(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 640 567**

(51) Int. CI.:

A61K 45/00	(2006.01)	***G01N 33/53***	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	***C12N 15/09***	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
A61P 19/00	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		
A61P 19/08	(2006.01)		
A61P 19/10	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
G01N 33/15	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012 PCT/JP2012/003113**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12157237**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12785073 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2711023**

(54) Título: **Promotor de la osteogénesis**

(30) Prioridad:

13.05.2011 JP 2011108642

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

(73) Titular/es:

NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY (100.0%)
5-45 Yushima 1-chome Bunkyo-ku
Tokyo 113-8510, JP

(72) Inventor/es:

TAKAYANAGI, HIROSHI y
NEGISHI, TAKAKO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Promotor de la osteogénesis

Campo técnico

La presente invención se refiere a un acelerador de la osteogénesis y a un agente preventivo y terapéutico. Más particularmente, se refiere a un acelerador de la osteogénesis y a un agente preventivo y terapéutico que tiene como principio activo una sustancia que inhibe la unión de la semaforina 4D y de la plexina B1.

Antecedentes de la invención

Según envejece la población de Japón, se ha producido un aumento en los pacientes que padecen fracturas óseas, osteoporosis, reumatismo articular, dolor lumbar y otras enfermedades óseas. La función de tejido en el tejido óseo es mantenida mediante la combinación de los osteoblastos, que favorecen la osteogénesis, y de los osteoclastos, que favorecen la resorción ósea, y mediante el mantenimiento de un equilibrio entre la osteogénesis y la resorción ósea. El equilibrio del metabolismo óseo es destruido por el envejecimiento, por una disminución en la función ovárica, así como por otros factores. Cuando disminuye la osteogénesis o cuando existe una resorción ósea anormal, la cantidad de hueso (la densidad ósea) disminuye y aparecen diversas enfermedades óseas. Algunas enfermedades óseas incluyen fracturas óseas, insuficiencia ósea, osteoporosis, osteomalacia, osteopenia, dolor lumbar, enfermedad ósea de Paget, mielitis tónica, reumatismo articular, artrosis deformante y similares. En particular, cuando una persona anciana padece una enfermedad ósea, es difícil que esa persona se desarrolle en un nivel necesario para la vida diaria, y dependiendo del caso, existe el riesgo de que el paciente quede encamado. Como resultado, esto es extremadamente significativo en la prevención y el tratamiento de las enfermedades óseas en la sociedad moderna, en la que un número creciente de personas son ancianos.

La vitamina D3 activada, el bifosfonato, la calcitonina, las preparaciones hormonales que contienen estradiol, las preparaciones de vitamina K2 y similares se usan generalmente como agentes terapéuticos para las enfermedades óseas. Se están desarrollando derivados del estradiol, derivados de la vitamina D3 activada, derivados del bifosfonato y similares como agentes terapéuticos más eficaces, ya que tienen menos efectos secundarios (véase el Documento Patente 1). Sin embargo, la vitamina D3 tiene una acción que aumenta la concentración de calcio en la sangre, y el estradiol y el bifosfonato tienen un efecto inhibidor de la resorción ósea. Sin embargo, ninguno de estos tiene un efecto que acelere directamente la osteogénesis a través de los osteoblastos. El tratamiento de elección es una terapia multifarmacológica en este caso, por lo que existe una necesidad de desarrollar un nuevo agente preventivo y terapéutico que tenga una acción diferente a la de los agentes preventivos y terapéuticos convencionales.

El hueso es creado de forma continua en unas etapas conocidas como remodelado óseo, en las que se repiten la fase de resorción y la siguiente fase de osteogénesis. La forma de transición de una fase a otra debe estar controlada de forma precisa mediante una secreción desde la célula ósea, ya que contribuye a la comunicación entre el osteoclasto y el osteoblasto, o por factores de reconstrucción ósea liberados desde la matriz ósea. Es bien conocido que el TGF-β y el IGF-1 liberados durante la resorción ósea estimulan la osteogénesis, de forma que es un conocido factor de acoplamiento. Aunque existe una abundancia de datos *in vitro* sobre moléculas candidatas que son extremadamente importantes para el factor de acoplamiento, todavía no hay ninguna prueba *in vitro* de esto.

Las moléculas de guiado axónico se manifiestan ampliamente fuera del sistema nervioso. Por lo tanto, las células errantes, la respuesta inmunitaria, el desarrollo tisular y la angiogénesis y similares están controladas (véanse los Documentos no Patente 1 y 2). Tomando como base la investigación llevada a cabo en los últimos años, se sugiere que las moléculas de guiado axónico como semaforina y efrina y similares contribuyen a la comunicación intercelular entre los osteoclastos y los osteoblastos (véanse los Documentos no Patente 3 hasta 5).

Es bien conocido que la Semaforina 4D es secretada desde los oligodentrocitos y que induce la destrucción del crecimiento del cono medular en el sistema nervioso central. También está claro que la semaforina 4D es extremadamente importante en el mantenimiento de la respuesta inmunitaria y de la homeostasis del sistema inmunitario. Un receptor bien conocido de la semaforina 4D es la plexina B1 (véase el Documento no Patente 6). Adicionalmente, el Documento no Patente 7 sugiere que la formación de osteoclastos puede ser acelerada a través de una acción de inhibición de la diferenciación de los osteoblastos, así como los osteoblastos. El Documento no Patente 8 desvela que la semaforina 4D no es detectada en los osteoblastos, que está presente en la superficie de los osteoclastos, y se ha confirmado que la cantidad de hueso aumenta en comparación con ratones naturales en ratones hembra sema4D-/- en los que la Semaforina 4D (Sema 4D) es deficiente en los homocigotos.

Documentos de la técnica anterior

Documentos Patente

Tabla especial en la Publicación JP2005-509629 correspondiente al documento WO 03/034987.

El documento WO2008/100995 enseña composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades con CD10.

[Documento no Patente 1] B. J. Dickson, Science 298, 1959 (6 de diciembre de 2002)

[Documento no Patente 2] A. B. Huber, A. L. Kolodkin, D. D. Ginty, J. F. Cloutier, Annual Review Neuroscience 26, 509 (2003)

[Documento no Patente 3] N. Takagahara et al., Nat. Cell Biol 8, 615 (junio de 2006)

[Documento no Patente 4] N. Irie et al., Cell Metab 4, 111 (agosto de 2006)

[Documento no Patente 5] C. Zhao et al., Cell Metab 4, 111 (agosto de 2006)

[Documento no Patente 6] I. Oinuma et al., Science, Vol. 305, nº 5685, páginas 862-865 (agosto de 2004)

[Documento no Patente 7] Ishida Masanari, Kaneda Toshio, Muto Akihiro, Yoshida Masashi, Meeting Program Abstracts of the Japan Society of Bone Metabolism, vol. 25, página 266, publicado en junio de 2007, [Analysis of Bioaction in Bone Metabolism in Osteoclast-derived Semaphorin 4D]

[Documento no Patente 8] Romain Dacquin, Chantal Domenget, Pierre Jurdic, Irma Machuca-Gayet, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, Presentation Abstracts, Presentation Number MOO152, "Physiological Control of Bone Resorption by Semaphorin 4D is Dependent on Ovarian Function"

[Documento no Patente 9] Conrotto et al Blood 1 junio de 2005, Vol. 105, nº 11 enseña que la Sema4D induce la angiogénesis a través del reclutamiento de Met por parte de la Plexina B1.

[Documento no Patente 10] Suzuki et al Nature Immunology Vol. 9, nº 1 enero de 2008 enseña las semaforinas y sus receptores en las interacciones entre las células inmunitarias.

[Documento no Patente 11] Roth et al Cellular and Molecular Life Sciences, Vol. 66, 2009 enseña las muchas caras de las semaforinas – desde el desarrollo hasta la patología.

[Documento no Patente 12] Dacquin et al PLoS ONE octubre de 2011, Vol. 6, publicación 10, enseña que el control de la resorción ósea por parte de la semaforina 4D es dependiente de la función ovárica.

[Documento no Patente 13] Negishi-Koga et al Nature Medicine Vol. 17, nº 11 noviembre de 2011 págs. 1473-1481 enseña la supresión de la formación de hueso por la expresión osteoclástica de la semaforina 4D.

Resumen de la invención

Problemas que pretende resolver la presente invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un agente de aceleración de la osteogénesis y un agente preventivo y terapéutico para enfermedades óseas que implica la promoción directa de la osteogénesis usando osteoblastos.

Medios usados para resolver los problemas

Después de una gran cantidad de duro trabajo de investigación en las condiciones descritas en los antecedentes de tecnología mencionados anteriormente, los inventores averiguaron que (a) cuando la semaforina 4D que deriva de los osteoclastos se une al receptor de la plexina B en el osteoblasto, activa la pequeña proteína G RhoA que inhibe la diferenciación de los osteoblastos, disminuye las señales del IRS (señales que promueven la diferenciación de los osteoblastos) e inhiben la diferenciación de los osteoblastos, de forma que se inhibe la osteogénesis; y que (b) los anticuerpos anti-semaforina 4D y los anticuerpos anti-plexina B1 aceleran directamente la osteogénesis usando los osteoblastos.

Esto significa que la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-semaforina 4D o a un fragmento funcional del mismo, o a un anticuerpo anti-plexina B1 o a un fragmento funcional del mismo, para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas en un sujeto.

En el presente documento también se describen: un agente para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas que tiene como principio activo una sustancia que inhibe la unión de la semaforina 4D y de la plexina B1; un agente para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas como se ha descrito anteriormente característico porque la sustancia de inhibición de la unión es un anticuerpo anti-semaforina 4D; un agente para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas como se ha descrito anteriormente característico porque la sustancia de inhibición de la unión es un anticuerpo anti-plexina B1 o una proteína que contiene regiones extracelulares de la

plexina B1; y un agente para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas como se ha descrito anteriormente característico porque las enfermedades óseas se seleccionan entre fractura ósea, insuficiencia ósea, osteoporosis, osteomalacia, osteopenia, dolor lumbar, enfermedad ósea de Paget, mielitis tónica, reumatismo articular y artrosis deformante.

En el presente documento también se describe un método usado para la determinación de un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis en el que se determina si una sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1, y si la sustancia mencionada anteriormente en estudio es la sustancia mencionada anteriormente que inhibe la unión, se determina que la sustancia mencionada anteriormente en estudio es un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis; en el presente documento también se describe un método como se ha descrito anteriormente característico porque el método usado para la determinación de si una sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1 consiste en las siguientes etapas (A) hasta (D): (A) una etapa en la que la semaforina 4D y la plexina Blare se ponen en contacto entre sí en presencia de la sustancia en estudio, (B) una etapa en la que se mide el grado de unión entre la semaforina 4D y la plexina B1, (C) una etapa en la que se compara el grado medido en la etapa (B) anterior con el grado cuando no están en presencia de la sustancia en estudio, y (D) una etapa en la que se determina que la sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1 cuando el grado medido en la etapa (B) anterior es menor que cuando no están en presencia de la sustancia en estudio; y en el presente documento también se describe un método de cribado de un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis característico porque se usan los métodos descritos anteriormente para buscar sustancias que se están estudiando como candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis.

La presente invención puede usarse para promover directamente la osteogénesis usando osteoblastos y para prevenir y/o tratar enfermedades óseas.

Breve descripción de las figuras

[Figura 1] Un diagrama que indica la cantidad de hueso en ratones naturales (WT) medida usando una tomografía microcomputarizada (μCT) y en ratones inactivados para la semaforina 4D (Sema 4d-/-).

[Figura 2] Un diagrama que indica el ancho trabecular en ratones WT medido usando una μCT y en ratones Sema4d-/-.

[Figura 3] Un diagrama que indica la osteogénesis [el área superficial del osteoblasto (izquierda); el área superficial del hueso calcificado (centro); y el índice de osteogénesis (derecha)] medido usando un análisis de osteomorfogénesis en ratones WT y en ratones Sema4d-/- con un doble marcador de calceína cada 4 días.

[Figura 4] Un diagrama que indica el área superficial del osteoclasto y el recuento de células (a la izquierda y en el centro), así como los parámetros (a la derecha) de la resorción ósea medidos usando un análisis de osteomorfogénesis en ratones WT y en ratones Sema4d-/-.

[Figura 5] Un diagrama que indica la cantidad de hueso en ratones en los que se ha llevado a cabo un injerto de células inmunitarias adoptadas usando las células de médula ósea de ratones WT y de ratones Sema4d-/-. El segundo injerto desde la izquierda indica la cantidad de hueso de los ratones cuando se injertó en los ratones WT, y el segundo injerto desde la derecha indica la cantidad de hueso de los ratones cuando se injertó en los ratones Sema4d-/-.

[Figura 6] Un diagrama que indica el número de nódulos óseos cuando se añade Fc-sema4D (Semaforina 4D recombinada, fusionada con el área Fc de la IgG1) a las células de la bóveda craneal cultivadas en condiciones de osteogénesis.

[Figura 7] Un diagrama que indica la manifestación del tipo de Plexina B y el ARNm del agrupamiento de la diferenciación 72 (CD72) durante la diferenciación del osteoblasto.

[Figura 8] Un diagrama que indica los resultados del análisis de la precipitación usando Fc-sema4D. El panel de la derecha indica los resultados del análisis de la toma de muestras antes de la precipitación, y el panel de la izquierda indica los resultados del análisis de la toma de muestras después de la precipitación.

[Figura 9] Un diagrama que indica la cantidad de hueso en ratones WT medido usando un análisis de μCT y en ratones inactivados para la Plexina B1 (Plxnb1-/-).

[Figura 10] Un diagrama que indica el ancho de la trabécula en ratones WT medido usando ratones μCT y ratones Plxnb1-/-.

[Figura 11] Un diagrama que indica el área superficial de los osteoblastos en ratones WT medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 12] Un diagrama que indica el área superficial de hueso que ha quedado calcificado en ratones WT medida usando un análisis de osteomorfogénesis y ratones Plxnb1-/-.

[Figura 13] Un diagrama que indica el índice de osteogénesis en ratones WT medido usando un análisis de osteomorfogénesis y ratones Plxnb1-/-.

[Figura 14] Un diagrama que indica los mutantes RA (R1661 / 1662 / 1968A) de la Plexina B1 y la Plexina B1 con mutaciones en el dominio GAP, así como el corte de mutante de la Plexina B1 en el que el dominio de unión PDZ está ausente (Δ PDZ).

[Figura 15] Un diagrama que indica la cantidad de hueso en ratones WT (ratones de control) medida usando un análisis de μCT y ratones dominantes negativos RhoA (RhoA DNOB).

[Figura 16] Un diagrama que indica la trabécula en ratones WT medida usando un análisis de μCT y RhoA DNOB.

[Figura 17] Un diagrama que indica la formación [área superficial del osteoblasto] en ratones WT y en ratones RhoA DNOB medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 18] Un diagrama que indica la formación [área superficial de hueso calcificado] en ratones WT y en ratones RhoADNOB.

[Figura 19] Un diagrama que indica la formación [índice de osteogénesis] en ratones WT y en ratones RhoA DNOB medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 20] Un diagrama que indica el área superficial de osteoblastos de ratones ovariotomizados (OVX) y de ratones OVX tratados con anticuerpos-Sema4D medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 21] Un diagrama que indica la cantidad de hueso de los ratones OVX y de los ratones OVX tratados con anticuerpos anti-semaforina 4D (anticuerpos anti-Sema4D) medida usando un análisis de μCT.

