

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 362**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/US2015/020412**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138874**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15762288 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3116521**

54 Título: **Regulación neurogénica del crecimiento óseo y degradación ósea**

30 Prioridad:

14.03.2014 US 201461953475 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2024

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
35 State Street
Albany NY 12207, US**

72 Inventor/es:

**MARGULIES, BRYAN, S. y
DEBOYACE, SEAN, D.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 989 362 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Regulación neurogénica del crecimiento óseo y degradación ósea

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad con respecto a la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/953.475, presentada el 14 de marzo de 2014.

Antecedentes de la técnica

- 10 La formación y degradación ósea están estrechamente reguladas por la señalización de factores de crecimiento entre los osteoblastos, que son responsables de la formación ósea, y los osteoclastos, que son responsables de la reabsorción ósea. El acoplamiento de la formación ósea por los osteoblastos con la degradación por los osteoclastos se ha convertido recientemente en un tema de estudio exhaustivo; con la ampliación de la lista de factores de crecimiento identificados como factores de acoplamiento. El acoplamiento de la formación ósea con la reabsorción
15 ósea requiere el reclutamiento de osteoblastos y osteoclastos en paralelo con el reclutamiento de sus respectivas células progenitoras. Los osteoblastos derivan de células madre mesenquimales (MSC), mientras que los osteoclastos derivan de monocitos que son parte del linaje mieloide; sin embargo, aún se desconoce cómo las MSC o los monocitos migran desde su nicho en la médula ósea a los sitios de formación de hueso nuevo. La comprensión actual de la regulación espacial y temporal de la osteogénesis propone que las MSC migran desde su nicho en la médula ósea a la superficie endóstica; donde las MSC se diferencian en osteoblastos que producen hueso nuevo. En paralelo, los monocitos también migran desde su nicho en la médula ósea a la superficie endóstica; donde posteriormente se diferencian en osteoclastos que reabsorben el hueso. Los factores de crecimiento que se sabe que regulan la formación ósea incluyen los ligandos de TGF β , de BMP y de Wnt canónicos. Si bien la formación de osteoclastos a partir de precursores de monocitos y la reabsorción ósea están reguladas a través de la expresión de MSCF, OPG y el ligando de RANK. En paralelo, la actividad de los osteoclastos también está regulada por la expresión de los ligandos de TGF β , de BMP y de Wnt no canónicos. Sin embargo, muchos factores de crecimiento y desarrollo intervienen en la formación de patrones tisulares, incluyendo los ligandos de TGF β , de BMP y de Wnt, y promueven la formación y reabsorción ósea. El mantenimiento de hueso sano requiere una remodelación constante, en la que el hueso se crea y se destruye continuamente. Los ligandos de netrína, RGM y slit se identificaron como factores de crecimiento que potencialmente podrían acoplar la formación y reabsorción ósea a través de la regulación de la diferenciación de células progenitoras dentro de la estructura tridimensional del hueso.

- La introducción de un implante en el hueso da lugar a una cascada bioquímica que produce a una respuesta proinflamatoria que está parcialmente mediada por los macrófagos, que se derivan del linaje mieloide y pueden contribuir a la degradación del hueso o de un material de implante. Actualmente, los implantes y los materiales de los implantes se seleccionan para minimizar la respuesta de los macrófagos y al mismo tiempo ser óptimamente osteoconductores y promover la máxima integración hueso-implante. Como alternativa, la introducción de un autógrafo con un implante o el uso de un injerto de tejido óseo desvitalizado se ha empleado junto con las propiedades materiales de un implante como medio para aumentar la osteointegración; sin embargo, estos enfoques a menudo han sido problemáticos. De forma ideal, podrían diseñarse materiales para que sean autoorganizables y autoensamblables.

- La generación de hueso como enfoque terapéutico adyuvante empleado durante procedimientos de traumatismos ortopédicos o durante procedimientos rutinarios de fusión de columna representa un desafío continuo en cirugía ortopédica. De manera específica, estas terapias adyuvantes generadoras de hueso buscan aumentar el crecimiento de hueso sano en el sitio de la intervención quirúrgica al mismo tiempo que disminuyen el tiempo de curación del hueso. En las últimas décadas se han realizado varios intentos de utilizar diversos factores de crecimiento con potencial osteogénico, incluyendo BMP. Desafortunadamente, las terapias basadas en BMP destinadas a generar hueso también conllevan un riesgo de tumorigénesis en pacientes que puedan estar recibiendo radioterapia o que posean un tumor naciente no detectado. Además, las terapias basadas en BMP no se pueden utilizar en pacientes con tumores activos, que es particularmente desafortunado ya que estos pacientes se beneficiarían significativamente de terapias que aumentan la formación ósea durante la intervención quirúrgica.

- La curación deficiente de fracturas continúa representando un desafío importante en la cirugía ortopédica y la curación ósea. Se han reportado tasas de fracturas sin unión de hasta un 5-20 %. La morbilidad y el coste asociados con el tratamiento de pacientes que desarrollan pseudoartrosis pueden ser sustanciales. Aproximadamente el 10 % de las 6,2 millones de fracturas que se producen cada año tienen dificultades para sanar. Existen varias opciones para ayudar a acelerar la curación ósea, con eficacia no probada. El injerto óseo de la cresta ilíaca sigue considerándose el modelo de referencia, pero presenta problemas importantes relacionados con la comorbilidad del sitio de extracción. Terapias basadas en factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la hormona paratiroidea (PTH) han demostrado un éxito inicial en estudios de cultivo celular; sin embargo, su eficacia aún no ha sido demostrada en la aplicación clínica. Una opción adicional, como la proteína morfogénica ósea-2 (BMP2) y la BMP7, se ha demostrado que tiene éxito en acelerar la curación de fracturas diafisarias. Sin embargo, existen riesgos asociados con el uso de BMP que incluyen aumento de infecciones, mayor riesgo de crecimiento tumoral y mayor riesgo de osteólisis local. Muchos de los riesgos asociados a los tratamientos que incluyen BMP también impiden el uso de BMP en pacientes con otras patologías.

La capacidad terapéutica para aumentar la formación ósea, como coadyuvante durante cirugía ortopédica, si bien no aumenta el potencial de crecimiento tumoral, actualmente supone una limitación de los productos biológicos disponibles comercialmente, en el tratamiento de problemas ortopédicos complejos como la fusión de columna, la curación de fracturas y el tratamiento de pseudoartrosis de fracturas.

En el campo de la traumatología ortopédica, particularmente en fracturas abiertas con grandes defectos y pseudoartrosis; los injertos óseos autólogos/allogénicos son las principales opciones de tratamiento. Sin embargo, el injerto óseo autógeno, utilizado como modelo de cicatrización o fusión, y su aplicación aumenta el coste del tratamiento. Otros sustitutos de injerto óseo allogénico no han demostrado una eficacia similar cuando se utilizan individualmente. Las mismas limitaciones existen para la cirugía de columna cuando se utilizan durante las fusiones.

El hueso cortical y esponjoso derivado de fuentes cadavéricas sirve para rellenar espacios y es principalmente osteoconductor sin potencial osteoinductivo significativo. Por tanto, se utilizan terapias biológicas como el PDGF, el VEGF y la BMP para aumentar los índices de cicatrización o fusión, y su aplicación aumenta el coste del tratamiento. Sin embargo, estas terapias biológicas estimulan la proliferación durante el desarrollo en una variedad de fenotipos celulares, lo que presenta un riesgo oncológico inherente e inaceptable.

La matriz ósea desmineralizada y los sustitutos de fosfato de calcio no han demostrado una alta eficacia para acelerar la curación ósea y también tienen costes asociados significativos debido a los costes de producción.

La BMP2 recombinante (rhBMP2) es un implante desarrollado comercialmente por Medtronic conocido como Infuse que se distribuye en pequeño (4,2 mg de BMP2 con 2 esponjas de colágeno para un implante de 15 mg/cm³), mediano (8,4 mg de BMP2 con 4 esponjas de colágeno para un implante de 15 mg/cm³), grande (12 mg de BMP2 con 6 esponjas de colágeno para un implante de 15 mg/cm³) y grande-II (12 mg de BMP2 con 1 esponja de colágeno para un implante de 15 mg/cm³). Todos los tamaños del implante Infuse están aprobados para aplicaciones en la columna y maxilofaciales, mientras que solo el implante grande-II está aprobado para fracturas. Infuse se administra reconstituyendo la BMP2 en polvo con solución salina estéril y a continuación añadiendo la solución salina de BMP2 a la esponja de colágeno; después de lo cual se coloca el implante localmente durante la intervención quirúrgica.

La BMP7 recombinante (rhBMP7 u OP1) es un implante desarrollado comercialmente por Stryker y ahora propiedad de Olympus, conocido como OP1. OP1 se distribuye como masilla OP1 (vial de 20 ml que contiene cartílago bovino en polvo y 3,3 mg de BMP7) o implante OP1 (1 g de cartílago bovino en polvo y 3,3 mg de BMP7). La masilla OP1 está aprobada para cirugías de fusión de columna, mientras que el implante OP1 está aprobado para el tratamiento de fracturas y cirugía de fracturas no unidas. La masilla OP1 o el implante OP1 se administran reconstituyendo la BMP7 en polvo con solución salina estéril y a continuación añadiendo la solución salina de BMP7 al implante de colágeno; después de lo cual se coloca el implante localmente durante la intervención quirúrgica.

Observaciones recientes durante el desarrollo neurológico han identificado una familia de proteínas y receptores poco relacionados que poseen propiedades atractivas y repulsivas. Los ligandos de netrina son una clase de cuatro proteínas secretadas (netrina-1, netrina-3, netrina-4 y netrina-5) que se unen a los receptores de DCC, neogenina y UNC5A-D. Las moléculas de guía repulsivas (RGMA y RGMb) son ligandos que se unen al receptor de neogenina y se ha identificado que antagonizan la señalización del ligando de netrina. Los ligandos de netrina se identificaron inicialmente en mamíferos como esenciales para la migración axonal comisural y pueden poseer la capacidad de regular la migración atractiva en el hueso. Los ligandos de slit (slit1, slit2 y slit3) y su receptor indirecto (ROBO1, ROBO2, ROBO3 y ROBO4) poseen la capacidad de regular la migración de células repulsivas en el hueso, ya que se ha demostrado que el eje de señalización de slit-ROBO regula la migración repulsiva de neuritas en el cerebro.

Los ligandos de netrina poseen sitios de unión a la laminina que actúan para secuestrar las proteínas del ligando de netrina en una matriz de colágeno y se consideran un elemento regulador importante de la función del ligando de netrina. Se ha demostrado que los ligandos de slit se unen al sulfato de heparán y la interacción entre el sulfato de heparán y el ligando de slit es necesaria para la función del ligando de slit; mientras que, el heparán unido al colágeno es importante para secuestrar los ligandos de slit.

El documento WO 2013/187730 A1, publicado el 19 de diciembre de 2013, describe una composición farmacéutica para prevenir o tratar fracturas u osteoporosis utilizando un sistema slit-robo.

El documento US 2011/002972 A1, publicado el 6 de enero de 2011, describe factores neuroendocrinos para el tratamiento de enfermedades degenerativas.

Wu, Qifang et al, PLOS ONE, vol. 7, n.º 9, publicado el 27 de septiembre de 2012, página e46307, describe las proteínas de la familia de moléculas de guía repulsivas (RGM) y su cinética de unión a las proteínas morfogenéticas óseas (BMP).

El documento US 2013/195863 A1, publicado el 1 de agosto de 2013, describe métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la densidad ósea.

Mediero, Journal of Bone and Mineral Research, vol. 28, publicado en 2013, páginas 2-3, describe la netrina-1 y su papel en la diferenciación de los osteoclastos.

5 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de un sitio de lesiones ortopédicas en el hueso o intervenciones quirúrgicas en el hueso, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en netrina-1 y netrina-4, y en donde dicho método comprende administrar al menos un polipéptido seleccionado del grupo.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la osteopetrosis, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en RGMa y RGMb, y la administración inhibe la formación ósea y aumenta la formación de osteoclastos.

Descripción de los dibujos

Figura 1: (A) La expresión del gen de NTN4 disminuyó en los osteoblastos, los adipocitos y los osteoclastos en relación con las MSC (* = $p < 0,026$), mientras que la expresión de NTN4 en adipocitos y osteoclastos disminuyó aún más en relación con los osteoblastos (# = $p < 0,002$). (B) La expresión del gen de neogenina aumentó en los osteoblastos en relación con las MSC (* = $p < 0,045$). Sin embargo, la expresión del gen de neogenina disminuyó en los adipocitos y los osteoclastos en relación con los osteoblastos (# = $p < 0,001$). (C) La expresión del gen de UNC5b aumentó en los osteoblastos en relación con las MSC (* = $p < 0,024$) mientras que en los adipocitos y los osteoclastos la expresión del gen de UNC5b disminuyó en relación con los osteoblastos (# = $p < 0,003$). (D) La expresión del gen de UNC5c aumentó en los osteoblastos (* = $p < 0,044$) y los adipocitos en relación con las MSC (* = $p < 0,007$). (E) La expresión del gen de NTNG1 aumentó en los osteoblastos frente a las MSC (* = $p < 0,0492$). (F) La expresión del gen de NGL1 aumentó en los osteoblastos en relación con las MSC (* = $p < 0,008$) mientras que la expresión del gen de NGL1 disminuyó en los adipocitos y los osteoclastos en relación con los osteoblastos (# = $p < 0,043$). (G) La expresión del gen de NGL2 disminuyó en los osteoblastos en relación con las MSC (* = $p < 0,03$). (H) Tras la adición de medios osteogénicos a los cultivos de MSC, tanto la expresión del gen de ALP (* = $p < 0,007$) como la del gen de OCN (* = $p < 0,008$) aumentaron. (I) La adición de medios adipogénicos a los cultivos de MSC produjo un aumento de la expresión de los genes de PPAR γ (* = $p < 0,05$), FABP4 (* = $p < 0,026$) y perilipina (* = $p < 0,001$). (J) En cultivos de osteoclastos identificamos la expresión del gen de CD14, cathepsina K (CTSK) y TRAP.

Figura 2: (A) Se añadieron NTN1 y NTN4 con medios de osteoinducción a MSC cultivadas. NTN1 y NTN4 aumentaron la formación mineral (tinción roja) en MSC más allá de los efectos observados cuando se añadieron 25 ng de BMP2/7 o medios de osteoinducción. (B) Se observó que las MSC cultivadas para convertirse en osteoblastos (OB) tenían una expresión reducida de la proteína NTN4. (C) Los fragmentos de neogenina de longitud completa y de γ -secretasa aumentaron en lisados derivados de MSC inducidos a convertirse en osteoblastos (OB) (2 x pacientes, H1 y H2). (D) Las células tumorales de osteosarcoma SaOS2 se transfectaron con ARNhc de neogenina o GFP. Las células SaOS2 con ARNhc de neogenina expresaron menos neogenina. Los lisados de proteínas derivados de cerebro de ratón (mB) sirvieron como controles en paralelo con el control de carga de actina. (E y F) La expresión del gen de ID1 disminuyó un 63,4 % (* = $p < 0,001$) mientras que la expresión del gen de ID2 disminuyó un 42,3 % (* = $p < 0,039$) en las células SaOS2 deficientes en neogenina en relación con las células de control. (G) La expresión del gen de SMAD1 también disminuyó un 36,6 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina (* = $p < 0,04$) frente a los controles. (H) La expresión del gen de SMAD5 disminuyó un 44,3 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina (* = $p < 0,037$) frente a los controles GFP y los controles no transfectados. (I) También medimos que el inhibidor SMAD6 disminuyó un 66,3 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina (* = $p < 0,0007$) en relación con los controles. (J) Las células SaOS2 inducidas a producir mineral óseo se cultivaron en concentraciones decrecientes de suero (10 %, 5 % y 2,5 %). No se observó ningún efecto significativo en la acumulación de minerales (tinción roja) en las células SaOS2 de control con GFP y de control no transfectadas; sin embargo, se observó una disminución dependiente de la dosis en la formación de minerales en las células SaOS2 deficientes en neogenina frente a los controles. El tratamiento con BMP2/7 (25 ng) pudo restaurar parcialmente la formación mineral.

Figura 3: (A) La adición de NTN1 produjo disminuciones significativas en el número de adipocitos (* = $p < 0,008$) mientras que (B) NTN4 también produjo una disminución en el número de adipocitos (* = $p < 0,001$). 3 (C, D y E) La adición de NTN1 produjo una disminución significativa en el número de osteoclastos (* = $p < 0,0003$) y NTN4 produjo una disminución profunda en el número de osteoclastos (* = $p < 0,0001$).

Figura 4: La tinción de TRAP (rojo) disminuyó en los defectos de los ratones de control (A y D) correspondiente a una disminución del número de osteoclastos en las tibias tratadas con NTN1 (B y E) y NTN4 (C y F). (2x) La tinción de OTC (verde) para la formación de hueso dentro del defecto solo se observó alrededor de la periferia del defecto en los ratones de control (G) mientras que en los ratones tratados con NTN1 (H) y NTN4 (I) la tinción de OTC fue robusta en todo el defecto. (20x)

Figura 5: Imágenes μ CT sagitales y axiales (profundidad de vóxel de 12 μ m) del defecto unicortical de ratones control

(A y D) y tratados con NTN1 (B y E) y NTN4 (C y F). Los defectos fueron cualitativamente más pequeños en los ratones tratados con NTN1 y NTN4 en comparación con los ratones de control tratados con PBS. (G) En comparación con los defectos tratados con PBS, el tratamiento con NTN1 (* = $p < 0,0003$) o NTN4 (* = $p < 0,0001$) aumentó la cantidad de hueso dentro de los defectos unicorticales (Bv/Tv). (H) Los cambios en la masa ósea (Bv/Tv) se correspondieron con un mayor número trabecular (Tb.N) después del tratamiento con NTN1 (* = $p < 0,006$) o NTN4 (* = $p < 0,04$). (I) El espesor trabecular (Tb.Th) aumentó en paralelo con el número trabecular después del tratamiento con NTN1 (* = $p < 0,023$) o NTN4 (* = $p < 0,011$). (J) En consonancia con la disminución cualitativa observada en el defecto, también se observó que el diámetro medido del defecto disminuía después del tratamiento con NTN1 (* = $p < 0,009$) o NTN4 (* = $p < 0,001$).

Figura 6: (A) La expresión del gen de neogenina aumentó aproximadamente dos veces en cultivos de osteoblastos (*, $p < 0,028$) en comparación con las MSC mientras que la expresión de neogenina disminuyó en cultivos de adipocitos y osteoclastos (#, $p < 0,016$) en comparación con los osteoblastos. (B) La expresión del gen de RGMa aumentó en ambos osteoblastos (*, $p < 0,005$) y adipocitos (*, $p < 0,0001$) en comparación con los cultivos de MSC. La expresión del gen de RGMa también aumentó en los adipocitos en comparación con los osteoblastos y osteoclastos (#, $p < 0,0001$). La expresión de RGMa se suprimió aún más en los osteoclastos en comparación con los osteoblastos (X, $p < 0,014$). (C) La expresión del gen de RGMb disminuyó en cultivos de osteoblastos (*, $p < 0,0035$), adipocitos (*, $p < 0,0005$) y osteoclastos (*, $p < 0,0035$) en relación con los cultivos de MSC. (D) La expresión de los genes de la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OCN) está asociada con la osteogénesis. La expresión del gen de ALP aumentó en los osteoblastos (*, $p < 0,0012$) mientras que la expresión del gen de OCN también aumentó significativamente (*, $p < 0,049$). (E) Se analizó el regulador transcripcional PPARg en paralelo con los marcadores funcionales proteína de unión a ácidos grasos-4 (FABP4) y perilipina en cultivos de adipocitos. La expresión génica de PPARg (*, $p < 0,0018$), FABP4: $p < 0,005$) y perilipina (*, $p < 0,0018$) aumentó significativamente en los cultivos de adipocitos derivados de MSC. (F) Se midió la expresión de los genes de los marcadores de linaje mieloide CD14, catepsina K (CTSK) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) en cultivos de osteoclastos.

Figura 7: (A) La expresión de la proteína RGMa de longitud completa derivada de lisados de proteínas aumentó en los osteoblastos (OB) frente a las MSC. La fracción soluble escindida de RGMa no se modificó después de la osteogénesis. Los lisados de cerebro de ratón (mB) sirvieron como controles de expresión positiva y la actina sirvió como control de carga. (B) La expresión de RGMb disminuyó en los lisados de proteínas derivados de osteoblastos (OB) en comparación con las MSC. Los lisados de cerebro de ratón (mB) sirvieron como controles de expresión positiva y la vinculina sirvió como control de carga. (C) Dosis seriadas de ligando de RGMa (1, 10 o 100 ng) produjeron un aumento débil y dependiente de la dosis en la formación de minerales (tinción roja), mientras que el ligando de RGMb no alteró la formación de minerales. El ligando de BMP2/7 (25 ng) se añadió a los cultivos de MSC inducidos a convertirse en osteoblastos como control positivo.

Figura 8: (A) El ligando de RGMa aumentó significativamente el número de adipocitos después de la adición de las dosis de 1 ng (*, $p < 0,0002$), 10 ng (*, $p < 0,0004$) y 100 ng (*, $p < 0,0002$). (B) El ligando de RGMb también produjo aumentos significativos en el número de adipocitos después de añadir las dosis de 1 ng (*, $p < 0,0037$), 10 ng (*, $p < 0,0002$) y 100 ng (*, $p < 0,0037$). (C, D y E) La adición de 100 ng de ligando de RGMa (*, $p < 0,002$) o ligando de RGMb (*, $p < 0,007$) aumentó el número de osteoclastos en el cultivo.

Figura 9: (A, B y C) Los defectos unicorticales se escanearon utilizando μ CT (resolución de vóxel de 12 μ m) y a continuación se analizaron. (D) El volumen óseo corregido por el volumen total (Bv/Tv) disminuyó significativamente en los defectos tratados con 100 ng del ligando de RGMa (*, $p < 0,033$) o 100 ng del ligando de RGMb (*, $p < 0,012$). (E) El número trabecular (TbN) disminuyó, pero solo significativamente para los defectos tratados con el ligando de RGMb (*, $p < 0,01$). (F) El espesor trabecular (TbTh) también disminuyó en los defectos tratados con ligandos de RGMa (*, $p < 0,014$) o ligandos de RGMb (*, $p < 0,012$). (G) No se observó ningún cambio en el diámetro de los defectos debido al tratamiento con ligandos de RGM.

