con ceramidasas incluyen todos los expuestos *supra*.

40 Se describe, además, un método para promover la condrogénesis. Este método incluye seleccionar una población de células de médula ósea que necesitan diferenciarse en condrocitos, tratar la población de células de médula ósea con una ceramidasas para enriquecer las células madre mesenquimales dentro de la población de células de médula ósea y tratar la población de células madre mesenquimales enriquecidas con una ceramidasas, o una ceramidasas y TGF β , para promover la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos.

45 Las células de médula ósea adecuadas incluyen células de médula ósea de mamífero, *por ejemplo*, células de médula ósea humana, células de médula ósea equina, células de médula ósea porcina, células de médula ósea felina y células de médula ósea canina. Las células de médula ósea humana se prefieren particularmente.

50 En al menos una modalidad, el método incluye además tratar los condrocitos con una ceramidasas para mejorar el fenotipo de los condrocitos, como se discutió *supra*.

Las ceramidasas y métodos adecuados para tratar las poblaciones de células con ceramidasas incluyen todos los expuestos *supra*.

55 Se describe, además, un método para mantener una población de células en un estado diferenciado o aumentar el número de células de una población en un estado diferenciado. Este método incluye seleccionar una población de células que necesita mantenerse en un estado diferenciado o una población de células que necesita un mayor número de células en un estado diferenciado y tratar la población de células seleccionada con una ceramidasas para mantener o aumentar el número de células diferenciadas en la población de células seleccionada.

60 Las poblaciones de células adecuadas de acuerdo con este aspecto incluyen poblaciones de células de mamífero, *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 se prefieren particularmente.

65 En al menos una modalidad, las células diferenciadas son células primarias. Las células diferenciadas adecuadas incluyen, sin limitación, condrocitos, neuronas, hepatocitos, células óseas, células pulmonares y células cardíacas. En una modalidad preferida, las células son condrocitos. Los condrocitos adecuados incluyen los descritos *supra*.

5 En al menos una modalidad, el número de células diferenciadas en la población de células se mantiene. En al menos una modalidad, el número de células diferenciadas en la población de células aumenta. 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.

Las ceramidasas y métodos adecuados para tratar las poblaciones de células con ceramidasas incluyen todos los expuestos *supra*.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* de producción de una población de células condrocíticas. Este método incluye seleccionar una población de células madre capaces de diferenciarse en células condrocíticas, seleccionar un medio de diferenciación capaz de estimular la diferenciación en las células diferenciadas deseadas, y cultivar *in vitro* la población de células madre en el medio de diferenciación y la proteína ceramidasas para estimular la diferenciación en la población de células condrocíticas.

15 Las células madre adecuadas de acuerdo con este aspecto de la presente invención 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, y células madre cardíacas.

20 Las células diferenciadas de este aspecto de la presente invención son condrocitos. La selección de células madre adecuadas y de medios de diferenciación adecuados para producir las células diferenciadas deseadas será evidente para el experto en la técnica.

25 Las ceramidasas adecuadas incluyen todas las expuestas *supra*.

El cultivo de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede llevarse a cabo como se describió anteriormente.

30 Además, se describe el cultivo que se lleva a cabo *in vivo*, *por ejemplo*, en el cuerpo de un sujeto mamífero. Los sujetos mamíferos adecuados incluyen sujetos humanos, sujetos equinos, sujetos porcinos, sujetos felinos y sujetos caninos. La población de células madre puede producirse por el sujeto o, alternativamente, la población de células madre (que puede ser homóloga o heteróloga) puede introducirse artificialmente en el sujeto. El medio de diferenciación puede ser un medio de diferenciación comercial o un medio de diferenciación natural producido por el sujeto. Además de los métodos de cultivo descritos *supra*, el cultivo de acuerdo con estas modalidades puede incluir, por ejemplo: implantar en el sujeto un soporte sólido como se describió anteriormente (*por ejemplo*, un andamio de tejido) que tiene la ceramidasas dispuesta sobre el mismo y/o en el mismo, administrar la ceramidasas al sujeto en un sitio de tejido que contiene la población de células madre y/o dañar selectivamente un tejido del sujeto para estimular la producción del medio de diferenciación.

40 En todas las modalidades que implican administrar la ceramidasas a un sujeto, puede administrarse una ceramidasas activa, proteína precursora de ceramidasas y/o ácido nucleico que codifica la ceramidasas/proteína precursora de ceramidasas. 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 ceramidasas puede administrarse en un área no dirigida junto con uno o más agentes que faciliten la migración de la ceramidasas a (y/o la captación por) un tejido, órgano o célula objetivo. 45 Adicionalmente y/o alternativamente, la ceramidasas en sí misma puede modificarse para facilitar su transporte a (y la captación por) el tejido, órgano o célula deseados, como será evidente para un experto en la técnica.

Típicamente, la ceramidasas se administrará a un sujeto en un vehículo que suministra la ceramidasas a la célula, tejido u órgano objetivo. Las rutas ilustrativas de administración incluyen, sin limitación, por inoculación intratraqueal, aspiración, 50 instilación de las vías respiratorias, aplicación de aerosol, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, por vía tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraarterial (tal como *mediante* la arteria pulmonar), inyección intramuscular, instilación intrapleural, por vía intraventricular, por vía intralesional, por aplicación a las membranas mucosas (tales como las de la nariz, la garganta, los bronquios, los genitales, y/o el ano), o implantación de un vehículo de liberación mantenida.

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

60 La 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 la comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, la 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 ceramidasas. El porcentaje de ceramidasas en estas 65 composiciones puede variarse, por supuesto, y convenientemente puede estar entre aproximadamente 2 % y

aproximadamente 60 % del peso de la unidad. La cantidad de ceramidasa en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal, que se obtendrá una dosis adecuada.

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

10 La ceramidasa puede administrarse además por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de ceramidasa pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un tensioactivo, tal como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse además en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos en aceites. Los aceites ilustrativos son los originados del petróleo, de animales, vegetales o sintéticos, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, y los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son los portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 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 que sea fácilmente inyectable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse 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, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de estos, y aceites vegetales.

25 La ceramidasa puede administrarse además directamente a las vías respiratorias en forma de aerosol. Para el 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 ceramidasa puede administrarse además en una forma no presurizada.

30 Los dispositivos de suministro ilustrativos incluyen, sin limitación, nebulizadores, atomizadores, liposomas (que incluyen técnicas de suministro activo y pasivo de fármacos) (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); la patente de Estados Unidos núm. 5,653,996 de Hsu; la patente de Estados Unidos núm. 5,643,599 de Lee y otros; la patente de Estados Unidos núm. 5,885,613 de Holland y otros; la patente de Estados Unidos núm. 5,631,237 de Dzau y Kaneda; y la 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. Biophys. 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.

45 La administración puede llevarse a cabo con la frecuencia que se requiera y durante un período adecuado para proporcionar un tratamiento eficaz. Por ejemplo, la administración puede llevarse a cabo con una formulación de dosificación de liberación mantenida única o con múltiples dosis diarias.

50 La cantidad a administrar variará, por supuesto, en dependencia del régimen de tratamiento. La dosis requerida para obtener una cantidad eficaz puede variar en dependencia del agente, la formulación y el individuo al que se administra el agente.

55 Típicamente, la ceramidasa se administrará como una formulación farmacéutica que incluye la ceramidasa y cualquiera de los adyuvantes, portadores, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, y puede estar en forma sólida o líquida, tal como tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Las composiciones contienen preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 por ciento en peso, con mayor preferencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 por ciento en peso de ceramidasa junto con los adyuvantes, portadores y/o excipientes. En algunas modalidades, una cantidad eficaz varía de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunas modalidades, la cantidad eficaz del agente varía de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o de aproximadamente 1 o 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

65 Además, se describen métodos para tratar una determinada enfermedad o trastorno. Estos métodos implican seleccionar un sujeto mamífero que tiene la enfermedad o trastorno y administrar una población de determinadas células al sujeto para tratar la enfermedad o trastorno.

La población de células se produce mediante la selección de una población de células madre capaces de diferenciarse en una población deseada de células diferenciadas, seleccionar un medio de diferenciación capaz de estimular la diferenciación en las células diferenciadas deseadas, y cultivar la población de células madre en el medio de diferenciación y ceramidas para estimular la diferenciación en la población de células diferenciadas, como se describió *supra*.

En al menos una modalidad, el cultivo se lleva a cabo *in vitro*. En estas modalidades, la población de células madre puede obtenerse del sujeto o de un segundo sujeto antes del cultivo, el cultivo se lleva a cabo *in vitro* para producir células diferenciadas, y después las células diferenciadas se administran al primer sujeto (*por ejemplo*, mediante inyección de las células diferenciadas en el primer sujeto).

En al menos una modalidad, el cultivo se lleva a cabo *in vivo*. En estas modalidades, la población de células madre puede producirse por el sujeto o por un segundo sujeto. El cultivo puede llevarse a cabo, *por ejemplo*, en el primer sujeto o en el segundo sujeto, mediante el uso de los métodos de cultivo *in vivo* descritos anteriormente. En al menos una modalidad, las células madre se producen por el sujeto y el cultivo incluye administrar la ceramida al sujeto en un sitio de tejido que contiene la población de células madre. En al menos una modalidad, las células madre se producen por un segundo sujeto y el cultivo incluye administrar la ceramida al segundo sujeto en un sitio de tejido que contiene la población de células madre. La ceramida puede administrarse al primer o segundo sujeto mediante el uso de los métodos descritos anteriormente.

Los sujetos mamíferos incluyen, *por ejemplo*, sujetos humanos, sujetos equinos, sujetos porcinos, sujetos felinos y sujetos caninos. Los sujetos humanos se prefieren particularmente.

