

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 039**

21 Número de solicitud: 201930708

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.07.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.02.2021

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(65.0%)**

**Xubias de Arriba, 84, Hospital Materno Infantil
Teresa Herrera 1ª Planta**

15006 A Coruña ES;

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE

COMPOSTELA (25.0%);

UNIVERSIDADE DA CORUÑA (7.5%) y

SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (2.5%)

72 Inventor/es:

MAYÁN SANTOS, María Dolores;

VARELA EIRÍN, Marta;

CASTRO IGLESIAS, Alejandro;

VÁZQUEZ SENTÍS, Eugenio;

MASCAREÑAS CID, José Luis;

LEARTE AYMAMÍ, Soraya;

CAEIRO REY, José Ramón y

PAZOS CHANTRERO, Elena

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE CX43 PARA SU USO COMO AGENTES SENOLÍTICOS**

57 Resumen:

Fragmentos peptídicos de Cx43 para su uso como agentes senolíticos. La presente invención se refiere a agentes senolíticos que comprenden fragmentos peptídicos de Cx43 para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.

ES 2 804 039 A1

DESCRIPCIÓN**FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE CX43 PARA SU USO COMO AGENTES
SENOLÍTICOS****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención pertenece al campo médico. En particular, la presente invención se refiere a agentes senolíticos que comprenden fragmentos peptídicos de la conexina 43 (Cx43) seleccionados de la lista que consiste o que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En una realización preferida la presente invención se refiere a la prevención o al tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La progresión de enfermedades asociadas al envejecimiento generalmente surge de la presencia y acumulación de células senescentes. Además, la complejidad y los componentes del secretoma de las células senescentes (SASP) están asociados con la inflamación, reprogramación, desdiferenciación y proliferación de las células diana junto con cambios en la síntesis y degradación de la matriz extracelular, que tienen un impacto negativo sobre la función y estructura del tejido. Entre las enfermedades asociadas al envejecimiento, y cuyo progreso está asociado a la acumulación de células senescentes, destacan (lista no exhaustiva): la obesidad, la enfermedad renal, la sarcopenia, fibrosis, aterosclerosis, diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer, artritis, cataratas, osteoporosis, diabetes tipo 2 o enfermedad de Alzheimer. La incidencia de todas estas enfermedades aumenta exponencialmente con la edad [*Cellular senescence: from physiology to pathology. Muñoz-Espín et al., 2014. Nat Rev Mol Cell Biol. Julio de 2014;15(7):482-96. doi: 10.1038/nrm3823*].

Tal como se citó anteriormente, la artritis es uno de los trastornos degenerativos mejor caracterizados y asociados al envejecimiento. Entre los más de 100 tipos de artritis descritas, la artrosis u osteoartritis (OA) es la forma más frecuente. La OA es el trastorno degenerativo de las articulaciones más común en la población occidental caracterizado por la degeneración progresiva de las articulaciones sinoviales, lo que limita la movilidad y genera dolor crónico. La OA supone un impacto socioeconómico elevado al ser una de las principales causas de discapacidad, que afecta a un número creciente de la población envejecida. El daño y degeneración del cartílago articular es el signo más típico de OA. Sin embargo, esta patología

afecta a todos los tejidos de la articulación, entre los que se incluyen el hueso, membrana sinovial, músculos, tendones y ligamentos. El cartílago articular de pacientes con OA muestra una acumulación de células desdiferenciadas y senescentes junto con un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β y enzimas catabólicas que conducen a la degradación de la matriz extracelular del cartílago (ECM). La prevalencia de la OA está aumentando a nivel mundial debido al envejecimiento de la población. A pesar de que todavía se desconoce la etiología de la OA, el descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares implicados en la progresión de la enfermedad está empezando a abrir nuevas posibilidades terapéuticas, con el objetivo de restablecer el fenotipo del condrocito articular y poder desarrollar nuevas estrategias que permitan restaurar la capacidad regenerativa del tejido y restablecer la función normal de la articulación en pacientes con OA.

Dado que un factor causal en enfermedades asociadas al envejecimiento es la persistencia y acumulación de células senescentes, uno de los campos más prometedores en el estudio de nuevas dianas para el tratamiento de este tipo de patologías es el uso de agentes senolíticos, al reducir la acumulación de células senescentes por activación de muerte celular programada por apoptosis. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad imperiosa de desarrollar nuevos agentes senolíticos eficaces y con capacidad regenerativa que puedan inducir selectivamente la muerte celular y/o reduzcan la acumulación de células senescentes y/o promuevan la rediferenciación celular en tejidos dañados con el objetivo de restaurar la capacidad regenerativa del tejido, con el fin de restablecer su función normal.

La presente invención está orientada a solucionar esta limitación y se refiere a fragmentos peptídicos de Cx43 que pueden utilizarse como agentes senolíticos para restablecer la regeneración tisular con el objetivo de prevenir y/o tratar enfermedades asociadas al envejecimiento y vinculadas con la persistencia y acumulación de células desdiferenciadas y senescentes, en particular condrocitos senescentes y desdiferenciados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a agentes senolíticos que comprenden fragmentos peptídicos de la Cx43, preferiblemente los fragmentos peptídicos mostrados a continuación, y a su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes:

- SEQ ID NO: 1 (YSA1): *Nt*-GKSDPYHATSGALSPAKD-*Ct*
- SEQ ID NO: 2 (YTP1): *Nt*-GKSDPYHATTGPLSPAKD-*Ct*
- SEQ ID NO: 3 (TUB1): *Nt*-FKGVKDRVKGK-*Ct*

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos de Cx43 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID
5 NO: 2 o SEQ ID NO: 3 pertenecen a una región de la proteína Cx43 que está comprendida
entre los residuos 232 a 266.

En una realización preferida, los péptidos citados anteriormente pueden comprender una cola
de 8 argininas en el dominio N-terminal para facilitar la internalización de los péptidos dentro
de la célula, así como otra etiqueta tal como TAT u otras moléculas que facilitan su
10 internalización.

En una realización preferida, los péptidos citados anteriormente pueden comprender un
fluoróforo como tetrametilrodamina (TAMRA) unido a ácido aminohexanoico (Ahx), o un
fluoróforo como tetrametilrodamina (TAMRA) unido a una cola de 8 argininas y también al
ácido aminohexanoico (Ahx).

15 En la presente invención se ha utilizado la OA como ejemplo ilustrativo de enfermedades
asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células
senescentes. Tal como se explica a continuación, los péptidos de la invención pueden i)
reducir la acumulación de células senescentes de condrocitos, por ejemplo, induciendo su
muerte por medio de la apoptosis y/o ii) desencadenar la rediferenciación de condrocitos
20 previamente desdiferenciados.

Tal como puede observarse en los resultados proporcionados por la presente invención:

- Los péptidos de la invención no muestran toxicidad (véase el **Ejemplo 2.1** y la **Figura 2**).
- La presencia de la cola de arginina (8-Arg) mejora la internalización de los péptidos
25 en las células (véase el **Ejemplo 2.2** y la **Figura 3**).
- El tratamiento con los péptidos de la invención da lugar a una disminución en los
niveles de Cx43 en condrocitos de pacientes con OA (Cx43 está significativamente
aumentada en el cartílago articular de pacientes que padecen OA y conduce a
senescencia y desdiferenciación) (véase el **Ejemplo 2.3** y la **Figura 4**).

- Los péptidos de la invención disminuyen la comunicación intercelular en condrocitos de OA (véase el **Ejemplo 2.4** y la **Figura 5**).
- Los péptidos de la invención mejoran el fenotipo del condrocito de OA aumentando la expresión de los componentes de la matriz extracelular del cartílago articular; disminuyendo la senescencia implicada en la progresión de OA y reduciendo significativamente el número de células senescentes (véase el **Ejemplo 2.5** y la **Figura 6**).
- El tratamiento con los péptidos de la invención mejora la composición y estructura de la matriz extracelular de los condrocitos en cultivos tridimensionales en micromasas (véase el **Ejemplo 2.6** y la **Figura 7**).

Por tanto, en la presente invención se utiliza la OA como ejemplo ilustrativo con el fin de demostrar la idoneidad de los péptidos de la invención para i) reducir la acumulación de células senescentes, por ejemplo, induciendo su muerte por medio de apoptosis y/o ii) desencadenar la rediferenciación de células desdiferenciadas. Estos resultados indican que los péptidos de la invención podrían utilizarse para la prevención y el tratamiento no sólo de la OA, sino también de cualquier otra enfermedad asociada al envejecimiento y con persistencia y acumulación de células senescentes, como por ejemplo son (lista no exhaustiva): la obesidad, la enfermedad renal, la sarcopenia, fibrosis, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, cáncer, artritis, cataratas, osteoporosis, diabetes tipo 2 o enfermedad de Alzheimer. La incidencia de todas estas enfermedades aumenta exponencialmente con la edad [*Cellular senescence: from physiology to pathology. Muñoz-Espín et al., 2014. Nat Rev Mol Cell Biol. Julio de 2014;15(7):482-96. doi: 10.1038/nrm3823*]

Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un agente senolítico que comprende fragmentos peptídicos de la Cx43 seleccionados de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1 (YSA1), SEQ ID NO: 2 (YTP1) o SEQ ID NO: 3 (TUB1).

La segunda realización de la presente invención se refiere a fragmentos peptídicos de la Cx43 seleccionados de la lista que comprende: SEQ ID NO: 1 (YSA1), SEQ ID NO: 2 (YTP1) o SEQ ID NO: 3 (TUB1) para su uso como agente senolítico.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos de la Cx43 se usan para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos de la Cx43 se usan en la prevención o el tratamiento de la OA.

La segunda realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende fragmentos peptídicos de Cx43 seleccionados de la lista que consiste en: SEQ
5 ID NO: 1 (YSA1), SEQ ID NO: 2 (YTP1) o SEQ ID NO: 3 (TUB1) y opcionalmente excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa como agente senolítico.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la prevención o el
10 tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la prevención o el tratamiento de OA.

En una realización preferida, la prevención o el tratamiento de OA se consigue reduciendo la acumulación de células senescentes de condrocitos.

15 En una realización preferida, la prevención o el tratamiento de OA se consigue desencadenando la rediferenciación de condrocitos de OA una vez se han desdiferenciado.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos de la Cx43 comprenden una cola N-terminal con 8 argininas.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos de la Cx43 o la composición
20 farmacéutica se administran por vía oral o por medio de una inyección intraarticular, subcutánea, intravenosa o muscular.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y
25 acumulación de células senescentes, preferiblemente OA, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente senolítico que comprende fragmentos peptídicos de la Cx43, preferiblemente SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Para el fin de la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones:

- Según la presente invención, “senescencia celular” se refiere a un estado biológico natural en el que una célula detiene permanentemente la división celular. Las células senescentes se acumulan tras un daño o con la edad y secretan más de 100 proteínas biológicamente activas diferentes, incluyendo factores proinflamatorios, proteasas, factores profibróticos y factores de crecimiento que alteran el microambiente tisular. Esta serie de componentes secretados se denomina SASP. Además de sus efectos sobre la estructura tisular, SASP contiene factores que inducen senescencia en células vecinas y distantes, activando mecanismos moleculares que desencadenan en envejecimiento por desdiferenciación y degeneración del tejido, que están implicados en el progreso de diferentes enfermedades asociadas a la edad. Por tanto, la eliminación de células senescentes eliminaría la síntesis y liberación de los factores SASP, tratando una de las causas principales del progreso de enfermedades asociadas al envejecimiento.
- Según la presente invención, “agentes senolíticos con capacidad regenerativa” están diseñados para eliminar selectivamente células senescentes, y por tanto el componente SASP. Más específicamente, el agente senolítico es una molécula que puede o bien i) reducir la acumulación de células senescentes, por ejemplo, induciendo su muerte por medio de apoptosis y ii) activar la rediferenciación de células desdiferenciadas. Tanto la reducción de senescencia como la activación de la rediferenciación celular son suficientes para restablecer la capacidad regenerativa de los tejidos dañados o envejecidos. El objetivo de los “agentes senolíticos” es retrasar, prevenir, aliviar o revertir enfermedades relacionadas con la edad que están provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes, ya que la senescencia por medio de SASP también induce inflamación, reprogramación y desdiferenciación de células vecinas, siendo por tanto uno de los factores clave implicados en la degeneración tisular y progresión de enfermedades asociadas al envejecimiento [*Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents*]. Kirkland JL, Tchkonja T (2015). *Experimental Gerontology*. 68: 19–25. doi:10.1016/j.exger.2014.10.012. PMC 4412760. PMID 25446976. Recuperado el 28-12-2015] [*Senolytic therapies for healthy longevity*. Jan M. van Deursen (2019). *Science*: 364(6441), 636-637 doi:10.1126/science.aaw1299].

