

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 014**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2017 PCT/KR2017/012651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018 WO18088813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2017 E 17868981 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 3539978**

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

30 Prioridad:

**09.11.2016 KR 20160149090**

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

**25.03.2025**

73 Titular/es:

**ICM CO., LTD. (100.00%)  
Building 323, Room 426, 50 Yonsei-ro,  
Seodaemun-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 3 009 014 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 principio activo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un fragmento de Nkx3.2 con estabilidad mejorada en un entorno tisular patológico de 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 cartilagosos que protegen una articulación, los huesos y los ligamentos que forman una articulación, y similares, lo que produce 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 la inflamación no puede ser una técnica terapéutica fundamental.

15

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

20

Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión Nkx3.2 (NK3 caja homeótica 2) suprime la pérdida de tejido cartilaginoso causada por la artritis degenerativa, y por tanto la proteína puede usarse para el tratamiento de la artritis degenerativa. A este respecto, en la patente coreana n.º 10-1150900 se describe una composición para el tratamiento de la artritis, un kit de diagnóstico de la artritis o un método de exploración de un agente terapéutico para la artritis usando la proteína Nkx3.2. En el documento WO2011/093647 también se hace referencia 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 se promueve debido a la señalización de la 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 de Indian Hedgehog aumenta con el desarrollo de la artritis degenerativa acompañada por calcificación de condrocitos, y el control de la señalización de 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 mencionados anteriormente podían inducir la activación del NF-κB (por las siglas del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados) a un nivel comparable al de la Nkx3.2 de longitud completa. Así mismo, los autores de la presente invención descubrieron 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 lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona 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

Así mismo, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente.

55

Además, la presente invención proporciona vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos mencionados anteriormente.

Así mismo, la presente invención proporciona células hospedadoras que llevan los vectores de expresión mencionados anteriormente.

60

Así mismo, la presente invención proporciona virus recombinantes que comprenden los polinucleótidos mencionados anteriormente.

65

Efectos ventajosos de la invención

Los fragmentos de Nkx3.2 de la presente invención, tienen la función de activar el NF- $\kappa$ B a un nivel comparable al de 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. Por tanto, los fragmentos de Nkx3.2 pueden usarse de manera eficaz para la prevención o el tratamiento de la artritis.

Breve descripción de los dibujos

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 I $\kappa$ B $\alpha$ .

La Fig. 3 es una ilustración fotográfica que muestra la inducción de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  por los fragmentos de Nkx3.2.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la activación de la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B por los fragmentos de Nkx3.2.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático que representa el mecanismo molecular que subyace al proceso de activación del NF- $\kappa$ B inducido por Nkx3.2.

La Fig. 6 es un diagrama esquemático del procedimiento experimental realizado con animales para evaluar el efecto terapéutico de los fragmentos de Nkx3.2 usando un modelo animal con inducción de artritis degenerativa.

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 zonas 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.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento se describirá en detalle la presente invención.

La presente invención proporciona 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.

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

dominio de extensión en el extremo N-dominio central-dominio de extensión en el extremo C (I),

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 la que los aminoácidos 1 a 53 pueden delecionarse consecutivamente 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 delecionarse consecutivamente 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 de la invención 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;

5 el dominio de extensión en el extremo N es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 en la que los aminoácidos 1 a 41 pueden delecionarse consecutivamente 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

10 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 delecionarse consecutivamente 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.

15 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.

20 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, los polipéptidos de la invención consisten 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.

25 Los polipéptidos de la invención, representados por las Fórmulas (I) o (II) anteriores, son fragmentos de la proteína Nkx3.2 y no están presentes de manera natural en los organismos vivos. No obstante, los polipéptidos no se degradan fácilmente *in vivo* mientras tengan la actividad comparable a de la proteína Nkx3.2 de longitud completa, y por tanto pueden seguir estando presentes en un organismo más tiempo que la Nkx3.2 de longitud completa, mostrando una actividad excelente.

30 La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos que consisten 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 Los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención pueden codificar el dominio central, el dominio de extensión en el extremo N y el dominio de extensión en el extremo C que pueden incluir, respectivamente, las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o 38, SEQ ID NO: 36 o 40, y SEQ ID NO: 6 o 42.

El polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que exprese el polipéptido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 5.

40 El polinucleótido puede incluir un polinucleótido sustituido con otra secuencia de nucleótidos que exprese el polipéptido de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 41.

La presente invención proporciona vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos.

45 El vector de expresión puede ser un vector de plásmido, un vector de cósmido, un vector bacteriófago o un vector vírico. Un experto familiarizado con la materia puede construir el vector de expresión, de manera que los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención puedan expresarse y secretarse en el mismo.

