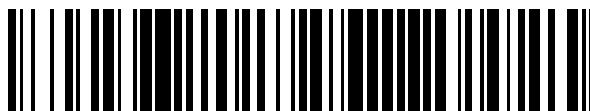


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 217**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2010** **E 10800425 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2453921**

54 Título: **Diferenciación de células madre mesenquimales**

30 Prioridad:

**14.07.2009 US 225293 P**

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

**16.07.2015**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**  
**Mail Drop TPC-8 10550 North Torrey Pines Road**  
**La Jolla, CA 92037, US y**  
**NOVARTIS AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, KRISTEN;**  
**JENNINGS, LORI y**  
**SCHULTZ, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 541 217 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

Diferenciación de células madre mesenquimales

Referencias cruzadas con las solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo la 35 U. S. C. No. 1.119(e) de la Solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/225,293, presentada el 14 de julio de 2009, cuyo contenido se incorpora como referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

- 10 La osteoartritis (OA) representa el trastorno musculoesquelético más común. Aproximadamente 40 millones de Americanos son afectados actualmente y se predice que este número se incrementará a 60 millones durante los próximos 20 años como resultado de la población en envejecimiento y un incremento en su expectativa de vida, convirtiéndola en la cuarta causa de discapacidad. La OA se caracteriza por una ruptura lenta degenerativa de la articulación incluyendo tanto el cartílago articular (que contiene las células y la matriz que producen la lubricación y amortiguación para la articulación) y el hueso subcondral que subyace al cartílago articular. Terapias para osteoartritis actuales incluyen alivio del dolor con NSAID o inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), inyección intraarticular (IA) con agentes tales como corticosteroides y hialuronano, y metodologías quirúrgicas.

- 15 Las células madres mesenquimales (MSCs) están presentes en cartílagos articulares de adultos y por aislamiento pueden ser programadas *in vitro* para experimentar diferenciación a condrocitos y otras líneas celulares mesenquimales. En parte esto es regulado por factores de crecimiento (TGFβs, BMPs), condiciones del suero y contacto célula a célula.

Breve resumen de la invención

- 20 La presente invención provee un polipéptido para uso en un método para mejorar o evitar artritis o lesiones en articulaciones en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de un polipéptido seleccionado de: (a) un polipéptido consistente de SEQ ID NO: 1 o 25; (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25; (b) un polipéptido consistente de SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 26, 27 o 28; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 26, 27 o 28; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 17 o 21; o (e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 17 o 21, en donde dicho polipéptido tiene una actividad condrogénica.

- 30 La invención también provee el uso de un polipéptido seleccionado de: (a) un polipéptido consistente de SEQ ID NO: 1 o 25; (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25; (b) un polipéptido que consiste de SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 26, 27 o 28; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 26, 27 o 28; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 17 o 21; o (e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 17 o 21, en la manufactura de un medicamento para mejorar o prevenir artritis o lesiones en articulaciones en un mamífero, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.

- 35 En algunas realizaciones, el individuo tiene artritis o lesiones articulares. En algunas realizaciones, el individuo no tiene, pero está en riesgo de tener, artritis o lesiones articulares.

En algunas realizaciones, la artritis es seleccionada del grupo consistente de osteoartritis, artritis traumática y artritis autoinmune.

En algunas realizaciones, el mamífero es un humano.

- 40 En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente ácido hialurónico.

La presente invención también provee métodos *in vitro* para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos los cuales forman la matriz del cartílago, comprendiendo el método poner en contacto células madres mesenquimales con una cantidad suficiente de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25 para inducir la diferenciación de las células madre en condrocitos.

- 45 La presente invención también provee composiciones farmacéuticas para administración intraarticular, comprendiendo la composición una cantidad farmacéuticamente efectiva de un polipéptido seleccionado de: (a) un polipéptido consistente de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 25; (b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 3, 26, o 27; (c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 17 o 21; o (d) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22 o 23, y en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.
- 50

En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente ácido hialurónico.

La invención también provee un polipéptido para uso en un método para inducir reparación del cartílago o producción de cartílago en un mamífero, en donde el método comprende poner en contacto células madres mesenquimales en el mamífero con una cantidad suficiente de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1 a 25 y en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica, para inducir reparación del cartílago o producción de cartílago.

La invención también provee un polipéptido seleccionado de: (a) un polipéptido consistente de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 25, 26 o 27 (b) un polipéptido consistente de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 18, 19, 21, 22 o 23; (c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos variante Angptl3 sustancialmente idéntica a SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 18, 19, 21, 22 o 23; o (d) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 18, 19, 21, 22 o 23, para uso en terapia, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.

Características, ventajas y realizaciones adicionales de la invención pueden ser determinadas o aparentes a partir de la consideración de la siguiente descripción detallada, y reivindicaciones. Además, debe entenderse que tanto el resumen anterior de la invención como la descripción detallada siguiente son de ejemplo y pretenden proveer explicaciones adicionales sin limitar el alcance de la invención tal como se reivindica.

#### Definiciones

Los términos "peptidomimético" y "mimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de un polipéptido de origen natural o no natural (por ejemplo, ANGPTL3). Comúnmente se utilizan análogos de péptidos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido patrón. Estos tipos de compuestos no peptídicos son denominados "imitadores de péptidos" o "peptidomiméticos" (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987), los cuales se incorporan aquí como referencia). Los peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden ser utilizados para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o potenciado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido de paradigma (esto es, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica) tales como los que se encuentran en un polipéptido de interés, pero tiene uno o más enlaces peptídicos reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo consistente de, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, y -CH<sub>2</sub>SO-. El mimético también puede estar compuesto completamente de análogos sintéticos, no naturales de aminoácidos, o es una molécula química de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales en tanto tales sustituciones no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad mimética. Por ejemplo, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si es capaz de llevar a cabo al menos una actividad de un polipéptido de interés.

Los términos "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" se utilizan de manera intercambiable aquí para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término se aplica a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente del gen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido de origen natural, esto es, un carbono α que está enlazado a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos codificados de manera natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína.

"Variantes modificadas de manera conservadora" se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, variantes modificadas de manera conservadoras se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina.

Así, en cada posición en donde una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones en aminoácidos son “variaciones silenciosas”, las cuales son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Una persona experimentada reconocerá que cada codón es un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es ordinariamente el único codón para la metionina, y TGG, el cual es ordinariamente el único codón para el triptófano) que puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. De acuerdo con lo anterior, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

- 5 En cuanto a secuencias de aminoácidos, una persona experimentada reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínica que altera, agrega o elimina un aminoácido individual o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservadora” en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proveen aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora son adicionales a y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecie, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras uno de otro:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 20 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6, Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 25 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

- El “porcentaje de identidad de secuencia” es determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (esto es, brechas) en comparación con la secuencia de referencia (por ejemplo, un polipéptido de la invención), el cual no comprende adiciones o eliminaciones, para alineamiento óptico de las dos secuencias. El porcentaje es calculado determinando el número de posiciones en las cuales el residuo de bases de ácidos nucleicos o aminoácidos idénticos se presenta en ambas secuencias para generar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

- 35 Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas secuencias. Dos secuencias son “sustancialmente idénticas” si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (esto es, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad a lo largo de una región especificada, o, cuando no se especifica, a lo largo de la secuencia completa), cuando se compara y alinea para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación, o región designada medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento e inspección visual. La invención provee polipéptidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos, respectivamente, ejemplificados aquí (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NOs: 1-28), así como usos de los mismos incluyendo pero no limitándose al uso para el tratamiento o prevención de artritis o lesiones articulares.
- 40 Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos 50 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud, o la longitud completa de la secuencia de referencia.

- Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, contra la cual son comparadas las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia son introducidas en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. Pueden utilizarse parámetros de programa por sistema, o pueden diseñarse parámetros alternativos. El algoritmo de

comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, con base en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se utiliza aquí, incluye referencia a un segmento de una cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo consistente de 20 a 600, usualmente de forma aproximada 50 a aproximadamente 200, de manera más usual aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las cuales una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias son alineadas óptimamente. Los métodos de alineamiento de las secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptico de las secuencias para comparación puede ser llevado a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, por la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 suplemento)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad en secuencias y similitud en secuencia porcentuales son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales están descritos en Altschul et al. (1977) Nuc. Acid Res. 25:3389-3402, y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para ejecutar los análisis por BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo involucra identificar primero pares de secuencias de alta calificación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de indagación, las cuales coinciden con o satisfacen algunas de las calificaciones de umbral valoradas como positivas T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud de una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de clasificación de palabras en vecindario (Altschul et al., supra). Estos aciertos en palabras de vecindario iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Estos aciertos en palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en cuanto la clasificación de alineamiento acumulativo pueda ser incrementada. Las clasificaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M. (calificación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (calificación de penalidad para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de calificación para calcular la calificación acumulativa. La extensión del acierto de palabra en cada dirección se detiene cuando: la calificación de alineamiento acumulativa cae por fuera de la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la calificación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de calificación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad de velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valor de fondo una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor de fondo una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de calificación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), la cual provee una indicación de la probabilidad con la cual ocurriría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01 y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

El término "ácido hialurónico" se utiliza aquí para incluir derivados de ácido hialurónico que incluyen ésteres de ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico, y también incluye el término hialuronano. La designación también incluye formas tanto de bajo como de alto peso molecular de los hialuronanos y hialuronanos entrecruzados o hilanos. Ejemplos de tales hialuronanos son Synvisc™ (Genzyme Corp. Cambridge, Mass.), ORTHOVISC™ (Anika Therapeutics, Woburn, Mass.), y HYALGAN™ (Sanofi-Synthelabo Inc., Malvern, Pa.).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Definición cuantitativa de la producción de colágeno tipo II inducida por MSC durante condrogénesis *in vitro*. Se siembra hMSCs (10,000/384 pozos) durante 24 horas en medio de cultivo para hMSC (Millipore). Las células fueron tratadas con las proteínas anteriores durante 72 horas adicionales. El medio fue reemplazado con DMEM libre de suero y cultivado 14 días adicionales en la ausencia de cualquier estímulo adicional. Al terminar, las células fueron fijadas con formalina, lavadas, teñidas con un anticuerpo para colágeno tipo II y contrateñidas con DAPI. La cantidad de tinción de colágeno tipo II fue cuantificado utilizando generación de imágenes de contenido (Opera, Perkin Elmer). Los datos se reúnen a partir de 3 experimentos en duplicado para cada dosis (n=6).

Figura 2. Caracterización de condrogénesis inducida por ANGTP3. (A) Se cultivo hMSCs en cultivo en pellas ( $1 \times 10^6$  células/pellas) durante 21 días en DMEM libre de suero, 1X ITS y ANGTP3 (cuando se indica). El medio fue

reemplazado cada 3 días. La expresión de ARNm de Agrecano fue cuantificada utilizando sondas específicas Taqman humanas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (datos reunidos de 3 experimentos en duplicado (n=6). (B) Se aisló cartílago bovino, se troqueló en círculos simétricos y se puso en un cultivo para órganos. Los segmentos fueron tratados durante 48 horas con 20 ng/ml de TNF $\alpha$  y 10 ng/ml de OSM (mediadores inflamatorios) para inducir la degradación de la matriz del cartílago en la presencia o ausencia de ANGPTL3 para identificar el porcentaje de inhibición de la liberación de glicosaminoglicano, un indicador del daño en la matriz (datos reunidos de 4 donantes, n=12). (C) Se sembraron condrocitos y sinoviocitos humanos normales primarios (2500/384 pozos en medio de cultivo) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. Se demostró un incremento en el crecimiento celular específico de condrocitos moderado en respuesta a ANGPTL3 durante el período de 24 horas (datos reunidos de 2 experimentos, 2 replicados/dosis (n=4))

Figura 3. mANGPTL3. (A) La estructura de la proteína primaria y sitios de glicosilación confirmados. (B) La estructura atómica (1.8 angstroms) de FLD en el terminal C de mANGPTL3 (225-455).