En un aspecto, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno articular y se administra una población de condrocitos producidos de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los tipos ilustrativos de enfermedades o trastornos articulares incluyen, sin limitación, osteoartritis, artritis reumatoide, mucopolisacaridosis, enfermedad articular degenerativa y lesión articular.

En otro aspecto, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno neurodegenerativo y se administra una población de neuronas. Los tipos ilustrativos de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad por priones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, atrofia sistémica múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, miositis por cuerpos inclusión, miopatía degenerativa, atrofia espinocerebelosa, neuropatía metabólica, neuropatía diabética, neuropatía endocrina, hipotensión ortostática, lesión cerebral, lesión de la médula espinal y accidente cerebrovascular.

En otro aspecto, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno cardíaco y se administra una población de células cardíacas. Los tipos ilustrativos de enfermedades o trastornos cardíacos incluyen, sin limitación, enfermedad cardíaca, lesión cardíaca, hipercardia, infarto cardíaco, regurgitación mitral, regurgitación aórtica, defecto septal y síndrome de taquicardia-bradicardia.

En otro aspecto, la enfermedad o trastorno es la diabetes y se administra una población de células pancreáticas.

Cualquier enfoque adecuado para administrar la población de células al sujeto puede utilizarse para practicar estos aspectos, como será evidente para el experto en la técnica. Esto puede incluir, *por ejemplo*, el trasplante a un sitio particular en el cuerpo, tal como un tejido u órgano particular. Además, puede realizarse la infusión sistémica de células.

Pueden administrarse además agentes terapéuticos para tratar la enfermedad o trastorno, además de administrar la población de células, como será evidente para el experto en la técnica.

La dosis, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos y/o células pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, *por ejemplo*, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis con eficacia terapéutica en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD₅₀/ED₅₀. Los agentes/células que exhiben altos índices terapéuticos pueden ser convenientes. Aunque pueden usarse agentes/células que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija tales agentes/células al sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los agentes terapéuticos y/o las células se administran a un sujeto en una cantidad para tratar la enfermedad o trastorno. La cantidad es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, *por ejemplo*, una cantidad que produce la prevención, o disminución, de la causa o síntomas asociados con la enfermedad o trastorno que se trata.

La cantidad eficaz de un agente terapéutico/población de células 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 fármacos. 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.

5 Debe apreciarse que determinados 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 determinados términos como se usan en esta descripción. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen, generalmente, el mismo significado que comprenden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

EJEMPLOS

10 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.

15 *Animales* - Los animales se criaron según las normativas de los Institutos Nacionales de Salud y del USDA para el cuidado y uso de animales en la investigación. Las ratas normales se derivaban de la colonia reproductora MPS VI (Kunieda y otros, "Mucopolysaccharidosis Type VI in Rats: Isolation of cDNAs Encoding Arylsulfatase B, Chromosomal Localization of the Gene, and Identification of the Mutation", *Genomics* 29(3):582-7 (1995) y se mantuvieron en la Escuela de Medicina de Mount Sinai, mientras que los animales más grandes (gatos y caballos) se mantuvieron en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pensilvania. Los animales se alojaron con comida y agua *ad libitum*. La eutanasia se realizó en gatos mediante el uso de 80 mg/kg de pentobarbital de sodio (Veterinary Laboratories, Lenexa, KS) de acuerdo con las normativas de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria. La eutanasia de las ratas se realizó mediante el uso de inhalación de dióxido de carbono. Las células equinas se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos de rutina.

25 *Aislamiento y cultivo de condrocitos primarios* - Los métodos para el aislamiento y cultivo de condrocitos articulares de rata se han publicado en otra parte (Simonaro y otros, "Mechanism of Glycosaminoglycan-mediated Joint and Bone Disease: Implications for the Mucopolysaccharidoses and Other Connective Tissue Diseases", *Am. J. Path.* 172:112-122 (2008)). Brevemente, para establecer cultivos de condrocitos primarios en ratas, se recolectaron las cápsulas femorales y el menisco y se lavaron tres veces en NaCl al 0,9 % complementado con penicilina/estreptomomicina al 5 % (v/v) y fungizona al 0,1 % (v/v). El cartílago se digirió con 0,5 mg/ml de pronasa preparada en NaCl al 0,9 % (v/v) + penicilina/estreptomomicina al 5 % (v/v) + fungizona al 0,1 % durante 2 horas a 37 °C, y con 1 mg/ml de colagenasa (Sigma Chemical Co.) preparada en DMEM que contenía FBS al 10 % (v/v), penicilina/estreptomomicina al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 % durante la noche a 37 °C. Después las células se limpiaron mediante filtración del medio resultante a través de un filtro de células de 40 µm y se aislaron por centrifugación (1200 rpm durante 8 minutos). Posteriormente se lavaron dos veces en DMEM complementado con FBS al 10 % (v/v), Pen/Strep al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 %, y se sembraron en 35 matraces de 75 cm² a una densidad de 7000 células por cm² en DMEM que contenía FBS al 10 % (v/v), penicilina/estreptomomicina al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 %. Las células recién sembradas se consideraron el pase 0 (P0). Al alcanzar la subconfluencia, las células se trataron con tripsina y se pasaron (P1) para una expansión adicional. Para los pases posteriores, las células se cultivaron durante siete días, se trataron con tripsina y después se volvieron a sembrar a la misma densidad celular. En algunos experimentos, se añadió rAC a los medios en P0 (concentración final de 200 U/ml). A menos que se indique de otra forma, rAC se añadió a las células solo una vez, y los cambios de medio posteriores no incluyeron la enzima.

45 Para cultivar condrocitos de rata en cultivos tridimensionales, se usaron esponjas de colágeno de 5x5 mm (CollaCote, Zimmer Dental). Las esponjas se humedecieron previamente en DMEM que contenía FBS al 10 % (v/v) y antibióticos, y las células, que se habían aislado previamente como se describió anteriormente, se suspendieron en medio y se pipetearon sobre la esponja. Para distribuir los condrocitos por toda la esponja, esta se comprimió ligeramente para hacer circular el medio y distribuir las células. Las esponjas se colocaron después en placas de cultivo y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 % y antibióticos con y sin rAC. El medio se cambió cada tres días con medio nuevo que carecía de rAC.

50 Para cultivar condrocitos de rata en geles de fibrina, se sembraron 7,5 x 10⁶ células en 200 µl de gel TISSEEL® (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) en placas de 96 pocillos y se cultivaron en medio estándar (DMEM que contenía FBS al 10 %) con o sin rAC (200 U/ml). El medio se cambió cada cuatro días con inclusión de rAC nuevo en cada cambio de medio. Las células se mantuvieron durante dos semanas antes del análisis.

55 Para obtener condrocitos articulares equinos, se recuperó tejido de explante de cartílago de las superficies articulares de las articulaciones de la babilla de los animales castrados (edad de 3-12 años) mediante el uso de un perforador de biopsia de 6 mm. El perforador se introdujo en el cartílago perpendicular a la superficie articular hasta que se hizo contacto con la superficie del hueso. Después, el perforador se rotó y se retiró y el explante resultante se retiró del hueso mediante el uso de una hoja de bisturí mediante una disección paralela a la superficie articular. Los explantes de cartílago se recortaron a un grosor de aproximadamente 100 µm para eliminar cualquier tejido mineralizado que pudiera haber afectado los cultivos o procedimientos de análisis posteriores. Los condrocitos se aislaron del tejido de explante como se describe en otra parte (Novotny y otros, "Biomechanical and Magnetic Resonance Characteristics of a Cartilage-like Equivalent Generated in a Suspension Culture", *Tissue Eng* 12:2755-2764 (2006)), y se congelaron (P0) o usaron para la expansión celular en medios DMEM/F12 que contenían 50 µg de ascorbato-2-fosfato/ml (v/v), penicilina/estreptomomicina al 1 % (v/v), glutamato al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 % (v/v).

Se recolectó cartílago articular humano de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo total de rodilla con consentimiento por escrito de acuerdo con un protocolo aprobado por IRB (#09-0248). Se recolectaron cortes de cartílago en medio DMEM/F12 sin FBS (que contenía penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v), glutamato al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 % (v/v)), y después se incubaron con Pronasa (1 mg/ml) en DMEM/F12 que contenía FBS al 10 % (v/v) durante 30 minutos a 37 °C en un agitador. Después de la centrifugación a 200xg, el cartílago se lavó dos veces con PBS y después se incubó con colagenasa P (1 mg/ml) en DMEM/F12 que contenía FBS al 10 % (v/v) durante la noche a 37 °C en un agitador. Después se filtró el cartílago mediante el uso de un filtro de 40-70 µm, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en medio DMEM/F12 que contenía FBS al 10 % (v/v) y después se sembraron a una densidad de $1 \times 10^5/\text{cm}^2$. En algunos experimentos, se añadió rAC al medio de cultivo inmediatamente en el momento de la siembra de las células (concentración final de 200 U/ml).

Mediciones de ceramidas ácida, ceramida y esfingosina - Se cultivaron condrocitos de rata en placas de 12 pocillos con o sin rAC (200 U/ml), y se determinaron los niveles de actividad de AC, ceramida y esfingosina en lisados celulares a las 12, 24 y 48 horas. Se recolectaron las células y se extrajeron las proteínas totales mediante el uso del reactivo de lisis celular Cell Lytic™ M (Sigma, Saint Louis, MO, Estados Unidos). Las proteínas se cuantificaron (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) y los lisados se sometieron a medición de actividad enzimática de AC (He y otros, "A Fluorescence-based High-performance Liquid Chromatographic Assay to Determine Acid Ceramidase Activity", Anal. Biochem. 274(2):264-9 (1999)). Además, se extrajeron los lípidos de los lisados celulares, y los niveles de ceramida y esfingosina se cuantificaron como ya se publicó (He y otros, "Deregulation of Sphingolipid Metabolism in Alzheimer's Disease", Neurobiol. Aging 31(3):398-408 (2010)).

Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales - Las MSC de rata se obtuvieron de las cavidades femorales y tibiales de ratas adultas. Se aislaron fémures y tibias, se extirparon las extremidades y se extrajo la médula ósea mediante el uso de PBS. Después de dos lavados en PBS, se contaron las células de médula ósea y se sembraron a una densidad de 5×10^6 células/cm² en Alpha MEM complementado con FBS al 20 % (v/v), penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v), glutamato al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1% (v/v). Las células de médula ósea de gatos se recolectaron durante procedimientos quirúrgicos y se enviaron en hielo y en PBS durante la noche.

Para los caballos, la médula ósea se recolectó asépticamente del esternón mediante el uso de una aguja de biopsia de médula ósea de calibre 11 y una jeringa estéril de punta Luer de 60 ml que contenía 10 ml de solución estéril de ácido-citrato-dextrosa. Después de la aspiración de la médula ósea, el aspirado se mezcló brevemente con la solución de ácido-citrato-dextrosa y la jeringa se colocó en hielo y se transportó al laboratorio para el aislamiento de las MSC. Una vez recibidas, las células se lavaron dos veces con PBS y se sembraron a una densidad entre $1-5 \times 10^6$ células/cm² (células felinas) y 3×10^8 células/cm² (células equinas) en Alpha MEM complementado con FBS al 20 % (v/v), penicilina/estreptomicina al 1% (v/v), glutamato al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 % (v/v). Las células de médula ósea recién sembradas se trataron con o sin rAC en el día 0 (concentración final de 200 U/ml). En el día tres, se retiró el medio y se reemplazó con medio nuevo que carecía de rAC. Posteriormente, el medio se cambió dos veces por semana y las colonias se pasaron cuando alcanzaron la subconfluencia.

En algunos experimentos, las células se tiñeron después de una semana de cultivo con violeta cristal (0,5 % [Sigma] p/v en metanol) para contar el número de colonias. Para estos ensayos (CFU-F), las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se enjuagaron cuatro veces con PBS, antes de un lavado final en agua. Solo se contaron las colonias con un diámetro superior a 1 mm.

En otros experimentos, se realizó un análisis de citometría de flujo para evaluar el número de MSC. Para estos análisis, se recolectaron las MSC, se lavaron dos veces en PBS complementado con FBS al 2 % y se marcaron para CD90-FITC y CD45-PE (Cat#11-0900-81 y Cat#554878, respectivamente, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos), diluido en PBS + FBS al 2 % durante 15 minutos, en hielo y en la oscuridad. Después de lavados posteriores, las células se analizaron en un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos). El análisis de citometría de flujo no pudo realizarse en las células de gato y caballo debido a la falta de reactivos de anticuerpos adecuados.

Para probar el efecto de rAC sobre el potencial condrogénico de BM-MS, las células de médula ósea se amplificaron durante 3 semanas en Alpha MEM complementado con FBS al 20 % (v/v), penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v), glutamato al 1 % (v/v) y fungizona al 0,1 % (v/v). Durante las tres semanas de cultivo, las células se pasaron cuando alcanzaron la subconfluencia. Al final de las tres semanas se trataron con tripsina, se contaron y 5×10^5 células se diferenciaron en cultivos en sedimento de células mediante el uso de tubos de cultivo cónicos. La diferenciación condrogénica se realizó en medio DMEM con alto contenido de glucosa que contenía 6,25 µg/ml de insulina, 6,25 µg/ml de transferina, 1,25 mg/ml de albúmina de suero bovino, dexametasona 100 nM, ascorbato-2-fosfato 50 µM, 5,33 µg/ml de ácido linoleico y 10 ng/ml de TGFβ1, como se describió previamente (Anjos-Afonso y otros, "Isolation, Culture and Differentiation Potential of Mouse Marrow Stromal Cells", CURR. PROTOC. STEM CELL BIOL. Capítulo 2, Unite 2B.3 (2008)). Para evaluar el efecto de rAC sobre la diferenciación condrogénica, en algunos experimentos se añadió rAC al medio condrogénico (concentración final de 200 U/ml). El medio se cambió cada tres días, con o sin rAC. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada, a 37 °C bajo 5 % de CO₂.

Producción y purificación de AC recombinante - Se produjo AC recombinante humana (rAC) como se describe en He y otros, "Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase. Catalytic Reactions and Interactions With Acid Sphingomyelinase", J. Biol. Chem. 278(35):32978-86 (2003). Brevemente, las células CHO que sobreexpresan rAC se cultivaron hasta la confluencia en DMEM complementado con FBS al 10 % v/v y penicilina/estreptomicina al 1 %. El medio acondicionado se recolectó y la rAC se concentró por filtración a presión (límite de 30 kDa, Amicon, Billerica, MA, Estados Unidos) y se purificó mediante el uso de un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos). La cantidad de rAC se cuantificó mediante la medición de la actividad enzimática y el análisis de transferencia Western (Eliyah y otros, "Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival", FASEB J. 21(7):1403-9 (2007)).

Procesamiento de los cultivos en sedimento de células de células madre mesenquimales diferenciadas - Una vez que se diferenciaron las BM-MSC en los medios condrogénicos con o sin rAC, se retiraron los sedimentos de células de la incubadora, se lavaron dos veces y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se deshidrataron mediante incubaciones sucesivas en etanol al 70 % (30 minutos a temperatura ambiente), etanol al 95 % (2x 30 minutos a temperatura ambiente) y etanol al 100 % (2x 30 minutos a temperatura ambiente). Después, los sedimentos de células se aclararon en dos baños sucesivos de xilenos (2 x 30 minutos a temperatura ambiente), y se incrustaron en parafina y se procesaron con micrótopo para crear cortes de 6 µm en portaobjetos de polipropileno (Sigma).

Para la tinción histoquímica, los sedimentos de células se desparafinaron en xilenos, se hidrataron en agua destilada y se tiñeron con Azul Alcian 8GX 1 % (p/v), pH 2,5 (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente o Safranina O (Sigma) 0,1 % (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron, se deshidrataron y aclararon con xilenos antes de cubrirlos con medio de montaje.

Inmunohistoquímica - Para el análisis inmunohistoquímico, los sedimentos de células se desparafinaron en xilenos, se hidrataron y se lavaron tres veces en PBS. De ser necesario (es decir, para la inmunotinción de Sox9), las células se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0,2 % (v/v) preparado en PBS (pH 7,4) durante cinco minutos a temperatura ambiente, se fijaron posteriormente en paraformaldehído y lavaron varias veces en PBS. Después los portaobjetos se bloquearon dos horas a temperatura ambiente en PBS complementado con Tween al 0,1 % (v/v) y FBS al 10 % (v/v). Después del bloqueo, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo primario diluido en PBS que contenía Tween 0.1 al 0,1 % y FBS al 5 % durante la noche a 4 °C. Los siguientes anticuerpos primarios de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, se usaron para la inmunotinción: Anti-Sox 9 (H-90, sc-20095) de conejo, anti-colágeno IIA1 de conejo (H-300, sc-28887), anti-colágeno XA1 de cabra (E-14, sc-323750) y anti-agrecano (D-20, sc-16492) de cabra. Después de la exposición a los anticuerpos primarios, los portaobjetos se incubaron después una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con Cy3, diluido en PBS/tween 0,1 %/FBS al 10 %. Por último, los portaobjetos se lavaron varias veces en PBS y se montaron con un medio que contenía DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). La localización de los anticuerpos primarios se visualizó mediante el uso del segundo anticuerpo fluorescente conjugado con Cy-3 y microscopía confocal de barrido láser (Zeiss LSM510).

Para la inmunohistoquímica de los cultivos de condrocitos primarios, se sembraron células P3 en portaobjetos de cámara (5000 células/cámara, portaobjetos de cámara lab-tek2, Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron hasta la subconfluencia. Después las células se lavaron dos veces en PBS, y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se inmunotiñeron como se describió anteriormente.

Análisis de transferencia Western - Los condrocitos primarios se recolectaron por tripsinización y se lavaron, y las proteínas se extrajeron en el reactivo de lisis celular Cell Lytic™ M (Sigma, Saint Louis, MO, Estados Unidos). Las proteínas se cuantificaron (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) y se analizaron mediante transferencia Western (Novex Protein Analysis Solutions, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Los siguientes anticuerpos primarios de Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos, se usaron para el análisis de transferencia Western. Anti-Sox 9 de conejo (H-90, sc-20095), anti-colágeno 1A2 de cabra (M-19, sc-8788), anti-colágeno 2A1 de conejo (H-300, sc-28887), anti-agrecano de cabra (D-20, sc-16492), anti-FGF2 de ratón (sc-135905), anti-TGFβ1 de conejo (sc146), anti-Bax de ratón (2D2) (sc-20067), anti-PARP-1/2 de conejo (H-250) (sc-7150), anti-GAPDH de conejo (FL-335) (sc-25778) y anti-actina de cabra (C-11) (sc-1616). Se usó además anti-colágeno X de conejo (ab58632) de Abcam (Cambridge, MA, Estados Unidos).

Aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa - Para el aislamiento de ARN, las células se trataron con tripsina, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en Trizol/cloroformo (5/1 (v/v)) (Life Technologies). Después de la centrifugación, la fase superior acuosa se guardó y se purificó a través de una columna de afinidad (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se resuspendió en agua libre de RNasa y se cuantificó, y se sometió a transcripción inversa 1 µg de ARN.

