

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 020**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2017 E 21154441 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3835311**

54 Título: **Fragmento de Nkx3.2 y composición farmacéutica que lo comprende como ingrediente activo**

30 Prioridad:

**09.11.2016 KR 20160149090**

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

**13.11.2024**

73 Titular/es:

**ICM CO., LTD. (100.0%)  
Building 323, Room 42650 Yonsei-roSeodaemun-  
gu  
Seoul 03722, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, DAE-WON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 020 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

Fragmento de Nkx3.2 y composición farmacéutica que lo comprende como ingrediente activo

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento de Nkx3.2 (o un virus recombinante que comprende su polinucleótido de codificación) como ingrediente activo para su uso en el tratamiento o la prevención de la artritis.

10

## Antecedentes de la técnica

La artritis degenerativa, que es una de las artritis que se produce con mayor frecuencia, es una enfermedad en la que los cambios degenerativos dañan los tejidos del cartílago que protegen una articulación, los huesos y los ligamentos que forman una articulación, y similares, con el resultado de inflamación y dolor. Convencionalmente, el tratamiento de la artritis degenerativa se ha llevado a cabo principalmente a través del control de la inflamación. Sin embargo, se ha comprobado que el control de inflamación no puede ser una técnica terapéutica fundamental.

15

Por tanto, para tratar la causa de la artritis degenerativa, se requiere la identificación de una diana que regule los procesos, tales como la generación, diferenciación, muerte y calcificación, de los condrocitos y el desarrollo de procedimientos para controlar la diana.

20

Entre tanto, se ha demostrado que la Nkx3.2 sobreexpresada (NK3 caja homeótica 2) suprime la pérdida de tejido de cartílago causada por la artritis degenerativa, y así la proteína puede usarse para el tratamiento de la artritis degenerativa. A este respecto, la patente coreana nº 10-1150900 describe una composición para tratar la artritis, un kit de diagnóstico de artritis o un procedimiento de cribado de un agente terapéutico para la artritis usando la proteína Nkx3.2. El documento WO2011/093647 también se refiere a una composición para la prevención o el tratamiento de la artritis usando la proteína Nkx3.2.

25

Además, se ha demostrado que la degradación de la proteína Nkx3.2 es promovida por la señalización Indian Hedgehog (Ihh), que se activa durante el proceso de hipertrofia y calcificación de los condrocitos, y este fenómeno está mediado por una enzima proteolítica, Siah1. Además, se ha demostrado que la señalización Indian Hedgehog aumenta con el desarrollo de la artritis degenerativa acompañada por calcificación de condrocitos, y el control de la señalización Indian Hedgehog suprime la progresión de la artritis degenerativa en modelos animales.

30

35

## Descripción detallada de la invención

## Problema técnico

Los autores de la presente invención llevaron a cabo estudios para desarrollar terapias para la artritis degenerativa usando variantes de Nkx3.2 que pueden funcionar de manera eficaz en el entorno patológico de la artritis degenerativa. En consecuencia, los autores de la presente invención produjeron fragmentos de Nkx3.2 que son resistentes a la proteólisis inducida por Siah1. Los autores de la presente invención también identificaron que los fragmentos de Nkx3.2 antes mencionados pueden inducir activación de NF- $\kappa$ B en el nivel comparable a la Nkx3.2 de longitud completa. Además, los autores de la presente invención encontraron que los fragmentos de Nkx3.2 muestran una eficacia terapéutica notablemente mejorada contra la artritis degenerativa en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa.

40

45

## Solución al problema

Para alcanzar los objetos anteriores, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que comprende, como ingrediente activo, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

50

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que comprende, como ingrediente activo, un virus recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 y es capaz de expresar dicho polipéptido.

55

En un aspecto preferido, el virus es cualquiera seleccionado de entre el grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, un virus del herpes simple y un virus vaccinia.

60

En un aspecto preferido adicional la artritis es cualquiera seleccionada de entre el grupo que consiste en artrosis, artritis reumatoide, artritis degenerativa, artritis gotosa artritis juvenil, artritis reactiva y combinaciones de las mismas.

En un aspecto aún más preferido la composición se administrará a un sujeto que la necesita por administración

65

intraarticular.

Efectos ventajosos de la invención

5 Los fragmentos de Nkx3.2 para su uso según la presente invención tienen la función de activar NF-kB en el nivel comparable a la Nkx3.2 de longitud completa y son resistentes a la proteólisis mediada por Siah1. Además, los fragmentos de Nkx3.2 mencionados anteriormente muestran efectos terapéuticos mejorados contra la artritis degenerativa en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa en la evaluación de la eficacia *in vivo* basada en modelos animales. Así, los fragmentos de Nkx3.2 pueden usarse de manera eficaz para la prevención o el tratamiento de la artritis.

Breve descripción de los dibujos

15 La FIG. 1 es una ilustración fotográfica que muestra la resistencia de los fragmentos de Nkx3.2 contra la proteólisis mediada por Siah1.

La FIG. 2 es una ilustración fotográfica que muestra la unión de los fragmentos de Nkx3.2 a IκBα.

20 La FIG. 3 es una ilustración fotográfica que muestra la inducción de degradación de IκBα por fragmentos de Nkx3.2.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la activación de la actividad transcripcional de NF-kB por fragmentos de Nkx3.2.

25 La FIG. 5 es un diagrama esquemático que representa el mecanismo molecular que subyace al proceso de activación de NF-kB inducido por Nkx3.2.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático para el procedimiento de experimentos con animales para la evaluación del efecto terapéutico de los fragmentos de Nkx3.2 usando un modelo animal con inducción de artritis degenerativa.

30 La FIG. 7 es una ilustración fotográfica que muestra la evaluación histopatológica de la eficacia terapéutica contra la artritis degenerativa de Nkx3.2 o fragmentos de Nkx3.2 expresados en las áreas afectadas.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra la gravedad de la artritis degenerativa en una escala de 0 a 5 basada en la evaluación cuantitativa de datos generales obtenidos a través de análisis histológico.

35 Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación se describirá en detalle la presente invención.

40 Los autores de la presente invención produjeron fragmentos de Nkx3.2, y encontraron que los fragmentos no son degradados por Siah1 (FIG. 1). Los autores de la invención también encontraron que los fragmentos de Nkx3.2 proporcionados en la presente memoria descriptiva inducen la degradación de IκBα a través de la unión a IκBα (FIG. 2 y 3) e inducen la activación transcripcional de NF-kB (FIG. 4). Además, los autores de la presente invención encontraron que cuando el virus adenoasociado que incluye el polinucleótido que codifica el fragmento de Nkx3.2 se administra a ratones con inducción de artritis degenerativa, el tejido de cartílago dañado se restaura (FIG. 7 y 8). Por tanto, los fragmentos de Nkx3.2 de la presente invención pueden usarse de manera eficaz para la prevención o el tratamiento de la artritis. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis, que comprende, como ingrediente activo, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

50 En algunos de los fragmentos de Nkx3.2 descritos anteriormente, el polipéptido puede representarse por la Fórmula (I) siguiente:

dominio de extensión en el extremo N-dominio central-dominio de extensión en el extremo C

(I),

55 En la Fórmula (I) anterior, el dominio central es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; el dominio de extensión en el extremo N es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 en el que los aminoácidos 1 a 53 pueden someterse consecutivamente a delección desde el extremo N a la dirección en el extremo C, empezando desde el aminoácido en la posición 1 de SEQ ID NO: 35; y el dominio de extensión en el extremo C es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en la que los aminoácidos 1 a 23 pueden someterse consecutivamente a delección desde el extremo C a la dirección en el extremo N, empezando desde el aminoácido en la posición 24 de SEQ ID NO: 5.