- “Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente en la composición de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos al paciente.
- Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” la presente invención se refiere a la situación cuando los péptidos o la composición se administran tal como se describió anteriormente, y se logra una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene una enfermedad asociada al envejecimiento. La cantidad exacta requerida variará entre sujetos, según la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que está tratándose, el modo de administración, y similares. La cantidad “eficaz” apropiada en cada caso individual podría ser determinada por un experto medio en la materia usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente eficaz restablece la función del nervio periférico.
- El término “que comprende” pretende incluir, pero sin limitarse, a lo que siga a continuación de la expresión “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos opcionales podrían o no estar presentes.
- Por “que consiste en” se pretende incluir, y limitarse, a lo que siga a continuación de la frase “que consiste en”. Por tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

Descripción de las figuras

- Figura 1. Diagrama representativo de las secuencias correspondientes a los péptidos sometidos a ensayo en la presente invención. (a)** El péptido YSA1 se corresponde con los residuos 242-259 del dominio C-terminal (CTD) de la Cx43, que incluye sitios de fosforilación de Src (Y247) y MAPK (S255). El péptido YTP1 incluye la misma secuencia, pero con dos mutaciones (S251T, A253P) que se encuentran en la secuencia del pseudogén de Cx43 (GJA1P). Se añadió una secuencia de penetración de 8 argininas al péptido YSA1 para facilitar su entrada en la célula (8Arg-YSA1). Posteriormente, se mutó YSA1 en el residuo Y247 (Src) con un residuo de 3-nitrotirosina para obtener el péptido YSA1-NO2. El péptido TUB1 corresponde con los residuos 232-243 del dominio CTD de la Cx43, que

incluye sitios de unión de microtúbulos (K234-K243). Todos los péptidos se marcaron en su extremo N-terminal con el fluoróforo TMR para permitir su detección mediante fluorescencia. **(b)** Diagrama topológico de Cx43 que muestra la región total de interés de los residuos F232-D265.

5 **Figura 2. Ensayo de viabilidad celular para estudiar la toxicidad.** Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad MTT en condrocitos primarios de cartílago articular de pacientes con OA tratados con concentraciones crecientes del péptido 8Arg-YSA1 (1-10-60-600 μ M, con la secuencia de octaarginina y la TMR), durante 16 horas. Tal como se indica en la figura, las diferentes concentraciones estudiadas no afectaron a la viabilidad celular con respecto a las
10 mismas células no tratadas (NT).

Figura 3. La presencia de la cola de octaargininas (8-Arg) mejora la internalización de la secuencia del péptido YSA1. Se trataron condrocitos a una confluencia del 70-80% durante 16 horas con los péptidos marcados con TMR para su visualización a nivel celular a una concentración de 150 μ M (YSA1, YTP1 y YSA1-NO2). La presencia de las 8-Arg
15 aumenta la internalización del péptido, permitiendo disminuir la concentración eficaz hasta 30 veces (5 μ M), tanto en el caso del péptido 8Arg-YSA1 como de 8Arg-TUB1. Las imágenes indican que YSA1 y TUB1 se sitúan principalmente a nivel citoplásmico.

Figura 4. Disminución en los niveles de Cx43 en condrocitos de pacientes con OA tratados con péptidos YSA1, YTP1 y TUB1. Los pacientes con OA tienen niveles
20 significativamente elevados de Cx43 en el cartílago articular, lo que activa la desdiferenciación celular por medio de EMT mediante la activación de Twist-1 y la senescencia celular mediada por p53/p16. La disminución en los niveles y la actividad de Cx43 activa la rediferenciación del condrocito y disminuye la acumulación de células senescentes, restableciendo el fenotipo del condrocito adulto y la capacidad de regeneración
25 tisular. **(a)** Se detectó una disminución en la positividad para Cx43 en los condrocitos de OA mediante estudios de inmunofluorescencia para la detección de Cx43, especialmente en la membrana, o en el margen de las células, cuando las células se trataron con 200 μ M de YSA1 o YTP1, y en comparación con células sin tratar (NT) **(a)** o con 5 μ M del péptido 8-Arg-YSA1. **(b)** Los resultados obtenidos se confirmaron mediante Western Blot usando α -tubulina como control de carga. **(c)** El tratamiento con YSA1 150 μ M durante 16 horas redujo significativamente los niveles de Cx43 en condrocitos de OA, en comparación con las
30 mismas células sin tratar (NT). **(d)** Se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis

durante 16 horas con el péptido YTP1 (150 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante Western Blot, usando α -tubulina como control de carga. Como con el péptido YSA1, el tratamiento con el péptido YTP1 redujo los niveles de Cx43 en condrocitos de OA, en comparación con las mismas células sin tratar (NT). **(e)** Se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis durante 16 horas con el péptido 8Arg-YSA1 (5 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western, usando α -tubulina como control de carga. **(f)** La nitración del residuo Y247 del péptido YSA1 evitó la disminución de Cx43 cuando los condrocitos se tratan con este péptido modificado (YSA1-NO₂), lo que indica la importancia de esta tirosina para la actividad del péptido YSA1 y su posible aplicación para el tratamiento de la OA. **(g)** Se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis durante 16 horas con el péptido TUB1 (5 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante Western Blot, usando la intensidad de la tinción Ponceau como control de carga. Como con los péptidos anteriores, el tratamiento con el péptido TUB1 redujo los niveles de Cx43 en condrocitos de OA, en comparación con las mismas células sin tratar (NT). **(h)** Las imágenes de inmunofluorescencia confirmaron que el péptido nitrado YSA1-NO₂ puede atravesar la membrana citoplasmática, pero no disminuye los niveles de Cx43 (inmunofluorescencia).

Figura 5. Los péptidos YSA1 y YTP1 disminuyen la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes (UCs) formadas por Cx43 en condrocitos de OA. **(a)** Ensayo Scrape Loading/Dye Transfer (SL / DT) en el que se estudia la transferencia de fluoróforo Lucifer Yellow (LY) entre condrocitos en contacto a través de UCs. Los condrocitos OA tratados con el péptido YSA1 (150 μ M) durante 16 horas mostraron una disminución en el acoplamiento celular en comparación con las células sin tratar (NT). **(b)** La presencia de 8-Arg disminuyó el acoplamiento celular mediado por este péptido a concentraciones inferiores (5 μ M, 16 h). **(c)** El tratamiento con YTP1 disminuyó el acoplamiento celular a través de UCs cuando las células se trataron con YTP1 150 μ M durante 16 horas.

Figura 6. Los péptidos de esta invención mejoran el fenotipo de los condrocitos OA disminuyendo la senescencia celular implicada en la progresión de OA y aumentando la expresión de las proteínas de la matriz extracelular del cartílago. Los condrocitos OA muestran niveles aumentados de Cx43 asociados con EMT y senescencia mediante Twist-1 y p53/p21/p16, respectivamente. Además, la acumulación de células senescentes está implicada en la progresión de OA. **(a)** El tratamiento con el péptido 8Arg-YSA1 (5 μ M) durante 16 horas redujo la expresión de Twist-1, un factor de la transcripción que activa la

desdiferenciación celular por medio de EMT, y los marcadores de senescencia p16 y p21. Los niveles de ARN de Twist-1, p16 y p21 se normalizaron con los niveles de HPRT1 y se compararon con condrocitos OA (OAC) sin tratar (NT). **(b)** El análisis de la expresión génica de OAC tratados con 8Arg-YSA1 (5 μ M) durante 16 horas confirmó la regulación por

5 disminución de factores de SASP incluyendo citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, COX-2) y enzimas degradantes de la matriz tales como metaloproteasa-3 (MMP-3) y expresión aumentada de marcadores de la ECM de cartílago, tales como agregcano (ACAN). Los niveles de ARN se normalizaron frente a los niveles de HPRT1 y se compararon con condrocitos de OA sin tratar (NT). **(c)** El tratamiento de OAC durante 7 días con el péptido 8Arg-YSA1 (5

10 μ M) redujo significativamente el número de células senescentes detectadas por tinción con β -galactosidasa. **(d)** El tratamiento con el péptido 8Arg-TUB1 (5 μ M) durante 16 horas también disminuyó la expresión de Twist-1 y los factores de activación de senescencia p16 y p21 en OAC. **(e)** Además, se observó una reducción de la expresión de factores de SASP IL-1 β , IL-6, COX-2 y MMP-3, en OAC tratados con 8Arg-TUB1 (5 μ M) durante 16 horas. **(f)** El

15 tratamiento de OAC durante 7 días con el péptido 8Arg-TUB1 (5 μ M) redujo significativamente el número de células senescentes detectadas por tinción con β -galactosidasa.

Figura 7. YSA1 y TUB1 mejoran la composición y estructura de la matriz extracelular de condrocitos cultivados como micromasas. Los condrocitos aislados de donantes con OA

20 se cultivaron como micromasas tridimensionales durante 14 días en medio de crecimiento normal o en medio condrogénico (CM) solo o complementado con 5 μ M de los péptidos 8Arg-YSA1 o 8Arg-TUB1. La tinción con hematoxilina-eosina mostró que las micromasas tratadas con estos péptidos conducen a una mejor estructura de la MEC. Además, la tinción con azul de toluidina mostró una deposición aumentada de proteoglicanos en la ECM de

25 micromasas tratadas con los péptidos 8Arg-YSA1 o 8Arg-TUB1, tal como se detecta mediante el incremento en la coloración violeta.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

30

Ejemplo 1.1. Cultivo primario.

Se obtuvieron los cultivos primarios de condrocitos de cartílago articular de la cadera y rodilla de pacientes con artrosis (OA) y de individuos sanos en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS-XXIS) bajo consentimiento informado y aprobado por el Comité de Ética Institucional, dentro de la colección privada de muestras biológicas del grupo (C.0003333, 2012/094 y 2015/029). Con la ayuda de un bisturí, se separó el cartílago del hueso y se dividió en pequeños fragmentos de 1 mm. Los fragmentos de tejido fueron digeridos con tripsina durante 10 min a 37°C en agitación, seguido por digestión con colagenasa IV a 37°C en agitación durante 16 horas. Posteriormente, la muestra se filtró a través de un filtro de 100 µM y se sembraron las células en medio de cultivo DMEM (Lonza) complementado con suero bovino fetal al 10% (SFB, Gibco, Thermo Scientific) y penicilina (100 U / ml) / estreptomina (100 µg / ml) al 1% (Gibco, Thermo Scientific) y se mantuvo en cultivo en un incubador a 37°C, CO₂ al 5% y saturación de humedad.

15 **Ejemplo 1.2. Síntesis de péptidos.**

Se sintetizaron los péptidos sometidos a prueba en el Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) y Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA). La secuencia del péptido YSA1 se corresponde con parte del dominio C-terminal de Cx43 y contiene un sitio de fosforilación de la Src quinasa (Y247) y otro sitio de fosforilación (S255) de la proteína quinasa activada por mitógeno (proteína quinasa activada por mitógeno, MAPK). Se sintetizó un nuevo péptido de secuencia similar a YSA1 pero mutado en dos posiciones y se denominó YTP1 (**Figura 1**, YSA1 mutado). Ambos péptidos contienen una secuencia de 8 argininas en el extremo N-terminal (8Arg) y una molécula fluorescente para estudiar su localización subcelular (tetrametilrodamina, TMR). Finalmente, YSA1-NO2 contiene un residuo de 3-nitrotirosina en la misma posición que el residuo de tirosina fosforilado por Src (Y247), para estudiar el efecto de la nitración de tirosina sobre el péptido YSA1 (véase la **Figura 1**). Se sintetizaron péptidos siguiendo los protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) Fmoc convencionales. Después de completar la síntesis de las secuencias peptídicas, sus extremos N-terminales se desprotegieron mediante el tratamiento con 4-metilpiperidina al 20% en N,N-dimetilformamida (DMF). Entonces, el fluoróforo se unió al extremo N-terminal de los péptidos mediante el tratamiento de las resinas desprotegidas con éster succinimidílico de 6-carboxitetrametilrodamina en presencia de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) y DMF. Una vez se acopló el fluoróforo a los péptidos,

aquellos se escindieron de la resina y se purificaron los residuos correspondientes mediante HPLC de fase inversa, y se liofilizaron las fracciones identificadas como productos deseados.