Para el análisis de qPCR de los cultivos de condrocitos articulares humanos, el ADNc se sintetizó con Superscript VILO (Invitrogen). Se realizó la qPCR con SYBR green (Invitrogen Platinum Taq) y la expresión génica se normalizó respecto a GAPDH (método 2^{-ΔΔCt}).

Análisis estadístico - Según correspondiera, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de un análisis estándar de prueba t de Student, análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la variable grupo, análisis multivariante de la varianza (MANOVA) seguido de ajustes post hoc de Bonferroni. Los resultados se consideraron significativos a $P < 0,05$. Las estadísticas se realizaron con Sigma Stat 3.1 (programa informático Systat).

5

Ejemplo 2-Cambios en el metabolismo de los esfingolípidos después del tratamiento con rAC de condrocitos articulares primarios

10

Los condrocitos articulares primarios de rata se aislaron y se cultivaron en cultivos en monocapa como se describió en el Ejemplo 1 mediante el uso de DMEM que contenía FBS al 10 % con o sin rAC. Para el punto de tiempo inicial, las células se recolectaron de 6 ratas y se agruparon sin cultivo. Los niveles de ceramidasa ácida, ceramida y esfingosina en estos lisados celulares se compararon con las células cultivadas durante 12, 24 y 48 horas con o sin rAC. Los datos se resumen en las Figuras 1A-1C.

15

Como se esperaba, las células cultivadas en medio complementado con rAC exhibieron una actividad de AC notablemente aumentada en 12 horas, y esto se mantuvo durante 48 horas. Los niveles de ceramida también aumentaron en comparación con el valor inicial a las 12 horas, pero menos en las células expuestas a rAC. De hecho, a las 48 horas, los niveles de ceramida en las células tratadas con rAC habían regresado al valor inicial, mientras que en aquellas sin tratamiento con rAC permanecieron significativamente elevados. Además, a las 48 horas aumentaron significativamente las elevaciones de esfingosina, el producto de la actividad de AC, en las células tratadas con rAC. A los 7 días, los niveles de AC, ceramida y esfingosina habían regresado al valor inicial independientemente del tratamiento con rAC.

20

En general, estos resultados demostraron que los condrocitos de rata captaron rAC y que se retuvo su actividad biológica al hidrolizar ceramida y producir esfingosina. El hecho de que los niveles de AC regresaran al valor inicial a los 7 días fue acorde con su vida media intracelular esperada de 48-72 horas (Bernardo y otros, "Purification, Characterization and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase", J. Biol. Chem. 270(19):11098-102 (1995)).

25

Ejemplo 3-Efectos de la complementación con rAC en cultivos en monocapa expandida de condrocitos articulares primarios

30

A continuación, se evaluaron los efectos de la complementación con rAC sobre el fenotipo de los condrocitos articulares después de la expansión celular. Para estos experimentos, se cultivaron condrocitos de rata durante tres semanas con y sin rAC en DMEM que contenía FBS al 10 %. Se añadió rAC una vez en el momento de la siembra inicial de las células (P0). Todos los análisis se realizaron al final del período de expansión de tres semanas a menos que se mencione de otra forma.

35

No se observó ningún efecto del tratamiento con rAC sobre el número total de células (Figura 2A), acorde con el hecho de que los niveles de dos marcadores apoptóticos, Bax y PARP, también fueron muy similares con y sin tratamiento con rAC.

40

Sin embargo, a pesar de obtener el mismo número de células, hubo un efecto notable del tratamiento con rAC sobre la calidad de las células al final del período de expansión de 3 semanas, según se determina por la expresión de varios marcadores de condrocitos. Como se muestra en la Figura 2B, el análisis de transferencia Western reveló que la expresión de cada uno de colágeno 2A1, colágeno IA2, Agrecano, Sox9, TGF β 1 y FGF2 mejoraba en las células tratadas con rAC. Efectos similares fueron evidentes en células cultivadas mediante el uso de un medio de cultivo diferente, RPMI que contiene FBS al 10 %. En particular, la expresión de colágeno X, un marcador de hipertrofia y dediferenciación de condrocitos (Nadzir y otros, "Comprehension of Terminal Differentiation and Dedifferentiation of Chondrocytes During Passage Cultures", J. Biosci. Bioeng. 112(4):395-401 (2011)), se redujo en estos cultivos.

45

Para confirmar que los efectos de rAC no eran específicos de ratas, a continuación, se estudiaron condrocitos articulares equinos que se proporcionaron congelados en P0. Las células congeladas se descongelaron y expandieron durante tres semanas sin rAC, y después se volvieron a sembrar con o sin rAC en el medio de cultivo. Después se cultivaron durante una semana adicional y después se analizaron. Como se muestra en la Figura 2C, la expresión de tres marcadores de condrocitos importantes, el agrecano, Sox9 y el colágeno II, mejoró notablemente en las células tratadas con rAC, acorde con lo que se observó en rata. La falta de otros anticuerpos específicos para equinos impidió el análisis de marcadores de condrocitos adicionales en estos cultivos. De interés, se observó una reducción en la expresión de la proteína proapoptótica Bax en las células equinas tratadas con rAC, más que la observada en las células de rata. Esto podría deberse al hecho de que las células equinas se proporcionaron congeladas a los investigadores, lo que provocó muerte celular adicional relacionada con el estrés durante el período de cultivo que se redujo por rAC.

50

55

A continuación, los condrocitos de rata tratados y no tratados con rAC se evaluaron por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Estos análisis confirmaron que después de tres semanas de expansión, el número de células que expresan colágeno 2A1 en estos cultivos aumentó aproximadamente un 40 % después del tratamiento con rAC (Figura 3A). Además, la distribución intracelular de Sox9 parecía diferente, con más del factor de transcripción localizado en el núcleo en las células después de la exposición a rAC (Figura 3B).

60

65

La osteoartritis (OA) es un trastorno común relacionado con la edad que produce degradación del cartílago y los pacientes con OA con frecuencia se someten a procedimientos quirúrgicos para reparar sus articulaciones defectuosas. Se obtuvo el cartílago articular de dos pacientes con OA de edad avanzada y las células se expandieron en un cultivo en monocapa durante tres semanas con o sin rAC en el medio (añadida una vez en la siembra inicial de las células). En la Figura 4A, el análisis de PCR mostró que las células del paciente 1 exhibían una expresión significativamente elevada del ARNm de Sox9, colágeno 2A1, agrecano y TNF β 1 en respuesta al tratamiento. En las células del paciente 2 (Figura 4B), la expresión de Sox9 fue significativamente elevada, y también hubo una tendencia hacia la expresión elevada de colágeno IIA1 y agrecano. Como se observó con las células de rata y caballo, el número total de condrocitos obtenidos después del período de expansión fue similar, a pesar de este patrón diferencial de expresión génica. Nuevamente es notable que no se observara elevación de la expresión de colágeno X en las células tratadas con rAC de ninguno de los pacientes.

En general, estos resultados indican que la complementación del medio de condrocitos con rAC una vez en el momento de la siembra inicial de las células tuvo un efecto positivo significativo sobre el fenotipo condrogénico después de tres semanas de expansión.

Ejemplo 4-Efectos de la complementación con rAC en cultivos tridimensionales de condrocitos articulares primarios

Para lograr la implantación eficaz de los condrocitos expandidos en los pacientes, después del período inicial de expansión en monocapa, las células se siembran generalmente en andamios tridimensionales para su posterior cultivo y trasplante. Por lo tanto, se evaluaron los efectos del tratamiento con rAC sobre los condrocitos primarios de rata cultivados en andamios recubiertos con colágeno (Figura 5A). Para este experimento, las células se sembraron directamente sobre los andamios bañados en DMEM que contenían suero FBS al 10 % con o sin rAC. Después se cultivaron durante 7 o 14 días y se analizaron. Como se muestra en las imágenes representativas, las células cultivadas en presencia de rAC eran más grandes y mantenían un fenotipo más redondeado que aquellas sin rAC. Es importante destacar que estas células también se tiñeron positivamente para Safranina O, un marcador de expresión de proteoglicanos usado comúnmente. El grado de reducción celular se cuantificó adicionalmente y se observó una reducción significativamente menor en las células tratadas con rAC (Figura 5B).

Además de los andamios recubiertos con colágeno, los geles de fibrina biodegradables también se usan con frecuencia para la implantación de las células en el sitio dañado del cartílago. Como se muestra en la Figura 5C, el tratamiento con rAC de condrocitos de rata cultivados en tales geles durante dos semanas exhibió una tinción mejorada para Azul Alcían, un marcador importante de la deposición de proteoglicanos.

Ejemplo 5-Efectos de la complementación con rAC sobre el rendimiento de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea

Como se señaló anteriormente, el interés reciente en la reparación de cartílagos basada en células se ha centrado en el uso de MSC, que pueden obtenerse fácilmente de médula ósea adulta, tejido adiposo u otras fuentes autólogas, y pueden inducirse *in vitro* o *in vivo* para formar condrocitos y otros linajes celulares mesenquimales. Por lo tanto, a continuación se evaluaron los efectos de rAC en MSC derivadas de médula ósea de rata adulta antes y después de su diferenciación en condrocitos. La adición de rAC al medio de cultivo en el momento de la siembra inicial de las células de médula ósea de rata condujo a un aumento aproximado de dos a tres veces en el número de MSC obtenidas en el día 5, según el número de unidades de fibroblastos formadores de colonias (CFU-F) o por citometría de flujo (Figura 6A). Para confirmar que estos hallazgos no eran específicos de ratas, se analizó además el efecto de la complementación con rAC en las MSC de médula ósea obtenidas de gatos y caballos (Figuras 6B, 6C, 6D). Debido a la falta de reactivos de anticuerpos adecuados para la citometría de flujo, el número de MSC en estas especies se cuantificó solo con CFU-F, lo que reveló aumentos similares a los observados con las células de rata.