El dominio central es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 166 a la posición

309 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa. El dominio de extensión en el extremo N es un dominio unido al extremo N del dominio central mencionado anteriormente, y es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 112 a la posición 165 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa. El dominio de extensión en el extremo C es un dominio unido a un extremo C del dominio central mencionado anteriormente, y es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 310 a la posición 333 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa.

Alternativamente algunos de los fragmentos de Nkx3.2 descritos anteriormente pueden representarse por la siguiente Fórmula (II):

dominio de extensión en el extremo N-dominio central-dominio de extensión en el extremo C

(II),

En la Fórmula (II) anterior, el dominio central es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

el dominio de extensión en el extremo N es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 en el que los aminoácidos 1 a 41 pueden someterse consecutivamente a delección desde el extremo N a la dirección en el extremo C, empezando desde el aminoácido en la posición 1 de SEQ ID NO: 39; y

el dominio de extensión en el extremo C es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 en la que los aminoácidos 1 a 15 pueden someterse consecutivamente a delección desde el extremo C a la dirección en el extremo N, empezando desde el aminoácido en la posición 16 de SEQ ID NO: 41.

El dominio central es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 154 a la posición 317 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa. El dominio de extensión en el extremo N es un dominio unido al extremo N del dominio central mencionado anteriormente, y es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 112 a la posición 153 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa. El dominio de extensión en el extremo C es un dominio unido al extremo C del dominio central mencionado anteriormente, y es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 318 a la posición 333 de la proteína Nkx3.2 de longitud completa.

Específicamente, el polipéptido en composiciones para su uso según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

Los polipéptidos representados por las Fórmulas (I) o (II) anteriores o para su uso según la invención son fragmentos de la proteína Nkx3.2 y no están presentes naturalmente en los organismos vivos. Sin embargo, el polipéptido no se degrada fácilmente *in vivo* mientras tiene una actividad comparable a la proteína Nkx3.2 de longitud completa, y así puede mantenerse presente en un organismo más tiempo que la Nkx3.2 de longitud completa, que muestra una actividad excelente.

El fragmento de Nkx3.2 puede obtenerse por medio de una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria descriptiva.

El polinucleótido codifica el polipéptido mencionado anteriormente, por ejemplo el dominio central, el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C que puede incluir las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o 38, SEQ ID NO: 36 o 40, y SEQ ID NO: 6 o 42, respectivamente.

El polinucleótido puede incluir un polinucleótido que codifica un fragmento obtenido por delección de residuos de aminoácidos en el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C tal como se describe anteriormente. En este caso, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que expresa el polipéptido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 5.

Además, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido que codifica un fragmento obtenido por delección de residuos de aminoácidos en el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C tal como se describe anteriormente. En este caso, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que expresa el polipéptido de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

Los polinucleótidos pueden proporcionarse en vectores de expresión. El vector de expresión puede ser un vector de plásmido, un vector de cósmido, un vector bacteriófago o un vector vírico. El vector de expresión puede ser construido por un experto en la materia, de manera que el polinucleótido puede expresarse y secretarse en el mismo.

Los vectores de expresión pueden alojarse en células hospedadoras. La célula hospedadora es una célula transfectada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y puede ser una célula procariota o una

- 5 célula eucariota. Específicamente, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La transfección puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Entre tanto, un ejemplo de la célula procariota puede ser *E. coli*, y un ejemplo de la célula eucariota puede ser la levadura. Además, la célula de mamífero puede ser células de mieloma NS/O, células 293, células de ovario de hámster chino (células CHO), células HeLa, células CapT (células derivadas de líquido amniótico humano) o células COS.
- La artritis puede ser cualquiera seleccionada de entre el grupo que consiste en artrosis, artritis reumatoide, artritis degenerativa, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis senescente, artritis reactiva y combinaciones de las mismas.
- 10 La composición farmacéutica para su uso según la invención puede incluir del 0,1 % al 99 % en peso, del 1 % al 90 % en peso y del 10 % al 80 % en peso del polipéptido para su uso según la presente invención como ingrediente activo, con respecto al peso total de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede incluir además uno o más ingredientes activos que muestran la misma función o similar además del ingrediente activo descrito anteriormente.
- 15 La composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede incluir además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración además de los ingredientes activos descritos anteriormente.
- 20 La dosis de la composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que incluye los fragmentos Nkx 3.2 como ingrediente activo puede ajustarse dependiendo de varios factores que comprenden el tipo de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, los tipos y el contenido de ingredientes activos y otros ingredientes incluidos en la composición farmacéutica, el tipo de formulación, la edad del paciente, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta, los tiempos de administración, las vías de administración, la duración del tratamiento y los fármacos usados simultáneamente.
- 25 Sin embargo, para un efecto deseado, la dosis del polipéptido incluido en la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede ser de 0,0001 a 100 mg/kg. En este caso, la administración puede realizarse una vez al día o dividirse en varias veces.
- 30 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis, que comprende, como ingrediente activo, un virus recombinante que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.
- 35 El polinucleótido cargado en el virus recombinante puede codificar un polipéptido tal como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente.
- Un virus recombinante que incluye un polinucleótido que codifica el fragmento de Nkx3.2 puede obtenerse a través de una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria descriptiva anteriormente.
- 40 El polinucleótido codifica el polipéptido mencionado anteriormente, por ejemplo el dominio central, el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C que puede incluir las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o 38, SEQ ID NO: 36 o 40 y SEQ ID NO: 6 o 42, respectivamente.
- 45 El polinucleótido puede incluir un polinucleótido que codifica un fragmento obtenido por delección de residuos de aminoácidos en el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C tal como se describe anteriormente. En este caso, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que expresa el polipéptido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 5. Además, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido que codifica un fragmento obtenido por delección de residuos de aminoácidos en el dominio de extensión en el extremo N y el extremo C tal como se describe anteriormente. En este caso, el polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que expresa el polipéptido de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.
- 50 Según la invención, el polinucleótido codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.
- 55 El virus puede ser cualquiera seleccionado de entre el grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, un virus del herpes simple y un virus vaccinia. Específicamente, el virus puede ser un virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado no se limita a un serotipo específico, y preferentemente, puede ser cualquiera de AAV1 a AAV9.
- 60 Dado que el virus adenoasociado (AAV) es capaz de infectar células no en división y tiene la capacidad de infectar diversos tipos de células, el virus adenoasociado se usa de manera adecuada como sistema de suministro de genes de la presente invención. Los detalles para la preparación y los usos de vectores AAV se describen en las patentes
- 65

de EE.UU. nº 5.139.941 y 4.797.368.

