

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 912 283**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 15/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/US2014/069829**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089321**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14869366 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.02.2022 EP 3079712**

(54) Título: **Uso de proteínas de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) para la anticoncepción y conservación de la reserva ovárica**

(30) Prioridad:

11.12.2013 US 201361914671 P

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

25.05.2022

(73) Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

(72) Inventor/es:

**DONAHOE, PATRICIA K. y
PEPIN, DAVID**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 912 283 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

Uso de proteínas de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) para la anticoncepción y conservación de la reserva ovárica

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de anticoncepción y/o conservación de la reserva ovárica usando proteínas de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) y variantes de las mismas. En algunas realizaciones, se administra una proteína SIM o variante de proteína SIM a un sujeto. En algunos aspectos, la proteína SIM o variante de proteína SIM se produce de manera endógena en un sujeto femenino por un vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteína SIM o variante de proteína SIM recombinante.

10

Referencia cruzada a solicitud relacionada

15

Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/914.671 presentada el 11 de diciembre de 2013.

20

Antecedentes de la invención

25

La sustancia inhibidora mülleriana (SIM), también conocida como hormona antimülleriana (AMH), es una glicoproteína homodimérica unida por disulfuro de 140 kDa miembro de la gran familia multigénica del factor de crecimiento transformante β (TGF β) de glicoproteínas. Todas las proteínas en esta familia de genes se producen como precursores diméricos y se someten a un procesamiento posterior a la traducción para su activación, que requiere la escisión y disociación para liberar los fragmentos C-terminales bioactivos. De manera similar, el homodímero unido por disulfuro de 140 kilodalton (kDa) de SIM se escinde de manera proteolítica para generar sus fragmentos C-terminales activos.

30

La SIM es una hormona reproductora producida en los testículos fetales que inhibe el desarrollo de las estructuras sexuales secundarias femeninas en los varones. Antes de la diferenciación sexual, el feto es bipotencial, y la elección de desarrollo de los conductos mesonéfricos masculinos (es decir, la próstata, el conducto deferente) en lugar de los conductos paramesonéfricos femeninos (es decir, las trompas de Falopio, el útero, la vagina) en el varón se controla en parte por la SIM.

35

El gen SIM humano está ubicado en el cromosoma 19, y su expresión es sexualmente dimórfica. En los varones, la expresión de SIM comienza a las 9 semanas de gestación en los testículos fetales y continúa a altos niveles hasta la pubertad, cuando los niveles de expresión disminuyen drásticamente. En las mujeres, la SIM se produce sólo después del nacimiento en las células de la granulosa desde antes de la pubertad hasta la menopausia a niveles similares a los hombres adultos, tras lo cual cesa la expresión. En los fetos masculinos, la SIM provoca la regresión de los conductos paramesonéfricos, los precursores de las trompas de Falopio, el útero, el cuello uterino y el tercio superior de la vagina.

40

De manera endógena, la SIM se produce por las células de la granulosa y es un filtro importante del reclutamiento de folículos primordiales en el conjunto en crecimiento. En los varones, la sobreexpresión de SIM inhibe la esteroidogénesis de células de Leydig, lo que provoca una notable disminución en los niveles de testosterona (Teixeira et al., 1999).

Sumario de la invención

50

La presente invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas, y se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína variante de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) para su uso en conservar la reserva ovárica, o prevenir la disminución relacionada con la edad en los folículos ováricos primordiales que están reclutándose en un sujeto femenino, en la que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (WT-SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación, y en la que el sujeto femenino:

55

(a) padece cáncer y se tratará con, o está tratándose con, o se ha tratado con, un tratamiento contra el cáncer seleccionado de quimioterapia o radioterapia,

60

(b) padece, o está en riesgo de padecer, uno o más de: reserva ovárica disminuida (ROD), envejecimiento ovárico prematuro (EOP), endometriosis, síndrome del ovario poliquístico (SOP), mutaciones de FMR1, menos de 26 repeticiones GCC en FMR1, mutaciones de BRAC1, síndrome de Turner, una enfermedad autoinmunitaria, autoinmunidad tiroidea, autoinmunidad suprarrenal o síndromes poliglandulares autoinmunitarios. La invención se refiere al uso de proteínas SIM y variantes de proteína SIM con bioactividad y potencia aumentadas en comparación con la proteína SIM de tipo natural para su uso en métodos anticonceptivos y para su uso en

métodos para proteger la reserva ovárica femenina o prevenir la disminución relacionada con la edad en los folículos ováricos que están reclutándose en un sujeto femenino, tal como se menciona en la reivindicación 1. La presente invención se basa en el descubrimiento de que la proteína SIM humana detiene la foliculogénesis en la fase inicial de los folículos primordiales. En particular, los inventores han demostrado que, en un modelo de ratón de fecundidad, la administración de proteína SIM humana, por ejemplo, mediante terapia génica, puede prevenir la maduración de folículos y la liberación de ovocitos, inhibiendo de ese modo la ovulación, y, lo que es más importante, han demostrado que, en un modelo de ratón *in vivo*, los ratones a los que se les administra proteína SIM humana no pueden reproducir o tienen tasas de reproducción significativamente reducidas. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un método de anticoncepción en un sujeto femenino, comprendiendo el método administrar, al sujeto femenino, una composición que comprende una proteína variante SIM o un ácido nucleico que codifica para dicha proteína variante de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM), en el que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación. Por consiguiente, los métodos pueden usarse para prevenir que un sujeto se quede embarazada y prevenir la reproducción.

En el presente documento, los inventores también han demostrado que la administración de proteína SIM, por ejemplo, mediante terapia génica, puede prevenir la disminución relacionada con la edad en el número de folículos ováricos primordiales en un modelo de ratón *in vivo*. Por consiguiente, la presente invención puede usarse en sujetos que necesitan conservar su reserva ovárica, por ejemplo, sujetos que desean retrasar la reproducción hasta un momento posterior en su vida, y/o sujetos que desean prolongar su vida reproductiva, así como sujetos que padecen, o están en riesgo de padecer, envejecimiento ovárico prematuro (EOP) (también conocido como insuficiencia ovárica primaria oculta). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso de la invención se administra a un sujeto con reserva ovárica disminuida (ROD) para prevenir más disminuciones en las reservas ováricas.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método de anticoncepción que comprende administrar, a un sujeto femenino, una composición que comprende una proteína de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) según la reivindicación 8.

La composición farmacéutica para su uso según la invención previene la disminución en la reserva ovárica funcional (ROF) en un sujeto femenino. Prevenir la disminución en la reserva ovárica funcional (ROF) en un sujeto femenino en la presente invención se refiere a conservar la reserva ovárica en el sujeto. En algunas realizaciones, la composición para su uso según la invención inhibe la disminución relacionada con la edad natural en la ROF en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o más del 50%, en comparación con un sujeto de la misma edad al que no se le administra la proteína SIM o variantes de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento.

En el presente documento se da a conocer una proteína SIM que comprende un polipéptido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína SIM comprende los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4 o un polipéptido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína SIM comprende los residuos de aminoácido 25-567 de SEQ ID NO: 5 o un polipéptido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 25-567 de SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la proteína SIM se produce por un vector, en la que el vector comprende un polinucleótido que codifica para la proteína SIM unido operativamente a un promotor, por ejemplo, un vector viral, seleccionado del grupo que consiste en; un vector adenoviral (Adv), un vector de AAV, un vector de poxvirus y un vector lentiviral. En el presente documento se da a conocer una proteína SIM que está codificada por una secuencia de polinucleótidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína SIM está codificada por una secuencia de polinucleótidos correspondiente a SEQ ID NO: 2 o un polinucleótido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones de todos los aspectos de la invención, el sujeto femenino es un animal, tal como un gato o un perro. En algunas realizaciones, el sujeto femenino es una mujer humana.

La administración puede ser mediante cualquier método y vía conocido habitualmente por un experto habitual en la técnica, y puede incluir, por ejemplo, una única inyección (por ejemplo, en el caso de terapia génica, por ejemplo, cuando es deseable tener una anticoncepción permanente) o mediante administración pulsada seguida por un intervalo sin administración, por ejemplo, cuando es deseable tener una detención temporal de la foliculogénesis, tal como en un método de anticoncepción temporal o cuando se desea el embarazo en un

periodo posterior en la vida del sujeto. En algunas realizaciones, la administración pulsada comprende la administración de la proteína SIM o variante de proteína SIM seguida por un intervalo de al menos 3 días, o al menos 7 días, entre aproximadamente 7 días y 3 semanas sin tratamiento entre la administración pulsada de la composición tal como se da a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, la administración es 5 administración subcutánea, o administración mediante un parche transdérmico, un anillo, un biogel o una inyección.

En algunas realizaciones, se administra una proteína SIM o variante de proteína SIM a concentraciones suficientemente altas para la detención completa de la foliculogénesis en el sujeto. En algunas realizaciones, se 10 administra SIM al sujeto en una cantidad suficiente para aumentar la concentración de la proteína SIM en la sangre del sujeto en del 10% al 50% mayor en comparación con la ausencia de administración de SIM, o para aumentar la concentración de la proteína SIM en la sangre del sujeto en del 50% al 100% mayor en comparación con la ausencia de administración de SIM, o para aumentar la concentración de la proteína SIM en la sangre del sujeto en de 2 a 5 veces mayor o más de 5 veces en comparación con la ausencia de administración de SIM. En 15 algunas realizaciones, se administra SIM al sujeto en una cantidad suficiente para aumentar la concentración de la proteína SIM en la sangre del sujeto hasta entre 1 µg/ml y 5 µg/ml.

Breve descripción de los dibujos

20 Las figuras 1A-1C muestran tratamiento con AAV9-SIM en ratones. La figura 1A muestra niveles de proteína SIM en sangre mediante ELISA tras una única infección de diversos títulos de AAV9-LR-SIM o GFP. Figura 1B) Recuentos de folículos en ratones tratados con 3×10^{11} virus durante 60 días. Figura 1C) Secciones de ovarios SIM y GFP en el diámetro más grande a los 60 días (mismo aumento, inserto 10X). Obsérvese la abundancia de folículos primordiales en el ovario LR-SIM más pequeño.

25 La figura 2 muestra el número de recuentos de folículos/portaobjetos tras el tratamiento con diversos constructos de AAV9-SIM. Recuentos de folículos en ratones tratados con 3×10^{11} ufp de virus con uno de los siguientes virus AAV9-SIM diferentes que expresan proteínas variantes SIM humana; AAV9-LR-SIM, AAV9-LRF-SIM y AAV9-RF-SIM, durante 60 días en comparación con ratones de control tratados con AAV9-GFP. Los ratones tratados con 30 AAV9-LR-SIM, AAV9-LRF-SIM o AAV9-RF-SIM tenían más folículos por portaobjetos que los ratones tratados con AAV9-GFP de control, lo que demuestra la conservación de en los ratones tratados con SIM.

35 La figura 3 es un conjunto de imágenes que muestran las dimensiones de los ovarios tras el tratamiento con diversos constructos de AAV9-SIM. Se tomaron fotografías de las secciones de ovarios en el diámetro más grande en ratones tratados con 3E11 virus durante 60 días tratados con control AAV9-GFP o tres constructos de SIM humana modificados: AAV9-LR-SIM, AAV9-LRF-SIM y AAV9-RF-SIM. Todas las imágenes se tomaron con el mismo aumento. Los ratones tratados con AAV9-LR-SIM, AAV9-LRF-SIM o AAV9-RF-SIM tenían ovarios mucho más pequeños en comparación con ratones tratados con AAV9-GFP de control, lo que demuestra la ausencia de foliculogénesis en los ratones tratados con SIM.

40 La figura 4 es un dibujo esquemático que muestra diferentes variantes de proteínas SIM recombinantes. El diseño de los constructos RF, LRF y LR incluye la ubicación de la etiqueta Flag (F), el sitio de escisión modificado (R) y la secuencia líder de albúmina (L).

45 La figura 5 muestra los niveles en sangre de SIM mediante ELISA tras una única inyección de AAV9-SIM. Se administra una inyección de 3×10^{11} partículas virales de AAV9-RF-SIM, AAV9-LRF-SIM y AAV9-LR-SIM el día 0 y se monitorizó semanalmente la sangre durante 60 días usando un ELISA de SIM.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención es tal como se menciona en las reivindicaciones adjuntas, y se refiere al uso de proteínas SIM y variantes de proteínas SIM con bioactividad y potencia aumentadas en comparación con la proteína SIM de tipo natural en métodos anticonceptivos tal como se menciona en la reivindicación 8 y para su uso en métodos para proteger la reserva ovárica femenina y prevenir la disminución relacionada con la edad en los 55 folículos ováricos que están reclutándose, tal como se menciona en la reivindicación 1.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la proteína SIM humana detiene la foliculogénesis en la fase inicial de los folículos primordiales. La foliculogénesis es la maduración del folículo ovárico, que implica el reclutamiento de folículos primordiales que se desarrollan en los folículos preovulatorios grandes antes de entrar en el ciclo menstrual. Cuando se detiene la foliculogénesis, se para la maduración del folículo ovárico, lo que 60 puede reducir significativamente la probabilidad de embarazo.

En particular, los inventores han demostrado que la administración de proteína SIM humana, por ejemplo, mediante terapia génica, a ratones puede inhibir la maduración de folículos y liberación de ovocitos, inhibiendo de ese modo la ovulación. De manera importante, los inventores han demostrado que los ratones a los que se les administra proteína SIM humana *in vivo* no pueden reproducirse o tienen tasas de reproducción 65

- significativamente reducidas en comparación con ratones tratados de control. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un método de anticoncepción en un sujeto femenino, comprendiendo el método administrar, al sujeto femenino, una composición que comprende SIM tal como se menciona en la reivindicación 8. Por consiguiente, los métodos pueden usarse para prevenir que un sujeto se quede embarazada y prevenir la reproducción. La administración de SIM como anticonceptivo, o para prevenir el embarazo, es sorprendente considerando que la SIM se suprime normalmente por los anticonceptivos hormonales (¿Kushnir et al., "Ovarian Reserve screening before contraception?" Reproductive Biomedicine Online, 2014; 29; 527-529; Dolleman et al., "Reproductive and lifestyle determinants of anti-mullerian hormone in a large population-based study" J. Clin Endocrinol. Metabol., 2013, 98; 2106-2115).
- En el presente documento, los inventores también han demostrado que la administración de altos niveles de proteína SIM, por ejemplo, mediante terapia génica, puede prevenir la disminución relacionada con la edad en el número de folículos ováricos primordiales en un modelo de ratón *in vivo*. De manera importante, aunque se ha notificado previamente que la SIM desempeña un papel en el reclutamiento de folículos primordiales e inhibe el crecimiento de folículos primordiales en el ovario de un ratón (Durlinger et al., Endocrinology, 1999; 140; 5789-5796; Durlinger et al., Endocrinology, 2002; 143(3); 1076-1084), fue sorprendente que altos niveles de SIM pueden inhibir la maduración de folículos ováricos, porque previamente se demostró que se producía un desarrollo sexual anómalo en ratones transgénicos que expresan crónicamente SIM (Behringer et al., Let. Nature, 1990; 345; 167-170). Además, aunque se ha notificado que la SIM inhibe el reclutamiento de folículos primordiales, la magnitud observada del efecto inhibidor por parte de SIM siempre ha sido en cierto modo pequeña. En cambio, los inventores en el presente documento han descubierto sorprendentemente que, con niveles suficientemente altos de SIM, existe una detención completa de la foliculogénesis, lo que demuestra que SIM sola es suficiente para regular el reclutamiento de folículos primordiales.
- A menudo se usan los niveles de SIM en la sangre en la evaluación de la reserva ovárica funcional (ROF) en mujeres humanas, ya que los niveles de SIM reflejan el conjunto folicular (porque todos los folículos en crecimiento secretan SIM) y la SIM endógena es un regulador de retroinhibición para evitar el reclutamiento excesivo de folículos primordiales una vez que ya está creciendo un número suficiente de folículos. Por tanto, los niveles disminuidos de SIM son indicativos de un sujeto femenino con un pequeño conjunto de folículos en crecimiento, lo que demuestra una reserva ovárica pequeña (quedan pocos folículos primordiales) y un ovario "envejecido", y los niveles anómalamente altos de SIM pueden usarse como diagnóstico temprano para sujetos femeninos en riesgo de envejecimiento ovárico prematuro (EOP) (Pigny et al., Serum anti-mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome, J. Clin Endocrinol. Metabol., 2006, 91; 941-945), y los altos niveles de SIM durante la madurez están asociados con una reserva ovárica funcional (ROF) anómalamente baja (Gleicher et al., FMR1 genotype with autoimmunity-associated polycystic ovary-like phenotype and decreased pregnancy chance, PLoS one, 2010, 5, e15303). Por consiguiente, dado que los altos niveles de SIM en la sangre pueden identificar a un sujeto con envejecimiento ovárico prematuro (EOP) y baja reserva ovárica funcional (ROF), es sorprendente que los inventores descubrieran que mantener altos niveles de SIM con la administración de SIM exógena (por ejemplo, terapia génica o proteica) pudo bloquear el reclutamiento de folículos primordiales y mantener el ovario en un estado quiescente, similar al de una mujer prepupal.
- Por consiguiente, la presente invención puede usarse en sujetos que necesitan conservar su reserva ovárica, por ejemplo, sujetos que desean retrasar la reproducción hasta un momento posterior en su vida, y/o sujetos que desean prolongar su vida reproductiva, así como sujetos que padecen, o están en riesgo de padecer, envejecimiento ovárico prematuro (EOP) (también conocido como insuficiencia ovárica primaria oculta). En algunas realizaciones, los métodos que comprenden administrar una proteína SIM o un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM se administran a un sujeto con reserva ovárica disminuida (ROD) para prevenir más disminuciones en las reservas ováricas.
- Sujetos susceptibles de la administración de proteínas SIM y proteínas variantes SIM**
- En todos los aspectos de la presente invención, un sujeto susceptible del tratamiento con los métodos y las composiciones tal como se da a conocer en el presente documento es una mujer humana.
- SIM como agente anticonceptivo**
- Tal como se comenta en el presente documento, un aspecto de la presente invención se refiere a administrar proteínas SIM y proteínas variantes SIM a un sujeto femenino como método de anticoncepción. Por consiguiente, los métodos tal como se da a conocer en el presente documento pueden usarse para prevenir que un sujeto femenino se quede embarazada y, por tanto, prevenir la reproducción. Los métodos para usar SIM como agente anticonceptivo o para prevenir que un sujeto se quede embarazada tal como se da a conocer en el presente documento comprenden administrar, al sujeto, una proteína variante SIM, en los que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (WT-SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación (por ejemplo, LR-SIM), o un ácido nucleico que codifica para la misma. De manera

importante, aunque los inventores han notificado previamente el uso de SIM como agente anticonceptivo, véase la patente estadounidense 4.753.794, no se ha demostrado ni notificado el uso de variantes de proteína SIM, tales como LR-SIM o LRF-SIM o RF-SIM, o de terapia génica para una única administración de proteínas SIM para la anticoncepción.

- 5 Los sujetos susceptibles del tratamiento incluyen cualquier sujeto que no desee quedarse embarazada. A los sujetos pueden administrárseles proteínas SIM o variantes de proteína SIM (tales como LR-SIM), o ácidos nucleicos que codifican para proteínas SIM, de manera temporal o a más largo plazo o de manera permanente dependiendo del deseo de los sujetos femeninos de prevenir temporalmente quedarse embarazadas, o prevenir permanentemente quedarse embarazadas tras el coito o la actividad sexual sin protección. Los sujetos adecuados incluyen cualquier mujer, por ejemplo, mujer humana, dentro del intervalo de edades de aproximadamente 15-55 años, o aproximadamente 15-25 años, o aproximadamente 25-35 años, o aproximadamente 35-55 años, o mayores de 55 años. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto no humano, por ejemplo, cuando es importante el control de la población de las especies no humanas. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal. En algunas realizaciones, el animal es un gato o un perro, o cualquier animal cimarrón. En algunas realizaciones, el sujeto femenino es un ser humano.
- 10
- 15

SIM para prevenir la reducción en la reserva ovárica

- 20 Se sabe en la técnica que un folículo primordial consiste en un ovocito encerrado por una monocapa de células, y el ovocito es una célula reproductora femenina implicada en la reproducción. A lo largo de la vida reproductiva, el número total de folículos primordiales, también denominado reserva ovárica, disminuye constantemente con el tiempo como consecuencia del reclutamiento y la muerte celular (McGee y Huseh, Endocrine Reviews 2000, 21 200-214). Y el agotamiento de la reserva ovárica da como resultado la infecundidad femenina. Sin querer restringirse a la teoría, cuando se detiene o bloquea la foliculogénesis, se previene el reclutamiento de los folículos primordiales, eliminando eficazmente un factor principal que contribuye al agotamiento de la reserva ovárica. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína variante SIM para su uso en conservar la reserva ovárica, o prevenir la disminución relacionada con la edad en los folículos ováricos primordiales que están reclutándose en un sujeto femenino, en la que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (WT-SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación, y en la que el sujeto femenino: (a) padece cáncer y se tratará con, o está tratándose con, o se ha tratado con, un tratamiento contra el cáncer seleccionado de quimioterapia o radioterapia, (b) padece, o está en riesgo de padecer, uno o más de: ROD, EOP, SOP, mutaciones de FMR1, menos de 26 repeticiones GCC en FMR1, mutaciones de BRAC1, síndrome de Turner, una enfermedad autoinmunitaria, autoinmunidad tiroidea, autoinmunidad suprarrenal o síndromes poliglandulares autoinmunitarios.
- 25
- 30
- 35

- 40 Los métodos para usar SIM como agente anticonceptivo o para prevenir que un sujeto se quede embarazada tal como se da a conocer en el presente documento comprenden administrar, al sujeto, una proteína variante SIM tal como se da a conocer en el presente documento (por ejemplo, LR-SIM), o un ácido nucleico que codifica para la misma, tal como se menciona en la reivindicación 9.