Figura 10: La tinción de TRAP de los defectos demostró que se observaron muy pocos osteoclastos (tinción roja) en los defectos de control tratados con PBS (A-I). Aunque se observaron osteoclastos alrededor de los defectos de control. En cambio, se observó un mayor número de osteoclastos (tinción roja) dentro de los defectos tratados con los ligandos de RGMa o RGMb (H e I). El tejido teñido con TRAP se contratiñó con verde de metilo y se fotografió a 4x (A-C; barra de escala = 250 μ m) o a 20x (D-F; barra de escala = 100 μ m). (J-L) En paralelo, la tinción de oxitetraclina (OTC) asociada con la formación de nuevos minerales fue sólida en los defectos de control (tinción verde), mientras que la tinción de OTC se redujo significativamente en los defectos tratados con RGMa y RGMb. Las imágenes teñidas con OTC se contratiñeron con el colorante nuclear PI y se tomaron imágenes a 20x (barra de escala = 100 μ m).

Figura 11: (A) La expresión del gen del ligando de slit2 aumentó significativamente en los cultivos de osteoblastos en relación con los cultivos de MSC (* = $p < 0,021$). (B) Por el contrario, la expresión del gen de slit3 disminuyó significativamente en los osteoblastos y osteoclastos en relación con las MSC (* = $p < 0,002$). (C) La expresión del gen del receptor ROBO1 aumentó en los osteoblastos en relación con las MSC (* = $p < 0,018$). (D) El receptor ROBO4 aumentó significativamente en los osteoclastos en relación con los osteoblastos y las MSC (* = $p < 0,005$). (E) Tras la adición de medios de osteoinducción, los marcadores fenotípicos de osteoblastos, fosfatasa alcalina (ALPL) y osteocalcina (OCN), aumentaron significativamente (* = $p < 0,01$ y * = $p < 0,015$, respectivamente). (F) Los marcadores

fenotípicos del linaje mieloide, CD14, cathepsina K (CTSK) y fosfatasa resistente al tartrato (TRAP5) se expresaron en cultivos de osteoclastos.

Figura 12: (A) La adición de slit1 o slit2 aumentó la formación de minerales mientras que slit3 disminuyó la formación de minerales. El ligando de slit2 en particular aumentó el mineral más que BMP2/7. (B) La adición de 1 ng o 10 ng del ligando de slit1 aumentó el número de adipocitos (células grasas) (* = $p < 0,015$) mientras que 100 ng de slit1 no tuvieron efecto sobre el número de adipocitos. (C) La adición de 100 ng de slit2 disminuyó el número de adipocitos (* = $p < 0,012$). (D) Por el contrario, la adición de 1 ng del ligando de slit3 (* = $p < 0,001$) mientras que 10 ng y 100 ng aumentaron el número de adipocitos (* = $p < 0,015$). (E-G) Slit1 disminuyó el número de osteoclastos (* = $p < 0,0002$) mientras que slit2 y slit3 aumentaron el número de osteoclastos (* = $p < 0,0001$).

Figura 13: (A) El volumen óseo corregido por el volumen total (Bv/Tv) aumentó dentro de los defectos unicorticales tratados con 100 ng del ligando de slit1 (* = $p < 0,0001$) en paralelo con el aumento de Bv/Tv observado cuando los defectos se trataron con el ligando de slit2 (* = $p < 0,0003$). La adición de slit3 no tuvo efecto sobre Bv/Tv. (B) Asombrosamente, ninguno de los ligandos de slit tiene efecto sobre el número trabecular (TbN). (C) En consonancia con el aumento de Bv/Tv, la adición de slit1 aumentó el espesor trabecular (TbTh; * = $p < 0,0001$) mientras que slit2 aumentó significativamente TbTh (* = $p < 0,0015$). TbTb no se modificó en los defectos tratados con slit3.

Figura 14: (A) La expresión del gen de Netrina-4 (NTN4) disminuyó en los osteoblastos (OB; * = $p < 0,001$), las células tumorales de sarcoma de Ewing RDES (* = $p < 0,006$), las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs863 (* = $p < 0,027$) y las células tumorales de osteosarcoma SaOS2 (* = $p < 0,0085$) en relación con los cultivos de MSC. En cambio, la expresión del gen de NTN4 aumentó significativamente en las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs822 (* = $p < 0,05$) en relación con las MSC. (B) La expresión del gen de RGMb disminuyó en los osteoblastos (OB; * = $p < 0,034$), las células tumorales de sarcoma de Ewing RDES (* = $p < 0,0214$) y las células tumorales de osteosarcoma SaOS2 (* = $p < 0,0214$) en relación con los cultivos de MSC. En cambio, la expresión del gen de RGMb aumentó significativamente en las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs822 (* = $p < 0,0002$) en relación con las MSC. (C) La expresión del gen de Slit3 disminuyó en los osteoblastos (OB; * = $p < 0,0001$), las células tumorales de sarcoma de Ewing RDES (* = $p < 0,0001$), las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs863 (* = $p < 0,0001$) y las células tumorales de osteosarcoma SaOS2 (* = $p < 0,0001$) en relación con los cultivos de MSC. En cambio, la expresión del gen de slit3 aumentó significativamente en las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs822 (* = $p < 0,006$) en relación con las MSC. (D) La expresión del gen de neogenina aumentó en los osteoblastos (OB; * = $p < 0,02$), las células tumorales de sarcoma de Ewing RDES (* = $p < 0,04$) y las células tumorales de osteosarcoma SaOS2 (* = $p < 0,05$) en relación con los cultivos de MSC. (E) La expresión del gen de UNC5b aumentó en los osteoblastos (OB; * = $p < 0,04$), las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs822 (* = $p < 0,009$) y las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs883 (* = $p < 0,0004$) en relación con los cultivos de MSC. (F) La expresión del gen de ROBO1 aumentó en las células tumorales de sarcoma de Ewing RDES (* = $p < 0,0023$) en relación con los cultivos de MSC.

Figura 15: Tinción inmunohistoquímica del sarcoma de Ewing de secciones óseas de biopsia de médula ósea que demuestran la relación del tumor con la médula. Sarcoma de Ewing del hueso teñido positivamente con CD99 (tinción marrón/roja). Los receptores de netrina, neogenina y UNC5b, se tiñeron positivamente en las mismas células tumorales de Ewing, mientras que el receptor del ligando de proteína acoplado a netrina-G, NGL1, también se tiñó en muestras de tumores de Ewing. La tinción de los receptores ligandos de slit, ROBO1 y ROBO4, fue robusta en las muestras de tumores de sarcoma de Ewing. Se utilizó verde de metilo como colorante nuclear (tinción verde/azul).

Figura 16: La adición de 100 ng de los ligandos de netrina-1 (NTN1) o netrina-4 (NTN4) no tuvo efecto sobre la proliferación de células tumorales del sarcoma de Ewing, 72 horas después de la adición de los ligandos. En cambio, la adición de 100 ng de los ligandos de RGMa o RGMb produjo una disminución significativa en el número de células tumorales RDES (* = $p < 0,0021$). La adición de 100 ng de los ligandos de slit1 o slit2 no tuvo efecto sobre la proliferación de células tumorales RDES. En cambio, la adición de 100 ng del ligando de slit3 produjo una disminución significativa en el número de células tumorales RDES (* = $p < 0,0007$) en relación con los cultivos de control. Los ligandos de netrina, RGM o slit no tuvieron efecto sobre las células tumorales del osteosarcoma SaOS2, ni sobre las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs863, ni sobre las células tumorales de sarcoma de Ewing Hs822.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Las referencias a métodos de tratamiento mediante terapia en lo que sigue deben interpretarse como referencias a compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en esos métodos.

La invención proporciona un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de un sitio de lesiones ortopédicas en el hueso o intervenciones quirúrgicas en el hueso, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en netrina-1 y netrina-4, y en donde dicho método comprende administrar al menos un polipéptido seleccionado del grupo. Preferentemente, dicha administración promueve la formación ósea. Preferentemente, dicho método comprende además administrar slit2.

La netrina-1, la netrina-4 y la slit1 aumentan la formación ósea mientras disminuyen el número de osteoclastos y de adipocitos (células grasas). El aumento de la formación ósea está respaldado por la formación mineral observada en el cultivo y la formación ósea medida mediante microCT después de un defecto unicortical inducido quirúrgicamente. La disminución del número de osteoclastos observada en el cultivo respalda una mayor formación ósea. La

5 disminución del número de células grasas se corresponde con un aumento de la masa ósea y está relacionada con el destino bipotencial de las MSC. El aumento de la masa ósea debido a los ligandos de netrina se debe al aumento del número trabecular, que se asocia con el reclutamiento de más MSC en el defecto unicortical. El aumento de la masa ósea en Slit1 se debe al aumento del espesor trabecular, que se asocia con una mayor actividad de las células óseas y no con el reclutamiento de MSC.

10 Slit2 aumenta la formación ósea, aumenta el número de osteoclastos y disminuye el número de adipocitos. El aumento de la formación ósea se demuestra mediante la formación mineral en cultivo y la formación ósea medida mediante microCT después de un defecto unicortical inducido quirúrgicamente. La disminución del número de células grasas se corresponde con un aumento de la masa ósea y está relacionada con el destino bipotencial de las MSC. El aumento

15 de la masa ósea en Slit2 se debe al aumento del espesor trabecular, que se asocia con una mayor actividad de las células óseas y no con el reclutamiento de MSC.

La invención proporciona además un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la osteopetrosis, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en RGMa y RGMb, y la administración inhibe la

20 formación ósea y aumenta la formación de osteoclastos. Preferentemente, dicho método comprende además administrar slit3.

Slit3 aumentó el número de osteoclastos pero no la masa ósea, mientras que RGMb disminuyó la masa ósea y aumentó el número de osteoclastos. El número de adipocitos aumentó en los cultivos tratados con slit3 y RGMb. Los

25 resultados de RGMb sugieren que los ligandos de RGM son antagonistas a los ligandos de netrina.

En los usos médicos descritos anteriormente, dicho polipéptido puede administrarse con un portador a base de colágeno, ya sea en forma de esponja de colágeno, un colágeno en polvo, o un hidrogel de gelatina a base de colágeno. Preferentemente, el portador a base de colágeno es un implante y tiene capas alternas de polipéptidos que

30 se liberan durante un período de tiempo.

La administración de cualquiera de estos ligandos puede lograrse a través de varias vías. El modelo quirúrgico produjo una lesión que contenía abundante colágeno, laminina, fibronectina y heparina; todos los cuales son necesarios para la función de netrina y slit y estos ligandos contienen sitios de unión para estas proteínas de la matriz. Por lo tanto, en

35 algunas realizaciones, estos ligandos se pueden administrar localmente en el sitio de una fractura o en el sitio de un procedimiento quirúrgico ortopédico, todo ello que provoca hemorragias. Estos ligandos pueden administrarse por otras vías, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, parenteral, entre otras.

La administración de estos ligandos solos o en combinación con un implante como medio para controlar la migración de MSC a un implante y la formación de hueso (netrina-1 o netrina-4) o para prevenir la migración de MSC e inhibir la

40 formación de hueso (slit3). En paralelo, los ligandos de netrina-1, netrina-4 o slit1 inhiben la degradación ósea (a través de la disminución del número de osteoclastos) del hueso o del material del implante. De manera adicional, la degradación controlada del hueso o de un material de implante puede mediar mediante la adición de slit3 o RGMb (a través del aumento del número de osteoclastos).

La administración de cualquiera de los ligandos divulgados en este documento se puede realizar para promover el crecimiento óseo o reducir la destrucción ósea, lo que produce un aumento de la masa ósea; o para reducir la masa ósea, en sujetos que lo necesiten. Por ejemplo, la administración de netrina-1, netrina-4 y slit1 puede ser útil en el

45 tratamiento de la osteonecrosis o la osteorradionecrosis, en el que la actividad de los osteoblastos disminuye y el número de adipocitos (es decir, la acumulación de grasa) aumenta cuando las MSC no logran migrar ni diferenciarse en el espacio del tejido lesionado. La administración de slit3 y RGMb puede ser útil en el tratamiento de la osteopetrosis (masa ósea patológicamente alta) para la que existen pocas opciones terapéuticas.

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de un sitio de lesiones ortopédicas en el hueso o intervenciones quirúrgicas en el hueso, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en netrina-1 y netrina-4, y en donde dicho método comprende administrar al

50 menos un polipéptido seleccionado del grupo. Preferentemente, dicha administración promueve la formación ósea. Preferentemente, dicho método comprende además administrar slit2.

En realizaciones específicas, el polipéptido ligando de netrina o de slit es un polipéptido de origen mamífero, como un ser humano, un roedor (ratón o rata). En algunas realizaciones, el o los polipéptidos empleados son de origen humano.

Se divulga, pero no forma parte de la invención, un método para promover la migración y/o diferenciación de células madre mesenquimales (MSC) a un sitio de lesión o intervención quirúrgica en el hueso para promover la curación

65 promoviendo directamente la diferenciación de MSC en un osteoblasto mientras se inhibe la diferenciación en un adipocito (célula grasa). El método incluye administrar una cantidad de un polipéptido de ligando de netrina o de slit

eficaz para promover la migración o diferenciación de células madre mesenquimales (MSC) a un sitio de lesión o intervención quirúrgica en el hueso. El polipéptido ligando de netrina es netrina-1, o netrina-4, o una combinación de los mismos. El polipéptido ligando de netrina puede ser un polipéptido de origen mamífero, como un ser humano, un roedor (ratón o rata). El o los polipéptidos empleados pueden ser de origen humano.

Se divulga, pero no forma parte de la invención, un método para prevenir o reducir la migración de células madre mesenquimales (MSC) a un sitio de lesión o intervención quirúrgica en el hueso para inhibir la formación ósea. El método incluye administrar una cantidad de un polipéptido de ligando de slit eficaz para prevenir o reducir la migración de células madre mesenquimales (MSC) y/o la diferenciación de MSC en un osteoblasto a un sitio de lesión o intervención quirúrgica en el hueso. El polipéptido ligando de slit puede ser slit3. El polipéptido puede ser un polipéptido de origen mamífero, como un ser humano, un roedor (ratón o rata). Se pueden emplear polipéptidos de origen humano.

Se divulga, pero no forma parte de la invención, un método para reducir o prevenir la formación de minerales o el crecimiento óseo, o para reducir la masa ósea. El método comprende administrar una cantidad del polipéptido ligando de RGMb eficaz para reducir o prevenir la formación de minerales o el crecimiento óseo o reducir la masa ósea. El polipéptido ligando de RGMb puede ser un polipéptido RGMb humano. El polipéptido RGMb de un polipéptido RGMb de roedor (p. ej., ratón o rata). El polipéptido RGMb puede ser un polipéptido RGMb humano o de roedor. Los usos médicos según la invención pueden comprender la administración del polipéptido con un portador a base de colágeno (por ejemplo, una esponja de colágeno, un colágeno en polvo o un hidrogel de gelatina a base de colágeno) con capas alternas de ligandos que se liberan durante un período de tiempo; por ejemplo, con una capa de netrina-1 y/o netrina-4 que promueven la formación de osteoblastos, encima de una capa interna de slit3 o RGMb, que inhiben la formación ósea y promueven la degradación del implante. Este proceso de formación ósea controlada junto con la inhibición de los osteoblastos y la degradación del implante producirá una plantilla similar al hueso.

En algunas realizaciones, esta divulgación proporciona un rango de dosis adecuado, a través del cual se administra un ligando de netrina-1 (1 ng a 50 microgramos) y/o un ligando de netrina-4 (1 ng a 50 microgramos) y es eficaz para aumentar la formación ósea y/o disminuir la degradación ósea a través de una disminución de la formación de osteoclastos y una disminución de la formación de adipocitos de manera dependiente de la dosis. Las cantidades de dosis específicas pueden ser de, por ejemplo, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, o una cantidad entre cualquiera de las dosis enumeradas. La cantidad precisa de dosis total que es efectiva dependerá de la extensión de la lesión o aplicación quirúrgica y del portador a utilizar. Por ejemplo, 50 ng en 1 microlitro de solución salina o cualquier dosis equivalente (p. ej., 100 ng en 2 microlitros o 1414,14 ng/cm³), de un ligando de netrina-1 o un ligando de netrina-4 se puede administrar a una lesión o sitio quirúrgico local que produzca una aceleración sustancial de la formación ósea y la inhibición del número de osteoclastos en la zona quirúrgica.

En otras realizaciones, esta divulgación proporciona un rango de dosis adecuado, a través del cual se administra un ligando de RGMa (1 ng a 50 microgramos) y/o un ligando de RGMb (1 ng a 50 microgramos) y es eficaz para inhibir la formación ósea mientras aumenta la formación de osteoclastos. Las cantidades de dosis específicas pueden ser de, por ejemplo, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, o una cantidad entre cualquiera de las dosis enumeradas. La cantidad precisa de dosis total que es efectiva dependerá de la extensión de la lesión o aplicación quirúrgica y del portador a utilizar. Por ejemplo, 50 ng en 1 microlitro de solución salina o cualquier dosis equivalente (p. ej., 100 ng en 2 microlitros o 1414,14 ng/cm³), se puede administrar un ligando de RGMa o un ligando de RGMb a una lesión o sitio quirúrgico local, lo que produce una inhibición de la curación ósea a través de un aumento en el número de osteoclastos dentro del área quirúrgica.

En algunas realizaciones, esta divulgación proporciona un rango de dosis adecuado, a través del cual se administra un ligando de slit2 (1 ng a 50 microgramos) y es eficaz para aumentar la formación ósea para el ligando de slit2 de manera dependiente de la dosis, al tiempo que disminuye la degradación ósea tras el tratamiento. Las cantidades de dosis específicas pueden ser de, por ejemplo, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, o una cantidad entre cualquiera de las dosis enumeradas. La cantidad precisa de dosis total que es efectiva dependerá de la extensión de la lesión o aplicación quirúrgica y del portador a utilizar. Por ejemplo, 50 ng en 1 microlitro de solución salina o cualquier dosis equivalente (p. ej., 100 ng en 2 microlitros o 1414,14 ng/cm³), de un ligando de slit2 se puede administrar a una lesión o sitio quirúrgico local que da como resultado una formación ósea sustancial para el ligando de slit2.

En otras realizaciones, esta divulgación proporciona un rango de dosis adecuado, a través del cual se administra un ligando de slit3 (1 ng a 50 microgramos) y es eficaz para disminuir la formación ósea en cultivo y no aumentar la formación ósea en un defecto óseo administrado quirúrgicamente. Las cantidades de dosis específicas pueden ser de, por ejemplo, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, o una cantidad entre cualquiera de las dosis enumeradas. La cantidad precisa de dosis total que es efectiva dependerá de la extensión de la lesión o aplicación quirúrgica y del portador a utilizar. Por ejemplo, 50 ng en 1 microlitro de solución salina o cualquier dosis equivalente (p. ej., 100 ng en 2 microlitros o 1414,14 ng/cm³), de un ligando de slit3 se pueden administrar a una lesión o sitio quirúrgico local que da como resultado una formación ósea deteriorada para el ligando de slit3 a través de un aumento en el número de osteoclastos dentro del área quirúrgica.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona la combinación de un ligando de netrina-1, un ligando de netrina-4, un

ligando de slit2 a un implante de colágeno bovino, de manera similar a Infuse (BMP2) o a masilla OP1 o a implante OP1, que se suministra con una esponja de colágeno bovino o colágeno bovino en polvo. Un ligando de netrina-1, un ligando de netrina-4 o un ligando de slit2 se administrarán reconstituyendo el ligando de netrina-1 en polvo, el ligando de netrina-4, o el ligando de slit2 con solución salina estéril y a continuación añadiendo la solución salina-ligando al implante de colágeno; después de lo cual el implante se colocará localmente en el sitio de la intervención quirúrgica.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona la combinación de un ligando de RGMa, un ligando de RGMb o un ligando de slit3 a un implante de colágeno bovino, de manera similar a Infuse (BMP2) o a masilla OP1 o a implante OP1, que se suministra con una esponja de colágeno bovino o colágeno bovino en polvo. Un ligando de RGMa, un ligando de RGMb o un ligando de slit3 se administrarán reconstituyendo el ligando de RGMa, el ligando RGMb o el ligando de slit3 en polvo con solución salina estéril y a continuación añadiendo la solución salina-ligando al implante de colágeno; después de lo cual el implante se colocará localmente en el sitio de la intervención quirúrgica.

Ejemplos específicos de polipéptidos de netrina, slit y RGMb adecuados para su uso en este documento incluyen las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 22 y 23, polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor al 99 % a cualquiera de los números de SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 22 o 23, y fragmentos funcionales o bioactivos de los mismos.

Identificadores de secuencia, Descripción y Números de acceso al GenBank

SEQ ID NO: 1 Netrina-1 de ratón, ácido nucleico, NM_008744
 SEQ ID NO: 2 Netrina-1 de ratón, aminoácido, NP_032770,
 SEQ ID NO: 3 Netrina-1 humana, ácido nucleico, NM_004822
 SEQ ID NO: 4 Netrina-1 humana, aminoácido, NP_004813
 SEQ ID NO: 5 Netrina-4 de ratón, ácido nucleico, NM_021320
 SEQ ID NO: 6 Netrina-4 de ratón, aminoácido, NP_067295
 SEQ ID NO: 7 Netrina-4 humana, ácido nucleico, NM_021229
 SEQ ID NO: 8 Netrina-4 humana, aminoácido, NP_067052
 SEQ ID NO: 9 SLIT1 humana, ácido nucleico, NM_003061.2
 SEQ ID NO: 10 SLIT1 humana, aminoácido, NP_003052.2
 SEQ ID NO: 11 SLIT1 de ratón, aminoácido, Q80TR4
 SEQ ID NO: 12 SLIT2 humana, ácido nucleico, NM_004787.1
 SEQ ID NO: 13 SLIT2 humana, aminoácido, NP_004778.1
 SEQ ID NO: 14 SLIT2 de ratón, aminoácido, Q9R1B9
 SEQ ID NO: 15 SLIT3 humana, ácido nucleico, NM_003062.3
 SEQ ID NO: 16 SLIT3 humana, aminoácido, NP_003053.1
 SEQ ID NO: 17 SLIT3 de ratón, aminoácido, Q9WVB4
 SEQ ID NO: 18 RGMa humana, ácido nucleico, NM_001166289.1
 SEQ ID NO: 19 RGMa humana, aminoácido, NP_001159761.1
 SEQ ID NO: 20 RGM-A de ratón; aminoácido, Q6PCX7
 SEQ ID NO: 21 RGMb humana, ácido nucleico, NM_001012761.2
 SEQ ID NO: 22 RGMb humana, aminoácido, NP_001012779.2
 SEQ ID NO: 23 RGM-B de ratón; aminoácido, Q7TQ33

La presente descripción se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no debe interpretarse como limitativo de ningún modo.