5 En una realización preferida, los péptidos pueden comprender un fluoróforo como tetrametilrodamina (TAMRA) unido a ácido aminohexanoico (Ahx), o un fluoróforo como tetrametilrodamina (TAMRA) unido a una cola de 8 argininas y también al ácido aminohexanoico (Ahx).

Ejemplo 1.3. Ensayo de viabilidad celular MTT.

10

Se sembró un número inicial de células (5.000-10.000) en una placa de cultivo de 96 pocillos, y se trató con diferentes concentraciones de los péptidos. Después del tratamiento, se retiró el medio de cada pocillo y se añadieron 10 µl del reactivo MTT a 100 µl de medio fresco, y se incubó a 37°C durante 4 horas. Para solubilizar los cristales de formazán del reactivo MTT,
15 se incubó con DMSO a temperatura ambiente y con agitación durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Nanoquant Infinite M200, TECAN).

Ejemplo 1.4. Visualización de la internalización de péptidos.

20 Se trataron cultivos primarios de condrocitos a una confluencia del 70-80% con el péptido correspondiente. Después de 16 horas, la ubicación subcelular de los péptidos marcados con TMR se visualizó in vivo en un microscopio de fluorescencia invertido (Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon).

Ejemplo 1.5. Inmunofluorescencia.

Se trataron cultivos primarios de condrocitos a una confluencia del 70-80% con péptidos miméticos de Cx43, y se fijaron con paraformaldehído al 2-4% (PFA, Sigma-Aldrich) en tampón fosfato salino (PBS, MP Biomedicals) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el PFA y se incubaron las células en glicina 0,1 M (Sigma-Aldrich) durante 10
30 minutos para eliminar la autofluorescencia del PFA, y las membranas celulares se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 minutos. Se bloquearon los sitios de unión no específica con albúmina sérica bovina al 1% (BSA, Sigma-Aldrich) en PBS con Tween-20 (PBS-T, Sigma-Aldrich), durante 30 minutos.

Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo anti-Cx43 primario (C6219, Sigma-Aldrich) durante 1 hora, a temperatura ambiente y se lavaron con PBS durante 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo. Se incubó con el anticuerpo secundario marcado con FITC (anti-F2765 de conejo, Thermo Fisher) durante 1 hora a temperatura ambiente, en la oscuridad. Se eliminó el anticuerpo en exceso y se tiñeron los núcleos con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) durante 4 minutos. Finalmente, se montaron las preparaciones con una gota de medio de montaje acuoso Glycergel (Dako) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 usando una cámara digital DP71 (Olympus).

10 **Ejemplo 1.6. Western Blot.**

Las células aisladas de pacientes con OA y tratados o sin tratar o no con los péptidos se lisaron mecánica y químicamente usando una aguja de 29 gauges (BD Medical) en presencia de un tampón de lisis frío (Tris HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 50 mM pH 8, NP-40 al 0,5%, Tritón X-100 al 1%, NaCl 150 mM). Una vez se obtuvieron los extractos celulares, se diluyeron en tampón de carga (SDS al 10%, Tris HCl 200 mM pH 6,8, glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0,1%, β -mercaptoetanol al 10%). Se separaron cantidades iguales de los extractos celulares en un gel de acrilamida / bisacrilamida (Acr / Bis) al 10% con SDS. Las proteínas se transfirieron posteriormente a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Merck) en un aparato Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Se verificó que la transferencia era correcta mediante la tinción de la membrana con ATX Ponceau S (Sigma-Aldrich). Para inhibir la posible unión no específica con la membrana, se incubó la membrana 1 hora a temperatura ambiente con una disolución de leche al 5% en un tampón TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%). La membrana se incubó con el anticuerpo primario a 4°C con agitación durante 16 horas. Se retiró el exceso de anticuerpo con posteriores lavados con TTBS y luego se incubó con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Se retiró el anticuerpo en exceso y se reveló la señal con el kit comercial Pierce™ ECL (Thermo Fisher Scientific) en una cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Los anticuerpos primarios usados fueron anti-Cx43 (C6219, Sigma-Aldrich) y anti- α -tubulina (T9026 Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios usados fueron un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (A6154 Sigma-Aldrich) y un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón (NA-931 Sigma-Aldrich), respectivamente.

Ejemplo 1.7. Ensayo Scrape Loading/ Dye Transfer (SL / DT).

Se sembraron las células en placas de cultivo hasta aproximadamente un 90% de confluencia. Después de tratar las células con los péptidos, se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS. Se añadió el compuesto fluorescente Lucifer Yellow (LY, Cell Projects Ltd © Kent) al 0,4% en PBS y se realizaron dos cortes, uno con un bisturí y el otro con una aguja sobre la monocapa celular. Se incubaron las células durante 5-7 minutos a 37°C para permitir la transferencia del LY entre células en contacto no dañadas, tras lo cual se retiró el LY y se lavaron las células con PBS. Se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 10 minutos. Se realizó la visualización en un microscopio de fluorescencia invertido (Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon).

Ejemplo 1.8. Análisis de la expresión génica (qPCR).

Después de los tratamientos con los péptidos, las células se tripsinizaron y lisaron en reactivo TRI (MRC), siguiendo las instrucciones del fabricante hasta obtener ARN. Posteriormente, se realizó un tratamiento con 1 U / μ l de ADNasas para eliminar ADN contaminante. La calidad y cantidad de ARN aislado se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Para la retrotranscripción del ARN y obtener el ADN complementario, se usaron 1 μ g de ARN y el kit comercial Superscript® VILO™ Master Mix (Invitrogen) en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 65°C, seguida por 10 minutos a 25°C, una incubación de 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. El ADN complementario se diluyó en agua libre de proteasas, ADNasas y ARNasas (Sigma-Aldrich). Finalmente, se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando el reactivo PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en el termociclador LightCycler® 480 (Roche, Applied Science) con el siguiente programa: 10 minutos incubación a 95°C, seguida por amplificación de 30-40 ciclos de 10 segundos a 95°C, de 30 segundos a 60°C y de 12 segundos a 72°C. Se usó HPRT-1 como gen de referencia, y los niveles de expresión génica se analizaron con respecto a las células control sin tratamiento. Los cebadores usados fueron los siguientes:

Tabla 1

Gen	Directo	Inverso
	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5
CDKN2A (p16)	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
CDKN1A (p21)	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19
PTGS2 (COX-2)	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21

Ejemplo 1.9. Diferenciación condrogénica.

Se cultivaron condrocitos primarios aislados de donantes con artrosis en forma de micromasas tridimensionales. Para esto, se sembraron 500.000 células en tubos de poliestireno y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Entonces, se reemplazó el medio por el correspondiente tratamiento: control sin tratar (DMEM con SFB al 10%), o medio condrogénico solo o complementado con 8Arg-YSA1 o 8Arg-TUB1 5 μ M. Se cambió el medio cada 2-3 días, y después de 14 días, se congelaron las micromasas en Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek).

10 Ejemplo 1.10. Detección de actividad de β -galactosidasa.

Para la detección de actividad de β -galactosidasa se ha usado un kit de tinción citoquímico de células de senescencia (Sigma-Aldrich). Se lavaron las células con PBS atemperado y se fijaron durante 7 minutos a temperatura ambiente con un tampón compuesto por paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2%. Después de tres lavados con PBS, se incubaron las células 16 h a 37°C sin CO₂ en una solución de tinción que contenía X-gal, que se escinde mediante la enzima β -galactosidasa produciendo un producto insoluble de color azul intenso.

Ejemplo 2. Resultados.

Ejemplo 2.1. Ensayo de viabilidad celular para estudiar la toxicidad.

Tal como se explica en la **Figura 2**, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad MTT en condrocitos primarios de cartílago articular de pacientes con OA tratados con concentraciones crecientes del péptido 8Arg-YSA1 (1-10-60-600 μM , con la secuencia de arginina y la TMR), durante 16 horas.

- 5 Las diferentes concentraciones estudiadas no afectaron a la viabilidad celular con respecto a las mismas células sin tratar (NT).

Ejemplo 2.2. La presencia de la cola de octaargininas (8-Arg) mejora la internalización de la secuencia del péptido YSA1.

Se trataron condrocitos a una confluencia del 70-80% durante 16 horas con los péptidos marcados con TMR para visualización a nivel celular a una concentración de 150 μM (YSA1, YTP1 y YSA1-NO2) (véase la **Figura 3**). La presencia de la cola de 8-Arg aumenta la internalización de los péptidos, dándose así la posibilidad de reducir las concentraciones del péptido hasta 30 veces (5 μM) tanto en el caso del péptido 8Arg-YSA1 como de 8Arg-TUB1. Las imágenes representadas en la **Figura 3** indican que YSA1 y TUB1 se ubican principalmente a nivel citoplásmico.

Ejemplo 2.3. Disminución en los niveles de Cx43 en condrocitos de pacientes con OA tratados con los péptidos YSA1, YTP1 y TUB1.

Los pacientes con OA tienen niveles significativamente elevados de Cx43 en el cartílago articular lo que activa la desdiferenciación celular por medio de EMT mediante la activación de Twist-1 y la senescencia celular mediada por p53/p16.

Tal como se muestra en la **Figura 4**, los péptidos YSA1, YTP1 y TUB1 pudieron disminuir los niveles y la actividad de Cx43. Al seleccionar la Cx43 como diana, estos péptidos activan la rediferenciación del condrocito y disminuyen la acumulación de células senescentes, restableciendo el fenotipo de condrocitos adultos y la capacidad de regeneración tisular.

25 Tal como se muestra en la **Figura 4**, se detectó una disminución en la positividad para Cx43 en los condrocitos de OA, especialmente en la membrana, o en el margen de las células (actividad del canal, UCs), cuando se trataron con 200 μM de YSA1 o YTP1, contra las células sin tratar (NT) (**Figura 4a**) o con 5 μM del péptido 8Arg-YSA1 (**Figura 4b**). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante Western Blot usando α -tubulina como control de carga. Además, el tratamiento con YSA1 150 μM durante 16 horas redujo

significativamente los niveles de Cx43 en condrocitos de OA, en comparación con las mismas células sin tratar (NT) (**Figura 4c**). Por otro lado, se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis durante 16 horas con el péptido YTP1 (150 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante Western Blot, usando α -tubulina como control de carga (**Figura 4d**). Como con el péptido YSA1, el tratamiento con el péptido YTP1 redujo los niveles de Cx43 en condrocitos con OA, en comparación con las mismas células sin tratar (NT). Además, se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis durante 16 horas con el péptido 8Arg-YSA1 (5 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante Western Blot usando α -tubulina como control de carga (**Figura 4e**). La nitración del residuo Y247 del péptido YSA1 evitó la disminución de Cx43 cuando los condrocitos se tratan con este péptido modificado (YSA1-NO₂) lo que indica la importancia de esta tirosina para la actividad del péptido YSA1 y su posible aplicación para el tratamiento de la OA (**Figura 4f**). Se trataron condrocitos aislados de donantes con artrosis durante 16 horas con el péptido 8Arg-TUB1 (5 μ M) y se analizaron los niveles de Cx43 mediante Western Blot, usando la intensidad de la tinción Ponceau como control de carga. Como con los péptidos anteriores, el tratamiento con el péptido 8Arg-TUB1 redujo los niveles de Cx43 en condrocitos de OA, en comparación con las mismas células sin tratar (NT) (**Figura 4g**). Las imágenes de inmunofluorescencia (**Figura 4h**) confirman que el péptido nitrado YSA1-NO₂ puede cruzar la membrana celular, pero no disminuye los niveles de Cx43 (inmunofluorescencia).

Ejemplo 2.4. Los péptidos YSA1 y YTP1 disminuyen la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes (UCs) en condrocitos con OA.

Se realizó un ensayo Scrape Loading/Dye Transfer (SL/DT) para evaluar la transferencia del fluoróforo Lucifer Yellow (LY) entre condrocitos en contacto a través de UCs. Los condrocitos con OA tratados con el péptido YSA1 (150 μ M) durante 16 horas mostraron una disminución en el acoplamiento celular en comparación con células sin tratar (NT) (**Figura 5a**). La presencia de 8-Arg hizo posible disminuir el acoplamiento celular de manera más eficaz a menores concentraciones (8Arg-YSA1 5 μ M, 16 horas) (**Figura 5b**). El tratamiento con YTP1 disminuyó el acoplamiento celular a través de UCs cuando las células se trataron con 150 μ M durante 16 horas (**Figura 5c**).