Además, la presente invención proporciona células hospedadoras que llevan los vectores de expresión.

50 La célula hospedadora es una célula transfectada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la presente invención, y puede ser una célula procariota o una célula eucariota. Específicamente, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La transfección puede realizarse utilizando los métodos conocidos en la técnica. Por otra parte, 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.

60 La presente invención proporciona virus recombinantes que comprenden los polinucleótidos proporcionados en el presente documento.

65 El virus puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, un virus del herpes simple y un virus variolovacunal. Específicamente, el virus puede ser un virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado no se limita a un serotipo específico, y en algunas realizaciones, el AVV puede ser uno cualquiera de AAV1 a AAV9.

Dado que el virus adenoasociado (AAV) es capaz de infectar células que no se dividen 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. En las patentes de EE.UU. n.º 5.139.941 y 4.797.368 se describen detalles de preparación y uso de vectores de AAV.

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 de AAV y un plásmido de expresión que comprende una secuencia codificante de AAV natural que no incluye repeticiones terminales.

En realizaciones de la presente invención, los presentes inventores produjeron fragmentos de Nkx3.2, y descubrieron que la proteína Siah1 no degradaba estos fragmentos (Fig. 1). Los inventores también descubrieron que los fragmentos de Nkx3.2 proporcionados en el presente documento, inducían la degradación de IκBα uniéndose a IκBα (Figs 2 y 3) e inducían la activación transcripcional del NF-κB (Fig.4). Además, los presentes inventores descubrieron que, cuando el virus adenoasociado, que incluye el polinucleótido que codifica el fragmento Nkx3.2, se administra a ratones con artritis degenerativa inducida, el tejido cartilaginoso dañado se reestablecía (Figs. 7 y 8). Por lo tanto, los fragmentos de Nkx3.2 de la presente invención pueden utilizarse de manera eficaz para prevenir o tratar la artritis.

Los fragmentos de Nkx3.2 pueden obtenerse a través de una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el 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.

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

El polipéptido o virus recombinante de la invención puede utilizarse como principio activo en una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la artritis.

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 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.

El sujeto que va a tratarse puede ser un mamífero, en particular, un ser humano. Un experto en la materia puede seleccionar de manera apropiada la vía de administración, teniendo en cuenta un método de administración, el volumen y la viscosidad del líquido corporal, y similares. Específicamente, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intraarticular.

La composición farmacéutica puede administrarse por vía intraarticular. Como se usa en el presente documento, 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 métodos para llevar a cabo la administración intraarticular. Por ejemplo, existe un método 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 método 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 lugar 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 aprecia una sensación de resistencia o el paciente se queja de un dolor intenso, deberá ajustarse el lugar de inyección de la jeringa.

Los fragmentos de Nkx3.2 de la invención con estabilidad aumentada en un organismo pueden producirse mediante la delección de una región cualquiera de un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, que se selecciona del 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 restos 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

## ES 3 009 014 T3

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.

5 La delección del resto de aminoácido puede producirse en una o en ambas de la región en el extremo N y la región en el extremo C. De acuerdo con 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.

10 La delección de los restos de aminoácidos puede realizarla un experto en la materia con un método apropiado. La proteína Siah1 no degrada fácilmente *in vivo* los fragmentos de Nkx3.2 con estabilidad aumentada en un organismo producidos a través del método anterior y por tanto pueden estar presentes en un organismo durante más tiempo que la proteína Nkx3.2 natural.

Modos para llevar a cabo la invención

15 A continuación, en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle a través de los siguientes ejemplos que pretenden ilustrar dicha invención. El alcance de la invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

20 Ejemplo 1. Construcción de vectores que expresan fragmentos de Nkx3.2

Para obtener variantes que fuesen resistentes a la proteólisis mediada por Siah1, se construyeron vectores que expresaban fragmentos de Nkx3.2 mediante el siguiente procedimiento.

25 Específicamente, como molde, se usó el gen de Nkx3.2 que tiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 8 y se amplificó usando una Lamp (*Loop-mediated isothermal amplification*, amplificación isotérmica mediada por bucle) con ADN polimerasa de Pfu (*Pyrococcus furiosus*) (Cat. n.º LP116-250, BIOFACT Co., Ltd., Corea) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada uno de los productos amplificados, resultantes de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), se escindió con enzimas de restricción EcoRI (Cat. n.º FD0274, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) y XhoI (Cat. n.º FD0694, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) o XbaI (Cat. n.º FD0684, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.), y se insertaron, respectivamente, en un vector de expresión pCS (Addgene Cat. n.º 17095) usando una T4 ligasa (Cat. n.º EL0011, Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.).

30 En consecuencia, se construyeron vectores de expresión que expresaban 20 tipos de fragmentos de Nkx3.2 tal como se muestra en la Tabla 1 siguiente.