- 45 Los sujetos susceptibles del tratamiento incluyen cualquier sujeto femenino que desea retrasar el embarazo, o quedarse embarazada en un momento posterior en su vida, o retrasar sus años de procrear hasta un momento posterior en su vida. Los sujetos adecuados incluyen cualquier mujer, por ejemplo, mujer humana, dentro del intervalo de edades de aproximadamente 25-30 años, o aproximadamente 30-35 años, o aproximadamente 35-40 años, o aproximadamente 40-45 años, o mayores de 45 años.

- 50 El sujeto femenino en el método para conservar la reserva ovárica puede ser sujetos que necesitan conservar su reserva ovárica, tales como sujetos que desean retrasar la reproducción hasta un momento posterior en su vida, y/o sujetos que desean prolongar sus años reproductivos, así como sujetos que padecen, o están en riesgo de padecer, envejecimiento ovárico prematuro (EOP) (también conocido como insuficiencia ovárica primaria oculta). En algunas realizaciones, los métodos que comprenden administrar una proteína SIM o un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM se administran a un sujeto con reserva ovárica disminuida (ROD) para prevenir más disminuciones en las reservas ováricas.
- 55

- 60 Los sujetos susceptibles del tratamiento son aquellos que experimentan infecundidad relacionada con la edad o que padecen, o están en riesgo de padecer, envejecimiento ovárico prematuro (EOP) (también conocido como insuficiencia ovárica primaria oculta), o padecen insuficiencia ovárica prematura (también conocida como insuficiencia ovárica primaria). En algunas realizaciones, los sujetos susceptibles del tratamiento incluyen cualquier sujeto humano femenino que presenta un síntoma de amenorrea posterior a la anticoncepción, anomalías menstruales o infecundidad tras el cese de anticoncepción distinta de SIM.

- 65 En algunas realizaciones, los sujetos susceptibles del tratamiento incluyen cualquier sujeto humano femenino que, después de la evaluación de reserva ovárica funcional (ROF), se identifica como que presenta envejecimiento ovárico prematuro (EOP) o reserva ovárica disminuida (ROD). En la técnica se conocen bien

exámenes para identificar tales sujetos, e incluyen medir uno cualquiera o más de; niveles de hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) basal y estradiol (E_2), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), niveles de FSH:LH, inhibina A y B, progesterona (P_4) y razones $P_4:E_2$, niveles de SIM, testosterona, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) y razones de proteínas de unión IGF-1:IGF-1 (razones IGF-1:IGFBP-1), prueba de exposición a citrato de clomifeno (CCCT), prueba de estimulación de análogos de gonadotropina, prueba de reserva ovárica de FSH exógena, biopsia ovárica, recuento de folículos antrales, volumen ovárico, torrente circulatorio estromal ovárico, y se comentan en Johnson *et al.*, (Ovarian reserve tests for producing fertility outcomes for assisted reproductive technology; the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation Protocol for systematic review of ovarian reserve test accuracy, BJOG, 2006; 113; 1472-1480).

Otros sujetos susceptibles del tratamiento en métodos para conservar la reserva ovárica incluyen cualquier sujeto que presenta, o es probable que experimente, factores que predisponen a la mujer al envejecimiento ovárico prematuro (EOP), incluyendo, pero sin limitarse a, factores iatrogénicos tales como cirugía ovárica, quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea, terapias antivirales y otros factores de riesgo médicos. En algunas realizaciones, el sujeto está sometiéndose a quimioterapia, quimioradioterapia, radioterapia u otro tratamiento contra el cáncer. Al prevenir el reclutamiento de los folículos primordiales, se reduce el riesgo de que los folículos primordiales se vean afectados por los fármacos quimioterápicos. De manera importante, puede usarse el cotratamiento de las composiciones que comprenden una proteína SIM o variante de proteína SIM de la misma durante la quimioterapia en un método para disminuir o evitar la insuficiencia ovárica prematura inducida por fármacos. A menudo, los fármacos citotóxicos, particularmente la quimioterapia, que preferentemente daña a las células en división, son muy tóxicos para los folículos en crecimiento. La pérdida de folículos en crecimiento provoca una desregulación de la retroinhibición (es decir, reduce temporalmente los niveles de SIM), lo que conduce a un reclutamiento excesivo de folículos primordiales. Esos folículos también se dañan luego por los agentes quimioterápicos y los procedimientos de ciclo de quimioterapia repetido hasta que se agotan todos los folículos primordiales del ovario. Puesto que las mujeres nacen con una cantidad establecida de folículos primordiales, la insuficiencia ovárica prematura debida a la quimioterapia u otra afección es irreversible. Por tanto, la presente invención abarca proteínas SIM y variantes de proteína SIM para su uso según la invención en pacientes que padecen cáncer durante o después del tratamiento quimioterápico para prevenir la desregulación y/o restablecer la retroinhibición proporcionada por SIM.

En algunas realizaciones, un sujeto femenino es un sujeto femenino con predisposición al envejecimiento ovárico prematuro (EOP).

En algunas realizaciones, un sujeto susceptible de los métodos para conservar la reserva ovárica tal como se da a conocer en el presente documento incluyen cualquier sujeto que padece, o es probable que padezca, endometriosis, síndrome del ovario poliquístico (SOP), mutaciones de FMR1 (por ejemplo, midiendo las repeticiones CGG en el gen FMR1 tal como se da a conocer en las solicitudes de patente estadounidenses 2011/0020795 y 20140206756), sujetos con menos de 26 repeticiones GCC en FMR1 (genoma het-norm/bajo-sub o genoma hom/bajo/bajo-sub), mutaciones de BRAC1, síndrome de Turner, autoinmunidad, autoinmunidad tiroidea (por ejemplo, hipertiroidismo o hipotiroidismo), autoinmunidad suprarrenal, cualquier otra autoinmunidad, síndromes poliglandulares autoinmunitarios, antecedentes familiares de enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, un pariente de 1^{er} grado o dos parientes de 2^o grado), antecedentes de abortos repetidos o antecedentes de menopausia materna/fraternal temprana.

La administración de una composición que comprende SIM o una proteína variante SIM, o un ácido nucleico que codifica para la misma, puede usarse en un método para ralentizar, detener y/o invertir el envejecimiento ovárico prematuro (EOP) y/o tratar la infertilidad.

50 *Proteínas de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) y variantes de proteína SIM:*

Sin querer restringirse a la teoría, la sustancia inhibidora mülleriana (SIM) es un miembro de la familia multigénica de TGF β de glicoproteínas. Todas las proteínas en esta familia de genes se producen como precursores diméricos y se someten a un procesamiento posterior a la traducción para su activación, que requiere la escisión y disociación para liberar fragmentos C-terminales bioactivos. La SIM es un dímero de 140 kDa que consiste en monómeros unidos por disulfuro de 70 kDa idénticos que se componen, cada uno, de un dominio N-terminal de 57 kDa y uno carboxilo-terminal (C-terminal) de 12,5 kDa. Por tanto, la SIM comprende 2 monómeros idénticos (y, por tanto, se denomina "homodímero"), comprendiendo cada monómero dos dominios, el dominio N-terminal y el C-terminal, que se mantienen en asociación no covalente. El dominio C-terminal purificado es el resto biológicamente activo y se requiere escisión para su actividad. El dominio N-terminal puede ayudar en el plegamiento de la proteína *in vivo* y facilitar el suministro del péptido C-terminal a su receptor, por ejemplo, MISRI y MISRII. Un mutante no escindible de SIM es biológicamente inactivo.

El dominio activo carboxilo-terminal comparte homología de aminoácidos con otros miembros de la familia de TGF β , tales como TGF-B 1, 2 y 3, inhibina, activina y proteínas morfogenéticas óseas, así como un miembro de los factores de crecimiento y diferenciación (GDF). La estructura del dominio carboxilo-terminal de SIM está

soportada por siete cisteínas implicadas en puentes disulfuro tanto intramoleculares como intermoleculares que conducen a su estabilidad estructural, tal como se revela por la homología con la estructura tridimensional de TGF β usando modelación molecular (Lorenzo, Donahoe, *et al.*, datos no publicados).

- 5 Al igual que otros miembros de la familia de TGF β , la SIM puede escindirse por plasmina, lo que genera sus dominios amino-terminal y carboxilo-terminal. Se requiere este proceso proteolítico para su actividad fisiológica y se produce en un sitio en una posición similar al sitio de escisión dibásico hallado en la secuencia de TGF β . Los productos resultantes están estrechamente asociados en un complejo no covalente que se disocia a pH bajo; por tanto, se requieren protocolos técnicamente complejos y que requieren mucho tiempo con tratamiento con plasmina y cromatografía de exclusión por tamaño molecular para mejorar o completar la separación del extremo carboxilo-terminal del extremo amino-terminal.

10 El procesamiento de la proteína SIM madura implica la escisión proteolítica y la eliminación de la secuencia líder (por ejemplo, los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 3), la escisión de la proteína SIM en el sitio primario para generar los dominios N-terminal y C-terminal y la formación de estos dominios para dar un monómero, que está unido por disulfuro mediante enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios a un monómero idéntico para formar la proteína SIM homodimérica bioactiva.

15 La SIM contiene dos sitios de escisión principales que son sensibles a la plasmina y dan como resultado una purificación difícil y compleja de la proteína SIM humana recombinante. Hay un sitio de escisión monobásico primario, que es Q/R, que está ubicado en la posición de aminoácido 426-427 de la proteína SIM humana de tipo natural (en el que se ha escindido la secuencia líder) (el sitio de escisión RAQ/R corresponde al aminoácido 448-451 de SEQ ID NO: 3, que es la proteína hSIM de tipo natural que incluye la secuencia líder de 1-25 de SEQ ID NO: 3). La escisión en este sitio, que libera el dominio carboxilo-terminal activo de SIM, se asemeja a un sitio de escisión de furina de consenso. Un sitio de escisión secundario (denominado "R/S"), identificado mediante secuenciación amino-terminal de fragmentos de SIM, está ubicado en los residuos 229-230 en el dominio amino-terminal de SIM de tipo natural (correspondiente a los aminoácidos 254-255 de SEQ ID NO: 3). Este sitio contiene un R/S, pero por lo demás no sigue Arg-X-(Arg/Lys)-Arg de consenso para la escisión de furina. La separación de SIM purificada carboxilo-terminal del amino-terminal después de la digestión con plasmina exógena usó previamente cromatografía de exclusión por tamaño molecular en condiciones ácidas. Esta técnica requiere un cuidado extremo para controlar la digestión de SIM, puesto que largas incubaciones de SIM en plasmina produjeron el dominio carboxilo-terminal de SIM más otros fragmentos de 22 y 34 kDa, debido a la escisión tanto en el sitio primario como en el secundario, que son extremadamente difíciles de separar entre sí mediante exclusión por tamaño. Puesto que todos los fragmentos generados después de la digestión con plasmina están glicosilados, excepto el dominio carboxilo-terminal, puede usarse afinidad con lectina de germen de trigo como alternativa a la separación por cromatografía de exclusión por tamaño para purificar el dominio carboxilo-terminal de SIM. Después de la escisión con plasmina, pueden cargarse los fragmentos resultantes sobre una columna de lectina de germen de trigo a pH 3,5 con el fin de disociar los dominios amino-terminal y carboxilo-terminal, tal como se da a conocer en Lorenzo *et al.*, J. Chromatography, (2001), 776; 89-98.

20 40 Con el fin de facilitar la purificación y prevenir la producción de fragmentos de SIM durante la purificación (por ejemplo, cuando se producen tanto el dominio carboxilo-terminal de SIM como un fragmento de 22 y 34 kDa debido a la escisión tanto en el sitio primario como en el secundario), los inventores desarrollaron previamente una proteína SIM recombinante modificada (denominada en el presente documento "LR-SIM" y que corresponde a la SEQ ID NO: 4) en la que el sitio de escisión RAQ/R primario en la posición de aminoácido 426-427 de SIM humana de tipo natural (correspondiente al aminoácido 448-451 de SEQ ID NO: 3 en el presente documento) se cambió a RAR/R. Esto se da a conocer en la solicitud PCT PCT/US14/024010, en la que los inventores demostraron previamente que cambiar la Q en la posición 450 de SEQ ID NO: 3 en el presente documento a una R permitió la producción de una preparación escindida altamente purificada de proteína SIM humana que tiene bioactividad completa.

25 50 55 Por consiguiente, en todos los aspectos de la invención, una proteína SIM para su uso en el método, las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento puede ser una variante de SIM en la que el sitio de escisión primario de los residuos 448-451 de SEQ ID NO: 3 se han cambiado de RAQ/R a RAR/R (por ejemplo, una proteína variante SIM que comprende al menos los aminoácidos 25-559 de SEQ ID NO: 4).

30 60 65 Tal como se comentó anteriormente, la proteína SIM de tipo natural madura se produce inicialmente como prohormona que comprende una secuencia líder N-terminal, que corresponde a los residuos de aminoácido 1-25 de la proteína SIM de tipo natural de SEQ ID NO: 3. Esta secuencia líder se elimina por escisión para dar la proteína SIM madura. En todos los aspectos de la invención, una proteína SIM o una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma para su uso en el método, las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento puede tener una secuencia líder de SIM no endógena, en la que la secuencia líder de SIM de los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 3 se ha reemplazado por una secuencia líder diferente, tal como, por ejemplo, una secuencia líder de albúmina sérica humana. En todos los aspectos de la invención, una proteína SIM o una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma para su uso en el método, las

composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento es una proteína SIM recombinante modificada (denominada en el presente documento "LR-SIM") y que corresponde a la SEQ ID NO: 4, en la que el sitio de escisión RAQ/R primario en la posición de aminoácido 426-427 de SIM humana de tipo natural (correspondiente al aminoácido 448-451 de SEQ ID NO: 3 en el presente documento) se cambió a RAR/R y en la que la secuencia líder de SIM endógena se ha reemplazado por una secuencia líder de albúmina.

En algunas realizaciones, una proteína SIM o una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma para su uso en el método, las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento es una proteína SIM recombinante modificada que comprende al menos los aminoácidos 25-559 de SEQ ID NO: 4 (en la que el sitio de escisión RAQ/R primario se ha cambiado a RAR/R) y cualquier secuencia líder N-terminal adecuada, tal como las dadas a conocer en la solicitud PCT PCT/US14/024010.

A menudo, secuencias líder no endógenas diferentes mejoran la expresión y/o secreción de un polipéptido de interés en una célula huésped, y son útiles para la producción de proteínas recombinantes. Generalmente, dado que un método eficiente para la producción de una proteína deseada mediante un procedimiento de modificación por ingeniería genética implica su secreción a partir de una célula, en el que el procedimiento implica la expresión de una proteína fusionada, por ejemplo, que comprende la proteína deseada (por ejemplo, SIM) y un prepropéptido (péptido señal + propéptido) en una célula huésped y luego su escisión intracelular (por ejemplo, procesamiento) mediante enzimas del huésped, seguido por su secreción extracelular. Según este procedimiento, la proteína fusionada debe escindirse dos veces mediante enzimas del huésped para ser una proteína madura, lo que da como resultado un menor rendimiento de la proteína madura y la contaminación de la proteína madura con proteína fusionada residual.

Por consiguiente, las proteínas secretadas se expresan inicialmente en el interior de la célula en una forma precursora que contiene una secuencia líder que garantiza la entrada en la ruta secretora. Tales secuencias líder, también denominadas péptidos señal, dirigen el producto expresado a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). Generalmente, los péptidos señal se eliminan por escisión mediante peptidasas señal durante la translocación al RE. Una vez que entran en la ruta secretora, la proteína se transporta al aparato de Golgi. Desde el aparato de Golgi, la proteína puede seguir diferentes rutas que conducen a compartimentos tales como la vacuola celular o la membrana celular, o puede dirigirse fuera de la célula para su secreción al medio externo (Pfeffer y Rothman (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:829-852).

Para la producción industrial de una proteína secretada, es necesario secretar de manera eficiente la proteína que va a producirse a partir de la célula huésped o del organismo huésped. El péptido señal puede ser, por ejemplo, el péptido señal nativo de la proteína que va a producirse, un péptido señal heterólogo o un híbrido de péptido señal nativo y heterólogo. Sin embargo, se encuentran varios problemas con el uso de los péptidos señal actualmente conocidos. Un problema encontrado con frecuencia al producir una proteína humana a partir de una célula o un organismo huésped no humano es que el péptido señal nativo no garantiza la translocación y/o escisión eficientes del péptido señal. Esto conduce a bajas tasas de secreción de proteína y/o secreción de proteínas maduras que presentan extensiones N-terminales debido a una escisión incorrecta del péptido señal. Por tanto, la elección del péptido señal es de gran importancia para la producción industrial de una proteína.

Además de las secuencias líder que dirigen la secreción de la proteína, una forma precursora puede comprender secuencias líder complementarias que se escinden durante la maduración. Estos péptidos líder complementarios, denominados propéptidos, habitualmente siguen al péptido señal. Prácticamente todas las hormonas peptídicas, numerosas proteínas bioactivas (por ejemplo, factores de crecimiento, receptores y moléculas de adhesión celular, e incluso SIM) y muchas toxinas bacterianas y glicoproteínas de la envoltura vírica comprenden un propéptido que se escinde de manera posterior a la traducción para generar la proteína madura y biológicamente activa (Seidah y Chretien (1999) Brain Res. 848:45-62).

Además, los péptidos se escinden mediante enzimas denominadas proproteínas convertasas. Las proproteínas convertasas de mamífero incluyen, por ejemplo, las convertasas de subtilisina PCSK1, PCSK2 y furina. La furina se expresa de manera ubicua y se ubica en la red trans-Golgi. La furina activa de manera proteolítica un gran número de sustratos de proproteínas en los compartimentos de la ruta secretora. (Thomas (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3:753-766). Más específicamente, la furina se localiza en la red trans-Golgi, una estructura de Golgi tardía que es la responsable de la clasificación de las proteínas de la ruta secretora a sus destinos finales, incluyendo la superficie celular, los endosomas, los lisosomas y los gránulos secretores. El sitio en el que se escinde la furina se ha estudiado extensamente. El sitio de escisión está posicionado después de la arginina carboxilo-terminal de la secuencia de consenso R-X-L/R-R, en la que X puede representar cualquier aminoácido (Nakayama (1997) Biochem. J 327:625-635). Se aumenta la eficiencia de escisión cuando X es una lisina, una valina, una isoleucina o una alanina (Watanabe *et al* (1992) J Biol. Chem. 267:8270-8274).

En algunas realizaciones, la proteína SIM humana recombinante comprende una secuencia líder modificada en lugar de la secuencia líder de tipo natural de la proteína SIM correspondiente a los residuos de aminoácido 1-25 de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia líder nativa de los residuos de aminoácido 1-25 de SEQ ID NO: 3 se reemplaza por una secuencia líder distinta de SIM, por ejemplo, pero sin limitarse a, una

secuencia líder de albúmina, o un fragmento funcional de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia líder distinta de SIM es una secuencia de albúmina sérica humana (ASH), por ejemplo, una secuencia líder correspondiente a SEQ ID NO: 6 (es decir, los aminoácidos 1-24 de SEQ ID NO: 4), que está codificada por los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 (es decir, los ácidos nucleicos 1-78 de SEQ ID NO: 1).

- 5 En algunas realizaciones, una secuencia de ASH es un fragmento funcional de SEQ ID NO: 6, por ejemplo, o al menos 23, o al menos 22, o al menos 21, o al menos 20, o al menos 19, o al menos 18, o al menos 17, o al menos 16, o al menos 15, o al menos 14, o al menos 13, o al menos 12, o al menos 11, o al menos 10, o menos de 10 aminoácidos consecutivos o no consecutivos de SEQ ID NO: 6. También se abarcan versiones 10 modificadas de la secuencia líder de ASH para su uso en la presente invención y se dan a conocer en la patente estadounidense 5.759.802. En algunas realizaciones, un fragmento funcional de la secuencia líder de ASH es MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 8) o variaciones del mismo, que se dan a conocer en la patente EP EP2277889. Las variantes de la región pre-pro de la secuencia señal de ASH (por ejemplo, MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR, SEQ ID NO: 6) incluyen fragmentos tales como la región pre de la secuencia señal de ASH (por ejemplo, MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO: 9) o variantes de la misma, tales como, por 15 ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 10).