Ejemplo 1: Los ligandos de netrina regulan la formación ósea y la reabsorción ósea.

Métodos: Se extrajo médula ósea humana de pacientes adultos que dieron su consentimiento y se sometieron a una artroplastia total de cadera femoral proximal primaria electiva o a una artroplastia total de rodilla femoral distal primaria electiva (n = 6, (edad media de 65 años) como parte de un estudio aprobado por el IRB. Las MSC humanas se derivaron de la fracción adherente de células derivadas de cada aspirado de médula ósea completo recolectado, mientras que la población de monocitos se recolectó de la fracción no adherente de la médula ósea. La fracción de monocitos se enriqueció mediante subcultivo con 100 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos humanos recombinante (MCSF; Wyeth). En experimentos paralelos descritos a continuación, se recogieron los fémures de ratones macho de 3 semanas (n = 10) y 16 semanas (n = 20) de edad y a continuación se extrajo la médula ósea del fémur de acuerdo con lo siguiente: Se insertó una aguja de calibre 21 en el canal intramedular femoral después de retirar los extremos proximal y distal del fémur. A continuación se pasó cuidadosamente el medio a través del extremo proximal del fémur, lo que obligó a la médula ósea a salir del hueso. Por último, el sedimento de médula ósea se disoció mecánicamente utilizando una aguja de calibre 18 y a continuación se pasó a través de un filtro de malla de 70 µm. Estos aspirados de médula ósea completa se utilizaron para generar osteoclastos. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (v/v) y 1 % de penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG; Cellgro, Mediatech). Los ligandos de netrina humana recombinante (NTN1 y NTN4) se diluyeron en PBS (R&D Systems). El comité responsable del IACUC aprobó todos los estudios con animales descritos en este trabajo.

Análisis de expresión genética: Las MSC, los osteoblastos y los adipocitos derivados de médula ósea humana se analizaron para detectar cambios en la expresión genética. En paralelo, también se analizaron osteoclastos derivados de monocitos humanos para detectar cambios en la expresión de genes mieloides. Los datos genéticos se derivaron de dos muestras generadas independientemente recolectadas de al menos tres pacientes. El ARNm se purificó utilizando columnas RNeasy Plus Mini (Qiagen) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La expresión genética se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando 100 ng de ADNc mezclado con Fast Plus EvaGreen Master Mix (Biotium). En cada experimento, la GAPDH sirvió como control, los controles negativos no contenían plantilla y se generó una curva patrón utilizando diluciones seriadas de una secuencia sintetizada químicamente para la GAPDH (0, 1, 10 y 100 femtogramos; Integrated DNA Technologies). La expresión genética se evaluó utilizando el método de Pfaffl, en el que la eficiencia de cada cebador (E) y la concentración del producto génico inicial (N_0) se calculan a partir de la región lineal de la curva del umbral de cruce de fluorescencia utilizando el software LinRegPCR (v2013.0). Los experimentos se consideraron válidos cuando el gen de control de GAPDH se encontraba dentro de la curva patrón y se calculó que las eficiencias del cebador (E) eran $E \geq 1,8$. La presencia de un solo producto genético se confirmó mediante un análisis de curva de fusión y el tamaño del producto se confirmó mediante electroforesis en gel del producto genético.

Expresión de proteínas mediante análisis Western Blot: Las MSC, los osteoblastos y los osteoclastos humanos se lisaron con tampón RIPA frío (Pierce Thermo Scientific) que contenía yodoacetamida 2 mM, clorhidrato de benzamidina 2 mM, etilmaleimida 0,1 mM, 1 % de PMSF y el cóctel inhibidor de la proteasa Halt (Pierce Thermo Scientific). También se analizó la proteína a partir de muestras de sobrenadante derivadas de cultivos de MSC. Se analizaron lisados de proteínas de al menos dos réplicas generadas a partir de tres muestras de pacientes. La proteína total se analizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cargaron (20 µg/pocillo) en un gel prefabricado Mini-Protean Tris-Tricine al 10-20 % (Bio-Rad) con la escalera de proteínas NIR preteñida Page Ruler (Bio-Rad) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Los receptores de NTN4, NTNG1, UNC5 (UNC5b y UNC5c) y NGL1 se identificaron en membranas bloqueadas utilizando leche descremada al 5 % y los siguientes anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnologies): NTN4(1:500), NTNG1(1:500), UNC5b(1:500), UNC5c (1:500) y NGL1 (1:500). La vinculina (1:500) o la actina (1:500) sirvieron como controles de carga. El fragmento de γ -secretasa (aa1171-aa1345) o el extremo C del receptor de neogenina se detectó utilizando los clones de anticuerpos H-175 (1:1000) o C-20 (1:500) dirigidos contra el receptor de neogenina, respectivamente. Los anticuerpos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con micropolímero conjugado con HRP (kit ImmPress, Vector Labs) junto con el sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad). Se utilizaron lisados de proteína de cerebro de ratón (mB) como controles de expresión positiva.

Inmunofluorescencia y morfología: Las tibias de ratones de 3 semanas ($n = 10$) y 16 semanas ($n = 20$) de edad se fijaron en paraformaldehído al 2 %, simultáneamente descalcificado y crioprotegido utilizando una solución del 15 % de EDTA y el 30 % de sacarosa, y a continuación congelado rápidamente utilizando nitrógeno líquido y seccionado a 8 µm utilizando un criomicrotomo (Leica 3050). Se identificaron patrones en la expresión de ligandos y receptores utilizando los siguientes anticuerpos primarios: NTN4(1:250), NTNG1(1:250), neogenina (1:250), UNC5b(1:250), UNC5c(1:250), NGL1 (1:250) y FABP4 (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos secundarios Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Las MSC también se cultivaron en discos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las MSC se incubaron con anticuerpos primarios contra NTN1 (1:250), NTN4(1:250), NTNG1(1:250), neogenina (1:250), UNC5b(1:250), UNC5c(1:250), NGL1 (1:250) y nucleostemina (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Los núcleos se contratiñeron con 10 µg/ml de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma).

Osteogénesis: El potencial osteogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la formación de minerales. Se sembraron MSC de al menos tres pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir y entrelazar antes de la adición de medios de osteoinducción. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 20 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con 25 µg/ml de ascórbico-2-fosfato (Sigma), dexametasona 100 nM (Sigma) y el siguiente régimen de dosificación de β -glicerofosfato (BGP; Sigma): 1x cambio de medio con BGP 5 mM, 1x cambio de medio con BGP 10 mM y 1x cambio de medio con BGP 20 mM. Los ligandos de netrina (1, 10 y 100 ng) se añadieron en cada cambio de medio posterior a la inducción. Los pocillos de control positivo se trataron con 25 ng del ligando BMP2/BMP7 humano recombinante (R&D Systems) con la primera adición de medio de inducción. Tras la aparición de nódulos minerales, las células se fijaron con EtOH helado al 70 % (Sigma) y a continuación se tiñeron con rojo de alizarina-S 40 mM (pH 4,2, Sigma). Los experimentos de osteogénesis se repitieron al menos dos veces para cada paciente.

Adipogénesis: El potencial adipogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos. Se sembraron MSC de al menos tres muestras de pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir antes de la adición de medios de adipoinducción. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 10 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con rosiglitazona 5 µM (Cayman Chemical), 3-isobutil-1-metilxantina 500 µM (IBMX; Sigma), dexametasona 1 µM (Sigma) y 1 µg/ml de insulina humana recombinante (rInsulin, Sheffield Bio-Science). Medios de inducción que incluyen los ligandos de netrina (1, 10 y 100 ng) se añadieron a los cultivos en cada cambio de medio; 2 cambios de medios durante un período de 7 días posterior a la inducción. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 2 % y se obtuvieron imágenes con

el colorante fluorescente lipofílico rojo Nilo (excitación a 488 nm; Sigma). Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Las estimaciones del número de adipocitos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri junto con una modificación de la técnica del fraccionador utilizada en la estereología imparcial, en la que un pozo particular se dividió en secciones paralelas que servían como regiones de recuento. Los experimentos de adipogénesis se repitieron al menos dos veces.

Tinción de TRAP y determinación del número de osteoclastos: Los osteoclastos se derivaron de una población enriquecida de monocitos humanos o de aspirados de médula ósea completa no enriquecida de ratón. Se analizaron tres muestras de médula ósea de pacientes humanos en paralelo con muestras recolectadas de médula ósea de ratón de 3 semanas (n = 10) y 16 semanas (n = 20). La fracción de monocitos se estimuló para convertirse en osteoclastos cultivando 1×10^6 células con 25 ng/ml de MCSF y 25 ng/ml de ligando de RANK humano o de ratón recombinante (R&D Systems) en presencia de los ligandos de NTN1 o NTN4 (100 ng). Los osteoclastos se tiñeron con fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP; Kit de fosfatasa ácida leucocitaria Sigma 387-A) y se contaron cuando las células daban positivo para TRAP y tenían al menos tres núcleos. Las estimaciones del número de osteoclastos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri y una modificación de la técnica del fraccionador.

Inactivación del receptor de neogenina mediante ARNhc: Se utilizaron células tumorales de osteosarcoma SaOS2 para modelar la osteogénesis. Inhibimos la actividad del receptor de neogenina utilizando un lentivirus con ARNhc de neogenina disponible comercialmente o células SaOS2 transfectadas con un lentivirus GFP utilizado como control (Santa Cruz Biotechnologies). A continuación se indujo a las células SaOS2 a convertirse en osteoblastos utilizando el 10 %, 5 % o 2,5 % de suero y a continuación se analizaron para detectar genes diana de BMP (ID1, ID2, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD6, SMAD7 y SMAD8/9).

Modelo de defecto unicortical: A ratones macho C57BL/6 de 3 semanas de edad (n = 5 por grupo de tratamiento) se les inyectó NTN1 o NTN4 después de la creación de un defecto unicortical. Brevemente, se realizó una pequeña incisión (de aproximadamente 3 mm) justo debajo de la articulación de la rodilla, ubicada en el lado medial de la tibia, justo debajo de la tuberosidad tibial en la cresta tibial. En animales jóvenes la placa fisaria es claramente visible y la broca se colocó aproximadamente 1 mm por debajo de este punto. La broca produce un defecto unicortical con dimensiones de 300 μ m de diámetro x 1 mm de profundidad. Se utilizó una jeringa Hamilton Neuros RN de 10 μ l con una aguja de punta roma de calibre 33 para inyectar los ligandos de netrina (NTN1 o NTN4 a 100 ng en 2 μ l) directamente en el defecto unicortical a una tasa no superior a aproximadamente 0,1 μ l por segundo. Las tibias de la extremidad izquierda sirvieron como controles quirúrgicos contralaterales, en las que los animales recibieron un defecto unicortical y se inyectaron 2 μ l de solución salina. A estos mismos ratones se les inyectó oxitetraciclina (50 μ g/kg; OTC) administrada por vía intraperitoneal para medir la aposición ósea 48 horas antes de la eutanasia. Los ratones fueron sacrificados 5 días después de la cirugía, se recogieron las extremidades traseras y se fijaron las tibias para inmunofluorescencia, tinción de TRAP y crecimiento óseo asociado a OTC.

Análisis MicroCT de defectos unicorticales: Se adquirieron imágenes de alta resolución de la tibia con un sistema de imágenes μ CT (μ CT40; Scanco Medical). Las tibias se escanearon a 45 keV con un tamaño de vóxel isotrópico de 12 μ m. Se seleccionó una región de análisis de las secciones axiales para incluir todo el defecto unicortical delimitado por la pared cortical endóstica. El volumen óseo corregido por volumen (volumen óseo/volumen total; Bv/Tv), el número trabecular (TbN) y el espesor trabecular (TbTh) se calcularon utilizando el software Scanco. El diámetro máximo del defecto se determinó utilizando estereología imparcial, en la que se midió la distancia lineal máxima entre lados opuestos del defecto a través de secciones seriadas. El diámetro máximo se determinó utilizando el plug-in BoneJ para ImageJ (NIH Research Services Branch; <http://rsbweb-nih.gov/ij/>).

Análisis estadísticos: Para analizar los datos se utilizó el software estadístico Prism (Graphpad). Se calcularon las medias y las desviaciones típicas. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías utilizando la corrección post-hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con significancia establecida en $p < 0,05$.

Resultados:

Los ligandos de netrina y los receptores de netrina se expresan en los linajes de MSC y monocitos: La expresión del gen de NTN4 disminuyó significativamente en los osteoblastos, adipocitos y osteoclastos en comparación con las MSC ($p < 0,026$). (Figura 1 A) Por el contrario, los receptores de netrina que se detectaron (neogenina, UNC5b y UNC5c) aumentaron significativamente en los osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,045$). (Figuras 1B, 1C, 1D) Curiosamente, la expresión del gen de UNC5c fue mayor en los adipocitos en comparación con las MSC ($p < 0,007$). (Figura 1D) Sin embargo, la expresión de los genes de neogenina y UNC5b fue significativamente menor en adipocitos y osteoclastos en comparación con los osteoblastos ($p < 0,003$). La expresión del gen de NTNG1 aumentó significativamente en los osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,0492$) (Figura 1E). Asimismo, la expresión del gen del receptor de NTNG1, NGL1, también aumentó significativamente en los osteoblastos frente a las MSC ($p < 0,008$), mientras que la expresión del gen del receptor de NGL2 disminuyó significativamente en los osteoblastos ($p < 0,03$). (Figuras 1F y 1G) No se observó ningún cambio en la expresión genética entre los diversos linajes de MSC o monocitos para los ligandos de NTN1, NTN3, NTN5 y NTNG2. (no mostrado) Además, la expresión de los genes de UNC5a, UNC5d, DCC, DSCAM y NGL3 fue indetectable. La expresión de los genes de la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OCN) aumentó significativamente en los osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,009$). (Figura

1H) Paralelamente, genes específicos de adipocitos (PPAR γ , FABP4 y perilipina) aumentaron en los adipocitos en comparación con las MSC ($p < 0,01$). (Figura 1I) También se observaron genes osteoclasticos específicos (CD14, CSTK y TRAP) en monocitos cultivados para convertirse en osteoclastos. (Figura 1J)

5 **Se observó una tinción generalizada de NTN4, UNC5b y neogenina en la médula ósea y a lo largo de la superficie endóstica del hueso:** La tinción fluorescente reveló que NTN4 solo se expresaba dentro de un pequeño grupo de condrocitos dentro de la zona de reserva de la placa de crecimiento. La neogenina se expresó débilmente en los condrocitos de la zona proliferativa y fuertemente en los condrocitos de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento. Tanto la NTN4 como la neogenina se observaron abundantemente en la región de la metáfisis adyacente a la placa de crecimiento (la unión condroósea). La tinción de lectina de tomate y neogenina demostró que el linaje monocítico es abundante cerca de la unión condroósea, lo que podría reflejar la actividad de los osteoclastos, que son responsables de degradar el cartílago mineralizado de la placa de crecimiento. Se observó tinción de UNC5b y UNC5c en los condrocitos dentro de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, mientras que también se observó tinción de UNC5c en los condrocitos de la zona de reserva-proliferativa. También se identificó tinción de UNC5b y UNC5c cerca de la unión condroósea de la placa de crecimiento. De manera adicional, se observó una fuerte tinción para la NTN4, la neogenina y la UNC5b en la capa de osteoblastos que recubre la superficie endóstica del hueso. Es importante destacar que, solo se observó tinción de neogenina en los osteocitos dentro del hueso cortical. Además, dentro de la médula ósea, la NTN4 se tiñó ampliamente. Por último, la tinción de neogenina y UNC5b fue mayor en los osteoblastos que recubren la superficie endóstica del hueso trabecular.

20 **NTNG1 y NGL1 fueron expresadas por condrocitos dentro de la placa de crecimiento y los osteoblastos que recubren la superficie endóstica:** Se observó tinción del ligando de NTNG1 y del receptor de NGL1 en los condrocitos ubicados dentro de la zona de reserva-proliferativa de la placa de crecimiento, mientras que no se observó tinción de NTNG1 ni de NGL1 dentro de la zona hipertrófica. También se identificó tinción de NTNG1 y NGL1 en la región metafisaria adyacente a la placa de crecimiento (unión condroósea). También se observó tinción de NTNG1 y NGL1 en los osteoblastos que recubren la superficie endóstica y en toda la médula ósea adyacente a la superficie endóstica. Osteoblastos de hueso trabecular dentro de la metáfisis teñidos con NTNG1 y NGL1.

30 **La tinción de NTN4, NTNG1 y neogenina fue abundante en los cultivos de MSC:** Se observó tinción del receptor de neogenina en todos los cultivos de MSC. En cambio, la tinción del ligando de NTN1 fue limitada, en consonancia con nuestros datos de expresión genética, mientras que la tinción de NTN4 fue más extendida en cultivos de MSC. La tinción de NTNG1 fue alta en los cultivos de MSC, mientras que se observó que la tinción del receptor de NTNG1, NGL1, fue escasa. UNC5b y UNC5c se tiñeron en niveles intermedios en los cultivos de MSC. Curiosamente, la neogenina y la UNC5c tiñeron proyecciones finas y largas dentro de una subpoblación de MSC. La tinción de UNC5b y UNC5c fue débil en las células que también se tiñeron con el marcador fenotípico de las MSC, nucleostemina, mientras que no se observó tinción de neogenina en las células teñidas con nucleostemina. Cuando la nucleostemina se localizó en el nucléolo, las MSC se tiñeron con UNC5b. En cambio, cuando la tinción de nucleostemina se localizó en el citoplasma, las MSC se tiñeron con UNC5c. Se requerirá más investigación para desentrañar la importancia de la tinción nucleolar frente a la citoplasmática de la nucleostemina y la UNC5b o UNC5c. Se confirmó la expresión de las proteínas NTN4, neogenina, UNC5b, UNC5c, NTNG1 y NGL1 en los cultivos de MSC. En paralelo, las proteínas NTN4 y neogenina se expresaron en gran medida en los osteoclastos, consistente con nuestros datos genéticos. La forma soluble del ligando de NTN4 se observó en sobrenadantes de cultivo de MSC. Sorprendentemente, un fragmento soluble de NTNG1, un ligando unido a GPI que se cree que no es soluble, también se observó en sobrenadantes derivados de cultivos de MSC.

45 **Los ligandos de netrina aumentan la osteogénesis mientras disminuyen la adipogénesis y la formación de osteoclastos:** La adición de NTN1 y NTN4 recombinantes a cultivos de MSC sometidos a diferenciación osteogénica produjo un aumento dependiente de la dosis en la acumulación de minerales, con la dosis más grande de NTN1 o NTN4 (100 ng) produciendo más tinción de rojo de alizarina en comparación con los cultivos tratados con BMP2/7. En paralelo, la diferenciación osteogénica produjo una disminución de la expresión de la proteína NTN4 que es consistente con la disminución observada en la expresión del gen de NTN4. La proteína neogenina de longitud completa aumentó en cultivos de osteoblastos. Goldschneider *et al.* (Goldschneider *et al.*, (2008) describieron recientemente dos fragmentos intracelulares de neogenina escindidos por las enzimas α - y γ -secretasa. Se identificaron fragmentos de α - y γ -secretasa en MSC y osteoblastos; sin embargo, solo se observó un aumento significativo del fragmento de neogenina creado por la γ -secretasa (NeolCD) en los osteoblastos. La expresión del receptor de neogenina se inhibió en células SaOS2 utilizando un lentivirus con ARNhc de neogenina y se confirmó mediante el análisis de lisados de proteínas. Goldschneider *et al.* propusieron que la expresión del gen de SMAD5 era una diana del NeolCD. Descubrimos que la expresión del gen de SMAD5 disminuyó un 44,3 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina ($p < 0,037$) en comparación con los controles GFP y los controles no transfectados. La señalización del receptor de BMP requiere que el complejo SMAD1/5/8 se localice en el núcleo, de modo que también examinamos la expresión del gen de SMAD. La expresión del gen de SMAD1 también disminuyó un 36,6 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina ($p < 0,04$) en comparación con los controles. (Figura 6G) También medimos que el inhibidor SMAD6 disminuyó un 66,3 % en las células SaOS2 deficientes en neogenina ($p < 0,0007$) en comparación con los controles. Los factores de transcripción ID, ID1 y ID2, son dianas de la señalización BMP (Peng *et al.*, 2004). La expresión del gen de ID1 disminuyó un 63,4 % ($p < 0,001$) mientras que la expresión del gen de ID2 disminuyó un 42,3 % ($p < 0,039$) en las células SaOS2 deficientes en neogenina en relación con las células de control. No identificamos cambios

significativos en la expresión del gen de SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7 o SMAD8. Además, no hubo cambios en la expresión genética de los ligandos de TGF β y los receptores de TGF β . Las células SaOS2 inducidas a producir mineral óseo se cultivaron en concentraciones decrecientes de suero. No se observó ningún efecto significativo en la acumulación de minerales en las células SaOS2 control con GFP y control no transfectadas; sin embargo, se observó una disminución dependiente de la dosis en la formación de minerales en las células SaOS2 deficientes en neogenina frente a los controles. (Figura 6J) La adición de BMP2/7 a estos cultivos restauró cierta acumulación de minerales en las células SaOS2 deficientes en neogenina. Por el contrario, los ligandos de NTN1 o NTN4 disminuyeron el número de adipocitos de forma dependiente de la dosis ($p < 0,008$). (Figuras 3A y 3B) FABP4 se expresó fuertemente en células de médula ósea que también expresaron fuertemente el receptor de UNC5c. La expresión del gen de UNC5c aumentó en las MSC inducidas a convertirse en osteoblastos en relación con las MSC; como tal, proponemos que los grupos de células de la médula ósea sean células FABP4⁺/UNC5c⁺ del linaje de los adipocitos. A pesar de los bajos niveles de expresión del receptor de netrina, la adición de NTN1 o NTN4 también produjo una disminución significativa en el número de osteoclastos en el cultivo ($p < 0,0003$). (Figuras 3C, 3D y 3E) La disminución del número de osteoclastos mediada por el ligando netrina es consistente con las observaciones realizadas por Enoki *et al.* (Enoki *et al.*, 2014).