Ejemplo 2.5. Los péptidos en estudio mejoran el fenotipo del condrocito de OA disminuyendo la senescencia implicada en la progresión de OA y aumentando la expresión de los componentes de la matriz extracelular del cartílago articular.

Los condrocitos de OA muestran niveles aumentados de Cx43 que conducen a EMT y senescencia por medio de Twist-1 y p53/p21/p16, respectivamente. Además, la acumulación de células senescentes está implicada en la progresión de OA. El tratamiento con el péptido 8Arg-YSA1 (5 μ M) durante 16 horas redujo la expresión génica de Twist-1, un factor de la transcripción que activa la desdiferenciación celular por medio de EMT, y los factores de activación de senescencia p16 y p21 (**Figura 6a**). Los niveles de ARN de Twist-1, p16 y p21 se normalizaron con los niveles de HPRT-1 y se compararon con OAC sin tratar (NT). El análisis de la expresión génica de OAC tratados con 8Arg-YSA1 (5 μ M) durante 16 horas confirmaron la reducción de expresión de factores de SASP incluyendo citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, COX-2) y enzimas degradadoras de la matriz tales como metaloproteasa-3 (MMP-3) y expresión aumentada de marcadores de la MEC de cartílago, tales como agregano (ACAN). Los niveles de ARN se normalizaron con los niveles de HPRT-1 y se compararon con OAC sin tratar (NT) (**Figura 6b**). El tratamiento de OAC durante 7 días con el péptido 8Arg-YSA1 (5 μ M) redujo significativamente el número de células senescentes detectadas por la tinción con β -galactosidasa (**Figura 6c**). El tratamiento con el péptido 8Arg-TUB1 (5 μ M) durante 16 horas también conduce a la expresión reducida de Twist-1 y los factores de activación de senescencia p16 y p21 en OAC (**Figura 6d**). Además, los OAC tratados con 8Arg-TUB1 (5 μ M) durante 16 horas conducen a la expresión disminuida de factores de SASP IL-1 β , IL-6, COX-2 y MMP-3 (**Figura 6e**). El tratamiento de OAC durante 7 días con el péptido 8Arg-TUB1 (5 μ M) redujo significativamente el número de células senescentes detectado por la tinción con β -galactosidasa (**Figura 6f**).

Ejemplo 2.6. El tratamiento con los péptidos 8Arg-YSA1 y 8Arg-TUB1 mejora la composición y estructura de la matriz extracelular de condrocitos cultivados como micromasas.

Se cultivaron condrocitos aislados de donantes con OA como micromasas tridimensionales durante 14 días en medio de crecimiento normal o en medio condrogénico (CM) solo o complementado con 5 μ M de péptidos 8Arg-YSA1 o 8Arg-TUB1. La tinción con hematoxilina-eosina mostró que las micromasas tratadas con estos péptidos conducen a una mejor estructura de la MEC. Además, la tinción con azul de toluidina mostró una deposición aumentada de proteoglicanos en la MEC de micromasas tratadas con los péptidos 8Arg-YSA1 o 8Arg-TUB1, tal como se detecta mediante un incremento en la coloración violeta (véase la **Figura 7**).

REIVINDICACIONES

1. Agente senolítico que comprende al menos un fragmento peptídico de Cx43 seleccionado de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 5 2. Fragmento peptídico de Cx43, seleccionado de la lista que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, para su uso como agente senolítico.
3. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según la reivindicación 2, en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.
- 10 4. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la prevención o el tratamiento de la artrosis.
5. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según la reivindicación 4, en el que la prevención o el tratamiento de la artrosis se consigue reduciendo la acumulación de células senescentes de condrocitos.
- 15 6. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según la reivindicación 4, en el que la prevención o el tratamiento de la artrosis se consigue desencadenando la rediferenciación de condrocitos artrósicos una vez se han desdiferenciado.
7. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que los péptidos comprenden una cola *N*-terminal con 8 argininas.
- 20 8. Fragmento peptídico de Cx43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el péptido se administra por vía oral o por medio de una inyección intraarticular, subcutánea, intravenosa o muscular.
9. Composición farmacéutica que comprende un fragmento peptídico de Cx43 seleccionado de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y opcionalmente excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 25 10. Composición farmacéutica, según la reivindicación 9, para su uso como agente senolítico.
11. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 10, en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento provocadas por la persistencia y acumulación de células senescentes.
- 30 12. Composición farmacéutica para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en la prevención o el tratamiento de la artrosis.

13. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 12, en la que la prevención o el tratamiento de la artrosis se consigue reduciendo la acumulación de células senescentes de condrocitos.
14. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 12, en la que la
5 prevención o el tratamiento de la artrosis se consigue desencadenando la rediferenciación de condrocitos artrósicos una vez se han desdiferenciado.
15. Composición farmacéutica para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que se administra por vía oral o por medio de una inyección intraarticular, subcutánea, intravenosa o muscular.

10

Figura 1

a

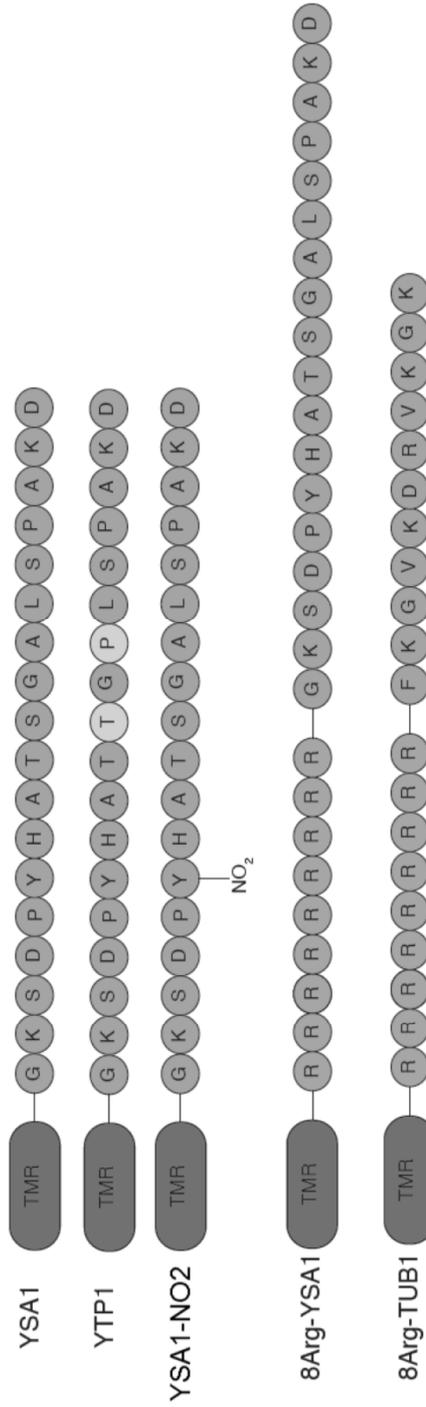


Figura 1 (cont)