[Figura 22] Un diagrama que indica la osteogénesis [índice de osteogénesis] en ratones OVX y en ratones OVX tratados con anticuerpos anti-Sema4D medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 23] Un diagrama que indica los intervalos trabeculares en ratones OVX y en ratones OVX tratados con anticuerpos anti-Sema4D medidos usando un análisis de μCT.

[Figura 24] El panel superior de la Figura 24 es un diagrama que indica los resultados del estudio de la formación de calcificación en osteoblastos de ratón cultivados usando osteoclastos de ratones WT de ratones Sema4D-/- y cuando se cultivan en presencia de anticuerpos anti-Sema4D. El panel inferior de la Figura 24 es un diagrama que indica los resultados del estudio de la calcificación de osteoblastos de ratón cuando se cultivan en presencia de Fc-sema4d y / o de anticuerpos anti-plexina Ba.

[Figura 25] Un diagrama que indica los resultados del estudio de la formación de calcificación en osteoblastos humanos (HOS) cultivados en presencia de osteoclastos o del sobrenadante y / o de anticuerpos anti-Sema4D y similares.

[Figura 26] Un diagrama que indica el área superficial de osteoblastos de ratones ovariotomizados (OVX) y de ratones OVX tratados con anticuerpos anti-semaforina 4D (anticuerpos anti-Sema4D) 6 semanas después del tratamiento OVX medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 27] Un diagrama que indica la cantidad de hueso en ratones OVX y en ratones OVX tratados con anticuerpos anti-Sema4D 6 semanas después del tratamiento OVX medida usando un análisis de μCT.

[Figura 28] Un diagrama que indica la osteogénesis [índice de osteogénesis] en ratones OVX y en ratones OVX tratados con anticuerpos anti-Sema4D 6 semanas después del tratamiento OVX medida usando un análisis de osteomorfogénesis.

[Figura 29] Un diagrama que indica los intervalos trabeculares en ratones OVX y en ratones OVX tratados con anticuerpos anti-Sema4D 6 semanas después del tratamiento OVX medidos usando un análisis de μCT.

Modo de trabajo preferido de la invención

La proteína que comprende las regiones extracelulares de los anticuerpos anti-semaforina 4D, de los anticuerpos anti-plexina B1 y de la plexina B1 son aceleradores adecuados de la osteogénesis. El inhibidor de la unión en la presente invención inhibe la unión de la semaforina 4D derivada de los osteoclastos y de los receptores de la plexina B1 en los osteoblastos y mediante la inhibición de la supresión de la diferenciación de los osteoblastos a través de la inhibición de la activación de la RhoaA y a través de la inhibición de la reducción de las señales del IRS, de forma que se cree que se acelera la osteogénesis usando osteoblastos. Adicionalmente, en esta Memoria descriptiva, los términos [inhibición] y [supresión] se usan de forma intercambiable.

Los anteriormente mencionados anticuerpos anti-semaforina 4D y los anticuerpos anti-plexina B1 (denominados en lo sucesivo en el presente documento como los [anticuerpos en esta invención] pueden ser anticuerpos policlonales y pueden ser monoclonales y cualquier fragmento funcional de estos. Sin embargo, se prefieren los anticuerpos monoclonales dada su elevada especificidad. Los anteriormente mencionados anticuerpos anti-semaforina 4D y anticuerpos anti-plexina B1 pueden ser producidos usando un método convencional bien conocido usando semaforina 4D y plexina B1. Los fragmentos funcionales que son los anticuerpos en la presente invención indican fragmentos de los anticuerpos que se unen específicamente con respecto a (a) la semaforina 4D, que es un antígeno al que se unen específicamente los anticuerpos en la presente invención, y a (b) la plexina B. Algunos ejemplos específicos son F (ab') 2, Fab', Fab, Fv, FV unidos por disulfuro, FV de cadena única (scFV) y los polímeros de estos (D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998 T.J. International Ltd.). Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos usando un método convencional tal como una digestión de las moléculas de anticuerpos usando papaína, pepsina y otras proteasas, o usando un método de ingeniería genética bien conocido.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos humanos. Aquí, [anticuerpos humanos], según se relacionan estos con la presente invención, indica anticuerpos que son los productos manifestados de genes de anticuerpos derivados de seres humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser obtenidos introduciendo un locus de un gen de un anticuerpo humano y administrando semaforina 4D y plexina B1 en animales transgénicos que son capaces de producir anticuerpos derivados de seres humanos. Un ratón es un ejemplo de dicho animal transgénico. Los ratones que son capaces de producir anticuerpos humanos, por ejemplo, son deficientes en las cadenas pesadas endógenas de la inmunoglobulina de ratón (Ig) y las cadenas ligeras de ratón κ, y los ratones pueden usarse de forma que conserven simultáneamente un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que comprende los genes de la cadena pesada de la Ig humana, así como los transgenes de la cadena Igκ humana (KCo5). Estos ratones son producidos cruzando ratones de la raza A que tienen un locus de un gen de una cadena pesada de una Ig humana, con ratones de la raza B que tienen un transgen de la cadena Igκ humana. Los ratones de la raza A son homocigóticos para ambas destrucciones endógenas de la cadena pesada de la Ig y la cadena ligera κ y son una raza de ratones (Tomizuka, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 200 Vol. 97: 722) que conserva un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que es capaz de una transmisión apomórfica. La raza B también es homocigótica para ambas deficiencias en las cadenas pesadas de la Ig de ratón y cadena ligera κ y es una raza de ratones (Nat Biotechnol., 1996 Vol. 14: 845) que conserva un transgen de la cadena de la Igκ humana (KCo5).

Los anticuerpos policlonales de la presente invención pueden ser producidos usando el método indicado a continuación. Pueden obtenerse usando semaforina 4D y plexina B1 y, si fuera necesario, un agente de inmunoactivación (adyuvante de Freund y similares) en ratones, conejos, cabras, caballos y otros mamíferos no humanos. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se usan para producir un hibridoma a partir de células productoras de anticuerpos procedentes de animales inmunosensibilizados y de células de mieloma que no pueden producir sus propios anticuerpos. El hibridoma es clonado y se seleccionan los clones que producen anticuerpos monoclonales, lo que indica su afinidad específica hacia los antígenos usados para la inmunización. Dicho hibridoma puede ser producido basándose en el método de Keller y Millstein (Nature, 1975 Vol. 256: 495-497). El cribado del clon del hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales se lleva a cabo cultivando el hibridoma en una placa de microtitulación. La sensibilidad de respuesta de los inmunoantígenos en el sobrenadante de cultivo en los pocillos que se observa que ha proliferado puede llevarse a cabo midiendo usando un ELISA y otros métodos de enzimoinmunoensayo, radioinmunoensayo, el método del anticuerpo fluorescente y otros métodos inmunológicos.

La producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas puede llevarse a cabo cultivando el hibridoma *in vitro* y aislándolo a partir del sobrenadante. También puede ser cultivado *in vivo* en el líquido pleural de ratones, ratas, cobayas, hámsteres o conejos y similares, y aislarse a partir del líquido pleural. Los genes que codifican los anticuerpos monoclonales procedentes del hibridoma y otras células productoras de anticuerpos son clonados, recombinados en un vector adecuado, y éstos son introducidos en el hospedador (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), otras reservas de células de mamífero, *Escherichia coli,* células de levadura, células de insecto, células vegetales, y similares), y los anticuerpos recombinantes son producidos usando la tecnología de recombinación génica (P. J. Delves, Antibody Production Essential Techniques, 1997, Wiley, P. Sheferd y C. Dean, Monoclonal Antibodies, 2000, Oxford University Press, J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 1993, Academic Press).

Se producen vacas, cabras, ovejas o cerdos transgénicos en los que los genes de los anticuerpos deseados son recombinados en genes endógenos usando la tecnología de producción de animales transgénicos, y se obtienen grandes cantidades de anticuerpos derivados de los genes de anticuerpos a partir de la leche de estos animales transgénicos.

Los anticuerpos producidos pueden ser refinados usando un método bien conocido en el campo tal como una combinación de cromatografía en columna de la proteína A, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, el método analítico del sulfato, filtración en gel, cromatografía de afinidad, y similares.

La proteína que comprende la región extracelular de la anteriormente mencionada plexina B1 puede inhibir la unión de la semaforina 4D y de la plexina B1 mediante el atrapamiento de la semaforina 4D. No hay ninguna restricción en particular sobre la proteína que comprende la región extracelular de la plexina B1, sin embargo, una proteína que fusiona la región constante de los anticuerpos (preferentemente cualquier fragmento Fc de una inmunoglobulina) es un ejemplo adecuado.

La proteína que comprende las anteriormente mencionadas semaforina 4D, plexina B1 y regiones extracelulares de la plexina B1, puede producir un vector de manifestación que comprende esa secuencia basada en la información de la secuencia de estas proteínas. El vector de manifestación se somete a una transformación fenotípica en unas células hospedadoras adecuadas, la proteína objetivo es producida en el interior de las células y la proteína objetivo puede ser introducida usando un método de aislamiento u otro método bien conocido. Por ejemplo, la secuencia 3 de ADN (número de secuencia 1) de la semaforina 4D humana y la secuencia de aminoácidos (número de secuencia 2) se divulgan con el número de registro del GenBank NM_001142287, y la secuencia de ADN (número de secuencia 3) de la plexina B1 humana y la secuencia de aminoácidos (número de secuencia 4) se divulgan con el número de registro del GenBank NM_001130082. Adicionalmente, la región extracelular de la plexina B1 humana se corresponde con los números de aminoácidos 1 hasta 1490 de la secuencia de aminoácidos del anteriormente mencionado número de registro NM_001130082.

Hemos medido mediante un análisis de inmunotransferencia la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1 tanto en presencia como en ausencia de la sustancia, para ver si una cierta sustancia es una sustancia que inhibe la unión de la semaforina 4D y de la plexina B1, y estudiamos si el enlace entre estas disminuye en presencia de esa sustancia, de forma que pudiera confirmarse con facilidad.

El efecto de aceleración de la osteogénesis mencionado en la presente invención indica el efecto de aceleración de la osteogénesis, de forma más precisa incluye el efecto de acelerar la osteogénesis por parte de los osteoblastos mediante la inhibición de la supresión de la diferenciación de los osteoblastos. Si una cierta sustancia tiene o no un efecto de aceleración de la osteogénesis puede ser confirmado mediante la administración de la sustancia a vertebrados que tengan una menor cantidad de hueso de la habitual (preferentemente a pacientes con osteoporosis y a modelos de vertebrados de osteoporosis) y averiguar si aumenta o no la cantidad de hueso.

El efecto de prevención y tratamiento de la enfermedad ósea de la presente invención indica el efecto de prevención y / o de tratamiento de cualquiera de las enfermedades óseas, o el efecto de mejorar los síntomas de la presente invención. Si una cierta sustancia tiene o no un efecto terapéutico óseo puede ser confirmado mediante la administración de la sustancia a un paciente o a un vertebrado con una enfermedad ósea (preferentemente un paciente con osteoporosis o un modelo de vertebrado de osteoporosis) y estudiando después si la enfermedad ósea se cura o mejora.

La formulación de la presente invención puede contener únicamente la sustancia de inhibición de la unión de la presente invención, sin embargo, puede añadirse un habitualmente permitido farmacológicamente portador, agente de unión, estabilizante, excipiente, diluyente, tampón de pH, disgregante, agentes solubilizante, adyuvante de solubilización, isotónico y otros componentes de combinación de agentes de ajustes. La formulación del agente reductor de la presente invención puede ser una formulación en polvo, una formulación granulada, un agente en cápsula u otra preparación sólida. También puede ser una preparación en solución, una emulsión, una suspensión u otra formulación líquida. Estas preparaciones pueden usarse según sea adecuado para la sustancia de inhibición de la unión de la presente invención mediante un tratamiento usando el método habitual.

No hay ninguna restricción en particular sobre el método usado para la administración del agente de la presente invención, siempre que tenga el efecto preventivo o terapéutico de la enfermedad ósea deseado, y pueda ser administrado por vía oral o no oral. El método no oral usado para su administración incluye una administración vascular, una administración muscular, una administración hipodérmica, una administración transdérmica, una administración nasal, una administración transpulmonar. De éstas, pueden usarse la administración vascular y la intravenosa con una ventaja particular. La dosis de la preparación de la presente invención, así como el número de veces administrada y la concentración, pueden ser ajustadas según el peso corporal del sujeto, el tipo de enfermedad ósea y los síntomas de la enfermedad ósea.

El sujeto para la presente invención pueden ser vertebrados, tales como mamíferos y animales pertenecientes a la familia de las aves. Estos pueden incluir seres humanos, monos, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, vacas, cerdos, caballos, conejos, ovejas, cabras, gatos, perros, pollos, codornices y otros animales adecuados. De éstos, son particularmente adecuados los seres humanos y los animales domésticos y las aves. La sustancia de inhibición de la unión contenida en el agente de la presente invención es adecuada desde el punto de vista de obtener un sorprendente efecto de aceleración de la osteogénesis y un afecto de prevención y tratamiento de una enfermedad ósea cualquiera que sea el tipo de vertebrado derivado de la semaforina 4D y de la plexina B1 que provoque que la acción de inhibición de la unión coincida con el tipo de vertebrado que es un candidato para la administración del agente de la presente invención. Adicionalmente, un vertebrado derivado de la semaforina 4D y el tipo de vertebrado derivado de la plexina B1 pueden ser iguales o diferentes.

No hay ninguna restricción en particular sobre el tipo de enfermedad ósea que puede ser tratada usando la presente invención, siempre que sea una enfermedad ósea que tenga un factor que provoque una disminución en la osteogénesis o en una enfermedad ósea relacionada con una disminución en la osteogénesis. Sin embargo, las fracturas óseas, la insuficiencia ósea, la osteoporosis, la osteomalacia, la insuficiencia ósea, el dolor lumbar, la enfermedad ósea de Paget, la mielitis tónica, el reumatismo articular, la disosteogénesis y la artrosis deformante son, todas, unas candidatas adecuadas. De éstas, son particularmente adecuadas la osteoporosis, la osteomalacia, la osteopenia y la disosteogénesis.

El método de la presente invención es un método usado para la determinación de un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis en el que se determina si una sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1, y si la sustancia mencionada anteriormente en estudio es la sustancia mencionada anteriormente que inhibe la unión, se determina que la sustancia mencionada anteriormente en estudio es un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis. En el anteriormente mencionado método de determinación, las siguientes etapas (A) hasta (D) son un ejemplo adecuado del método usado para determinar si una sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1:

(A) una etapa en la que se ponen en contacto entre sí la semaforina 4D y la plexina Blare en presencia de la sustancia en estudio;
(B) una etapa en la que se mide el grado de unión entre la semaforina 4D y la plexina B1;
(C) una etapa en la que se compara el grado medido en la etapa (B) anterior con el grado cuando no está en presencia de la sustancia en estudio;
(D) una etapa en la que se determina que la sustancia en estudio es una sustancia que inhibe la unión entre la semaforina 4D y la plexina B1 cuando el grado medido en la etapa (B) anterior es menor que el grado cuando no está en presencia de la sustancia en estudio.