35 [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 1º a 320º	SEQ ID NO: 9
Nkx3.2 (1-307)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 1º a 307º	SEQ ID NO: 10
Nkx3.2 (42-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 42º a 333º	SEQ ID NO: 11
Nkx3.2 (99-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99º a 333º	SEQ ID NO: 12
Nkx3.2 (112-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 112º a 333º	SEQ ID NO: 13
Nkx3.2 (123-333)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 123º a 333º	SEQ ID NO: 14
Nkx3.2 (99-330)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99º a 330º	SEQ ID NO: 15
Nkx3.2 (99-327)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99º a 327º	SEQ ID NO: 16
Nkx3.2 (99-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 99º a 320º	SEQ ID NO: 17
Nkx3.2 (105-327)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 105º a 327º	SEQ ID NO: 18
Nkx3.2 (110-324)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 110º a 324º	SEQ ID NO: 19
Nkx3.2 (112-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 112º a 320º	SEQ ID NO: 20
Nkx3.2 (123-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 123º a 320º	SEQ ID NO: 21
Nkx3.2 (130-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 130º a 320º	SEQ ID NO: 22
Nkx3.2 (150-320)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 150º a 320º	SEQ ID NO: 23
Nkx3.2 (153-318)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 153º a 318º	SEQ ID NO: 24
Nkx3.2 (156-316)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 156º a 316º	SEQ ID NO: 25
Nkx3.2 (159-314)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 159º a 314º	SEQ ID NO: 26
Nkx3.2 (162-312)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 162º a 312º	SEQ ID NO: 27
Nkx3.2 (165-310)	Fragmento de Nkx3.2 que contiene los aminoácidos 165º a 310º	SEQ ID NO: 28

## Ejemplo 2. Selección de fragmentos de Nkx3.2 resistentes a la proteólisis mediada por Siah1

Usando los vectores de expresión que expresaban los fragmentos de Nkx3.2 construidos como en el Ejemplo 1, a través del siguiente procedimiento, se seleccionaron fragmentos de Nkx3.2 que la proteína Siah1 no degradaba.

5 En primer lugar, la E3 ubiquitina-proteína ligasa (*Siah1*, *E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) (SEQ ID NO: 29; con n.º de registro AAH35562.1 en el *GenBank*) se amplificó mediante PCR en las mismas condiciones y con el mismo método que los descritos en el Ejemplo 1, y el producto amplificado, resultante de la PCR, se amplificó con EcoRI y NcoI. Para  
10 construir un vector de expresión que expresase la proteína Siah1, el producto resultante, se insertó en un vector de expresión pCS 3HA (plásmido n.º 17095 de Addgene, un vector con una etiqueta de epítipo 3-HA insertada entre los sitios EcoRI y ClaI del plásmido pCS2P+), que se había escindido con las mismas enzimas de restricción y que 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.

15 Por otro lado, la línea de células de riñón 293T (Cat. n.º CRL-3216, ATCC, EE.UU.) se cultivó en un medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) complementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % (v/v) a una temperatura de 37 °C y con 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>. Las células se transfectaron de manera transitoria usando  
20 2 µg del vector de expresión que expresaba Nkx3.2 y 4 µg de cada uno de los vectores de expresión que expresaban los fragmentos de Nkx3.2, respectivamente, junto con 2 µg del vector de expresión que expresaba Siah1. La transfección se llevó a cabo usando el reactivo de transfección VivaMagic (Cat. n.º VM001, VIVAGEN CO., LTD., Corea) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25 La proteína completa se aisló de las células transfectadas y se realizó un recuento con un kit de proteínas de Bio-Rad Laboratories (Cat. n.º 500-0116, Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). A continuación, a través de un procedimiento convencional, se llevó a cabo una inmunotransferencia Western de cada una de Nkx3.2, Siah1 y β-actina. En este caso, se diluyeron un anticuerpo anti-Nkx3.2 (Cat. n.º Ab83288, Abcam, Gran Bretaña), un anticuerpo anti-HA (Cat. n.º 11583816001, Roche, Suiza), un anticuerpo anti-Myc (Cat. n.º 11667149001, Roche, Suiza) y un anticuerpo anti-β-actina (Cat. n.º LF-PA0207, AbFrontier, Corea) a 1:1.000, 1:5.000, 1:5.000 y 1:5.000, respectivamente, en un tampón de TBST (*Tris-buffered saline with Tween<sup>®</sup> 20*) que contenía seroalbúmina bovina (SAB) al 3 % (v/v), y se utilizó. Como  
30 resultado, se obtuvieron fotografías de bandas 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	+++	○
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	+++	○
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	+++	○
Nkx3.2(99-327)	SEQ ID NO: 16	+++	○
Nkx3.2(99-320)	SEQ ID NO: 17	+	X
Nkx3.2(105-327)	SEQ ID NO: 18	++	○
Nkx3.2(110-324)	SEQ ID NO: 19	+++	○
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