b

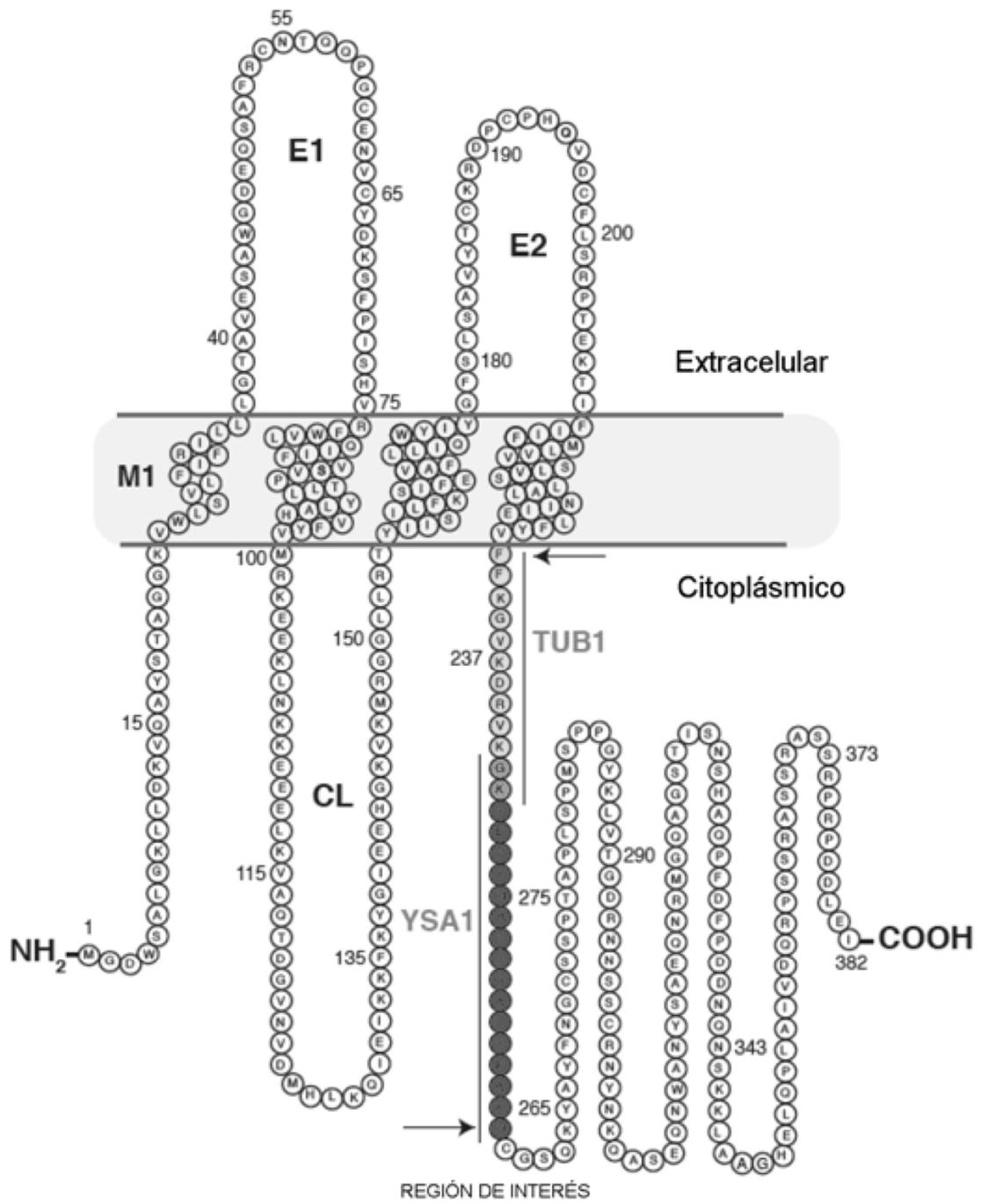


Figura 2

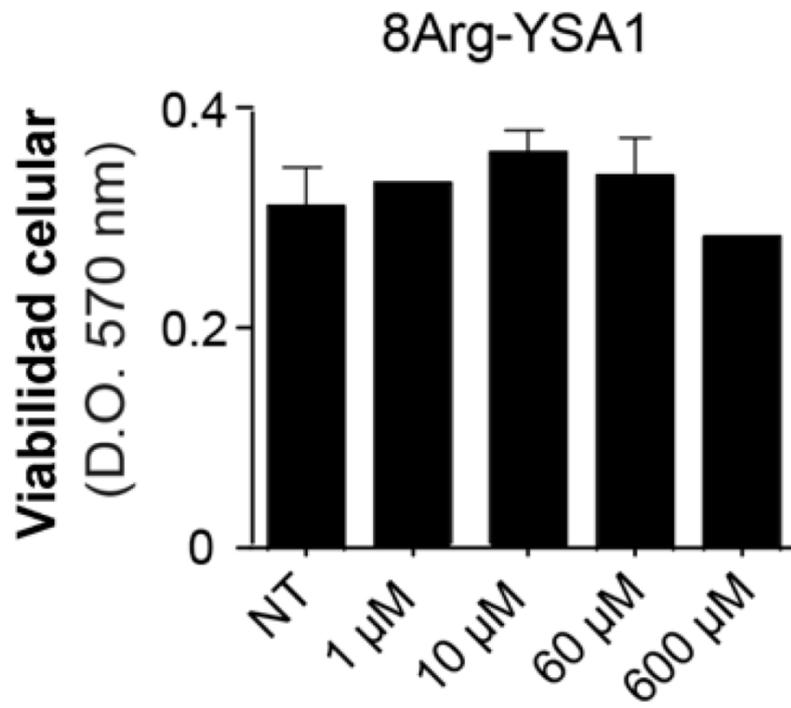


Figura 3

YSA1
150 μ M

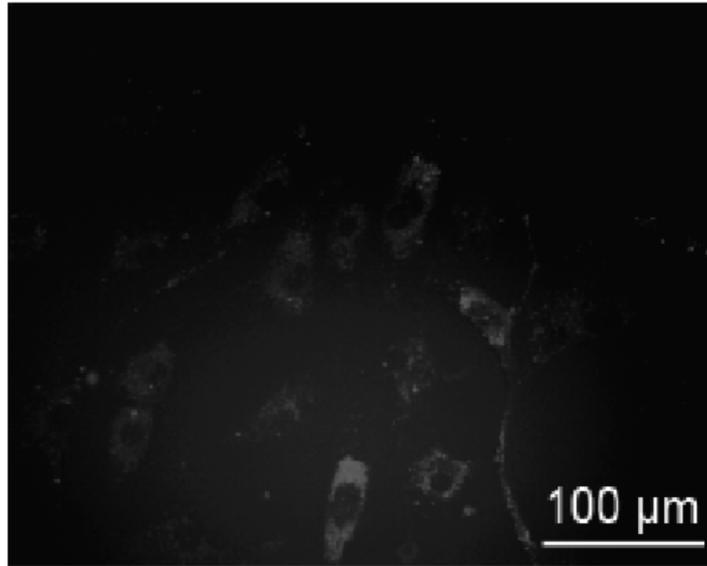
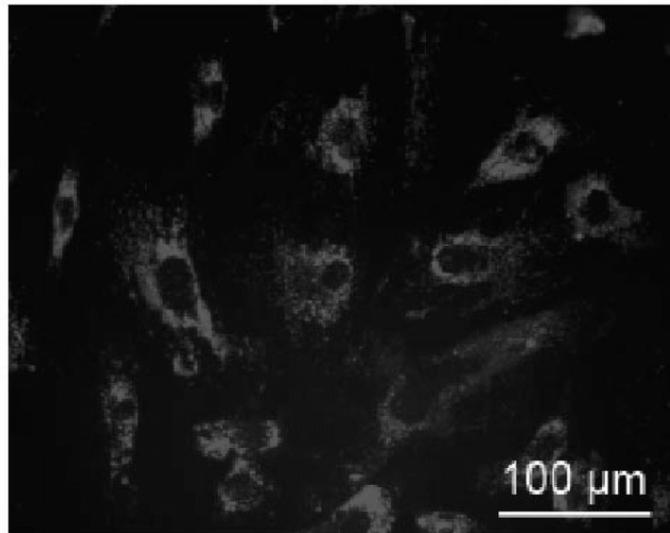


Figura 3 (cont.)

8Arg-YSA1
5 μ M



8Arg-TUBB1
5 μ M

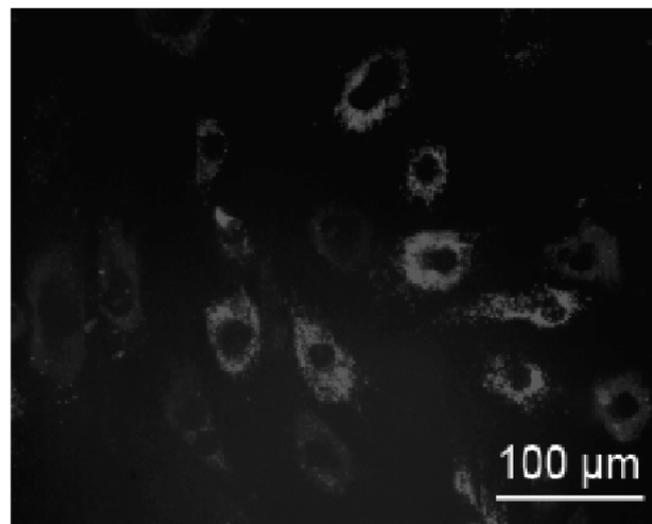
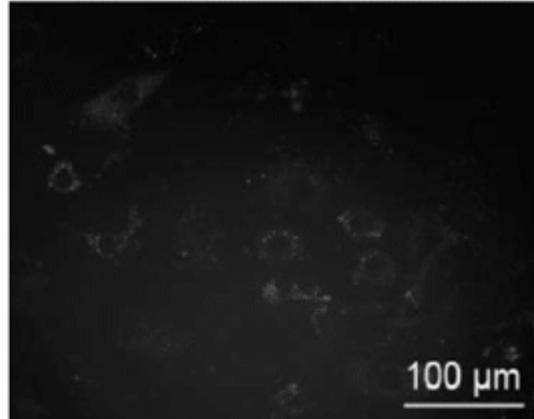


Figura 3 (cont.)

YTP1
150 μM



YSA1-NO2
150 μM

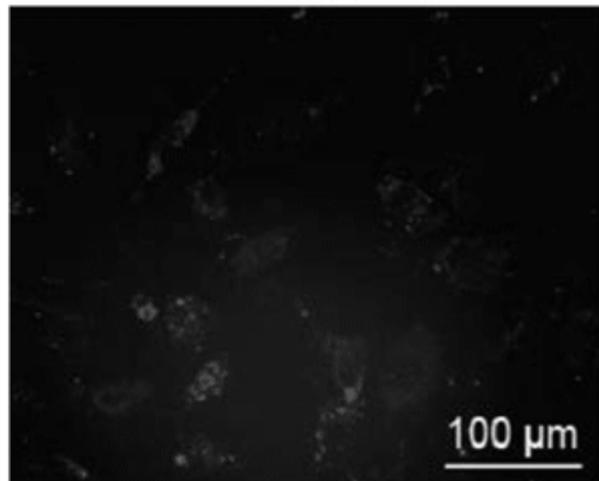
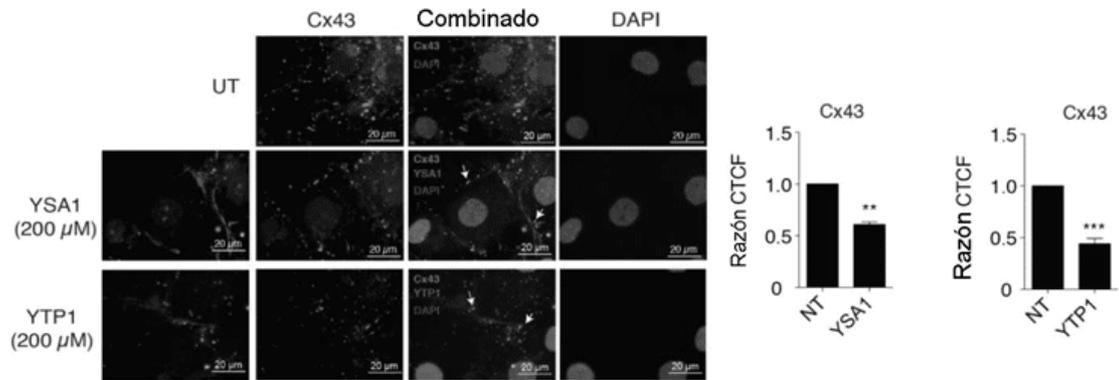


Figura 4

a



b

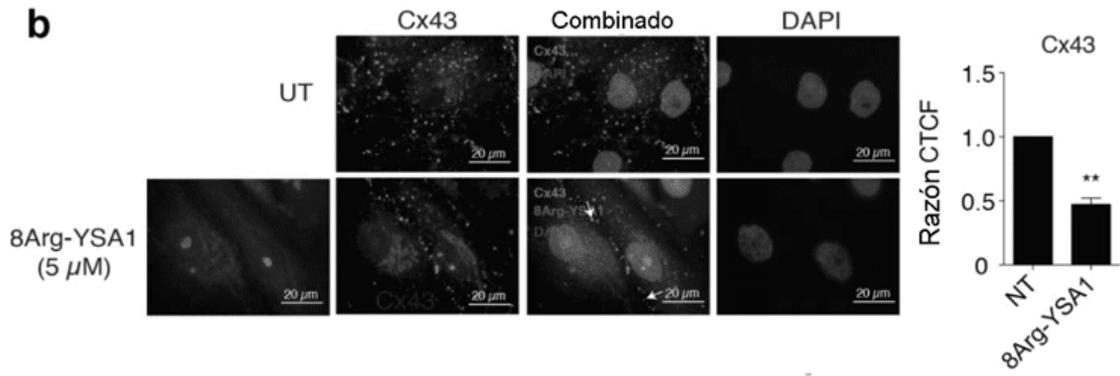
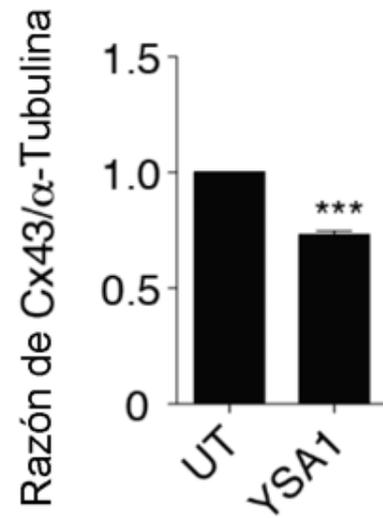
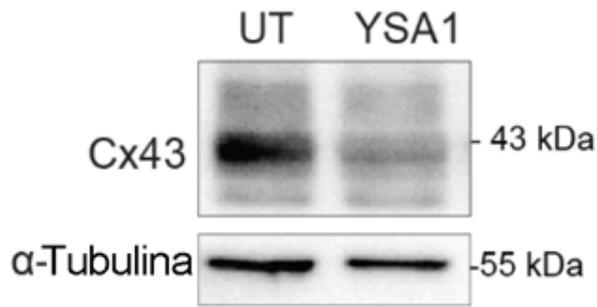


Figura 4 (cont.)

c



d

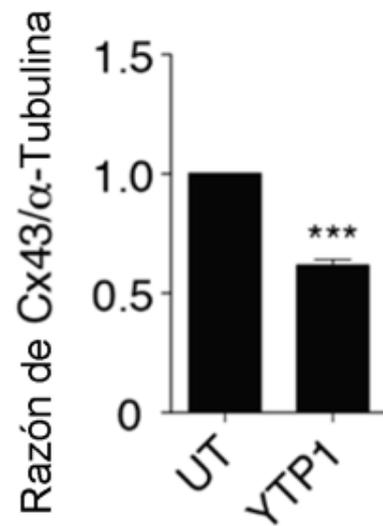
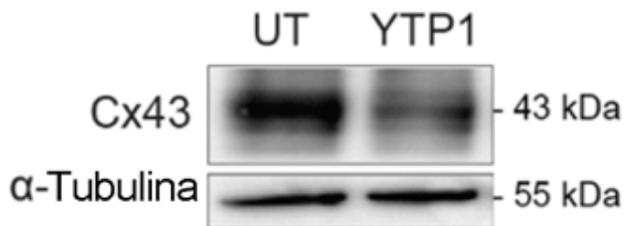
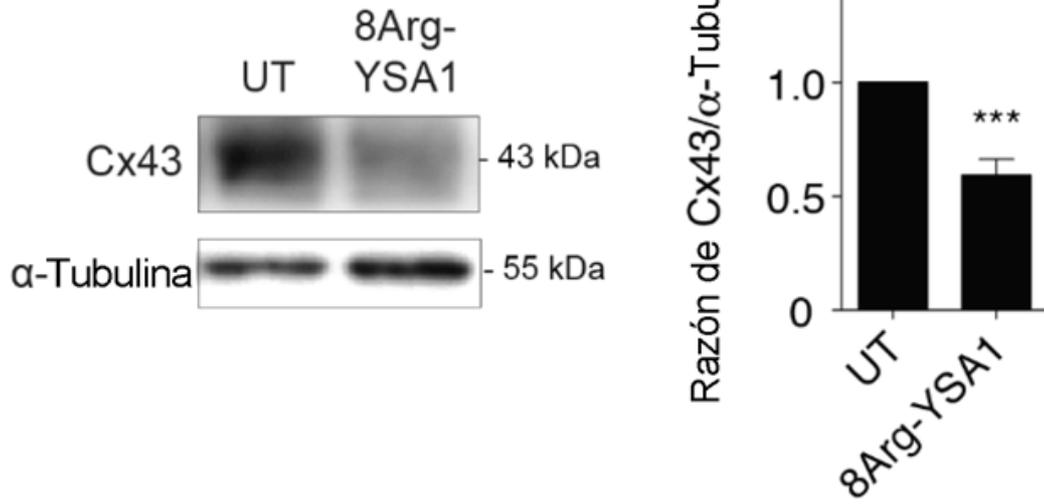