En el anteriormente mencionado método de determinación, puede usarse lo siguiente para medir el grado de unión: para la semaforina 4D, la región extracelular de la semaforina 4D marcada o la proteína de fusión de la región extracelular de la semaforina 4D y la región Fc de una inmunoglobulina, etc., y para la plexina B1, una célula que expresa la plexina B1 en su superficie. También puede usarse lo siguiente para medir el grado de unión: para la plexina B1, la región extracelular de la plexina B1 marcada o la proteína de fusión de la región extracelular de la plexina B1 y la región Fc de una inmunoglobulina, etc., y para la semaforina 4D, una célula que expresa la 4D en su superficie.

No hay ninguna restricción en particular sobre la sustancia en estudio en el método de determinación de la presente invención, y puede ser una sustancia que se ha predeterminado que tiene una actividad que inhibe la unión de la semaforina 4D y la plexina B1, y puede ser cualquier sustancia cuya actividad sea desconocida. También es posible usar simultáneamente múltiples sustancias en estudio. Cuando se usan simultáneamente múltiples sustancias en estudio, es posible usar simultáneamente sustancias individuales en estudio, cada una en una muestra individual, usar simultáneamente múltiples sustancias en estudio en una muestra individual, o usar simultáneamente múltiples muestras preparadas individualmente con múltiples sustancias en estudio. Cuando se usan simultáneamente múltiple sustancias en estudio en una única muestra, puede no ser posible determinar en una única prueba cuál de las sustancias en estudio inhibe la unión de la semaforina 4D y la plexina B1, pero es posible determinar cuál de las sustancias en estudio es un inhibidor de la unión realizando la prueba múltiples veces y estrechando las sustancias en estudio por etapas. El método de determinación de la presente invención está caracterizado por la búsqueda de sustancias en estudio para un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis, y el método puede usarse para cribar un candidato a principio activo para un agente de aceleración de la osteogénesis.

En el presente documento también se enseña (a) el uso de una sustancia de inhibición de la unión en la producción del agente preventivo y terapéutico del anteriormente mencionado agente de aceleración de la osteogénesis y enfermedades óseas; (b) una sustancia de inhibición de la unión para su uso como un agente de aceleración de la osteogénesis y en la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas; (c) un método de uso de la sustancia de inhibición de la unión para la aceleración de la osteogénesis y la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas; (d) un método para promover la osteogénesis mediante la administración de la sustancia de inhibición de la

unión; y (e) un método para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas mediante la administración de la sustancia de inhibición de la unión.

A continuación describiremos la presente invención con detalle con referencia a los ejemplos prácticos de la misma, sin embargo, no debe interpretarse en modo alguno que la presente invención está restringida a estos ejemplos prácticos.

Ejemplos prácticos 1

Análisis de los fenotipos de ratón y óseo

Produjimos los ratones Sema4d-/-, Plxnb1-/-, inactivados para la plexina B2 (Plxnb2-/-), CAT-RhoA DN y α 1 (I)-Cre según el método descrito en la bibliografía (W. Shi et al., Immunity 13, 633 (noviembre de 2000); R. H. Friedel et al., J Neurosci 27, 3921 (4 de abril de 2007); R. H. Friedel et al., Proc Natl Acad Sci USA 102, 13188 (13 de septiembre de 2006); K. Kobayashi et al., J. Neurosci 24, 3480 (7 de abril de 2004); R. Dacquin, M. Starbuck, T. Schinke; G. Karsenty, Dev Dyn 224, 245 (junio de 2002)]. Todos los ratones se retrocruzaron 8 veces o más con ratones C57BL/6. Todos los ratones se mantuvieron en un estado en el que no había hongos patógenos específicos. Todos los experimentos con animales fueron autorizados por el Animal Experiment Committee of the Tokyo Medical and Dental University, y cumplían con las directrices y las leyes relacionadas. El análisis del fenotipo óseo implicó el control respectivamente de los ratones alterados genéticamente de los ratones de la misma camada, y analizamos al menos 8 machos y 8 hembras. El análisis de micro CT tridimensional (μCT) y los análisis de medición histomorfológicos se llevaron a cabo según los métodos descritos en la bibliografía (K. Nishikawa et al., J Clin Invest 120, 3455 (1 de octubre de 2010); T. Koga et al., Nature 428, 758 (15 de abril de 2004).

Ratones con una médula ósea quimérica

Produjimos ratones con una médula ósea quimérica modificando en parte el método descrito en la bibliografía (B. Zhao et al., Nat Med 15, 1066 (septiembre de 2009). Esto significa que recogimos células de médula ósea de donante (C57BL6-Ly5, 2 acervos genéticos) de ratones naturales Sema 4d-/- de la misma camada. Inyectamos por vía intravenosa 2 x 106 células obtenidas a partir de cada donante en la vena caudal del ratón receptor natural (3 semanas de edad, C57BL/6-Ly5, 1 acervo genético) expuesto a una radiación letal, o de ratones Sema4d-/-. Ocho semanas después del trasplante de médula ósea, se alcanzó un elevado nivel de quimerismo de tipo donante (> 95 %).

Análisis en genochip

Llevamos a cabo un análisis en genochip según el método descrito en la bibliografía (K. Nishikawa et al., J Clin Invest 120, 3455 (1 de octubre de 2010)). Esto significa que después de llevar a cabo una síntesis de ADNc usando una transcripción inversa usando todo el ARN, sintetizamos el ARNc que había sido sometido a un marcaje biotinizado mediante una transcripción *in vitro.* Después de fragmentar el ARNc, llevamos a cabo una hibridación usando el A430 GeneChip de ratón (fabricado por Affymetrix) según el método descrito en la bibliografía (T. Koga et al., Nat Med 11, 880 (agosto de 2005); H. Takayanagi et al., Dev Cell 3, 889 (diciembre de 2002).

Inducción de la diferenciación de los osteoblastos *in vitro*

La inducción de la diferenciación de los osteoblastos y de los osteoclastos *in vitro* se llevó a cabo según el método descrito en el documento (T. Koga et al., Nat Med II, 880 (agosto de 2005); y H. Takayanagi et al., Dev Cell 3, 889 (diciembre de 2002). Esto significa que llevamos a cabo una inducción de la diferenciación llevando a cabo el cultivo de células derivadas de la bóveda craneal en un medio de cultivo de osteogénesis (50 μM de ácido ascórbico, 10 nM de dextrasona y 10 mM de β-glicerofosfato) y la inducción de la diferenciación se confirmó mediante un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) (después de 7 días) y un análisis de la osteonodosidad (21 días después, tinción con rojo de alizarina). Se añadieron Fc-sema4D, anticuerpos anti-Semar4D y anticuerpos anti-plexina BA (anticuerpos anti-Plexina B1) cada 3 días. Se recuperó el sobrenadante de los osteoclastos a partir de cada solución de cultivo de las células naturales y de las Sema4d-/- después de estimular el ligando activado por el receptor del factor intranuclear κB (RANKL; fabricado por Peprotech). Cultivamos los osteoclastos cultivados en una placa de código de colágeno (fabricada por IWAKI) y los recuperamos usando tripsina dos días después de la estimulación con el RANKL. El sobrenadante de los osteoclastos se usó como un medio de cultivo de osteogénesis que contiene el reactivo mencionado anteriormente, y lo añadimos a los osteoclastos cultivados (1 x 150 células/pocillo, placa de 24 pocillos) cada 3 días.

Análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se llevó a cabo una RR-PCR cuantitativa en tiempo real según los protocolos del producto usando un dispositivo ciclador ligero (fabricado por Roche) y SYBR Green (fabricado por Toyobo). Usamos con los siguientes cebadores.

Plxnb1 sentido: 5'-tgggtcatgtgcagtacgat-3' (número de secuencia 5),

Plxnb1 antisentido: 5'-cactgctctccaggttctcc-3' (número de secuencia 6),
Plxnb2 sentido: 5'-aggggagcctctctacaagc-3' (número de secuencia 7),
Plxnb2 antisentido: 5'-tcgatcccttcatcctgaac-3' (número de secuencia 8),
Plnxb3 sentido: 5'-atatgctgagcgtgccttct-3' (número de secuencia 9),
Plnxb3 antisentido: 5'-tgctgttgagcaaattggag-3' (número de secuencia 10),
CD72 sentido: 5'-gccttctcctgtcctgtctg-3' (número de secuencia 11),
CD72 antisentido: 5'-cctcctggaactgctgagac-3' (número de secuencia 12),
Alpl sentido: 5'-aacccagacacaagcattcc-3' (número de secuencia 13)
Alpl antisentido: 5'-gcctttgaggtttttggtca-3' (número de secuencia 14)
Bglap sentido: 5'-gcgctctgtctctctgacct-3' (número de secuencia 15),
Bglap antisentido: 5'-accttattgccctcctgctt-3' (número de secuencia 16),
Colla1 sentido: 5'-gagcggagagtactggatcg-3' (número de secuencia 17),
Coll11 antisentido: 5'-gttcgggctgatgtaccagt-3' (número de secuencia 18)
Gapdh sentido: 5'-acccagaaagactgtggatgg-3' (número de secuencia 19),

Introducción genética de adenovirus y retrovirus

El método de producción del vector adenovírico portador del tipo de configuración activo (CA) de RhoA (Myc-V14Rho) y Racl (hRacl V12) y el tipo negativo dominante (DN) de RhoA (Myc-N19Rho) y Racl (hRacl V12), y el método de introducción de estos, se llevaron a cabo según el método descrito en la bibliografía (Bito, H. et al. A Critical Role for a Rho-Associated Kinase, p160ROCK, in Determining Axon Outgrowth in Mammalian CNS Neurons, Neuron 26, 431-441 (2000). La producción del vector retrovírico (pMXs-Plexin-B1-EGFP, pMXs-Plexin-B1 RA-EGFP y pMXs-Plexin-B1 DPDS-EGFP en el que se manifestaba el mutante [Plexin-B1 DPDZ-EGFP]) en el que no pudo activarse la activación de la [Plexin-B1 RA] y de la RhoA, se llevó a cabo insertando el fragmento de ADNc respectivamente de la Plexina B1, la Plexina B1 RA (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, Science 305, 862 (6 de agosto de 2004) y la Plexina B1 DPDZ (V. Perrot, J. Vazquez-Prado, J. S. Gutkind, J Biol Chem 277, 43115 (8 de noviembre de 2002)) en pMXs-IRES-EGFP. La producción de un retrovirus recombinante se llevó a cabo según el método descrito en la bibliografía (S. Morita, T. Kojima, T. Kitamura, Gene Ther 7, 1063 (junio de 2000). Esto significa que llevamos a cabo un empaquetamiento del retrovirus mediante la introducción del vector retrovírico producido en las células Plat-E.

Procesado de los anticuerpos anti-Sema4D para la disminución en la cantidad de hueso inducida por la OVX

La producción de un modelo de ratón de osteoporosis inducida por una OVX (ovariotomía) se llevó a cabo según el método descrito en la bibliografía (M. Shinohara et al., J. Bio Chem 282, 17640 (15 de junio de 2007). Esto significa que llevamos a cabo una operación de extracción de los ovarios o una pseudooperación en ratones hembra de 7 semanas de edad. Con este modelo de ratón llevamos a cabo pruebas con más de 6 ratones en cada grupo. Validamos esto usando el método indicado a continuación para averiguar si había o no un efecto preventivo sobre la disminución en la cantidad de hueso. Esto significa que inyectamos por vía intravenosa 20 µg de los anticuerpos Sema4D (fabricados por MBL) o una solución salina en la vena caudal una vez por semana. Sacrificamos todos los ratones 8 semanas después de la cirugía y realizamos un análisis de µCT y un análisis de osteomorfogénesis. También llevamos a cabo la validación usando el siguiente método, para estudiar si había o no un efecto de aceleración sobre la cantidad de hueso que había disminuido. Esto significa que después de 6 semanas inyectamos por vía intravenosa 20 µg de los anticuerpos anti-Sema4D (fabricados por MBL) en la vena caudal durante 3 semanas cada 3 días en ratones OVX. Sacrificamos todos los ratones 9 semanas después de la operación y los usamos para un análisis de µCT.

Análisis de inmunotransferencia, análisis de precipitación y tinción inmunofluorescente

Cultivamos células de la bóveda craneal durante dos días en un medio de cultivo de osteogénesis (50 µM de ácido ascórbico, 10 nM de dexametasona y 10 mM de β-glicerofosfato) y después las estimulamos con Fc-Sema4D. Usamos IgG humana purificada (parte Fc) (fabricada por Beckman Coulter) para el control nativo para el análisis de la precipitación (tiempo 0). Recogimos las células en el punto indicado y llevamos a cabo un análisis de inmunotransferencia o un análisis de precipitación usando anticuerpos anti-Plexina B1 (clon A-8, fabricado por Santa Cruz); anticuerpos anti-PDZ-RhoGEF (policlonales, fabricados por Protein Express); anticuerpos anti-LARG (policlonales, fabricados por Lifespan Biosciences); anticuerpos anti-fosfo-Akt (Thr308) (policlonales, fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-Akt (policlonales, fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-fosfor ERK (Thr202/Tyr204) (policlonales, fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-ERK (policlonal, fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-Met (clon 25H2) (fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-ErbB2 (clon 29D8) (fabricados por Cell Signaling); anticuerpos anti-Rac1 (clon 102/Rac1) (fabricados por BD Transduction Laboratories); anticuerpos anti-RhoA (clon 55/Rho) (fabricados por BD Transduction Laboratories); anticuerpos anti-cadherina-11 (policlonales, fabricados por Invitrogen); anticuerpos anti-IRS1 (clon 53-10C-31) (fabricados por Millipore); y anticuerpos anti-b-actina (clon AC40) (fabricados por Sigma-Aldrich). La fosforilación de la plexina B1, la Met, la ErbB2 y el IRS1 fueron detectados con anticuerpos anti-fosfotirosina (4G10, fabricados por Upstate) después de una inmunoprecipitación usando respectivamente anticuerpos específicos para estos. Incubamos el producto celular disuelto con Fc-sema4D (500 ng) que se unió a microesferas de proteína A-agarosa con objeto de detectar la

plexina B1 que se unía a la semaforina 4D, y se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-Plexina B1. La detección de la activación de la GTPasa se llevó a cabo según la descripción de la bibliografía (M. Shinohara et al., J Bio Chem 282, 17640 (15 de junio de 2007). Esto significa que tratamos las células de la bóveda craneal con Fc-sema4D y las recogimos en el punto en el que se mostraron. Incubamos el producto celular disuelto con GST-RBD (usando RhoA) o GST-PAK1 (usando Rac1) (2 µg) que se unían a la sefarosa de glutatión, y llevamos a cabo un análisis de inmunotransferencia usando respectivamente anticuerpos anti-RhoA o anticuerpos anti-Rac1. Fijamos las células con paraformaldehído al 4 % para la tinción inmunofluorescente, llevamos a cabo un procesado de penetración y después las teñimos usando anticuerpos secundarios marcados con Alex Fluor 488 y faloidina conjugada con rodamina (fabricada por Molecular Probes).

Citometría de flujo

Teñimos una única solución de células flotantes usando anticuerpos monoclonales conjugados con 8 tipos de pigmentos fluorescentes [anticuerpos anti-CD45. 2 conjugados con PerCP.Cy5.5; anticuerpos anti-CD45.2 (clon 104) conjugados con FITC; anticuerpos anti-CD11b (clon M1/70) conjugados con eFLuor450; anticuerpos anti-CD105 (clon MJ7/18) conjugados con PE; anticuerpos anti-CD10 (clon 4.29E+02) conjugados con Alex Fluor 647; (anticuerpos anti-CD44 conjugados con APC-Alexa Fluor 750; anticuerpos anti-Cd 44 (clon IM7) conjugados con AC-Cy7; y anticuerpos anti-Sca-1 (clon D7) (fabricados por eBioscience) conjugados con APC con objeto de analizar las células derivadas de médula ósea y las células de la bóveda craneal. Después llevamos a cabo una citometría de flujo usando FACSCant II usando el programa informático Diva (fabricado por BD Biosciences).