En algunas realizaciones, la secuencia líder es una secuencia líder que es al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90%, 20 o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 96%, o al menos aproximadamente el 97%, o al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% idéntica a los residuos de aminoácido de SEQ ID NO: 6.

25 Se ha demostrado que la secuencia líder de ASH, tal como se usa en el presente documento, produce un rendimiento aumentado inesperado (tanto mayor concentración como mayor producción) de la proteína SIM humana recombinante (véanse las figuras 2 y 3 del documento PCT/US14/024101). Sin embargo, la presencia de la secuencia líder de ASH también dio como resultado un aumento sorprendente e inesperado en la escisión a partir del sitio de escisión primario (correspondiente a la escisión en 450/451 de SEQ ID NO: 3). Este rendimiento aumentado y la escisión aumentada fue sorprendente porque, con un rendimiento aumentado (y, por tanto, más proteína producida por la célula), podría esperarse una disminución en la escisión a medida que se satura y extiende en exceso la actividad de las enzimas de escisión disponibles. Sin embargo, este no fue el caso; de hecho, se produjo exactamente lo contrario, con el aumento de la producción de proteína hubo un aumento de la escisión a partir del sitio de escisión primario.

35 Se abarcan otras secuencias líder para su uso en una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, para reemplazar los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 3. Tales secuencias líder se conocen bien en la técnica e incluyen las secuencias líder que comprenden un péptido señal de inmunoglobulina fusionado con un propéptido activador de plasminógeno de tipo tisular (IgSP-tPA), tal como se da a conocer en el documento US 2007/0141666. Se usan otros numerosos péptidos señal para la producción 40 de proteínas secretadas. Uno de ellos es un péptido señal de inmunoglobulina murina (IgSP, n.º de registro de EMBL M13331). IgSP se identificó por primera vez en 1983 por Loh *et al.* (Cell. 33:85-93). Se sabe que IgSP proporciona una buena expresión en células de mamífero. Por ejemplo, la patente EP n.º 0382762 da a conocer un método para producir peroxidasa del rábano mediante la construcción de un polipéptido de fusión entre IgSP y la peroxidasa del rábano.

45 Otras secuencias líder incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse a, la secuencia señal de MPIF-1 (por ejemplo, los aminoácidos 1-21 del número de registro de GenBank AAB51134) MKVSVAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO: 11); la secuencia señal de estaniocalcina (MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO: 12); la secuencia señal de invertasa (por ejemplo, MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO: 13); la secuencia señal del factor alfa de 50 apareamiento de levaduras (por ejemplo, la secuencia líder de la toxina destructora de *K. lactis*); una secuencia señal híbrida (por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO: 14); una secuencia señal híbrida de ASH/MF α -1 (también conocida como ASH/kex2) (por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKR, SEQ ID NO: 15); una secuencia líder de fusión de toxina destructora de *K. lactis*/MF α -1 (por ejemplo, MNIFYIFLFLLSFVQGSLDKR, SEQ ID NO: 16); la secuencia señal de inmunoglobulina Ig (por ejemplo, MGWSCIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 17); la secuencia señal del precursor de fibulina B (por ejemplo, MERAAPSRRVPPLLLLGGLALLAAGVDA, SEQ ID NO: 18); la secuencia señal del precursor de clusterina (por ejemplo, MMKTLLLFVGLLLTVESGQVLG, SEQ ID NO: 19); y la secuencia señal de la proteína 4 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (por ejemplo, MLPLCLVAALLAAGPGPSLG, SEQ ID NO: 20).

60 Cuando es deseable producir SIM recombinante en un sistema bacteriano, las secuencias líder pueden incluir secuencias líder bacterianas tal como se da a conocer en la solicitud estadounidense 2011/0020868. Se han descrito otras diversas señales de secreción para su uso en la expresión de polipéptidos o proteínas recombinantes. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.914.254; la patente estadounidense n.º 4.963.495; la patente europea n.º 0 177 343; la patente estadounidense n.º 5.082.783; la publicación PCT n.º WO 89/10971; la patente estadounidense n.º 6.156.552; las patentes estadounidenses n.ºs 6.495.357; 6.509.181; 6.524.827; 6.528.298; 6.558.939; 6.608.018; 6.617.143; las patentes estadounidenses n.ºs 5.595.898;

5.698.435; y 6.204.023; la patente estadounidense n.º 6.258.560; las publicaciones PCT n.os WO 01/21662, WO 02/068660 y la publicación de solicitud estadounidense 2003/0044906; la patente estadounidense n.º 5.641.671; y la patente europea n.º EP 0 121 352.

- 5 En realizaciones adicionales, una proteína SIM o una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma para su uso en el método, las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento también comprende una etiqueta para ayudar en la purificación. Las etiquetas se conocen bien en la técnica y se dan a conocer en la solicitud PCT PCT/US14/024010. Las etiquetas proteicas son útiles para ayudar en la purificación del dominio C-terminal sin la necesidad de métodos complicados usando columnas de cromatografía de exclusión por tamaño o de afinidad con lectina de germen de trigo. Los inventores también añadieron previamente una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta Flag) al extremo N-terminal del dominio C-terminal para producir una variante "LRF-SIM" correspondiente a SEQ ID NO: 5. Se abarca cualquier etiqueta proteica para su uso en el presente documento y se dan a conocer en el documento PCT/US14/024010.
- 10 15 En algunas realizaciones, una proteína SIM recombinante comprende al menos un marcador o una "etiqueta" interno. En algunas realizaciones, la etiqueta puede ser, por ejemplo, una etiqueta c-myc, poli-histidina o FLAG. En algunas realizaciones, la etiqueta es una etiqueta FLAG, por ejemplo, una etiqueta FLAG de SEQ ID NO: 21. Una etiqueta FLAG puede estar codificada por el ácido nucleico de SEQ ID NO: 22.
- 20 25 En algunas realizaciones, la etiqueta en la proteína SIM humana recombinante es interna con respecto al extremo carboxilo-terminal inmediatamente en el sentido de 3' desde el sitio de escisión. Como es la parte más flexible del extremo C-terminal y no está implicada en la unión al receptor ni en la provisión de especificidad, ya que son las "puntas de los dedos" del extremo C-terminal (Papakostas *et al.*, 2010, Lorenzo *et al.*, 2002). En algunas realizaciones, es más probable que el marcaje en este sitio conserve la actividad biológica. En algunas 30 35 realizaciones, una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta FLAG, está ubicada después del sitio de escisión primario, por ejemplo, después del aminoácido 450 de SEQ ID NO: 3 (correspondiente al residuo de aminoácido 425 de la nomenclatura convencional de proteínas). En algunas realizaciones, una etiqueta está ubicada entre los residuos de aminoácido 452 y 453 de SEQ ID NO: 3 (que corresponde a los residuos de aminoácido 427 y 428 en la nomenclatura normal de aminoácidos de la proteína SIM).
- En algunas realizaciones, una proteína SIM recombinante comprende más de una etiqueta, por ejemplo, al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o más de 4 etiquetas. En algunas realizaciones, las etiquetas son secuenciales (por ejemplo, una detrás de otras) y, en algunas realizaciones, están dispersas (por ejemplo, intermitentes) en la proteína SIM humana recombinante. Preferiblemente, las etiquetas no interfieren ni afectan sustancialmente a la bioactividad de la función de la proteína SIM recombinante en la unión y activación de MISRII. En algunas realizaciones, cuando la proteína SIM recombinante comprende más de una etiqueta, las etiquetas son la misma etiqueta. En realizaciones alternativas, cuando la proteína SIM recombinante comprende más de una etiqueta, las etiquetas son etiquetas diferentes, por ejemplo, una proteína SIM recombinante puede comprender una etiqueta FLAG y una etiqueta histidina. El pequeño tamaño de la etiqueta Flag le permite estar contenida en el dominio N-terminal, no de unión, flexible del extremo C-terminal. Por consiguiente, en algunas realizaciones, puede usarse cualquier etiqueta conocida por un experto habitual en la técnica en lugar de la etiqueta Flag, por ejemplo, una etiqueta de entre aproximadamente 5 y 10 aminoácidos, o de entre 40 45 50 55 60 65 aproximadamente 10 y 15 aminoácidos, o una etiqueta de entre aproximadamente 15 y 20 aminoácidos, o una etiqueta de entre 20 y 30 aminoácidos, o una etiqueta de entre aproximadamente 30 y 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, no se recomienda una etiqueta con una longitud de más de 50 aminoácidos, ya que la etiqueta puede impedir estéricamente el extremo N-terminal flexible del dominio C-terminal y, por tanto, inhibir la bioactividad de la proteína SIM recombinante.
- En algunas realizaciones, puede eluirse una proteína SIM humana recombinante marcada con etiqueta, por ejemplo, etiquetada con FLAG, tal como la proteína SIM humana recombinante LRF tal como se da a conocer en el presente documento, mediante una única etapa para producir una preparación escindida de manera eficiente y altamente purificada con bioactividad completa. Cuando se aumenta la escala, esta purificación de proteína SIM humana recombinante será adecuada para aplicaciones clínicas; además, será útil para diversos ensayos de unión en entornos tanto clínicos como experimentales. Se ha demostrado que el marcaje interno de SIM durante la traducción es más eficaz que el marcaje después de la purificación de la proteína, ya que la yodación o biotinilación redujo en gran medida la bioactividad de SIM. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el constructo de proteína SIM humana recombinante LRF es más bioactivo que la SIM de tipo natural. La inserción de la secuencia de etiqueta FLAG presenta otras diversas ventajas distintas. En primer lugar, su dominio de aminoácidos único no está presente en ningún otro gen (excepto para la fosfatasa de cerebro de

ratón), haciendo de ese modo que el anticuerpo anti-FLAG sea muy específico. En segundo lugar, la elución de la proteína con el péptido 3x FLAG es específica para FLAG-SIM y no para otras proteínas que se unen de inespecíficamente a las perlas de agarosa.

- 5 En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante marcada, por ejemplo, una SIM con una FLAG interna, es útil en un método eficiente para producir una forma etiquetada de manera interna, altamente pura y biológicamente activa de SIM, que puede usarse para aumentar la escala para su uso preclínico y clínico, para el estudio de proteínas de unión a SIM y para el seguimiento en estudios farmacocinéticos.
- 10 Tal como se comentó anteriormente, las proteínas SIM útiles en los métodos tal como se da a conocer en el presente documento pueden ser SIM de tipo natural o variantes de SIM tales como LR-SIM, LRF-SIM, y similares. Tales variantes de proteínas LR-SIM y LRF-SIM son proteínas que no se producen de manera natural y se producen mediante medios recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión a partir de un sistema de expresión de ácido nucleico *in vitro* tal como se da a conocer en el presente documento.

15 *Variantes y homólogos de una proteína SIM humana recombinante.*

En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante útil en los métodos, las composiciones y los kits tal como se da a conocer puede tener una modificación en la secuencia principal de proteína SIM, por ejemplo, los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3 (incluyendo una modificación de residuo de aminoácido 450 de Q a R de SEQ ID NO: 3) y/o la inserción de una etiqueta al comienzo del dominio C-terminal. Se considera que tales variantes son homólogas a la proteína SIM de tipo natural.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y a su equivalente y no se refiere a una longitud específica del producto; por tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de un polipéptido. Un derivado es un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácido conservadoras, en comparación con otra secuencia. Los derivados incluyen además otras modificaciones de proteínas, incluyendo, por ejemplo, modificaciones tales como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares.

25 30 En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante es al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% similar a la proteína SIM humana recombinante homóloga. Tal como se usa en el presente documento, "similitud" o "porcentaje de similitud", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o sustituciones conservadoras de los mismos, que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante inspección visual. A modo de ejemplo, una primera secuencia de aminoácidos puede considerarse similar a una segunda secuencia de aminoácidos cuando la primera secuencia de aminoácidos es al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 90% o incluso el 95% idéntica, o está sustituida de manera conservadora, a la segunda secuencia de aminoácidos cuando se compara un mismo número de aminoácidos que el número contenido en la primera secuencia, o cuando se compara con una alineación de polipéptidos que se ha alineado mediante un programa informático de similitud conocido en la técnica, tal como se comenta a continuación.

35 40 45 También se abarcan homólogos y derivados funcionales y fragmentos funcionales de SIM de SEQ ID NO: 1 para su uso en la presente invención, y también pueden identificarse, por ejemplo, mediante la expresión de SIM a partir de una biblioteca de expresión. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3^a ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press); Ausubel *et al.*, citado anteriormente). Una secuencia génica endógena mutada puede denominarse transgén heterólogo; por ejemplo, un transgén que codifica para una mutación en SIM que no se conoce en genomas que se producen de manera natural es un transgén heterólogo con respecto a especies murinas y no murinas, por ejemplo, humanas. Una proteína SIM tal como, por ejemplo, las dadas a conocer en las publicaciones de patente estadounidense n.^os 5.427.780, 5.359.033 y 5.661.126.

50 55 60 La variación en la estructura primaria de la secuencia principal de proteína SIM humana (por ejemplo, los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3 (incluyendo una modificación del residuo de aminoácido 450 de Q a R de SEQ ID NO: 3) y/o la inserción de una etiqueta al comienzo del dominio N-terminal del dominio C-terminal), o un fragmento funcional, o un homólogo, se abarcan para su uso en la presente invención, por ejemplo, pueden incluir delecciones, adiciones y sustituciones. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras. Las diferencias entre una proteína SIM humana recombinante y una variante generalmente conservan las propiedades deseadas, mitigan o eliminan las propiedades no deseadas y añaden propiedades deseadas o nuevas. Por ejemplo, las variantes de una proteína SIM humana recombinante pueden presentar una actividad superior en comparación con la proteína SIM de tipo natural.

65 Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia principal de proteína SIM humana (por ejemplo, los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3) de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a

conocer en el presente documento pueden manipularse fácilmente para alterar la secuencia de aminoácidos de una proteína. Un gen que codifica para la proteína SIM o un fragmento funcional, un homólogo o una variante de la misma puede manipularse mediante una variedad de técnicas bien conocidas para la mutagénesis *in vitro*, entre otros, para producir variantes de la proteína humana que se produce de manera natural o un fragmento de la misma, denominadas en el presente documento variantes o muteínas, que pueden usarse según la invención.

5

Otras modificaciones a una proteína SIM humana recombinante

La proteína SIM humana recombinante útil en la presente invención también puede modificarse en sus extremos amino-terminales, por ejemplo, para aumentar su hidrofilicidad. Una hidrofobicidad aumentada mejora la exposición de los péptidos en las superficies de portadores a base de lípidos en los que se han incorporado los conjugados péptido-lípido parentales. Los grupos polares adecuados para su unión a péptidos para aumentar su hidrofilicidad se conocen bien e incluyen, por ejemplo y sin limitación: los grupos acetilo ("Ac"), 3-ciclohexilalanilo ("Cha"), acetil-serina ("Ac Ser"), acetil-seril-serina ("Ac-Ser-Ser-"), succinilo ("Suc"), succinil-serina ("Suc-Ser"), succinil-seril-serina ("Suc-Ser-Ser"), metoxisuccinilo ("MeO-Suc"), metoxisuccinil-serina ("MeO-Suc-Ser"), metoxisuccinil-seril-serina ("MeO-Suc-Ser-Ser") y seril-serina ("Ser-Ser-"), polietilenglicol ("PEG"), poliacrilamida, poliacrilomorfolina, polivinilpirrolidina, un grupo polihidroxilo y grupos de azúcares carboxilados, por ejemplo, los ácidos lactobiónico, N-acetilneuramínico y sálico. Los grupos carboxilo de estos azúcares se unirían al extremo N-terminal del péptido a través de un enlace amida. En el presente documento, la modificación N-terminal preferida es una modificación con metoxisuccinilo.

10

15

20

En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante puede fusionarse con una o más parejas de fusión. En determinadas realizaciones, una de las parejas de fusión es la proteína Fc (por ejemplo, Fc de ratón o Fc humana). La proteína de fusión puede incluir además una segunda pareja de fusión tal como una etiqueta de purificación o detección, por ejemplo, proteínas que pueden detectarse directa o indirectamente (tales como proteína verde fluorescente, hemaglutinina o fosfatasa alcalina), dominios de unión al ADN (por ejemplo, GAL4 o LexA), dominios de activación génica (por ejemplo, GAL4 o VP16), etiquetas de purificación o péptidos señal de secreción (por ejemplo, secuencia señal de preprotripsina).

25

30

35

LELVPRGSGDPIEGRGGGGDPKSCDKPHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPKPKDLM
SRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
IAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

40

45

En una realización, una proteína SIM humana recombinante se fusiona con una segunda pareja de fusión, tal como una molécula portadora, para mejorar su biodisponibilidad. Tales portadores se conocen en la técnica e incluyen polí(alquil)glicol tal como polietilenglicol (PEG). La fusión con albúmina sérica también puede aumentar la semivida sérica de polipéptidos terapéuticos.

50

55

En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante también puede fusionarse con una segunda pareja de fusión, por ejemplo, con un polipéptido que dirige el producto a una ubicación deseada, o, por ejemplo, con una etiqueta que facilita su purificación, si así se desea. En algunas realizaciones, las etiquetas y parejas de fusión pueden diseñarse para ser escindibles, si así se desea. Otra modificación específicamente contemplada es la unión, por ejemplo, unión covalente, a un polímero. En un aspecto, los polímeros tales como polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol (mPEG) pueden aumentar la semivida *in vivo* de proteínas a las que se conjugan. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de pegilación de agentes polipeptídicos, al igual que las consideraciones de, por ejemplo, el tamaño del polímero de PEG a usar.

En algunas realizaciones, se modifica una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional de la misma para lograr semividas circulantes adecuadas, que tienen un impacto en la dosificación, la administración de fármacos y la eficacia. Se han emprendido muchos enfoques con el objetivo de aumentar la semivida de productos bioterapéuticos. El riñón elimina rápidamente proteínas pequeñas de menos de 60 kD y, por tanto, no alcanzan su diana. Esto significa que son necesarias altas dosis para lograr eficacia. Las modificaciones a una proteína SIM humana recombinante y fragmentos abarcados en los métodos de la presente invención para aumentar la semivida de proteínas en circulación incluyen: enfoques de pegilación; conjugación o fusión genética con proteínas, por ejemplo, transferrina (documento WO06096515A2), albúmina, hormona del crecimiento (documento US2003104578AA); conjugación con celulosa (Levy y Shoseyov, 2002); conjugación o fusión con fragmentos Fc; glicosilación y mutagénesis (Carter, 2006).

En el caso de la pegilación, se conjuga polietilenglicol (PEG) con una proteína SIM humana recombinante o un fragmento, que puede ser, por ejemplo, una proteína, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en plasma. Los primeros estudios sobre el efecto de la pegilación de anticuerpos se realizaron en la década de 1980. La conjugación puede realizarse de manera o bien enzimática o bien química y está bien establecida en la técnica (Chapman, 2002; Veronese y Pasut, 2005). Con la pegilación puede aumentarse el tamaño total, lo que reduce la posibilidad de filtración renal. Adicionalmente, la pegilación protege frente a la degradación proteolítica y ralentiza la eliminación a partir de la sangre. Además, se ha notificado que la pegilación puede reducir la inmunogenicidad y aumentar la solubilidad. La mejora de la farmacocinética mediante la adición de PEG se debe a varios mecanismos diferentes: aumento del tamaño de la molécula, protección frente a la proteólisis, reducción de la antigenicidad y enmascaramiento de secuencias específicas de los receptores celulares. En el caso de fragmentos de anticuerpo (Fab), se ha logrado un aumento de 20 veces en la semivida plasmática mediante pegilación (Chapman, 2002).

Hasta la fecha, existen varios fármacos pegilados aprobados, por ejemplo, PEG-interferón alfa2b (PEG-INTRON) comercializado en 2000 y alfa2a (Pegasys) comercializado en 2002. Se presentó un fragmento de anticuerpo pegilado contra TNF alfa, denominado Cimzia o Certolizumab Pegol, para su aprobación por la FDA para el tratamiento de enfermedad de Crohn en 2007 y se ha aprobado el 22 de abril de 2008. Una limitación de la pegilación es la dificultad para sintetizar especies monodispersas largas, especialmente cuando son necesarias cadenas de PEG de más de 1000 kD. Para muchas aplicaciones, se usa PEG polidisperso con una longitud de cadena de más de 10000 kD, lo que da como resultado una población de conjugados que tienen cadenas de PEG de longitudes diferentes, que requieren extensos análisis para garantizar lotes equivalentes entre producciones. La longitud diferente de las cadenas de PEG puede dar como resultado actividades biológicas diferentes y, por tanto, farmacocinéticas diferentes. Otra limitación de la pegilación es la disminución en la afinidad o actividad tal como se ha observado con el interferón alfa Pegasys, que sólo presenta un 7% de la actividad antiviral de la proteína nativa, pero presenta una farmacocinética mejorada debido a la semivida plasmática aumentada.