Ejemplo 6-Efectos de la complementación con rAC sobre la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales de médula ósea

Se evaluaron además los efectos de la inclusión de rAC en el medio de diferenciación condrogénica de las MSC. Para estos estudios, la diferenciación se llevó a cabo en cultivos en sedimento de células de alta densidad mediante el uso de medio estándar con o sin TGF β 1 (ver el Ejemplo 1, *supra*). Se cultivaron células de médula ósea de rata durante tres semanas en ausencia de rAC para obtener una población de MSC adherentes que era aproximadamente 90 % pura (CD90+/CD40-). Después se cultivaron en cultivos en sedimento de células de alta densidad durante tres semanas adicionales en medio de diferenciación de condrocitos. Como se muestra en la Figura 7A, los sedimentos de células de rata crecidos en presencia de rAC fueron significativamente más grandes (>2 veces) y se tiñeron más intensamente para los proteoglicanos mediante el uso de Azul Alcían y Safranina O. Los efectos de rAC fueron independientes de TGF β 1 y los dos factores funcionaron sinérgicamente para producir resultados óptimos. Los sedimentos de células de rata se analizaron además por inmunohistoquímica y microscopía confocal para la expresión de Sox9, agrecano y colágeno II. Como se ilustra en las imágenes de las Figuras 7B-7D, la expresión de estos tres marcadores condrogénicos se elevó significativamente en las células complementadas con rAC. Para confirmar estos hallazgos, se realizaron los mismos estudios mediante el uso de células equinas, y esencialmente se obtuvieron los mismos resultados (Figuras 8A-8D).

Como se describió anteriormente para los estudios de expansión de condrocitos, no se observó ningún cambio o reducción en los niveles de colágeno X, un marcador de hipertrofia y desdiferenciación de condrocitos, a diferencia del colágeno II, que fue elevado. Para examinar esto más a fondo, los condrocitos equinos diferenciados también se tiñeron para el colágeno X y se encontró que los niveles disminuyeron en las células tratadas con rAC (Figura 8E). En conjunto, la elevada expresión de colágeno II, agrecano y Sox9 junto con la baja expresión de colágeno X sugiere que las células tratadas tienen un fenotipo más condrogénico que conduce a la reparación de cartílagos.

Ejemplo 7-Discusión de los Ejemplos 1-9

La desdiferenciación de los condrocitos sigue siendo una de las principales barreras en la ACI (Schulze-Tanzil, G., "Activation and Dedifferentiation of Chondrocytes: Implications in Cartilage Injury and Repair", *Ann. Anat.* 191(4):325-38 (2009)). De hecho, los condrocitos, responsables de la producción de una matriz extracelular muy abundante, son muy sensibles al estrés mecánico y bioquímico. Durante el proceso de amplificación, las células tardan solo unos días en cambiar su forma de redondeada a fibroblástica y comenzar a mostrar características anómalas. Por ejemplo, el citoesqueleto se vuelve anómalo con la expresión de las fibras contráctiles de actina F, las proteínas de la matriz extracelular se expresan de manera anómala (por ejemplo, disminución de Col 2A, proteoglicanos, glucoproteína), se activan las proteasas (por ejemplo, MMP, ADAM-TS) y las proteínas de señalización se expresan de manera anómala (pérdida de Sox9). Además, aunque las células desdiferenciadas se pueden volver a diferenciarse cuando se implantan en sistemas de cultivo tridimensionales tales como los sistemas de alginato, agarosa o fibrina, generalmente se observa una desdiferenciación irreversible en las preparaciones de condrocitos primarios. Por lo tanto, es de interés principal mantener los condrocitos primarios lo más cerca posible de su perfil condrogénico inicial y/o mejorar su capacidad para volver a diferenciarse antes de la reimplantación.

Esta invención muestra que un solo tratamiento de condrocitos primarios con rAC, aunque no mejora el rendimiento de los condrocitos primarios, mejora en gran medida su fenotipo condrogénico después de 2-3 semanas de expansión. En particular, la expresión de colágeno 2A1, agrecano, FGF2 y Sox9 aumentó notablemente en células de rata al final del período de expansión de 3 semanas (Figuras 2A-2B y 3A-3B). En células equinas y humanas, la expresión de estos marcadores condrogénicos aumentó de manera similar (Figuras 2A-2C y 4A-4B). Esta mejora del fenotipo puede explicarse por la mejor localización subcelular del factor de transcripción Sox9 en el núcleo de las células tratadas con rAC (Figura 3A-3B), aunque se mantiene aún no queda claro, cómo un solo tratamiento con rAC influye en la localización nuclear de Sox9 durante varias semanas. Por último, cuando se cultivó en sistemas de cultivo tridimensionales, es decir, en esponjas de colágeno o geles de fibrina, la adición de rAC mejoró la diferenciación de las células, como se muestra por la tinción con H&E y safranina O (Figuras 5A-5C). Las células eran más grandes y la mejor diferenciación era cada vez más evidente con el tiempo (Figuras 5A y 5B). Además, mejoró la expresión de proteoglicanos en las células tratadas con rAC (Figura 5C). En general, los presentes ejemplos demuestran que un solo tratamiento con rAC mejora el fenotipo de los condrocitos primarios después de la expansión. Se especula que estos cambios se deben a los cambios a corto plazo en el metabolismo de los esfingolípidos inducidos por rAC (Figuras 1A-1C), que presumiblemente conducen a cambios transcripcionales y postraduccionales que producen estos efectos aguas abajo.

Las principales limitaciones en el uso de MSC para la reparación de cartílagos basada en células son que (i) las MSC pierden su capacidad de diferenciarse en condrocitos muy temprano (3 o 4 pases), lo que acorta el tiempo de amplificación antes de la diferenciación, y que (ii) todavía faltan protocolos apropiados *ex vivo* e *in vivo* para diferenciar las MSC en condrocitos que sean completamente funcionales y no experimenten hipertrofia. Se han publicado numerosos artículos que describen el uso de nuevos agentes para la diferenciación de MSC en condrocitos. Entre los candidatos, las proteínas de la familia de TGFβ (TGFβ1, TGFβ3), pero también las proteínas morfogénicas óseas (BMP), son las más descritas. Otra estrategia se basa en la ingeniería de andamios tridimensionales que liberan factores de crecimiento, factores antiapoptóticos o factores de diferenciación, en los que las MSC pueden sembrarse a alta densidad para imitar las condiciones naturales de diferenciación.

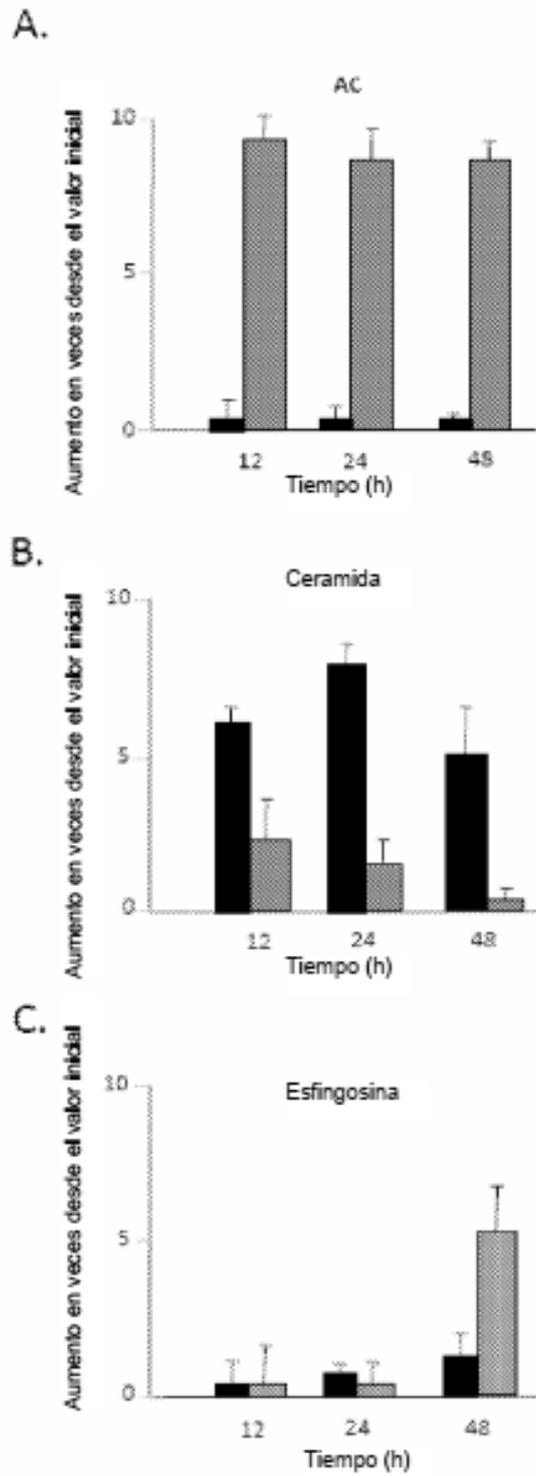
En los presentes ejemplos, se muestra que (i) una sola adición de rAC en el medio de cultivo de médula ósea de rata aumenta el rendimiento de MSC en una semana (Figuras 6A-6D), como se observa mediante el ensayo CFU-F y los análisis de citometría de flujo y (ii) el tratamiento repetido con rAC durante el proceso de diferenciación condrogénica mejora la calidad de los condrocitos derivados de MSC resultantes, como se observa mediante la tinción con Azul Alcian, tinción con Safranina O e inmunotinción (Figuras 7A-7D y 8A-8E). En particular, los niveles de Sox9, colágeno IIA1 y agrecano fueron más elevados en las células diferenciadas en presencia de rAC, pero el nivel de colágeno X también disminuyó, lo que revela un bloqueo parcial de la hipertrofia en las células diferenciadas en presencia de rAC.