Normalmente, el AAV puede producirse por cotransfección de un plásmido que comprende una secuencia de genes de interés que está flanqueada por dos repeticiones terminales AAV y un plásmido de expresión que comprende una secuencia de codificación AAV natural que no tiene repeticiones terminales.

La artritis puede ser cualquiera seleccionada de entre el grupo que consiste en artrosis, artritis reumatoide, artritis degenerativa, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis senescente, artritis reactiva y combinaciones de las mismas.

La composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede incluir además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración además de los ingredientes activos descritos anteriormente.

La dosis de la composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que incluye, como ingrediente activo, un virus recombinante que incluye un polinucleótido que codifica el fragmento de Nkx 3.2 puede ajustarse dependiendo de varios factores que incluyen el tipo de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, los tipos y el contenido de los ingredientes activos y otros ingredientes incluidos en la composición farmacéutica, el tipo de formulación, la edad del paciente, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta, los tiempos de administración, las vías de administración, la duración del tratamiento y los fármacos usados simultáneamente.

Sin embargo, para un efecto deseado, el virus recombinante incluido en la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede administrarse en una cantidad de  $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^{15}$  de genoma viral al día en el caso de adultos. Específicamente, la dosis de la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede ser tal que la administración se lleva a cabo en una cantidad de  $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^{15}$ ,  $1,0 \times 10^7$  a  $1,0 \times 10^{13}$ ,  $1,0 \times 10^8$  a  $1,0 \times 10^{12}$  o  $1,0 \times 10^9$  a  $1,0 \times 10^{10}$  al día en el caso de adultos.

El sujeto puede ser un mamífero, en particular, un ser humano. La vía de administración puede ser seleccionada de manera apropiada por un experto en la materia en consideración de un procedimiento de administración, el volumen y la viscosidad del líquido corporal, y similares. Específicamente, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intraarticular.

La composición farmacéutica para su uso según la invención puede administrarse por vía intraarticular. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "intraarticular" significa que la administración se lleva a cabo a través de una luz confinada por una cápsula articular, que es el hueco existente entre los huesos en una articulación. Existen varios procedimientos para llevar a cabo la administración intraarticular. Por ejemplo, existe un procedimiento en el que se pide a un paciente que doble una rodilla 90 grados en un estado de decúbito en una postura mirando al techo, y se introduce una jeringa por vía intraarticular. En esta postura, los límites interno y externo de la articulación pueden ser relativamente fáciles de distinguir con la mano. La inyección puede realizarse tanto en los límites interno como externo de la articulación, y principalmente se lleva a cabo hacia el límite interno de la articulación. Además, existe también un procedimiento para aplicar una inyección en una postura en la que la rodilla está estirada. En las dos posturas, cuando la jeringa se introduce correctamente en un sitio de inyección predeterminado, la solución de la inyección puede inyectarse con escasa resistencia. Sin embargo, cuando, en el momento de presionar la jeringa, los fármacos no entran bien, y se reconoce una sensación de resistencia o el paciente se queja de un dolor intenso, deberá ajustarse el sitio de inyección de la jeringa.

Los fragmentos de Nkx3.2 con estabilidad aumentada en un organismo para su uso según la invención pueden producirse mediante delección de una región cualquiera de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, que se selecciona de entre el grupo que consiste en una región en el extremo N y una región en el extremo C y una combinación de las mismas.

La delección de la región en el extremo N puede ser tal que se procede a la delección de los aminoácidos 1 a 165 consecutivamente desde el extremo N a la dirección en el extremo C, empezando desde el aminoácido en la posición 1 de SEQ ID NO: 7. Específicamente, la delección puede ser tal que se procede a la delección de los aminoácidos 1 a 53 consecutivamente desde el extremo N a la dirección en el extremo C, empezando desde el aminoácido en la posición 112 de SEQ ID NO: 7. La delección de la región en el extremo N puede ser tal que se procede a la delección de los residuos de aminoácidos 11, 18, 38, 41, 44, 47, 50 o 53 desde el extremo N a la dirección en el extremo C, empezando desde el aminoácido en la posición 112 de SEQ ID NO: 7.

La delección de la región en el extremo C puede ser tal que se procede a la delección de los aminoácidos 1 a 23 consecutivamente desde el extremo C a la dirección en el extremo N, empezando desde el aminoácido en la posición 333 de SEQ ID NO: 7. La delección de la región en el extremo C puede ser tal que se procede a la delección de los residuos de aminoácidos 13, 15, 17, 19, 21 o 23 desde el extremo C a la dirección en el extremo N, empezando desde el aminoácido en la posición 333 de SEQ ID NO: 7.

La delección del residuo de aminoácido puede producirse en una o en ambas de la región en el extremo N y la región en el extremo C. Según la presente invención, el fragmento de Nkx3.2 que se produce consiste en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

5 La delección del residuos de aminoácidos puede ser realizada con un procedimiento apropiado por un experto en la materia. Los fragmentos de Nkx3.2 con estabilidad aumentada en un organismo producida por el procedimiento anterior no se degradan fácilmente *in vivo* por medio de Siah1, y así pueden estar presentes en un organismo durante más tiempo que la proteína Nkx3.2 natural.

Modos de llevar a cabo la invención

10 A continuación se describirá en detalle la presente invención mediante los ejemplos siguientes. Sin embargo, los ejemplos siguientes pretenden simplemente ilustrar la presente invención, y la presente invención no se limita a ellos. El alcance de la invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

15 **Ejemplo 1. Construcción de vectores que expresan fragmentos de Nkx3.2**

Para obtener variantes que sean resistentes a la proteólisis mediada por Siah1 se construyeron vectores que expresan fragmentos de Nkx3.2 por el siguiente procedimiento.

20 Específicamente, se usó como plantilla el gen Nkx3.2 que tiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 8 y se amplificó usando una Lamp Pfu ADN polimerasa (Cat. # LP116-250, BIOFACT Co., Ltd., Corea) según el protocolo del fabricante. Cada uno de los productos de PCR amplificados se escindió con enzimas de restricción EcoRI (Cat. # FD0274, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) y XhoI (Cat. # FD0694, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) o XbaI (Cat. # FD0684, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.), y respectivamente, se insertó en un vector de expresión pCS (Addgene Cat # 17095) usando una T4 ligasa (Cat. # EL0011, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.).

25 En consecuencia, se construyeron vectores de expresión que expresan 20 clases de los fragmentos de Nkx3.2 tal como se muestra en la Tabla 1 siguiente.