En algunas realizaciones, se conjuga una proteína SIM humana recombinante o un fragmento de la misma con una proteína de vida prolongada, por ejemplo, albúmina, que tiene 67 kD y presenta una semivida plasmática de 19 días en ser humano (Dennis *et al.*, 2002). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma y está implicada en la regulación del pH plasmático, pero también sirve como portador de sustancias en el plasma. En el caso de CD4, se ha logrado un aumento de la semivida plasmática después de fusionarla con albúmina sérica humana (Yeh *et al.*, 1992). Otros ejemplos de proteínas de fusión son insulina, hormona del crecimiento humana, transferrina y citocinas (Ali *et al.*, 1999; Duttaroy *et al.*, 2005; Melder *et al.*, 2005; Osborn *et al.*, 2002a; Osborn *et al.*, 2002b; Sung *et al.*, 2003), y véanse los documentos US2003104578A1, WO06096515A2 y WO07047504A2.

También se ha estudiado extensamente el efecto de la glicosilación sobre la semivida plasmática y la actividad de la proteína. En el caso de activador de plasminógeno tisular (tPA), la adición de nuevos sitios de glicosilación disminuyó la eliminación plasmática y mejoró la potencia (Keyt *et al.*, 1994). Se ha aplicado con éxito la glicosilación por ingeniería a varias proteínas recombinantes e inmunoglobulinas (Elliott *et al.*, 2003; Raju y Scallan, 2007; Sinclair y Elliott, 2005; Umana *et al.*, 1999). Además, la glicosilación influye en la estabilidad de las inmunoglobulinas (Mimura *et al.*, 2000; Raju y Scallan, 2006).

En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante o fragmentos de la misma pueden fusionarse con el fragmento Fc de una IgG (Ashkenazi y Chamow, 1997). Se ha utilizado el enfoque de fusión de Fc, por ejemplo, en la tecnología de trampa desarrollada por Regeneron (por ejemplo, trampa de IL1 y trampa de VEGF). Se ha descrito el uso de albúmina para prolongar la semivida de péptidos en el documento US2004001827A1. También se han notificado efectos positivos de la albúmina para fragmentos Fab y proteína de fusión scFv-ASH (Smith *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la semivida sérica prolongada de la albúmina se debe a un procedimiento de reutilización mediado por FcRn (Anderson *et al.*, 2006; Chaudhury *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2001).

En algunas realizaciones, se conjuga una proteína SIM humana recombinante con una proteína Fc biotinilada, tal como se da a conocer en la solicitud estadounidense 2010/0209424.

Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugar" o "conjugación" se refiere a la unión de dos o más entidades para formar una entidad. Por ejemplo, los métodos de la presente invención proporcionan la conjugación de una proteína SIM humana recombinante (es decir, SEQ ID NO: 2 ó 3, o fragmentos o derivados o variantes de la misma) unida con otra entidad, por ejemplo, un resto tal como una primera pareja de fusión que hace que la proteína SIM humana recombinante sea estable, tal como una partícula portadora de Ig, por ejemplo, Fc de IgG1. La unión puede ser por medio de ligadores, modificación química, ligadores peptídicos, ligadores químicos, enlaces covalentes o no covalentes o fusión de proteínas, o mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica. La unión puede ser permanente o reversible. En algunas realizaciones, pueden incluirse 5 varios ligadores con el fin de aprovechar las propiedades deseadas de cada ligador y cada proteína en el conjugado. Se contemplan ligadores flexibles y ligadores que aumentan la solubilidad de los conjugados para su uso solos o con otros ligadores tal como se da a conocer en el presente documento. Los ligadores peptídicos 10 pueden unirse mediante la expresión de ADN que codifica para el ligador a una o más proteínas en el conjugado. Los ligadores pueden ser ligadores escindibles por ácido, fotoescindibles y sensibles al calor. Los expertos en la 15 técnica conocen bien métodos para la conjugación y se abarcan para su uso en la presente invención.

Según la presente invención, puede unirse una proteína SIM humana recombinante (es decir, SEQ ID NO: 4 ó 5, o fragmentos, derivados o variantes de la misma) a la primera pareja de fusión mediante cualquier medio adecuado tal como se conoce en la técnica, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 4.625.014, 20 5.057.301 y 5.514.363. Por ejemplo, puede conjugarse de manera covalente una proteína SIM humana recombinante con Fc de IgG1, o bien directamente o bien a través uno o más ligadores. En una realización, se conjuga una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento directamente con la primera pareja de fusión (por ejemplo, Fc) y, en una realización alternativa, puede 25 conjugar una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento con una primera pareja de fusión (tal como Fc de IgG1) mediante un ligador, por ejemplo, un ligador que mejora el transporte.

En la técnica se conocen una gran variedad de métodos para la conjugación de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento con una primera pareja de fusión (por ejemplo, 30 Fc). Tales métodos se describen, por ejemplo, por Hermanson (1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press), en el documento US 6.180.084 y en el documento US 6.264.914, que incluyen, por ejemplo, métodos usados para unir haptenos a proteínas portadoras que se usan de manera rutinaria en inmunología aplicada (véase Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Se reconoce que, en algunos casos, una proteína SIM humana recombinante puede perder 35 eficacia o funcionalidad tras la conjugación dependiendo de, por ejemplo, el procedimiento de conjugación o el grupo químico utilizado en el mismo. Sin embargo, dada la gran variedad de métodos para la conjugación, el experto puede hallar un método de conjugación que no afecte, o afecte mínimamente, a la eficacia o funcionalidad de las entidades, tales como una proteína SIM humana recombinante que va a conjugarse.

40 Los métodos adecuados para la conjugación de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento con una primera pareja de fusión (por ejemplo, Fc) incluyen, por ejemplo, conjugación con carbodiimida (Bauminger y Wilchek, 1980, *Met. Enzymol.* 70: 151-159). Alternativamente, puede acoplarse un resto con un agente de direccionamiento tal como se describe por Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7269-7273 (1996) y Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1794-1799 (1998). Otro método para la 45 conjugación que puede usarse es, por ejemplo, oxidación con peryodato de sodio seguida por alquilación reductora de reactantes apropiados y reticulación con glutaraldehído.

Pueden usarse varios ligadores diferentes para conjugar una proteína SIM humana recombinante tal como se da a 50 conocer en el presente documento con una primera pareja de fusión (por ejemplo, Fc), por ejemplo, pero sin limitarse a, peroxidasa del rábano (HRP) aminocaproica o un agente de reticulación heterobiofuncional, por ejemplo, un agente de reticulación reactivo con carbonilo y reactivo con sulfhidrilo. Los reactivos de reticulación heterobiofuncionales contienen habitualmente dos grupos reactivos que pueden acoplarse con dos dianas funcionales diferentes en proteínas y otras macromoléculas en un procedimiento de dos o tres etapas, lo que 55 puede limitar el grado de polimerización asociado a menudo con el uso de agentes de reticulación homobiofuncionales. Tales protocolos de múltiples etapas pueden ofrecer un gran control sobre el tamaño del conjugado y la razón molar de componentes.

El término "ligador" se refiere a cualquier medio para unir dos o más entidades, por ejemplo, una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento con una primera pareja de fusión (por 60 ejemplo, Fc). Un ligador puede ser un ligador covalente o un ligador no covalente. Los ejemplos de ligadores covalentes incluyen enlaces covalentes o un resto de ligador unido covalentemente a una o más de las proteínas que van a unirse. El ligador también puede ser un enlace no covalente, por ejemplo, un enlace organometálico a través de un centro metálico tal como un átomo de platino. Para los enlaces covalentes, pueden usarse diversas 65 funcionalidades, tales como grupos amida, incluyendo derivados de ácido carbónico, éteres, ésteres, incluyendo ésteres orgánicos e inorgánicos, amino, uretano, urea, y similares. Para proporcionar la unión, pueden modificarse la molécula efectora y/o la sonda mediante oxidación, hidroxilación, sustitución, reducción, etc., para

proporcionar un sitio para el acoplamiento. Se apreciará que se prefiere la modificación que no disminuye significativamente la función de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento ni de la primera pareja de fusión (por ejemplo, Fc).

- 5 Direcciónamiento. En algunas realizaciones, puede dirigirse una proteína SIM humana recombinante, o un fragmento funcional, o un homólogo, para su uso en los métodos y las composiciones tal como se da a conocer en el presente documento a un cáncer o a células ováricas mediante un ligando de direcciónamiento. Un ligando de direcciónamiento es una molécula, por ejemplo, molécula pequeña, proteína o fragmento de la misma, que se une específicamente con alta afinidad a una diana, por ejemplo, un marcador de superficie celular en una célula preseleccionada, tal como una proteína de superficie tal como un receptor que está presente en mayor grado en la célula preseleccionada diana que en cualquier otro tejido corporal. Por consiguiente, en algunas realizaciones, puede fusionarse una proteína SIM humana recombinante para su uso en las composiciones y los métodos tal como se da a conocer en el presente documento con un Fc y/u opcionalmente también con una molécula de direcciónamiento. En algunas realizaciones, puede fusionarse un ácido nucleico que codifica para un ligando de direcciónamiento con un nucleótido que codifica para una proteína SIM humana recombinante, o un fragmento o un homólogo o una variante de la misma. Otro ejemplo de un ligando de direcciónamiento es un grupo de dominios de cadherina de una cadherina humana. Un componente de ligando de direcciónamiento unido a una proteína SIM humana recombinante puede incluir un ligando que se produce de manera natural o recombinante o modificado por ingeniería, o un fragmento del mismo, capaz de unirse a la célula preseleccionada diana.
- 10 20 Los ejemplos adicionales de ligandos de direcciónamiento también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y porciones de los mismos que se unen específicamente a una proteína de superficie celular preseleccionada con alta afinidad. Por "alta afinidad" se entiende una constante de disociación en equilibrio de al menos molar, tal como se determina mediante métodos de ensayo conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis BiaCore. En una realización, el ligando de direcciónamiento también puede comprender uno o más dominios de unión a inmunoglobulina aislados de anticuerpos generados contra un receptor específico de tejido diana o una proteína de superficie específica de tejido seleccionados. El término "inmunoglobulina o anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de mamífero, incluyendo ser humano, que comprende una región de entramado de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente a y reconoce un antígeno, que, en el caso de la presente invención, es una proteína de superficie específica de tejido, un receptor específico de tejido diana, o una porción de los mismos. Si el polipéptido de fusión de direcciónamiento previsto se usará como producto terapéutico para mamíferos, las regiones de unión a inmunoglobulina deben derivarse de las inmunoglobulinas de mamífero correspondientes. Si el polipéptido de fusión de direcciónamiento se prevé para un uso no terapéutico, tal como para pruebas diagnósticas y ELISA, las regiones de unión a inmunoglobulina pueden derivarse de mamíferos o bien humanos o bien no humanos, tales como ratones. Los genes o fragmentos génicos de inmunoglobulina humana incluyen las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como la mirada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligera se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de cada clase de IgG, existen diferentes isótipos (por ejemplo, IgG1, IgG2, etc.). Normalmente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será la más crítica para determinar la especificidad y la afinidad de unión.
- 15 25 30 35 40 Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo de IgG humana comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera (de aproximadamente 25 kD) y una cadena pesada (de aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos "cadena ligera variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diversas peptidasas. Por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')2, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH por un enlace disulfuro. F(ab')2 puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de ese modo el dímero F(ab')2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra. Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse *de novo* o bien químicamente o bien mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Por tanto, los términos inmunoglobulina o anticuerpo, tal como se usan en el presente documento, también incluyen fragmentos de anticuerpo o bien producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o bien sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla (scFv)) o bien identificados usando bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.* (1990) Nature 348:552-554). Además, los polipéptidos de fusión de la invención incluyen las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de inmunoglobulinas, así como proteínas de superficie específicas de tejido y porciones de unión a receptor diana de las mismas. Los métodos para producir tales regiones variables se describen en Reiter, *et al.* (1999) J. Mol. Biol. 290:685-698.

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497; Harlow y Lane (1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY). Los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés pueden clonarse a partir de una célula, por ejemplo, los genes que codifican para un anticuerpo monoclonal pueden clonarse a partir de un hibridoma y usarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. También pueden prepararse bibliotecas de genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas o células plasmáticas. Combinaciones aleatorias de los productos génicos de cadena pesada y ligera generan un gran conjunto de anticuerpos con especificidad antigenica diferente. Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos recombinantes (patente estadounidense n.º 4.946.778; patente estadounidense n.º 4.816.567) para producir anticuerpos usados en los polipéptidos de fusión y en los métodos de la presente invención. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos tales como otros mamíferos para expresar anticuerpos humanos o humanizados. Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo tales como dominios variables, y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados.

El examen y la selección de inmunoglobulinas preferidas (por ejemplo, anticuerpos) pueden llevarse a cabo mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica: puede llevarse a cabo un examen inicial para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para un receptor diana o específico de tejido usando presentación en fagos o métodos basados en ELISA, por ejemplo. Preferiblemente se lleva a cabo un examen secundario para identificar y seleccionar un anticuerpo monoclonal deseado para su uso en la construcción de los polipéptidos de fusión específicos de tejido de la invención. El examen secundario puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Un método, denominado "perfilado asistido por modificación con biosensor" ("BiaMAP") (publicación de patente estadounidense 2004/101920), permite la rápida identificación de clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales con características deseadas. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales se clasifican en distintos grupos relacionados con el epítopo basándose en la evaluación de las interacciones anticuerpo:antígeno.

Producción de proteínas SIM humanas recombinantes

Pueden obtenerse proteínas SIM humanas recombinantes, tales como LR-SIM, etc., útiles en los métodos, las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos usando tecnología de ácidos nucleicos recombinantes convencional, tal como ADN o ARN, preferiblemente ADN. Pueden hallarse pautas e información sobre métodos y materiales para la producción de polipéptidos usando tecnología de ADN recombinante en numerosos tratados y manuales de referencia. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Press; Ausubel *et al.* (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.; Innis *et al.* (eds.), 1990 PCR Protocols, Academic Press.

Alternativamente, pueden obtenerse proteínas SIM humanas recombinantes, tales como LR-SIM, etc., o fragmentos funcionales de las mismas directamente mediante síntesis química, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos comercial según las instrucciones del proveedor. En la técnica se conocen bien métodos y materiales para la síntesis química de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Merrifield, 1963, "Solid Phase Synthesis", J. Am. Chem. Soc. 83:2149-2154.

En algunas realizaciones, puede expresarse una proteína SIM humana recombinante, o un fragmento funcional o un derivado o una variante de la misma, en la célula tras la introducción de un ADN que codifica para la proteína, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para proteínas SIM humanas recombinante u homólogos o derivados funcionales de las mismas, por ejemplo, en un vector de expresión convencional tal como se da a conocer en el presente documento o mediante un catéter o mediante células transformadas con el ácido nucleico *ex vivo* y trasplantadas al sujeto.

Suministro de proteínas SIM humanas recombinantes mediante terapia génica:

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la anticoncepción o prevención del embarazo en un sujeto femenino, comprendiendo el método administrar, al sujeto femenino, una composición que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM o proteína variante SIM según la reivindicación 8. Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica para su uso en un método para conservar la reserva ovárica en un sujeto femenino según la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, se administra una composición que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM o proteína variante SIM en un método para la anticoncepción permanente, por ejemplo, para el tratamiento de animales tales como gatos y perros, y otros animales en los que se desea el control de su población.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la proteína variante SIM se expresa a partir de un vector, en la que el

- vector comprende un polinucleótido que codifica para una proteína SIM recombinante de los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452, o de los aminoácidos 25 a 559 de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína SIM está codificada por un polinucleótido que produce una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un fragmento funcional de las mismas.
- Pueden abarcarse una variedad de vectores que comprenden un polinucleótido que codifica para una proteína SIM recombinante en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, varios de tales vectores se dieron a conocer en el documento US 61/777.135, presentado el 12 de marzo de 2013, en el documento US 61/880.451, presentado el 20 de septiembre de 2013, y en el documento US 61/881.719, presentado el 24 de septiembre de 2013.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. Pueden usarse vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente aquellos compatibles con células de vertebrados, para producir constructos recombinantes para la expresión de una proteína SIM recombinante o un derivado funcional o una variante funcional o un fragmento funcional de la misma tal como se da a conocer en el presente documento. En la técnica se conocen bien vectores de expresión de células eucariotas y están disponibles de varias fuentes comerciales.
- Alternativamente, en algunas realizaciones, puede usarse un vector de expresión plasmídico. Los vectores de expresión plasmídicos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3.1, vectores pET (Novagen®), vectores pGEX (GE Life Sciences) y vectores pMAL (New England labs. Inc.) para la expresión de proteínas en células huésped de *E. coli* tales como BL21, BL21(DE3) y AD494(DE3)pLysS, Rosetta (DE3) y Origami(DE3) (Novagen®); los vectores pcDNA3.1 (Invitrogen™ Inc.) y pCIneo (Promega) basados en el promotor de CMV fuerte para la expresión en líneas celulares de mamífero tales como CHO, COS, HEK-293, Jurkat y MCF-7; vectores adenovirales incompetentes para la replicación pAdeno X, pAd5F35, pLP-Adeno-X-CMV (Clontech®), pAd/CMV/V5-DEST, vector pAd-DEST (Invitrogen™ Inc.) para la transferencia y expresión de genes mediadas por adenovirus en células de mamífero; vectores de retrovirus pLNCX2, pLXSN, y pLAPSN para su uso con el sistema Retro-X™ de Clontech para la transferencia y expresión de genes mediadas por retrovirus en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6,2/V5-GW/lacZ (INVITROGEN™ Inc.) para la transferencia y expresión de genes mediadas por lentivirus en células de mamífero; vectores de expresión de virus adenoasociados tales como los vectores pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP y pAAV-RC (Stratagene®) para la transferencia y expresión de genes mediadas por virus adenoasociados en células de mamífero; baculovirus BACpak6 (Clontech®) y pFastBac™ HT (Invitrogen™ Inc.) para la expresión en líneas celulares de insecto *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) y Sf11; pMT/BIP/V5-His (Invitrogen™ Inc.) para la expresión en células S2 de *Drosophila Schneider*; vectores de expresión de *Pichia* pPICZα, pPICZ, pFLDα y pFLD (Invitrogen™ Inc.) para la expresión en *Pichia pastoris* y vectores pMETα y pMET para la expresión en *P. methanolica*; vectores pYES2/GS y pYD1 (Invitrogen™ Inc.) para la expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen avances recientes en la expresión a gran escala de proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii* por Griesbeck C. et al., 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 y Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5. Se insertan secuencias codificantes heterólogas extrañas en el genoma del núcleo, el cloroplasto y la mitocondria mediante recombinación homóloga. Puede usarse el vector de expresión de cloroplasto p64 que porta el marcador seleccionable de cloroplastos más versátil, aminoglicósido adenil transferasa (aadA), que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomicina, para expresar proteína extraña en el cloroplasto. Se usa el método de cañón de genes biológico para introducir el vector en algas. Tras su entrada en los cloroplastos, el ADN extraño se libera a partir de las partículas del cañón de genes y se integra en el genoma del cloroplasto a través de recombinación homóloga.
- En algunas realizaciones, el vector de expresión es pcDNA3.1 o ADNc o un vector genómico para bacterias (por ejemplo, *E. coli*) o un bacteriófago.
- En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante, o una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional de la misma, tal como se da a conocer en el presente documento, puede administrarse de manera adecuada como un vector, por ejemplo, un vector viral. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral puede ser un vector adenoviral, un vector de poxvirus o un vector lentiviral. Otros vectores virales incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, poxvirus tales como un orthopox (vaccinia y vaccinia atenuada), avipox, lentivirus, virus de la leucemia murina de Moloney, etc.
- En algunas realizaciones, el vector viral es un virus adenoasociado (AAV). En particular, los inventores han demostrado en el presente documento que el nivel de expresión de proteína SIM por un vector AAV9 que comprende un constructo AAV-SIM fue alto y se mantuvo durante los 60 días de experimento (figura 1A). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento puede permitir la anticoncepción permanente en el sujeto después de una única inyección, en el que la composición administrada

al sujeto puede mantener la expresión de SIM igual o superior a un nivel de umbral. El nivel de umbral es el nivel mínimo de SIM necesario para lograr un bloqueo completo de la foliculogénesis en el sujeto. Debe observarse que el nivel de umbral puede depender del sujeto o de la especie del sujeto. Existen varias situaciones prácticas en las que se desea una anticoncepción permanente, por ejemplo, en aplicaciones veterinarias.