Figura 4: Alineamiento en secuencia de secuencias de ANGPTL3. (A) Alineamiento en secuencias de proteínas ANGPTL3 naturales humana, de ratón, bovina y canina; (B) Alineamiento en secuencias de las proteínas ANGPTL3 naturales humanas, de ratón, bovina, canina y equina.

Figura 5. Eficacia *in vivo* de mANGPTL3 en un modelo de osteoartritis quirúrgico. La transección quirúrgica del ligamento cruzado anterior (ACL), del ligamento de tibia de menisco medio (MMTL) y el ligamento colateral medio (MCL) de la rodilla derecha de ratones C57BL/6 (n=12/grupo) se llevo a cabo para inducir inestabilidad en la articulación de la rodilla y llevar así a un fenotipo con OA. Una semana después de la cirugía, los ratones fueron dosificados por vía intraarticular tal como se indica una vez / por 3-4 semanas. (A). Se recolectó sangre periférica en el día 28 después de la cirugía. Los fragmentos de colágeno tipo II circulante (CTX-II) fueron cuantificados por un ELISA (Nordic biosciences). Dosis de mANGPTL3 = 200 ng / rodilla, 3 inyecciones semanales. (B). Las definiciones cuantitativa de la meseta tibial se hicieron en una escala de 0-4, siendo 0 normal y siendo 5 una OA severa (perturbación completa del espesor del cartílago). Dos secciones de cada ratón fueron calificadas a ciegas por dos observadores. Dosis de ANGPTL3 = 200 ng / rodilla, inyecciones 3 veces a la semana. (C). El dolor por OA fue medido por la prueba de incapacidad, o por la determinación del porcentaje de tiempo que el ratón permanece sobre la pierna quirúrgica versus la otra pierna a lo largo del dispositivo de monitorización. Las lecturas representan la respuesta por dolor en el día 36 después de la cirugía (3 dosis semanales de ANGPTL3 a la concentración indicada).

## Descripción detallada

### I. Introducción

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que la 3 similar a angiopoyetina (ANGPTL3) estimula la diferenciación en condrocitos de células madre mesenquimales. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee los métodos para inducción de la diferenciación de células madres mesenquimales en condrocitos. Adicionalmente, la presente invención provee la administración de proteínas de ANGPTL3 para prevenir o mejorar la artritis o lesiones articulares administrando una proteína de ANGPTL3 a una articulación, las vertebras, discos vertebrales o por vía sistémica.

### II. 3 Similar a angiopoyetina

Similar a angiopoyetina 3 es un miembro de la familia de factores secretados similares a la angiopoyetina. Se expresa predominantemente en el hígado, y tiene la estructura característica de las angiopoyetinas, consistente de un péptido de señalización, un dominio en espiral con terminal N (CCD) y el dominio similar a fibrinógeno en terminal C (FBN). El dominio similar a FBN en 3 similar a angiopoyetina demostró unirse a integrinas  $\alpha$ V $\beta$ 3, y este enlazamiento induce a adhesión y migración celular endotelial.

Puede utilizarse una variedad de proteínas ANGPTL3 de acuerdo con la presente invención. Tal como se explica aquí, la ANGPTL3 natural es escindida de manera general *in vivo* en fragmentos en terminal amino y terminal carboxilo. La presente invención contempla el uso de diversas proteínas ANGPTL3 que tienen actividad condrogénica. En algunas realizaciones, la invención provee el uso de secuencias de aminoácidos de proteínas ANGPTL3 naturales de longitud completa (o variantes de las mismas). En algunas realizaciones, la invención provee proteínas de ANGPTL3 que comprenden una porción (no la secuencia natural de longitud completa) de la secuencia de ANGPTL3, o una variante de la misma, que retiene la actividad condrogénica, esto es, no el extremo amino terminal de la proteína natural. En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención no tienen el dominio CCD y/o no tienen actividad de CCD significativa. Así, en algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención comprenden al menos un fragmento (por ejemplo, al menos 50, 100, 150, 200, 250 aminoácidos contiguos) de la secuencia de proteínas de ANGPTL3 naturales de ratón (por ejemplo, SEQ ID NO:12), humano (por ejemplo, SEQ ID NO:8), bovina (por ejemplo, SEQ ID NO:16), de perro (por ejemplo, SEQ ID NO:20), o equina (por ejemplo, SEQ ID NO:24) o secuencias sustancialmente idénticas, pero no comprende al menos 200 aminoácidos amino terminales contiguos de una proteína de ANGPTL3 natural.

En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención comprenden un dominio similar a fibrinógeno. En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención comprenden aminoácidos contiguos correspondientes a los aminoácidos 207-455, 207-400, 207-350, 225-455, 225-400, 225-350, 241-455, 241-400, 241-350 de la secuencia de proteína de ANGPTL3 natural de ratón (por ejemplo, SEQ ID NO:12), humana (por ejemplo, SEQ ID NO:8), bovina (por ejemplo, SEQ ID NO:16), de perro (por ejemplo, SEQ ID NO:20), o equina (por ejemplo, SEQ ID NO:24) o son sustancialmente idénticas a tales secuencias, pero no incluyen la secuencia de aminoácidos de proteína ANGPTL3 natural flanqueante. En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención (incluyendo pero no limitándose a cualquiera de SEQ ID NOs: 1-28) carecen de al menos un porción de la secuencia terminal C, por ejemplo, carecen de 10, 20, 30, 40, 50 aminoácidos del terminal C.

Mientras que las proteínas de ANGPTL3 de la invención tal como se describe más arriba pueden no incluir secuencias de proteína de ANGPTL3 naturales que flanquean las regiones descritas más arriba, las proteínas de ANGPTL3 de la invención pueden incluir secuencias flanqueantes de la proteína ANGPTL3 no natural. Por ejemplo, la porción activa condrogénica de una proteína de ANGPTL3 puede ser fusionada a uno o más aminoácidos heterólogos para formar una proteína de fusión. Las secuencias asociadas de fusión pueden incluir, pero no se limitan a, etiquetas de aminoácidos, aminoácidos no L (por ejemplo, D-) u otros imitadores de aminoácidos para extender la vida media *in vivo* y/o la resistencia a la proteasa, secuencias de direccionamiento u otras secuencias.

Las proteínas de ANGPTL3 de la invención abarcan variantes y truncamientos de las proteínas de ANGPTL3 naturales así como variantes y truncamiento de fragmentos activos descritos aquí. Las variantes activas pueden ser identificadas de cualquier número de maneras conocidas para los experimentados en la técnica. En algunas realizaciones, los alineamientos de aminoácidos de las proteínas activas pueden establecerse para identificar aquellas porciones que no varían o que incluyen cambios en aminoácidos conservados. Las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, o 4 representan secuencias de consenso que comprenden los aminoácidos no variantes entre ciertas áreas (posición 241-455, 225-455 y 207-455, y de longitud completa natural, respectivamente) de las proteínas de ANGPTL3 humana, de ratón, bovina y canina naturales. Las SEQ ID NOs: 25, 26, 27, o 28 representan secuencias de consenso que comprenden los aminoácidos no variantes entre ciertas áreas (posición 241-455, 225-455 y 207-455, y longitud completa natural, respectivamente) de las proteínas de ANGPTL3 humana, de ratón, bovina, canina y equina natural. Así, en algunas realizaciones, las proteínas ANGPTL3 condrogénicas de la invención comprenden SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 25, 26, 27, o 28. En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 condrogénicas de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 (según se mide a lo largo de la longitud de SEQ ID NOs).

Las proteínas de ANGPTL3 de la invención tienen actividad condrogénica. Tal como se define aquí, la condrogénesis o actividad condrogénica se refiere al desarrollo de condrocitos a partir de MSCs. Los indicadores de la actividad condrogénica incluyen, pero no se limitan a, producción de matriz de cartílago. La producción de matriz de cartílago puede ser medida por diversos marcadores, por ejemplo, tales como la producción de Sox9, colágeno tipo II, o glicosaminoglicano (GAG). En algunas realizaciones, la producción de GAG se mide como un marcador para la producción de matriz de cartílago. En algunas realizaciones, un incremento de 3 veces en la producción de GAG con expresión de proteína específica para cartílago indica producción de matriz de cartílago positiva.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de ANGPTL3 de la invención comprenderán al menos un aminoácido codificado de manera no natural. Métodos para hacer introducir un aminoácido de origen no natural en una proteína son conocidos. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,083,970; y 7,524,647. Los principios generales para la producción de sistemas de translación ortogonal que son adecuados para hacer proteínas que comprenden uno o más aminoácidos no naturales deseados son conocidos en la técnica, como lo son los métodos generales para producir de sistemas de translación ortogonal. Por ejemplo, véase los Números de Publicación Internacional WO 2002/086075, titulado "METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS;" WO 2002/085923, entitled "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS;" WO 2004/094593, entitled "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE;" WO 2005/019415, filed Jul. 7, 2004; WO 2005/007870, filed Jul. 7, 2004; WO 2005/007624, filed Jul. 7, 2004; WO 2006/110182, filed Oct. 27, 2005, entitled "ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS FOR THE VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" and WO 2007/103490, filed Mar. 7, 2007, entitled "SYSTEMS FOR THE EXPRESSION OF ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS IN EUBACTERIAL HOST CELLS." Cada una de estas solicitudes se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Para la discusión de sistemas de translación ortogonal que incorporan aminoácidos no naturales, y métodos para su producción y uso, véase también, Wang y Schultz, (2005) "Expanding the Genetic Code." *Angewandte Chemie Int Ed* 44: 34-66; Xie and Schultz, (2005) "An Expanding Genetic Code." *Methods* 36: 227-238; Xie and Schultz, (2005) "Adding Amino Acids to the Genetic Repertoire." *Curr Opin in Chemical Biology* 9: 548-554; and Wang, et al., (2006) "Expanding the Genetic Code." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 225-249; Deiters, et al, (2005) "In vivo incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:1521-1524; Chin, et al., (2002) "Addition of p-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*." *J Am Chem Soc* 124: 9026-9027; y la Publicación Internacional No. WO2006/034332, presentada el 20 de septiembre de 2005, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Se encuentran detalles adicionales en las Patentes de los Estados

Unidos No. 7,045,337; No. 7,083,970; No. 7,238,510; No. 7,129,333; No. 7,262,040; No. 7,183,082; No. 7,199,222; y No. 7,217,809.

Un "aminoácido codificado de manera no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otros términos que pueden ser utilizados como sinónimos con el término "aminoácido codificado de manera no natural" son "aminoácido no natural", "aminoácido innatural", o "aminoácido de origen no natural", y diversas versiones con guiones y sin guiones de las mismas. El término "aminoácido codificado de manera no natural" también incluye, pero no se limita a, aminoácidos que ocurren por modificación (por ejemplo, modificaciones postraduccion) de un aminoácido codificado de manera natural (incluyendo pero no limitándose, a los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero no son en sí mismos incorporados de manera natural en una cadena de polipéptidos creciente mediante el complejo de traducción. Ejemplos de tales aminoácidos de origen no natural incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosamil-L-serina, N-acetilglucosamil-L-treonina, y O-fosfotirosina.