La adición de ligandos de netrina aumentó la curación ósea en un defecto unicortical: Los defectos unicorticales administrados quirúrgicamente fueron tratados con ligandos de netrina. (Figuras 4 y 5) Se observaron osteoclastos teñidos con TRAP en todos los defectos de control. (Figuras 4A y 4D) Sin embargo, se observó una menor tinción de TRAP en los defectos tratados con NTN1 (Figuras 4B y 4E), mientras que no se observó tinción de TRAP en los defectos tratados con NTN4. (Figuras 4C y 4F) En los defectos tratados con NTN1 o NTN4, se observó abundante tinción de TRAP en la periferia de los defectos. En paralelo, la tinción de OTC asociada a la formación de hueso nuevo disminuyó en los defectos de control tratados con solución salina y aumentó en los defectos tratados con NTN1 o NTN4. (Figuras 4G, 4H y 4I) Se observó que las tibias tratadas con los ligandos de NTN1 o NTN4 y obtenidas mediante μ CT tenían defectos más pequeños que las tibias no tratadas con ligando. (Figuras 5A-5F) Un análisis de las imágenes μ CT demostró que el tratamiento con NTN1 o NTN4 produjo un aumento significativo de la masa ósea, Bv/Tv ($p < 0,0003$). (Figura 5G) El número trabecular (TbN) y el espesor trabecular (TbTh) también aumentaron significativamente después de la adición de NTN1 o NTN4 ($p < 0,04$). (Figuras 5H y 5I) Además, un análisis del diámetro del defecto mostró que NTN1 o NTN4 dieron como resultado una disminución significativa del diámetro en comparación con los controles tratados con solución salina ($p < 0,0085$). (Figura 5J)

Ejemplo 2: Los ligandos de RGMa y RGMb inhiben la formación ósea mientras promueven la reabsorción ósea.

Métodos: Se extrajo médula ósea humana de pacientes adultos que dieron su consentimiento y se sometieron a una artroplastia total de cadera femoral proximal primaria electiva o a una artroplastia total de rodilla femoral distal primaria electiva ($n = 6$, edad media de 65 años) como parte de un estudio aprobado por el IRB. Las MSC humanas se derivaron de la fracción adherente de aspirados de médula ósea completa. Los monocitos se derivaron de la fracción no adherente de la médula ósea y se enriquecieron a través de un subcultivo separado utilizando 100 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos humanos recombinantes (MCSF; Wyeth). En experimentos paralelos descritos a continuación, se recogieron los fémures de ratones macho de 3 semanas ($n = 10$) y 16 semanas ($n = 20$) de edad y a continuación se extrajo la médula ósea del fémur de acuerdo con lo siguiente: Se insertó una aguja de calibre 21 en el canal intramedular femoral después de retirar los extremos proximal y distal del fémur. A continuación se pasó cuidadosamente el medio a través del extremo proximal del fémur, lo que obligó a la médula ósea a salir del hueso. Por último, el sedimento de médula ósea se disoció mecánicamente utilizando una aguja de calibre 18 y a continuación se pasó a través de un filtro de malla de 70 μ m. Estos aspirados de médula ósea completa se utilizaron para generar osteoclastos. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (v/v) y 1 % de penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG; Cellgro, Mediatech). Los ligandos de RGM humana recombinante (RGMa y RGMb) se diluyeron en PBS (R&D Systems). El comité responsable del IACUC aprobó todos los estudios con animales descritos en este trabajo.

Análisis de expresión genética: Las MSC, los osteoblastos y los adipocitos derivados de médula ósea humana se analizaron para detectar cambios en la expresión genética. En paralelo, también se analizaron osteoclastos derivados de monocitos humanos para detectar cambios en la expresión de genes mieloides. Los datos genéticos se derivaron de dos muestras generadas independientemente recolectadas de al menos tres pacientes. El ARNm se purificó utilizando columnas RNeasy Plus Mini (Qiagen) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La expresión genética se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando 100 ng de ADNc mezclado con Fast Plus EvaGreen Master Mix (Biotium). En cada experimento, la GAPDH sirvió como control, los controles negativos no contenían plantilla y se generó una curva patrón utilizando diluciones seriadas de una secuencia sintetizada químicamente para la GAPDH (0, 1, 10 y 100 femtogramos; Integrated DNA Technologies). La expresión genética se evaluó utilizando el método de Pfaffl, en el que la eficiencia de cada cebador (E) y la concentración del producto génico inicial (N_0) se calculan a partir de la región lineal de la curva del umbral de cruce de fluorescencia utilizando el software LinRegPCR (v2013.0). Los experimentos se consideraron válidos cuando el gen de control de GAPDH se encontraba dentro de la curva patrón y se calculó que las eficiencias del cebador (E) eran $E \geq 1,8$. La presencia de un solo producto genético se confirmó mediante un análisis de curva de fusión y el tamaño del producto se confirmó mediante electroforesis en gel del producto genético.

Expresión de proteínas mediante análisis Western Blot: Las MSC, los osteoblastos y los osteoclastos humanos

se lisaron con tampón RIPA frío (Pierce Thermo Scientific) que contenía yodoacetamida 2 mM, clorhidrato de benzamida 2 mM, etilmaleimida 0,1 mM, 1 % de PMSF y el cóctel inhibidor de la proteasa Halt (Pierce Thermo Scientific). También se analizó la proteína a partir de muestras de sobrenadante derivadas de cultivos de MSC. Se analizaron lisados de proteínas de al menos dos réplicas generadas a partir de tres muestras de pacientes. La proteína total se analizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cargaron (20 µg/pocillo) en un gel prefabricado Mini-Protean Tris-Tricine al 10-20 % (Bio-Rad) con la escalera de proteínas NIR preteñida Page Ruler (Bio-Rad) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se identificaron anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnologies) dirigidos contra RGMa (1:500) y RGMb (1:500) en membranas bloqueadas con leche descremada al 5%. La vinculina (1:500) o la actina (1:500) sirvieron como controles de carga. Los anticuerpos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con micropolímero conjugado con HRP (kit ImmPress, Vector Labs) junto con el sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad). Se utilizaron lisados de proteína de cerebro de ratón (mB) como controles de expresión positiva.

Inmunofluorescencia y morfología: Las tibias de ratones de 3 semanas (n = 10) y 16 semanas (n = 20) de edad se fijaron en paraformaldehído al 2 %, simultáneamente descalcificado y crioprotectado utilizando una solución del 15 % de EDTA y el 30 % de sacarosa, y a continuación congelado rápidamente utilizando nitrógeno líquido y seccionado a 8 µm utilizando un criomicrotomo (Leica 3050). Se identificaron patrones en la expresión de ligandos y receptores utilizando los siguientes anticuerpos primarios: RGMa (1:250), RGMb (1:250), neogenina (1:250) y FABP4 (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos secundarios Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Las MSC también se cultivaron en discos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las MSC se incubaron con anticuerpos primarios contra RGMa (1:250), RGMb (1:250) y nucleostemina (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Los núcleos se contratiñeron con 10 µg/ml de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma).

Osteogénesis: El potencial osteogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la formación de minerales. Se sembraron MSC de al menos tres pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir y entrelazar antes de la adición de medios de osteoinducción. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 20 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con 25 µg/ml de ascórbico-2-fosfato (Sigma), dexametasona 100 nM (Sigma) y el siguiente régimen de dosificación de β-glicerofosfato (BGP; Sigma): 1x cambio de medio con BGP 5 mM, 1x cambio de medio con BGP 10 mM y 1x cambio de medio con BGP 20 mM. Los ligandos de RGM (1, 10 y 100 ng) se añadieron en cada cambio de medio posterior a la inducción. Los pocillos de control positivo se trataron con 25 ng del ligando BMP2/BMP7 humano recombinante (R&D Systems) con la primera adición de medio de inducción. Tras la aparición de nódulos minerales, las células se fijaron con EtOH helado al 70 % (Sigma) y a continuación se tiñeron con rojo de alizarina-S 40 mM (pH 4,2, Sigma). Los experimentos de osteogénesis se repitieron al menos dos veces para cada paciente.

Adipogénesis: El potencial adipogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos. Se sembraron MSC de al menos tres muestras de pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir antes de la adición de medios de adipogénesis. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 10 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con rosiglitazona 5 µM (Cayman Chemical), 3-isobutil-1-metilxantina 500 µM (IBMX; Sigma), dexametasona 1 µM (Sigma) y 1 µg/ml de insulina humana recombinante (rInsulin, Sheffield Bio-Science). Medios de inducción que incluyen los ligandos de RGM (1, 10 y 100 ng) se añadieron a los cultivos en cada cambio de medio; 2 cambios de medios durante un período de 7 días posterior a la inducción. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 2 % y se obtuvieron imágenes con el colorante fluorescente lipofílico rojo Nilo (excitación a 488 nm; Sigma). Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Las estimaciones del número de adipocitos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri junto con una modificación de la técnica del fraccionador utilizada en la estereología imparcial, en la que un pozo particular se dividió en secciones paralelas que servían como regiones de recuento. Los experimentos de adipogénesis se repitieron al menos dos veces.

Tinción de TRAP y determinación del número de osteoclastos: Los osteoclastos se derivaron de una población enriquecida de monocitos humanos o de aspirados de médula ósea completa no enriquecida de ratón. Se analizaron tres muestras de médula ósea de pacientes humanos en paralelo con muestras recolectadas de médula ósea de ratón de 3 semanas (n = 10) y 16 semanas (n = 20). La fracción de monocitos se estimuló para convertirse en osteoclastos cultivando 1×10^6 células con 25 ng/ml de MCSF y 25 ng/ml de ligando de RANK humano o de ratón recombinante (R&D Systems) en presencia de los ligandos de RGMa o RGMb (100 ng). Los osteoclastos se tiñeron con fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP; Kit de fosfatasa ácida leucocitaria Sigma 387-A) y se contaron cuando las células daban positivo para TRAP y tenían al menos tres núcleos. Las estimaciones del número de osteoclastos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri y una modificación de la técnica del fraccionador.

Modelo de defecto unicortical: A ratones macho C57BL/6 de 3 semanas de edad (n = 5 por grupo de tratamiento) se les inyectó uno de los ligandos de RGM (RGMa o RGMb) después de la creación de un defecto unicortical. Brevemente, se realizó una pequeña incisión (de aproximadamente 3 mm) justo debajo de la articulación de la rodilla, ubicada en el lado medial de la tibia, justo debajo de la tuberosidad tibial en la cresta tibial. En animales jóvenes la placa fisaria es claramente visible y la broca se colocó aproximadamente 1 mm por debajo de este punto. La broca produce un defecto unicortical con dimensiones de 300 µm de diámetro x 1 mm de profundidad. Se utilizó una jeringa

Hamilton Neuros RN de 10 µl con una aguja de punta roma de calibre 33 para inyectar los ligandos de RGM (RGMa o RGMb a 100 ng en 2 µl) directamente en el defecto unicortical a una tasa no superior a aproximadamente 0,1 µl por segundo. Las tibias de la extremidad izquierda sirvieron como controles quirúrgicos contralaterales, en las que los animales recibieron un defecto unicortical y se inyectaron 2 µl de solución salina. A estos mismos ratones se les inyectó

5 oxitetraciclina (50 µg/kg; OTC) administrada por vía intraperitoneal para medir la aposición ósea 48 horas antes de la eutanasia. Los ratones fueron sacrificados 5 días después de la cirugía, se recogieron las extremidades traseras y se fijaron las tibias para inmunofluorescencia, tinción de TRAP y crecimiento óseo asociado a OTC.

Análisis MicroCT de defectos unicorticales: Se adquirieron imágenes de alta resolución de la tibia con un sistema de imágenes µCT (µCT40; Scanco Medical). Las tibias se escanearon a 45 keV con un tamaño de vóxel isotrópico de 12 µm. Se seleccionó una región de análisis de las secciones axiales para incluir todo el defecto unicortical delimitado por la pared cortical endóstica. El volumen óseo corregido por volumen (volumen óseo/volumen total; Bv/Tv), el número trabecular (TbN) y el espesor trabecular (TbTh) se calcularon utilizando el software Scanco. El diámetro máximo del defecto se determinó utilizando estereología imparcial, en la que se midió la distancia lineal máxima entre lados opuestos del defecto a través de secciones seriadas. El diámetro máximo se determinó utilizando el plug-in BoneJ para ImageJ (NIH Research Services Branch; <http://rsbweb.nih.gov/gov/iii/>).

10

15

Análisis estadísticos: Para analizar los datos se utilizó el software estadístico Prism (Graphpad). Se calcularon las medias y las desviaciones típicas. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías utilizando la corrección post-hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con significancia establecida en $p < 0,05$.

20

Resultados:

Los ligandos de RGM y el receptor de neogenina se expresaron en células de linaje mesenquimal y osteoclastos. La expresión del gen de neogenina aumentó en cultivos inducidos a convertirse en osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,028$) y disminuyó en cultivos de adipocitos y osteoclastos en comparación con los osteoblastos ($p < 0,016$). (Figura 6A) La expresión del gen de RGMa aumentó en los osteoblastos en comparación con los cultivos de MSC ($p < 0,005$) y aumentó aún más en los cultivos inducidos a convertirse en adipocitos en comparación con los osteoblastos ($p < 0,0001$). (Figura 6B) Por el contrario, la expresión del gen de RGMb disminuyó en cultivos de osteoblastos ($p < 0,0035$), adipocitos ($p < 0,0005$) y osteoclastos ($p < 0,0035$) en comparación con las MSC. (Figura 6C) Se identificó la expresión del gen de RGMc en MSC y osteoblastos; sin embargo, la expresión de RGMc no cambió después de la adición de medios de osteoinducción. La expresión del gen de RGMc nunca se observó en adipocitos ni en osteoclastos. Se confirmó la expresión de genes específicos de linaje en osteoblastos, adipocitos y osteoclastos. La expresión de los genes de la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OCN) aumentó en los osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,049$). (Figura 6D) La PPARg, la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP4) y la perilipina aumentaron en los adipocitos frente a los cultivos de MSC ($p < 0,005$). (Figura 6E) Se observó la expresión de los genes de CD14, catepsina K (CSTK) y TRAP en los osteoclastos. (Figura 6F) La proteína RGMa de longitud completa y los fragmentos de la proteína RGMa solubles escindidos se expresaron en lisados de MSC. Se observó que la expresión de la proteína RGMb era robusta en cultivos de MSC. El fragmento de proteína RGMb soluble escindido también se identificó en proteínas derivadas de sobrenadantes recolectados de cultivos de MSC. La diferencia en el tamaño de la proteína entre la RGMa/RGMb de longitud completa y los fragmentos solubles escindidos tenían ambos aproximadamente 17 kD. No se pudo detectar RGMa en los osteoclastos. La expresión de la proteína RGMb fue robusta.

25

30

35

40

Ligandos de RGM localizados en tejido teñido con receptor de neogenina. Se observó tinción del receptor de neogenina en toda la placa de crecimiento, con una mayor tinción observada en los condrocitos más diferenciados de la zona hipertrófica frente a los condrocitos menos diferenciados de las zonas de reserva y proliferativa. Además, la tinción de neogenina fue robusta en el hueso adyacente a la placa de crecimiento en paralelo con la tinción de lectina de tomate, esta última que es un marcador de células de linaje mieloide. La tinción de RGMa solo se expresó débilmente junto a la placa de crecimiento. Se observó tinción de RGMb en los condrocitos de las zonas de reserva y de las zonas hipertróficas. Además, la tinción de RGMb fue intensa en la región de la metafisis adyacente a la placa de crecimiento, en consonancia con los altos niveles de expresión observados en MSC que son abundantes cerca de la unión condroósea de la placa de crecimiento. Se observó tinción de neogenina dentro de la médula ósea y se expresó en gran medida en los osteoblastos que recubren la superficie endóstica. Además, se observó tinción de neogenina dentro de la capa perióstica, dentro del tejido muscular adyacente y dentro de los osteocitos (flechas) ubicados en el hueso cortical. Se observó tinción de RGMa en los osteoblastos que recubren la superficie endóstica y dentro de la médula ósea. Se observó tinción de RGMb dentro de las células singulares dentro de la médula ósea y en los osteoblastos que recubren la superficie endóstica. La tinción de RGMa solo se observó en raras ocasiones en MSC cultivadas (flechas), mientras que la tinción de neogenina estuvo omnipresente en todos los cultivos de MSC. Se observó tinción de RGMb en MSC cultivadas que también dieron positivo para neogenina. También se observó tinción de RGMb en MSC cultivadas que se tiñeron con nucleostemina, que es un marcador fenotípico para MSC; sin embargo, no se pudo detectar RGMa en MSC que se tiñeron con nucleostemina. En consonancia con nuestros datos de expresión genética, la tinción de RGMb fue mayor en las MSC teñidas con nucleostemina que la tinción de RGMb observada en las células teñidas con neogenina.

45

50

55

60

65

La adición de ligandos de RGM a cultivos de MSC alteró la acumulación de minerales en el cultivo. La adición

de medios de inducción de osteoblastos a los cultivos de MSC produjo un aumento en la expresión de la proteína RGMa de longitud completa, mientras que no se observó ningún cambio en la expresión del fragmento RGMa soluble escindido. (Figura 7A) Por el contrario, la expresión de la proteína RGMb disminuyó en los cultivos de osteoblastos en comparación con los cultivos de MSC. (Figura 7B) El fragmento soluble escindido observado en los sobrenadantes de cultivo de MSC no pudo detectarse en los cultivos de osteoblastos. La adición del ligando de RGMa a MSC cultivadas inducidas a convertirse en osteoblastos produjo un ligero aumento dependiente de la dosis en la formación de minerales. (Figura 7C) Sin embargo, los efectos del ligando de RGMa sobre la formación de minerales no fueron mayores que el tratamiento con BMP2/7. En cambio, la administración del ligando de RGMb no logró aumentar la formación de minerales en los osteoblastos. (Figura 7C)

Los ligandos de RGM aumentaron el número de adipocitos y osteoclastos en cultivo. La adición del ligando de RGMa a los cultivos de MSC dio como resultado un aumento significativo, de 2 veces, en el número de adipocitos ($p < 0,0004$), independiente de la dosis. (Figura 8A) El ligando de RGMb también produjo un aumento significativo, de 2,5 veces, en el número de adipocitos ($p < 0,0037$) cuando se añaden a cultivos de MSC. (Figura 8B) La expresión del gen de RGMa fue mayor en los adipocitos y se observó que la tinción de RGMa se localizaba en grupos de células dentro de la médula ósea. Un análisis de estas regiones con el marcador de adipocitos FABP4 demostró que la tinción de RGMa se localizaba en estas regiones de tinción de FABP4 dentro de la médula ósea. También se observó que FABP4 tiñe las células endoteliales vasculares. En monocitos cultivados para convertirse en osteoclastos, la adición del ligando de RGMa produjo un aumento significativo de 1,72 veces en el número de osteoclastos ($p < 0,002$). (Figuras 8C-E) Además, la adición del ligando de RGMb también produjo un aumento significativo, de 1,55 veces, en el número de osteoclastos en cultivo ($p < 0,007$).

Los ligandos de RGM disminuyeron la curación ósea cuando se añadieron a un defecto unicortical. La adición de RGMa a los defectos unicorticales produjo una disminución significativa del volumen óseo dentro del defecto (Bv/Tv) ($p < 0,033$). (Figura 9A) Paralelamente, el tratamiento con el ligando de RGMb produjo una disminución significativa de Bv/Tv dentro de los defectos unicorticales ($p < 0,002$). (Figura 9A) La disminución de Bv/Tv después de la adición de RGMb se correspondió con una disminución significativa en el número trabecular (TbN) ($p < 0,01$). (Figura 9B) Tanto la adición de RGMa ($p < 0,014$) como de RGMb ($p < 0,012$) dieron como resultado una disminución significativa del espesor trabecular (TbTh). (Figura 9C) También se midió el diámetro del defecto; sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el diámetro del defecto cuando los animales fueron tratados con cualquiera de los dos ligandos de RGM. (Figura 9D) La tinción de TRAP reveló un aumento en la cantidad de osteoclastos en los defectos unicorticales tratados con RGMa o RGMb. (Figura 10A-I) En concreto, no se observó tinción de TRAP dentro de los defectos unicorticales del grupo de control, mientras que se observó tinción de TRAP en todos los defectos de los ratones tratados con RGMa o RGMb. (Figura 10G, 10H y 10I) En paralelo, la tinción de OTC para aposición mineral fue significativa en los defectos unicorticales de los grupos de control. (Figura 10J) Los defectos unicorticales tratados con RGMa o RGMb tuvieron muy poca tinción de OTC, lo que sugiere que se produce una reducción del crecimiento de hueso nuevo dentro del defecto. (Figura 10K y 10L)

Ejemplos 3: Los ligandos de Slit1 y Slit2 aumentaron la formación ósea mientras que Slit3 aumentó la reabsorción ósea.

Métodos: Se extrajo médula ósea humana de pacientes adultos que dieron su consentimiento y se sometieron a una artroplastia total de cadera femoral proximal primaria electiva o a una artroplastia total de rodilla femoral distal primaria electiva ($n = 6$, (edad media de 65 años) como parte de un estudio aprobado por el IRB. Las MSC humanas se derivaron de la fracción adherente de aspirados de médula ósea completa. Los monocitos se derivaron de la fracción no adherente de la médula ósea y se enriquecieron a través de un subcultivo separado utilizando 100 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos humanos recombinantes (MCSF; Wyeth). En experimentos paralelos descritos a continuación, se recogieron los fémures de ratones macho de 3 semanas ($n = 10$) y 16 semanas ($n = 20$) de edad y a continuación se extrajo la médula ósea del fémur de acuerdo con lo siguiente: Se insertó una aguja de calibre 21 en el canal intramedular femoral después de retirar los extremos proximal y distal del fémur. A continuación se pasó cuidadosamente el medio a través del extremo proximal del fémur, lo que obligó a la médula ósea a salir del hueso. Por último, el sedimento de médula ósea se disoció mecánicamente utilizando una aguja de calibre 18 y a continuación se pasó a través de un filtro de malla de 70 μm . Estos aspirados de médula ósea completa se utilizaron para generar osteoclastos. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (v/v) y 1 % de penicilina-estreptomina-glutamina (PSG; Cellgro, Mediatech). Ligandos de slit humana recombinante (slit1, slit2 o slit3) se diluyeron en PBS (R&D Systems). El comité responsable del IACUC aprobó todos los estudios con animales descritos en este trabajo.