- 5 Recientemente, se han desarrollado y empleado AAV, que normalmente infectan a mamíferos, incluyendo seres humanos, pero que no son patógenos, como vectores de terapia génica en ensayos clínicos en los Estados Unidos y Europa (Daya y Berns, Clinical Microbiology Reviews 2008, 21, 583-593). En algunas realizaciones, el AAV es AAV9.
- 10 En algunas realizaciones, puede usarse eficazmente un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante, o una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM), en el tratamiento mediante terapia génica. Véase generalmente, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346. El principio general es introducir el polinucleótido en una célula diana de un paciente en la que se transcribe en la proteína.
- 15 Puede facilitarse la entrada en la célula mediante técnicas adecuadas conocidas en la técnica tales como proporcionar el polinucleótido en forma de un vector adecuado o encapsular el polinucleótido en un liposoma.
- 20 Un modo deseado de terapia génica es proporcionar el polinucleótido en una manera tal que se replicará en el interior de la célula, aumentando y prolongando el efecto deseado. Por tanto, el polinucleótido se une operativamente a un promotor adecuado, tal como el promotor natural del gen correspondiente, un promotor heterólogo que es intrínsecamente activo en células hepáticas, nerviosas, óseas, musculares, cutáneas, articulares o cartilaginosas, o un promotor heterólogo que puede inducirse por un agente adecuado.
- 25 Los sistemas de vectores virales que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores de virus del herpes simple; (e) vectores del SV40; (f) vectores del virus del poliomielitis; (g) vectores del virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de poxvirus tales como un orthopox, por ejemplo, vectores de virus vaccinia, o un avipox, por ejemplo, viruela del canario o viruela aviar; y (j) un adenovirus cobarde (*gutless*) o dependiente de virus auxiliar. En una realización preferida, el vector es un adenovirus. También pueden ser ventajosos virus con replicación defectuosa.
- 30 35 El vector puede incorporarse o no en el genoma celular. Los constructos pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Alternativamente, el constructo puede incorporarse en vectores con capacidad de replicación episómica, por ejemplo, vectores de VEP y VEB.
- 40 Generalmente, los constructos para la expresión de un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante, o una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, ADN, MOD-ARN o ARNa, pueden unirse operativamente con elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, etc., para garantizar la expresión del constructo en células dianas. A continuación se describen en mayor detalle otros detalles específicos para vectores y constructos.
- 45 En algunas realizaciones, el vector inducible comprende pcDNA3.1 o un ADNc o un vector genómico para bacterias (por ejemplo, *E. coli*) o un bacteriófago.
- 50 55 En algunas realizaciones, el vector inducible comprende un vector viral.
- En algunas realizaciones de las composiciones que están administrándose que comprenden un vector inducible, puede revertirse el número de folículos primordiales que están reclutándose a un nivel normal mediante la inhibición de la expresión de SIM. En la técnica se conoce el uso de vectores inducibles para regular la expresión génica o la síntesis de proteínas, véase por ejemplo, los documentos WO1993022431, US20110301228, US6500647, WO2005053750 o US6784340.
- 60 65 En algunas realizaciones, la proteína SIM o proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) se expresa por un vector inducible, que puede comprender uno o más elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, etc., que se unen operativamente al polinucleótido que codifica para una proteína SIM recombinante, mediante lo cual los elementos reguladores pueden controlar el nivel de expresión de SIM.
- Los elementos reguladores típicos incluyen, pero no se limitan a, promotores transcripcionales, promotores inducibles y elementos transcripcionales, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica para sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias para controlar la terminación de la transcripción y/o traducción. En el término "elementos reguladores" se incluyen secuencias de ácido nucleico tales como señales de iniciación, potenciadores y promotores que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteínas con las que se unen operativamente. En algunos ejemplos, la transcripción de un gen recombinante está bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora transcripcional) que controla la expresión del gen recombinante en un tipo de célula en la que se

pretende la expresión. También se entenderá que el gen recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras transcripcionales que son iguales o que son diferentes de las secuencias que controlan la transcripción de la forma que se producen de manera natural de una proteína. En algunos casos, la secuencia promotora se reconoce por la maquinaria sintética de la célula o por la maquinaria sintética introducida requerida para iniciar la transcripción de un gen específico.

Las secuencias reguladoras pueden ser una única secuencia reguladora o múltiples secuencias reguladoras, o secuencias reguladoras modificadas o fragmentos de las mismas. Las secuencias reguladoras modificadas son secuencias reguladoras en las que se ha cambiado o modificado la secuencia de ácido nucleico mediante algún medio, por ejemplo, pero sin limitarse a, mutación, metilación, etc. Secuencias reguladoras útiles en los métodos tal como se da a conocer en el presente documento son elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable de manera específica para un tipo de célula, específica para un tejido o inducible mediante señales o agentes externos (por ejemplo, potenciadores o represores); tales elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' ó 3' del gen nativo o dentro de un intrón.

Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor específico de tejido" significa una secuencia de ácido nucleico que sirve como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada unida operativamente al promotor, y que afecta selectivamente a la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en células específicas de un tejido, tales como células de origen ovárico.

El término "promotor constitutivamente activo" se refiere a un promotor de un gen que se expresa en todo momento dentro de una célula dada. Los promotores a modo de ejemplo para su uso en células de mamífero incluyen citomegalovirus (CMV), y para su uso en células procariotas incluyen los promotores de bacteriófago T7 y T3, y similares.

El término "promotor inducible" se refiere a un promotor de un gen que puede expresarse en respuesta a una señal dada, por ejemplo, adición o reducción de un agente. Ejemplos no limitativos de un promotor inducible son los promotores "tet-on" y "tet-off", o promotores que se regulan en un tipo de tejido específico.

En una realización específica, pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, ADN, MOD-ARN o ARNa, que codifican para una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional de la misma tal como se da a conocer en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller *et al.*, Met. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína SIM humana recombinante se clonian en uno o más vectores, lo que facilita el suministro del gene a un paciente. Pueden hallarse más detalles sobre vectores retrovirales en Boesen *et al.*, Biotherapy 6:291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen mdr1 a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993).

La producción de un vector retroviral recombinante que porta un gen de interés se logra normalmente en dos etapas. En primer lugar, puede insertarse la secuencia que codifica para una proteína SIM humana recombinante o un derivado funcional o una variante funcional o un fragmento funcional de la misma, sola o fusionada con Fc, en un vector retroviral que contiene las secuencias necesarias para la expresión eficiente de los reguladores metabólicos (incluyendo elementos promotores y/o potenciadores que pueden proporcionarse por repeticiones terminales largas (LTR) virales o por un promotor/potenciador interno y señales de corte y empalme relevantes), secuencias requeridas para el empaquetamiento eficiente del ARN viral para dar viriones infecciosos (por ejemplo, una señal de empaquetamiento (Psi), un sitio de unión a cebador (-PBS) de ARNt, una secuencia reguladora 3' requerida para la transcripción inversa (+PBS)) y una LTR virales). Las LTR contienen secuencias requeridas para la asociación de ARN genómico viral, funciones de transcriptasa inversa y integrasa, y secuencias implicadas en el direccionamiento de la expresión del ARN genómico que va a empaquetarse en partículas virales.

Tras la construcción del vector retroviral recombinante, se introduce el ADN de vector en una línea celular de empaquetamiento. Las líneas celulares de empaquetamiento proporcionan proteínas virales requeridas en *trans* para el empaquetamiento de ARN genómico viral en partículas virales que tienen la gama de huéspedes deseada (por ejemplo, proteínas del núcleo (gag), polimerasa (pol) y de la envoltura (env) codificadas por el virus). La gama de huéspedes se controla, en parte, por el tipo de producto génico de la envoltura expresado en la superficie de la partícula viral. Las líneas celulares de empaquetamiento pueden expresar productos génicos de la envoltura ecotrópicos, anfotrópicos o xenotrópicos. Alternativamente, la línea celular de empaquetamiento puede carecer de secuencias que codifican para una proteína de la envoltura (env) vírica. En este caso, la línea celular de empaquetamiento puede empaquetar el genoma viral para dar partículas que carecen de una proteína asociada a la membrana (por ejemplo, una proteína env). Para producir partículas virales que contienen una

- proteína asociada a la membrana que permite la entrada del virus en una célula, puede transfectarse la línea celular de empaquetamiento que contiene las secuencias retrovirales con secuencias que codifican para una proteína asociada a la membrana (por ejemplo, la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV)). A continuación, la célula de empaquetamiento transfectada puede producir partículas virales que contienen la proteína asociada a la membrana expresada por la línea celular de empaquetamiento transfectada; se dice que estas partículas virales que contienen ARN genómico viral derivado de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura de otro virus son partículas virales pseudotipadas.
- 5 Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios, en los que provocan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus presentan la ventaja de poder infectar células que no se encuentran en división. Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de los macacos de la India. Otro vector viral preferido es un poxvirus tal como un virus vaccinia, por ejemplo, una vaccinia atenuada tal como virus de Ankara modificado (MVA) o NYVAC, un avipox tal como viruela aviar o viruela del canario. Pueden hallarse otros casos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); publicación PCT WO94/12649; y Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). En otra realización, se usan vectores lentivirales, tales como los vectores basados en el VIH descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.143.520; 5.665.557; y 5.981.276. En algunas realizaciones, se usa un vector viral tal como un vector de virus adenoasociado (AAV). Se dan a conocer vectores de AAV a modo de ejemplo en Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); la patente estadounidense n.^o 5.436.146; Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2005, 5, 285-297; Vandenberghe *et al.*, *Gene Therapy* 2009, 16, 311-319; Gao *et al.*, *PNAS* 2002, 99, 11854-11859; Gao *et al.*, *PNAS* 2003, 100, 6081-6086; Gao *et al.*, *J. of Virology* 2004, 78, 6381-6388; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4^a edición) ed. por M. Green y J. Sambrook.
- 10 30 En algunas realizaciones, el vector de AAV es un AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.10, AAV2.5. Debe observarse que la selección de un tipo particular de vectores de AAV puede depender del tejido diana. En algunas realizaciones, un vector de AAV para expresar una proteína SIM, o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM), es AAV9 tal como se da a conocer en el presente documento en los ejemplos.
- 15 35 En algunas realizaciones, cuando una proteína SIM humana recombinante, o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM), codificada por un vector viral se expresa de manera endógena en un sujeto, el nivel de expresión de la proteína SIM humana recombinante dada a conocer en el presente documento puede ser constante a lo largo de un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, o al menos 5 años. En
- 20 40 45 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000
- Otro enfoque de terapia génica implica transferir un gen a células en histocultivo mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Luego se someten las células a selección para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Luego se suministran esas células a un paciente.
- 50 La patente estadounidense n.^o 5.676.954 notifica la inyección de material genético, complejado con portadores liposómicos catiónicos, en ratones. Las patentes estadounidenses n.^{os} 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055 y la publicación internacional n.^o WO 94/9469 proporcionan lípidos catiónicos para su uso en la transfección de ADN en células y mamíferos. Las patentes estadounidenses n.^{os} 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055 y la publicación internacional n.^o WO 94/9469 proporcionan métodos para suministrar complejos ADN-lípido catiónico a mamíferos. Tales complejos o nanopartículas de lípidos catiónicos también pueden usarse para suministrar proteína.
- Puede introducirse un gen o una secuencia de ácido nucleico en una célula diana mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede introducirse un constructo de proteína SIM humana recombinante en una célula mediante transfección (por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio o por DEAE-dextrano), lipofección, electroporación, microinyección (por ejemplo, mediante inyección directa de ADN desnudo), biolística, infección con un vector viral que contiene un transgén relacionado con el músculo, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica mediada por microcélulas, transferencia nuclear transfer, y similares. Puede introducirse un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante en células mediante electroporación (véase, por ejemplo, Wong y Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:584-87 (1982)) y biolística (por ejemplo, un cañón de genes; Johnston y Tang, *Methods Cell*

Biol. 43 Pt A:353-65 (1994); Fynan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11478-82 (1993)).

En determinadas realizaciones, puede introducirse un gen o una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante en células diana mediante transfección o lipofección. Los agentes adecuados para la transfección o lipofección incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, Lipofectin,

5 Lipofectamine, DIMRIE C, Superfect y Effectin (Qiagen), Unifectin, Maxifectin, DOTMA, DOGS (Transfectam; dioctadecilamidogliciliclespermina), DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DHDEAB (bromuro de N,N-di-n-hexadecil-N,N-dihidroxietilamonio), HDEAB (bromuro de N-n-hexadecil-N,N-dihidroxietilamonio), polibreno, polietilenimina (PEI), y similares. (Véase, por ejemplo, Banerjee *et al.*, Med. Chem. 42:4292-99 (1999); Godbey *et al.*, Gene Ther. 6:1380-88 (1999); Kichler *et al.*, Gene Ther. 5:855-60 (1998); Birchaa *et al.*, J. Pharm. 183:195-207 (1999)).

10 Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para el suministro terapéutico de agentes tales como proteínas y/o ácidos nucleicos para el suministro de un polipéptido o ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante a un sujeto, por ejemplo, transfección celular, terapia génica, administración directa con un vehículo de suministro o portador farmacéuticamente aceptable, suministro indirecto proporcionando células recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de fusión de direccionamiento de la invención.

15 20 Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar directamente polipéptidos terapéuticos tales como una proteína SIM humana recombinante y/o un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el compuesto, y endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural y oral. Los agentes pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de las mucosas epiteliales o mucocutáneas (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

25 30 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de manera local al área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, mediante inyección, por medio de un catéter o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas sialísticas, fibras o sustitutos cutáneos comerciales.

35 40 En otra realización, el agente activo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) Science 249:1527-1533). En aún otra realización, el agente activo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer (1990), citado anteriormente). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Howard *et al.* (1989) J. Neurosurg. 71:105).

45 50 Por tanto, en la técnica se conoce una amplia variedad de constructos y vectores de transferencia génica/terapia génica. Estos vectores se adaptan fácilmente para su uso en los métodos de la presente invención. Mediante la manipulación apropiada usando técnicas de ADN recombinante/biología molecular para insertar un segmento de ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante unido operativamente en el vector de expresión/suministro seleccionado, pueden generarse muchos vectores equivalentes para la práctica de los métodos descritos en el presente documento.

55 60 50 Los expertos apreciarán que los genes clonados pueden manipularse fácilmente para alterar la secuencia de aminoácidos de una proteína. El gen clonado para una proteína SIM humana recombinante puede manipularse mediante varias técnicas bien conocidas para la mutagénesis *in vitro*, entre otras, para producir variantes de la proteína humana que se produce de manera natural, denominadas en el presente documento muteínas o variantes o mutantes de una proteína SIM humana recombinante, que pueden usarse según los métodos y las composiciones descritos en el presente documento.

65 La variación en la estructura primaria de muteínas de una proteína SIM humana recombinante útil en la invención puede incluir, por ejemplo, delecciones, adiciones y sustituciones. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras. Las diferencias entre la proteína natural y la muteína generalmente conservan propiedades deseadas, mitigan o eliminan propiedades no deseadas y añaden propiedades deseadas o nuevas.

Remington's Pharmaceutical sciences Ed. Germany, Merk Publishing, Easton, PA, 1995 da a conocer diversos portadores usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales

como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agua; solución salina isotónica; solución de Ringer, alcohol etílico y disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y sulfato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes que también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen varios medios para administrar la composición descrita en el presente documento a sujetos. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, las 15 composiciones se administran a través de vías incluyendo, pero sin limitarse a, administración ocular, oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, aérea (aerosol), pulmonar, cutánea, tópica y mediante inyección. La administración puede ser local o sistémica. En una realización preferida, la administración es mediante inyección. En algunas realizaciones, pueden realizarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más 20 administraciones durante el transcurso de la anticoncepción.

20 Administración de una composición farmacéutica

Se administra una cantidad o dosificación eficaz de la composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o del ácido nucleico que codifica para la misma para reducir el número de 25 folículos primordiales que están reclutándose. Por ejemplo, una cantidad eficaz es la cantidad de proteína SIM o proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o de ácido nucleico que codifica para la misma para reducir el número de folículos primordiales que están reclutándose en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 99% en comparación con cuando no se administra la composición. Una cantidad de la composición 30 que comprende una proteína SIM o proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o un ácido nucleico que codifica para la misma administrada a un sujeto femenino se considera eficaz cuando la cantidad es suficiente para reducir el número de folículos primordiales que están reclutándose hasta un número deseable o disminuir la probabilidad de reclutamiento de un folículo primordial hasta un valor deseable. En algunas realizaciones, la cantidad de composición administrada es suficiente para lograr la anticoncepción.

35 En algunas realizaciones, una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o un ácido nucleico que codifica para la misma puede administrarse de una sola vez o dividirse en subdosis, por ejemplo, 2-4 subdosis, y administrarse a lo largo de un periodo de tiempo, por ejemplo, a intervalos apropiados durante el día u otra pauta apropiada. En algunas realizaciones, la administración puede ser crónica, 40 por ejemplo, una o más dosis y/o tratamientos al día a lo largo de un periodo de semanas o meses. Ejemplos de pautas posológicas y/o esquemas de tratamiento son la administración una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro o más veces al día a lo largo de un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses, o más. La dosificación no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos.

45 En las realizaciones de administrar una composición que comprende SIM, para revertir el número de folículos primordiales que están reclutándose a un nivel normal, se termina la administración de la composición que comprende SIM. El término "nivel normal" se usa en el presente documento para referirse al número de folículos primordiales que están reclutándose en ausencia de cualquier administración de SIM o SIM no natural.

50 Puede administrarse una proteína variante SIM humana recombinante o un derivado o fragmento funcional de la misma mediante cualquier vía conocida en la técnica o descrita en el presente documento, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa o intramuscular), intraperitoneal, rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalación, a través de la piel (parche) u ocular. La proteína SIM humana recombinante o el derivado o fragmento funcional de la proteína puede administrarse en cualquier dosis o pauta posológica.

55 Con respecto a los métodos terapéuticos de la invención, no se pretende que la administración de una proteína SIM humana recombinante o un polinucleótido que codifica para una proteína SIM humana recombinante de este tipo o un fragmento funcional de la misma se limite a un modo de administración, una dosificación o una frecuencia de dosificación particular; la presente invención contempla todos los modos de administración, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravesicular, intraarticular, intralesional, subcutánea o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para tratar una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inmunitario tal como se da a conocer en el presente documento. Puede administrarse una cantidad eficaz, por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz, de una proteína SIM humana recombinante al paciente en una dosis única o en múltiples dosis. Cuando se administran múltiples dosis, las dosis pueden separarse unas de otras por, por ejemplo, una hora, tres horas, seis horas, ocho horas, un día, dos días, una semana, dos

semanas o un mes. Por ejemplo, una composición que comprende un agente de proteína SIM humana recombinante puede administrarse durante, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más semanas. Debe entenderse que, para cualquier sujeto particular, deben ajustarse las pautas posológicas específicas a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Por ejemplo, puede aumentarse la dosificación del producto terapéutico si una dosis más baja no proporciona suficiente actividad terapéutica.

La administración de las composiciones que comprenden una proteína SIM humana recombinante o variante de proteína SIM o un ácido nucleico que codifica para la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede ser por vía parenteral o no parenteral, pero es preferiblemente oral o intravenosa. El tratamiento puede ser durante períodos cortos de tiempo, por ejemplo, pulsado o continuo durante toda la vida del paciente. En todos los aspectos de las realizaciones tal como se da a conocer en el presente documento, los agentes y las composiciones tal como se da a conocer en el presente documento se administran mediante administración pulsada. En algunas realizaciones, se administran por vía oral al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto está sometiéndose, o se someterá, a un tratamiento quimioterápico o tratamiento contra el cáncer.

En algunas realizaciones, la cantidad de una proteína SIM o variante de proteína SIM se administra a un sujeto (en pulsos, como tratamiento continuo o como una única administración (por ejemplo, mediante expresión por terapia génica de la proteína SIM o variantes de proteína SIM)) de tal manera que los niveles en sangre de la proteína SIM o variante de proteína SIM en el sujeto tratado son superiores a aproximadamente el 20%, o superiores a aproximadamente el 30%, o superiores a aproximadamente el 40%, o superiores a aproximadamente el 50%, o entre aproximadamente el 50 y el 100%, o superiores a aproximadamente 2 veces, o superiores a aproximadamente 3 veces, o superiores a aproximadamente 4 veces, o superiores a aproximadamente 5 veces o más de 5 veces los niveles en sangre de la proteína SIM endógena en un sujeto femenino de la misma edad, se consideran generalmente suficientes para detener la foliculogénesis en el sujeto y, por tanto, son cantidades suficientes de la proteína SIM o proteína variante SIM para su uso en métodos para la anticoncepción o para conservar la reserva ovárica (por ejemplo, para prevenir una disminución en la reserva ovárica funcional (ROF)) tal como se da a conocer en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de una proteína variante SIM o un ácido nucleico que codifica para la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede ser una única administración, por ejemplo, mediante un vector, por ejemplo, vector viral, o terapia génica, cuando es deseable la detención permanente de la foliculogénesis, por ejemplo, para la anticoncepción permanente de animales tales como perros y gatos.

En una realización alternativa, la administración de una proteína variante SIM tal como se da a conocer en el presente documento es mediante administración pulsada, por ejemplo, para la detención temporal de la foliculogénesis, por ejemplo, para prevenir temporalmente la disminución en la ROF o para la anticoncepción temporal de sujetos, por ejemplo, sujetos humanos, cuando el sujeto desea quedarse embarazada en un momento posterior en su vida.