[Tabla 1]

Nombre	Característica	SEQ ID NO
Nkx3.2 (1-333)	Nkx3.2 de longitud completa	SEQ ID NO: 7
Nkx3.2 (1-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 1° a 320°	SEQ ID NO: 9
Nkx3.2 (1-307)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 1° a 307°	SEQ ID NO: 10
Nkx3.2 (42-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 42° a 333°	SEQ ID NO: 11
Nkx3.2 (99-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99° a 333°	SEQ ID NO: 12
Nkx3.2 (112-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 112° a 333°	SEQ ID NO: 13
Nkx3.2 (123-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 123° a 333°	SEQ ID NO: 14
Nkx3.2 (99-330)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99° a 330°	SEQ ID NO: 15
Nkx3.2 (99-327)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99° a 327°	SEQ ID NO: 16
Nkx3.2 (99-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99° a 320°	SEQ ID NO: 17
Nkx3.2 (105-327)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 105° a 327°	SEQ ID NO: 18
Nkx3.2 (110-324)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 110° a 324°	SEQ ID NO: 19
Nkx3.2 (112-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 112° a 320°	SEQ ID NO: 20
Nkx3.2 (123-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 123° a 320°	SEQ ID NO: 21
Nkx3.2 (130-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 130° a 320°	SEQ ID NO: 22
Nkx3.2 (150-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 150° a 320°	SEQ ID NO: 23
Nkx3.2 (153-318)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 153° a 318°	SEQ ID NO: 24
Nkx3.2 (156-316)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 156° a 316°	SEQ ID NO: 25
Nkx3.2 (159-314)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 159° a 314°	SEQ ID NO: 26
Nkx3.2 (162-312)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 162° a 312°	SEQ ID NO: 27
Nkx3.2 (165-310)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 165° a 310°	SEQ ID NO: 28

30 **Ejemplo 2. Selección de los fragmentos de Nkx3.2 resistentes a la proteólisis mediada por Siah1**

Usando los vectores de expresión que expresan los fragmentos de Nkx3.2 tal como se construyen en el Ejemplo 1, se seleccionaron los fragmentos de Nkx3.2 que no se degradan mediante Siah1 por el siguiente procedimiento.

35 En primer lugar, se amplificó por PCR Siah1 (SEQ ID NO: 29; GenBank nº acceso AAH35562.1) en las mismas

condiciones y con el mismo procedimiento que se describen en el Ejemplo 1, y se escindió el producto de PCR amplificado con EcoRI y NcoI. Se insertó el producto resultante en un vector de expresión pCS 3HA (plásmido Addgene # 17095, un vector con una etiqueta de epítipo 3-HA insertada entre los sitios EcoRI y ClaI de pCS2P+), que se había escindido con las mismas enzimas de restricción e incluye una etiqueta en la que la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina (HA) de la gripe humana (SEQ ID NO: 33; YPYDVPDYA) se repite tres veces, para construir un vector de expresión que expresa Siah1.

Entre tanto, se cultivó la línea de células de riñón 293T (Cat. # CRL-3216, ATCC, EE.UU.) en un medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % (v/v) en una condición de 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células preparadas se dispensaron en una placa de cultivo celular de 60 x 15 mm de manera que el número de células fue de 5 x 10<sup>5</sup>. Se transfectaron las células temporalmente usando 2 µg del vector de expresión que expresa Nkx3.2, y 4 µg de cada uno de los vectores de expresión que expresan los fragmentos de Nkx3.2, respectivamente, junto con 2 µg del vector de expresión que expresa Siah1. La transfección se llevó a cabo usando VivaMagic (Cat. # VM001, VIVAGEN CO., LTD., Corea) según el protocolo del fabricante.

Se aisló la proteína completa de las células transfectadas y se cuantificó usando un kit de proteínas Bio-Rad Laboratories (Cat. # 500-0116, Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). A continuación, se llevó a cabo una inmunotransferencia Western para cada uno de Nkx3.2, Siah1 y β-actina mediante un procedimiento convencional. En este caso, se diluyeron un anticuerpo anti-Nkx3.2 (Cat.# Ab83288, Abcam, Gran Bretaña), un anticuerpo anti-HA (Cat. # 11583816001, Roche, Suiza), un anticuerpo anti-Myc (Cat.# 11667149001, Roche, Suiza) y un anticuerpo anti-β-actina (Cat. # LF-PA0207, AbFrontier, Corea) a 1:1.000, 1:5.000, 1:5.000, y 1:5.000, respectivamente, en un tampón TBST que contenía albúmina de suero bovino (ASB) al 3 % (v/v), y se utilizó. Como resultado se obtuvieron fotografías de inmunotransferencia Western ilustradas en la FIG. 1, que se resumen en la Tabla 2 siguiente.

[Tabla 2]

Nombre	SEQ ID NO	Degradación por Siah1	
Nkx3.2(1-333)	SEQ ID NO: 7	+++	o
Nkx3.2(1-320)	SEQ ID NO: 9	+	x
Nkx3.2(1-307)	SEQ ID NO: 10	-	x
Nkx3.2(42-333)	SEQ ID NO: 11	+++	o
Nkx3.2(99-333)	SEQ ID NO: 12	++	x
Nkx3.2(112-333)	SEQ ID NO: 13	++	x
Nkx3.2(123-333)	SEQ ID NO: 14	-	X
Nkx3.2(99-330)	SEQ ID NO: 15	+++	o
Nkx3.2(99-327)	SEQ ID NO: 16	+++	o
Nkx3.2(99-320)	SEQ ID NO: 17	+	X
Nkx3.2(105-327)	SEQ ID NO: 18	++	o
Nkx3.2(110-324)	SEQ ID NO: 19	+++	o
Nkx3.2(112-320)	SEQ ID NO: 20		x
Nkx3.2(123-320)	SEQ ID NO: 21		x
Nkx3.2(130-320)	SEQ ID NO: 22		x
Nkx3.2(150-320)	SEQ ID NO: 23		x
Nkx3.2(153-318)	SEQ ID NO: 24		x
Nkx3.2(156-316)	SEQ ID NO: 25	++	x
Nkx3.2(159-314)	SEQ ID NO: 26	++	x
Nkx3.2(162-312)	SEQ ID NO: 27	++	x
Nkx3.2(165-310)	SEQ ID NO: 28	++	x

Como se ilustra en la FIG. 1 y se muestra en la Tabla 2, a diferencia de la Nkx3.2 de longitud completa (1-333), no se produjo una degradación de la proteína Nkx3.2 por medio de Siah1 en los fragmentos de Nkx3.2 (1-320), Nkx3.2 (1-307), Nkx 3.2 (123-333), Nkx 3.2 (99-320), Nkx 3.2 (112-320), Nkx 3.2 (123-320), Nkx 3.2 (130-320), Nkx3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318).

### Ejemplo 3. Identificación de si los fragmentos de Nkx3.2 se unen a IκBα

Nkx3.2 induce la activación de NF-κB a través de la unión a IκBα. Así, se usó la inmunoprecipitación para identificar si los fragmentos Nkx 3.2 (112-320), Nkx 3.2 (123-320), Nkx 3.2 (130- 320), Nkx 3.2 (150-320) y Nkx 3.2 (153-318) se unen a IκBα.