Análisis de expresión genética: Las MSC, los osteoblastos y los adipocitos derivados de médula ósea humana se analizaron para detectar cambios en la expresión genética. En paralelo, también se analizaron osteoclastos derivados de monocitos humanos para detectar cambios en la expresión de genes mieloides. Los datos genéticos se derivaron de dos muestras generadas independientemente recolectadas de al menos tres pacientes. El ARNm se purificó utilizando columnas RNeasy Plus Mini (Qiagen) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La expresión genética se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando 100 ng de ADNc mezclado con Fast Plus EvaGreen Master Mix (Biotium). En cada experimento, la GAPDH sirvió como control, los controles negativos no contenían plantilla y se generó una curva patrón utilizando diluciones seriadas de una secuencia sintetizada

químicamente para la GAPDH (0, 1, 10 y 100 femtogramos; Integrated DNA Technologies). La expresión genética se evaluó utilizando el método de Pfaffl, en el que la eficiencia de cada cebador (E) y la concentración del producto génico inicial (N_0) se calculan a partir de la región lineal de la curva del umbral de cruce de fluorescencia utilizando el software LinRegPCR (v2013.0). Los experimentos se consideraron válidos cuando el gen de control de GAPDH se encontraba dentro de la curva patrón y se calculó que las eficiencias del cebador (E) eran $E \geq 1,8$. La presencia de un solo producto genético se confirmó mediante un análisis de curva de fusión y el tamaño del producto se confirmó mediante electroforesis en gel del producto genético.

Expresión de proteínas mediante análisis Western Blot: Las MSC, los osteoblastos y los osteoclastos humanos se lisaron con tampón RIPA frío (Pierce Thermo Scientific) que contenía yodoacetamida 2 mM, clorhidrato de benzamidina 2 mM, etilmaleimida 0,1 mM, 1 % de PMSF y el cóctel inhibidor de la proteasa Halt (Pierce Thermo Scientific). También se analizó la proteína a partir de muestras de sobrenadante derivadas de cultivos de MSC. Se analizaron lisados de proteínas de al menos dos réplicas generadas a partir de tres muestras de pacientes. La proteína total se analizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cargaron (20 µg/pocillo) en un gel prefabricado Mini-Protean Tris-Tricine al 10-20 % (Bio-Rad) con la escalera de proteínas NIR preteñida Page Ruler (Bio-Rad) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnologies) dirigidos contra slit1 (1:500), slit2(1:500), slit3(1:500), ROBO1 o ROBO4 se identificaron en membranas bloqueadas con leche descremada al 5 %. La vinculina (1:500) o la actina (1:500) sirvieron como controles de carga. Los anticuerpos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con micropolímero conjugado con HRP (kit ImmPress, Vector Labs) junto con el sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad). Se utilizaron lisados de proteína de cerebro de ratón (mB) como controles de expresión positiva.

Inmunofluorescencia y morfología: Las tibias de ratones de 3 semanas ($n = 10$) y 16 semanas ($n = 20$) de edad se fijaron en paraformaldehído al 2 %, simultáneamente descalcificado y crioprotegido utilizando una solución del 15 % de EDTA y el 30 % de sacarosa, y a continuación congelado rápidamente utilizando nitrógeno líquido y seccionado a 8 µm utilizando un criomicrotomo (Leica 3050). Se identificaron patrones en la expresión de ligando y receptor utilizando los siguientes anticuerpos primarios: slit1 (1:250), slit2(1:250), slit3(1:250), ROBO1(1:500), ROBO2(1:500), ROBO4 (1:500) y FABP4 (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos secundarios Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Las MSC también se cultivaron en discos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las MSC se incubaron con anticuerpos primarios contra slit1 (1:250), slit2(1:250), slit3(1:250), ROBO1(1:250), ROBO4 (1:250) y nucleostemina (1:250). Los anticuerpos se detectaron utilizando anticuerpos Alexa Fluor-488 o -568 (1:500; Invitrogen). Los núcleos se contratiñeron con 10 µg/ml de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma).

Osteogénesis: El potencial osteogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la formación de minerales. Se sembraron MSC de al menos tres pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir y entrelazar antes de la adición de medios de osteoinducción. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 20 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con 25 µg/ml de ascórbico-2-fosfato (Sigma), dexametasona 100 nM (Sigma) y el siguiente régimen de dosificación de β -glicerofosfato (BGP; Sigma): 1x cambio de medio con BGP 5 mM, 1x cambio de medio con BGP 10 mM y 1x cambio de medio con BGP 20 mM. Ligandos de slit (1, 10 y 100 ng) se añadieron en cada cambio de medio posterior a la inducción. Los pocillos de control positivo se trataron con 25 ng del ligando BMP2/BMP7 humano recombinante (R&D Systems) con la primera adición de medio de inducción. Tras la aparición de nódulos minerales, las células se fijaron con EtOH helado al 70 % (Sigma) y a continuación se tiñeron con rojo de alizarina-S 40 mM (pH 4,2, Sigma). Los experimentos de osteogénesis se repitieron al menos dos veces para cada paciente.

Adipogénesis: El potencial adipogénico en MSC se evaluó induciendo químicamente la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos. Se sembraron MSC de al menos tres muestras de pacientes humanos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo y se dejaron confluir antes de la adición de medios de adipoinducción. Los medios de inducción consistieron en DMEM que contenía el 10 % de FCS (v/v) y el 1 % de PSG suplementado con rosiglitazona 5 µM (Cayman Chemical), 3-isobutil-1-metilxantina 500 µM (IBMX; Sigma), dexametasona 1 µM (Sigma) y 1 µg/ml de insulina humana recombinante (rInsulin, Sheffield Bio-Science). Medios de inducción que incluyen los ligandos de slit (1, 10 y 100 ng) se añadieron a los cultivos en cada cambio de medio; 2 cambios de medios durante un período de 7 días posterior a la inducción. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 2 % y se obtuvieron imágenes con el colorante fluorescente lipofílico rojo Nilo (excitación a 488 nm; Sigma). Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Las estimaciones del número de adipocitos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri junto con una modificación de la técnica del fraccionador utilizada en la estereología imparcial, en la que un pozo particular se dividió en secciones paralelas que servían como regiones de recuento. Los experimentos de adipogénesis se repitieron al menos dos veces.

Tinción de TRAP y determinación del número de osteoclastos: Los osteoclastos se derivaron de una población enriquecida de monocitos humanos o de aspirados de médula ósea completa no enriquecida de ratón. Se analizaron tres muestras de médula ósea de pacientes humanos en paralelo con muestras recolectadas de médula ósea de ratón de 3 semanas ($n = 10$) y 16 semanas ($n = 20$). La fracción de monocitos se estimuló para convertirse en osteoclastos cultivando 1×10^6 células con 25 ng/ml de MCSF y 25 ng/ml de ligando de RANK humano o de ratón recombinante (R&D Systems) en presencia de los ligandos de slit1, slit2 o slit3 (100 ng). Los osteoclastos se tiñeron con fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP; Kit de fosfatasa ácida leucocitaria Sigma 387-A) y se contaron cuando las células

daban positivo para TRAP y tenían al menos tres núcleos. Las estimaciones del número de osteoclastos se obtuvieron mediante el muestreo de Cavalieri y una modificación de la técnica del fraccionador.

Modelo de defecto unicortical: A ratones macho C57BL/6 de 3 semanas de edad ($n = 5$ por grupo de tratamiento) se les inyectó uno de los ligandos de slit (slit1, slit2 o slit3) después de la creación de un defecto unicortical. Brevemente, se realizó una pequeña incisión (de aproximadamente 3 mm) justo debajo de la articulación de la rodilla, ubicada en el lado medial de la tibia, justo debajo de la tuberosidad tibial en la cresta tibial. En animales jóvenes la placa fisaria es claramente visible y la broca se colocó aproximadamente 1 mm por debajo de este punto. La broca produce un defecto unicortical con dimensiones de 300 μm de diámetro x 1 mm de profundidad. Se utilizó una jeringa Hamilton Neuros RN de 10 μl con una aguja de punta roma de calibre 33 para inyectar los ligandos de slit (slit1, slit2 o slit3 a 100 ng en 2 μl) directamente en el defecto unicortical a una tasa no superior a aproximadamente 0,1 μl por segundo. Las tibias de la extremidad izquierda sirvieron como controles quirúrgicos contralaterales, en las que los animales recibieron un defecto unicortical y se inyectaron 2 μl de solución salina. A estos mismos ratones se les inyectó oxitetraciclina (50 $\mu\text{g/kg}$; OTC) administrada por vía intraperitoneal para medir la aposición ósea 48 horas antes de la eutanasia. Los ratones fueron sacrificados 5 días después de la cirugía, se recogieron las extremidades traseras y se fijaron las tibias para inmunofluorescencia, tinción de TRAP y crecimiento óseo asociado a OTC.

Análisis MicroCT de defectos unicorticales: Se adquirieron imágenes de alta resolución de la tibia con un sistema de imágenes μCT ($\mu\text{CT}40$; Scanco Medical). Las tibias se escanearon a 45 keV con un tamaño de vóxel isotrópico de 12 μm . Se seleccionó una región de análisis de las secciones axiales para incluir todo el defecto unicortical delimitado por la pared cortical endóstica. El volumen óseo corregido por volumen (volumen óseo/volumen total; Bv/Tv), el número trabecular (TbN) y el espesor trabecular (TbTh) se calcularon utilizando el software Scanco. El diámetro máximo del defecto se determinó utilizando estereología imparcial, en la que se midió la distancia lineal máxima entre lados opuestos del defecto a través de secciones seriadas. El diámetro máximo se determinó utilizando el plug-in BoneJ para Imaged (NIH Research Services Branch; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Análisis estadísticos: Para analizar los datos se utilizó el software estadístico Prism (Graphpad). Se calcularon las medias y las desviaciones típicas. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías utilizando la corrección post-hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con significancia establecida en $p < 0,05$.

Resultados:

Los ligandos de slit y los receptores de ROBO se observaron en células MSC y de linaje mieloide. La expresión del gen de slit2 aumentó en los osteoblastos ($p < 0,021$) mientras que la expresión del gen de slit3 disminuyó en los osteoblastos ($p < 0,002$) y los osteoclastos ($p < 0,001$). (Figura 11A y 11B) La expresión del gen del receptor de ROBO1 aumentó significativamente en los osteoblastos en relación con las MSC ($p < 0,018$) mientras que la expresión del gen de ROBO2 solo se observó en los osteoblastos. (Figura 11C) La expresión del gen del receptor de ROBO4 aumentó significativamente en los osteoclastos en relación con los osteoblastos y las MSC ($p < 0,005$). (Figura 11D) La expresión de los genes de la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OCN) aumentó en los osteoblastos en comparación con las MSC ($p < 0,01$ y $p < 0,015$, respectivamente). (Figura 11E) Se observó la expresión de los genes de CD14, cathepsina K (CTSK) y TRAP en los osteoclastos. (Figura 11F) La expresión de Slit3 se confirmó mediante inmunquímica, que mostró que la expresión de slit3 era abundante en la médula ósea y dentro del hueso cortical. El receptor de ROBO1 teñido se observó en los osteoblastos de la capa endóstica, consistente con los datos genéticos.

Slit1 y Slit2 aumentaron la formación de minerales y aumentaron el número de adipocitos, mientras que slit1 suprimió el número de osteoclastos. La adición de slit1 o slit2 a cultivos de MSC inducidos a convertirse en osteoblastos aumentó la formación de minerales en el cultivo, mientras que slit3 pareció inhibir la acumulación de minerales a la dosis de ligando de 100 ng. (Figura 12A) Curiosamente, la adición de slit1, slit2 o slit3 aumentó el número de adipocitos; sin embargo, el aumento en el número de adipocitos (células grasas) observado no dependió de la dosis. (Figura 12B - 12D) Específicamente, dosis de 1 y 10 ng de slit1 aumentaron el número de adipocitos ($p < 0,015$) mientras que dosis de 100 ng de slit2 disminuyeron el número de adipocitos ($p < 0,012$). La adición de 1 ng de slit3 disminuyó el número de adipocitos ($p < 0,0001$) mientras que las dosis de 10 y 100 ng aumentaron el número de adipocitos ($p < 0,015$). Cuando se añadió slit1 a cultivos de monocitos inducidos a convertirse en osteoclastos, el número de osteoclastos disminuyó sustancialmente en relación con los controles no tratados ($p < 0,0002$). (Figura 12E - 12G) Por el contrario, la adición de slit2 o slit3 produjo un aumento en el número de osteoclastos en relación con los cultivos de control no tratados ($p < 0,0001$). (Figura 12E - 12G)

Slit1 y slit2 aumentaron la curación ósea y la formación ósea en un defecto unicortical. Los defectos unicorticales tratados con el ligando de slit1 o slit2 tenían sustancialmente más hueso dentro del defecto 5 días después de la cirugía en comparación con los controles contralaterales tratados con PBS. El Bv/Tv (volumen óseo) dentro del defecto aumentó 2,8 veces en los ratones tratados con slit1 ($p < 0,001$) y aumentó un 74,2 % en los ratones tratados con slit2 ($p < 0,0003$). (Figura 13A) Slit3 no tuvo efecto sobre la curación ósea. Además, no hubo efecto de los ligandos de slit sobre el número trabecular. (Figura 13B) Sin embargo, la adición de slit1 o slit al defecto aumentó el espesor trabecular ($p < 0,0015$) mientras que la adición del ligando de slit3 no tuvo ningún efecto. (Figura 13C)

Ejemplo 4: Los ligandos de netrina, RGM y slit no estimulan la proliferación de tumores de sarcoma a pesar

de poseer receptores de neogenina, UNC5 y ROBO.

Métodos: Se extrajo médula ósea humana de pacientes adultos que dieron su consentimiento y se sometieron a una artroplastia total de cadera femoral proximal primaria electiva o a una artroplastia total de rodilla femoral distal primaria electiva (n = 6, (edad media de 65 años) como parte de un estudio aprobado por el IRB. Las MSC humanas se derivaron de la fracción adherente de aspirados de médula ósea completa. Células tumorales de sarcoma de Ewing (RDES, Hs822 y Hs863) y células tumorales de osteosarcoma SaOS2 se obtuvieron de la ATCC. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (v/v) y 1 % de penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG; Cellgro, Mediatech). Ligandos de netrina humana recombinante (netrina-1 o netrina-4), ligandos de RGM (RGMa o RGMb) o ligandos de slit (slit1, slit2 o slit3) se diluyeron en PBS (R&D Systems).

Análisis de expresión genética: Las MSC, los osteoblastos y los adipocitos derivados de médula ósea humana se analizaron para detectar cambios en la expresión genética. En paralelo, también se analizaron osteoclastos derivados de monocitos humanos para detectar cambios en la expresión de genes mieloides. Los datos genéticos se derivaron de dos muestras generadas independientemente recolectadas de al menos tres pacientes. El ARNm se purificó utilizando columnas RNeasy Plus Mini (Qiagen) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La expresión genética se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando 100 ng de ADNc mezclado con Fast Plus EvaGreen Master Mix (Biotium). En cada experimento, la GAPDH sirvió como control, los controles negativos no contenían plantilla y se generó una curva patrón utilizando diluciones seriadas de una secuencia sintetizada químicamente para la GAPDH (0, 1, 10 y 100 femtogramos; Integrated DNA Technologies). La expresión genética se evaluó utilizando el método de Pfaffl, en el que la eficiencia de cada cebador (E) y la concentración del producto génico inicial (N₀) se calculan a partir de la región lineal de la curva del umbral de cruce de fluorescencia utilizando el software LinRegPCR (v2013.0). Los experimentos se consideraron válidos cuando el gen de control de GAPDH se encontraba dentro de la curva patrón y se calculó que las eficiencias del cebador (E) eran E ≥ 1,8. La presencia de un solo producto genético se confirmó mediante un análisis de curva de fusión y el tamaño del producto se confirmó mediante electroforesis en gel del producto genético.

Inmunofluorescencia y morfología: Las muestras de biopsia de tumor de sarcoma de archivo (n = 7) se tiñeron para los receptores de neogenina, UNC5b, NGL1, ROBO1 y ROBO4 (1:100) en un estudio aprobado por el IRB. Los anticuerpos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con micropolímero conjugado con HRP (kit ImmPress, Vector Labs) junto con el sustrato cromógeno de peroxidasa ImmPACT NovaRed (Vector Labs). Las secciones se contratiñeron con verde de metilo al 2 %.

Ensayo del número de células: Tras la adición de uno de los ligandos de netrina, RGM o slit, se determinó el número de células viables con el ensayo MTT. A cada pocillo, se le administró 100 ng de netrina-1, netrina-4, RGMa, RGMb, slit1, slit2 o slit3. Después de 72 horas, MTT (5 mg/ml (p/v), Sigma) se añadió a cada pocillo, se incubó durante 2 horas, después de lo cual las células se lisaron con 500 µl de DMSO (Sigma). El MTT se midió a 570 nm y los efectos de la terapia sobre la proliferación celular se determinaron normalizando los pocillos tratados en relación con los valores medios de los pocillos no tratados: Variación en el número de células = 100*[densidad óptica de células tratadas/densidad óptica media del control].

Análisis estadísticos: Para analizar los datos se utilizó el software estadístico Prism (Graphpad). Se calcularon las medias y las desviaciones típicas. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías utilizando la corrección post-hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con significancia establecida en p<0,05.

Resultados:

Los tumores de osteosarcoma y sarcoma de Ewing expresan los receptores del ligando de netrina, RGM y slit.

Los genes del factor de crecimiento neurotrófico y del receptor se expresaron ampliamente en MSC, osteoblastos (OB), sarcoma de Ewing (RDES, (Hs822 y Hs863) y osteosarcoma (SaOS2). Sin embargo, los siguientes genes no se observaron en las siguientes líneas celulares de sarcoma: No se observó RGMa en células Hs863. UNC5c no estaba presente en células RDES, Hs822 o Hs863. No se observó UNC5d en células Hs822 o Hs863. No se midió NGL3 en células Hs822, Hs863 o SaOS2. No se identificó DSCAM en las células Hs822 o Hs863. Slit1 no estaba presente en las células Hs822 mientras que el receptor de ROBO4 no se observó en las células RDES o Hs822. Además, solo se observó DCC en las células RDES (p<0,0125) mientras que ROBO3 no se observó en ninguna de las líneas de células de sarcoma. Aunque se expresaron, no se observó un aumento significativo de la expresión de los genes de NTN5, slit2, o BOC en comparación con las MSC o los osteoblastos. En cambio, los siguientes genes se expresaron significativamente en una de las líneas de células tumorales de sarcoma en comparación con las MSC: NTN1 se expresó en células SaOS2 (p<0,0018). NTN3 se midió en células RDES (p<0,006). NTNG1 y NTNG2 se observaron en células SaOS2 (p<0,001) y células Hs822 (p<0,0005), respectivamente. UNC5d estuvo presente en células RDES y SaOS2 (p<0,009). Se midió DSCAM en RDES (p<0,001). NGL1, NGL2 y NGL3 se observaron en células RDES (p<0,02). Slit1 y CDON se midieron en células RDES (p<0,04) mientras que SRGAP2 y ROBO2 se observaron en células SaOS2 (p<0,011). NTN4, RGMb y slit3 aumentaron significativamente en las células Hs822 en comparación con las MSC (*, p<0,003). (Figura 14A, 14B y 14C) Por el contrario, NTN4, RGMb y slit3 también disminuyeron significativamente en células RDES, Hs863 y SaOS2 en comparación con las MSC (*, p<0,03). La expresión del gen

de neogenina aumentó significativamente en RDES y SaOS2 en comparación con las MSC (*, $p < 0,0485$). (Figura 14D) La expresión del gen de UNC5b aumentó significativamente en las células Hs822 y Hs863 en comparación con las MSC (*, $p < 0,009$). (Figura 14E) ROBO1 aumentó significativamente en las células RDES en comparación con las MSC (*, $p < 0,0025$). (Figura 14F) Se confirmó la expresión de los receptores de neogenina, UNC5b, NGL1, ROBO1 y ROBO4 en muestras de biopsia de tumor de sarcoma de Ewing positivas para CD99 (tinción marrón). (Figura 15)

La adición de ligandos de netrina, RGM y slit no aumentaron el número de células tumorales de sarcoma en el cultivo. La adición de 100 ng del ligando de RGMa o RGMb produjo una disminución del 12 % en el número de células tumorales RDES ($p < 0,0025$). (Figura 16A) La adición de 100 ng de ligando de slit3 produjo una disminución del 20 % en el número de células tumorales RDES ($p < 0,001$). (Figura 16B) Se observaron aumentos más pequeños en las otras líneas de células tumorales. Los ligandos de NTN1, NTN4, slit1 y slit2 no tuvieron efecto sobre la proliferación de células tumorales.

Sumario de los resultados de los Ejemplos 1 a 4:

Los ligandos de netrina, slit y RGM se unen al colágeno y a dos componentes principales de las matrices de colágeno: heparina y laminina.

Los ligandos de netrina-1 y netrina-4 aumentan la formación ósea y reducen la reabsorción ósea (destrucción) a través de una reducción en el número de osteoclastos.

Los ligandos de slit1 y slit2 aumentan la formación ósea; sin embargo, solo el ligando de slit1 reduce la destrucción ósea a través de una reducción en el número de osteoclastos.

El ligando de slit3 no cambia significativamente la masa ósea, pero sí aumenta el número de osteoclastos, lo que sugiere que puede ser útil como tratamiento para la osteopetrosis (aumento patológico de la formación ósea).