En algunas realizaciones, la administración pulsada de una composición que comprende una variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento es más eficaz que el tratamiento continuo porque las dosis pulsadas totales a menudo son menores de lo que se esperaría de la administración continua de la misma composición. Puede reducirse cada dosis pulsada y se minimiza la cantidad total de fármaco administrado a lo largo del transcurso del tratamiento. Puede reducirse cada dosis pulsada y puede minimizarse la cantidad total de fármaco administrado al paciente a lo largo del transcurso del tratamiento. Con la terapia pulsada, los niveles *in vivo* de una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento pueden caer por debajo del nivel requerido para el tratamiento continuo eficaz. La administración pulsada puede reducir la cantidad de una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento administrada al paciente por dosis y/o por régimen de tratamiento total con una mayor eficacia. La administración pulsada puede proporcionar un ahorro de tiempo, esfuerzos y gastos, y una menor dosis eficaz puede reducir el número y la gravedad de complicaciones que puede experimentar un sujeto. Como tal, la pulsación puede ser más eficaz que la administración continua de la misma composición.

En las formas tradicionales de terapia, la administración repetida se diseña para mantener un nivel deseado de un principio activo en el cuerpo. Con mucha frecuencia, las complicaciones que se desarrollan pueden atribuirse a los niveles de dosificación que, para ser eficaces, son casi tóxicos o de otro modo perjudiciales para las células normales. En cambio, con la terapia pulsada, los niveles *in vivo* de fármaco caen por debajo del nivel requerido para el tratamiento continuo eficaz. Por tanto, la pulsación no es simplemente la administración de un bolo lo suficientemente grande como para que haya una alta concentración terapéuticamente suficiente de una proteína SIM o variante de proteína SIM en la sangre del sujeto durante un periodo de tiempo prolongado suficiente para detener la foliculogénesis durante el periodo de tiempo deseado. La administración pulsada puede reducir sustancialmente la cantidad de la composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM administrada al paciente por dosis o por régimen de tratamiento total con una mayor eficacia. Esto representa un

ahorro significativo de tiempo, esfuerzos y gastos y, de manera más importante, una menor dosis eficaz reduce sustancialmente el número y la gravedad de complicaciones que pueden experimentar los pacientes.

- 5 En determinadas realizaciones, una administración pulsada comprende administrar una o más proteínas SIM o proteínas variantes SIM durante aproximadamente 4 semanas, seguido por no administrar ninguna proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 1 semana. En algunas realizaciones, la administración pulsada comprende administrar al menos una proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 6 semanas, seguido por no administrar ninguna proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 2 semanas. En determinadas realizaciones, la administración pulsada comprende administrar al menos una proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 4 semanas, seguido por no administrar ninguna proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 2 semanas. En algunas realizaciones, la administración pulsada comprende administrar al menos una proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 2 semanas, seguido por no administrar ninguna proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 2 semanas. En algunas realizaciones, la administración pulsada comprende pulsos de administrar al menos una proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 12 meses o más de 12 meses. En determinadas realizaciones, la administración pulsada comprende intervalos de no administrar ninguna proteína SIM o proteína variante SIM durante aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 12 meses o más de 12 meses. En algunas realizaciones, la administración es continua. En determinadas realizaciones, la administración de una proteína SIM o proteína variante SIM es durante toda la vida del sujeto, cuando se justifica o desea la anticoncepción permanente.

- 35 Pueden suministrarse pulsos individuales de una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento al paciente de manera continua a lo largo de un periodo de varias horas, tal como aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ó 16 horas, o varios días, tal como 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días, o más de 7 días, por ejemplo, aproximadamente 7-14 días, o de 14 días a 3 semanas, o 3-4 semanas, o 4-6 semanas, o más de 6 semanas. Por ejemplo, puede suministrarse una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 a 20 días o de 10 a 30 días, seguido por un periodo de 7 días sin tratamiento.
- 40 40 En una realización, una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer puede administrarse a un sujeto durante aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente cinco semanas, o más de cinco semanas, por ejemplo, aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5, o aproximadamente 6, o aproximadamente 7 o más meses, y luego se administra posteriormente después de un intervalo apropiado durante un periodo de tiempo adicional, por ejemplo, durante aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente cinco días, o más de cinco días. Los ciclos de tratamiento pueden producirse en sucesión inmediata o con un intervalo sin tratamiento entre ciclos. Normalmente, cuando al sujeto se le administra una composición que comprende una proteína SIM o proteína variante SIM tal como se da a conocer en el presente documento para la conservación de la reserva ovárica (por ejemplo, en un método para prevenir una disminución en la reserva ovárica funcional (ROF)), a un sujeto puede administrársele la composición durante periodo de entre aproximadamente 3 y 4 meses, o un periodo de entre aproximadamente 4 y 6 meses, o un periodo de entre aproximadamente 6 y 8 meses, o un periodo de entre aproximadamente 8 y 12 meses, o un periodo de entre aproximadamente 12 y 24 meses, o un periodo de entre aproximadamente 24 y 36 meses, o más de aproximadamente 36 meses, seguido por un intervalo sin suministro, tal como se comenta en el presente documento. En algunas realizaciones, cuando al sujeto se le administra una composición que comprende una proteína SIM o proteína variante SIM tal como se da a conocer en el presente documento en un método de anticoncepción, a un sujeto puede administrársele la composición durante un periodo de entre aproximadamente 3 y 4 meses, o un periodo de entre aproximadamente 4 y 6 meses, o un periodo de entre aproximadamente 6 y 8 meses, o un periodo de entre aproximadamente 8 y 12 meses, o un periodo de entre aproximadamente 12 y 24 meses, o un periodo de entre aproximadamente 24 y 36 meses, o más de aproximadamente 36 meses, o siempre que el sujeto no desee quedarse embarazada, seguido por un intervalo sin suministro.
- 55 65 En algunas realizaciones, cuando se usa terapia pulsada, el intervalo entre pulsos o el intervalo sin suministro es mayor de 24 horas y preferiblemente mayor de 48 horas, y puede ser incluso más largo, tal como durante 3, 4, 5,

- 6, 7, 8, 9 ó 10 días, dos, tres o cuatro semanas, o incluso más largo. En algunas realizaciones, un experto habitual en la técnica puede determinar el intervalo entre pulsos, por ejemplo, tal como se demuestra en el presente documento en los ejemplos, mediante la medición del nivel de proteína SIM en la sangre en el sujeto después de la administración de la composición (por ejemplo, la dosis pulsada) y la administración de un pulso
- 5 cuando el nivel de ARNm de SIM o proteína SIM alcanza un determinado límite de umbral predefinido bajo. Un experto habitual en la técnica puede determinar tales límites de umbral de predefinidos bajos, y pueden ser, por ejemplo, aproximadamente el nivel inicial, o aproximadamente el 100% o aproximadamente el 200%, o aproximadamente el 300%, o aproximadamente el 400%, o aproximadamente el 500%, o más del 500% superiores al nivel inicial de los niveles de proteína SIM exógena en un sujeto femenino de la misma edad.
- 10 Alternativamente, en algunas realizaciones, el intervalo entre pulsos puede calcularse mediante la administración de otra dosis de una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento y cuando el componente activo de la composición ya no es detectable en el paciente antes del suministro del siguiente pulso. Alternativamente, los intervalos también pueden calcularse a partir de la semivida *in vivo* de la composición. Por ejemplo, los intervalos también pueden calcularse a partir de la semivida *in vivo* de la composición o a partir de los niveles de proteína SIM o proteína variante SIM en la sangre. Los intervalos pueden calcularse como mayores que la semivida *in vivo*, o 2, 3, 4, 5 e incluso 10 veces mayores que la semivida de la composición. Para las composiciones con semivididas bastante rápidas, los intervalos pueden ser 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e incluso 500 veces la semivida de la composición
- 15 20 química. El número de pulsos en un único régimen terapéutico puede ser tan bajo como de dos, pero normalmente es de desde aproximadamente 5 hasta 10, de 10 a 20, de 15 a 30, o más. En algunas realizaciones, los pacientes reciben una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento durante su vida, o durante un periodo de tiempo deseado cuando el sujeto no desea quedarse embarazada, según los métodos de esta invención sin los problemas e inconvenientes asociados con las terapias actuales.
- 25 En determinadas realizaciones, una composición que comprende una variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede administrarse prácticamente mediante cualquier medio, pero preferiblemente se suministra al paciente como inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraarterial), infusión o instilación, y más preferiblemente mediante ingestión oral o administración intravaginal.
- 30 En algunas realizaciones, la administración de una composición que comprende una variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede ser intermitente; por ejemplo, la administración puede ser una vez cada dos días, cada tres días, cada cinco días, una vez a la semana, una vez o dos veces al mes, y similares. La cantidad, las formas y/o cantidades de las diferentes formas de una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento pueden variarse en diferentes momentos de la administración.
- 35 En algunas realizaciones, una composición que comprende una variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede administrarse a un sujeto antes de administrar un tratamiento quimioterápico o una radioterapia al sujeto. En realizaciones alternativas, una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede coadministrarse a un sujeto concurrentemente con otro agente o régimen de tratamiento, por ejemplo, concurrentemente con un tratamiento quimioterápico o una radioterapia. En algunas realizaciones, una
- 40 45 composición que comprende una variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede coadministrarse con una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes adicionales. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse mediante administración pulsada. Por ejemplo, puede administrarse una composición que comprende una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento a un sujeto, seguido por un tratamiento quimioterápico o una radioterapia
- 50 55 después de que haya pasado un intervalo de tiempo, y puede repetirse este orden de administración con el mismo intervalo de tiempo o similar, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más veces. La administración pulsada de una o más composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína SIM o variante de proteína SIM tal como se da a conocer en el presente documento puede usarse para el tratamiento profiláctico, por ejemplo, un sujeto que se someterá, o se ha sometido, o está sometiéndose actualmente, a quimioterapia y quimioradioterapia, para evitar la insuficiencia ovárica prematura inducida por quimioterapia o radioterapia.
- 60 En algunas realizaciones, un sujeto puede recibir una o más composiciones que comprenden una variante de proteína SIM tal como se da a conocer durante su vida según los métodos de esta invención, por ejemplo, cuando el sujeto desea prevenir permanentemente el embarazo, por ejemplo, para sujetos animales tales como gatos y perros. Las composiciones pueden administrarse prácticamente mediante cualquier medio, y pueden suministrarse al sujeto como formulación oral, o mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraarterial), infusión o instilación. Se dan a conocer diversos métodos y aparatos para la pulsación de composiciones mediante infusión u otras formas de suministro al paciente en las patentes estadounidenses n.^os 4.747.825; 4.723.958; 4.948.592; 4.965.251; y 5.403.590.

- Si bien el médico responsable decidirá en última instancia la cantidad y la pauta posológica apropiadas, puede proporcionarse una cantidad eficaz de una proteína SIM humana recombinante o un derivado o fragmento funcional de la misma a una dosis de 0,0001, 0,01, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 ó 1,000 mg/kg. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas o bioensayos de prueba de modelo *in vitro* o animal. En algunas realizaciones, las dosis de una proteína SIM humana recombinante son de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (peso corporal del paciente), aunque también pueden administrarse dosis menores y mayores.
- En algunas realizaciones, los intervalos de referencia para las dosis de SIM humana recombinante se estiman a partir de grupos de referencia en los Estados Unidos, y se dan a conocer en Antimullerian Hormone (AMH), Serum from Mayo Medical Laboratories. Recuperado en abril de 2012. En algunas realizaciones, a los sujetos femeninos pueden administrárseles las siguientes dosis de SIM humana recombinante: mujeres de 13-45 años: de 1 a 10 ng/ml; mujeres mayores de 45 años: menos de 1 ng/ml. Se observa que las mediciones de SIM pueden ser menos precisas si la persona que está midiéndose presenta deficiencia de vitamina D.
- Un experto habitual en la técnica puede determinar las dosificaciones para un paciente o sujeto particular usando consideraciones convencionales (por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado). Un médico puede recetar, por ejemplo, una dosis relativamente baja al principio, posteriormente aumentar la dosis hasta que se obtenga una respuesta apropiada. La dosis administrada a un paciente es suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo, o, por ejemplo, para reducir los síntomas, u otra actividad apropiada, dependiendo de la aplicación. La dosis se determina por la eficacia de la formulación particular y la actividad, estabilidad o semivida sérica de una proteína SIM humana recombinante o derivados funcionales o fragmentos funcionales de la misma tal como se da a conocer en el presente documento, y el estado del paciente, la enfermedad autoinmunitaria que va a tratarse, así como el peso corporal o el área de superficie del paciente que va a tratarse. El tamaño de la dosis también se determina por la existencia, la naturaleza y el grado de cualquier efecto secundario adverso que acompaña a la administración de un vector, una formulación, o similar, particular en un sujeto particular. Las composiciones terapéuticas que comprenden una proteína SIM humana recombinante o derivados funcionales o fragmentos funcionales de la misma se someten a prueba opcionalmente en uno o más modelos animales *in vitro* y/o *in vivo* de enfermedad apropiados, tales como un bioensayo de regresión de los conductos paramesonéfricos tal como se da a conocer en el presente documento en los ejemplos y conocido por los expertos habituales en la técnica, para confirmar la eficacia, el metabolismo tisular y estimar las dosificaciones, según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, las dosificaciones pueden determinarse inicialmente por la actividad, estabilidad u otra medición adecuada de tratamiento frente a sin tratamiento (por ejemplo, comparación de células o modelos animales tratados frente a no tratados) en un ensayo relevante. Las formulaciones se administran a una tasa determinada por la DL₅₀ de la formulación relevante y/o la observación de cualquier efecto secundario de una proteína SIM humana recombinante o derivados funcionales o fragmentos funcionales de la misma a diversas concentraciones, por ejemplo, según se aplique a la masa y a la salud general del paciente. La administración puede lograrse mediante dosis únicas o divididas.
- Al determinar la cantidad eficaz de proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o derivados funcionales o fragmentos funcionales de la misma, o ácidos nucleicos que codifican para la misma, que van a administrarse en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, el médico evalúa los niveles plasmáticos circulantes de proteínas SIM, las toxicidades de la formulación y la evolución de la enfermedad. El nivel de dosificación seleccionado también dependerá de varios factores, incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, la sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está empleándose, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- En algunas realizaciones, la proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o el ácido nucleico que codifica para la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede administrarse a una dosis según las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el método de administración, la pauta de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.
- Las pautas posológicas de una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma, o un ácido nucleico que codifica para la misma, tal como se da a conocer en el presente documento pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o puede reducirse o aumentarse la dosis proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

- Además, pueden variarse los niveles de dosificación reales de la proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM) en una composición farmacéutica para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxica para el sujeto. Una composición farmacéutica que comprende una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" y/o una "cantidad profilácticamente eficaz". En general, una dosis diaria adecuada de una composición que comprende una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento será aquella cantidad de la proteína SIM humana recombinante que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico, tal como una reducción de un síntoma de un trastorno proliferativo o un cáncer tal como se da a conocer en el presente documento. Una dosis eficaz de este tipo dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente.
- Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición que comprende una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria.
- El nivel de dosificación administrado a un sujeto puede ser constante a lo largo de un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año o al menos 5 años, o más de 5 años. Alternativamente, el nivel de dosificación administrado a un sujeto puede variar dependiendo de la evolución de la afección que está tratándose, por ejemplo, dependiendo de la ROF (reserva ovárica funcional) del sujeto, o de la gravedad del EOP o la ROD (reserva ovárica disminuida).
- Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar dependiendo de la ROF (reserva ovárica funcional) femenina o de la gravedad del EOP o la ROD (reserva ovárica disminuida) que va a aliviarse. Además, debe entenderse que, para cualquier sujeto particular, deben ajustarse pautas posológicas específicas a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son sólo a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.
- La eficacia y la toxicidad del compuesto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la DE₅₀ (la dosis que es eficaz en el 50% de la población) y la DL₅₀ (la dosis que es mortal para el 50% de la población). La razón de dosis de los efectos tóxicos con respecto a los terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como razón DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes. Un modelo experimental apropiado que puede usarse incluye determinar la dosis en el bioensayo de regresión de los conductos paramesonéfricos tal como se da a conocer en el presente documento en los ejemplos, o un modelo de cáncer *in vivo* que habitualmente conoce un experto habitual en la técnica. Se comentan modelos de cáncer *in vivo* en Frese *et al.*, "Maximizing mouse cancer models" Nat Rev Cancer. Septiembre de 2007;7(9):645-58 y Santos *et al.*, Genetically modified mouse models in cancer studies. Clin Transl Oncol. Diciembre de 2008;10(12):794-803, y "Cancer stem cells in mouse models of cancer", 6º Simposio anual de células madre del MDI, MDI Biological Lab, Salisbury Cove, ME, 10-11 de agosto de 2007.
- Por ejemplo, inicialmente puede estimarse una cantidad terapéuticamente eficaz o bien en ensayos de cultivo celular o bien en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para lograr un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Luego puede usarse tal información para determinar dosis y vías útiles para la administración en otros sujetos. Generalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz depende del efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína SIM humana recombinante puede evaluarse en un modelo de ratón de fecundidad.
- Un médico o veterinario con experiencia habitual en la técnica puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. También debe observarse que los seres humanos se tratan generalmente durante más tiempo que los ratones u otros animales de experimentación mostrados a modo de ejemplo en el presente documento, cuyo tratamiento presenta una duración proporcional a la duración del proceso patológico y la eficacia farmacológica. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días, pero se prefieren las dosis únicas.
- En algunas realizaciones, la proteína variante SIM puede administrarse a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo las vías oral, nasal, por ejemplo, mediante un aerosol, rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo las vías bucal y sublingual.

- Después de la formulación con un portador farmacéuticamente aceptable apropiado en una dosificación deseada, puede administrarse una composición farmacéutica que comprende una proteína variante SIM tal como se da a conocer en el presente documento a un sujeto. Puede administrarse una composición farmacéutica que comprende una proteína SIM humana recombinante o proteína variante SIM (por ejemplo, proteína LR-SIM), o un fragmento funcional o una variante de la misma, a un sujeto usando cualquier medio adecuado. En general, los medios de administración adecuados incluyen, pero no se limitan a, las vías tópica, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), rectal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, ocular o nasal.
- En una realización específica, puede ser deseable administrar la composición farmacéutica que comprende una proteína SIM humana recombinante de manera local al área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, mediante inyección, por medio de un catéter o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas sialísticas, fibras o sustitutos cutáneos comerciales. En algunas realizaciones, puede aplicarse una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento al músculo usando cremas tópicas, parches, inyecciones intramusculares, y similares.
- En algunas realizaciones, puede administrarse una proteína variante SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento por vía vaginal, por ejemplo, mediante el uso que incluye hidrogeles, comprimidos vaginales, óvulos vaginales/supositorios, sistemas particulados y anillos intravaginales, tal como conoce un experto habitual en la técnica y se da a conocer en Woolfson *et al.*, "Drug delivery by the intravaginal route" Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 2000 (17(5)):509-599. En algunas realizaciones, puede administrarse una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento por vía vaginal usando sistemas de suministro de fármacos (DDS) mucoadhesivos vaginales, tal como se da a conocer en Maurya SK *et al.*, "Therapeutic potential of mucoadhesive drug delivery systems--an updated patent review" Recent Pat Drug Deliv Formul. Noviembre de 2010;4(3):256-65; Balaglu *et al.*, "Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems" J Pharm Sci. 2009;12(3):312-36 y de Araujo Pereira; "Vaginal mucoadhesive drug delivery systems" Drug Dev Ind Pharm. Junio de 2012;38(6):643-52. En algunas realizaciones, puede administrarse una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento por vía vaginal usando microesferas mucoadhesivas, tal como se da a conocer en Krutik *et al.*, "Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery" Patil *et al.*, Curr Drug Deliv octubre de 2008;5(4):312-8.
- En algunas realizaciones, puede administrarse una proteína variante SIM humana recombinante a un sujeto por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos) o mediante administración parenteral. Los métodos convencionales para administración oral incluyen administrar una proteína SIM humana recombinante en uno cualquiera de los siguientes; pueden usarse comprimidos, suspensiones, disoluciones, emulsiones, cápsulas, polvos, jarabes, y similares. Se prefieren técnicas conocidas que suministran una proteína SIM humana recombinante por vía oral o intravenosa y conservan la actividad biológica. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, la administración intramuscular, intravenosa, intraarticular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. También puede administrarse una proteína SIM humana recombinante por vía oral, transdérmica, tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales) o rectal. La administración puede ser local o sistémica, según se indique. También pueden suministrarse agentes, por ejemplo, agentes de ácido nucleico que codifican para una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional de la misma, usando un vector, por ejemplo, un vector viral, mediante métodos que conocen bien los expertos en la técnica.
- Cuando se administra una composición que comprende una proteína variante SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento por vía parenteral, generalmente se formulará en una forma de dosificación unitaria inyectable (por ejemplo, disolución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para su inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para su reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileneglicol, polietileneglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.
- El término forma de "dosificación unitaria", tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente independientes adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas de la proteína SIM humana recombinante o el fragmento funcional o la variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento y el efecto terapéutico o profiláctico particular que va a lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de convertir una proteína SIM humana recombinante en

un agente activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento pueden suspenderse en vehículos acuosos e introducirse a través de agujas hipodérmicas convencionales o usando bombas de infusión.