Por lo tanto, se observaron dos influencias positivas del tratamiento con rAC con las MSC, aunque los mecanismos detrás de estas observaciones podrían ser diferentes. Por ejemplo, si bien el tratamiento en P0 probablemente fue beneficioso porque la rAC estaba reduciendo la respuesta al estrés inducida por la extracción de las células de su entorno natural y su siembra en un medio artificial (lo que produce células más viables), el beneficio del tratamiento durante el proceso de diferenciación puede deberse a (i) reordenamiento de las estructuras de la balsa lipídica en la superficie celular y una mejor señalización a través de la vía de TGFβ, (ii) una disminución de la ceramida y un aumento de la esfingosina o SIP, que se sabe que desempeñan una función en la condrogénesis y homeostasis de los cartílagos, y/o (iii) reducción de la respuesta al estrés por sí misma, en particular dado que el medio de diferenciación carece de suero y, por lo tanto, es un inductor de estrés muy potente.

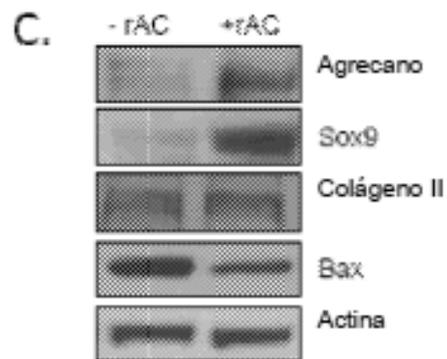
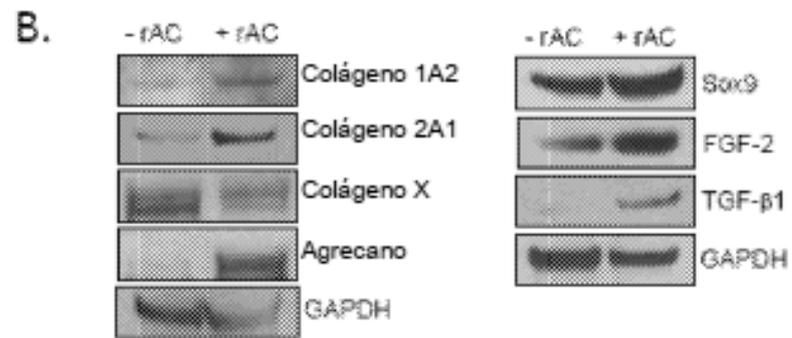
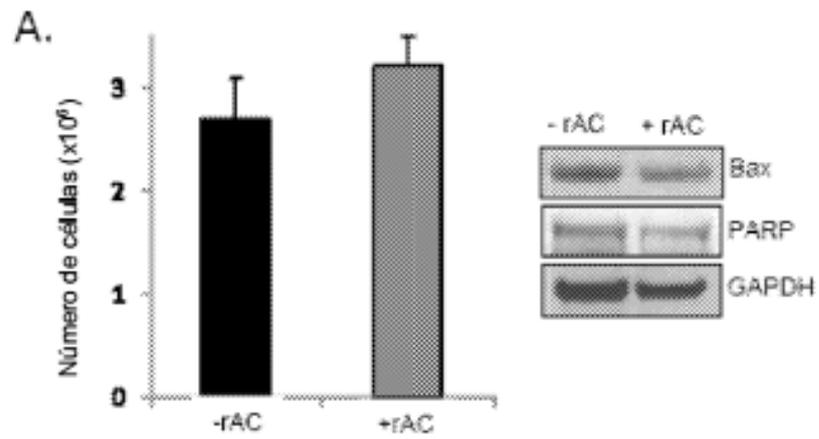
5 En general, los presentes ejemplos muestran por primera vez que la adición de rAC al medio de cultivo tiene una influencia positiva sobre el fenotipo condrogénico de los condrocitos primarios y derivados de MSC expandidos, probablemente a través de alteraciones de la vía de señalización de los esfingolípidos. Estos hallazgos podrían tener un impacto importante en la reparación de cartílagos basada en células al proporcionar células de mayor calidad para el trasplante y/o al incluir la enzima directamente en andamios tridimensionales para mejorar la condrogénesis *in vivo*.

REIVINDICACIONES

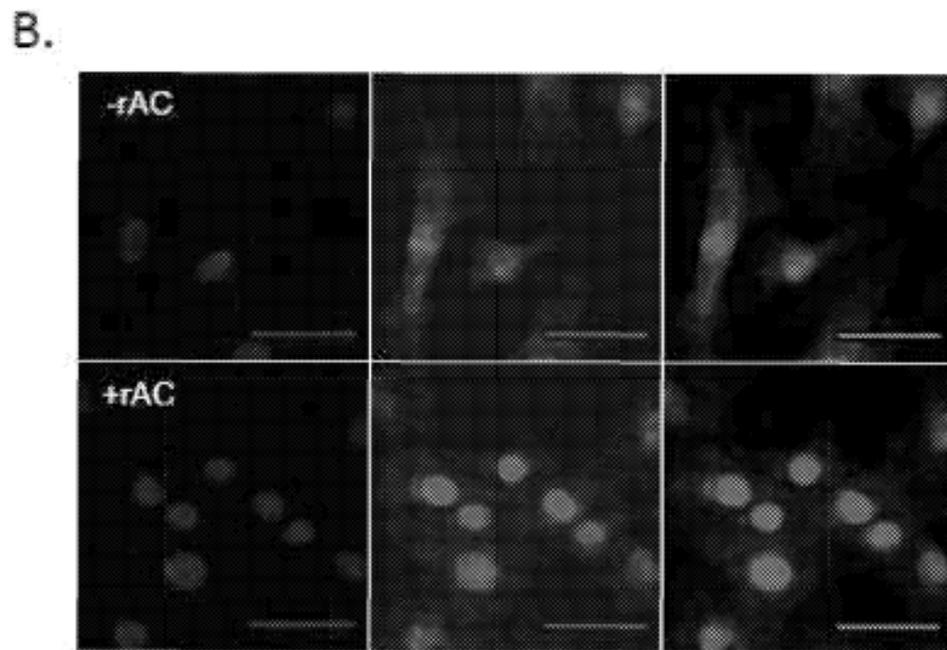
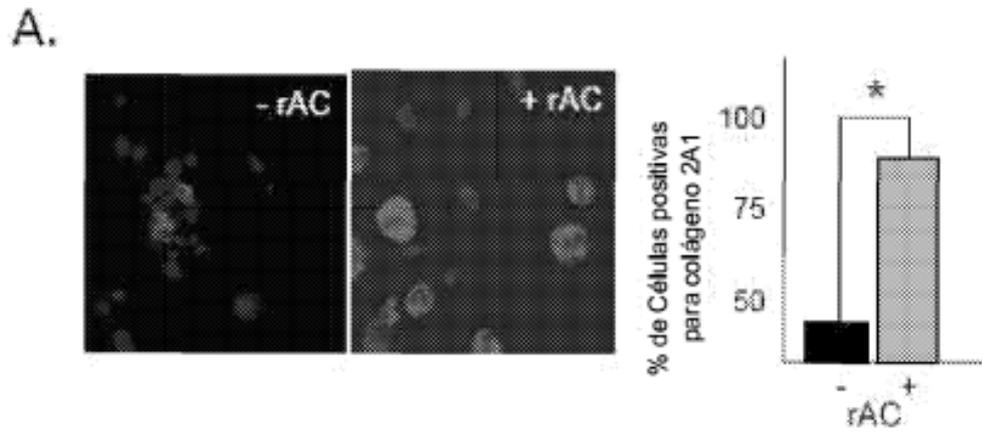
- 5 1. Un método *in vitro* para mejorar el fenotipo de una población de condrocitos, dicho método comprende:
seleccionar una población de condrocitos de mamífero que tienen un fenotipo condrocítico pobre **caracterizado por** baja expresión de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; expresión elevada de colágeno 10; y/o baja tinción para proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O; y
10 tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasa *in vitro* en donde, después de dicho tratamiento, la población seleccionada se **caracteriza por** expresión elevada de colágeno 2A1, Sox9 y agrecano; expresión reducida de colágeno 10; y/o tinción mejorada de proteoglicanos con Azul Alcían o Safranina O.
2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los condrocitos son condrocitos primarios, condrocitos articulares, condrocitos nasales, condrocitos traqueales, condrocitos meniscales o condrocitos aurales.
- 15 3. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los condrocitos son condrocitos humanos.
4. Un método *in vitro* para producir condrocitos, dicho método comprende:
20 seleccionar una población de células de mamífero que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos seleccionados de células de médula ósea, fibroblastos y células madre mesenquimales, y
tratar la población de células seleccionada con una proteína ceramidasa *in vitro* para transformar una o más de las células de la población seleccionada en condrocitos.
5. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células son células humanas.
- 25 6. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la población de células seleccionada comprende células de médula ósea o células madre mesenquimales, o consiste en células madre mesenquimales.
7. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en donde dicho tratamiento comprende:
30 cultivar la población de células seleccionada en un medio de cultivo que contiene la proteína ceramidasa.
8. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en donde dicho tratamiento se lleva a cabo en un soporte sólido.
- 35 9. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende, además:
tratar las células con TGFβ.
10. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína ceramidasa se selecciona de ceramidasa ácida, ceramidasa neutra y ceramidasa alcalina.
- 40 11. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la ceramidasa es proteína ceramidasa activa o una proteína precursora de ceramidasa.
- 45 12. Un método *in vitro* de producción de una población de células condrocíticas, dicho método comprende:
seleccionar una población de células madre capaces de diferenciarse en células condrocíticas
seleccionar un medio de diferenciación capaz de estimular la diferenciación en las células diferenciadas deseadas,
y
50 *cultivar in vitro* la población de células madre en el medio de diferenciación y la proteína ceramidasa para estimular la diferenciación en la población de células condrocíticas.
13. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las células madre se seleccionan del grupo que
55 consiste en células madre embrionarias, células madre somáticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.
14. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la proteína ceramidasa se
selecciona de ceramidasa ácida, ceramidasa neutra y ceramidasa alcalina.
15. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12 a la reivindicación 14, en donde la ceramidasa es proteína
ceramidasa activa o una proteína precursora de ceramidasa.