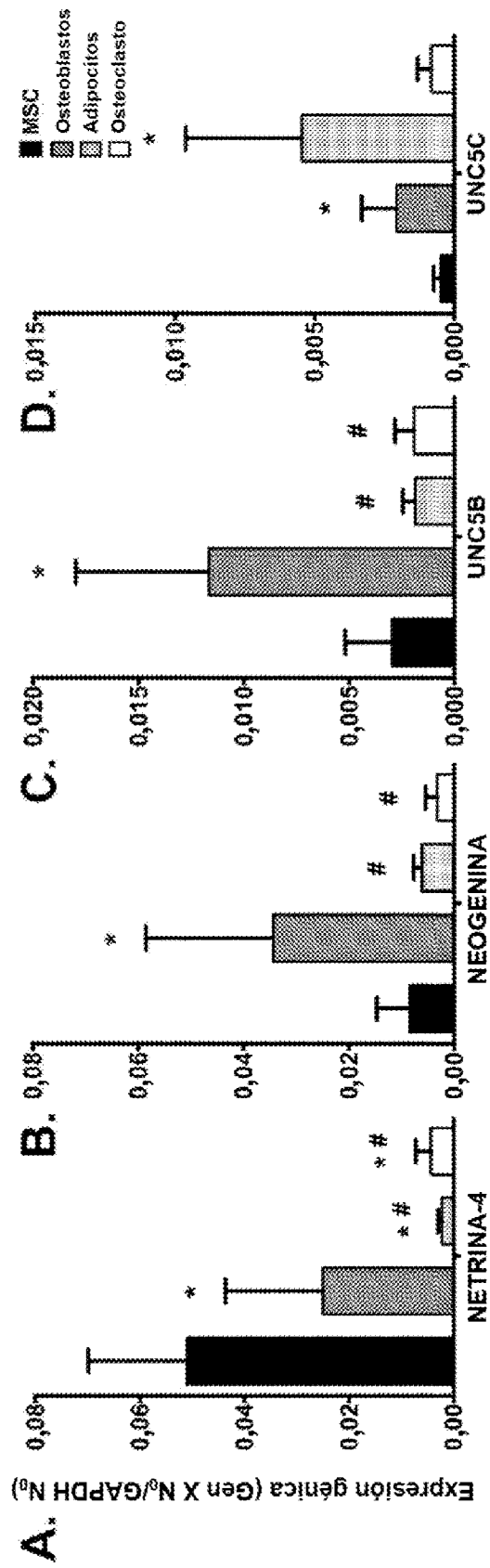
Los ligandos de RGMa y RGMb aumentaron el número de osteoclastos y no lograron aumentar la masa ósea, lo que sugiere que ambos podrían ser útiles como terapias para la osteopetrosis.

Los ligandos de netrina-1 y netrina-4 disminuyeron el número de adipocitos (células grasas), lo que sugiere que estos ligandos podrían usarse para tratar la mayor acumulación de grasa que se produce en la médula ósea de los huesos osteonecróticos.

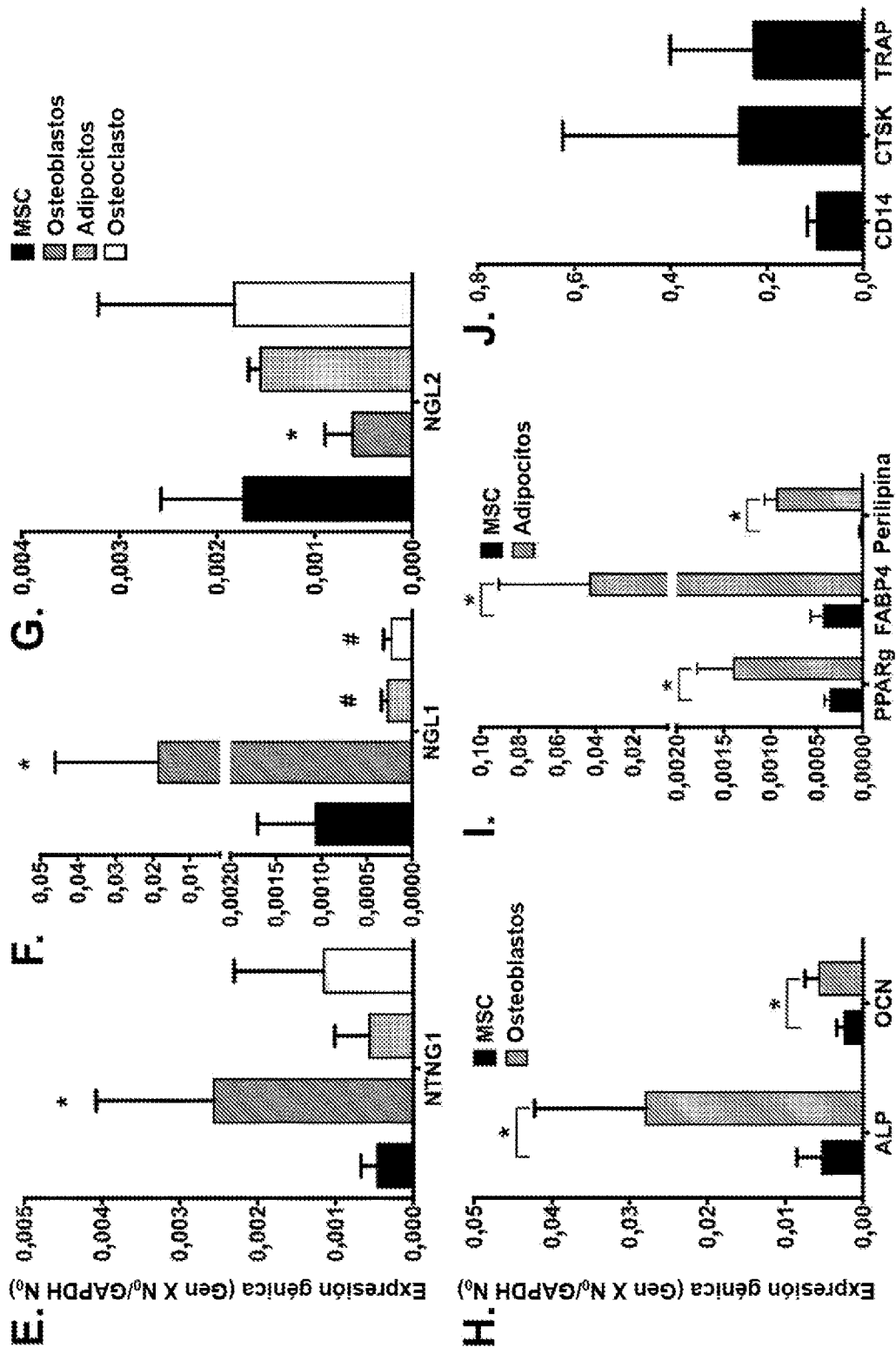
A pesar de poseer receptores del ligando de netrina, RGM o slit, los ligandos de netrina-1, netrina-4, RGMa, RGMb, slit1, slit2 o slit3 no lograron aumentar la proliferación de células tumorales del sarcoma.

REIVINDICACIONES

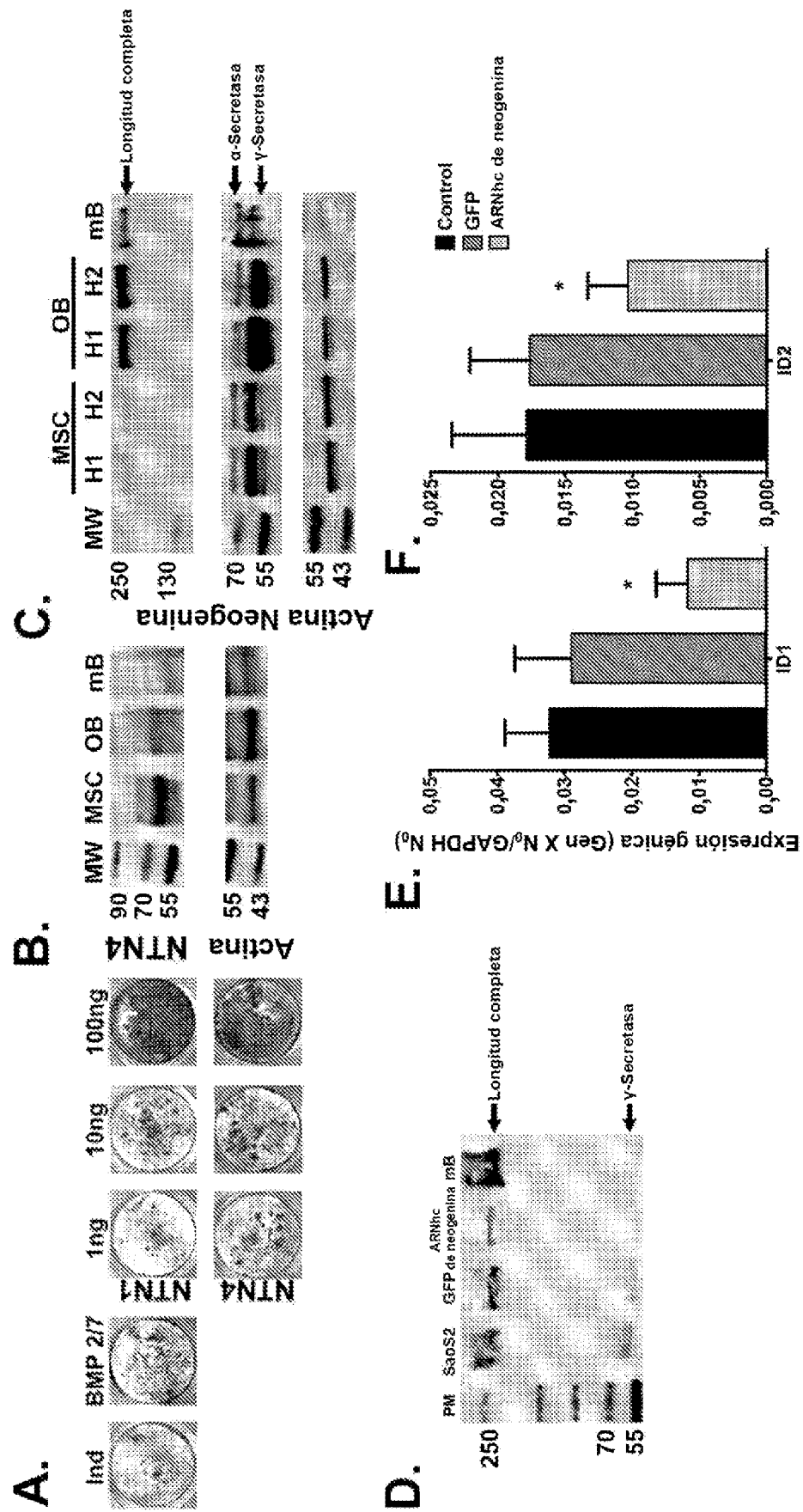
1. Un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de un sitio de lesiones ortopédicas en el hueso o intervenciones quirúrgicas en el hueso, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en netrina-1 y netrina-4, y en donde dicho método comprende administrar al menos un polipéptido seleccionado del grupo.
5
2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en donde la administración promueve la formación ósea.
3. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho método comprende además administrar slit2.
10
4. Un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la osteopetrosis, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en RGMa y RGMb, y la administración inhibe la formación ósea y aumenta la formación de osteoclastos.
15
5. El polipéptido para su uso según la reivindicación 4, en donde dicho método comprende además administrar slit3.
6. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1 o 4, en donde dicho polipéptido se administra con un portador a base de colágeno, ya sea en forma de esponja de colágeno, un colágeno en polvo, o un hidrogel de gelatina a base de colágeno.
20
7. El polipéptido para su uso según la reivindicación 6, en donde el portador a base de colágeno es un implante y tiene capas alternas de polipéptidos que se liberan durante un período de tiempo.



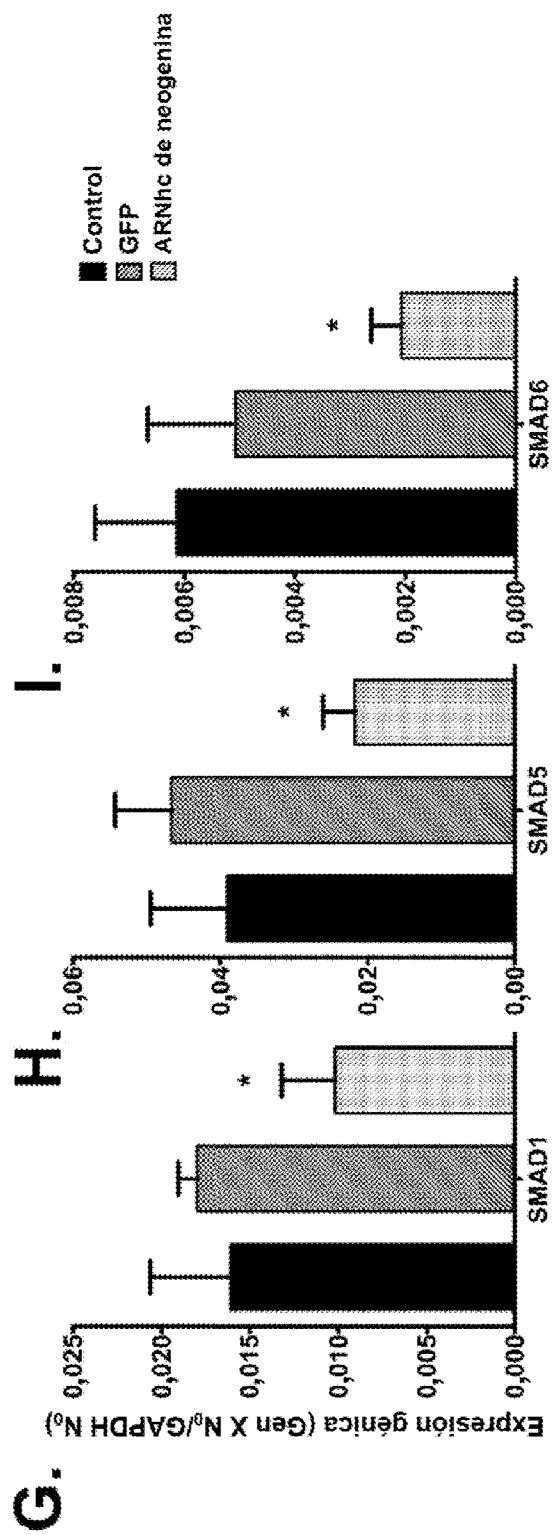
FIGURAS 1A-1D



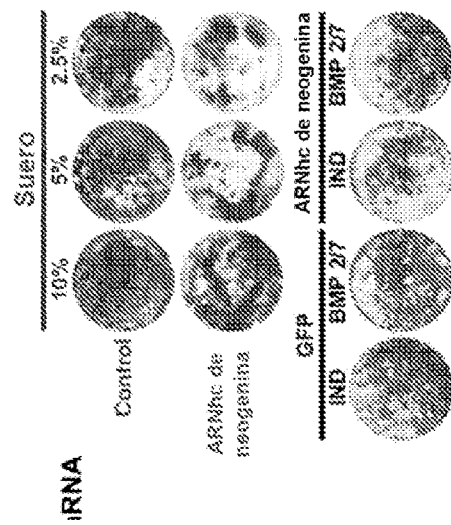
FIGURAS 1E-1J



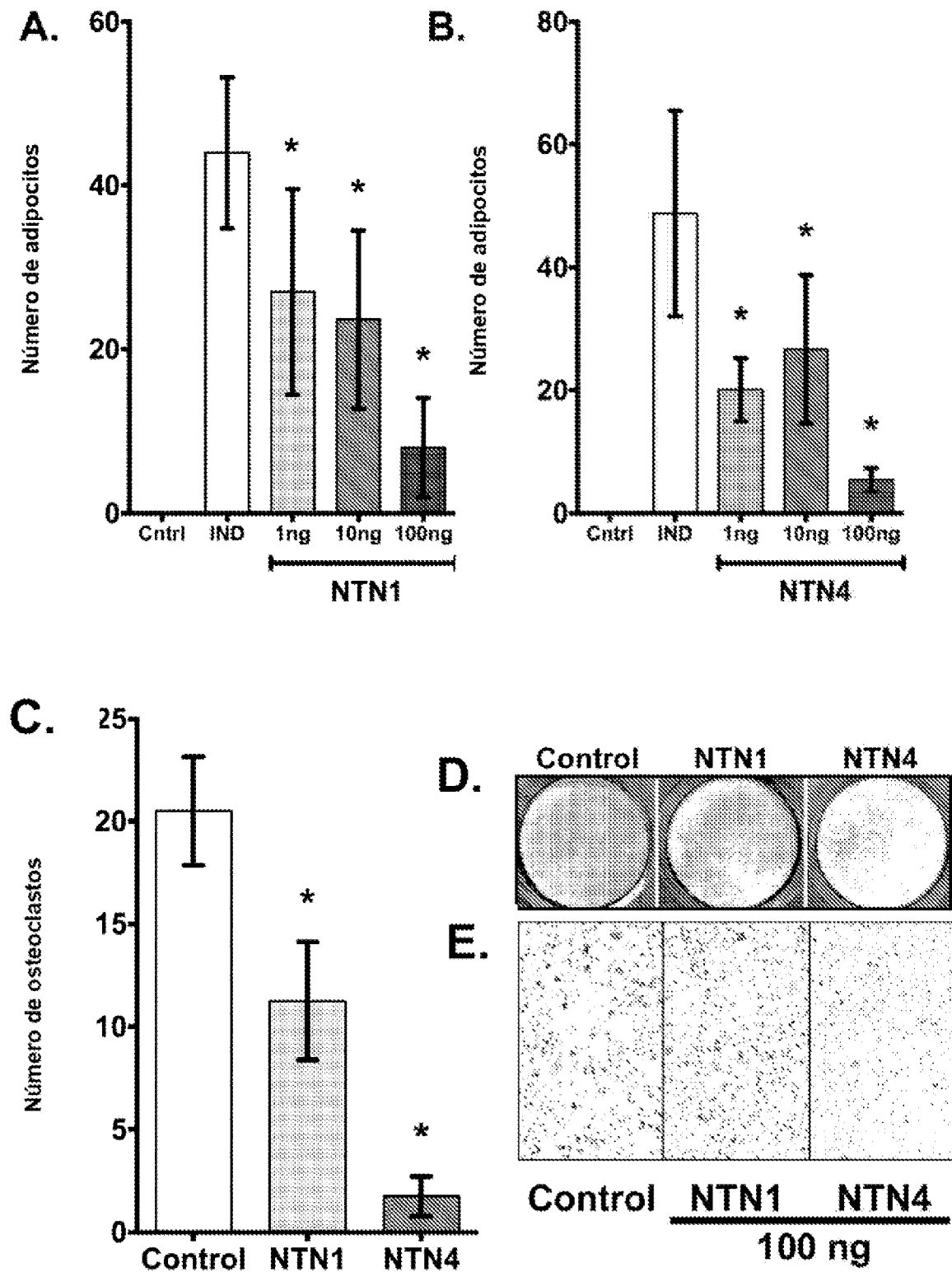
FIGURAS 2A-2F



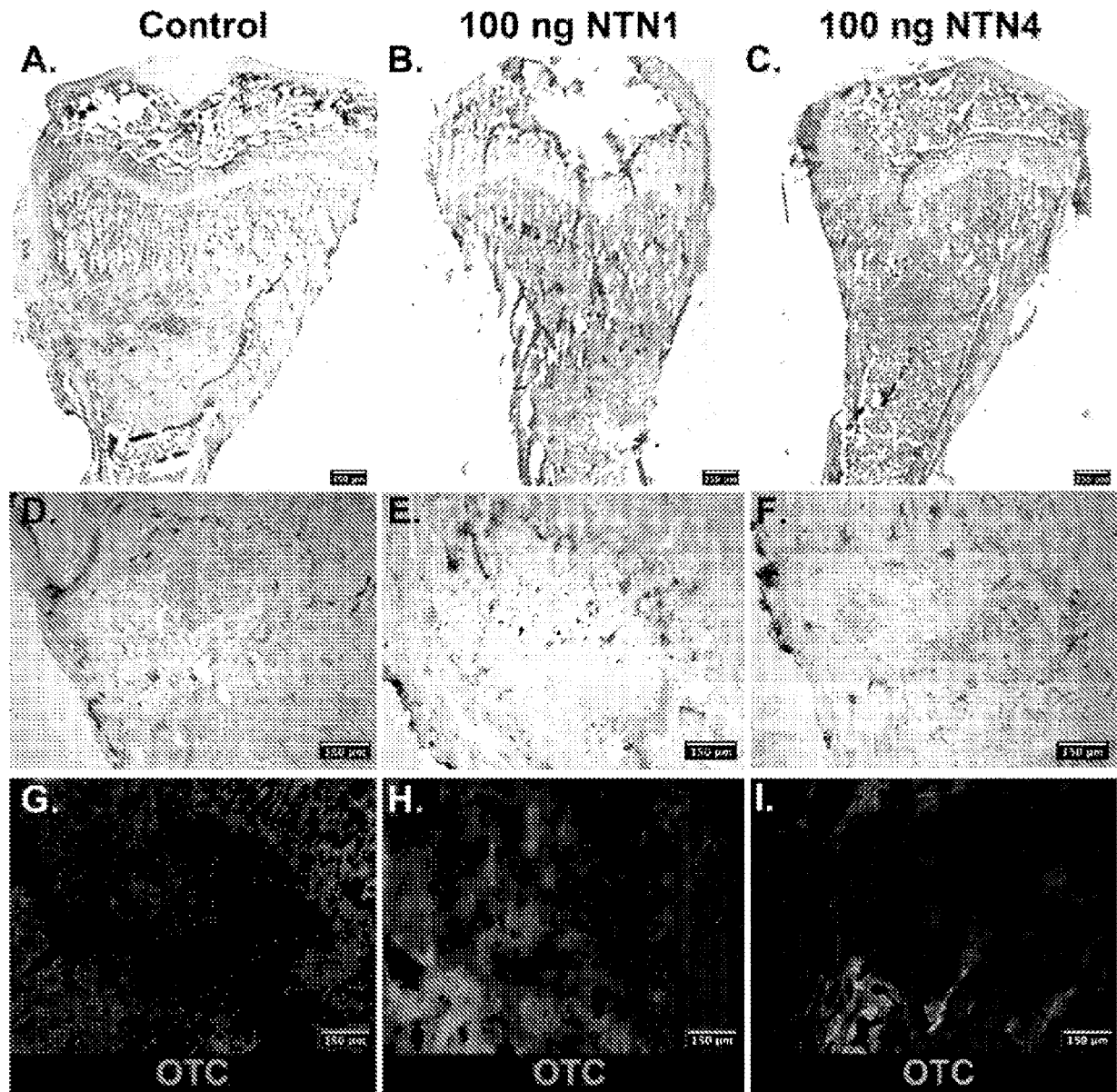
J.