Figura 4 (cont.)

e



f

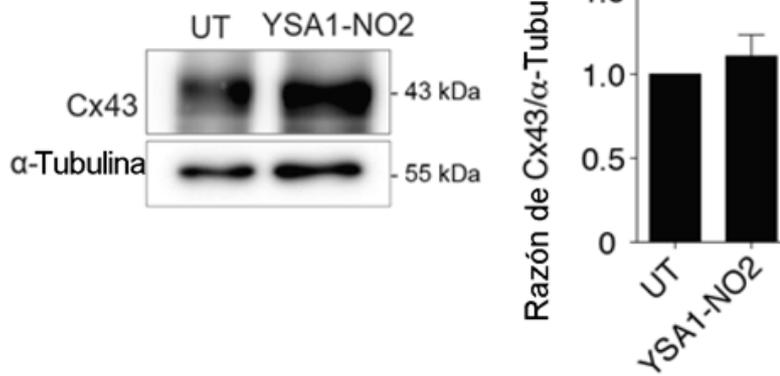
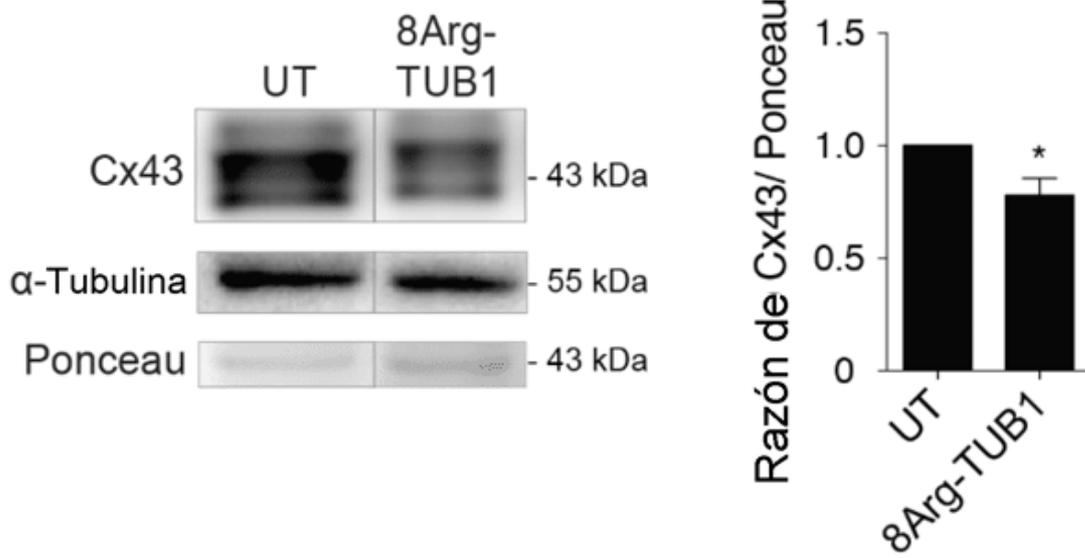


Figura 4 (cont.)

g



h

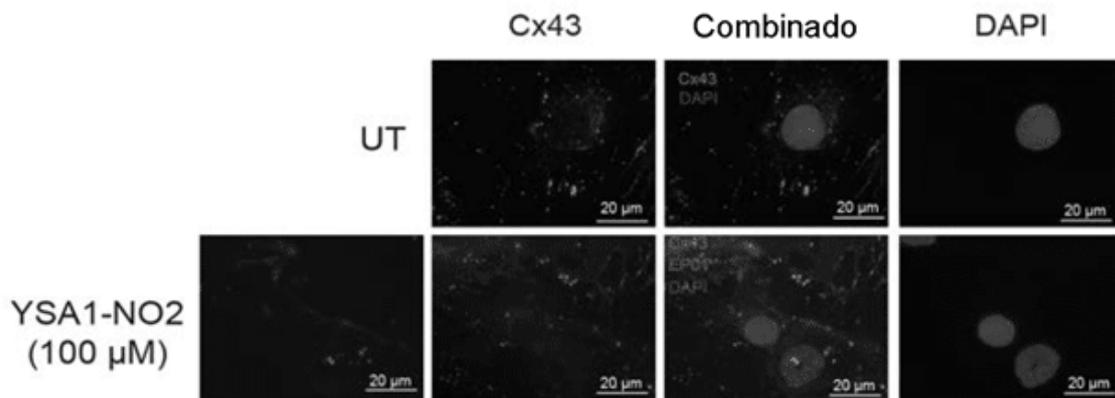


Figura 5

a

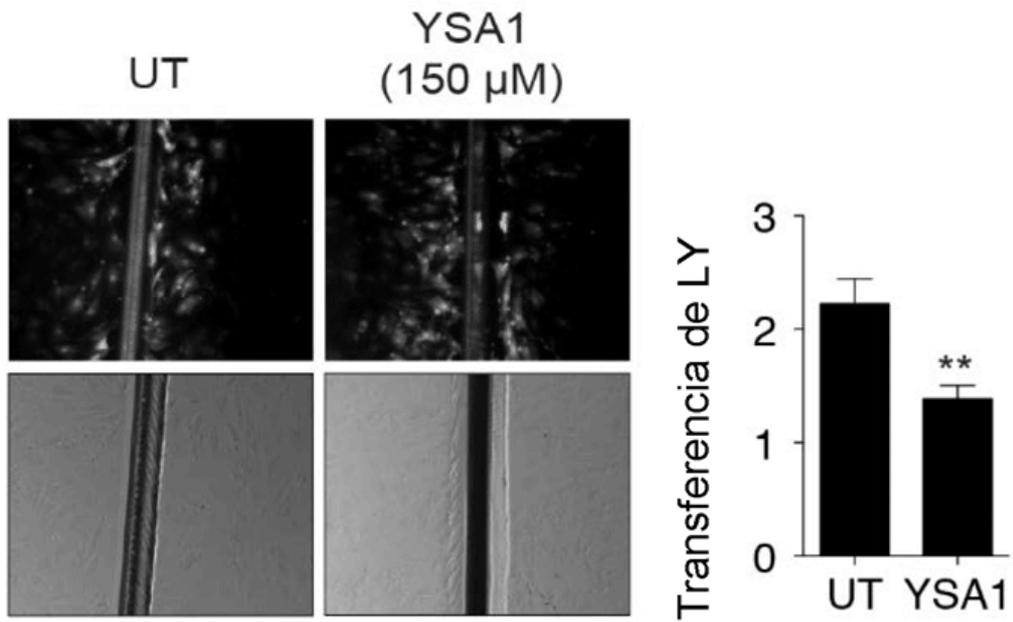


Figura 5 (cont.)

b

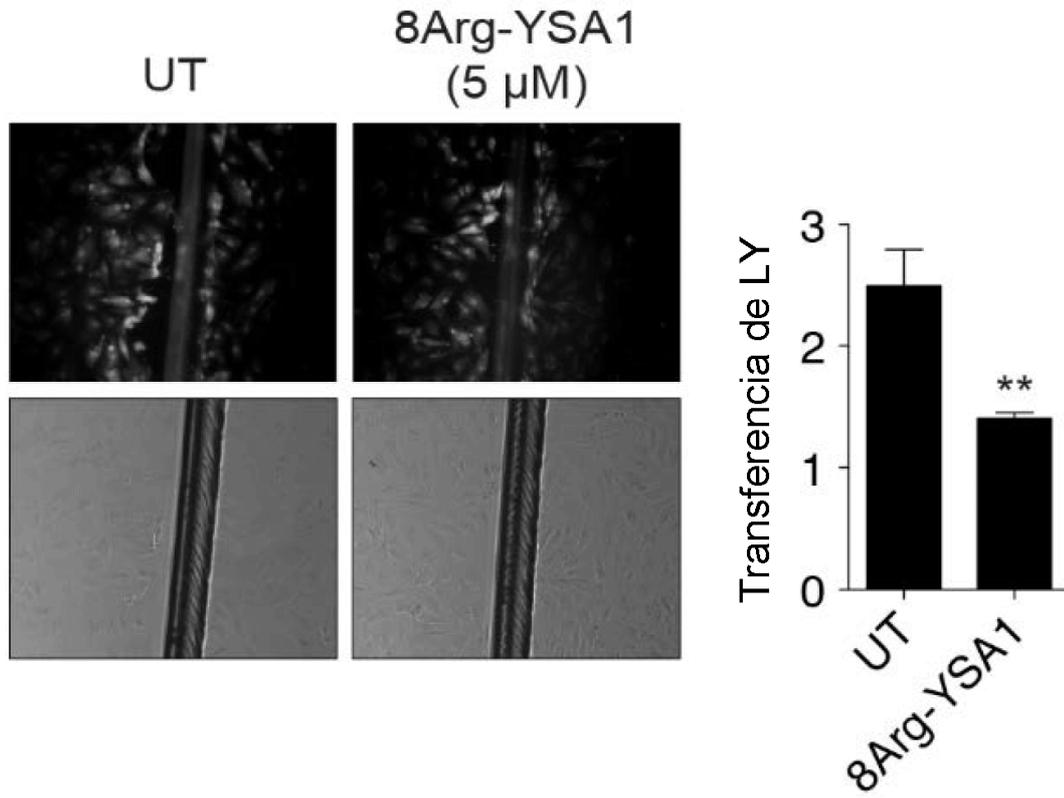


Figura 5(cont.)