Composiciones farmacéuticas

10 En algunas realizaciones, una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede formularse en cualquier medio adecuado, por ejemplo, como disolución inyectable estéril, por ejemplo, que puede prepararse mediante la incorporación de la proteína SIM humana recombinante en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversos de los demás componentes, según se deseé.

15 Una formulación farmacológica de una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede administrarse al paciente en una formulación inyectable que contenga cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención
20 pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de suministro dirigido tales como anticuerpos monoclonales, suministro vectorizado, ionoforesis, matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Los ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen los presentados en las patentes estadounidenses n.^{os}: 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447.224; 4.439.196; y 4.475.196. Los expertos en la
25 técnica conocen bien otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo.

Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. También pueden usarse vehículos no acuosos, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de
30 sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete, y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas de disolvente para las composiciones de compuesto. Además, pueden añadirse diversos aditivos que mejoren la estabilidad, la esterilidad y la isotonicidad de las
35 composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Puede garantizarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. Puede lograrse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o
40 aditivo usado debería ser compatible con los compuestos.

40 En otra realización, una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede comprender formulaciones a base de lípidos. Puede usarse cualquier de los sistemas de suministro de fármacos a base de lípidos conocidos en la práctica de la invención. Por ejemplo, pueden usarse todos y cada uno de
45 liposomas multivesiculares, liposomas multilamelares y liposomas unilamelares siempre que pueda establecerse una tasa de liberación sostenida del compuesto activo encapsulado. Se describen métodos de preparación de sistemas de suministro de fármacos de liposomas multivesiculares de liberación controlada en las publicaciones de solicitud PCT n.^{os}: WO 9703652, WO 9513796 y WO 9423697.

50 En algunas realizaciones, la composición usada en los métodos descritos en el presente documento puede estar en forma de liberación controlada. Pueden adaptarse varias formas de dosificación, formulaciones y dispositivos de liberación controlada o prolongada conocidos para su uso con las sales y composiciones de la divulgación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.^{os}: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476;
55 5.354.556; 5.733.566; y 6.365.185 B1. Pueden usarse estas formas de dosificación para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más principios activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos (tales como OROS[®] (Alza Corporation, Mountain Vista, Calif. EE.UU.)) o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables.

60 La composición de la vesícula de membrana sintética es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroideos, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de vesículas de membrana sintéticas incluyen fosfatidilgliceroles, fosfatidilcolinas, fosfatidilsierinas, fosfatidiletanolaminas, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos, incluyendo las realizaciones preferibles fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol y dioleoilfosfatidilglicerol.

- En la preparación de vesículas a base de lípidos que contienen una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma, deben considerarse variables tales la eficiencia de encapsulación del compuesto activo, la labilidad del compuesto activo, la homogeneidad y el tamaño de la población de vesículas resultante, la razón de compuesto activo con respecto a lípido, la permeabilidad, la inestabilidad de la preparación y la aceptabilidad farmacéutica de la formulación.
- En otra realización, la proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) Science 249:1527-1533). En aún otra realización, una proteína SIM humana recombinante puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer (1990), citado anteriormente). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Howard *et al.* (1989) J. Neurosurg. 71:105). En otra realización en la que el agente activo de la invención es un ácido nucleico que codifica para una proteína SIM humana recombinante o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM), el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para fomentar la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un cañón de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo unido con un péptido similar a la homeosecuencia que se sabe que entra en el núcleo (véase por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico de manera intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga.
- Antes de la introducción, puede esterilizarse una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento, mediante cualquiera de las numerosas técnicas disponibles de la técnica, tal como con esterilización por haces de electrones o radiación gamma.
- En otra realización de la invención, puede administrarse y/o formularse una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento junto (por ejemplo, en combinación) con cualquier otro agente terapéutico. Para el propósito de administración, una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento se formula preferiblemente como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto de esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable, en las que el compuesto está presente en la composición en una cantidad que es eficaz para tratar la afección de interés. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente concentraciones y dosificaciones apropiadas.
- Los portadores farmacéuticamente aceptables son familiares para los expertos en la técnica. Para las composiciones formuladas como disoluciones líquidas, los portadores aceptables incluyen solución salina y agua estéril, y pueden incluir opcionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y otros aditivos habituales. Las composiciones también pueden formularse como píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos que contienen, además de un compuesto de esta invención, diluyentes, agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. Además, un experto en esta técnica puede formular los compuestos de esta invención de una manera apropiada y según las prácticas aceptadas, tales como las dadas a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990.
- Las composiciones de la presente invención pueden estar en cualquier forma. Estas formas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, dispersiones, pomadas (incluyendo pomadas orales), cremas, pastas, geles, polvos (incluyendo polvos dentales), dentífricos, pastillas para chupar, bálsamos, chicles, pulverizaciones bucales, pastillas, sobres, colutorios, aerosoles, comprimidos, cápsulas, parches transdérmicos, que comprenden una o más resolvinas y/o protectinas o sus análogos de la invención.
- Las formulaciones de una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento pueden prepararse mediante varios medios conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las formulaciones pueden prepararse para su administración como formulación en aerosol, por ejemplo, combinando (i) una proteína SIM humana recombinante o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento en una cantidad suficiente para proporcionar una pluralidad de dosis terapéuticamente eficaces; (ii) la adición de agua en una cantidad eficaz para estabilizar cada una de las formulaciones; (iii) el propelente en una cantidad suficiente para impulsar una pluralidad de dosis a partir de una lata de aerosol; y (iv) cualquier componente opcional adicional, por ejemplo, etanol como codisolvente; y dispersando los componentes. Los componentes pueden dispersarse usando una mezcladora u homogeneizadora convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica.
- Puede transferirse la formulación a granel a viales de aerosol individuales más pequeños mediante el uso de métodos de transferencia de válvula a válvula, llenado a presión o mediante el uso de métodos de llenado en frío

convencionales. No se requiere que un estabilizador usado en una formulación de aerosol en suspensión sea soluble en el propelente. Los que no son suficientemente solubles pueden recubrirse sobre las partículas de fármaco en una cantidad apropiada y luego pueden incorporarse las partículas recubiertas en una formulación tal como se describió anteriormente.

- 5 En determinadas realizaciones, puede administrarse una composición de proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) tal como se da a conocer en el presente documento a un sujeto como una composición farmacéutica con un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, estas composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por supuesto, un experto habitual en la técnica puede identificar fácilmente tales agentes terapéuticos que conocen los expertos habituales en la técnica.
- 10

También pueden estar presentes en las composiciones agentes hidratantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

- 15 Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración intravenosa, oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 1 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente entre aproximadamente el 5 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente el 10 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento.
- 20

- 25 Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral de una proteína SIM o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios, y similares, que contienen, cada uno, una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. También puede administrarse un compuesto de la presente invención como bolo, electuário o pasta.
- 30

- 35 En formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), se mezcla la proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcico, y/o cualquiera de los siguientes: cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes hidratantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas rellenas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.
- 40

- 45 Un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse usando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmétilecelulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), un tensioactivo o un agente dispersante. Los comprimidos preparados por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humectado con un diluyente líquido inerte.
- 50

- 55 60 Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse o prepararse opcionalmente con
- 65

- recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetylcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Puede esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algunos otros medios inyectables estériles inmediatamente antes del uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden formar parte de una composición que libera el/los principio(s) activo(s) sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incrustantes que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.
- Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.
- Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, los aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes hidratantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.
- Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitano y polioxietilen-sorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.
- En algunos casos, una composición que comprende una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede estar en una formulación adecuada para administración rectal o vaginal, por ejemplo, como suppositorio, que puede prepararse mediante el mezclado de uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para suppositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura corporal y, por tanto, libera el compuesto activo. En la técnica se conocen portadores y formulaciones adecuados para tal administración.
- Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una proteína SIM humana recombinante de esta invención, por ejemplo, para la administración muscular, incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalatorios. Una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.
- Las pomadas, las pastas, las cremas y los geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y las pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener además propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.
- Los parches transdérmicos presentan la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de una proteína SIM humana recombinante de la presente invención al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden prepararse mediante la disolución o dispersión del compuesto en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de la velocidad o bien dispersando el compuesto activo en un gel o una matriz polimérica.
- Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

- Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
- Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes hidratantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Puede garantizarse la prevención de la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sóblico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, puede lograrse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
- En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de un material cristalino o amorfó que tenga escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, se logra la absorción retardada de una forma farmacéutica administrada por vía parenteral mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo oleaginoso.
- Las formas de depósitos inyectables se preparan mediante la formación de matrices microencapsuladas de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de fármaco con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(orthoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósitos inyectables también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.
- En determinadas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma puede aislarse y/o purificarse o purificarse sustancialmente mediante uno o más métodos de purificación descritos en el presente documento o conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, las purezas son de al menos el 90%, en particular el 95%, y a menudo mayores del 99%. En determinadas realizaciones, se excluye el compuesto que se produce de manera natural de la descripción general del género más amplio.
- En algunas realizaciones, la composición comprende al menos proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.
- En determinadas realizaciones, una composición que comprende una proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, puede formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables", tal como se usa en el presente documento, se refiere a las sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas y profármacos de los compuestos de la presente invención que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida, y similares, compatibles con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaces para el uso previsto de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención.
- Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o mediante la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y el aislamiento de la sal así formada. Estas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como los cationes de

amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, pero sin limitarse a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge S. M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 1977;66:1-19).

- 5 El término "ésteres farmacéuticamente aceptables" se refiere a los productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos, o mediante la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente de esterificación adecuado. Los ácidos carboxílicos pueden convertirse en ésteres mediante el tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. Se pretende que el término incluya además grupos de hidrocarburo inferior que pueden solvartarse en condiciones fisiológicas, por ejemplo, ésteres de alquilo, ésteres de metilo, etilo y propilo.
- 10

Tal como se usa en el presente documento, "sales o profármacos farmacéuticamente aceptables" son sales o profármacos que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas, y similares, compatibles con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaces para su uso previsto. Estos compuestos incluyen las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención.

20 El término "sales" se refiere a las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o mediante la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y el aislamiento de la sal así formada. Estas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como los cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, pero sin limitarse a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares (véase, por ejemplo, Berge S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66, 1).

25

30 El término "profármaco" se refiere a compuestos o agentes que se transforman rápidamente *in vivo* para producir la proteína SIM humana recombinante activa, por ejemplo, una proteína SIM o un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN, MOD-ARN) biológicamente activo o funcionalmente activo que codifica para una proteína SIM funcionalmente activa. En algunas realizaciones, un profármaco de proteína SIM humana recombinante puede activarse mediante hidrólisis en la sangre, por ejemplo, mediante la escisión de una secuencia líder y/o la escisión en el sitio de escisión primario para dar como resultado los dominios N-terminal y C-terminal para la producción de una proteína SIM bioactiva, de manera similar a cómo se activa la insulina a partir de su proproteína para dar una proteína insulina activa. Se proporciona un análisis exhaustivo en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 de la serie de simposios de la A.C.S., y en Bioreversible Carriers in: Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Tal como se usa en el presente documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo*, se metaboliza o convierte de otro modo en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de una proteína SIM humana recombinante, para enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad o para alterar otras características o propiedades de la proteína SIM humana recombinante.

35

40 En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y el metabolismo del fármaco o el procesamiento proteico posterior a la traducción de SIM *in vivo*, una vez identificado un compuesto farmacéuticamente activo, generalmente los expertos en la técnica farmacéutica pueden diseñar un profármaco de proteína SIM humana recombinante que puede activarse *in vivo* para aumentar los niveles de una proteína SIM bioactiva en el sujeto (véase, por ejemplo, Nogradi (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, N.Y., páginas 388-392). Se describen procedimientos convencionales para la selección y preparación de profármacos adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Los ejemplos adecuados de profármacos incluyen ésteres metílicos, etílicos y de glicerol del ácido correspondiente.

45

50 Tal como se comenta en el presente documento, en algunas realizaciones, una composición que comprende una proteína SIM humana recombinante o proteína variante SIM (por ejemplo, LR-SIM) o un fragmento funcional o una variante de la misma tal como se da a conocer en el presente documento puede conjugarse o unirse covalentemente a un agente de direccionamiento para aumentar su especificidad tisular y su direccionamiento a una célula, por ejemplo, una célula muscular. Los agentes de direccionamiento pueden incluir, por ejemplo, sin limitación, anticuerpos, citocinas y ligandos de receptor, tal como se comenta en la sección titulada "direccionamiento". En algunas realizaciones, el agente direccionamiento se sobreexpresa en las células que van a seleccionarse como diana, por ejemplo, las células musculares en comparación con células distintas de las musculares.

55

60 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos habituales en la técnica.

65

Definiciones

5 A menos que se indique lo contrario, o sea implícito a partir del contexto, los siguientes términos y expresiones incluyen los significados proporcionados a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o resulte evidente a partir del contexto, los términos y las expresiones a continuación no excluyen el significado que el término o la expresión ha adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar en la descripción de realizaciones particulares, y no se pretende que limiten la invención reivindicada, porque el alcance de la invención se limita sólo por las reivindicaciones. Además, a menos que se requiere lo contrario por el contexto, los términos en singular deben incluir pluralidades y los términos en plural deben incluir el singular.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, a métodos y a componente(s) respectivo(s) de los mismos, que son útiles para una realización, pero abiertos para la inclusión de elementos no especificados, ya sean útiles o no.

15 Los términos en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluye "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 20 Aparte de los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes o condiciones de reacción usados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa junto con porcentajes, puede significar \pm el 5% del valor al que se refiere. Por ejemplo, aproximadamente 100 significa desde 95 hasta 105.

25 30 Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de esta divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura "e.g." se deriva del latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "e.g." es sinónimo del término "por ejemplo".

35 40 El término "sustancia inhibidora mülleriana" y "SIM" se usa de manera intercambiable en el presente documento y también se conoce como hormona antimülleriana o AMH, se refiere a compuestos y materiales que son estructuralmente similares a SIM. Por "SIM" o "sustancia inhibidora mülleriana" quiere decirse un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 96%, o al menos aproximadamente el 97%, o al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% idéntica a los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3. Se pretende que la presente invención incluya formas mutantes de SIM humana recombinante que tienen sustancialmente la misma actividad biológica, o superior, que SIM de tipo natural. Los ejemplos de tales moléculas de SIM mutante portan una delección, inserción o alteración en la secuencia de aminoácidos de SIM de tipo natural (por ejemplo, residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3). Otras formas incluyen sustancias que son, por ejemplo, sales, derivados funcionales y forma de aglicona de SIM de tipo natural y SIM humana recombinante. Además, la proteína SIM humana recombinante puede obtenerse usando tecnología de ADN recombinante, o a partir de síntesis química de la proteína SIM. Solamente a modo de referencia, el ácido nucleico de SIM humana de tipo natural corresponde al n.^o de RefSeq: NM_000479.

45 50 El término "receptor de sustancia inhibidora mülleriana de tipo II" o "MISRII" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse al receptor de tipo II para SIM. Se pretende que el término MISRII abarque todos los receptores de SIM sustancialmente homólogos a MISRII y derivados funcionales de MISRII. MISRII también se conoce por el nombre AMHR2, y a modo de referencia, la secuencia de ácido nucleico de MISRII humano corresponde a NM_020547 y al n.^o de GenBank: AF172932.

55 60 El término "de tipo natural" se refiere a la secuencia de polinucleótidos que se produce de manera natural que codifica para una proteína, o una porción de la misma, o para una secuencia de la proteína, o una porción de la misma, respectivamente, tal como existe normalmente *in vivo*. Por consiguiente, tal como se da a conocer en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de tipo natural para la preproteína de SIM humana corresponde a la SEQ ID NO: 3, en la que los residuos de aminoácido 1-25 corresponden a la secuencia líder. La preproteína de SIM comprende los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, que carece de la secuencia líder 1-25), que luego se procesa de manera posterior a la traducción mediante escisión tal como se comenta en el presente documento para formar un homodímero de SIM bioactivo.

65 El término "polipéptido de SIM soluble", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de SIM que no comprende al menos parte de, o la totalidad de, los aminoácidos que le permiten unirse funcionalmente a la membrana.

- Por un "polinucleótido que codifica para SIM" quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 96%, o al menos aproximadamente el 97%, o al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácido 26-560 de SEQ ID NO: 3.
- El término "mutante" se refiere a cualquier cambio en el material genético de un organismo, en particular un cambio (es decir, delección, sustitución, adición o alteración) en una secuencia de polinucleótidos de tipo natural o cualquier cambio en una secuencia de proteína de tipo natural. El término "variante" se usa de manera intercambiable con "mutante". Aunque a menudo se supone que un cambio en el material genético da como resultado un cambio de la función de la proteína, los términos "mutante" y "variante" se refieren a un cambio en la secuencia de una proteína de tipo natural independientemente de si ese cambio altera la función de la proteína (por ejemplo, aumenta, disminuye, confiere una nueva función), o si ese cambio no tiene ningún efecto sobre la función de la proteína (por ejemplo, la mutación o variación es silenciosa). El término mutación se usa de manera intercambiable en el presente documento con polimorfismo en esta solicitud.
- El término "ácido nucleico" se conoce bien en la técnica. Un "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se referirá generalmente a una molécula (es decir, cadena) de ADN, ARN o un derivado o análogo de los mismos, que comprende una base nitrogenada. Una base nitrogenada incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina que se produce de manera natural hallada en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o en el ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). El término "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico". El término "oligonucleótido" se refiere a una molécula de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 bases nitrogenadas de longitud. El término "polinucleótido" se refiere a al menos una molécula de más de aproximadamente 100 bases nitrogenadas de longitud. El término "ácido nucleico" también se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos y, cuando sea aplicable a la realización que esté describiéndose, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios. Los términos "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" también se usan de manera intercambiable en el presente documento.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido, incluyendo tanto secuencias de exón como (opcionalmente) de intrón. Un "gen" se refiere a una secuencia codificante de un producto génico, así como regiones no codificantes del producto génico, incluyendo las regiones 5'UTR y 3'UTR, intrones y el promotor del producto génico. Estas definiciones se refieren generalmente a una molécula monocatenaria, pero en realizaciones específicas también abarcarán una cadena adicional que es parcial, sustancial o completamente complementaria a la molécula monocatenaria. Por tanto, un ácido nucleico puede abarcar una molécula bicatenaria o una molécula bicatenaria que comprende una o más cadenas complementarias o "complementos" de una secuencia particular que comprende una molécula. Tal como se usa en el presente documento, un ácido nucleico monocatenario puede indicarse por el sufijo "mc", un ácido nucleico bicatenario por el sufijo "bc" y un ácido nucleico tricatenario por el sufijo "tc". El término "gen" se refiere al segmento de ADN implicado en la producción de una cadena de polipéptido, incluye regiones precedentes y posteriores a la región codificante así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Un "promotor" es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan la iniciación y la tasa de transcripción. Puede contener elementos a los que pueden unirse moléculas y proteínas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. El término "potenciador" se refiere a una secuencia reguladora que actúa en *cis* implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico. Un potenciador puede funcionar en cualquier orientación y puede estar en el sentido de 5' o en el sentido de 3' del promotor.
- Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácido, y no se limitan a una longitud mínima. Los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, también se componen de aminoácidos dispuestos linealmente unidos por enlaces peptídicos, y ya sea que se produzcan de manera biológica, recombinante o sintética, y ya sea que se compongan de aminoácidos que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural, se incluyen dentro de esta definición. La definición abarca tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones que se producen al mismo tiempo que la traducción y posteriores a la traducción del polipéptido, tales como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, acetilación, fosforilación, escisión proteolítica (por ejemplo, escisión por furinas o metaloproteasas, y convertasas de prohormona (PC)), y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" abarca una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones, y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora tal como conocería un experto en la técnica), a la secuencia nativa, siempre que la

proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser intencionales, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR u otros métodos de ADN recombinante. Los polipéptidos o las proteínas se componen de aminoácidos dispuestos linealmente unidos por enlaces peptídicos, pero a diferencia de los péptidos, presentan una conformación bien definida. Las proteínas, a diferencia de los péptidos, consisten generalmente en cadenas de 50 o más aminoácidos. Para los propósitos de la presente invención, el término "péptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere normalmente a una secuencia de aminoácidos compuesta por una sola cadena de D- o L-aminoácidos o una mezcla de D- y L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Generalmente, los péptidos contienen al menos dos residuos de aminoácido y tienen una longitud de menos de aproximadamente 50 aminoácidos.