35 Como se ilustra en la Fig. 1 y se muestra en la Tabla 2, a diferencia de lo que sucedía en la Nkx3.2 de longitud completa (1-333), la proteína Siah1 no produjo ninguna degradación de la proteína Nkx3.2 en los fragmentos de Nkx3.2

(1-320), Nkx3.2 (1-307), Nkx3.2 (123-333), Nkx3.2 (99-320), Nkx3.2 (112-320), Nkx3.2 (123-320), Nkx3.2 (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 del NF-κB a través de la unión a IκBα. Por tanto, se usó inmunoprecipitación 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) se unían a IκBα.

En primer lugar, mediante PCR, se amplificó IκBα (SEQ ID NO: 31; n.º de registro CAB65556 del GenBank), en las mismas condiciones y con el mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, y el producto amplificado, resultante de la PCR, se escindió con EcoRI y XbaI. Para construir un vector de expresión que expresase IκBα, el producto resultante se insertó en un vector de expresión pCS 6Myc (plásmido n.º 17095 de Addgene, 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 y que incluía una etiqueta en la que la secuencia de aminoácidos de Myc (SEQ ID NO: 34: EQKLISEEDL) se repite seis veces.

A continuación, la línea de células de riñón 293T se transfectó en las mismas condiciones y con el mismo método que el descrito 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 los fragmentos, respectivamente, producidos en el Ejemplo 1, junto con una misma cantidad del vector de expresión que expresa IκBα. En este caso, para impedir que la proteína Nkx3.2 degrade la proteína IκBα, se añadió MG132 (Cat. n.º 474790, Merck Millipore, Alemania), que es un supresor de degradación del proteasoma, a una concentración de 20 µM. Después de 6 horas, la proteína completa se aisló de las células, y a través de un método convencional, se llevó a cabo la inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Myc que reconoce la proteína Myc con la que está marcada la IκBα. A continuación, se realizó inmunotransferencia Western usando los anticuerpos descritos 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 Nkx3.2 (112-320), Nkx3.2 (123-320), Nkx3.2 (130-320), Nkx3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318). Por lo tanto, se identificó que los fragmentos de Nkx3.2 tenían la función de unión a IκBα para formar un complejo, lo que se requiere necesariamente para la activación del NF-κB.

Ejemplo 4. Identificación de si los fragmentos de Nkx3.2 degradan la proteína IκBα

Nkx3.2 se une a IκBα, y por tanto promueve la ubiquitinación y la degradación de IκBα a través del 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) conservaban dicha actividad.

Por otra parte, la línea de células de cartílago ATDC5 (Cat. n.º RCB0565, Riken, Japón) se cultivó en un medio DMEM/F12 (medio de Eagle modificado de Dulbecco: Nutrient Mixture F-12) complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) a una temperatura de 37 °C y con 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>. Las células se transfectaron de manera transitoria 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. n.º VM001, VIVAGEN CO., LTD., Corea) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se llevó a cabo un procedimiento posterior tal como inmunotransferencia Western en las mismas condiciones y con el mismo método que el descrito 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 de la Nkx3.2 de longitud completa (1-333) para los fragmentos Nkx3.2 (112-320), Nkx3.2 (123-320), Nkx3.2 (130-320), Nkx3.2 (150-320) y Nkx3.2 (153-318). Por tanto, se identificó que los fragmentos de Nkx3.2 inducían la proteólisis de IκBα al mismo nivel que la Nkx3.2 de longitud completa.

Ejemplo 5. Identificación de si los fragmentos de Nkx3.2 activan la función transcripcional del NF-κB

Nkx3.2 suprime la muerte celular de los condrocitos induciendo la activación del NF-κB. Por tanto, para medir la activación del NF-κB por los fragmentos de Nkx3.2, una secuencia de polinucleótidos, en la que el sitio de unión a ADN específico del NF-κB (SEQ ID NO: 35: GGGAATTTCC) se repite cuatro veces, se insertó en un vector pGL3-Basic (Cat. n.º E1751, Promega, EE.UU.) usando MluI y XhoI para construir un vector de expresión 4x-κB-Luc. Además, analizando la actividad de la luciferasa, el vector de expresión se usó para medir la activación de la función transcripcional del NF-κB por Nkx3.2.

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-kB-Luc y 20 ng de un vector de expresión pRL-TK (Cat. n.º E2241, Promega, EE.UU.).