Análisis de la proliferación celular

Cultivamos células intersticiales derivadas de médula ósea en un medio de cultivo en condiciones de osteogénesis y analizamos el índice de proliferación celular antes de la diferenciación de los osteoblastos (Día 0) o en el proceso de diferenciación de los osteoblastos (Día 14) usando una estimulación con semaforina 4D usando Fc de IgG humana parcial o usando un kit de proliferación celular ELISA (fabricado por Roche) en presencia de Fc-Semar4D y detectamos la incorporación de 5-bromo-2’ desoxiuridina (BrdU).

Análisis de la unidad formadora de colonias (UFC)

Colocamos en placas células de médula ósea a 3 x 106 células por pocillo individual en una placa de 24 pocillos. Después cultivamos esto durante 3 días usando un medio de cultivo α-MEM que contiene un 10 % de suero bovino fetal y después los sustituimos por medio de cultivo en condiciones de osteogénesis. La unidad formadora de colonias-fosfatasa alcalina (UFC-ALP) fue detectada en forma de una colonia positiva para la ALP el día 7, y la UFC-osteoblasto (UFC-Ob) fue detectada en forma de una colonia positiva para el rojo de alizarina el día 21. El número de colonias agregadas (UFC-fibroblastos (UFC-F)) fue detectado mediante una tinción con azul de toluidina el día 7 y el día 21.

Análisis estadístico

Todos los datos se indican como la media ± EEM (n = 15). El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de Student ANOVA, y cuando fue posible, la prueba de Bonferroni (*p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005; n. s., no significativo). Los resultados están indicados en el ejemplo representativo de 4 o más experimentos individuales.

Resultados

Llevamos a cabo un cribado amplio del genoma del ARNm en los osteoclastos y los osteoblastos usando un análisis con GeneChip para estudiar si la semaforina, la efrina, la slits y la netrina, que son moléculas de guiado axónico, contribuyen o no al remodelado del hueso. Esto significa que después de analizar 20 tipos de semaforina, 16 tipos de efrina, 6 tipos de slits y 6 tipos de netrina, se confirmó una manifestación extremadamente alta de la semaforina 4D en los osteoclastos. Sin embargo, esta manifestación no fue confirmada en los osteoblastos. Estos resultados indican que la semaforina 4D tenía una manifestación inducida selectivamente en el proceso de formación de los osteoclastos.

Llevamos a cabo un análisis funcional del sistema esquelético usando ratones Sema4d-/- para estudiar la función de la semaforina 4D con una manifestación inducida selectivamente en el proceso de formación de los osteoclastos. Se demostró que la cantidad de hueso (Figura 1) y el ancho trabecular (Figura 2) en los ratones Sema4d-/- había aumentado significativamente en comparación con los ratones naturales (ratones WT) usando un µ*CT* y un análisis de osteomorfogénesis. El área superficial de la osteogénesis en los ratones Sema4d-/- (Figura 3, a la izquierda), el área superficial del hueso calcificado (Figura 3, en el centro) y el índice de osteogénesis (Figura 3, a la derecha) aumentó notablemente en comparación con los ratones naturales. Sin embargo, no se produjeron cambios en los parámetros (las áreas superficiales de los osteoclastos (Figura 4, a la izquierda), el número de osteoclastos (Figura 4, en el centro) y el área superficial del hueso corroído (Figura 4, a la derecha), lo que indica una resorción ósea de los osteoclastos. También observamos que la formación de los osteoclastos *in vitro* en las células Sema4d-/- era normal. A pesar del hecho de que la semaforina 4D se manifestaba específicamente en los osteoclastos, estos

resultados sugieren que el fenotipo de una elevada densidad ósea en los ratones Sema4d-/- aumentó debido a la osteogénesis a través de los osteoblastos.

Llevamos a cabo un injerto de células inmunitarias adoptadas usando células de médula ósea que incluían células precursoras de osteoclastos, para averiguar si el fenotipo óseo de los ratones Sema4d-/- se basaba o no en anomalías en el sistema de células de la médula ósea. Como resultado, la cantidad de hueso aumentó cuando se injertaron las células de médula ósea deficientes en Sema4d en los ratones naturales en comparación con cuando se injertaron las células de médula ósea naturales (véanse las dos gráficas de la izquierda de la Figura 5). Sin embargo, cuando se injertaron células de médula ósea del tipo normal en ratones Sema4d-/-, la cantidad de hueso disminuyó y volvió a la normalidad en comparación con cuando se injertaron células de médula ósea deficientes en Sema4d (véanse las dos gráficas de la derecha de la Figura5). Tomando como base estos resultados, se indicaba que el fenotipo óseo en los ratones Sema4d-/- era tal que era la causa de las anomalías en las células del sistema hematopoyético que comprenden los osteoclastos. Adicionalmente, no se confirmó un aumento definido en los osteonodos de las células de la bóveda craneal Sem4d-/- en la osteonodosidad de las células de la bóveda craneal Sema4d-/-. Estos resultados sugieren que la semaforina 4D que se manifiesta en los osteoclastos funciona como un factor de remodelado óseo que inhibe la osteogénesis a través de los osteoblastos.

Produjimos Fc-sema4D (I. Ishida et al., Int Immunol 15, 1027 (agosto de 2003) para estudiar con detalle el efecto de inhibición de la semaforina 4D sobre los osteoblastos. Después añadimos la Fc-sema4D a las células de la bóveda craneal que habían sido cultivadas en condiciones de osteogénesis. La adición de la Fc-sema4D inhibió la activación dependiente de la concentración de la ALP y la manifestación de la osteocalcina [Bglap] y del colágeno de tipo I [Colla1]). Estos resultados indican que la osteonodosidad esta inhibida como resultado de la inducción por parte de la Sema4D de la diferenciación de los osteoblastos. También cultivamos las células de la bóveda craneal en presencia del sobrenadante del cultivo de los osteoclastos o en presencia de los osteoblastos para ver si la semafore 4D derivada de los osteoclastos contribuía o no a la regulación de la osteogénesis. En el cultivo conjunto con el sobrenadante del cultivo de los osteoclastos de tipo natural o con los osteoclastos, no se produjo ningún efecto sobre la osteonodosidad, mientras que en el cultivo conjunto con el sobrenadante del cultivo de los osteoclastos Sema4d-/- o en el cultivo conjunto con los osteoclastos, la osteonodosidad estaba claramente acelerada. Tomando como base estos resultados, indican que los osteoclastos son inhibidores de la osteogénesis a través de la semaforina 4D producida en forma de soluble, al menos parcialmente. También debe destacarse que uno o más factores están contenidos en el sobrenadante de los osteoclastos. Se cree que el efecto de aceleración de la osteogénesis provocado por estos factores es revelado en su totalidad cuando no está presente la semaforina 4D.

Analizamos (a) la manifestación de la plexina de tipo B, que es bien conocida como el receptor de la semaforina D, en células no linfáticas y en células linfáticas, y (b) el ARN de CD72 (K. Suzuki, A. Kumanogoh, H. Kikutani, Nat Immunol 9, 17 (enero de 2008) usando una RT-PCR cuantitativa en tiempo real, con objeto de especificar el receptor de la semaforina 4D en el que se manifiestan los osteoblastos. Como resultado, la cantidad de plexina B1 manifestada aumentó notablemente durante la diferenciación de los osteoblastos (Figura 7). Sin embargo, la cantidad de plexina B2 manifestada era más bien baja, y no había prácticamente ninguna manifestación de plexina B3 y CD 72 (Figura 7). Después de llevar a cabo un análisis de precipitación usando Fc-sema 4D, se indicó que la semaforina 4D interactuaba con la plexina B1 (Figura 8). También se indicó que la Fc-sema 4D induce la fosforilación de la plexina B1. Es bien conocido que cuando la semaforina 4D se une a la plexina B1, se forma un conjugado con la cinasa de tirosina ErbB2 y la ErbB2 se autofosforila y la plexina B1 es dependiente de la semaforina B4. En la osteogénesis, después de la inhibición de la activación de la cinasa ErbB2, la fosforilación disminuye dependiente de la estimulación por parte de la semaforina 4D de la plexina B1. Tomando como base estos resultados, se sugiere que la plexina B1 actúa como el principal receptor para la semaforina 4D en los osteoblastos. Entonces analizamos el fenotipo óseo de los ratones Plxb1-/-. Al igual que en los ratones Sema4d-/-, la cantidad de hueso (Figura 9) y el ancho de la trabécula (Figura 10) de los ratones Plxnb1-/- aumentó notablemente en comparación con los ratones naturales debido a un aumento en la osteogénesis de los osteoblastos. El área superficial de los osteoblastos en los ratones Plxnb1-/- (Figura 11), el área superficial de hueso calcificado (Figura 12) y el índice de osteogénesis (Figura 13) también aumentaron respectivamente en comparación con los ratones naturales. Sin embargo, no se produjo ningún cambio en los parámetros (área superficial de los osteoclastos, y recuento de las células de osteoclastos y corrosión del área de la superficie ósea), lo que indica una resorción ósea en los osteoclastos. Tomando como base estos resultados, se sugiere que el fenotipo de elevada densidad ósea de los ratones Plxnb1-/-, al igual que el fenotipo de elevada densidad ósea de los ratones Sema4d-/-, está causado por un aumento en la osteogénesis provocado por los osteoblastos. No se confirmó ningún efecto de estimulación sobre la osteonodosidad por parte de los osteoblastos por los osteoclastos Sema4d-/- naturales con los osteoclastos Sem4d-/-. Por lo tanto, esto sugiere que la plexina B1 reconoce la osteogénesis fundamentalmente a través de la semaforina 4D.

¿Cómo se transforma la semaforina 4D-plexina B1 en las señales de inhibición en los osteoblastos? Es bien conocido que el sistema semaforina-plexina regula la osteomorfogénesis y las células errantes mediante la regulación de la reordenación de la actina de la célula ósea. También es bien conocido que cuando la semaforina 4D se combina con la plexina B2, la actividad de la RhoA es estimulada en presencia de la cinasa de tirosina ErbB2, mientras que la semaforina 4D tiene un acción contraria en presencia de otra cinasa de tirosina Met (J. M. Swiercz,

T. Worzfeld, S. Offermanns, J Bio Chem 283, 1893 (25 de enero de 2008). Por lo tanto, estudiamos la posibilidad de que la semaforina 4D activara la RhoA. Cuando analizamos la cantidad de ErbB2 y de Met manifestada en la osteogénesis, se sugirió que la EbrB2 se manifestaba en unas cantidades considerablemente mayores que la Met. Aunque la estimulación por parte de la semaforina 4D inducía la fosforilación de la ErbB2, no se inducía la fosforilación de la Met. Adicionalmente, basándonos en un análisis de inmunotransferencia y en un análisis de la precipitación, la semaforina 4D aumentó el tipo de activación de combinación de la GTP para la RhoA y está indicado que esta actividad es inhibida particularmente por parte de las células Plxnb1-/0. Sin embargo, la actividad de la Racl, que es otra familia de Rho, no afectó a la estimulación de la semaforina 4D. Coincidiendo con estos resultados, cuando introdujimos la RhoA de tipo activación estructurada usando un adenovirus, la osteonodosidad en las células de la bóveda craneal fue inhibida, mientras que cuando se introdujo una RhoA negativa dominante, la osteonodosidad se aceleró. Sin embargo, la Racl de tipo activación estructurada y la Rac1 negativa dominante no afectaron a la osteogénesis. Tomando como base estos resultados, se sugiere que la RhoA media selectivamente en el efecto de inhibición de la osteogénesis por parte de la semaforina 4D plexina B1. La plexina B1 tiene dos dominios de regulación de la RhoGTPasa, es decir, un dominio de proteína activada por GTPasa (GAP) y un dominio de unión a PDZ que se une a RhoGEF (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, Science 305, 862 (6 de agosto de 2004), J. M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, S. Offermanns, Neuron 35, 51 (3 de julio de, 2002), V. Perrot, J. Vázquez-Prado, J. S. Gutkind, J Bio Chem 277, 43115 (8 de noviembre de 2002), M. H. Driessens, C. Olivo, K. Nagata, M. Inagaki, J. G. Collard, FEBS Lett 529, 168 (9 de octubre de 2002). Tomando como base el análisis de precipitación y el análisis de inmunotransferencia, se indicó que PDZ-RhoGEF y LARG (la RhoGEF asociada a la leucemia), que se conocen como RhoGEG, se unían a la plexina B1 incluso en los osteoblastos. Por lo tanto, el anteriormente mencionado dominio GAP y el dominio de unión a PDZ produjeron dos tipos de mutantes de la plexina B1 (la Plexina B1-Δ PDZ y la Plexina B1 · RA) para determinar si la osteoporosis era inhibida significativamente (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, Science 305, 862 (6 de agosto de 2004) (Figura 14). Después de usar los dos tipos de mutantes de la plexina B1 y la plexina B1 natural (WT Plexina B1) respectivamente, para producir células de la bóveda craneal Plxnb1-/- con un exceso de manifestación, estimulamos éstas usando Fc-sema 4D y evaluamos el efecto de inhibición de la diferenciación de los osteoblastos. El efecto de inhibición de la Fc-Sema4d, indicado en la manifestación del ARNm de los marcadores de los osteoblastos (Alpl, Bglap y Col1a1), se recuperó en el exceso de manifestación de la WT-Plexina B1 y de la Plexina B1-RA, sin embargo, no se recuperó en el exceso de manifestación de la Plexina B1- Δ PDZ. Estos resultados sugieren que la RhoA media en la inhibición de la osteogénesis específicamente por parte de la semaforina 4D.

Cruzamos ratones transgénicos CAT-RHoA DN (K. Kobayashi et al., J. Neurosci 24, 3480 (7 de abril de 2004) y ratones transgénicos colágeno α 1 (I)-Cre (R. Dacquin, M. Starbuck, T. Schinke, G. Karsenty, Dev. Dyn 224, 245 (junio de 2002)) y produjimos ratones en los que se manifestaba específicamente la RhoA negativa dominante (RhoA DNOB) en los osteoblastos, para estudiar el papel de la RhoA en los osteoblastos *in vivo.* La cantidad de hueso (Figura 15) y el ancho de la trabécula (Figura 16) de los ratones RhoA DNOB aumentaron en comparación con los ratones naturales cuando la osteogénesis era acelerada por parte de los osteoblastos. Además, el área superficial de los osteoblastos (Figura 17) de los ratones RhoA DNOB, el área superficial del hueso (Figura 18) que se había calcificado y el índice de osteogénesis (Figura 19) aumentaron notablemente en comparación con los ratones naturales, sin embargo, no había ningún cambio en los parámetros que indicaban la resorción ósea de los osteoclastos (área superficial de los osteoclastos, número de osteoclastos y área superficial de hueso corroído). El fenotipo óseo era el mismo que el fenotipo óseo de los ratones Sema4d-/- y Plxbl-/-. Dado que la manifestación de la RhoA DNOB aumentó durante la diferenciación de los osteoblastos, la manifestación de la osteonodosidad y de los genes marcadores de los osteoblastos (Alpa, Bglap y Col1a1) aumentaron de forma notable en las células de la bóveda craneal procedentes de los ratones RhoA DNOB. La osteonodosidad que aumentó en las células RhoA DNOB no fue inhibida por la Fc-sema4d, por lo que se sugiere que la RhoA media en las señales de inhibición cascada abajo de la semaforina 4D-plexina B1.