Un aminoácido codificado de manera no natural es típicamente cualquier estructura que tenga una cadena lateral sustituyente diferente a una utilizada en los veinte aminoácidos naturales. Debido a que los aminoácidos codificados de manera no natural de la invención difieren típicamente de los aminoácidos naturales solamente en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos codificados de manera no natural forman enlaces amida con otros aminoácidos, incluyendo pero no limitándose a, codificados de manera natural o no natural, de la misma manera en la cual son formados en polipéptidos originados de manera natural. Sin embargo, los aminoácidos codificados de manera no natural tienen grupos de cadena lateral que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquilo-, arilo-, acilo-, ceto-, azido-, hidroxilo-, hidracina-, ciano-, halo-, hidrazida-, alqueno-, alquino-, éter-, tiol-, seleno-, sulfonilo-, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, o similares o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos de origen no natural de interés que pueden ser adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden un agente de entrecruzamiento fotoactivable, aminoácidos marcados por rotación, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos con enlazamiento a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radioactivos, aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan de manera covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de la biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilén glicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos escindibles químicamente y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales elongadas en comparación con aminoácidos naturales, que incluyen pero no se limitan a poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, que incluyen pero no se limitan a, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar enlazado por carbono, aminoácidos activos en función rédox, aminoácidos que contienen aminotioácidos, y aminoácidos que comprenden una o más unidades estructurales tóxicas.

Aminoácidos codificados de manera no natural de ejemplo que pueden ser adecuados para uso en la presente invención y que son útiles para reacciones en polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, aquellos con grupos carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas realizaciones, aminoácidos codificados de manera no natural comprenden una unidad estructural sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen N-acetil-N-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen también ejemplos en donde el enlace N- u O- de origen natural entre el aminoácido y el sacárido es reemplazado por un enlace covalente que no se encuentra de manera común en la naturaleza que incluyen pero no se limitan a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en proteínas de origen natural tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

Otro tipo de modificación que puede ser introducida opcionalmente en las proteínas de ANGPTL3 de la invención (por ejemplo dentro de la cadena de polipéptidos bien sea en el terminal N o en el C), por ejemplo, para extender la vida media *in vivo*, es la PEGilación o incorporación de polímeros de polietilenglicol de cadena larga (PEG). La introducción de PEG o de polímeros de PEG de cadena larga incrementan el peso molecular efectivo de los polipéptidos presentes, por ejemplo, para prevenir una filtración rápida en la orina. En algunas realizaciones, un residuo lisina en la secuencia de ANGPTL3 es conjugado a PEG directamente o a través de un enlazante. Tal enlazante puede ser, por ejemplo, un residuo Glu, o un residuo acilo que contiene un grupo funcional tiol para enlazamiento a la cadena de PEG apropiadamente modificada. Un método alternativo para introducir una cadena de PEG es introducir primero un residuo Cys en el terminal C o en residuos expuestos en solventes tales como reemplazos para residuos de Arg o Lys. Este residuo Cys es luego unido específicamente al sitio a una cadena de PEG que contiene, por ejemplo, una función maleimida. Métodos para incorporar PEG o polímeros de PEG de cadena larga son bien conocidos en la técnica (descritos, por ejemplo, en Veronese, F. M., et al., Drug Disc. Today 10: 1451-8 (2005); Greenwald, R. B., et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 217-50 (2003); Roberts, M. J., et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 54: 459-76 (2002)), cuyo contenido se incorpora aquí como referencia. Otros métodos para conjugaciones de polímeros conocidos en la técnica también pueden ser utilizados en la presente invención. En algunas realizaciones, se introduce poli(2-metacrilóioxietil fosforilcolina) (PMPC) en un conjugado polimérico con las



proteínas de ANGPTL3 de la invención (véase, por ejemplo, WO2008/098930; Lewis, et al., Bioconjug Chem., 19: 2144-55 (2008)). En algunas realizaciones, un polímero que contiene fosforilcolina conjugado con las proteínas de ANGPTL3 puede ser usado en la presente invención. Una persona de experiencia reconocerá fácilmente que pueden utilizarse otros conjugados de polímeros biocompatibles.

- 5 Una metodología alternativa recientemente reportada para incorporar PEG o polímeros de PEG a través de la incorporación de aminoácidos no naturales (tal como se describe más arriba) puede ser llevada a cabo con los presentes polipéptidos. Esta metodología utiliza un par ARNt/ARNt sintetasa y es codificado en el plásmido de expresión por el codón supresor ámbar (Deiters, A, et al. (2004). Bio-org. Med. Chem. Lett. 14, 5743-5). Por ejemplo, puede incorporarse p-azidofenilalanina en los polipéptidos presentes y luego hacerse reaccionar con un polímero de PEG que tiene una unidad estructural acetileno en la presencia de un agente reductor e iones cobre para facilitar una reacción orgánica conocida como "cicloadición [3+2] de Huisgen"

- 15 En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de las proteínas de ANGPTL3 de tal forma que se altera la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones pueden ser seleccionadas de tal manera que se introduzcan o eliminen uno o más de los sitios de glicosilación. Tales mutaciones pueden ser seleccionadas de tal manera que introduzcan o eliminen una o más sitios de glicosilación incluyendo pero no limitándose a, sitios de glicosilación, enlazados a O- o enlazados a N-. En ciertas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la presente invención tienen sitios y patrones de glicosilación no alterados con respecto a las proteínas de ANGPTL3 de origen natural. En ciertas realizaciones, una variante de las proteínas de ANGPTL3 incluye una variante de glicosilación en donde el número y/o tipo de sitios de glicosilación ha sido alterado con respecto a las proteínas de ANGPTL3 de origen natural. En ciertas realizaciones, una variante de un polipéptido comprende un número mayor o menor de sitios de glicosilación enlazados a N con respecto al polipéptido original. Un sitio de glicosilación enlazado a N es caracterizado por la secuencia: Asn-XSer o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de los residuos de aminoácidos para crear esta secuencia provee un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidratos enlazada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato enlazada a N existente. En ciertas realizaciones, se provee un reordenamiento de las cadenas de carbohidrato enlazadas a N, en donde uno o más sitios de glicosilación enlazados a N (típicamente aquellos que son de origen natural) son eliminados y se crean uno o más nuevos sitios enlazados a N.

- 30 Variantes de proteínas de ANGPTL3 de ejemplo incluyen variantes de cisteína en donde uno o más residuos de cisteína son eliminados o sustituidos por otro aminoácido (por ejemplo, serina) con respecto a la secuencia de aminoácidos de las proteínas de ANGPTL3 de origen natural. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando las proteínas de ANGPTL3 deban ser replegadas en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína tienen menos residuos de cisteína que el polipéptido natural. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína tienen un número par de residuos de cisteína para minimizar las interacciones resultantes de cisteínas no pareadas.

- 40 En algunas realizaciones, las variantes funcionales son formas modificadas de las proteínas de ANGPTL3 que incluyen proteínas de fusión de una proteína de ANGPTL3 de la invención y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatona S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, y región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de enlazamiento a la maltosa (MBP), o albumina de suero humano. Un dominio de fusión puede ser seleccionado de tal manera que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatona, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QLAexpress™ (Qiagen) útiles con los asociados de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, un dominio de fusión puede ser seleccionado de tal manera que facilite la detección de las proteínas de ANGPTL3. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "etiquetas de epítipo", las cuales son usualmente secuencias de péptidos cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Etiquetas de epítipo bien conocidas para anticuerpos monoclonales específicos que están disponibles fácilmente incluyen etiquetas para FLAG, para hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tales como para factor Xa o trombina, las cuales permiten que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere por lo tanto las proteínas recombinantes de la misma. Las proteínas liberadas pueden ser aisladas entonces a partir del dominio de fusión por separación cromatográfica subsecuente. En ciertas realizaciones, una proteína de ANGPTL3 está fusionada con un dominio que estabiliza la proteína ANGPTL3 *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se entiende cualquier cosa que incremente la vida media en suero, independientemente de si esto es debido a la destrucción disminuida, limpieza disminuida por el riñón u otros efectos farmacocinéticos. Las fusiones con la proteína Fc de una inmunoglobulina son conocidas por conferir propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio rango de proteínas. De la misma manera, las fusiones a albumina de suero humano puede conferir propiedades deseables. Otros dominios de fusión que pueden ser seleccionados incluyen dominios de

multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, según se desea).

### III. Indicaciones de enfermedad por proteínas 3 similares a angiopoietina

Se contempla que los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizados para tratar o prevenir cualquier tipo de artritis o lesión articular. Se contempla adicionalmente que los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizados para tratar o prevenir diversos trastornos de los cartílagos. En algunas realizaciones, las proteínas de la invención son administradas para prevenir artritis o lesiones articulares, por ejemplo, cuando hay una historia genética o familiar de artritis o lesiones articulares o antes o durante la cirugía de articulaciones. Condiciones o trastornos de ejemplo para ser tratados o prevenidos con los polipéptidos, composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a eritematosis por lupus sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, osteoartritis, enfermedad de disco degenerativa, espondiloartropatía, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismal), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis túbulo intersticial), enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa: enfermedad de Crohn), enteropatías sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas de pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con trasplantes incluyendo rechazo de injertos y enfermedad de injerto versus huésped. En algunas realizaciones de la invención, los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizados para tratar osteoartritis.

En algunas realizaciones, los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención proveen un método para estimular la proliferación de condrocitos y la producción de cartílagos en tejidos cartilaginosos que han sido dañados debido a lesiones traumáticas o condropatía. De importancia particular para el tratamiento son tejidos que exhiben superficies articuladas, tales como espina, hombro, codo, muñeca, articulaciones de los dedos, cadera, rodilla, tobillo y las articulaciones de los pies. Ejemplos de enfermedades que pueden beneficiarse del tratamiento incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, otras enfermedades autoinmunes, u osteocondritis dessicans. Además, la malformación de cartílagos es vista frecuentemente en formas de enanismo en humanos sugiriendo que los polipéptidos, composiciones y métodos serían útiles en estos pacientes.

Se contempla que los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizados para tratar un mamífero. Tal como se utiliza aquí un "mamífero" es cualquier mamífero clasificado como mamífero incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como ganado (por ejemplo vacas), caballos, perros, ovejas, cerdos, conejos, cabras, gatos, etc. En algunas realizaciones de la invención, el mamífero es un humano.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden ser heterólogos al mamífero que va a ser tratado. Por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 de bovino o fragmentos de la misma, una proteína o polipéptido derivados de una proteína de ANGPTL3 de bovino (por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 de bovino modificada, una variante conservadora de proteína de ANGPTL3 de bovino, un derivado peptidomimético de una proteína de ANGPTL3 de bovino) se utilizan en el tratamiento de un paciente humano. En algunas realizaciones, una proteína de ANGPTL3 heteróloga puede ser utilizada para expandir poblaciones de condrocitos en cultivos para trasplante. En algunas realizaciones, los cultivos expandidos serán entonces mezclados con polipéptidos y composiciones homólogos al mamífero que va a ser tratado, y colocados en el espacio de la articulación o directamente en el defecto del cartílago. Alternativamente, los polipéptidos de la invención son derivados de la misma especie (esto es, una proteína de ANGPTL3 humana o fragmentos de la misma, una proteína o polipéptido derivados de una proteína de ANGPTL3 humana (por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 humana modificada, una variante conservadora de una proteína de ANGPTL3 humana, un peptidomimético derivado de una proteína de ANGPTL3 humana) se utilizan en el tratamiento de un paciente humano. Usando una proteína derivada de la misma especie de mamífero que está siendo tratada, se pueden evitar respuestas inmunes imprevistas.