En primer lugar, se amplificó IκBα (SEQ ID NO: 31; GenBank nº acceso CAB65556) por PCR en las mismas condiciones y con el mismo procedimiento que se describen en el Ejemplo 1, y se escindió el producto de PCR amplificado con EcoRI y XbaI. Se insertó el producto resultante en un vector de expresión pCS 6Myc (plásmido Addgene # 17095, un vector con etiqueta de epítipo 6-Myc insertado entre los sitios EcoRI y ClaI de pCS2P+), que se había escindido con las mismas enzimas de restricción e incluye una etiqueta en la que la secuencia de aminoácidos Myc (SEQ ID NO: 34: EQKLISEEDL) se repite seis veces, para construir un vector de expresión que expresa IκBα.

A continuación, se transfectó la línea de células de riñón 293T en las mismas condiciones y con el mismo procedimiento que se describen en el Ejemplo 2 usando 8 µg del vector de expresión que expresa Nkx3.2 (1-333) y cada uno de los vectores de expresión que expresan el IκBα, respectivamente, según se produce en el Ejemplo 1, junto con una cantidad igual del vector de expresión que expresa IκBα. En este caso, para impedir que la proteína IκBα sea degradada por la proteína Nkx3.2, se añadió MG132 (Cat. # 474790, Merck Millipore, Alemania), que es un supresor de degradación del proteasoma, a una concentración de 20 µM. Después de 6 horas, se aisló la proteína completa a partir de las células, y se llevó a cabo la inmunoprecipitación mediante un procedimiento convencional usando un anticuerpo anti-Myc que reconoce el Myc con el que está marcada IκBα. A continuación, se realizó una inmunotransferencia Western usando los anticuerpos tal como se describe anteriormente. Las fotografías de los resultados obtenidos se ilustran en la FIG. 2.

Como se ilustra en la FIG. 2, de manera similar a la Nkx3.2 de longitud completa (1-333), se formaron las bandas para los fragmentos Nkx 3.2 (112-320), Nkx 3.2 (123-320), Nkx 3.2 (130-320), Nkx 3.2 (150-320) y Nkx 3.2 (153-318). Por tanto, se identificó que los fragmentos de Nkx3.2 tienen la función de unión a IκBα para formar un complejo, lo que se requiere necesariamente para la activación de NF-κB.

#### **Ejemplo 4. Identificación de si la proteína IκBα se degrada por los fragmentos de Nkx3.2**

Nkx3.2 se une a IκBα, y así promueve la ubiquitinación y la degradación de IκBα por el proteasoma. En consecuencia, se llevó a cabo inmunotransferencia Western para identificar si los fragmentos de Nkx3.2 (112-320), Nkx3.2 (123-320), Nkx3.2 (130-320), Nkx3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318) mantienen dicha actividad.

Entre tanto, se cultivó la línea de células de cartílago ATDC5 (Cat. # RCB0565, Riken, Japón) en medio DMEM/F12 (medio de Eagle modificado de Dulbecco: Nutrient Mixture F-12) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) a una condición de 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células preparadas se dispensaron en una placa de cultivo celular de 90 x 20 mm de manera que el número de células fue de 5 x 10<sup>5</sup>. Se transfectaron las células temporalmente usando 4 µg del vector de expresión que expresa Nkx3.2 (1-333) y 8 µg de cada uno de los vectores de expresión que expresan los fragmentos de Nkx3.2, respectivamente, junto con 1 µg del vector de expresión que expresa IκBα. La transfección se llevó a cabo usando VivaMagic (Cat. # VM001, VIVAGEN CO., LTD., Corea) según el protocolo del fabricante.

Se llevó a cabo un procedimiento posterior tal como inmunotransferencia Western en las mismas condiciones y con el mismo procedimiento que se describen en el Ejemplo 2, y las fotografías de los resultados obtenidos se ilustran en la FIG. 3.

Como se muestra en la FIG. 3, se formaron bandas con una intensidad similar a la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) para los fragmentos Nkx 3.2 (112-320), Nkx 3.2 (123-320), Nkx 3.2 (130-320), Nkx 3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318). Así se identifican los fragmentos de Nkx3.2 para inducir proteólisis de IκBα al mismo nivel que la Nkx3.2 de longitud completa.

#### **Ejemplo 5. Identificación de si la función transcripcional de NF-κB se activa con fragmentos de Nkx3.2**

Nkx3.2 suprime la muerte celular de los condrocitos induciendo la activación de NF-κB. Así, para medir la activación de NF-κB por los fragmentos de Nkx3.2, se insertó una secuencia de polinucleótidos en la que el sitio de unión a ADN específico de NF-κB (SEQ ID NO: 35: GGGAATTTCC) se repite cuatro veces en un vector pGL3-Basic (Cat. # EI751, Promega, EE.UU.) usando MluI y XhoI para construir un vector de expresión 4x-κB-Luc. Además, el vector de expresión se usó para medir la activación de la función transcripcional de NF-κB por Nkx3.2 analizando la actividad de la luciferasa.

En primer lugar, la línea de células de riñón 293T se transfectó transitoriamente usando, respectivamente, 200 ng del vector de expresión que expresa la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) y cada uno de los vectores de expresión que expresan los fragmentos de Nkx3.2, 100 ng del vector de expresión 4x-κB-Luc, y 20 ng de un vector de expresión pRL-TK (Cat. # E2241, Promega, EE.UU.).

La transfección se llevó a cabo usando VivaMagic según el protocolo del fabricante. Después de 24 horas, se llevó a cabo el ensayo de luciferasa usando Dual-Luciferase Reporter Assay System (Cat. # E1910, Promega, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

Específicamente, se retiró un cultivo de la línea de células de riñón 293T transfectadas y se lavó con 1xPBS. Se añadieron a la misma 150 µl de 1 x tampón de lisis pasiva (PLB), y se lisaron las células a temperatura ambiente durante 15 minutos. A 10 µl del lisado celular se añadieron 50 µl de LAR II y se dejó reaccionar el producto resultante. A continuación, se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga. A esto se le añadieron 50 µl de Stop & Glo y se midió la actividad de luciferasa de Renilla. En los resultados experimentales, para cada muestra, se normalizó la actividad de luciferasa de Renilla con la actividad de luciferasa de luciérnaga, y se ilustra una media porcentual en la FIG. 4.

Como se muestra en la FIG. 4, cuando la actividad de luciferasa en las células transfectadas con solo el vector pCS2 como control negativo se fija en 1, no solo la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) sino también los fragmentos de Nkx3.2 (112-320), NKx3.2 (123-320), Nkx3.2 (130-320), Nkx3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318) muestran una actividad de luciferasa significativamente aumentada. Así, se identifica que los fragmentos de Nkx3.2 poseen la función de activación de la función transcripcional de NF-κB en el nivel similar a la Nkx3.2 de longitud completa.