Con objeto de estudiar si la inhibición de la función de la Sema4D era eficaz o no para la osteoporosis, llevamos a cabo una validación usando un modelo de ratón con osteoporosis postmenopáusico tratado con una OVX (ovariotomía). Esto significa que administramos por vía intravenosa los anticuerpos anti-Sema4D a ratones sobre una base semanal después del tratamiento de OVX y estudiamos si había un efecto preventivo sobre la disminución en la cantidad de hueso. Después de analizar el tejido óseo, la cantidad de hueso disminuyó cuando no se administraban los anticuerpos anti-Sema4d, mientras que cuando se administraban los anticuerpos anti-Sema4d, se confirmó una aceleración en la osteogénesis (un aumento en el área superficial del osteoblasto [Figura 20], en la cantidad de hueso [Figura 21] y en el índice de osteogénesis [Figura 22] y una disminución en los intervalos trabeculares [Figura 23]). Sin embargo, no se produjeron cambios a los parámetros que indican la resorción ósea de los osteoclastos (el número de osteoclastos y el área superficial de hueso corroído). Tomando como base estos resultados, cuando la función de la semaforina 4D era inhibida por el tratamiento con los anticuerpos anti-Sema 4D, se indicaba un efecto preventivo sobre la disminución en la cantidad de hueso en la osteoporosis. También estudiamos si la inhibición funcional de la semaforina 4D era eficaz o no incluso para el tratamiento de la cantidad de hueso que ya había disminuido. Esto significa que después del tratamiento de OVX, administramos los anticuerpos anti-Sema4d en la vena caudal durante tres semanas, tres veces por semana, 6 semanas después de que la cantidad de hueso hubiera disminuido. Los resultados del análisis de los parámetros que indican una osteogénesis (área superficial de osteoblastos, aumento en la cantidad de hueso, aumento en el índice de osteogénesis y disminución en los intervalos trabeculares) confirmó la aceleración de la osteogénesis (aumento en el área

superficial del osteoblasto [Figura 26], en la cantidad de hueso [Figura 27] y aumento en el índice de osteogénesis [Figura 28] y una reducción en los intervalos trabeculares [Figura 29]). Por lo tanto, resultó evidente que una vez que la cantidad de hueso había disminuido, volvía al mismo nivel que cuando se administraban los anticuerpos Sema4D sobre una base semanal después del anteriormente mencionado tratamiento de OVX. Esto significa que se volvió al mismo nivel que cuando se previno la disminución en la cantidad de hueso. Sin embargo, no se produjeron cambios en los parámetros que indican la resorción ósea de los osteoclastos (área superficial de hueso corroído). También estudiamos el efecto de la inhibición funcional de la semaforina 4D y de la plexina B1 sobre la osteonodosidad. Cuando se usaron osteoblastos de ratón y osteoclastos de ratones WT, la osteonodosidad se aceleraba en función de la concentración de anticuerpos anti-Sema 4D (placas 1 a 3 desde la izquierda en el panel superior de la Figura 24). Sin embargo, la osteonodosidad que era inhibida por la Fc-sema4d se aceleraba en función de la concentración de los anticuerpos anti-plexina B1 (panel inferior de la Figura 24). Tomando como base estos resultados, cuando la interacción semaforina 4D-plexina B1 es inhibida por un tratamiento con anticuerpos anti-Sema 4d o un tratamiento con anticuerpos anti-plexina B1, no solo se inhibe la disminución en la cantidad de hueso en la osteoporosis, sino que también se indica un efecto que promueve un aumento en la cantidad de hueso. También estudiamos el efecto de la inhibición funcional de la semaforina 4D en osteoblastos humanos sobre la osteonodosidad. Esto significa que cuando llevamos a cabo una validación usando osteoclastos que se habían diferenciado a partir de células CD 14 positivas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (Figura 25, fila inferior) y el sobrenadante del cultivo de las mismas (Figura 25, fila superior) y cuando las añadimos a los osteoclastos y al sobrenadante del cultivo de los mismos, y añadimos los anticuerpos anti-Sema4d a los osteoblastos, la osteonodosidad se aceleraba en función de la concentración de los anticuerpos anti-Sema 4d (Figura 25). Estos resultados indican que los resultados en el anteriormente mencionado modelo de ratón con osteoporosis postmenopáusico eran apoyados para las células humanas, y que la inhibición de la interacción semaforina 4D-plexina B1 es una nueva estrategia en la promoción de la osteogénesis.

Realizamos un análisis detallado de la acción de la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos por parte de la semaforina RD. Esto significa que cuando comparamos el número de células hematopoyéticas en la médula ósea (Sca-1+ CD105+ CD106+ CD44+ CD45, 2-CD11b) en los ratones Sema4d-/- con los ratones naturales mediante la realización de un análisis por citometría de flujo, no había diferencias. También llevamos a cabo un análisis de la proliferación celular, y aunque había un cierto aumento debido a la Sema4d previo la diferenciación de los osteoblastos (Día 0), no se produjo ningún cambio debido a la estimulación por parte de la semaforina 4D en el proceso de diferenciación de los osteoblastos (Día 14). Adicionalmente, basándonos en un análisis de UFC, la osteogénesis indicada en la manifestación de la ALP y la alizarina, era inhibida debido a la estimulación por parte de la semaforina 4D. Estos resultados sugieren que la semaforina 4D actúa en las etapas de diferenciación de los osteoblastos.

Se sabe que las señales del sustrato del receptor de la insulina (IRS) causadas por los factores de crecimiento insulinoides (IGF)-1 aceleran la diferenciación de los osteoblastos. Por lo tanto, estudiamos la fosforilación de la Akt y de la ERK con respecto a las señales del IRS con una estimulación con semaforina 4D, y el nivel de fosforilación disminuyó. La fosforilación de la Tyr, que es un indicador de la activación del IRS, también disminuyó. Estos resultados sugieren que la estimulación por parte de la semaforina 4D disminuye las señales del IRS. También está claro que la RhoA de tipo activado reduce la fosforilación de la Akt y de la ERK, y por el contrario Y-27632 y RKI, que son inhibidores de la RhoA, promueven esta fosforilación. También está claro que el inhibidor de la RhoA induce la promoción de la fosforilación de tipo activación en las señales del IRS. Estos resultados sugieren que la semaforina 4D induce una disminución en las señales del IRS mediante la activación de la RhoA, y que inhibe la diferenciación de los osteoblastos.

Sumario

Tomando como base los experimentos mencionados anteriormente, identificamos la semaforina 4D derivada de los osteoclastos como un mediador extremadamente importante para la transmisión entre osteoclastos y osteoblastos en la reconstrucción ósea. La reconstrucción ósea se lleva a cabo en ciclos formados por tres etapas (comenzando por una resorción ósea debida a los osteoclastos, una transición a una nueva osteogénesis debida a los osteoblastos y la finalización de una nueva síntesis de hueso (K. Matsuo, N. Irie, Arch Biochem Biofys 473, 201 (mayo de 2008). La semar4d que se manifiesta en los osteoclastos funciona hasta el momento en que se completa la resorción de los osteoclastos como un factor de inhibición de la osteogénesis en la fase inicial, en la que está inhibida la diferenciación de los osteoblastos. Adicionalmente, también se indica que la activación de la RhoA inhibe la osteogénesis de los osteoblastos *in vivo.* Se indica que la EfrinB2/EfB4, que contribuye a la fase de transición, también hace uso de la RhoA para regular la osteogénesis (C. Zhao et al., Cell Metab 4, 111 (agosto de 2006), lo que sugiere que la familia Rho-GTPasa molecular menor actúa como un coordinador para la transmisión individual en la reconstrucción ósea. Se ha indicado que la RhoA específica que contiene PDZ, GEFArfgef 12 (LARG) (J. M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, S. Offermanns, Neuron 35, 51 (3 de julio de 2002); V. Perrot, J. Vázquez-Prado, J. S. Gutkind, J Bio Chem 277, 43115 (8 de noviembre de 2002)) tiene una elevada manifestación en los osteoblastos en un análisis mediante GeneChip. Estos resultados respaldan la importancia de la vía de la semaforina 4D-plexina B1-RhoA. Adicionalmente, basándonos en el análisis usando una tinción inmunofluorescente, se ha observado una regulación por disminución para la cadherina 11 después de la estimulación con Fc-ema Rd, y se sugiere la contribución de la función de unión gap regulada. El tratamiento intermitente con hormonas paratiroideas (PTH) es el

único método eficaz que se ha demostrado que aumenta la osteogénesis. Los anticuerpos anti-Sost, que actualmente están en desarrollo, han atraído atención como un nuevo agente para la osteogénesis, mientras que puede esperarse que los factores dirigidos a los anticuerpos relacionados con la vía de la semaforina 4D-plexina B1-RhoA y los inhibidores y similares sean unos nuevos agentes terapéuticos para los pacientes con osteopenia.

Aplicación industrial

La presente invención puede usarse para efectuar una aceleración en la osteogénesis y en la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> National University Corporation Tokyo Medical and Dental University

<120> Agente para promover la osteogénesis

<130> P11-005P

<150> 2011-108642
<151> 13-05-2011

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 2217
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Inventor: Takayanagi, Hiroshi; Negishi, Takako

<400> 1

atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca 60

gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt gcacctggtg 120

cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180

accttgtaca taggtgcccg ggaggcggtc ttcgctgtga acgcactcaa catctccgag 240

aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaaatg tgcagaaaag 300

gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcgcc 360

acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta 420

acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaag gaagatgtcc ctttgaccca 480

gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtcgtataat 540

tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtcctct gaggacagaa 600

tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660

ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720

gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgatc ccacggatag caagagtgtg caagggggac 780

cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc ccgactcatc 840

tgctcccggc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900

tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gcactcttca ccccacagct gaacaacgtg 960

gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg 1020

aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc 1080

ccggtaccca agccgcggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140

accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccctttgatg 1200

gatgactcgg taaccccaat agacaacagg cccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260

acccagatcg tggtggaccg gacccaggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320

gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc 1380

atcgaggaga cccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct gctgtcttca 1440

aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtggtcca ggccccgctg 1500

gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga cccctactgc 1560

gcctggagcc cgcccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620

ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggcctcgtc tcctaagccc 1680

ctccctcctc ctggctcctc ttccctgtcc tgtctgggcc atgtggggga caggaggctt 1740

tcctctccct ggacccccctg gccagcctcg ggtgcggggc ccgacagcag ctcgagggtc 1800

tccttgctgc cgcccttcct gagtgaccag gcacagcacg tgcacgccct ggggaacttc 1860

tacctcttct gccaggccac aggtcctgca gacattcgct ttgtctggga gaagaatggg 1920

cgagctctgg agacctgtgt ccctgtgcag acccatgcac tgcccgatgg cagggcccat 1980

gcactcagct ggctgcagga cgccatcagg gaaagcgctg agtatcgctg ctctgtcctc 2040

tcctcagcag ggaacaagac ttcgaaggtg caggttgctg tgatgagacc tgaagtgacc 2100

caccaggaga ggtggaccag agagctctct gcctggaggg ctgtggctgg ggagcacgac 2160

cggatgatgc agagctggag gaaggcgtgg gaaagctgta gcaaggacac cctgtag 2217

<210> 2
<211> 738
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
1 5 10 15

Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
20 25 30

Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
35 40 45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
50 55 60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80

```
Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
                85                  90                  95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
            100                 105                 110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
        115                 120                 125

Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
    130                 135                 140

Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
145                 150                 155                 160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
            180                 185                 190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
        195                 200                 205

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro
    210                 215                 220

Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
225                 230                 235                 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val
                245                 250                 255

Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
            260                 265                 270

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu
        275                 280                 285

Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu
    290                 295                 300

Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
305                 310                 315                 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
                325                 330                 335
```

```
Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
            340                 345                 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly
        355                 360                 365

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
    370                 375                 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
385                 390                 395                 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
                405                 410                 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
            420                 425                 430

Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
        435                 440                 445

His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
    450                 455                 460

Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465                 470                 475                 480

Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
                485                 490                 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys
            500                 505                 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
        515                 520                 525

Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
    530                 535                 540

Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Ala Ser Ser Pro Lys Pro
545                 550                 555                 560

Leu Pro Pro Pro Gly Ser Ser Ser Leu Ser Cys Leu Gly His Val Gly
                565                 570                 575

Asp Arg Arg Leu Ser Ser Pro Trp Thr Pro Trp Pro Ala Ser Gly Ala
            580                 585                 590
```

```
Gly Pro Asp Ser Ser Ser Arg Val Ser Leu Leu Pro Pro Phe Leu Ser
        595                 600                 605

Asp Gln Ala Gln His Val His Ala Leu Gly Asn Phe Tyr Leu Phe Cys
    610                 615                 620

Gln Ala Thr Gly Pro Ala Asp Ile Arg Phe Val Trp Glu Lys Asn Gly
625                 630                 635                 640

Arg Ala Leu Glu Thr Cys Val Pro Val Gln Thr His Ala Leu Pro Asp
                645                 650                 655

Gly Arg Ala His Ala Leu Ser Trp Leu Gln Asp Ala Ile Arg Glu Ser
            660                 665                 670

Ala Glu Tyr Arg Cys Ser Val Leu Ser Ser Ala Gly Asn Lys Thr Ser
        675                 680                 685

Lys Val Gln Val Ala Val Met Arg Pro Glu Val Thr His Gln Glu Arg
    690                 695                 700

Trp Thr Arg Glu Leu Ser Ala Trp Arg Ala Val Ala Gly Glu His Asp
705                 710                 715                 720

Arg Met Met Gln Ser Trp Arg Lys Ala Trp Glu Ser Cys Ser Lys Asp
                725                 730                 735

Thr Leu
```