5 La transfección se llevó a cabo usando VivaMagic de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de 24 horas, se llevó a cabo el ensayo de luciferasa usando sistema de ensayo con indicador de luciferasa doble (Cat. n.º E1910, Promega, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 Específicamente, un cultivo de la línea de células de riñón 293T transfectadas se eliminó y se lavó 1 vez con PBS. A este se añadieron 150 µl de tampón de lisis pasiva (PLB, *passive lysis buffer*) 1 vez y durante 15 min. se produjo la lisis de las células a temperatura ambiente. 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 la luciferasa de luciérnaga. A esto se le añadieron 50 µl de reactivo Stop & Glo y se midió la actividad de la luciferasa de *Renilla*. En los resultados experimentales, para cada muestra, la actividad de la luciferasa de *Renilla* se normalizó con la actividad de la luciferasa de luciérnaga, y en la Fig. 4 se ilustra una media porcentual.

15 Como se muestra en la Fig. 4, cuando en las células transfectadas solo con el vector pCS2 como control negativo, la actividad de la luciferasa 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. Por tanto, se identifica que los fragmentos de Nkx3.2 poseen la función de activación de la función transcripcional del NF-κB a un nivel similar al de la Nkx3.2 de longitud completa.

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

25 A través de los experimentos *in vitro* descritos anteriormente, se identificó la superioridad funcional de los fragmentos de Nkx3.2 en comparación con la de 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 de 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 artritis degenerativa a través de una intervención quirúrgica denominada desestabilización de menisco medial (DMM). En la Fig. 6 se ilustra esquemáticamente un procedimiento para llevar a cabo el experimento.

30 Específicamente, para inducir la desestabilización estructural del menisco medial, el ligamento del menisco medial del tejido de la rodilla se cortó 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 diseccionaron 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 de AAV vacío en la rodilla correspondiente, y los grupos de animales se criaron durante 4 semanas. Se analizó el grado de progresión de artritis degenerativa mediante análisis histopatológico.

35 Para el análisis histopatológico se empleó un método de tinción con safranina O. La safranina O es un colorante de compuesto catiónico y se adhiere de manera eficaz a un grupo aniónico de proteoglicano de heparán sulfato de cartílago de manera que se muestra un color rojo. Una zona teñida de rojo oscuro se evalúa como tejido cartilaginoso 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 interpreta como lesiones en las cuales la patología de artritis degenerativa ha progresado.

40 Como se muestra en la Fig. 7, en el caso del grupo de control en el que se inyecta el vector de 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.

45 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  $1 \times 10^{10}$ .

50 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 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 de la Nkx3.2 de longitud completa (1-333).

55 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 la 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 ETM 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.