#### **Ejemplo 6: Identificación de la eficacia terapéutica mejorada de los fragmentos de Nkx3.2 contra la artritis degenerativa**

A través de los experimentos *in vitro* descritos anteriormente se identificó la superioridad funcional de los fragmentos de Nkx3.2 en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa. En consecuencia, para identificar la función *in vivo* mejorada de los fragmentos de Nkx3.2, se comparó y se analizó la eficacia terapéutica del fragmento de Nkx3.2 (123-320) y la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) contra la artritis degenerativa. Para este fin, se seleccionó un modelo de ratón en el que se indujo una artritis degenerativa a través de una intervención quirúrgica denominada desestabilización de menisco medial (DMM). Se ilustra esquemáticamente un procedimiento para llevar a cabo el experimento en la FIG. 6.

Específicamente, se cortó el ligamento del menisco medial en el tejido de la rodilla para inducir desestabilización estructural del menisco medial, y así se hizo que el cartílago femoral y el cartílago tibial chocaran entre sí, de manera que se indujo un daño en el cartílago, y con ello se indujo artritis degenerativa. Como control se usó un grupo de animales en los cuales se disecaron y suturaron la piel externa y la piel interna de la rodilla mediante una cirugía simulada. El grupo de animales en los cuales se indujo artritis degenerativa y el control para el cual se realizó la cirugía simulada se criaron durante 8 semanas. A continuación se inyectó por vía intraarticular un virus adenoasociado (AAV) que expresaba el fragmento de Nkx3.2 (123-320) o la Nkx3.2 de longitud completa (1-333), o un vector AAV vacío en la rodilla correspondiente, y se criaron los grupos de animales durante 4 semanas. Se analizó el grado de progresión de artritis degenerativa por análisis histopatológico.

Para el análisis histopatológico se empleó un procedimiento de tinción con safranina-O. La safranina-O es un tinte de compuesto catiónico y se adhiere de manera eficaz a un grupo aniónico de proteoglicano de sulfato de heparano de cartílago de manera que se muestra un color rojo. Se evalúa un área teñida de rojo oscuro como tejido de cartílago en estado sano. Por el contrario, una parte que muestra una tinción con safranina-O débil o inexistente y una parte con tejido dañado se interpretan como lesiones en las cuales la patología de artritis degenerativa ha progresado.

Como se muestra en la FIG. 7, en el caso del grupo de control en el que se inyecta el vector AAV vacío por vía intraarticular se observó un fenómeno de daño y degeneración en el cartílago extremadamente grave con independencia de la cantidad de partículas de virus administradas.

En el caso del grupo de comparación en el que se inyectó el AAV que expresa la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) por vía intraarticular, se observó una eficacia terapéutica significativa contra la artritis degenerativa solo en el grupo al que se administró AAV a  $1 \times 10^{10}$ .

Por el contrario, en el caso del grupo experimental en el que se inyectó el AAV que expresa el fragmento de Nkx3.2 (123-320) por vía intraarticular, se mostró un efecto terapéutico superior contra la artritis degenerativa a partir del grupo al que se administró el AAV a  $1,25 \times 10^9$ , que es la dosis mínima. Es decir, en el caso del fragmento de Nkx3.2 (123-320) se identifica que la eficacia terapéutica contra la artritis degenerativa mejora al menos 10 veces, en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa (1-333).

Todos los datos obtenidos a través del análisis histopatológico se evaluaron cuantitativamente, y los resultados se ilustran gráficamente en la FIG. 8. El número de animales analizados en cada grupo experimental fue de 3, y la gravedad de artritis degenerativa se evaluó en una escala de 0 a 5. A partir de los resultados se preparó un gráfico de barras. La media con el error estándar se indicó mediante una barra de error. Las dosis de partículas de virus A, B, C y D fueron de  $1,25 \times 10^9$ ,  $2,5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$ , respectivamente, en este orden creciente.

Como se muestra en la FIG. 8, en el caso del control en el que se inyectó el vector AAV vacío por vía intraarticular, se evaluó una alta puntuación de 4,5 a 5 con independencia de la cantidad de partículas de virus administradas. Además, en el grupo de comparación en el que se inyectó el AAV que expresa la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) por vía intraarticular, se evaluó una baja puntuación de 1,5 solo en el grupo al que se administró AAV a  $1 \times 10^{10}$ . Por el contrario, en el caso del grupo experimental en el que se inyectó el AAV que expresaba el fragmento de Nkx3.2 (123-

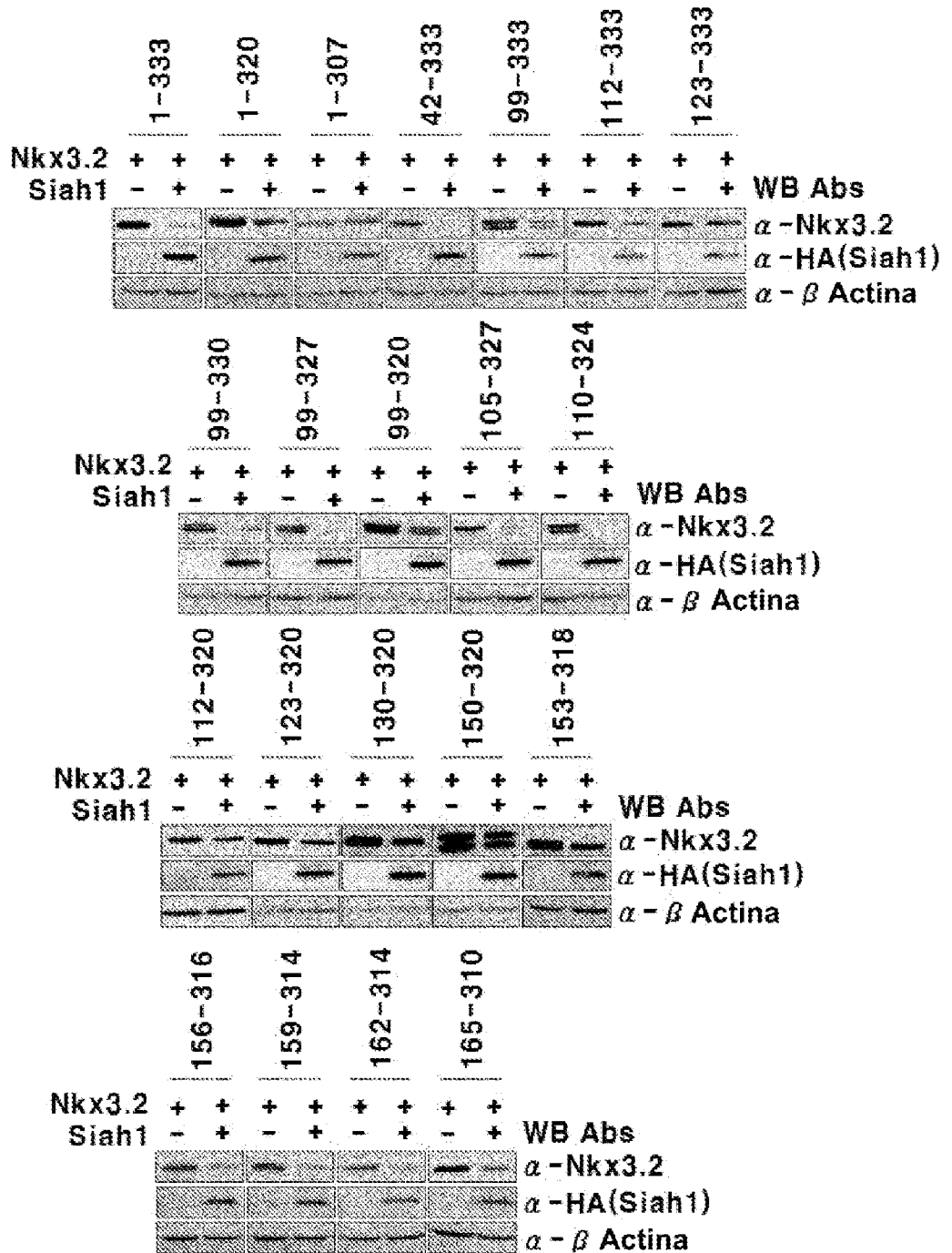
320) por vía intraarticular se evaluó una puntuación extremadamente baja de 1 o menos partiendo del grupo al que se administró el AAV a  $1,25 \times 10^9$ , que es la dosis mínima. Es decir, se identificó que el fragmento de Nkx3.2 (123-320) tiene una eficacia terapéutica superior contra la artritis degenerativa, en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa (1-333).