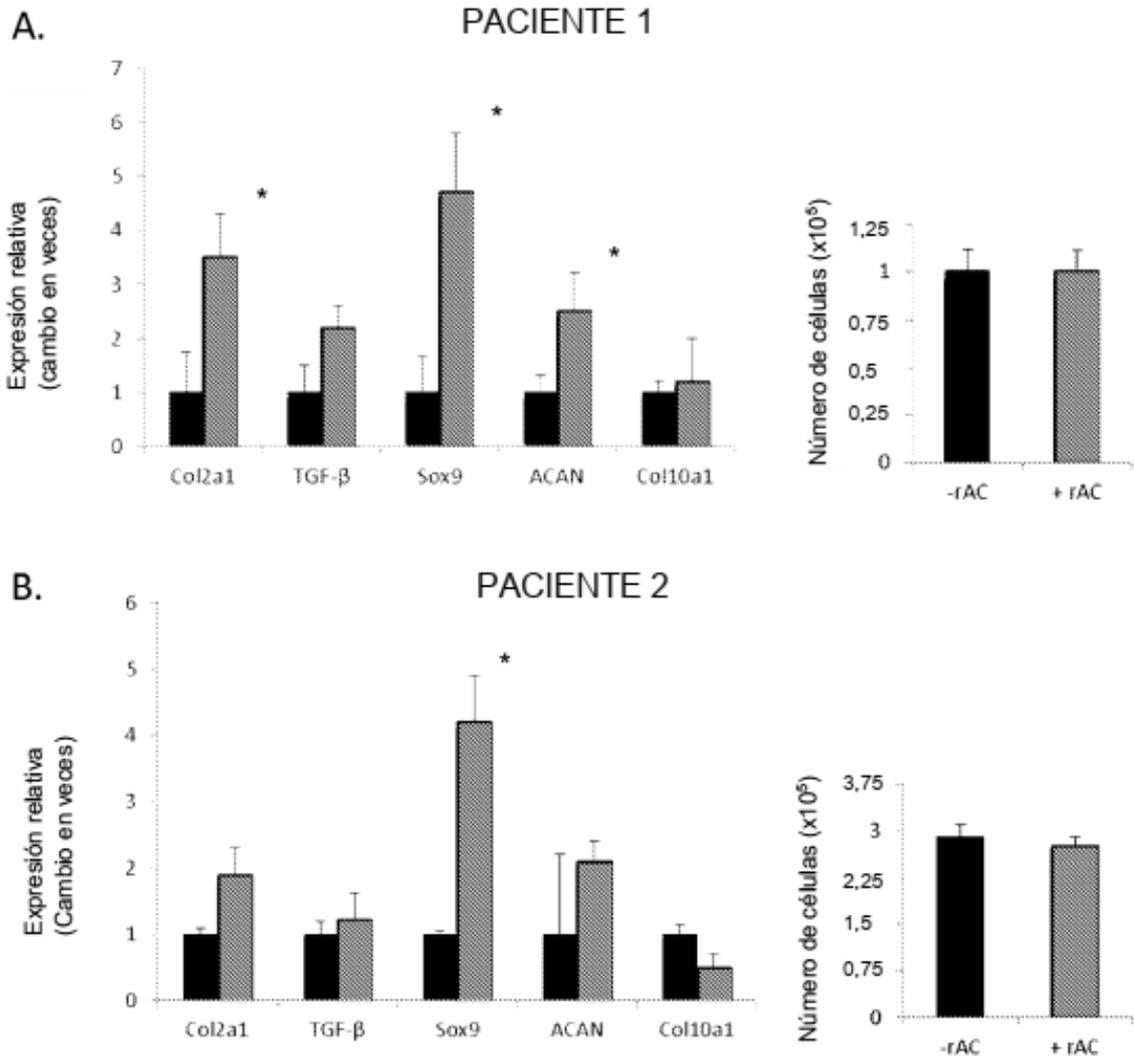
Figuras 1A-C



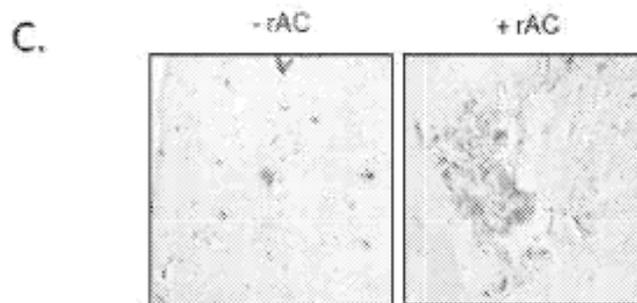
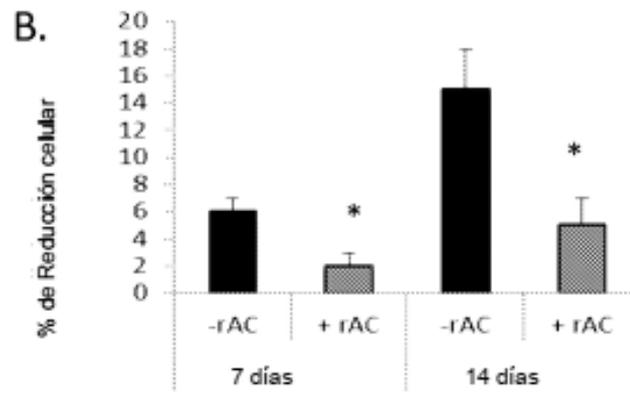
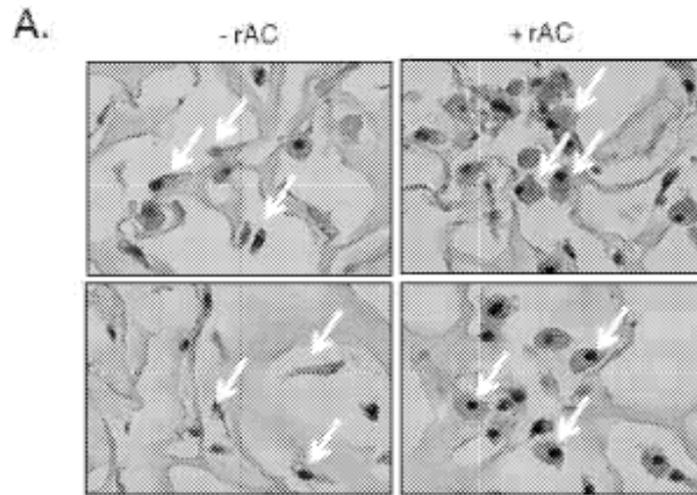
Figuras 2A-C