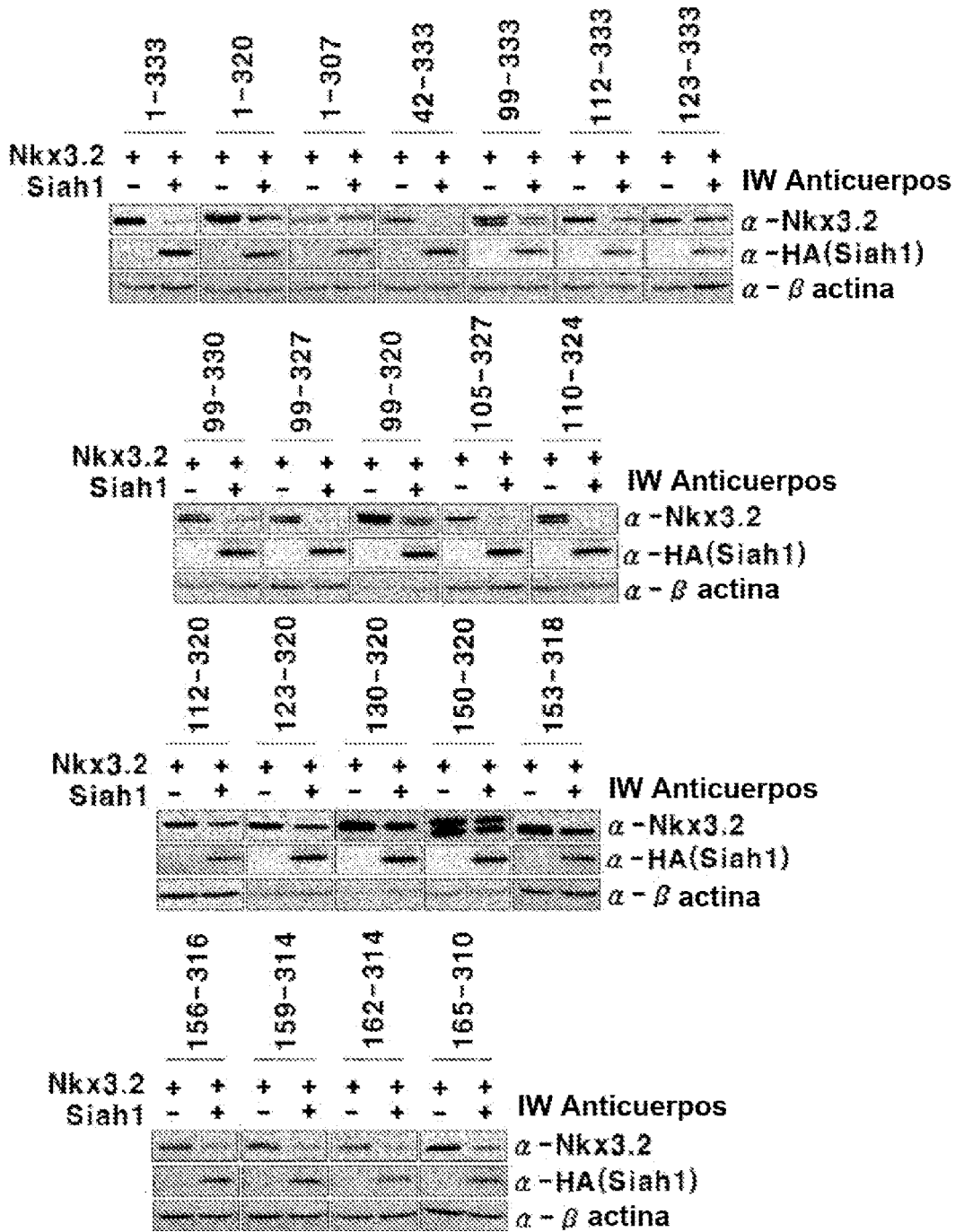
5 Como se muestra en la Fig. 8, en el caso del control en el que se inyectó el vector de AAV vacío por vía intraarticular, se evaluó una alta puntuación de 4,5 a 5 con independencia de la cantidad de partículas de virus administradas. Además, en el grupo de comparación en el que se inyectó el AAV que expresaba 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 inferior 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) tenía una eficacia terapéutica superior contra la artritis degenerativa, en comparación con la Nkx3.2 de longitud completa (1-333).

10

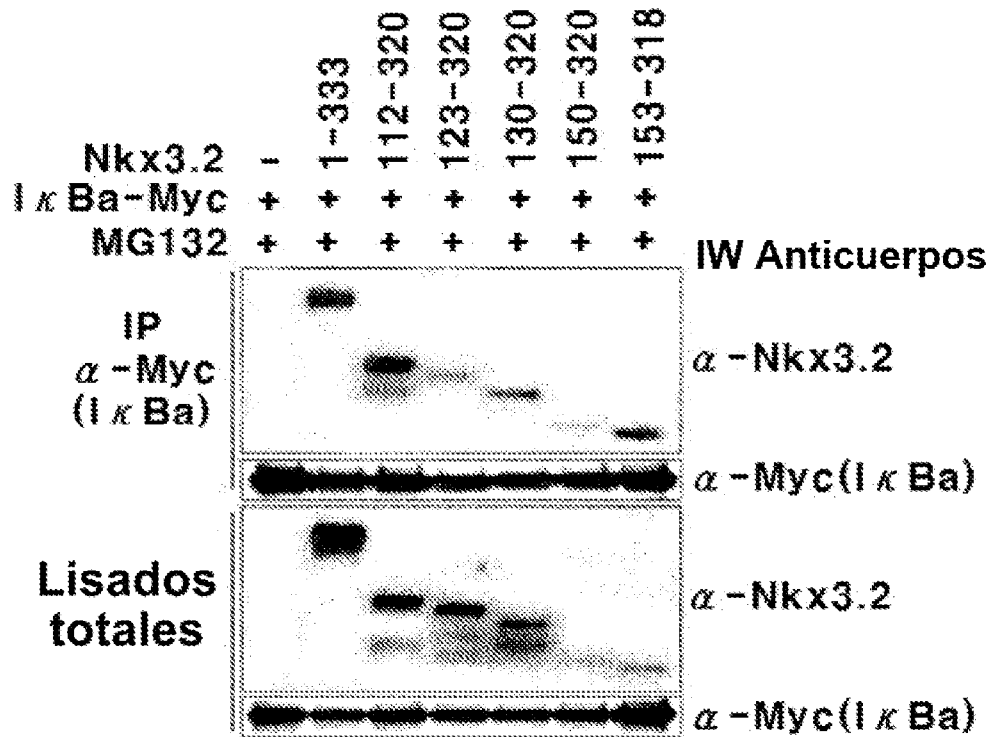
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. 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.
2. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2 y que puede expresar un polipéptido como se define en la reivindicación 1.
4. Un célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Un virus recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2 y que puede expresar el polipéptido como se define en la reivindicación 1.
6. El virus recombinante de la reivindicación 5,  
en donde el virus es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, un virus del herpes simple y un virus variolovacunal.
- 20