5

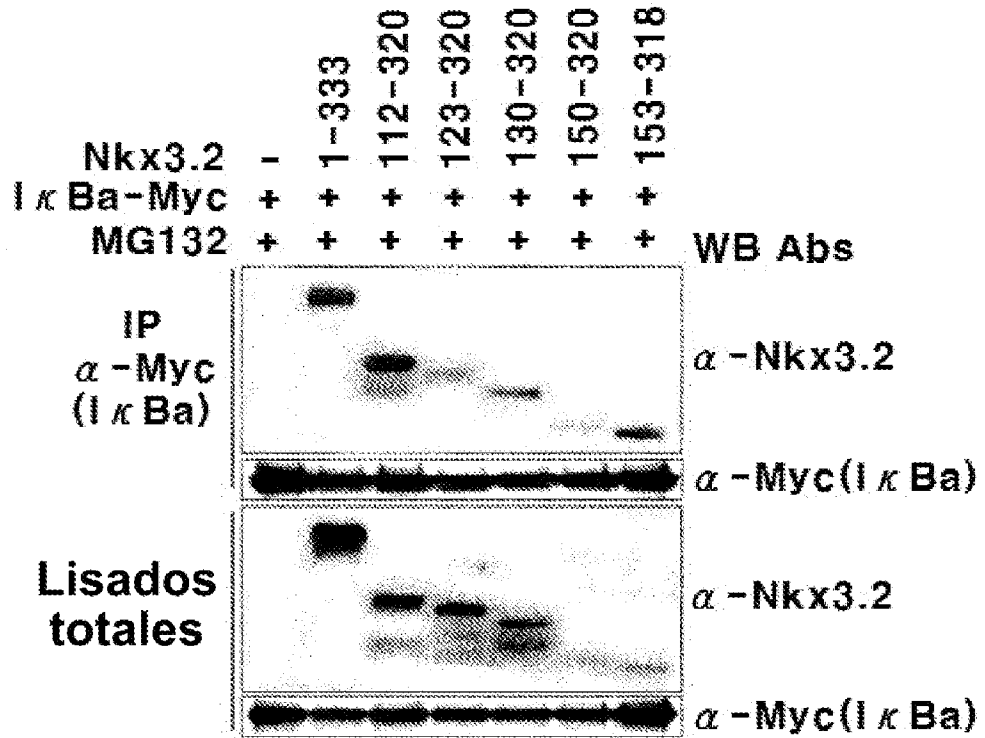
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que comprende, como ingrediente activo, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.
- 10 2. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis que comprende, como ingrediente activo, un virus recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 y capaz de expresar dicho polipéptido.
- 15 3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en la que el virus es cualquiera seleccionado de entre el grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, un virus del herpes simple y un virus vaccinia.
- 20 4. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la artritis es cualquiera seleccionada de entre el grupo que consiste en artrosis, artritis reumatoide, artritis degenerativa, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis reactiva y combinaciones de las mismas.
- 25 5. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se administrará a un sujeto que la necesita por administración intraarticular.

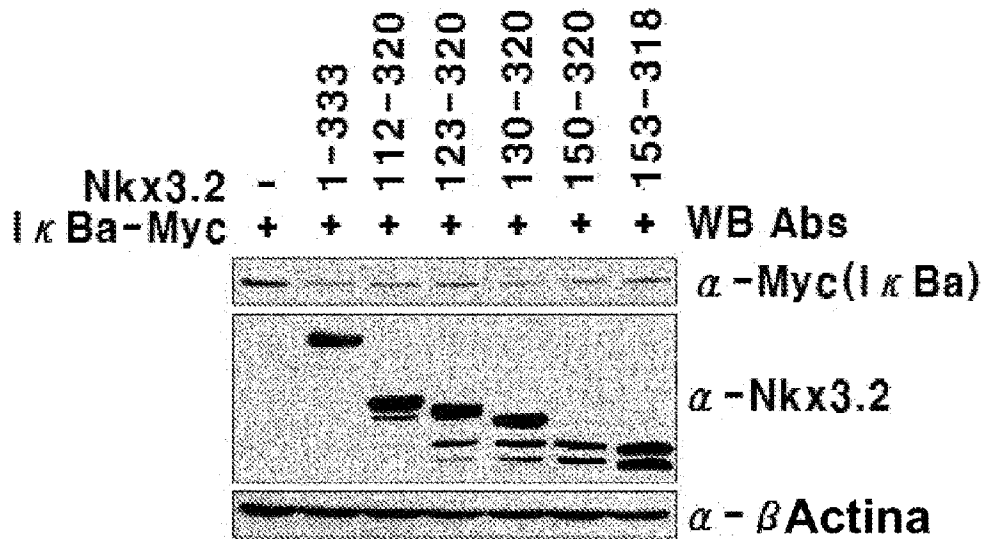
[FIG. 1]