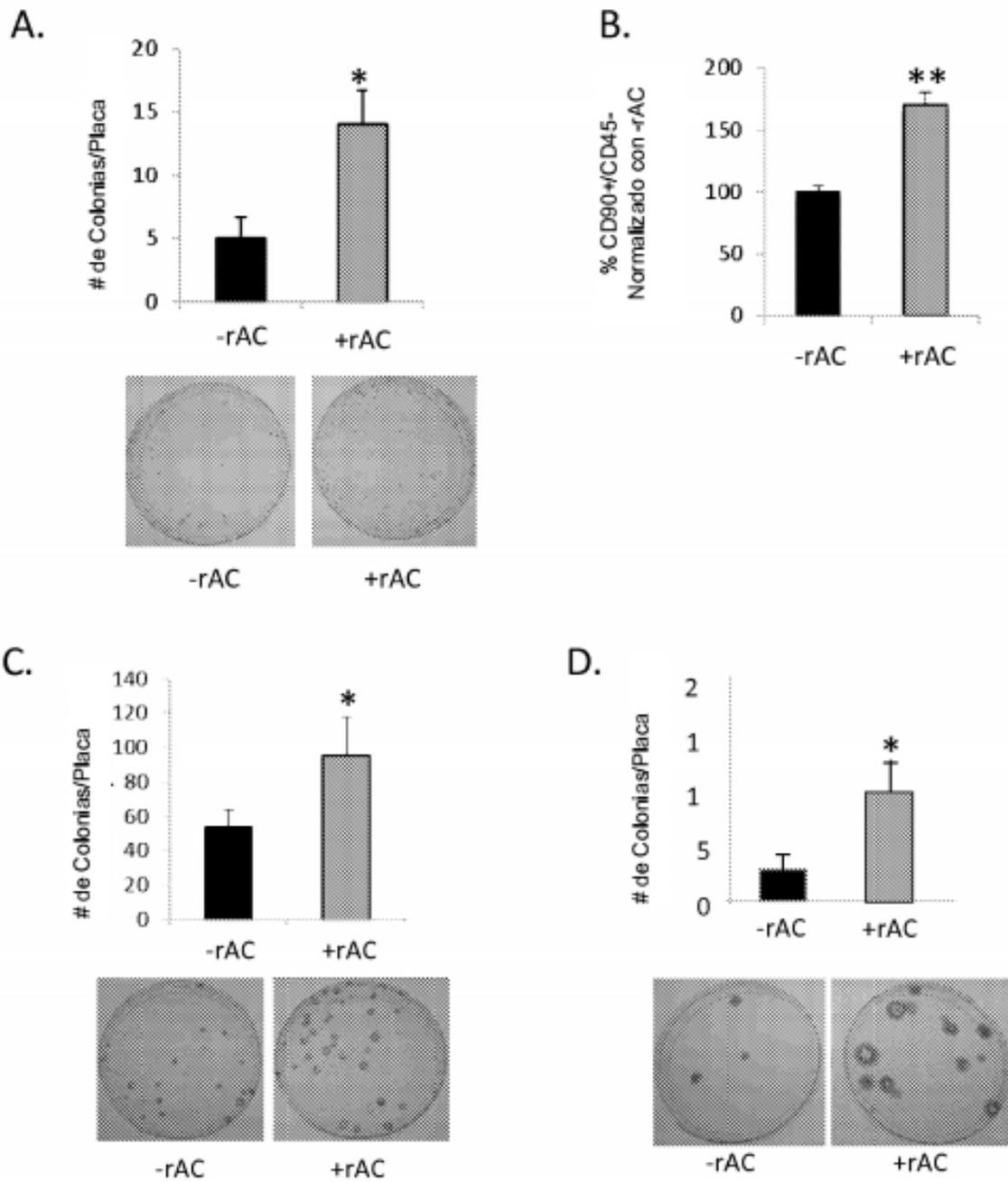
Figuras 3A-B



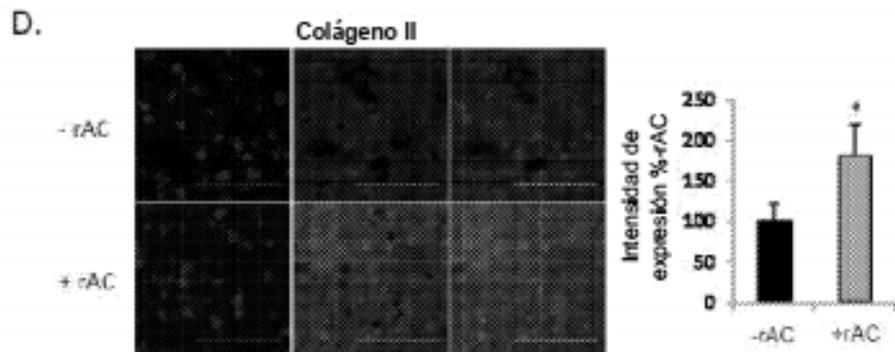
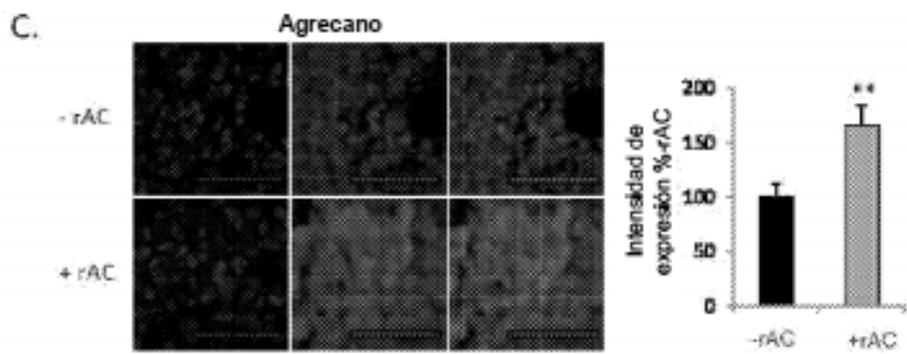
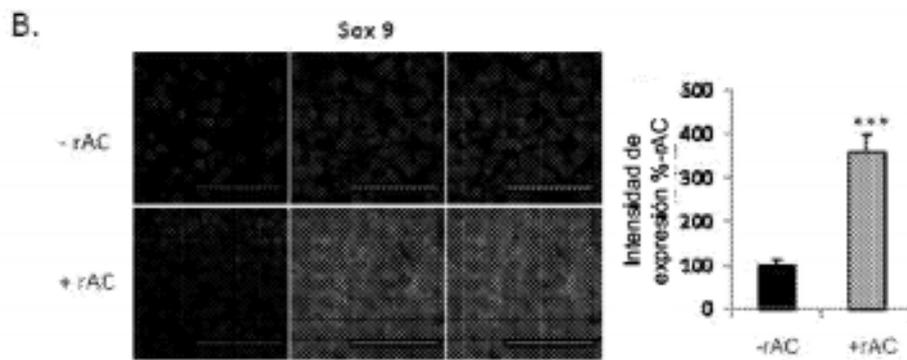
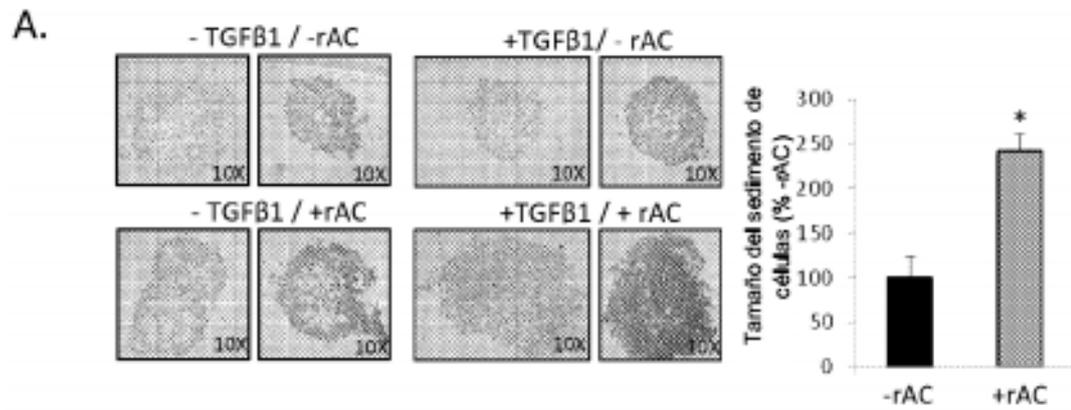
Figuras 4A-B



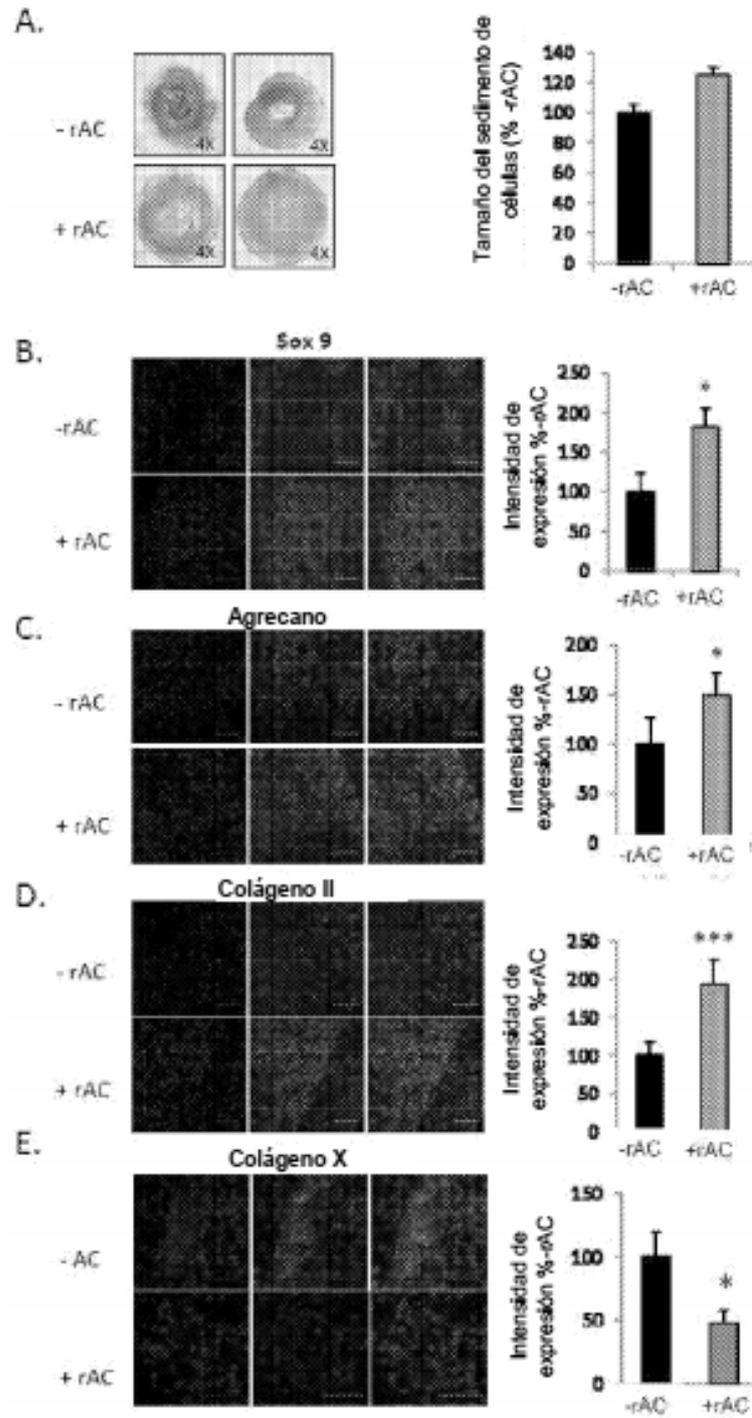
Figuras 5A-C



Figuras 6A-D



Figuras 7A-D



Figuras 8A-E