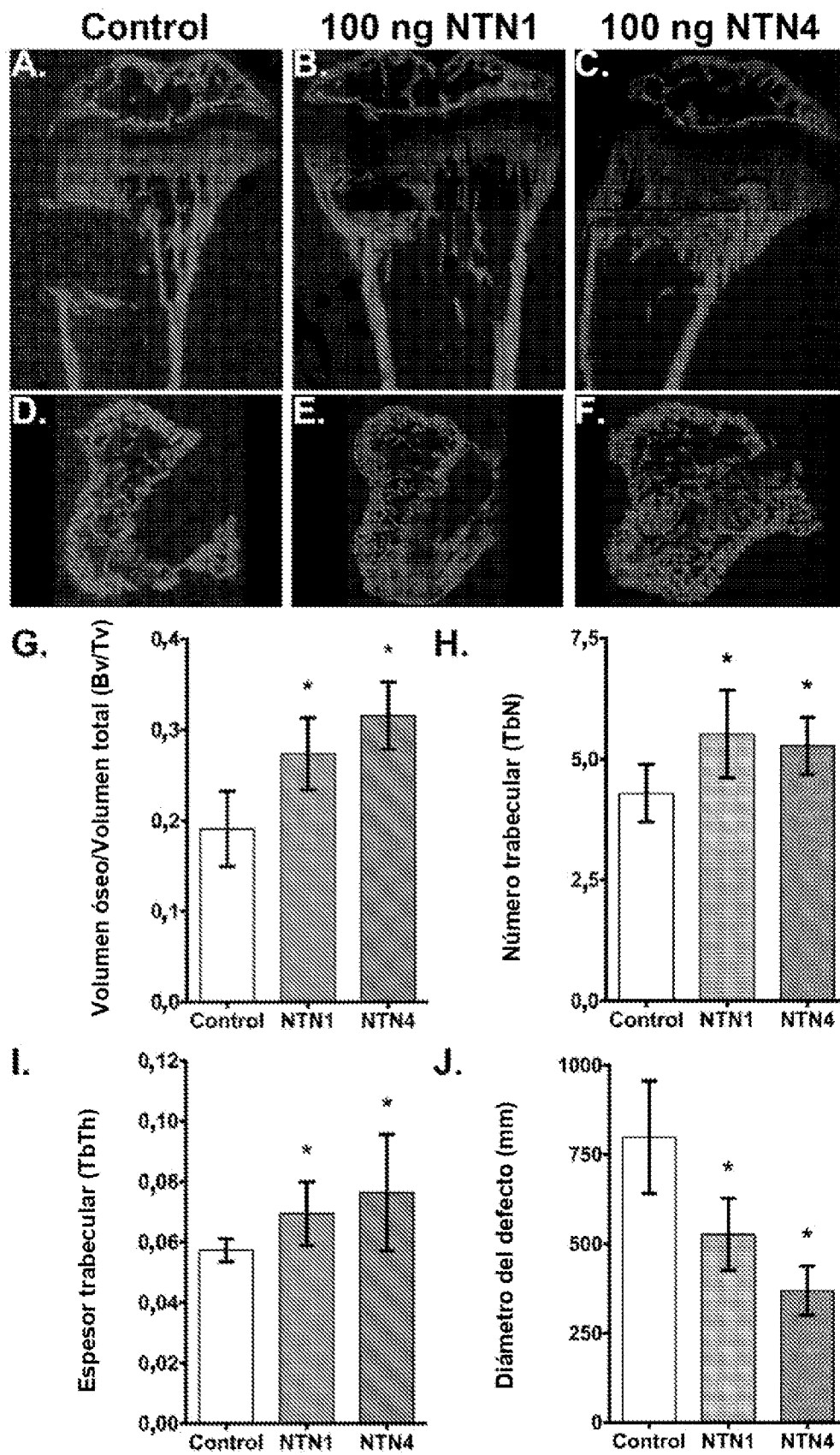
FIGURAS 2G-2J



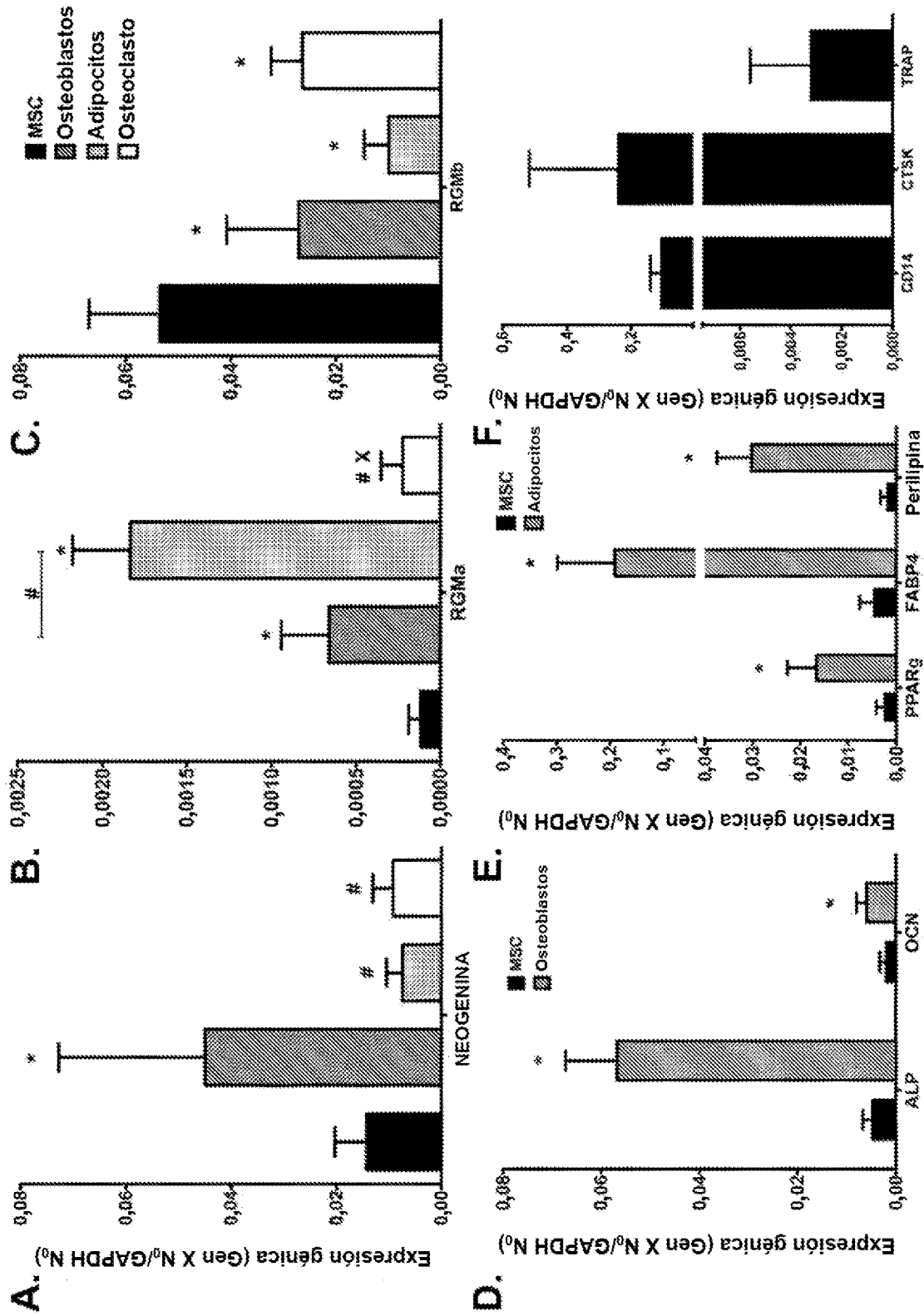
FIGURAS 3A-3E



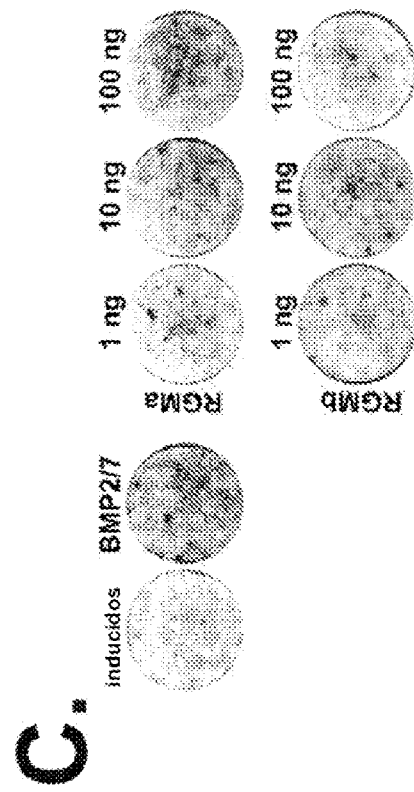
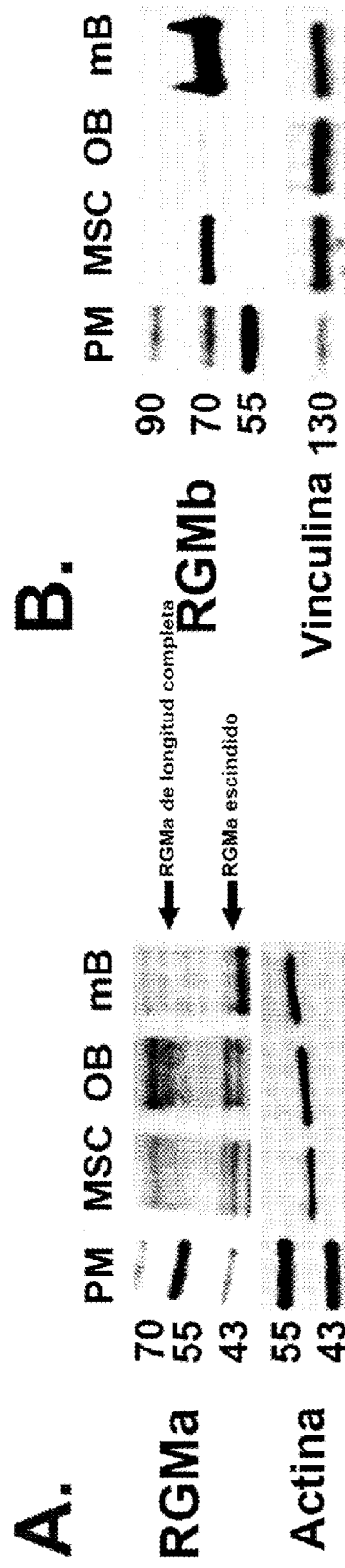
FIGURAS 4A-4I