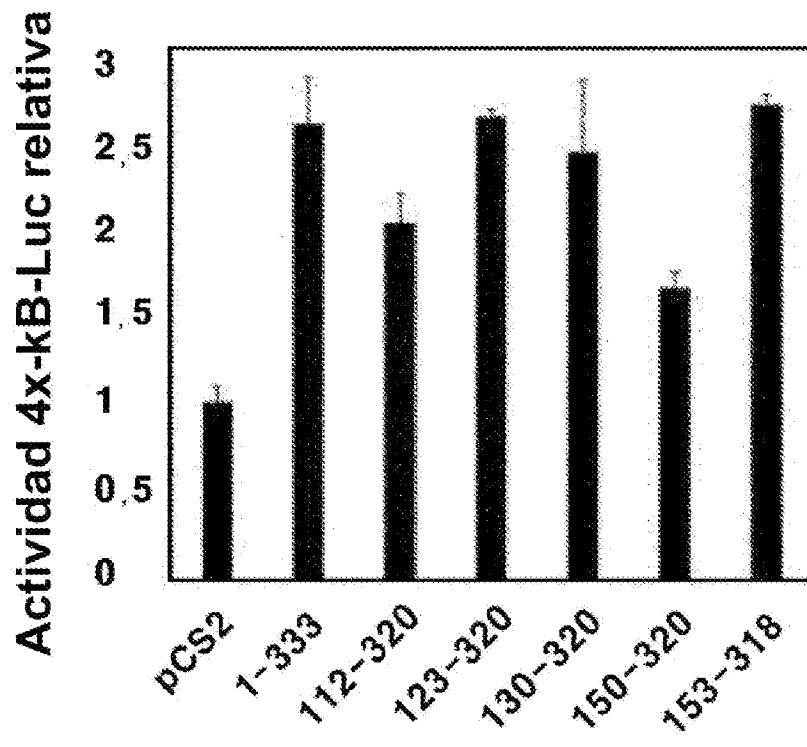
[FIG. 2]



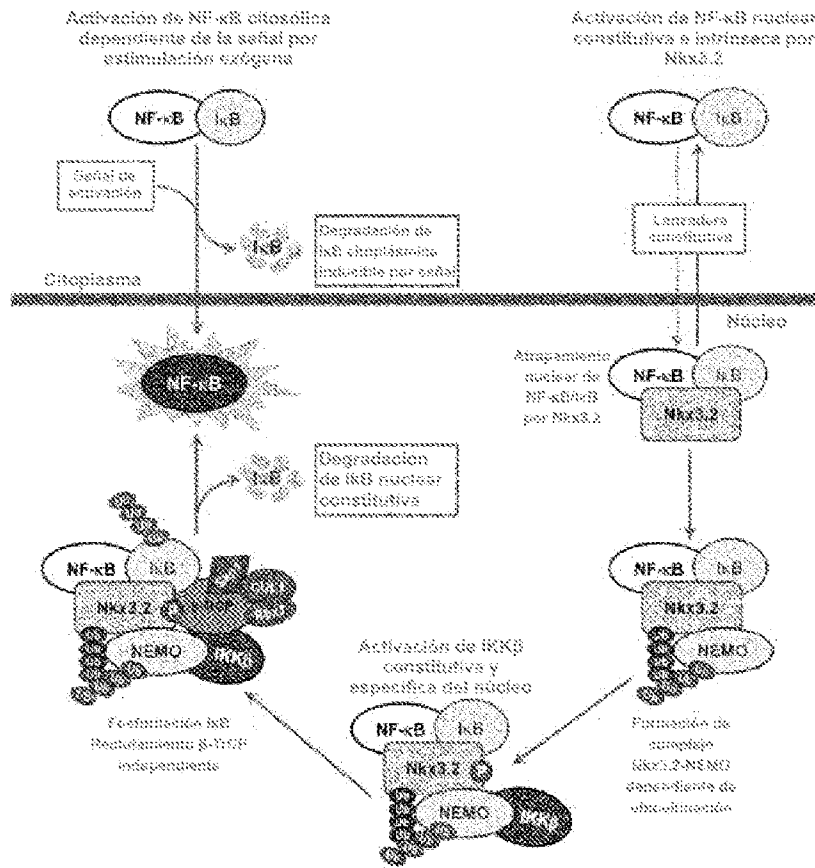
[FIG. 3]



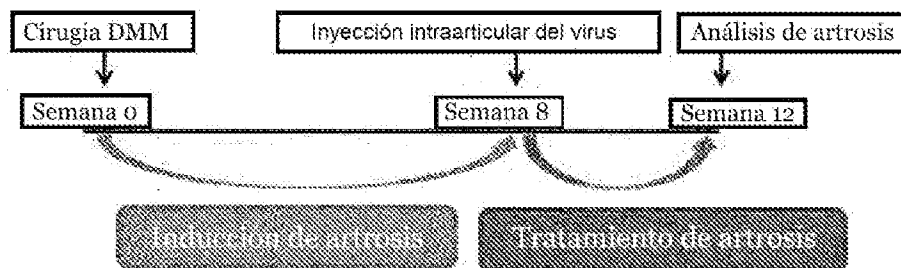
[FIG. 4]



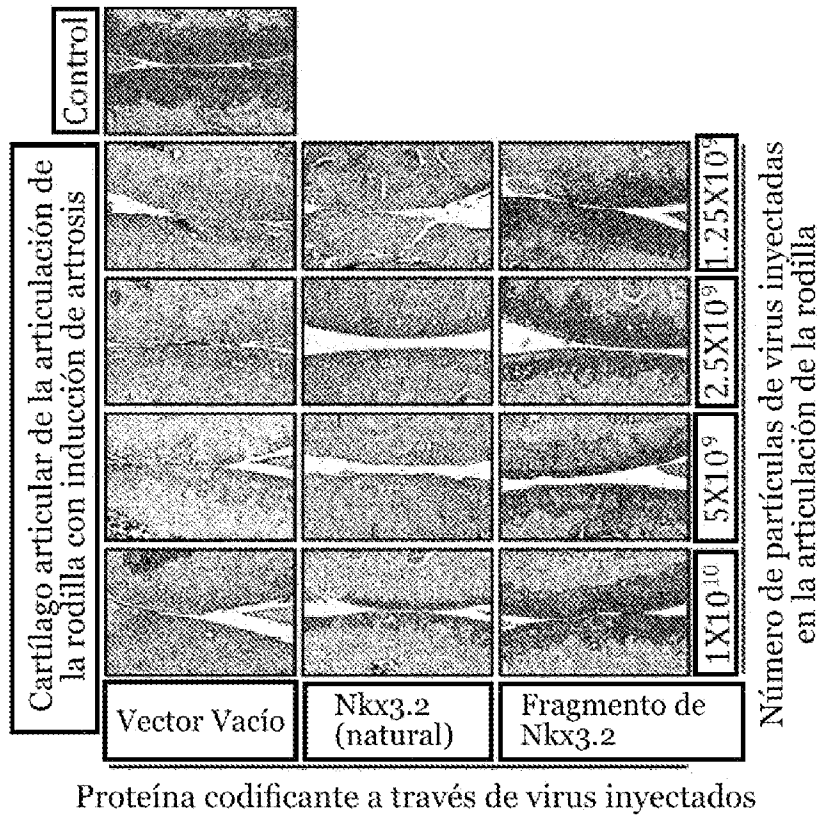
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]