<210> 3
<211> 6408
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
atgcctgctc tgggcccagc tcttctccag gctctctggg ccgggtgggt cctcaccctc     60
cagccccttc caccaactgc attcactccc aatggcacgt atctgcagca cctggcaagg    120
gaccccacct caggcaccct ctacctgggg gctaccaact tcctgttcca gctgagccct    180
gggctgcagc tggaggccac agtgtccacc ggccctgtgc tagacagcag ggactgcctg    240
ccacctgtga tgcctgatga gtgcccccag gcccagccta ccaacaaccc gaatcagctg    300
ctcctggtga gcccaggggc cctggtggta tgcgggagcg tgcaccaggg ggtctgtgaa    360
cagcggcgcc tggggcagct cgagcagctg ctgctgcggc cagagcggcc tggggacaca    420
caatatgtgg ctgccaatga tcctgcggtc agcacggtgg ggctggtagc ccagggcttg    480
```

gcaggggagc ccctcctgtt tgtggggcga ggatacacca gcaggggtgt gggggggtggc 540

attccaccca tcacaacccg ggccctgtgg ccgcccgacc cccaagctgc cttctcctat 600

gaggagacag ccaagctggc agtgggccgc ctctccgagt acagccacca cttcgtgagt 660

gcctttgcac gtggggccag cgcctacttc ctgttcctgc ggcgggacct gcaggctcag 720

tctagagctt ttcgtgccta tgtatctcga gtgtgtctcc gggaccagca ctactactcc 780

tatgtggagt tgcctctggc ctgcgaaggt ggccgctacg ggctgatcca ggctgcagct 840

gtggccacgt ccagggaggt ggcgcatggg gaggtgctct ttgcagcttt ctcctcggct 900

gcacccccca ctgtgggccg gcccccatcg gcggctgctg gggcatctgg agcctctgcc 960

ctctgtgcct tccccctgga tgaggtggac cggcttgcta atcgcacgcg agatgcctgc 1020

tacacccggg agggtcgtgc tgaggatggg accgaggtgg cctacatcga gtatgatgtc 1080

aattctgact gtgcacagct gccagtggac accctggatg cttatccctg tggctcagac 1140

cacacgccca gccccatggc cagccgggtc ccgctggaag ccacaccaat tctggagtgg 1200

ccagggattc agctaacagc tgtggcagtc accatggaag atggacacac catcgctttc 1260

ctgggtgata gtcaagggca gctgcacagg gtctacttgg gcccagggag cgatggccac 1320

ccatactcca cacagagcat ccagcagggg tctgcagtga gcagagacct caccttttgat 1380

gggacctttg agcacctgta tgtcatgacc cagagcacac ttctgaaggt tcctgtggct 1440

tcctgtgctc agcacctgga ctgtgcatct tgccttgctc acagggaccc atactgtggg 1500

tggtgcgtgc tccttggcag gtgcagtcgc cgttctgagt gctcgagggg ccagggccca 1560

gagcagtggc tatggagctt ccagcctgag ctgggctgtc tgcaagtggc agccatgagt 1620

cctgccaaca tcagccgaga ggagacgagg gaggttttcc tatcagtgcc agacctgcca 1680

cccctgtggc caggggagtc atattcctgc cactttgggg aacatcagag tcctgccctg 1740

ctgactggtt ctggtgtgat gtgcccctcc ccagacccta gtgaggcccc agtgctgccg 1800

agaggagccg actacgtatc cgtgagcgtg gagctcagat ttggcgctgt tgtgatcgcc 1860

aaaacttccc tctctttcta tgactgtgtg gcggtcactg aactccgccc atctgcgcag 1920

tgccaggcct gtgtgagcag ccgctggggg tgtaactggt gtgtctggca gcacctgtgc 1980

acccacaagg cctcgtgtga tgctgggccc atggttgcaa gccatcagag cccgcttgtc 2040

tccccagacc ctcctgcaag aggtggaccc agcccctccc cacccacagc ccccaaagcc 2100

ctggccaccc ctgctcctga cacccttccc gtggagcctg gggctccctc cacagccaca 2160

gcttcggaca tctcacctgg ggctagtcct tccctgctca gcccctgggg gccatgggca 2220

ggttctggct ccatatcttc ccctggctcc acagggtcgc ctctccatga ggagccctcc 2280

cctcccagcc cccaaaatgg acctggaacc gctgtccctg cccccactga cttcagaccc 2340

tcagccacac ctgaggacct cttggcctcc ccgctgtcac cgtcagaggt agcagcagtg 2400

cccctgcag accctggccc cgaggctctt catcccacag tgcccctgga cctgcccct 2460

gccactgttc ctgccaccac tttcccaggg gccatgggct ccgtgaagcc cgccctggac 2520

tggctcacga gagaaggcgg cgagctgccc gaggcggacg agtggacggg gggtgacgca 2580

cccgccttct ccacttccac cctcctctca ggtgatggag actcagcaga gcttgagggc 2640

cctcccgccc ccctcatcct cccgtccagc ctcgactacc agtatgacac ccccgggctc 2700

tgggagctgg aagaggcgac cttgggggca agctcctgcc cctgtgtgga gagcgttcag 2760

ggctccacgt tgatgccggt ccatgtggag cgggaaatcc ggctgctagg caggaacctg 2820

cacctttcc aggatggccc aggagacaat gagtgtgtga tggagctgga gggcctcgag 2880

gtggtggttg aggcccgggt cgagtgtgag ccacctccag atacccagtg ccatgtcacc 2940

tgccagcagc accagctcag ctatgaggct ctgcagccgg agctccgtgt ggggctgttt 3000

ctgcgtcggg ccggccgtct gcgtgtggac agtgctgagg ggctgcatgt ggtactgtat 3060

gactgttccg tgggacatgg agactgcagc cgctgccaaa ctgccatgcc ccagtatggc 3120

tgtgtgtggt gtgaggggga gcgtccacgt tgtgtgaccc gggaggcctg tggtgaggct 3180

gaggctgtgg ccacccagtg cccagcgccc ctcatccact cggtggagcc actgactggg 3240

cctgtagacg gaggcacccg tgtcaccatc aggggctcca acctgggcca gcatgtgcag 3300

gatgtgctgg gcatggtcac ggtggctgga gtgccctgtg ctgtggatgc ccaggagtac 3360

gaggtctcca gcagcctcgt gtgcatcacc ggggccagtg gggaggaggt ggccggcgcc 3420

acagcggtgg aggtgccggg aagaggacgt ggtgtctcag aacacgactt tgcctaccag 3480

gatccgaagg tccattccat cttcccggcc cgcggcccca gagctggggg cacccgtctc 3540

accctgaatg gctccaagct cctgactggg cggctggagg acatccgagt ggtggttgga 3600

gaccagcctt gtcacttgct gccggagcag cagtcagaac aactgcggtg tgagaccagc 3660

ccacgcccca cgcctgccac gctccctgtg gctgtgtggt ttggggccac ggagcggagg 3720

cttcaacgcg gacagttcaa gtataccttg gaccccaaca tcacctctgc tggccccacc 3780

aagagcttcc tcagtggagg acgtgagata tgcgtccgtg gccagaatct ggacgtggta 3840

cagacgccaa gaatccgggt gaccgtggtc tcgagaatgc tgcagcccag ccaggggctt 3900

ggacggaggc gtcgcgtggt cccggagacg gcatgttccc ttggaccctc ctgcagtagc 3960

cagcaatttg aggagccgtg ccatgtcaac tcctcccagc tcatcacgtg ccgcacacct 4020

gccctcccag gcctgcctga ggacccctgg gtccgggtgg aatttatcct tgacaacctg 4080

gtctttgact ttgcaacact gaaccccaca cctttctcct atgaggccga ccccaccctg 4140

cagccactca accctgagga ccccaccatg ccattccggc acaagcctgg gagtgtgttc 4200

tccgtggagg gggagaacct ggaccttgca atgtccaagg aggaggtggt ggctatgata 4260

ggggatggcc cctgtgtggt gaagacgctg acgcggcacc acctgtactg cgagcccccc 4320

gtggagcagc ccctgccacg gcaccatgcc ctccgagagg cacctgactc tttgcctgag 4380

ttcacggtgc agatggggaa cttgcgcttc tccctgggtc acgtgcagta tgacggcgag 4440

agccctgggg cttttcctgt ggcagcccag gtgggcttgg gggtgggcac ctctcttctg 4500

gctctgggtg tcatcatcat tgtcctcatg tacaggagga agagcaagca ggccctgagg 4560

gactataaga aggttcagat ccagctggag aatctggaga gcagtgtgcg ggaccgctgc 4620

aagaaggaat tcacagacct catgactgag atgaccgatc tcaccagtga cctcctgggc 4680

agcggcatcc ccttcctcga ctacaaggtg tatgcggaga ggatcttctt ccctgggcac 4740

cgcgagtcgc ccttgcaccg ggacctgggt gtgcctgaga gcagacggcc cactgtggag 4800

caagggctgg ggcagctctc taacctgctc aacagcaagc tcttcctcac caagttcatc 4860

cacacgctgg agagccagcg caccttttca gctcgggacc gtgcctacgt ggcatctctg 4920

ctcaccgtgg cactgcatgg gaagcttgag tatttcactg acatcctccg cactctgctc 4980

agtgacctgg ttgcccagta tgtggccaag aaccccaagc tgatgctgcg caggacagag 5040

actgtggtgg agaagctgct caccaactgg atgtccatct gtctgtatac cttcgtgagg 5100

gactccgtag gggagcctct gtacatgctc tttcgaggga ttaagcacca agtggataag 5160

gggccagtgg acagtgtgac aggcaaggcc aaatacacct tgaacgacaa ccgcctgctc 5220

agagaggatg tggagtaccg tcccctgacc ttgaatgcac tattggctgt ggggcctggg 5280

gcaggagagg cccagggcgt gcccgtgaag gtcctagact gtgacaccat ctcccaggca 5340

aaggagaaga tgctggacca gctttataaa ggagtgcctc tcacccagcg gccagaccct 5400

cgcacccttg atgttgagtg gcggtctggg gtggccgggc acctcattct ttctgacgag 5460

gatgtcactt ctgaggtcca gggtctgtgg aggcgcctga acacactgca gcattacaag 5520

gtcccagatg gagcaactgt ggccctcgtc ccctgcctca ccaagcatgt gctccgggaa 5580

aaccaggatt atgtccctgg agagcggacc ccaatgctgg aggatgtaga tgaggggggc 5640

atccggccct ggcacctggt gaagccaagt gatgagccgg agccgcccag gcctcggagg 5700

ggcagccttc ggggcgggga gcgtgagcgc gccaaggcca tccctgagat ctacctgacc 5760

cgcctgctgt ccatgaaggg caccctgcag aagttcgtgg atgacctgtt ccaggtgatt 5820

ctcagcacca gccgccccgt gccgctcgct gtgaagtact tctttgacct gctggatgag 5880

caggcccagc agcatggcat ctccgaccag gacaccatcc acatctggaa gaccaacagc 5940

ttgcctctga ggttctggat caatataata aaaaacccgc agtttgtgtt cgacgtgcaa 6000

acatctgata acatggatgc ggtgctcctt gtcattgcac agaccttcat ggacgcctgc 6060

accctggccg accacaagct gggccgggac tccccgatca acaaacttct gtatgcacgg 6120

gacattcccc ggtacaagcg gatggtggaa aggtactatg cagacatcag acagactgtc 6180

ccagccagcg accaagagat gaactctgtc ctggctgaac tgtcctggaa ctactccgga 6240

gacctcgggg cgcgagtggc cctgcatgaa ctctacaagt acatcaacaa gtactatgac 6300

cagatcatca ctgccctgga ggaggatggc acggcccaga agatgcagct gggctatcgg 6360

ctccagcaga ttgcagctgc tgtggaaaac aaggtcacag atctatag 6408

<210> 4
<211> 2135
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Pro Ala Leu Gly Pro Ala Leu Leu Gln Ala Leu Trp Ala Gly Trp
1 5 10 15

Val Leu Thr Leu Gln Pro Leu Pro Pro Thr Ala Phe Thr Pro Asn Gly
20 25 30

Thr Tyr Leu Gln His Leu Ala Arg Asp Pro Thr Ser Gly Thr Leu Tyr
35 40 45

Leu Gly Ala Thr Asn Phe Leu Phe Gln Leu Ser Pro Gly Leu Gln Leu
50 55 60

Glu Ala Thr Val Ser Thr Gly Pro Val Leu Asp Ser Arg Asp Cys Leu
65 70 75 80

Pro Pro Val Met Pro Asp Glu Cys Pro Gln Ala Gln Pro Thr Asn Asn
85 90 95

Pro Asn Gln Leu Leu Leu Val Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Cys Gly
100 105 110

Ser Val His Gln Gly Val Cys Glu Gln Arg Arg Leu Gly Gln Leu Glu
115 120 125

Gln Leu Leu Leu Arg Pro Glu Arg Pro Gly Asp Thr Gln Tyr Val Ala
130 135 140

Ala Asn Asp Pro Ala Val Ser Thr Val Gly Leu Val Ala Gln Gly Leu
145 150 155 160

Ala Gly Glu Pro Leu Leu Phe Val Gly Arg Gly Tyr Thr Ser Arg Gly
165 170 175

Val Gly Gly Gly Ile Pro Pro Ile Thr Thr Arg Ala Leu Trp Pro Pro

180 185 190

Asp Pro Gln Ala Ala Phe Ser Tyr Glu Glu Thr Ala Lys Leu Ala Val
195 200 205

Gly Arg Leu Ser Glu Tyr Ser His His Phe Val Ser Ala Phe Ala Arg
210 215 220

Gly Ala Ser Ala Tyr Phe Leu Phe Leu Arg Arg Asp Leu Gln Ala Gln
225 230 235 240

Ser Arg Ala Phe Arg Ala Tyr Val Ser Arg Val Cys Leu Arg Asp Gln
245 250 255

His Tyr Tyr Ser Tyr Val Glu Leu Pro Leu Ala Cys Glu Gly Gly Arg
260 265 270

Tyr Gly Leu Ile Gln Ala Ala Ala Val Ala Thr Ser Arg Glu Val Ala
275 280 285

His Gly Glu Val Leu Phe Ala Ala Phe Ser Ser Ala Ala Pro Pro Thr
290 295 300

Val Gly Arg Pro Pro Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ala
305 310 315 320

Leu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Glu Val Asp Arg Leu Ala Asn Arg Thr
325 330 335

Arg Asp Ala Cys Tyr Thr Arg Glu Gly Arg Ala Glu Asp Gly Thr Glu
340 345 350

Val Ala Tyr Ile Glu Tyr Asp Val Asn Ser Asp Cys Ala Gln Leu Pro
355 360 365

Val Asp Thr Leu Asp Ala Tyr Pro Cys Gly Ser Asp His Thr Pro Ser
370 375 380

Pro Met Ala Ser Arg Val Pro Leu Glu Ala Thr Pro Ile Leu Glu Trp
385 390 395 400

Pro Gly Ile Gln Leu Thr Ala Val Ala Val Thr Met Glu Asp Gly His
405 410 415

Thr Ile Ala Phe Leu Gly Asp Ser Gln Gly Gln Leu His Arg Val Tyr
420 425 430

Leu Gly Pro Gly Ser Asp Gly His Pro Tyr Ser Thr Gln Ser Ile Gln
435 440 445

Gln Gly Ser Ala Val Ser Arg Asp Leu Thr Phe Asp Gly Thr Phe Glu
450 455 460

His Leu Tyr Val Met Thr Gln Ser Thr Leu Leu Lys Val Pro Val Ala
465 470 475 480

Ser Cys Ala Gln His Leu Asp Cys Ala Ser Cys Leu Ala His Arg Asp
485 490 495

Pro Tyr Cys Gly Trp Cys Val Leu Leu Gly Arg Cys Ser Arg Arg Ser
500 505 510

Glu Cys Ser Arg Gly Gln Gly Pro Glu Gln Trp Leu Trp Ser Phe Gln
515 520 525

Pro Glu Leu Gly Cys Leu Gln Val Ala Ala Met Ser Pro Ala Asn Ile
530 535 540

Ser Arg Glu Glu Thr Arg Glu Val Phe Leu Ser Val Pro Asp Leu Pro
545 550 555 560

Pro Leu Trp Pro Gly Glu Ser Tyr Ser Cys His Phe Gly Glu His Gln
565 570 575

Ser Pro Ala Leu Leu Thr Gly Ser Gly Val Met Cys Pro Ser Pro Asp
580 585 590

Pro Ser Glu Ala Pro Val Leu Pro Arg Gly Ala Asp Tyr Val Ser Val
595 600 605

Ser Val Glu Leu Arg Phe Gly Ala Val Val Ile Ala Lys Thr Ser Leu
610 615 620

Ser Phe Tyr Asp Cys Val Ala Val Thr Glu Leu Arg Pro Ser Ala Gln
625 630 635 640

Cys Gln Ala Cys Val Ser Ser Arg Trp Gly Cys Asn Trp Cys Val Trp
645 650 655

Gln His Leu Cys Thr His Lys Ala Ser Cys Asp Ala Gly Pro Met Val
660 665 670

Ala Ser His Gln Ser Pro Leu Val Ser Pro Asp Pro Pro Ala Arg Gly
675 680 685