Los polipéptidos y composiciones de la presente invención pueden ser aplicados por inyección directa en el fluido sinovial de la articulación, administración sistémica (oral o intravenosa) o directamente en el defecto del cartílago, bien sea solos o en complejos con un vehículo adecuado para extender la liberación de la proteína. Los polipéptidos, composiciones y métodos de la presente invención también pueden ser útiles para expandir las poblaciones de

condrocitos en cultivo para trasplante autólogo a alogénico de condrocitos. El trasplante puede ser administrado opcionalmente con un tratamiento concurrente consistente de administración de los polipéptidos y composiciones de la presente invención. En estos procedimientos, por ejemplo, los condrocitos pueden ser recolectados por vía artroscópica a partir de un área portadora de carga menor no lesionada de la articulación dañada, y pueden ser cultivados en presencia de los polipéptidos y composiciones de la presente invención para incrementar el número de células antes del trasplante. Los cultivos expandidos serán entonces mezclados con los polipéptidos y composiciones de la presente invención, y colocados en el espacio de la articulación o directamente en el defecto. Los polipéptidos y composiciones de la presente invención pueden ser utilizados en combinación con injertos periosteales o pericondriales que contienen células que pueden formar cartílago y/o ayudar a sostener los condrocitos trasplantados o sus células precursoras en su lugar. Los polipéptidos y composiciones de la presente invención pueden ser utilizados para reparar daño en cartílagos en conjunción con el lavado lavage de la articulación, estimulación de la médula ósea, artroplastia por abrasión, perforación subcondrial, o microfractura del hueso subcondrial. Adicionalmente, después del crecimiento del cartílago debido a la administración de los polipéptidos y composiciones de la presente invención, puede ser necesario un tratamiento quirúrgico adicional para contornear adecuadamente la superficie de cartílago recién formada.

#### IV. Composiciones farmacéuticas

La dosis de un compuesto de la presente invención, para tratar las enfermedades o trastornos antes mencionados varía dependiendo de la forma de administración, la edad y el peso corporal del sujeto, y la condición del sujeto que va a ser tratado, y finalmente será decidida por el médico o veterinario a cargo. Tal cantidad del compuesto según es determinada por el médico o veterinario a cargo se denomina aquí como "cantidad efectiva".

Formulaciones adecuadas para administración incluyen excipientes, incluyendo pero no limitándose a, soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, las cuales pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto con el tiempo. La dosis será determinada por la eficacia de la proteína particular empleada y la condición del sujeto, así como el peso corporal o área superficial del área que va a ser tratada. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto colateral adverso que acompaña la administración de una proteína o vector particular en un sujeto particular. La administración puede ser lograda a través de dosis sencillas o divididas.

#### V. Métodos de administración

Puede utilizarse cualquier método para administrar las proteínas de la invención a una articulación afectada. En la práctica de esta invención, las composiciones pueden ser administradas, por ejemplo, por vía intraarticular (esto es, en una articulación), oralmente, por vía intravenosa. Las formulaciones de compuestos pueden ser presentadas en contenedores sellados con dosis unitarias o dosis múltiples, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones pueden ser preparadas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles de la clase previamente descrita. Las proteínas de la presente invención también pueden ser utilizadas efectivamente en combinación con uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, ácido hialurónico o una sal del mismo) dependiendo de la terapia o efectos deseados.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

##### **Ejemplo 1:** Filtración de alto rendimiento para inductores de la condrogénesis

Para identificar y definir una nueva estrategia no invasiva para la reparación de una articulación con OA, hemos desarrollado una selección de alto rendimiento no sesgada de proteínas capaces de direccionar selectivamente la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (MSCs) a condrocitos. El sistema de ensayo modela las MSCs residentes en cartílagos e identifica mediadores que estimulan el potencial reparador natural y potencian la regeneración de cartílago integrada. Escogemos probar una biblioteca de proteínas secretadas única mediante una selección basada en células de alto rendimiento de MSCs humana y de ratón. Esta metodología provee una estrategia que permite la identificación rápida de ligandos de proteína no caracterizada y natural que afectan la condrogénesis.

Para estudiar estas proteínas secretadas, se tomaron dos metodologías: la producción de medio acondicionado (CM) de una línea celular productora en mamíferos (HEK293T) la generación de proteínas purificadas a partir de células HEK-F de estilo libre. Juntas estas metodologías complementarias permitieron la identificación de nuevos objetivos en una variedad de aplicaciones.

La selección de proteínas en el ensayo de MSC identificó el compuesto candidato, 3 similar a angiopoyetina, abreviado a ANGPTL3. La ANGPTL3 fue identificada en dos selecciones iniciales o paralelas pero ortogonales de las proteínas tanto CM como purificadas. En la prueba del concepto de selección CM, se incubaron células C3H10t1/2 durante 7 días después de la transferencia del CM. Se encontró que la condrogénesis ocurría en pozos que contenían ANGPTL3 -75 probado con tinción con azul Alciano para la detección de la producción de matriz de cartílago. La ANGPTL3 -75 fue identificada independientemente filtrando 531 proteínas purificadas en cuanto a la diferenciación condrocítica de MSCs humana.

Después de los ensayos de selección iniciales, la ANGPTL3 fue caracterizada subsecuentemente en seis ensayos secundarios. Esto ensayos incluyen: (1) cultivo monocapa de células C3H10t1/2 mesenquimales de ratón: inducción de colágeno tipo II y expresión de proteína Sox9 (marcadores de condrogénesis) pero sin inducción de osteocalcina (marcadores de osteogénesis); (2) inhibición de la liberación de óxido nítrico (NO) inducida por TNF $\alpha$  / oncostatina M (OSM) en condrocitos de bovino; (3) inhibición de liberación de glicosaminoglicano (GAG) inducida por TNF $\alpha$  / OSM en cultivo de órganos con cartílago bovino; (4) inducción de la expresión de genes de matriz de cartílago (agrecano) en un sistema de cultivo en pellas de MSC humana; (5) carencia de toxicidad en condrocitos humanos primarios, fibroblastos sinoviales humanos, y MSCs humana; (6) estimulación de proliferación de condrocitos humanos.

La proteína ANGPTL3 de ratón funciona en tipos celulares de ratón, humano y bovino y por lo tanto fue escogida para caracterización posterior puesto que potencialmente indujo la diferenciación condrogénica (0.5-5 nM) aunque su homólogo humano mantiene una potencia similar para la condrogénesis en comparación con otros inductores de condrogénesis previamente conocidos en el ensayo de colágeno tipo II basado en imágenes cuantitativas (Figura 1). La MSCs tanto de ratón como humana se diferenció en cultivo en monocapas y en pella (respectivamente) durante 18 a 21 días cuando se trato con ANGPTL3 0.5-5 nM y expresó tres proteínas específicas de cartílago: colágeno tipo II, Sox9 y agrecano. Esto fue establecido tanto por tinción inmunohistoquímica y cuantificación de ARNm por Taqman (Figura 2A). Adicionalmente, los datos sugieren que después de cultivar MSCs de ratón durante 18 días, la ANGPTL3 inhibe la tendencia espontánea hacia una respuesta de reparación fibrótica a través de la expresión reducida de fosfatasa alcalina. Para establecer la capacidad potencial para prevenir el daño en los tejidos, se estimularon cultivos de órganos con cartílago bovino con TNF $\alpha$  y oncostatina M (OSM). La liberación estimulada de glicosaminoglicano, un indicador de la degeneración de la matriz, fue inhibida significativamente por tratamiento con ANGPTL3 (Figura 2B). Adicionalmente, el tratamiento de condrocitos humanos primarios pero no de sinoviocitos humanos llevó a un incremento de dos veces en el crecimiento celular durante 24 horas (Figura 2C) sugiriendo una especificidad de su acción sobre el cartílago. La proteína tampoco tenía efectos tóxicos *in vitro* obvios (<100  $\mu$ M) sobre la viabilidad en condrocitos humanos primarios, fibroblastos sinoviales y MSCs (datos no mostrados).

En comparación directa con los dos candidatos actualmente en ensayos químicos, el tratamiento con 100 ng/ml de FGF18 o 100 ng/ml de BMP7 podría inducir nódulos condrogénicos, pero con menos producción de matriz global en comparación con ANGPTL3. La FGF 18 carece de la capacidad de incrementar la tinción de colágeno tipo II o Sox9 con Alcian Blue, indicando una carencia de especificidad de una matriz de cartílago verdadera. 100 ng/ml de BMP7 incrementó la tinción con Alcian blue, de Sox9 y colágeno tipo II, pero el significado no fue tan grande a concentraciones similares.

## Ejemplo 2: Expresión de ANGPTL3 de longitud completa recombinante y proteína mutante y análisis de función

Se predice que la ANGPTL3 de ratón es una proteína de 51 kDa. Pertenece a una familia de 7 proteínas similares a angiopoyetina identificadas (ANGPTL) que tiene similitud estructural con las angiopoyetinas, pero carecen de la capacidad de enlazarse al receptor Tie2 y tener funciones distintivas. Contienen un dominio en espiral en N terminal (CCD) y un dominio similar a fibrinógeno en C terminal (FLD). Las proteínas de ANGPTL están reguladas estrechamente por su microambiente e interacciones con la matriz extracelular (ECM) si bien los sitios de interacción precisa ni los asociados han sido dilucidados en detalle. La ANGPTL3 es secretada por el hígado y circula por vía sistémica. Es controlada a través de receptores X del hígado (LXR), con la evidencia de que la hipertrigliceridemia inducida por LXR es debida a la liberación de ANGPTL3. Las interacciones entre el CCD y el ECM a través de un motivo de enlazamiento de heparina putativa llevó a la inhibición de la escisión de la secuencia de reconocimiento de la proproteína convertasa (R221-R224), similar a la reportada para ANGPTL4. La escisión da como resultado un incremento significativo en la capacidad de CCD para inhibir la actividad de lipoproteína lipasa (LPL), y por lo tanto lleva a incrementar la trigliceridemia (TG). Esto representa la principal función biológica de la ANGPTL3 identificada antes de la presente invención. La FLD del terminal C es suficiente para inducir adhesión celular endotelial y mediar la angiogénesis después de dirigir la implantación de la córnea de rata *in vivo*. También se demostró que la ANGPTL3 recombinante podría enlazarse a una integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3 purificada y llevar a un incremento en la señalización de FAK, MAPK y AKT en células endoteliales. Estos datos sugieren que la interacción de la FLD con integrinas media en la angiogénesis.

No se ha reportado una expresión de ANGPTL3 ni observado en nuestros estudios utilizando inmunoprecipitación western en condrocitos humanos, hMSCs o fibroblastos humanos sinoviales, y no se encontró expresión de la misma en rodillas de ratón. Adicionalmente, no se han reportado actividades para cada fragmento en células de articulación con respecto a esta función condrogénica novedosa identificada en nuestra selección.