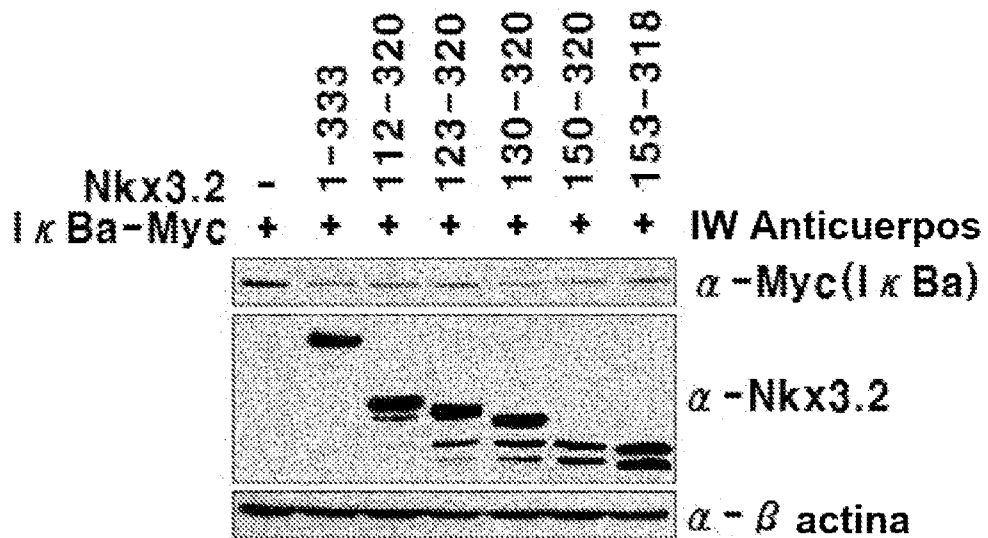
[FIG. 1]



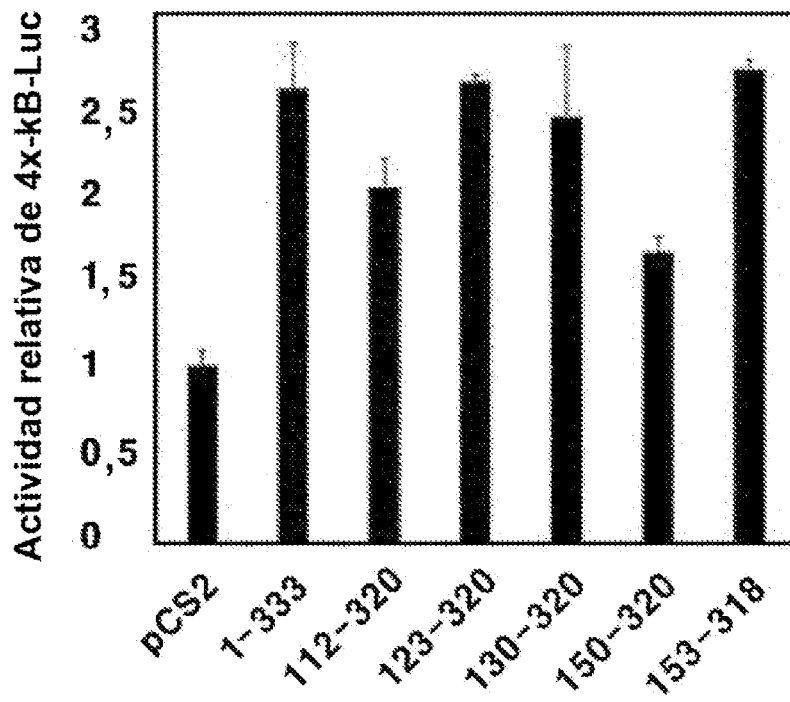
[FIG. 2]