```
Gly Pro Ser Pro Ser Pro Pro Thr Ala Pro Lys Ala Leu Ala Thr Pro
    690                 695                 700

Ala Pro Asp Thr Leu Pro Val Glu Pro Gly Ala Pro Ser Thr Ala Thr
705                 710                 715                 720

Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Leu Leu Ser Pro Trp
                725                 730                 735

Gly Pro Trp Ala Gly Ser Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Ser Thr Gly
            740                 745                 750

Ser Pro Leu His Glu Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Gln Asn Gly Pro
        755                 760                 765

Gly Thr Ala Val Pro Ala Pro Thr Asp Phe Arg Pro Ser Ala Thr Pro
    770                 775                 780

Glu Asp Leu Leu Ala Ser Pro Leu Ser Pro Ser Glu Val Ala Ala Val
785                 790                 795                 800

Pro Pro Ala Asp Pro Gly Pro Glu Ala Leu His Pro Thr Val Pro Leu
                805                 810                 815

Asp Leu Pro Pro Ala Thr Val Pro Ala Thr Thr Phe Pro Gly Ala Met
            820                 825                 830

Gly Ser Val Lys Pro Ala Leu Asp Trp Leu Thr Arg Glu Gly Gly Glu
        835                 840                 845

Leu Pro Glu Ala Asp Glu Trp Thr Gly Gly Asp Ala Pro Ala Phe Ser
    850                 855                 860

Thr Ser Thr Leu Leu Ser Gly Asp Gly Asp Ser Ala Glu Leu Glu Gly
865                 870                 875                 880

Pro Pro Ala Pro Leu Ile Leu Pro Ser Ser Leu Asp Tyr Gln Tyr Asp
                885                 890                 895

Thr Pro Gly Leu Trp Glu Leu Glu Glu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Ser
            900                 905                 910

Cys Pro Cys Val Glu Ser Val Gln Gly Ser Thr Leu Met Pro Val His
        915                 920                 925

Val Glu Arg Glu Ile Arg Leu Leu Gly Arg Asn Leu His Leu Phe Gln
    930                 935                 940
```

```
Asp Gly Pro Gly Asp Asn Glu Cys Val Met Glu Leu Glu Gly Leu Glu
945                 950                 955                 960

Val Val Val Glu Ala Arg Val Glu Cys Glu Pro Pro Pro Asp Thr Gln
                965                 970                 975

Cys His Val Thr Cys Gln Gln His Gln Leu Ser Tyr Glu Ala Leu Gln
            980                 985                 990

Pro Glu Leu Arg Val Gly Leu Phe  Leu Arg Arg Ala Gly  Arg Leu A
        995                 1000                1005

Val Asp  Ser Ala Glu Gly Leu  His Val Val Leu Tyr  Asp Cys Ser
    1010                1015                1020

Val Gly  His Gly Asp Cys Ser  Arg Cys Gln Thr Ala  Met Pro Gln
    1025                1030                1035

Tyr Gly  Cys Val Trp Cys Glu  Gly Glu Arg Pro Arg  Cys Val Thr
    1040                1045                1050

Arg Glu  Ala Cys Gly Glu Ala  Glu Ala Val Ala Thr  Gln Cys Pro
    1055                1060                1065

Ala Pro  Leu Ile His Ser Val  Glu Pro Leu Thr Gly  Pro Val Asp
    1070                1075                1080

Gly Gly  Thr Arg Val Thr Ile  Arg Gly Ser Asn Leu  Gly Gln His
    1085                1090                1095

Val Gln  Asp Val Leu Gly Met  Val Thr Val Ala Gly  Val Pro Cys
    1100                1105                1110

Ala Val  Asp Ala Gln Glu Tyr  Glu Val Ser Ser Ser  Leu Val Cys
    1115                1120                1125

Ile Thr  Gly Ala Ser Gly Glu  Glu Val Ala Gly Ala  Thr Ala Val
    1130                1135                1140

Glu Val  Pro Gly Arg Gly Arg  Gly Val Ser Glu His  Asp Phe Ala
    1145                1150                1155

Tyr Gln  Asp Pro Lys Val His  Ser Ile Phe Pro Ala  Arg Gly Pro
    1160                1165                1170

Arg Ala  Gly Gly Thr Arg Leu  Thr Leu Asn Gly Ser  Lys Leu Leu
```

1175 1180 1185

Thr Gly Arg Leu Glu Asp Ile Arg Val Val Val Gly Asp Gln Pro
1190 1195 1200

Cys His Leu Leu Pro Glu Gln Gln Ser Glu Gln Leu Arg Cys Glu
1205 1210 1215

Thr Ser Pro Arg Pro Thr Pro Ala Thr Leu Pro Val Ala Val Trp
1220 1225 1230

Phe Gly Ala Thr Glu Arg Arg Leu Gln Arg Gly Gln Phe Lys Tyr
1235 1240 1245

Thr Leu Asp Pro Asn Ile Thr Ser Ala Gly Pro Thr Lys Ser Phe
1250 1255 1260

Leu Ser Gly Gly Arg Glu Ile Cys Val Arg Gly Gln Asn Leu Asp
1265 1270 1275

Val Val Gln Thr Pro Arg Ile Arg Val Thr Val Val Ser Arg Met
1280 1285 1290

Leu Gln Pro Ser Gln Gly Leu Gly Arg Arg Arg Arg Val Val Pro
1295 1300 1305

Glu Thr Ala Cys Ser Leu Gly Pro Ser Cys Ser Ser Gln Gln Phe
1310 1315 1320

Glu Glu Pro Cys His Val Asn Ser Ser Gln Leu Ile Thr Cys Arg
1325 1330 1335

Thr Pro Ala Leu Pro Gly Leu Pro Glu Asp Pro Trp Val Arg Val
1340 1345 1350

Glu Phe Ile Leu Asp Asn Leu Val Phe Asp Phe Ala Thr Leu Asn
1355 1360 1365

Pro Thr Pro Phe Ser Tyr Glu Ala Asp Pro Thr Leu Gln Pro Leu
1370 1375 1380

Asn Pro Glu Asp Pro Thr Met Pro Phe Arg His Lys Pro Gly Ser
1385 1390 1395

Val Phe Ser Val Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Ala Met Ser Lys
1400 1405 1410

```
Glu Glu  Val Val Ala Met Ile  Gly Asp Gly Pro Cys  Val Val Lys
     1415                1420                1425

Thr Leu  Thr Arg His His Leu  Tyr Cys Glu Pro Pro  Val Glu Gln
     1430                1435                1440

Pro Leu  Pro Arg His His Ala  Leu Arg Glu Ala Pro  Asp Ser Leu
     1445                1450                1455

Pro Glu  Phe Thr Val Gln Met  Gly Asn Leu Arg Phe  Ser Leu Gly
     1460                1465                1470

His Val  Gln Tyr Asp Gly Glu  Ser Pro Gly Ala Phe  Pro Val Ala
     1475                1480                1485

Ala Gln  Val Gly Leu Gly Val  Gly Thr Ser Leu Leu  Ala Leu Gly
     1490                1495                1500

Val Ile  Ile Ile Val Leu Met  Tyr Arg Arg Lys Ser  Lys Gln Ala
     1505                1510                1515

Leu Arg  Asp Tyr Lys Lys Val  Gln Ile Gln Leu Glu  Asn Leu Glu
     1520                1525                1530

Ser Ser  Val Arg Asp Arg Cys  Lys Lys Glu Phe Thr  Asp Leu Met
     1535                1540                1545

Thr Glu  Met Thr Asp Leu Thr  Ser Asp Leu Leu Gly  Ser Gly Ile
     1550                1555                1560

Pro Phe  Leu Asp Tyr Lys Val  Tyr Ala Glu Arg Ile  Phe Phe Pro
     1565                1570                1575

Gly His  Arg Glu Ser Pro Leu  His Arg Asp Leu Gly  Val Pro Glu
     1580                1585                1590

Ser Arg  Arg Pro Thr Val Glu  Gln Gly Leu Gly Gln  Leu Ser Asn
     1595                1600                1605

Leu Leu  Asn Ser Lys Leu Phe  Leu Thr Lys Phe Ile  His Thr Leu
     1610                1615                1620

Glu Ser  Gln Arg Thr Phe Ser  Ala Arg Asp Arg Ala  Tyr Val Ala
     1625                1630                1635

Ser Leu  Leu Thr Val Ala Leu  His Gly Lys Leu Glu  Tyr Phe Thr
     1640                1645                1650
```

Asp Ile Leu Arg Thr Leu Leu Ser Asp Leu Val Ala Gln Tyr Val
1655 1660 1665

Ala Lys Asn Pro Lys Leu Met Leu Arg Arg Thr Glu Thr Val Val
1670 1675 1680

Glu Lys Leu Leu Thr Asn Trp Met Ser Ile Cys Leu Tyr Thr Phe
1685 1690 1695

Val Arg Asp Ser Val Gly Glu Pro Leu Tyr Met Leu Phe Arg Gly
1700 1705 1710

Ile Lys His Gln Val Asp Lys Gly Pro Val Asp Ser Val Thr Gly
1715 1720 1725

Lys Ala Lys Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Arg Leu Leu Arg Glu Asp
1730 1735 1740

Val Glu Tyr Arg Pro Leu Thr Leu Asn Ala Leu Leu Ala Val Gly
1745 1750 1755

Pro Gly Ala Gly Glu Ala Gln Gly Val Pro Val Lys Val Leu Asp
1760 1765 1770

Cys Asp Thr Ile Ser Gln Ala Lys Glu Lys Met Leu Asp Gln Leu
1775 1780 1785

Tyr Lys Gly Val Pro Leu Thr Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Leu
1790 1795 1800

Asp Val Glu Trp Arg Ser Gly Val Ala Gly His Leu Ile Leu Ser
1805 1810 1815

Asp Glu Asp Val Thr Ser Glu Val Gln Gly Leu Trp Arg Arg Leu
1820 1825 1830

Asn Thr Leu Gln His Tyr Lys Val Pro Asp Gly Ala Thr Val Ala
1835 1840 1845

Leu Val Pro Cys Leu Thr Lys His Val Leu Arg Glu Asn Gln Asp
1850 1855 1860

Tyr Val Pro Gly Glu Arg Thr Pro Met Leu Glu Asp Val Asp Glu
1865 1870 1875

Gly Gly Ile Arg Pro Trp His Leu Val Lys Pro Ser Asp Glu Pro
1880 1885 1890

```
Glu Pro  Pro Arg Pro Arg Arg  Gly Ser Leu Arg Gly  Gly Glu Arg
    1895                 1900                 1905

Glu Arg  Ala Lys Ala Ile Pro  Glu Ile Tyr Leu Thr  Arg Leu Leu
    1910                 1915                 1920

Ser Met  Lys Gly Thr Leu Gln  Lys Phe Val Asp Asp  Leu Phe Gln
    1925                 1930                 1935

Val Ile  Leu Ser Thr Ser Arg  Pro Val Pro Leu Ala  Val Lys Tyr
    1940                 1945                 1950

Phe Phe  Asp Leu Leu Asp Glu  Gln Ala Gln Gln His  Gly Ile Ser
    1955                 1960                 1965

Asp Gln  Asp Thr Ile His Ile  Trp Lys Thr Asn Ser  Leu Pro Leu
    1970                 1975                 1980

Arg Phe  Trp Ile Asn Ile Ile  Lys Asn Pro Gln Phe  Val Phe Asp
    1985                 1990                 1995

Val Gln  Thr Ser Asp Asn Met  Asp Ala Val Leu Leu  Val Ile Ala
    2000                 2005                 2010

Gln Thr  Phe Met Asp Ala Cys  Thr Leu Ala Asp His  Lys Leu Gly
    2015                 2020                 2025

Arg Asp  Ser Pro Ile Asn Lys  Leu Leu Tyr Ala Arg  Asp Ile Pro
    2030                 2035                 2040

Arg Tyr  Lys Arg Met Val Glu  Arg Tyr Tyr Ala Asp  Ile Arg Gln
    2045                 2050                 2055

Thr Val  Pro Ala Ser Asp Gln  Glu Met Asn Ser Val  Leu Ala Glu
    2060                 2065                 2070

Leu Ser  Trp Asn Tyr Ser Gly  Asp Leu Gly Ala Arg  Val Ala Leu
    2075                 2080                 2085

His Glu  Leu Tyr Lys Tyr Ile  Asn Lys Tyr Tyr Asp  Gln Ile Ile
    2090                 2095                 2100

Thr Ala  Leu Glu Glu Asp Gly  Thr Ala Gln Lys Met  Gln Leu Gly
    2105                 2110                 2115