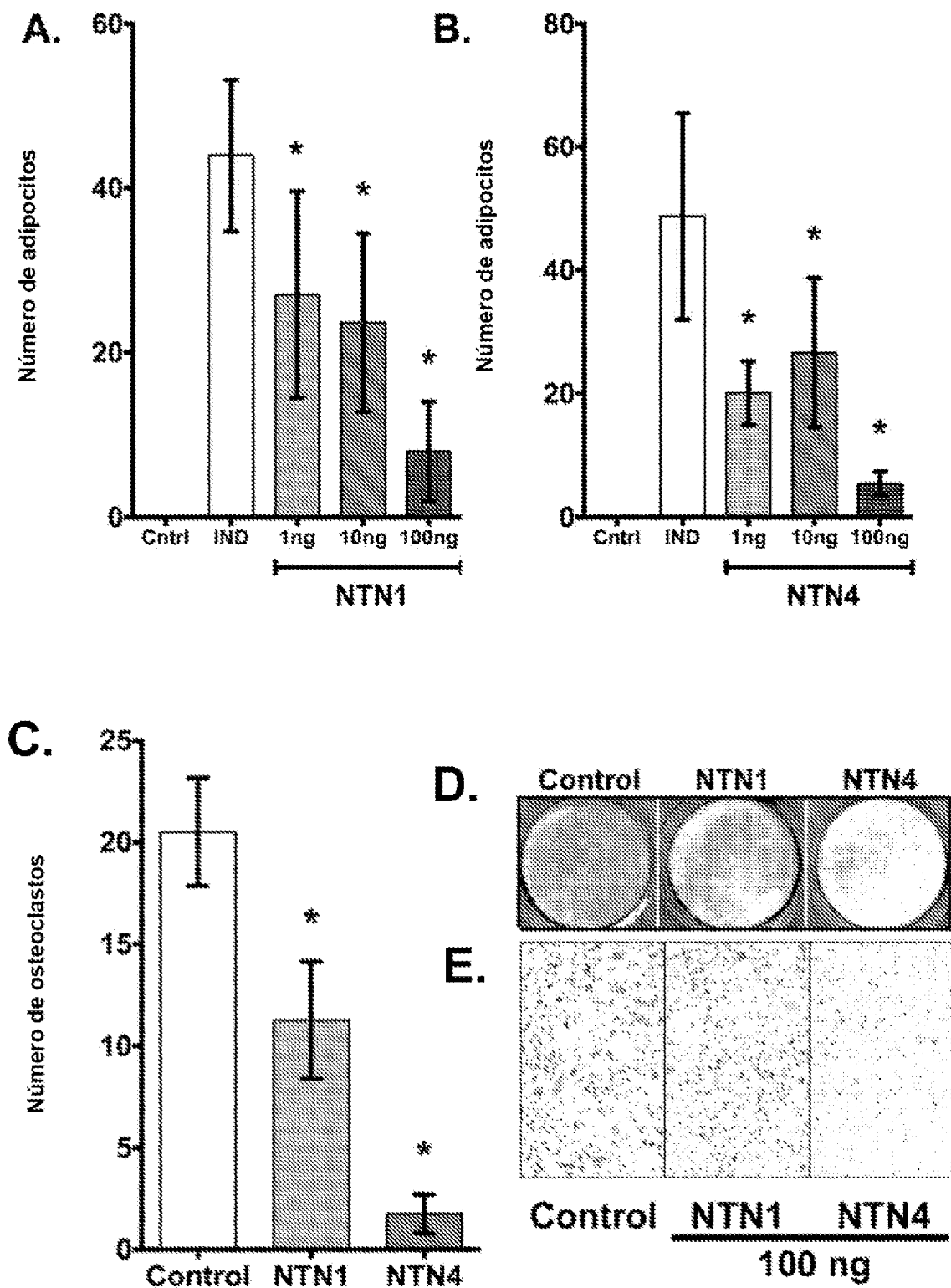
FIGURAS 5A-5J



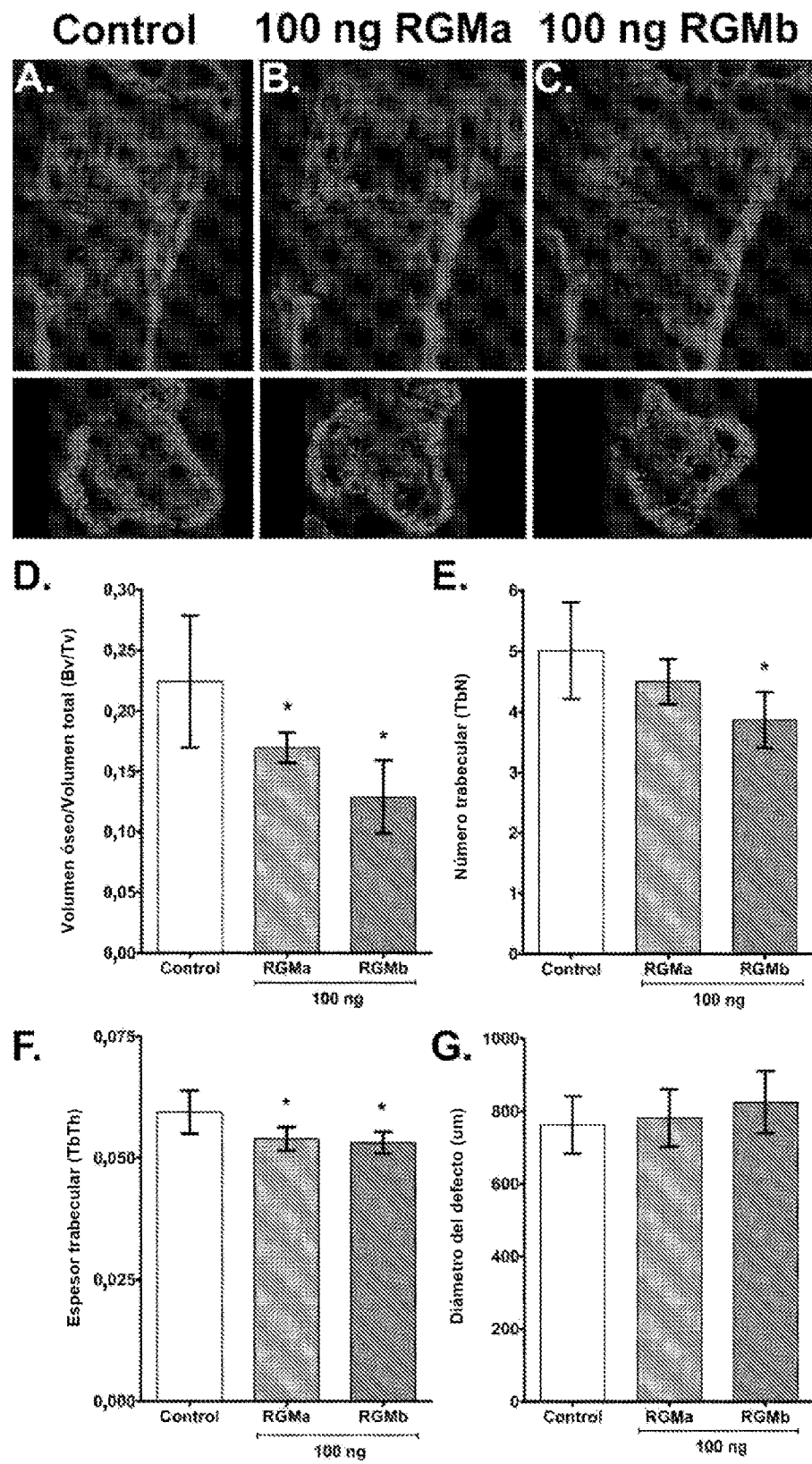
FIGURAS 6A-6F



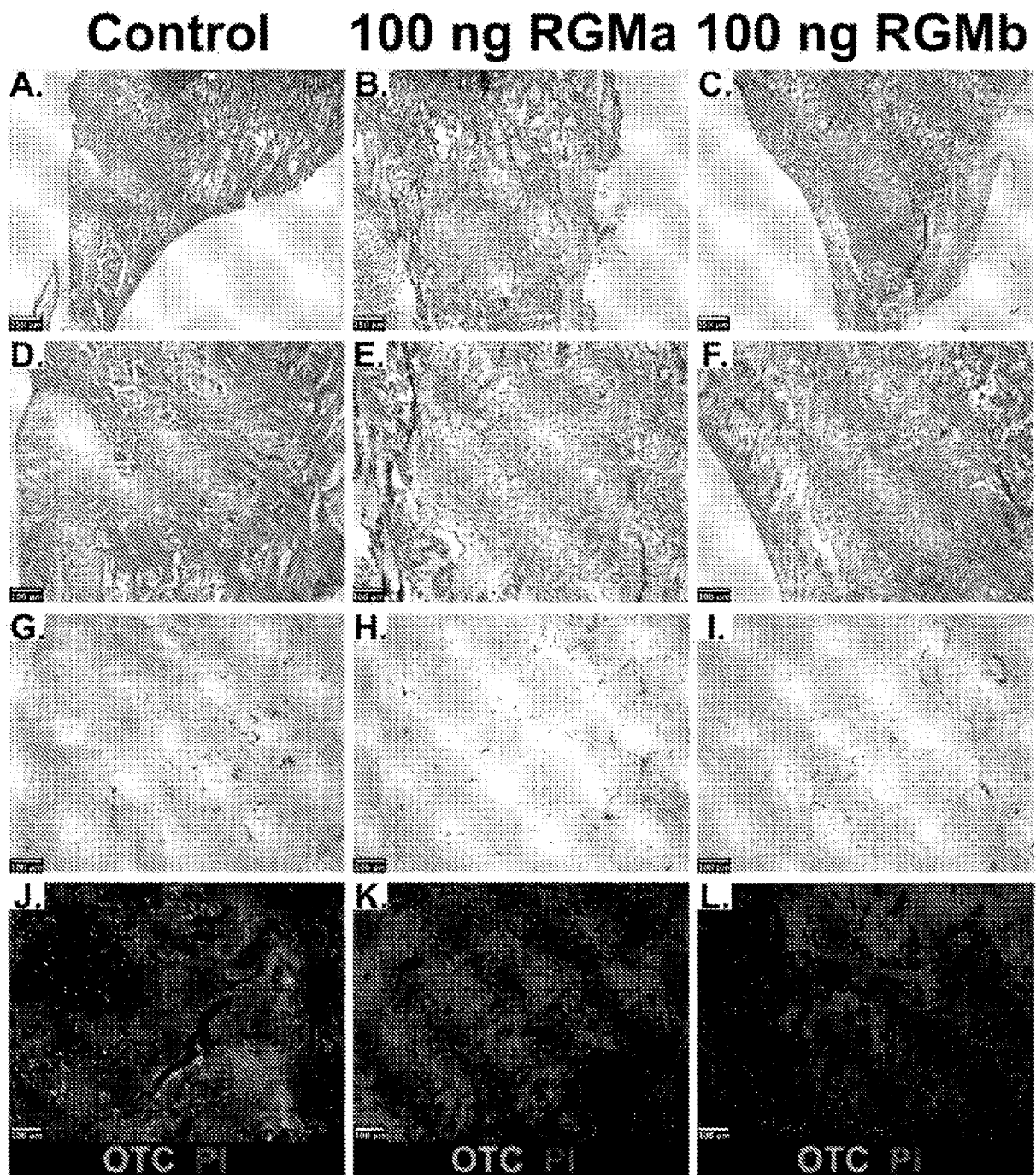
FIGURAS 7A-7C



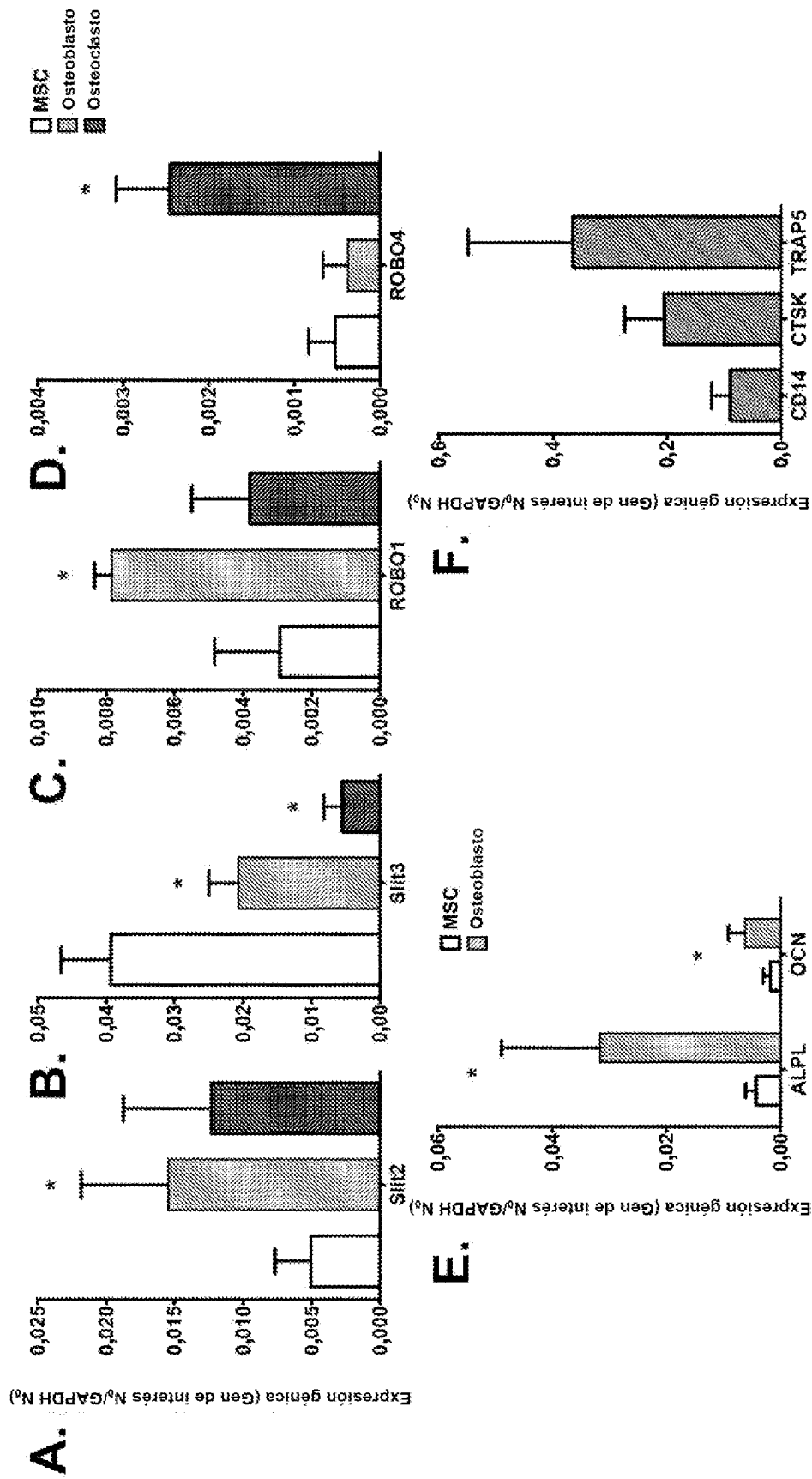
FIGURAS 8A-8E



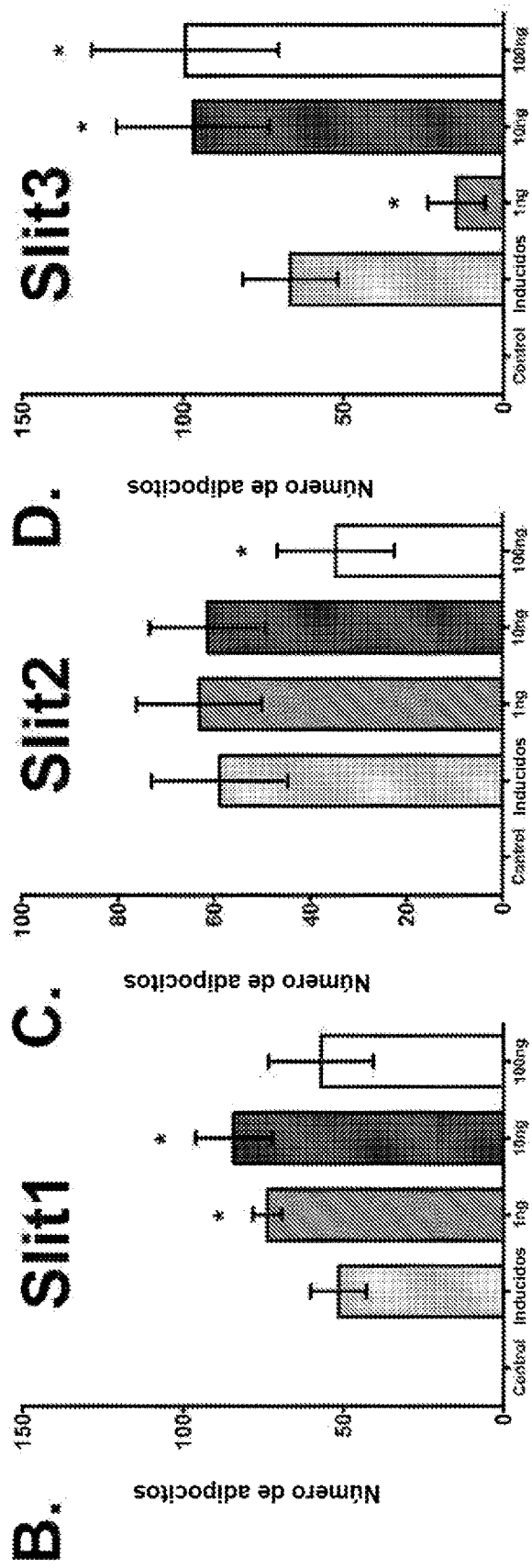
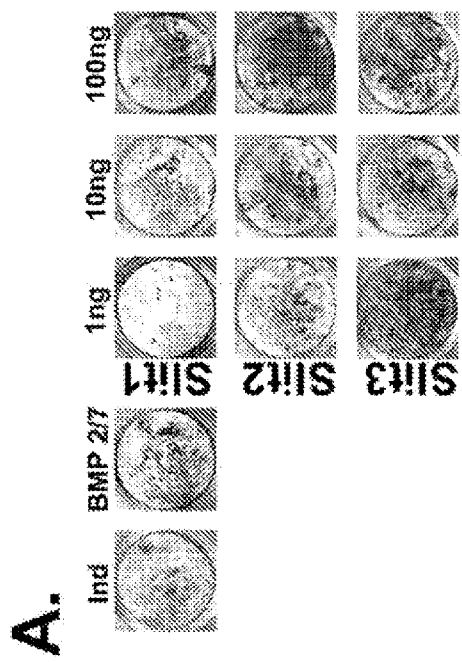
FIGURAS 9A-9G



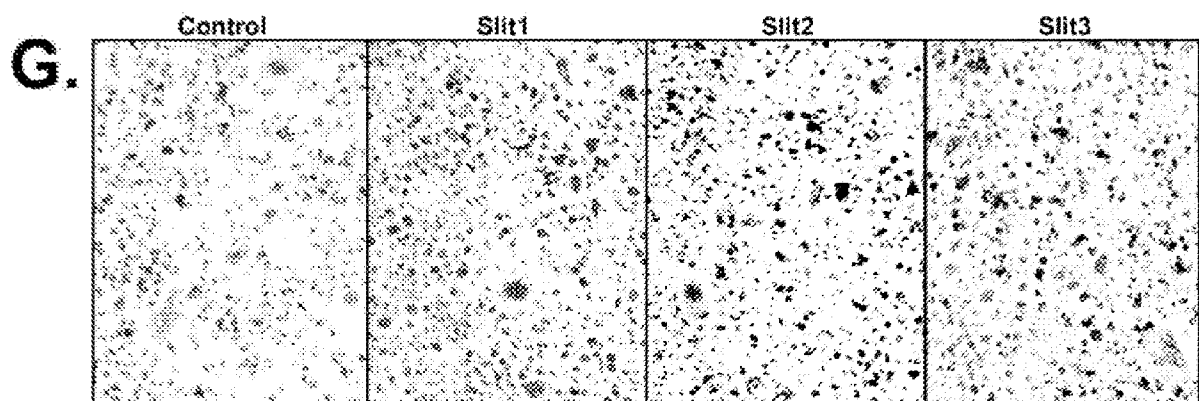
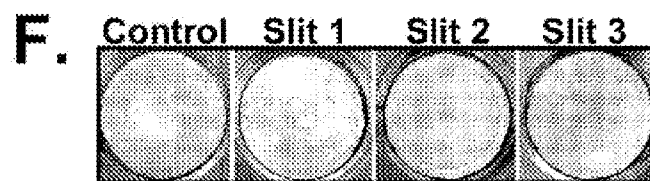
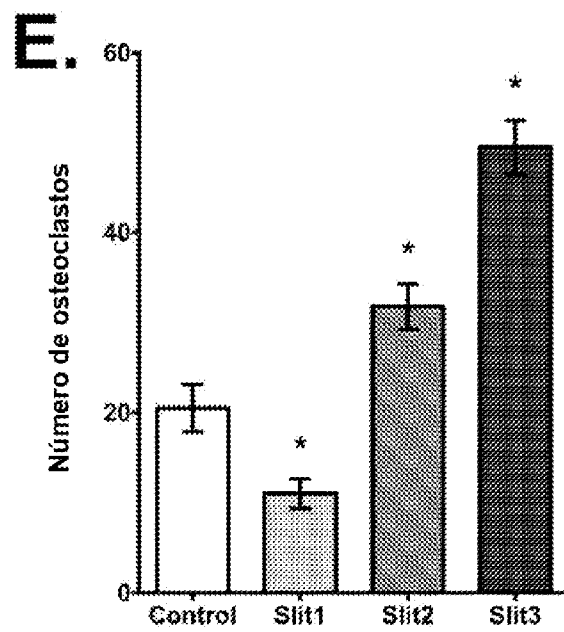
FIGURAS 10A-10L



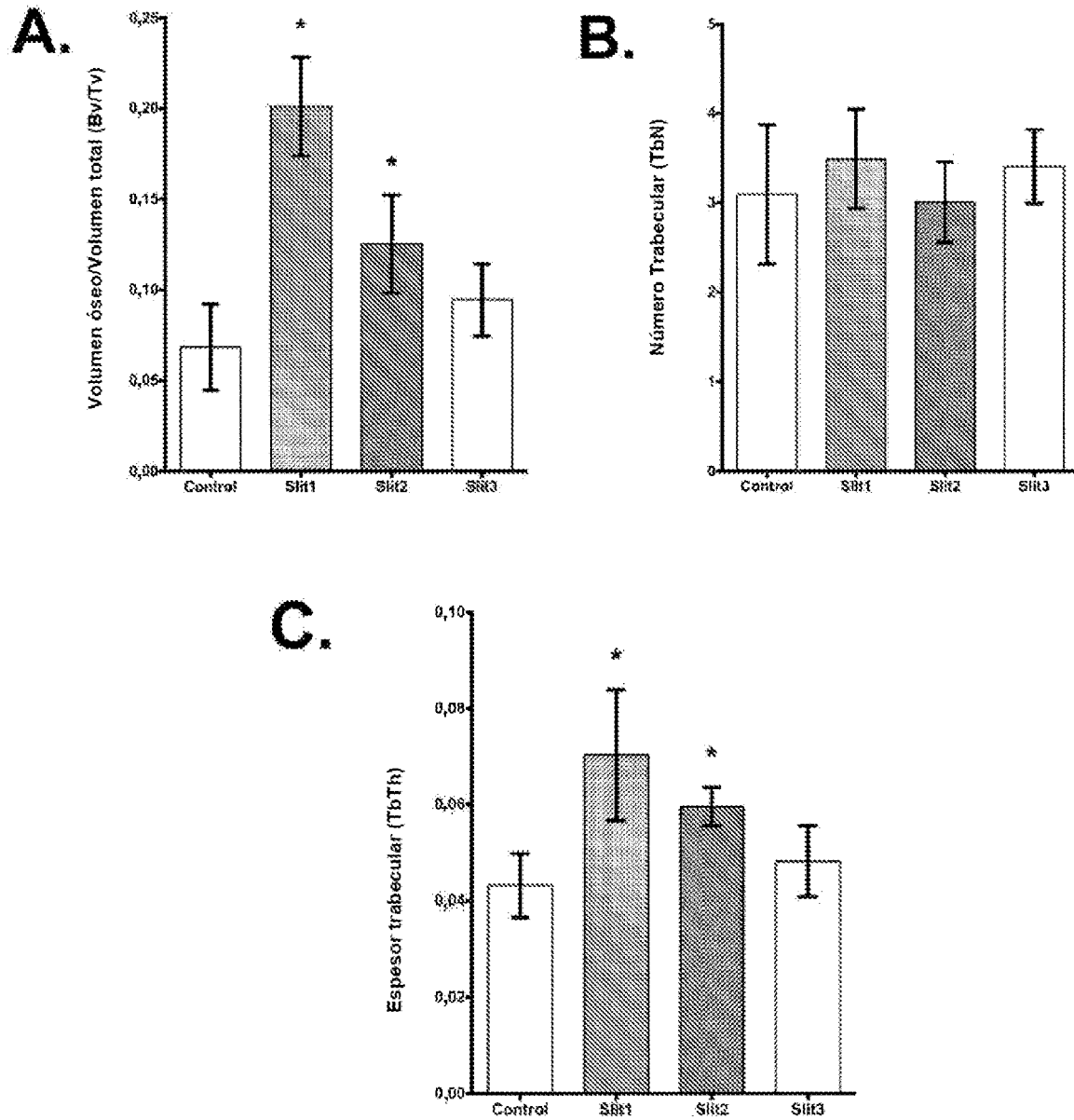
FIGURAS 11A-11F



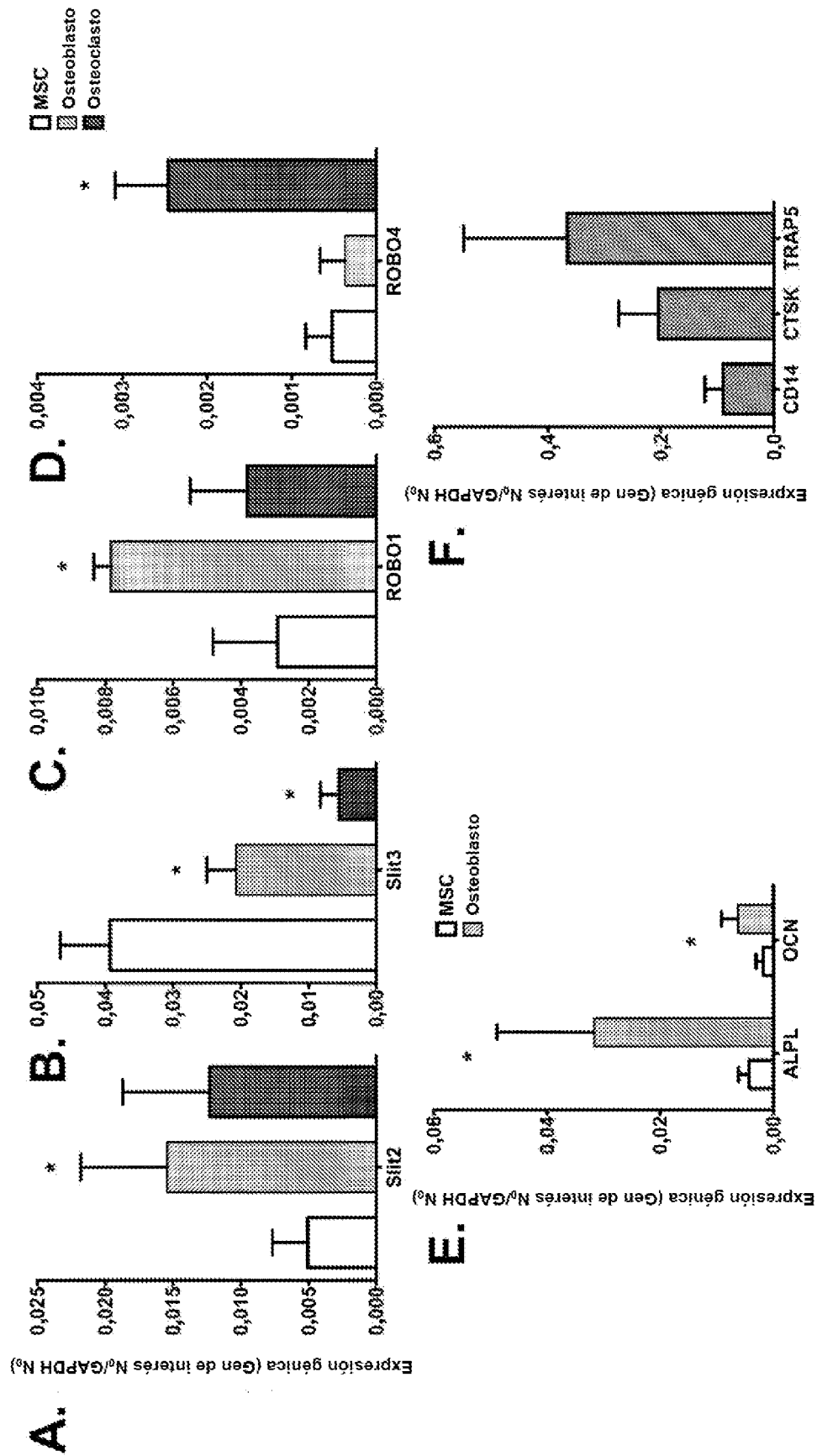
FIGURAS 12A-12D



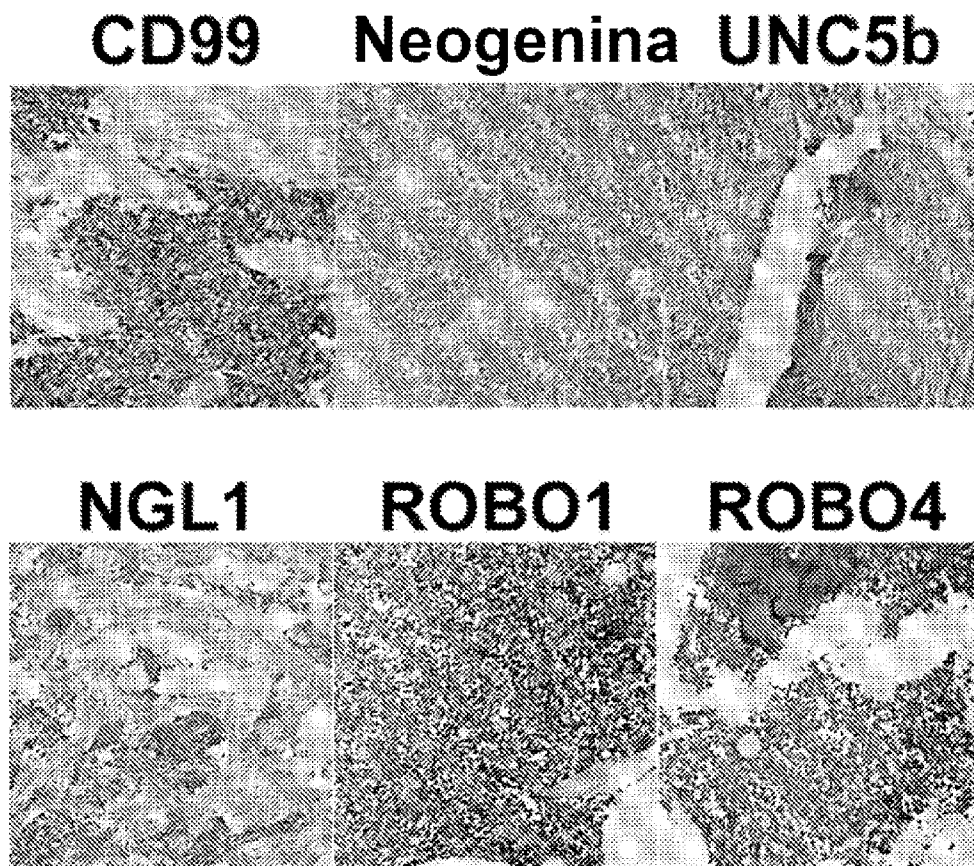
FIGURAS 12E-12G



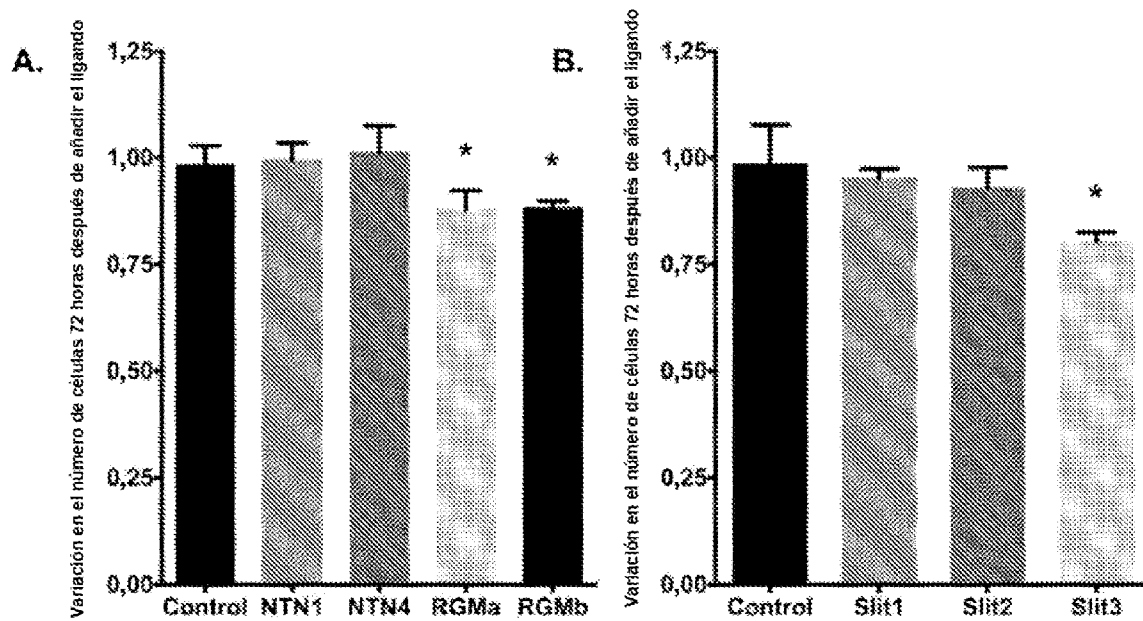
FIGURAS 13A-13C



FIGURAS 14A-14F



FIGURAS 15



FIGURAS 16