Nuestros datos indican que la ANGPTL3 de longitud completa es un mediador novedoso de la condrogénesis y la protección de cartílagos. Hemos examinado cuáles dominios de ANGPTL3 son críticos para esta función condrogénica novedosa. Una serie de truncamiento de ANGPTL3 y proteína de longitud completa han sido expresados y purificados en una línea celular HEK-S manipulada que da glicosilación limitada y homogénea para la caracterización biofísica deseada. Las metodologías espectrométricas de masas confirmaron la ocupación de cuatro glicosilaciones enlazadas a N predichas (N115, N232, N296, y N357, Figura 3A). A través de fragmentos procesados endógenamente a partir de HEK, el sitio de escisión proteolítico entre el dominio CCD y el FLD fue determinado por R224. El proceso completo en ANGPTL3 eluye por cromatografía de exclusión por tamaño con una masa >400 kDa, indicativo de una ruptura con la glicosilación heterogénea. El FLD (241-455), muestra un monómero por exclusión de tamaño y barrido con luz estática cuando se cristalizó. La estructura atómica del FLD fue determinada a una resolución de 1.8 angstroms. La estructura de FLD reveló una configuración de lámina beta de núcleo con estiramientos helicoidales que orientan tres bucles hacia el terminal C, típico de otros homólogos de FLD (Figura 3B). Los factores de temperatura en la porción terminal C del dominio son más altos que el resto de la estructura sugiriendo un alto grado de flexibilidad en esta región. La superposición con la estructura ANGPTL2/Tie2 (código PDB: 2GY7) sugiere que la porción con terminal C del FDL puede estar involucrada en interacciones proteína-proteína.

Los cinco productos de truncamiento generados han sido evaluados en ensayos condrogénicos múltiples. Los resultados sugieren que no hay retención en la actividad en el CCD solo, pero permanece actividad en FLD. De acuerdo con lo anterior, la fosforilación SMAD1 se incrementa por simulación de tres días cuando la longitud completa o los mutantes G o H solos, sugieren la activación de la cascada de señalización condrogénica.

Aunque la exposición sistémica de una proteína inyectada intraarticularmente es limitada debido al drenaje de linfa del fluido sinovial, la minimización de la exposición sistémica puede ser algunas veces deseable. Si hay exposición sistémica, la escisión de la ANGPTL3 puede llevar a la liberación del dominio CCD. La inhibición incrementada de la actividad de LPL por CCD puede llevar a la alteración de los niveles de TG en los pacientes. Nuestros resultados indican ventajas clínicas potenciales de la ANGPTL3. Por ejemplo, por disección donde la actividad condrogénica en ANGPTL3 está localizada minimizaría o excluiría los efectos sistémicos no deseados o el metabolismo de los lípidos o a las propiedades angiogénicas. La actividad condrogénica está localizada primariamente en el terminal C así que el uso específico de este dominio aliviaría las preocupaciones de la regulación de TG de la molécula de longitud completa o terminal N. Puesto que la ANGPTL3 de longitud completa está presente normalmente en suero, no hay inmunogenicidad esperada. Una ventaja adicional del uso del terminal C es que es escindido y es un monómero (~29 kDa) en comparación con la proteína de longitud completa trimerizada, reduciendo así posiblemente la vida media sistémica de cualquier porcentaje pequeño que podría estar presente en circulación y limitar cualquier efecto potencial de la angiogénesis.

### Ejemplo 3: Análisis *in vitro* de ANGPTL3

Hemos llevado a cabo varias evaluaciones *in vitro* de la ANGPTL3 de longitud completa para direccionar los eventos adversos potenciales y la retención intraarticular. Después de una inyección intraarticular (IA) de las articulaciones de la rodilla izquierda de ratones C57BL/10 de 8 semanas de edad con 3.6 µg de ANGPTL3 de longitud completa, evaluamos la expresión inmunohistoquímicamente en la presencia y ausencia de exposición durante 24 horas. A las 24 horas, permanecía muy poco o ningún nivel detectable de ANGPTL3 en el fluido sinovial puesto que el resultado típico por flujo transsinovial en los vasos de linfa sinovial para proteínas y agua es aproximadamente 2 horas. Los resultados no revelan expresión endógena de ANGPTL3 en articulaciones no tratadas, si no una detección significativa de la proteína en la matriz pericelular en el cartílago articular y en los meniscos incluso en el punto de tiempo de 24 horas. Adicionalmente no se detectó citotoxicidad dispersa de los condrocitos o daño en el cartílago *in vivo*. Después de una serie de 3 inyecciones IA en las articulaciones de rodilla de ratas (una vez / semana durante tres semanas), clínicamente no hubo toxicidad (no hubo inflamación de articulaciones o alteraciones en gait) o evidencia de una reacción inflamatoria aguda en la articulación de la rata. Histológicamente, no hubo incremento en sinovitis o proliferación incontrolada en las articulaciones de las cinco ratas inyectadas. Como sucede en el ratón, la ANGPTL3 podría ser detectada en la matriz de cartílago y circundando los condrocitos. Estos resultados indican que la ANGPTL3 no causa ningún efecto indeseable en el cartílago mismo, y que la ANGPTL3 no entra dentro ni es retenida en el cartílago y meniscos *in vivo*.

La OA no es una entidad de enfermedad sencilla y puede ser considerada la consecuencia de diversos factores etiológicos. En humanos es causada frecuentemente por tensión biomecánica anormal o anomalías genéticas o adquiridas del cartílago articular o hueso. Por lo tanto, la selección del "mejor" modelo de OA animal pequeño es difícil y deberían explorarse modelos múltiples para determinar las propiedades protectoras de cualquier agente terapéutico. Hemos completado estudios de eficacia sobre modelos de OA crónica (inducidos en colagenasa VII con base en la investigación descrita por van der Kraan y colegas) y un modelo quirúrgico agudo que involucra la transección de los tres ligamentos principales (ACL, MCL y MMTL) en la articulación con base en el trabajo de Glasson et al. Ambos modelos indujeron cambios patológicos asociados comúnmente con OA: pérdida de tinción de proteoglicano, erosión del cartílago y hueso, formación de osteofitos y alteraciones metaplásicas en el sinovio y los ligamentos pueden ser evidentes 4-8 semanas después de la iniciación de la OA. La Figura 5 representa la capacidad regenerativa del modelo quirúrgico de ANGPTL3 de OA. Para comenzar a examinar los biomarcadores

potenciales para OA, se recolectó sangre periférica durante el modelo quirúrgico para medir los fragmentos de colágeno tipo II liberados debido a daño en el cartílago (Figura 5A). Los análisis histológicos y la graduación subsecuente de la meseta tibial media reveló la regeneración en la matriz del cartílago después del tratamiento con 200 ng de ANGPTL3/rodilla una vez por semana durante 3 semanas (Figura 5B).

- 5 En un subconjunto de OA quirúrgico de 8 semanas de ratones, se examinaron tres dosis de ANGPTL3 para el alivio de dolor inducido por OA a través de mediciones de incapacidad. Este método mide la distribución de peso entre las piernas quirúrgicas y no quirúrgicas. En el día 36 después de la cirugía y 3 tratamientos semanales con PRO 1, tan bajo como 100 ng/rodilla la dosificación demostró una mejora significativa en comparación con las rodillas quirúrgicas tratadas con vehículo (Figura 5C). Estos datos combinados proveen evidencia concreta de que la ANGPTL3 tiene eficacia *in vivo* en dos modelos de OA (tanto la corrección patológica como la disminución en el dolor) y soporta el avance de su desarrollo como un agente terapéutico para OA novedoso.

- 10 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos aquí son para propósitos ilustrativos solamente y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridos a personas experimentadas en la técnica e incluidos dentro del espíritu y previsión de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones anexas. Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes citadas aquí son incorporadas por lo tanto como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Listas de secuencias

X=cualquier aminoácido

Los aminoácidos en paréntesis indican que el aminoácido puede estar ausente o presente.

- 20 SEQ ID NO:1

241-455 consenso

XXPAXCXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWTLIQHRXDGSQXFNETWENY  
XXGFGRLDGEFWLGLEKIYXIVXQSNYXLRXELXDWD (X) KXYXEYXFXLGXHETNYTLHX  
XXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHXAAGXXXCPEXXSGGWXXXXCGENNLNGKYNKXXXXKX  
XPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX

SEQ ID NO:2

225-455 consenso

- 25 TTPXXXXNEXXNXXXXXXXXXPAACXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWTLIQ  
HRXDGSQXFNETWENYXXGFGRLDGEFWLGLEKIYXIVXQSNYXLRXELXDWD (X) KXYXE  
YXFXLGXHETNYTLHXXXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHXAAGXXXCPEXXSGGWXXXXC  
GENNLNGKYNKXXXXKXPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX

SEQ ID NO:3

207-455 consenso

XIXEXXEXSLSSKXRAPRTTPXXXXNEXXNXXXXXXXXXPAACXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQ  
XFXVYCDXXSGSXWTLIQHRXDGSQXFNETWENYXXGFGRLDGEFWLGLEKIYXIVXQSNYX  
LRXELXDWD (X) KXYXEYXFXLGXHETNYTLHXXXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHXAAG  
XXXCPEXXSGGWXXXXCGENNLNGKYNKXXXXKXPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXX  
PXX

SEQ ID NO:4

- 30 Consenso de longitud completa

MXTIKLLXXXPLVIXSXXDXDXSXXSDSXXXEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLXTXEIKEEEKELRRXTXXLQVKNEEVKNMSXELXSKX  
ESLLEEKXXLQXKVXXLEXQLTXLIXXXXXXXXXXXEVEVTSKXXVEXQDNSIXXLLQXVEXQY  
XQLXQQXXQIKEIEXQLR (X) XXIXEXXEXSLSSKXRAPRTTPXXXXNEXNXXXXXXXXPAXC  
XXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWTLIQHRXDGSQXFNETWENYXXGFGFGR  
LDGEFWLGLEKIYXIVXQSNYXLRXELXDWD (X) KXYXEYXFXLXGHETNYTLHXXXIXGN  
XXXAXPEXXDLXFSTWXHAKGXXXCPEXXSGGWWXXXXCGENNLNGKYNKXXXXKXXPERXX  
GXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX (SEXXE)

**SEQ ID NO:5**

ANGPTL3 humana 241-455

GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENY  
KYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVA  
ITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECENNLNGKYNKPRAKSKP  
ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

**5 SEQ ID NO 6**

ANGPTL3 humana 225-455

TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQ  
HRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYS  
FYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECGE  
NNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

**SEQ ID NO 7**

ANGPTL3 humana 207-455

IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV  
FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYV  
RLELEDWKDNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFN  
CPEGYSGGWWHDECENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

10

**SEQ ID NO 8**

ANGPTL3 humana de longitud completa gi|7656888|ref|NP\_055310.1| [Homo sapiens]

MFTIKLLLFIIVPLVISSRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKL  
ESLLEEKILLQKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQY  
KQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTT  
IYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD  
GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRLELEDWKDNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNA  
IPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSW  
KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE

**SEQ ID NO:9**

15 ANGPTL3 de ratón 241-455

DLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKDGSQDFNETWENY  
EKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVQQSNYILRLELDQWDKSKHYVEYSFHLGSHETNYTLHVAE  
IAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKQLYCPESYSGGWWNDICENNLNGKYNKPRTKSRP  
ERRRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMMLQPTT

**SEQ ID NO 10**

ANGPTL3 de ratón 225-455

TTPPLQLNETENTEQDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQ  
HRKDGSDQDFNETWENYEKGFGRDLGFEWLGLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKHYVEYS  
FHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGQLYCPESYSGGWWNDICGE  
NNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMMLQPTT

**SEQ ID NO 11**

ANGPTL3 de ratón 207-455

IQEPSSENSLSSKSRAPRTTTPPLQLNETENTEQDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKDGSDQDFNETWENYEKGFGRDLGFEWLGLEKIYAIVQQSNYIL  
RLELQDWKDSKHYVEYSFHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGQLY  
CPESYSGGWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMMLQPTT

**SEQ ID NO 12**

ANGPTL3 de ratón de longitud completa gij33469117|ref|NP\_038941.1| [Mus musculus]

MHTIKLFLFVVPLVIASRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLRLTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKNEEVKNMSVELNSKL  
ESLLEEKTAHQKVRALQLTNLILSPAGAEHPEVTSLSKFVEQQDNSIRELLQSVVEEQY  
KQLSQQHMQUIKEIEKQLRKTGIQEPSSENSLSSKSRAPRTTTPPLQLNETENTEQDDLPADCSA  
VYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKDGSDQDFNETWENYEKGFGRDL  
GEFWLGLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKHYVEYSFHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGA  
LPEHTDLMFSTWNHRAKGQLYCPESYSGGWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWR  
PQSRKLYAIKSSKMMLQPTT

**SEQ ID NO:13**

ANGPTL3 bovina 241-454

DIPADCTIIYNQGKHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENY  
KYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVMQSNYILRIELEDWKDKYYTEYSFHLGDHETNYTLHLAEI  
SGNGPKAFPEHKDLMFSTWDHAKAGHFNCPESSGGWWYHDVCGENNLNGKYNKPKAKAKPE  
RKEGICWKSQDGRLYSIKATKMLIHPSD

**SEQ ID NO 14**

ANGPTL3 bovina 225-454

TTPSFHSNETKNVEHDDIPADCTIIYNQGKHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQ  
HRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVMQSNYILRIELEDWKDKYYTEYSF  
HLGDHETNYTLHLAEISGNGPKAFPEHKDLMFSTWDHAKAGHFNCPESSGGWWYHDVCGEN  
NLNGKYNKPKAKAKPERKEGICWKSQDGRLYSIKATKMLIHPSD

**SEQ ID NO 15**

ANGPTL3 bovina 207-454

IKESTEISLSSKPRAPRTTTPSFHSNETKNVEHDDIPADCTIIYNQGKHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVMQSNYIL  
RIELEDWKDKYYTEYSFHLGDHETNYTLHLAEISGNGPKAFPEHKDLMFSTWDHAKAGHFNC  
PESSGGWWYHDVCGENNLNGKYNKPKAKAKPERKEGICWKSQDGRLYSIKATKMLIHPSD

**SEQ ID NO 16**

ANGPTL3 bovina de longitud completa gij122692391|ref|NP\_001073814.1| [Bos taurus]



MYTIKLFLLIAPLVISSRTDQDYTSLSISPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEEKELRRATSKLQVKNEEVKNMSLELDSKL  
ESLLEEKILLQKQVRYLEDQLTDLIKNQPQIQEYLEVTSLKTLVEQQDNSIKDLLQIVEEQY  
RQLNQQQSQIKEIENQLRRTGIKESTEISLSSKPRAPRTTPSFHSNETKNVEHDDIPADCTI  
IYNQKGHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD  
GEFWLGLEKIYSIVMQSNYILRIELEDWKDKYYTEYSFHLGDHETNYTLHLAEISGNGPKAF  
PEHKDLMFSTWDHKAKGHFNCPESNSGGWWYHDVCGENNLNGKYNKPKAKAKPERKEGICWK  
SQDGRLYSIKATKMLIHPSDSENSE

**SEQ ID NO:17**

ANGPTL3 canina 240-454

DIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENY  
RYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVE  
ITGNILNALPEHKDLVFSTWDHKAKGHVNCPESSGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQRAKTKP  
ERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIID

5 **SEQ ID NO:18**

ANGPTL3 canina 224-454

TTPFLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQ  
HRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDNKHYIEYF  
FHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFSTWDHKAKGHVNCPESSGGWWWHNVCGE  
NNLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIID

**SEQ ID NO:19**

ANGPTL3 canina 206-454

IQUESTENSLSSKPRAPRTTPFLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQV  
FNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYIL  
RIELEDWNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFSTWDHKAKGHVN  
CPESYSGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIID

10

**SEQ ID NO:20**

ANGPTL3 canina de longitud completa gil7086505|ref|XP\_536686.1| [Canis familiaris]

MYTIKLFLLFIPLVISSKIDRDYSSYSVSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEEKELRRRTTSKLQVKNEEVKNMSLELNSKV  
ESLLEEKILLQKQVRYLEKQLTSLIKNQPEIQEHPEVTSLKTFVEQQDNSIKDLLQTVEEQY  
RQLNQQHSQIKEIENQLRNVIQUESTENSLSSKPRAPRTTPFLHLNETKNVEHNDIPANCTTI  
YNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDG  
EFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNAL  
PEHKDLVFSTWDHKAKGHVNCPESSGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYWK  
SQNGRLYSIKSTKMLIHPIIDSESSE

**SEQ ID NO:21**

15 ANGPTL3 equina 241-455

DFFADCTTIYNRGEHTSGIYSIKPSNSQVFNVYCDVISGSSWILIQRIDGSQNFNETWQNY  
KYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKRSNYILRIELEDWKDNKHTIEYSFHLGNHETNYTLHLVE  
ITGNVPNALPEHKDLVFSTWDHKAKQLNCLESYSGGWWWHDVCGDNPNGKYNKPRSKTKP  
ERRRGICWKSQNGRLYTIKSTKMLIHPIID

**SEQ ID NO:22**

ANGPTL3 equina 225-455

TTPSFHLNETKDVEHDDFPADCTTIYNRGEHTSGIYSIKPSNSQVFNVCVISGSSWILIQ  
RRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLD FEFWLGLEKIYSIVKRSNYILRIELEDWKDNKHTIEYS  
FHLGNHETNYTLHLVEITGNVPNALPEHKDLVFSTWDHKAKGQLNCLESYSGGWWHVDVCGG  
DNPNGKYNKPRSKTKPERRRGICWKSQNGRLYTIKSTKMLIHPID

**SEQ ID NO:23**

ANGPTL3 equina 207-455

IQESTENSLSSKPRAPRTTPSFHLNETKDVEHDDFPADCTTIYNRGEHTSGIYSIKPSNSQV  
FNVCVISGSSWILIQRRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLD FEFWLGLEKIYSIVKRSNYIL  
RIELEDWKDNKHTIEYSFHLGNHETNYTLHLVEITGNVPNALPEHKDLVFSTWDHKAKGQLN  
CLESYSGGWWHVDVCGGDNPNGKYNKPRSKTKPERRRGICWKSQNGRLYTIKSTKMLIHPID

**SEQ ID NO:24**

ANGPTL3 equina de longitud completa [equus caballus]

MYTIKLFLVIAPLVISSRIDQDYSSLDSIPPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYALSLQTNEIKEEEKELRRTTSKLQVKNEEVKNMSLELNSKL  
ESLLEEKSLLOQKVYLEEQLTCLIKNQPEIQEHPEVTSKTFVEQQDNSIKDLLQTMEEQY  
RQLNQQHSQIKEIENQLRRTGIQESTENSLSSKPRAPRTTPSFHLNETKDVEHDDFPADCTT  
IYNRGEHTSGIYSIKPSNSQVFNVCVISGSSWILIQRRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLD  
FEFWLGLEKIYSIVKRSNYILRIELEDWKDNKHTIEYSFHLGNHETNYTLHLVEITGNVPNA  
LPEHKDLVFSTWDHKAKGQLNCLESYSGGWWHVDVCGGDNPNGKYNKPRSKTKPERRRGICW  
KSQNGRLYTIKSTKMLIHPIDSESFELRQIKKPMN

**SEQ ID NO:25**

241-455 consenso

XXPAXCXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWXLIXRXDGSQXFNETWXNY  
XXGFGRLDXEFWLGLEKIYXIVXXSNYXLEXELXDWD (X) KXXXEYXFXLGXHETNYTLHX  
XXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHAKGXXXCXEXXSGGWWXXXCGXXNXNGKYNKXXXKX  
XPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX

**SEQ ID NO:26**

225-455 consenso

TTPXXXXNXXXXXXXXXXPAXCXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWXLIX  
RXDGSQXFNETWXNYXXGFGRLDXEFWLGLEKIYXIVXXSNYXLEXELXDWD (X) KXXXE  
YXFXLGXHETNYTLHXXXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHAKGXXXCXEXXSGGWWXXXC  
GXXNXNGKYNKXXXKXPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX

**SEQ ID NO:27**

207-455 consenso

XIXEXXEXSLSSKXRAPRTTPXXXXNXXXXXXXXXXPAXCXXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQ  
XFXVYCDXXSGSXWXLIXRXDGSQXFNETWXNYXXGFGRLDXEFWLGLEKIYXIVXXSNYX  
LEXELXDWD (X) KXXXEYXFXLGXHETNYTLHXXXIXGNXXXAXPEXXDLXFSTWXHAKG  
XXXCXEXXSGGWWXXXCGXXNXNGKYNKXXXKXPERXXGXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXX  
PXX

**SEQ ID NO:28**

Consenso de longitud completa

MXTIKLXLXXXPLVIXSXXDXDXXSXDSDXXXEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVH  
KTKGQINDIFQKLNIFDQSFYXLSLXTXEIKEEEKELRRXTXXLQVKNEEVKNMSXELXSKX  
ESLLEEKXXLQXKVXXLEXQLTXLIXXXXXXXXXXXEVTSLKXXVEXQDNSIXXLLQXXEXQY  
XQLXQQXXQIKEIEXQLR (X) XXIXEXXEXSLSSKXRAPRTTPXXXXNXXXXXXXXXXPAXC  
XXXYNXGXHTSGXYXIXPXNSQXFXVYCDXXSGSXWXLIQXRDXGSQXFNETWXNYXXGFGR  
LDXEFWLGLEKIYXIVXXSNYXLEXELXDWD (X) KXXXEYXFXLGXHETNYTLHXXXIXGN  
XXXAXPEXXDLXFSTWXHXAAGXXXCXEXXSGGWXXXXXCGXXNXNGKYNXXXXKXXPERXX  
GXXWXXQXXXLYXIKXXKMXXXPXX (SEXXXXXXXXXXXX)

# REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para uso en un método para mejorar o prevenir artritis o lesiones en articulaciones en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de un polipéptido seleccionado de:
  - (a) un polipéptido consistente de SEQ ID NO: 1 o 25;
- 5 (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25;
  - (b) un polipéptido que consiste de SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28;
  - (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28;
  - (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21; o
- 10 (e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.
2. Uso de un polipéptido seleccionado de:
  - (a) un polipéptido que consiste de SEQ ID NO: 1 o 25;
  - (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25;
- 15 (b) un polipéptido que consiste de SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28;
- (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28;
- (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21; o
- (e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21,
- 20 en la manufactura de un medicamento para mejorar o prevenir artritis o lesiones articulares en un mamífero, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.
3. El polipéptido para uso en un método de tratamiento de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde el polipéptido es PEGilado.
- 25 4. El polipéptido para uso en un método o tratamiento o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido es fusionado adicionalmente a una proteína heteróloga seleccionada de una albumina de suero humano (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutatona S transferasa (GST), una tioredoxina, una proteína A, una proteína G, o una proteína enlazante de maltosa (MBP).
5. El polipéptido para uso en un método de tratamiento o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido comprende 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos no naturales.
- 30 6. El polipéptido para uso en un método de tratamiento o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde (a) el individuo tenga artritis o lesión articular o (b) el individuo no tiene, pero está en riesgo de, artritis o lesión articular.
7. El polipéptido para uso en un método de tratamiento o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- 35 (a) el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25; o
- (b) el polipéptido consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28; o
- (c) el polipéptido consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24, y
- en donde dicho polipéptido tiene una actividad condrogénica.
- 40 8. El polipéptido para uso en un método de tratamiento o el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:

- (a) la artritis es seleccionada del grupo consistente de osteoartritis, artritis por trauma, y artritis autoinmune; y/o
- (b) el mamífero es un humano, un perro, o un gato; o
- (c) la composición comprende adicionalmente ácido hialurónico.
- 5 9. Un método *in vitro* para inducir diferenciación de células madres mesenquimales en condrocitos, comprendiendo el método poner en contacto células madres mesenquimales con una cantidad suficiente de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25 en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica, para inducir diferenciación de las células madre en condrocitos.
- 10 10. Un polipéptido para uso en un método de inducción de reparación de cartílago o producción de cartílago en un mamífero, en donde el método comprende poner en contacto células madre mesenquimales en el mamífero con una cantidad suficiente de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 25 en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica, para inducir reparación de cartílago o producción de cartílago.
11. El método o el polipéptido para uso en un método de tratamiento de la reivindicación 9 o reivindicación 10, en donde el polipéptido es PEGilado.
- 15 12. El método o el polipéptido para uso en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el polipéptido es fusionado adicionalmente a una proteína heteróloga seleccionada de una albumina de suero humana (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutatona S transferasa (GST), una tioredoxina, una proteína A, una proteína G, o una proteína enlazante de maltosa (MBP).
- 20 13. El método o el polipéptido para uso en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el polipéptido comprende 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos no naturales.
14. El polipéptido para uso en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde el mamífero es un humano, un perro o un gato.
15. El método o el polipéptido para uso en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde:
- 25 (a) el polipéptido comprende SEQ ID NO: 1 o 25;
- (b) la secuencia de aminoácidos tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27, o 28;
- (c) la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 26, 27 o 28;
- (d) la secuencia de aminoácidos es al menos 95% idéntica a SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21; o
- (e) la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21, y
- 30 en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.
16. Una composición farmacéutica para administración intraarticular, comprendiendo la composición una cantidad farmacéuticamente efectiva de un polipéptido seleccionado de:
- (a) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1 o 25;
- (b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 3, 26 o 27;
- 35 (c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 5, 9, 13, 17 o 21; o
- (d) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22 o 23, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.
17. La composición de la reivindicación 16, en donde el polipéptido es PEGilado.
- 40 18. La composición de la reivindicación 17, en donde el polipéptido está fusionado adicionalmente a una proteína heteróloga seleccionada de una albumina de suero humana (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutatona S transferasa (GST), una tioredoxina, una proteína A, una proteína G, o una proteína de enlazamiento a maltosa (MBP).

19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el polipéptido comprende 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos no naturales.

20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que comprende adicionalmente ácido hialurónico.

5 21. Un polipéptido seleccionado de:

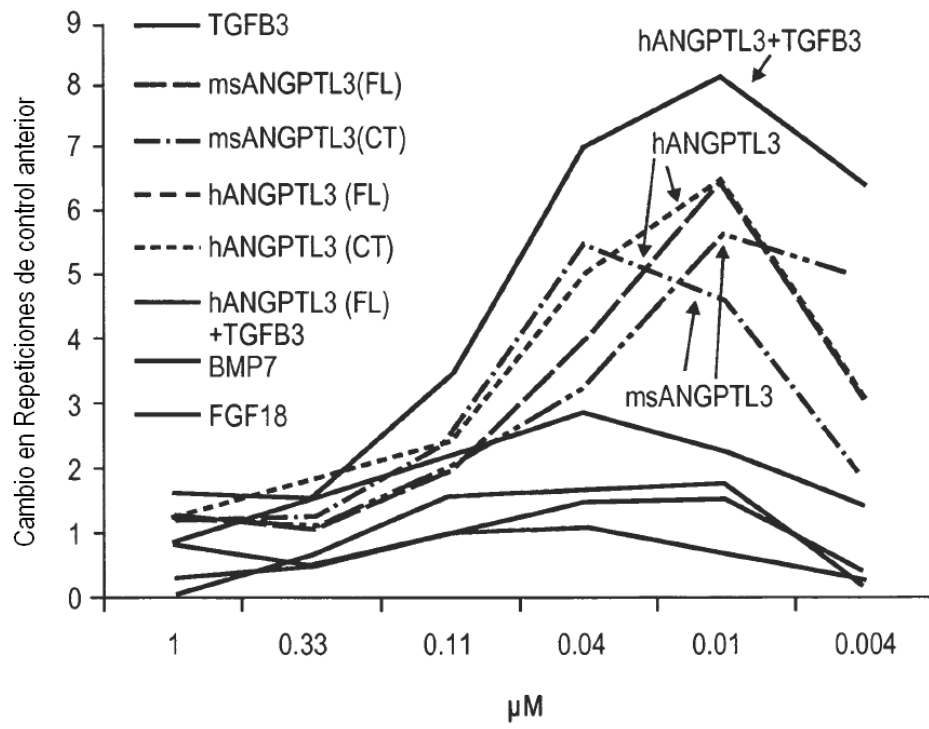
(a) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 25, 26 o 27;

(b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 18, 19, 21, 22 o 23;

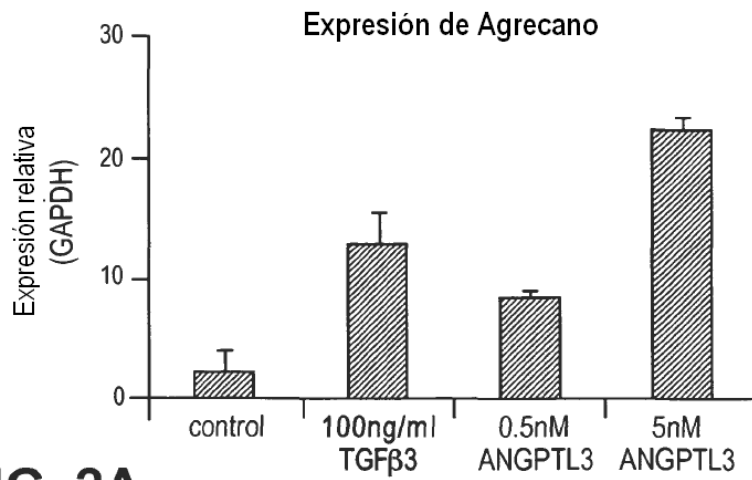
10 (c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos variante Angpt13 sustancialmente idéntica a SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22 o 23; o

(d) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22 o 23,

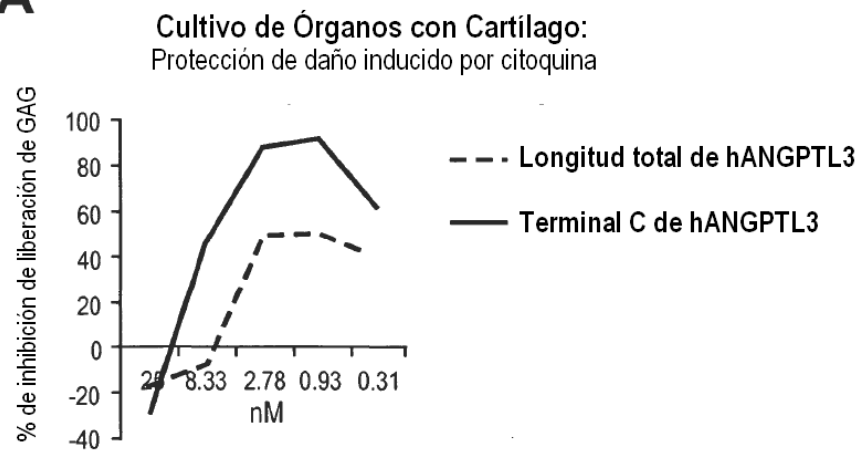
para uso en terapia, en donde dicho polipéptido tiene actividad condrogénica.



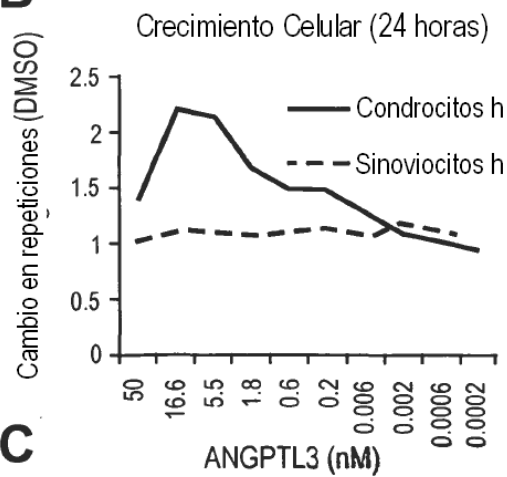
**FIG. 1**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**