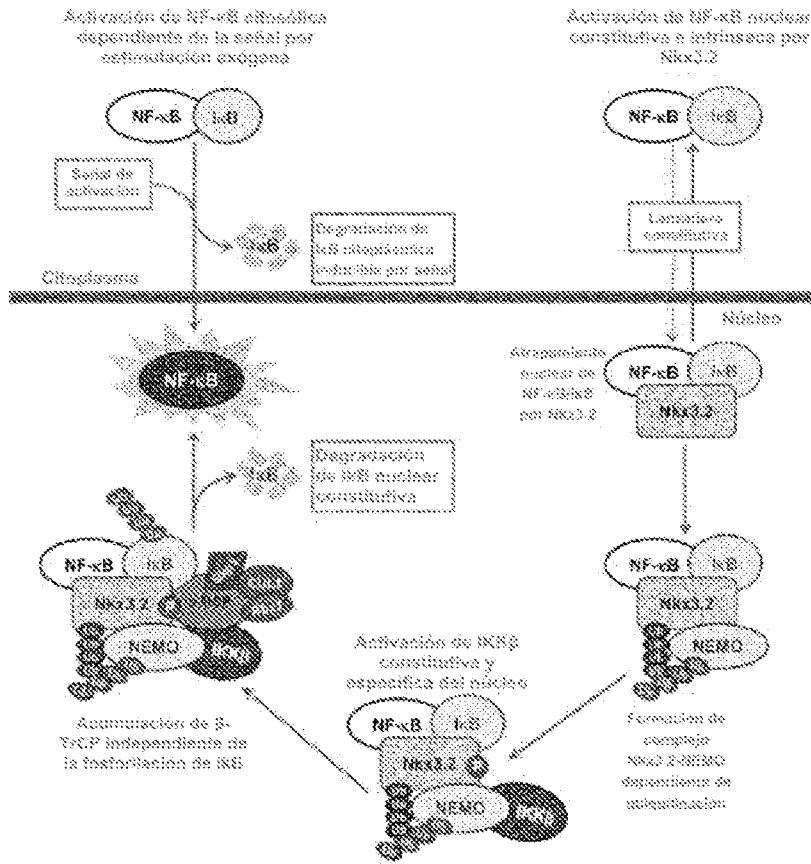
[FIG. 3]



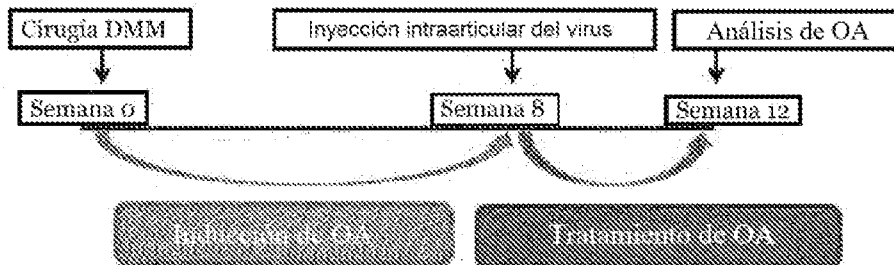
[FIG. 4]



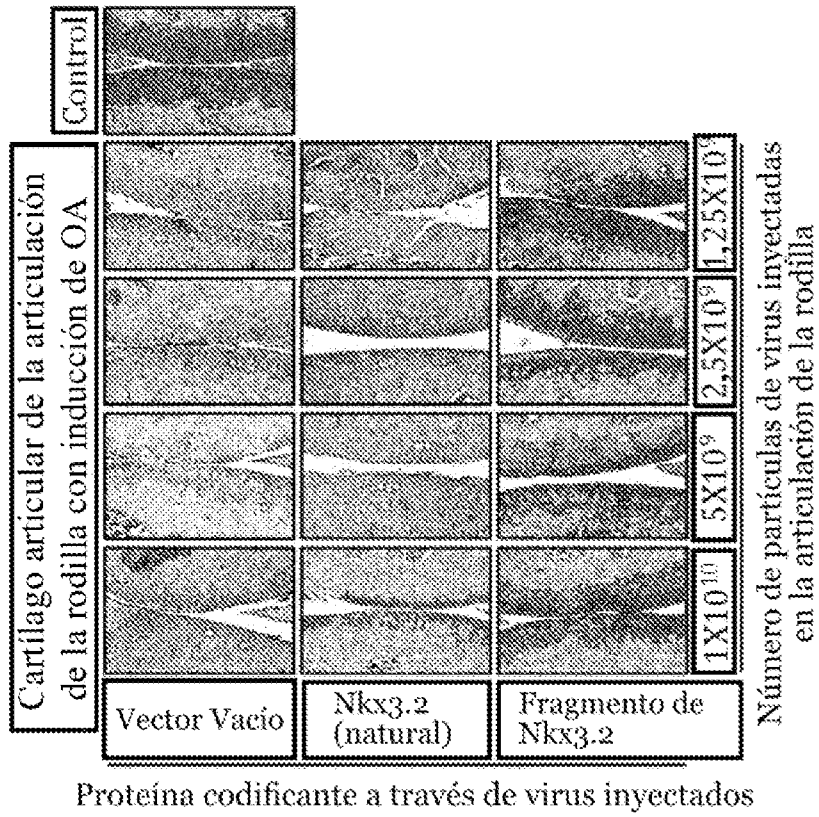
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]