Tyr Arg  Leu Gln Gln Ile Ala  Ala Ala Val Glu Asn  Lys Val Thr
```

2120 2125 2130

Asp Leu
2135

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnbl sentido

<400> 5
tgggtcatgt gcagtacgat 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnb1 antisentido

<400> 6

cactgctctc caggttctcc 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnb2 sentido

<400> 7

aggggagcct ctctacaagc 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnb2 antisentido

<400> 8

tcgatccctt catcctgaac 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnb3 sentido

<400> 9
atatgctgag cgtgccttct 20

<210> 10

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plxnb3 antisentido

<400> 10

tgctgttgag caaattggag 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CD72 sentido

<400> 11

gccttctcct gtcctgtctg 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CD72 antisentido

<400> 12

cctcctggaa ctgctgagac 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Alpl sentido

<400> 13

aacccagaca caagcattcc 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Alpl antisentido

<400> 14

gcctttgagg ttttggtca 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Bglap sentido

<400> 15

gcgctctgtc tctctgacct 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Bglap antisentido

<400> 16

accttattgc cctcctgctt 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Col1a1 sentido

<400> 17

gagcggagag tactggatcg 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Col1a1 antisentido

<400> 18

gttcgggctg atgtaccagt 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gapdh sentido

<400> 19

acccagaaga ctgtggatgg 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN

<213> Artificial
<220>
<223> Gapdh antisentido

<400> 20

cacattgggg gtaggaacac 20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-semaforina 4D o un fragmento funcional del mismo, o un anticuerpo anti-plexina B1 o un fragmento funcional del mismo, para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas en un sujeto.

2. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad ósea es una fractura ósea, una insuficiencia ósea, osteoporosis, osteomalacia, osteopenia, dolor lumbar, enfermedad ósea de Paget, mielitis tónica, reumatismo articular o artrosis deformante.

3. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo puede acelerar la osteogénesis y promover la diferenciación de los osteoblastos.

4. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sujeto es un mamífero.

5. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según la reivindicación 4, en el que el sujeto es un ser humano.

6. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo es monoclonal.

7. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento funcional del anticuerpo es un fragmento F(ab')2, un fragmento Fab', un fragmento Fab, un fragmento Fv, un fragmento FV unido por disulfuro, un fragmento FV de cadena única (scFV) o un polímero de uno o más de dichos fragmentos.

8. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano o un fragmento funcional del mismo.

9. El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo puede ser administrado por vía oral, mediante una administración vascular, mediante una administración intravenosa, mediante una administración muscular, mediante una administración hipodérmica, mediante una administración transdérmica, mediante una administración nasal o mediante una administración transpulmonar.

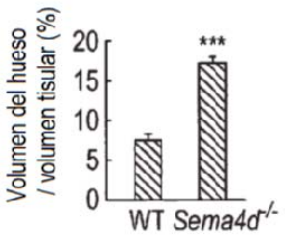

FIG. 1

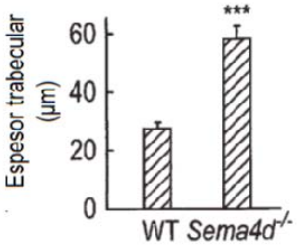

FIG. 2

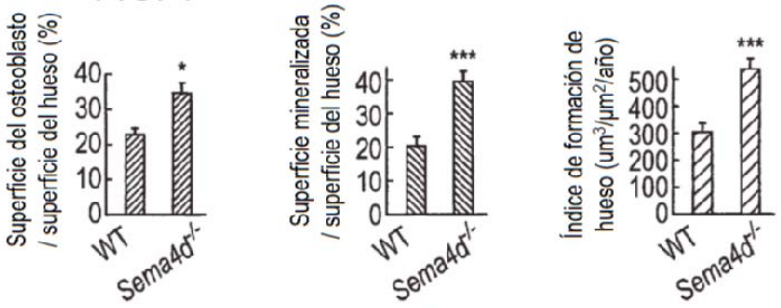

FIG. 3

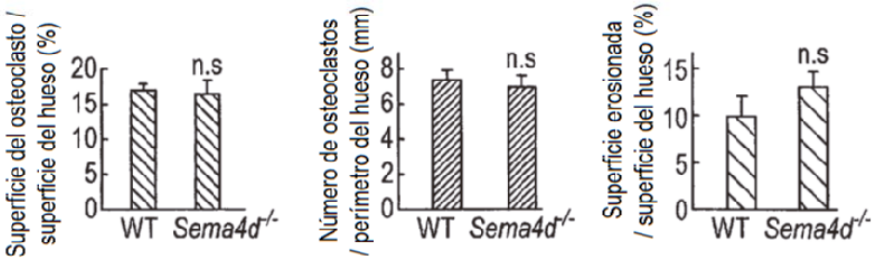

FIG. 4

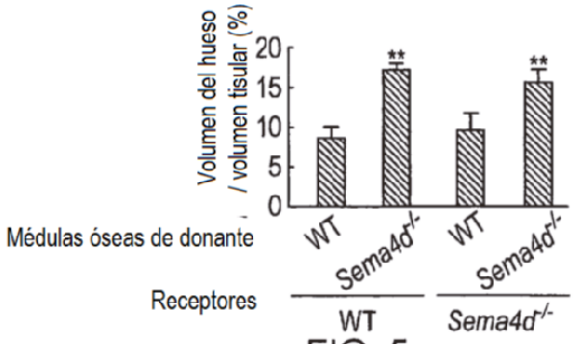

FIG. 5

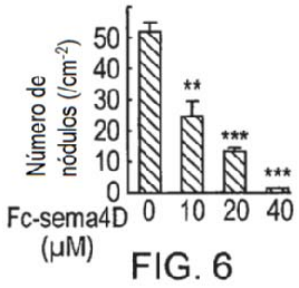

FIG. 6

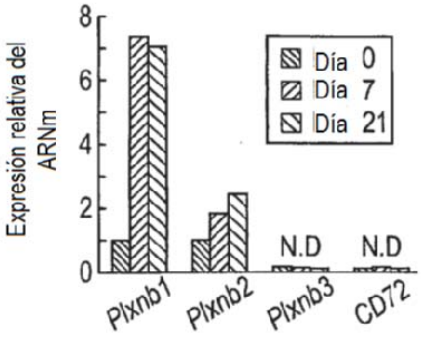

FIG. 7

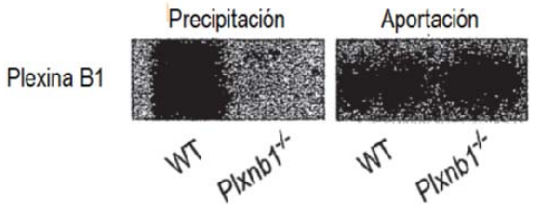

FIG. 8

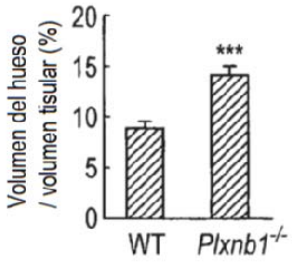

FIG. 9

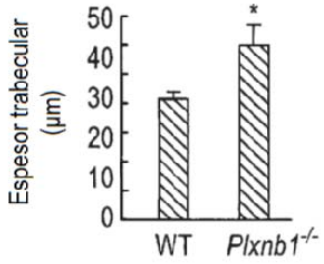

FIG. 10

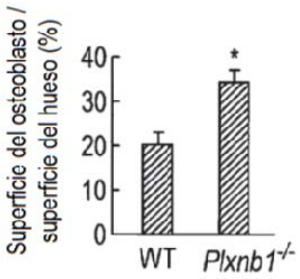

FIG. 11

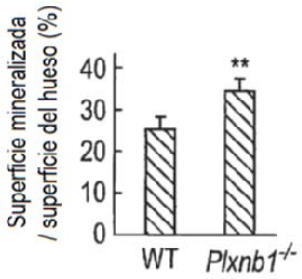

FIG. 12

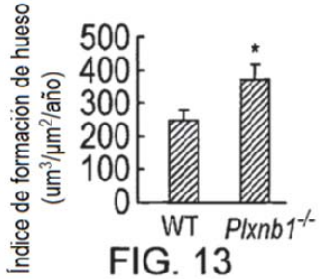

FIG. 13

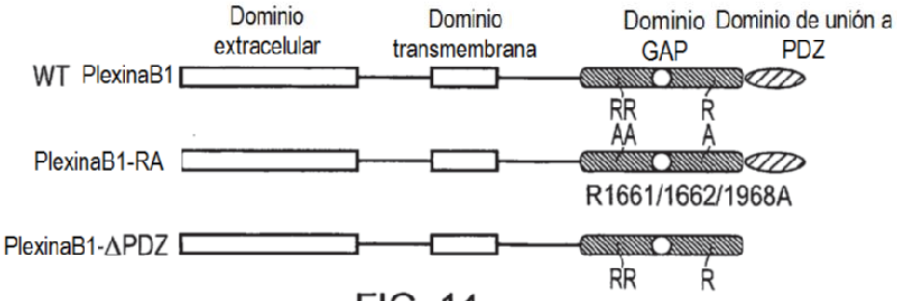

FIG. 14

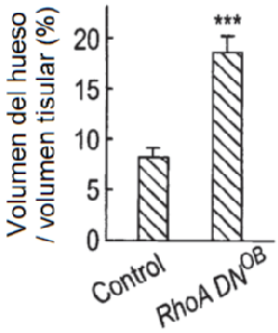

FIG. 15

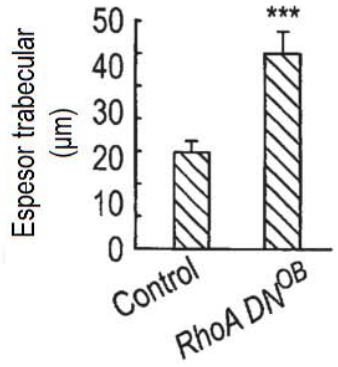

FIG. 16

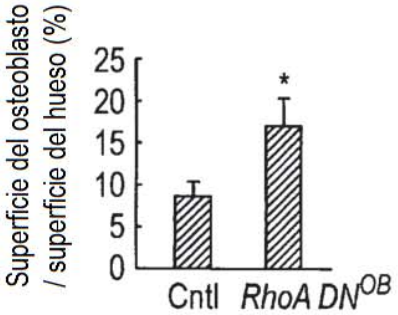

FIG. 17

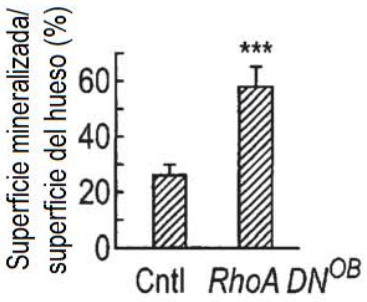

FIG. 18

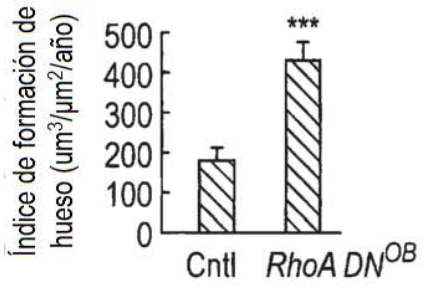

FIG. 19

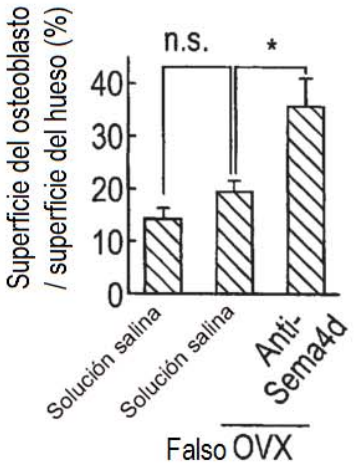

FIG. 20

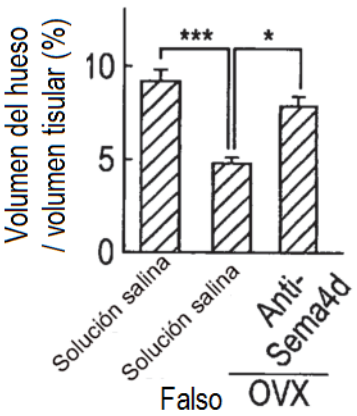

FIG. 21

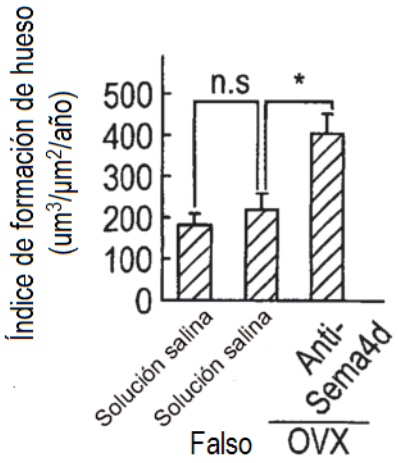

FIG. 22

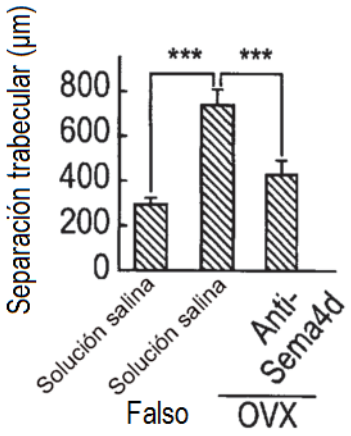

FIG. 23

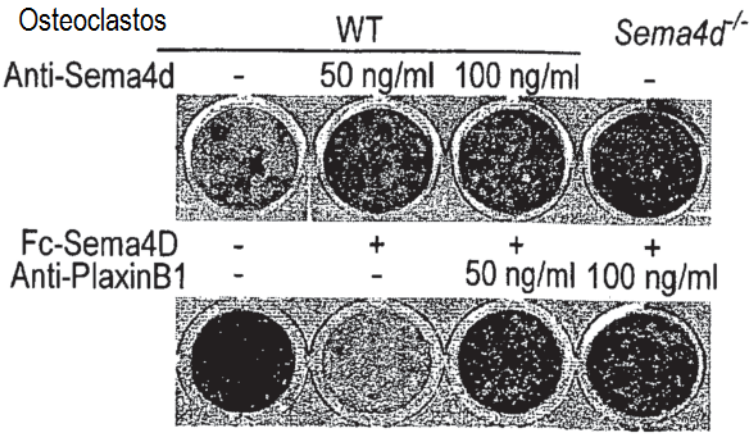

FIG. 24

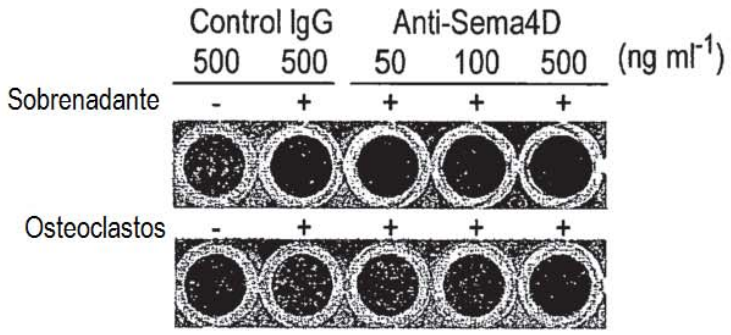

FIG. 25

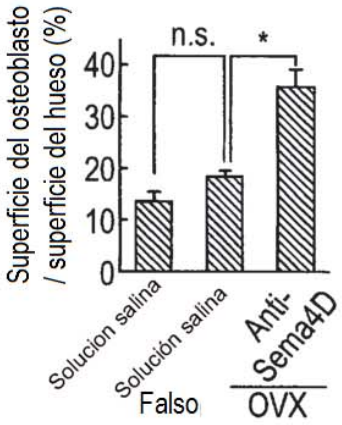

FIG. 26

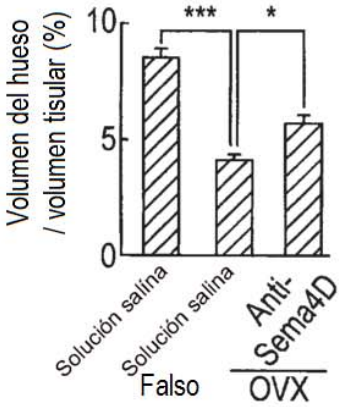

FIG. 27

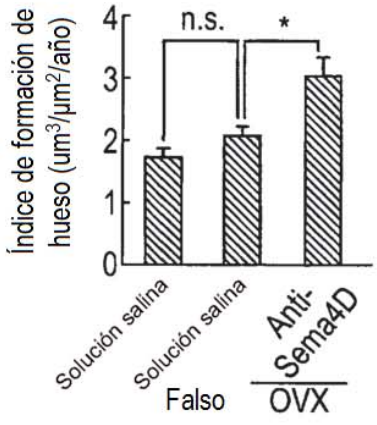

FIG. 28

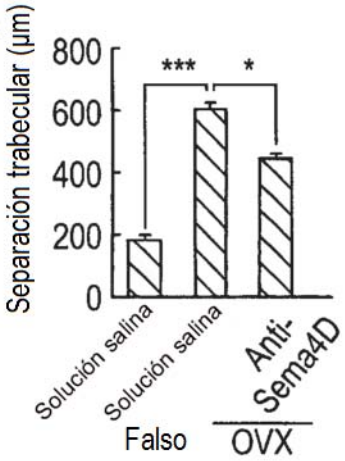
Separación trabecular (µm)
800
600
400
200
0
***
*
Solución salina
Solución salina
Anti-Sema4D
Falso
OVX

FIG. 29