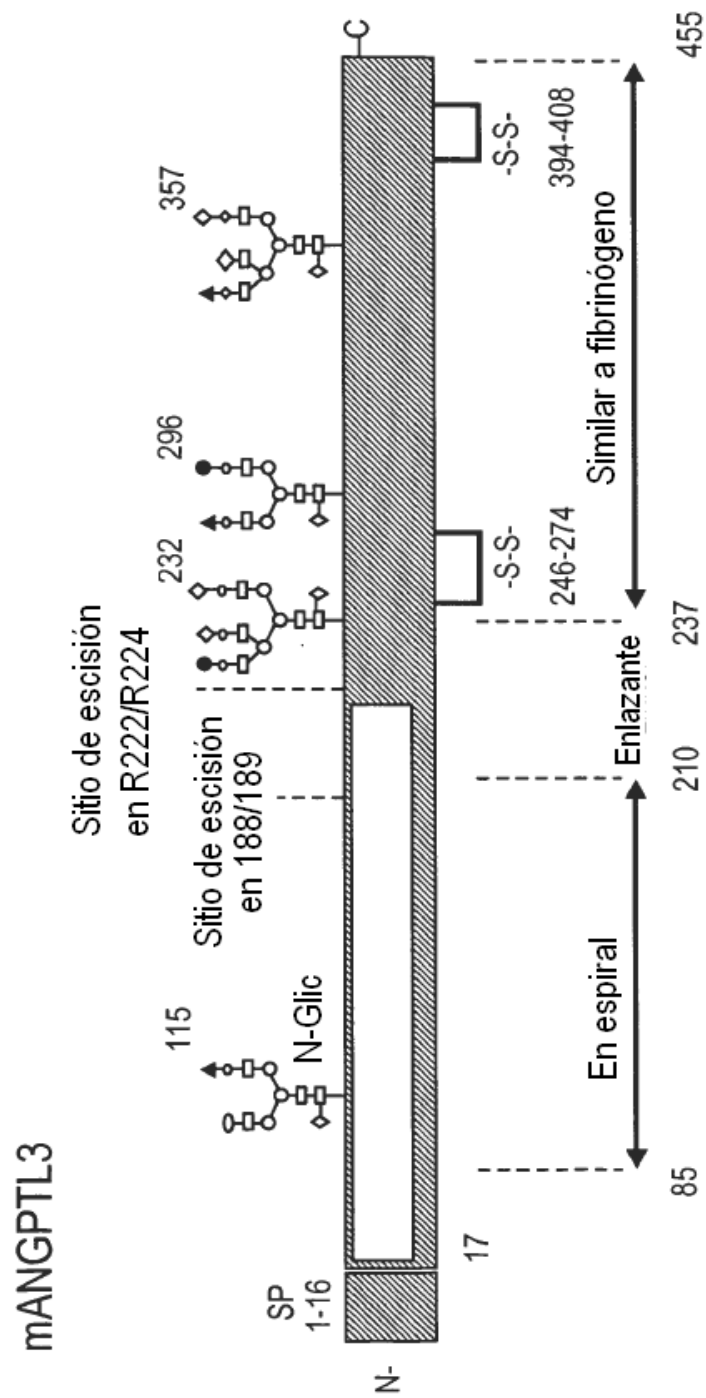
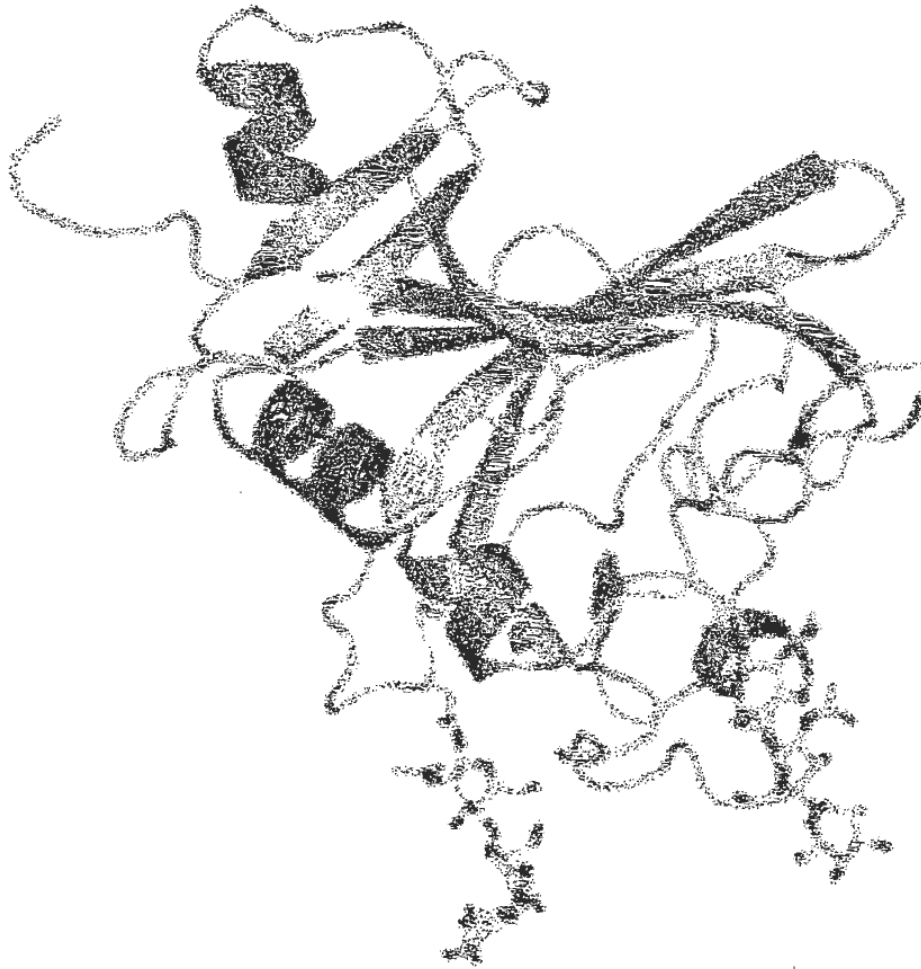


FIG. 3A

**mANGPTL3 (Terminal C)**



**FIG. 3B**

**FIG. 4A**

|          |     |                                                                     |                                |
|----------|-----|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Bovino   | 302 | YKYGFGRLDGEFWLGLGKIYSIVVQSNYILRIELEDWKD-KYYTEYSFHLGDHETNYTLHLAEI    | SGNGPKAFPEHK                   |
| Canino   | 301 | YKYGFGRLDGEFWLGLGKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDKNHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITG  | TGNILNALPEHK                   |
| humano   | 302 | YKYGFGRLDGEFWLGLGKIYSIVKQSNYILRIELEDWKNKHYYEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGN | PNAIPENK                       |
| Ratón    | 302 | YEKGFGRLDGEFWLGLGKIYIVQOSNYILRIELEDWQDSKHYEYSFHLGSHETNYTLHLAEI      | AGNIPGALPEHT                   |
| consenso |     | *****                                                               | *****                          |
| Bovino   | 377 | DIIFSTWDHKAKGHFNCPESNSGGWVYHDVCGENNNGKYNKP                          | KAKPERKQITWKSQDGRLYSIKATKMLIHP |
| Canino   | 377 | DIIFSTWDHKAKGHVNCPEISYSGGWWHNVCGENNNGKYNKQRA                        | TKPERRRGLWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP  |
| humano   | 378 | DIIFSTWDHKAKGHFNCPESYSGGWWHDECGENNNGKYNKPRAKSKPERRRGL               | SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP          |
| Ratón    | 378 | DIIFSTWNHRAKGLYCPESYSGGWWNDICGENNNGKYNKPRTKSPERRRGL                 | WFPQSRKLYAIKSSKMLQOP           |
| consenso |     | *****                                                               | *****                          |
| Bovino   | 453 | SDSENSE                                                             | 459                            |
| Canino   | 453 | IDSESSE                                                             | 459                            |
| humano   | 454 | TDSESFE                                                             | 460                            |
| Ratón    | 454 | TI-----                                                             | 455                            |
| consenso |     | ..**..*                                                             |                                |

FIG. 4A (cont.)

|          |     |                                                                                  |           |                |                                     |                                     |                      |                     |         |
|----------|-----|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------|---------|
| bovino   | 1   | MYTIKFLIIAPLVISSRTDQDY                                                           | LD        | ISPEPKSRFAMLD  | DDVKILANGLLQGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLN |                                     |                      |                     |         |
| equino   | 1   | MYTIKFLVIAPLVISSRIDQYSS                                                          | LD        | IPPEPKSRFAMLD  | DDVKILANGLLQGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLN |                                     |                      |                     |         |
| canino   | 1   | MYTIKFLFIAPLVISSRIDQYSS                                                          | SD        | SVSPEPKSRFAMLD | DDVKILANGLLQGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLN |                                     |                      |                     |         |
| humano   | 1   | MEIKILLFIAPLVISSRIDQNSS                                                          | DS        | LSPEPKSRFAMLD  | DDVKILANGLLQGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLN |                                     |                      |                     |         |
| ratón    | 1   | MHTIKFLFIAPLVIA                                                                  | SR        | DPDLSSDS       | APSEPKSRFAMLD                       | DDVKILANGLLQGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLN |                      |                     |         |
| consenso | 1   | * **** * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * |           |                |                                     |                                     |                      |                     |         |
| bovino   | 78  | FDQSFYDLSLQ                                                                      | TNEIKEEKE | ELRRATSKLQV    | KNEEVKNMSLEL                        | DSKLESLEEKILLQOKVRYLE               | DLTDLIKNQ            |                     |         |
| equino   | 78  | FDQSFYALS                                                                        | LQTN      | EIKEEKE        | ELRRATSKLQV                         | KNEEVKNMSLEL                        | SKLESLEEKILLQOKVRYLE | DLTDLIKNQ           |         |
| canino   | 78  | FDQSFYDLSLQ                                                                      | TNEIKEEKE | ELRRATSKLQV    | KNEEVKNMSLEL                        | SKLESLEEKILLQOKVRYLE                | DLTDLIKNQ            |                     |         |
| humano   | 78  | FDQSFYDLSLQ                                                                      | TNEIKEEKE | ELRRATSKLQV    | KNEEVKNMSLEL                        | SKLESLEEKILLQOKVRYLE                | DLTDLIKNQ            |                     |         |
| ratón    | 78  | FDQSFYDLSLQ                                                                      | TNEIKEEKE | ELRRATSKLQV    | KNEEVKNMSLEL                        | SKLESLEEKILLQOKVRYLE                | DLTDLIKNQ            |                     |         |
| consenso | 81  | * **** * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * |           |                |                                     |                                     |                      |                     |         |
| bovino   | 154 | QIQEYLEV                                                                         | TSKLTVEQ  | QDN            | SIKDLLQIV                           | EEQYRQLNQ                           | QSQIKEIENQLRRTG      | IKESTEISLSSKPRAPRTT | PSF     |
| equino   | 154 | EIQEHPEV                                                                         | TSKLTVEQ  | QDN            | SIKDLLQIV                           | EEQYRQLNQ                           | QSQIKEIENQLRRTG      | IKESTEISLSSKPRAPRTT | PSF     |
| canino   | 154 | EIQEHPEV                                                                         | TSKLTVEQ  | QDN            | SIKDLLQIV                           | EEQYRQLNQ                           | QSQIKEIENQLRRTG      | IKESTEISLSSKPRAPRTT | PSF     |
| humano   | 154 | ETPEHPEV                                                                         | TSKLTVEQ  | QDN            | SIKDLLQIV                           | EEQYRQLNQ                           | QSQIKEIENQLRRTG      | IKESTEISLSSKPRAPRTT | PSF     |
| ratón    | 154 | GAQEHPEV                                                                         | TSKLTVEQ  | QDN            | SIKDLLQIV                           | EEQYRQLNQ                           | QSQIKEIENQLRRTG      | IKESTEISLSSKPRAPRTT | PSF     |
| consenso | 161 | * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... *        |           |                |                                     |                                     |                      |                     |         |
| bovino   | 230 | HSNETKNVEH                                                                       | DDIPADCTI | IYNQ           | GKHTSGIYS                           | IRPSNSQVFN                          | VYCDVKSGSSWT         | LIQHRIDGSQNF        | NETWEN  |
| equino   | 230 | HLNETKDVEH                                                                       | DDIPADCTI | IYNQ           | GKHTSGIYS                           | IRPSNSQVFN                          | VYCDVISGSSW          | LIQRRIDGSQNF        | NETWQ   |
| canino   | 229 | HLNETKNVEH                                                                       | NDIPANCTI | IYNQ           | GKHTSGIYS                           | IRPSNSQVFN                          | VYCDVKSGSSWT         | LIQHRIDGSQNF        | NETWEN  |
| humano   | 230 | QLNEINVK                                                                         | HDGIPAE   | CTIYNQ         | GKHTSGIYS                           | IRPSNSQVFN                          | VYCDVISGSPW          | TLIQHRIDGSQNF       | NETWEN  |
| ratón    | 230 | QLNETENTE                                                                        | QDDIPADCS | HTYNQ          | GKHTSGIYS                           | IRPSNSQVFN                          | VYCDTQSGSPW          | TLIQHRKDGSD         | FNETWEN |
| consenso | 241 | * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... * ..... *        |           |                |                                     |                                     |                      |                     |         |

FIG. 4B

|     |                 |            |
|-----|-----------------|------------|
| 453 | <b>SP</b> SENSE | 459        |
| 454 | IDSEFELQIKKPMN  | 469        |
| 453 | IDSESE          | 459        |
| 454 | <b>TP</b> SESEF | <b>460</b> |
| 454 | TT              | 455        |
| 481 | ..**.*          |            |

bovino  
 equino  
 canino  
 humano  
 ratón  
 consenso

**FIG. 4B (cont.)**