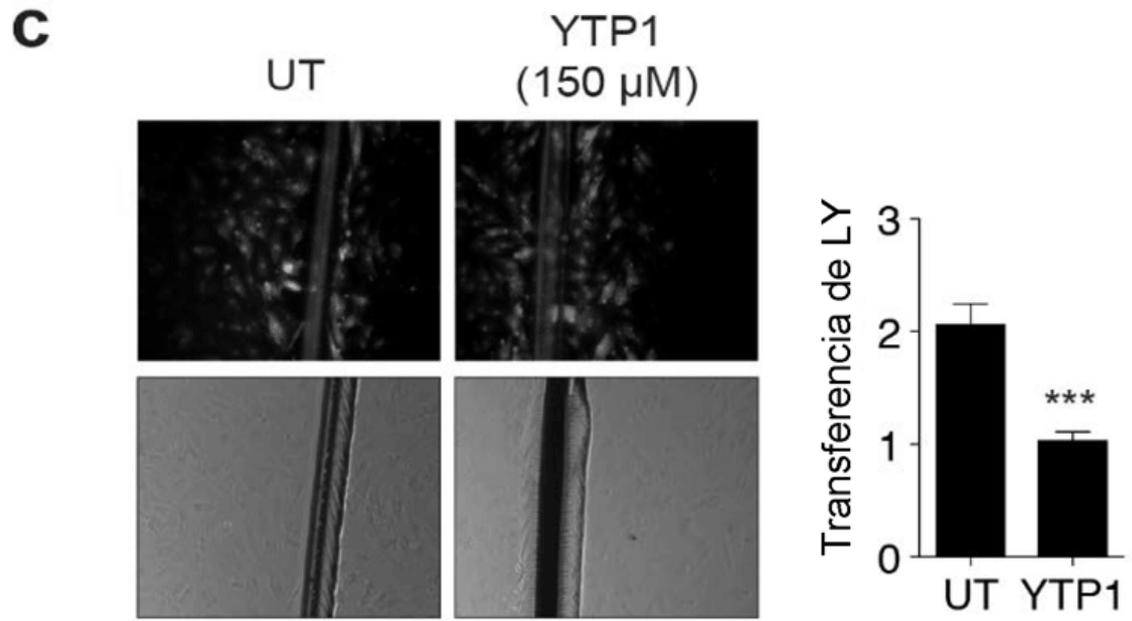


Figura 6

a

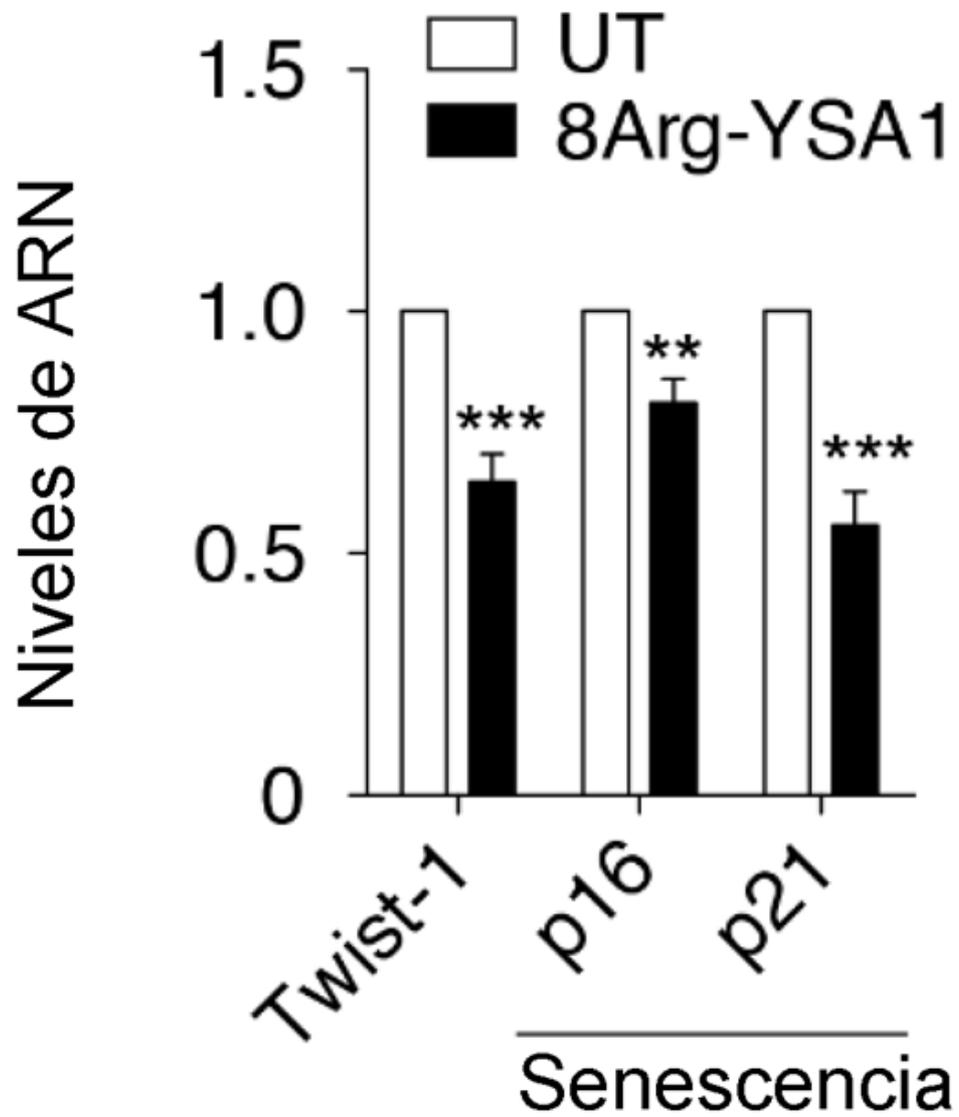


Figura 6 (cont.)

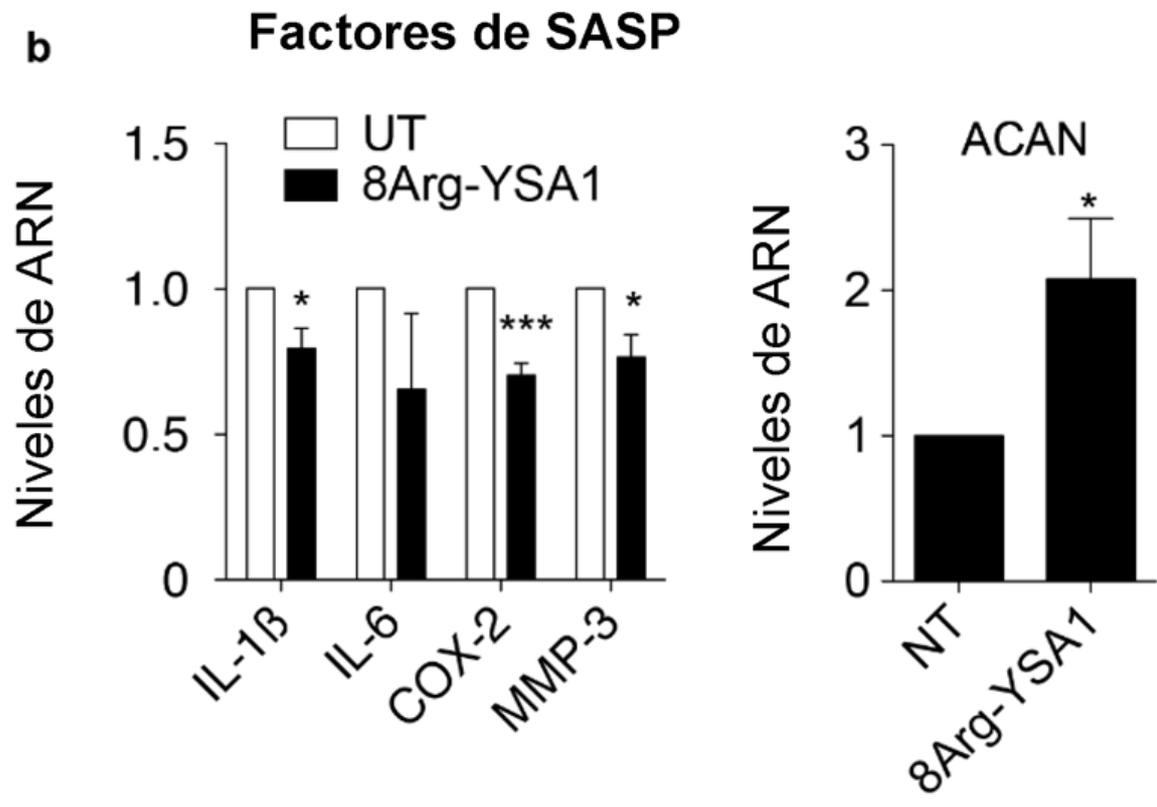


Figura 6 (cont.)

c

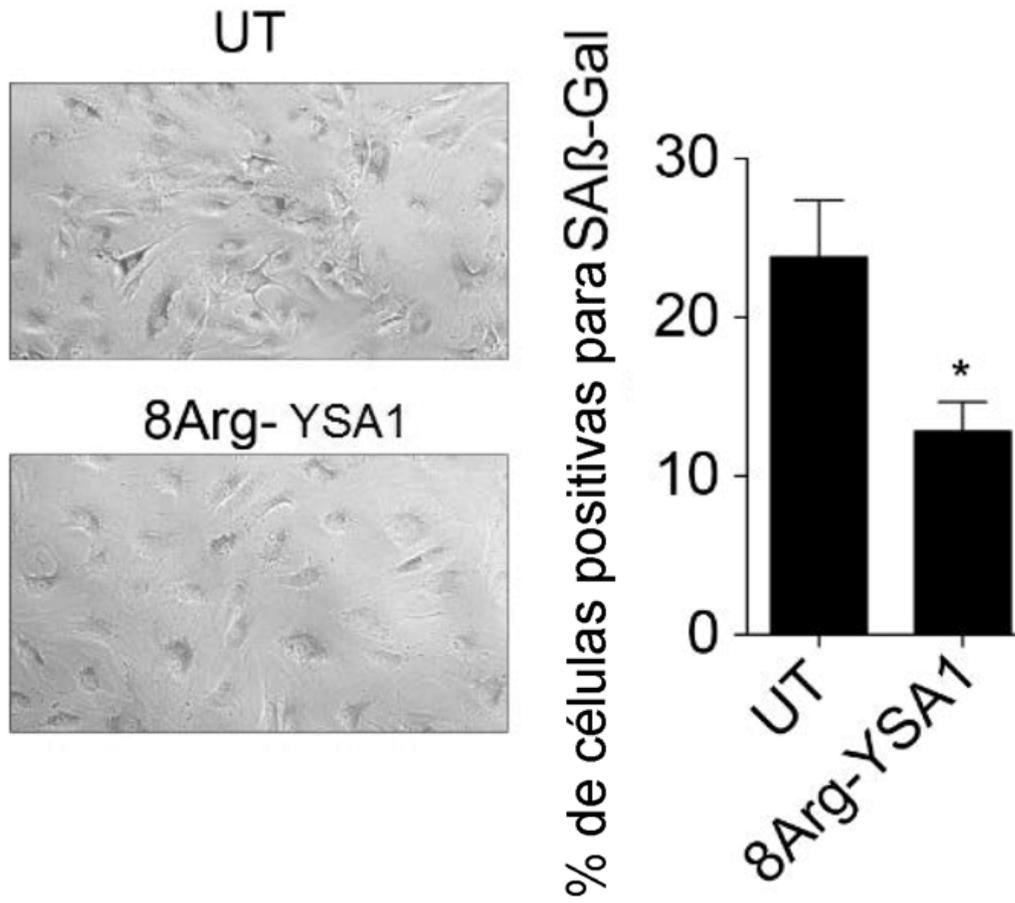


Figura 6 (cont.)

d

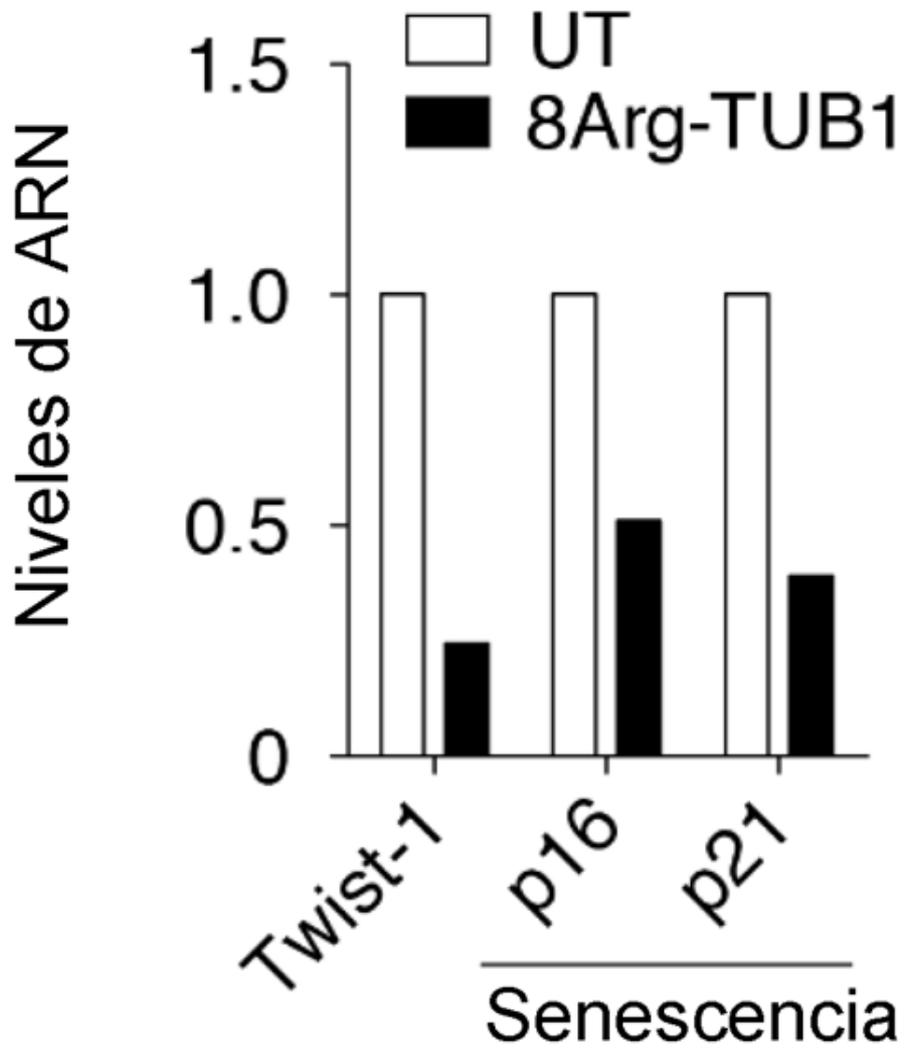


Figura 6 (cont.)

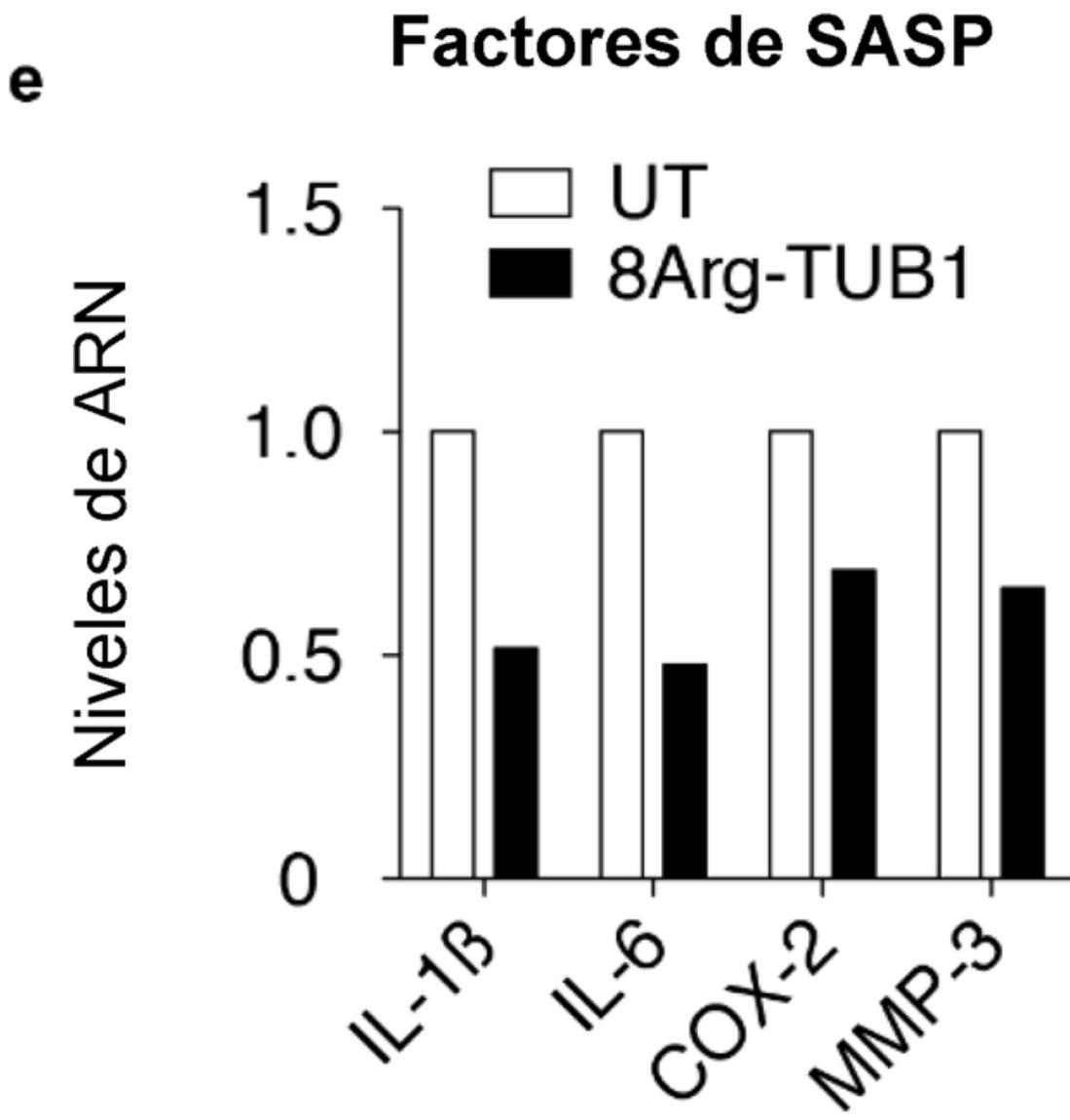
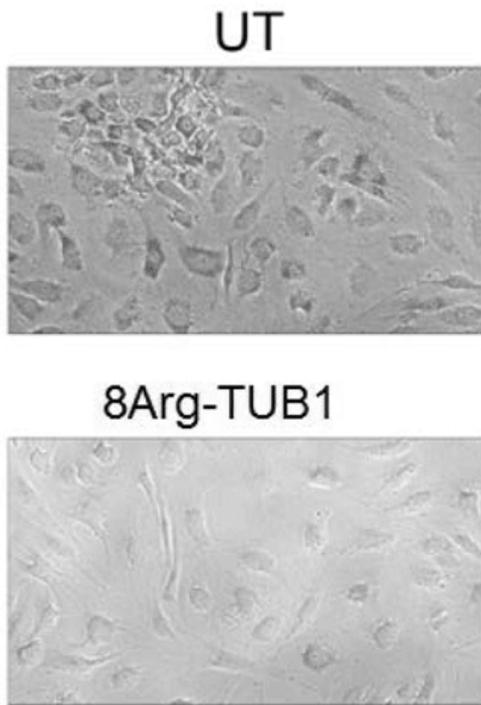


Figura 6 (cont.)

f



% de células positivas para SA β -Gal

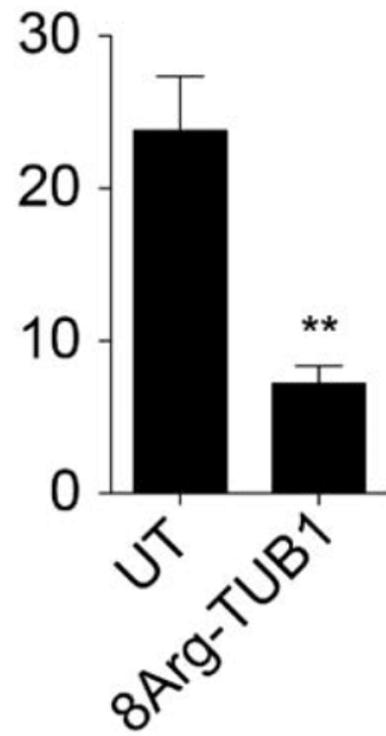
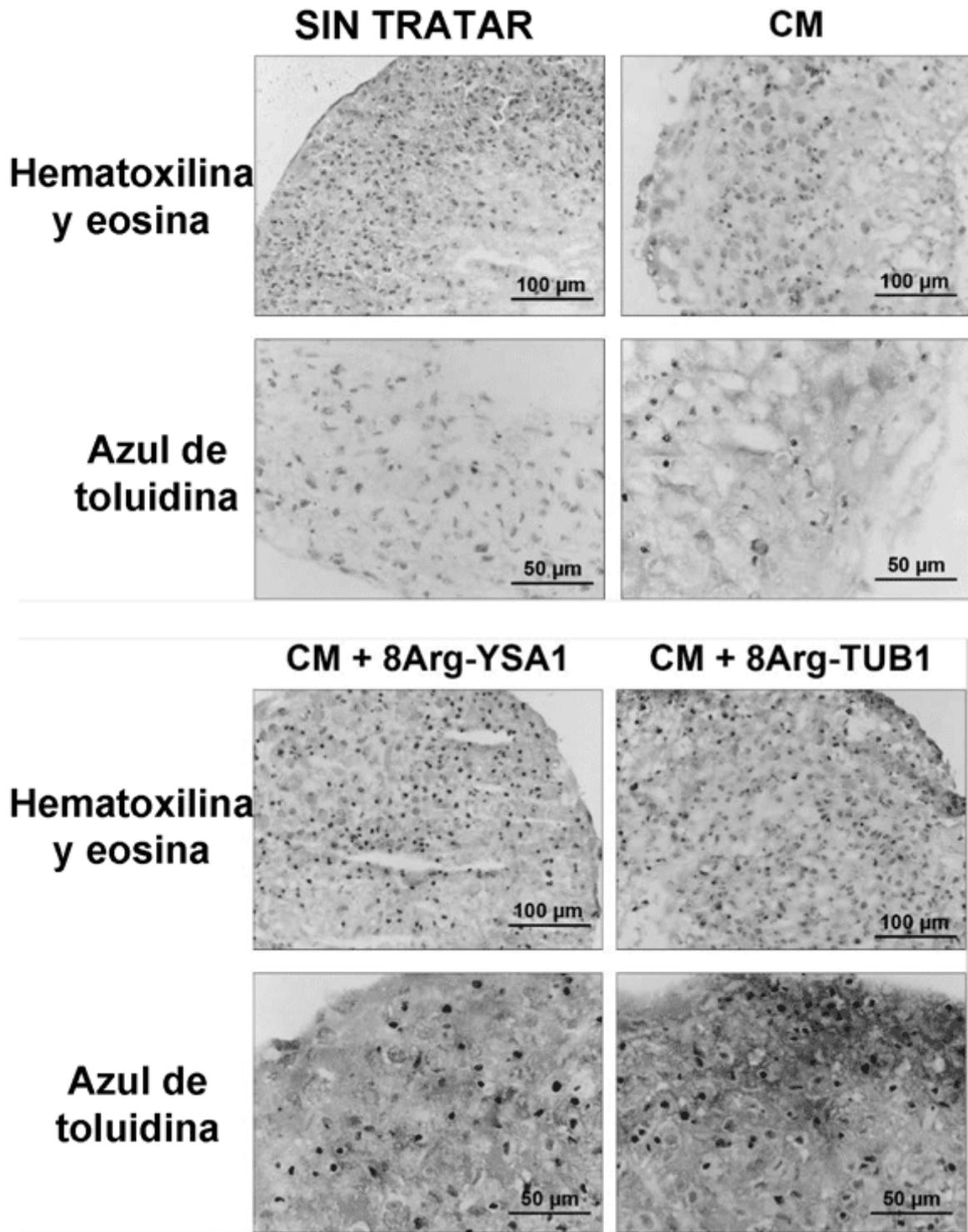


Figura 7





- ②① N.º solicitud: 201930708
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 10092624 A (GOURDIE et al.) 09/10/2018, Columna 1, líneas 26-28, columna 2, líneas 4-38, columna 8, líneas 39-58, columna 10, líneas 52-59, columna 18, línea 65-67, columna 19, líneas 1-33, columna 85, líneas 56,67, columna 86, líneas 1-38, SEQ ID NO: 2, 4, 6, 12 y 22 y, reivindicaciones 1, 9 y 13.	1-3, 7, 9-11
Y		4-6, 12-14
Y	VARELA-EIRIN, MARTA, et al. Cartilage regeneration and ageing: targeting cellular plasticity in osteoarthritis. Ageing research reviews, 2018, Vol. 42, Páginas 56-71	4-6, 12-14
X	WO 2006069181 A2 (MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT) 29/06/2006, Página 1, líneas 21-30, página 2, líneas 2-8, página 8, líneas 16-22, página 10, líneas 16-20, página 52, líneas 27-33, página 53, líneas 1-13, SEQ ID NO: 72 y, reivindicaciones 1-2, 4-7 y 42.	1-3, 9-11
A	US 2016120171 A1 (FIRSTRING RESEARCH INC.) 05/05/2016, Párrafos 0003, 0008-0009, 0016-0019, 0045, 0053, 0161, SEQ ID NO: 71 y reivindicaciones 1-3.	1-7, 9-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-7, 9-14

<p>Fecha de realización del informe 08.05.2020</p>	<p>Examinador M. J. García Bueno</p>	<p>Página 1/3</p>
---	---	------------------------------



21 N.º solicitud: 201930708

22 Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2019

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008157840 A2 (MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT) 24/12/2008, Página 1, líneas 10-17, página 5, líneas 3-22, página 6, líneas 1-13, y reivindicaciones 1-3 y 5.	1-7, 9-14
A	CALCINOTTO, ARIANNA, et al. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. Physiological reviews., 2019 (16/01/2019), Vol. 99, Nº 2, Páginas 1047-1078. Todo el documento.	1-7, 9-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-7, 9-14

Fecha de realización del informe
08.05.2020

Examinador
M. J. García Bueno

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K7/06 (2006.01)

C07K7/08 (2006.01)

A61K38/08 (2019.01)

A61K38/10 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, USPTO, JPO, NPL, EMBL ALL, STN, INTERNET.