La incorporación de aminoácidos no naturales, incluyendo aminoácidos no nativos sintéticos, aminoácidos sustituidos o uno o más D-aminoácidos en los péptidos (u otros componentes de la composición, con la excepción de secuencias de reconocimiento de proteasas) es deseable en determinadas situaciones. Los péptidos que contienen D-aminoácidos presentan una mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo* en comparación con las formas que contienen L-aminoácidos. Por tanto, la construcción de péptidos que incorporan D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se desea o requiere una mayor estabilidad intracelular o *in vivo*. Más específicamente, los D-péptidos son resistentes a las peptidasas y proteasas endógenas, proporcionando de ese modo un mejor suministro oral transepitelial y transdérmico de conjugados y fármacos unidos, una biodisponibilidad mejorada de los complejos permanentes de membrana (véase a continuación para un análisis adicional) y vidas útiles intravasculares e intersticiales prolongadas cuando son deseables tales propiedades. El uso de péptidos D-isoméricos también puede mejorar el suministro transdérmico y oral transepitelial de fármacos unidos y otras moléculas de carga. Además, los D-péptidos no pueden procesarse de manera eficiente para la presentación restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a células T cooperadoras y, por tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en todo el organismo. Por tanto, pueden construirse conjugados peptídicos usando, por ejemplo, formas D-isoméricas de secuencias peptídicas que penetran en las células, formas L-isoméricas de sitios de escisión y formas D-isoméricas de péptidos terapéuticos. En algunas realizaciones, una proteína SIM humana recombinante está compuesta por residuos de D- o L-aminoácido, ya que el uso de residuos de L-aminoácido que se producen de manera natural presenta la ventaja de que cualquier producto de descomposición debe ser relativamente no tóxico para la célula o el organismo.

El término "fragmento" de un péptido, un polipéptido o una molécula, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier subconjunto de polipéptidos contiguos de la molécula. El término "fragmento de proteína", tal como se usa en el presente documento, incluye secuencias de aminoácidos tanto sintéticas como que se producen de manera natural que pueden derivarse de proteínas SIM de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5. El fragmento de proteína puede obtenerse mediante la fragmentación de la proteína SIM humana recombinante, o puede sintetizarse basándose en el conocimiento de la secuencia de la secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural o del material genético (ADN o ARN) que codifica para esta secuencia. Por consiguiente, se pretende que un "fragmento" de una molécula se refiera a cualquier subconjunto de polipéptidos de la molécula. En algunas realizaciones, un fragmento funcional de SIM humana recombinante comprende al menos el dominio C-terminal y al menos el dominio N-terminal. En algunas realizaciones, un fragmento funcional comprende una porción del dominio C-terminal y/o una porción (por ejemplo, un fragmento) del dominio N-terminal de la proteína SIM humana recombinante. También se abarcan fragmentos de una proteína SIM humana recombinante que presentan una actividad al menos, o mayor que, la de la proteína SIM de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 tal como se da a conocer en el presente documento y que son solubles para su uso en la presente invención.

Los fragmentos de una proteína SIM humana recombinante, por ejemplo, fragmentos funcionales de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5, útiles en los métodos tal como se da a conocer en el presente documento presentan una actividad de al menos el 30% la de un polipéptido de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 *in vivo*, por ejemplo, para provocar la inhibición de la maduración de folículos tal como se da a conocer en el presente documento en los ejemplos. Dicho de otro modo, un fragmento funcional de una proteína SIM humana recombinante es un fragmento de cualquiera de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 que, solo o como una proteína de fusión, puede dar como resultado al menos el 30% de la misma actividad en comparación con SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 para unirse a y activar MISRII o inhibir la maduración de folículos tal como se da a conocer en el presente documento. Los fragmentos, tal como se usa en el presente documento, pueden ser solubles (es decir, no unidos a la membrana). Un "fragmento" puede tener al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300 ácidos nucleicos o aminoácidos, y todos los números enteros entremedias. Los fragmentos a modo de ejemplo incluyen truncamientos C-terminales, truncamientos N-terminales o truncamientos tanto C-terminales como N-terminales (por ejemplo, delecciones de, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100 o más aminoácidos delecionados de los extremos N-terminales, los extremos C-terminales, o ambos). Un experto habitual en la técnica puede crear tales fragmentos mediante un sencillo análisis de delecciones. Un fragmento de este tipo de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 puede tener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos o más de

- 10 aminoácidos, tal como 15, 30, 50, 100 o más de 100 aminoácidos delecionados de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5, respectivamente. Los expertos habituales en la técnica pueden identificar fácilmente el fragmento de péptidos mínimo de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 útil en los métodos y las composiciones tal como se da a conocer en el presente documento, o las proteínas de fusión tal como se da a conocer en el presente documento, mediante la delección secuencial de los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5, o mediante la delección secuencial de los aminoácidos N-terminales y C-terminales de la proteína SIM humana recombinante y la evaluación de la función del fragmento de péptidos resultante, solo o cuando se escinde. Pueden crearse fragmentos funcionales con múltiples fragmentos más pequeños. Estos pueden unirse mediante ligadores peptídicos que forman puentes. Pueden seleccionarse ligadores fácilmente para mantener la conformación de tipo natural. En algunas realizaciones, un fragmento debe tener al menos 6 aminoácidos, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500 ácidos nucleicos o aminoácidos continuos, o cualesquiera números enteros entremedias.
- 5 15 El término "derivado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos que se han modificado químicamente, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante técnicas tales como ubiquitinación, marcaje, pegilación (derivatización con polietilenglicol) o adición de otras moléculas. Una molécula también es un "derivado" de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Tales restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc., de la molécula. Los restos pueden disminuir alternativamente la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Se dan a conocer restos que pueden mediar en tales efectos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, A. R. Gennaro, Ed., MackPubl., Easton, PA (1990).
- 10 20 25 El término "funcional", cuando se usa junto con "derivado" o "variante" o "fragmento", se refiere a un polipéptido que posee una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a una actividad biológica del polipéptido que es un derivado funcional, una variante o un fragmento funcional del mismo. Se pretende que el término derivado funcional incluya los fragmentos, análogos o derivados químicos de una molécula. Por "sustancialmente similar" en este contexto quiere decirse que la actividad biológica, por ejemplo, la activación de MISRII, es al 25%, o al menos el 35%, o al menos el 50% tan activa como un polipéptido de referencia, por ejemplo, una proteína SIM humana recombinante o un polipéptido de SIM de tipo natural correspondiente, y preferiblemente al menos el 60% tan activa, el 70% tan activa, el 80% tan activa, el 90% tan activa, el 95% tan activa, el 100% tan activa o incluso mayor (es decir, la variante o el derivado presenta una mayor actividad que la de tipo natural), por ejemplo, el 110% tan activa, el 120% tan activa, o más. Dicho de otro modo, un fragmento funcional "sustancialmente similar" de una proteína SIM humana recombinante en este contexto quiere decir que se conserva al menos el 25%, al menos el 35%, al menos el 50% de la actividad biológica relevante o deseada de una proteína SIM humana recombinante correspondiente. En el caso de un fragmento funcional o péptido de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4 ó 5), un fragmento funcional de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 sería una proteína o un péptido que comprende una porción de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 que conserva una actividad para activar MISRII o inhibir la maduración de folículos tal como se da a conocer en el presente documento; preferiblemente el fragmento de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 que conserva al menos el 25%, al menos el 35%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100% o incluso mayor (es decir, la variante o el derivado presenta una actividad mayor que la de una proteína SIM de SEQ ID NO: 3 o de una proteína SIM humana recombinante de SEQ ID NO: 4 ó 5), por ejemplo, al menos el 110%, al menos el 120% o más de actividad en comparación con las proteínas SIM correspondientes a SEQ ID NO: 3, 4 ó 5.
- 30 35 40 45 50 El término "derivado funcional" y "agente mimético" o "variante biológicamente activa" o "fragmento biológicamente activo" se usan de manera intercambiable y se refiere a un compuesto que posee una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a una actividad biológica de la entidad o molécula que es un derivado funcional (por ejemplo, la proteína SIM humana recombinante). Se pretende que el término derivado funcional incluya fragmentos, variantes, análogos o derivados químicos de una molécula.
- 55 Se pretende que el término "derivados funcionales" incluya "fragmentos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" de una molécula. Se dice que una molécula es "sustancialmente similar" a otra molécula si ambas moléculas presentan estructuras sustancialmente similares o si ambas moléculas poseen una actividad biológica similar. Por tanto, siempre que dos moléculas posean una actividad similar, se consideran variantes ya que se use ese término en el presente documento incluso si la estructura de una de las moléculas no se halla en la otra, o si la secuencia de residuos de aminoácido no es idéntica. Se pretende que un "análogo" de una proteína SIM humana recombinante se refiera a una molécula sustancialmente similar, en cuanto a función, o bien a la molécula completa o bien a un fragmento de la misma. Tal como se usa en el presente documento, se dice que una molécula es un "derivado químico" de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Tales restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc., de la molécula. Los restos pueden disminuir alternativamente la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Se dan a conocer restos que pueden

mediar en tales efectos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, A. R. Gennaro, Ed., MackPubl., Easton, PA (1990).

5 Se pretende que una "variante" de una proteína SIM humana recombinante se refiera a una molécula sustancialmente similar, en cuanto a estructura y función, o bien a la molécula completa o bien a un fragmento de la misma.

Por consiguiente, el término "variante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o ácido nucleico que difiere del polipéptido o ácido nucleico que se produce de manera natural en una o más deleciones, 10 adiciones, sustituciones o modificaciones de cadena lateral de aminoácidos o ácidos nucleicos, pero aún conserva una o más funciones o actividades biológicas específicas de la molécula que se produce de manera natural. Las sustituciones de aminoácidos incluyen alteraciones en las que se reemplaza un aminoácido por un residuo de aminoácido que se produce de manera natural o uno no convencional diferente. Tales sustituciones 15 pueden clasificarse como "conservadoras", en cuyo caso se reemplaza un residuo de aminoácido contenido en un polipéptido por otro aminoácido que se produce de manera natural de carácter similar, ya sea en relación con la polaridad, la funcionalidad de la cadena lateral o el tamaño. Las sustituciones abarcadas por la presente invención también pueden ser "no conservadoras", en las que se sustituye un residuo de aminoácido que está 20 presente en un péptido por un aminoácido que tiene propiedades diferentes, tal como un aminoácido que se produce de manera natural de un grupo diferente (por ejemplo, sustituyendo un aminoácido cargado o hidrófobo por alanina), o, alternativamente, en las que se sustituye un aminoácido que se produce de manera natural por un aminoácido no convencional. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. 25 También abarcado dentro del término variante, cuando se usa con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que puede variar en cuanto a estructura primaria, secundaria o terciaria, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente (por ejemplo, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo natural). Se pretende que una "variante" de una proteína SIM humana recombinante se refiera a una molécula sustancialmente similar en cuanto a estructura y función, es decir, en la que la función es la capacidad para activar MISRII.

30 Por ejemplo, una variante de una proteína SIM humana recombinante puede contener una modificación que difiere de un aminoácido de referencia en SEQ ID NO: 3, 4 ó 5. En algunas realizaciones, una variante de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 es un fragmento de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 tal como se da a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, una variante puede ser una isoforma diferente de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 o puede 35 comprender aminoácidos isoméricos diferentes. Las variantes pueden ser polinucleótidos o polipéptidos que se producen de manera natural, sintéticos, recombinantes o químicamente modificados, aislados o generados usando métodos bien conocidos en la técnica. Las variantes pueden incluir cambios conservadores o no conservadores de aminoácidos, tal como se describe a continuación. Los cambios de polinucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Las variantes también pueden incluir inserciones, deleciones o 40 sustituciones de aminoácidos, incluyendo inserciones y sustituciones de aminoácidos y otras moléculas, que no se producen normalmente en la secuencia peptídica que es la base de la variante, por ejemplo, pero sin limitarse a, inserción de ornitina que no se produce normalmente en proteínas humanas.

45 El término "sustitución conservadora", cuando se describe un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la actividad del polipéptido. Por ejemplo, una sustitución conservadora se refiere a sustituir un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente que presenta propiedades químicas similares. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen el reemplazo de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina. Las "sustituciones conservadoras de aminoácidos" son el resultado del reemplazo de un aminoácido por otro que presenta propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo 50 de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina. Por tanto, una "sustitución conservadora" de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a una sustitución de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad del polipéptido o a una sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que presentan propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, con carga positiva o negativa, polares o apolares, etc.), de tal manera que la sustitución de aminoácidos incluso críticos no reduzca la 55 actividad del péptido (es decir, la capacidad del péptido para reducir las células T-reg y/o disminuir las citocinas inflamatorias tal como se da a conocer en el presente documento). En la técnica se conocen bien tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Por ejemplo, los siguientes seis grupos contienen, cada uno, aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos de otros: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 60 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). (Véase también Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984)). En algunas realizaciones, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o delecionan un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos también pueden considerarse "sustituciones conservadoras" si el cambio no reduce la actividad de la proteína SIM (es decir, la capacidad de una proteína 65 SIM humana recombinante o variante para provocar la regresión de los conductos paramesonéfricos *in vivo*, que puede determinarse usando el bioensayo de regresión de los conductos paramesonéfricos tal como se da a

conocer en el presente documento). Las inserciones o delecciones se encuentran normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La elección de aminoácidos conservadores puede seleccionarse basándose en la ubicación del aminoácido que va a sustituirse en el péptido, por ejemplo, si el aminoácido está en el exterior del péptido y expuesto a disolventes o en el interior y no expuesto a disolventes.

- 5 En realizaciones alternativas, puede seleccionarse el aminoácido que sustituirá a un aminoácido existente basándose en la ubicación del aminoácido existente, es decir, su exposición a disolventes (es decir, si el aminoácido está expuesto a disolventes o está presente en la superficie exterior del péptido o polipéptido en comparación con aminoácidos localizados internamente no expuestos a disolventes). En la técnica se conoce bien la selección de tales sustituciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, tal como se da a conocer en Dordo *et al.*, J. Mol Biol, 1999, 217, 721-739 y Taylor *et al.*, J. Theor. Biol. 119(1986);205-218 y S. French y B. Robson, J. Mol. Evol. 19(1983)171. Por consiguiente, pueden seleccionarse sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas para los aminoácidos en el exterior de una proteína o un péptido (es decir, aminoácidos expuestos a un disolvente), por ejemplo, pero sin limitarse a, pueden usarse las siguientes sustituciones: 10 sustitución de Y por F, T por S o K, P por A, E por D o Q, N por D o G, R por K, G por N o A, T por S o K, D por N o E, I por L o V, F por Y, S por T o A, R por K, G por N o A, K por R, A por S, K o P.

En realizaciones alternativas, también pueden seleccionarse sustituciones conservadoras de aminoácidos abarcadas adecuadas para aminoácidos en el interior de una proteína o un péptido, por ejemplo, pueden usarse 20 sustituciones conservadoras adecuadas para aminoácidos en el interior de una proteína o un péptido (es decir, los aminoácidos no expuestos a un disolvente), por ejemplo, pero sin limitarse a, pueden usarse las siguientes sustituciones conservadoras: en las que Y se sustituye por F, T por A o S, I por L o V, W por Y, M por L, N por D, G por A, T por A o S, D por N, I por L o V, F por Y o L, S por A o T y A por S, G, T o V. En algunas realizaciones, 25 también se abarcan sustituciones no conservadoras de aminoácidos dentro del término de variantes. Se pretende que una variante de una proteína SIM humana recombinante, por ejemplo, una variante de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5, se refiera a cualquier molécula sustancialmente similar, en cuanto a estructura y función, o bien a la molécula completa de SEQ ID NO: 3, 4 ó 5 o bien a un fragmento de la misma.

30 Los términos "homología", "identidad" y "similitud" se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico alineadas de manera óptima. La homología y la identidad pueden determinarse, cada una, comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con propósitos de comparación. Por ejemplo, se basa en el uso de un software de homología convencional en la 35 posición por defecto, tal como BLAST, versión 2.2.14. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o el mismo aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por residuos de aminoácido similares (por ejemplo, similares en cuanto a naturaleza estérica y/o electrónica tales como, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión como porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos similares o idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas, respetuosamente. Una secuencia que es 40 "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, aunque preferiblemente menos del 25% de identidad con las secuencias tal como se da a conocer en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de 45 polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido o residuo a residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o el residuo idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de 50 posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

El término "identidad sustancial", tal como se usa en el presente documento, indica una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que presenta al menos el 85% de identidad de secuencia, preferiblemente de al menos el 90% al 95% de 55 identidad de secuencia, más habitualmente al menos el 99% de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 de aminoácidos), con frecuencia a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 de aminoácidos), en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir delecciones o adiciones que suman un totales del 20 por ciento o 60 menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más larga. El término "similitud", cuando se usa para describir un polipéptido, se determina comparando la secuencia de aminoácidos y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

65 Tal como se usa en el presente documento, los términos "homólogo" u "homólogos" se usan de manera intercambiable, y cuando se usan para describir un polinucleótido o polipéptido, indican que dos polinucleótidos o

polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean de manera óptima y se comparan, por ejemplo, usando BLAST, versión 2.2.14, con parámetros por defecto para la alineación (véase en el presente documento), son idénticos, con inserciones o delecciones de nucleótidos o inserciones o delecciones de aminoácidos apropiadas, en al menos el 70% de los nucleótidos, habitualmente desde aproximadamente el 75%

5 hasta el 99%, y más preferiblemente de al menos aproximadamente el 98 al 99% de los nucleótidos. El término "homólogo", tal como se usa en el presente documento, también se refiere a homología con respecto a estructura y/o función. Con respecto a la homología de secuencia, las secuencias son homólogas si son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% idénticas, al menos el 97% idénticas, o al menos el 99% idénticas. El experto en la técnica puede cerciorarse fácilmente de la

10 determinación de homólogos de los genes o péptidos de la presente invención.

El término "sustancialmente homólogo" se refiere a secuencias que son al menos el 90%, al menos el 95% idénticas, al menos el 96% idénticas, al menos el 97% idénticas, al menos el 98% idénticas o al menos el 99% idénticas. Las secuencias homólogas pueden ser el mismo gen funcional en diferentes especies. El experto en la 15 técnica puede cerciorarse fácilmente de la determinación de homólogos de los genes o péptidos de la presente invención.

Se dice que una molécula es "sustancialmente similar" a otra molécula si ambas moléculas presentan estructuras sustancialmente similares o si ambas moléculas poseen una actividad biológica similar, por ejemplo, si ambas 20 moléculas pueden activar MISRII o inhibir la maduración de folículos ováricos. Por tanto, siempre que dos moléculas posean una actividad similar (es decir, una variante de una proteína SIM humana recombinante que puede activar MISRII de manera similar a la proteína SIM que corresponde a la SEQ ID NO: 3, o la proteína SIM humana recombinante que corresponde a la SEQ ID NO: 4 ó 5), se consideran variantes y se abarcan para su uso tal como se da a conocer en el presente documento, incluso si la estructura de una de las moléculas no se halla en la otra, o si la secuencia de residuos de aminoácido no es idéntica. Por tanto, siempre que dos 25 moléculas posean una actividad biológica similar, se consideran variantes ya que se usa ese término en el presente documento incluso si la estructura de una de las moléculas no se halla en la otra, o si la secuencia de residuos de aminoácido no es idéntica. Como tal, las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos que tienen menores grados de similitud que, pero una actividad biológica comparable con, la proteína SIM humana 30 recombinante se consideran equivalentes. Al determinar las secuencias de polinucleótidos, se considera que todas las secuencias de polinucleótidos objeto que pueden codificar para secuencias de aminoácidos sustancialmente similares son sustancialmente similares a una secuencia de polinucleótidos de referencia, independientemente de las diferencias en la secuencia de codón. Una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente similar" a una secuencia de ácido nucleico específica de SEQ ID NO: 1 ó 2 tal como se da a 35 conocer en el presente documento si: (a) la secuencia de nucleótidos se hibrida con las regiones codificantes del ácido nucleico de SIM natural, o (b) la secuencia de nucleótidos puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos de una proteína SIM humana recombinante codificada por SEQ ID NO: 1 ó 2 en condiciones moderadamente rigurosas y presenta una actividad biológica similar a la proteína SIM humana recombinante; o (c) las secuencias de nucleótidos que están degeneradas como resultado del código genético a las secuencias 40 de nucleótidos definidas en (a) o (b). Las proteínas sustancialmente similares normalmente serán más de aproximadamente el 80% similares a la secuencia correspondiente de la proteína nativa.

El término "similitud sustancial", en el contexto de secuencias de polipéptido, indica que el polipéptido comprende una secuencia con al menos el 60% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, o el 70%, o el 45 80%, o el 85% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, o lo más preferiblemente el 90% de identidad a lo largo de una ventana de comparación de aproximadamente 10-20 residuos de aminoácido. En el contexto de secuencias de aminoácidos, "similitud sustancial" incluye además sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por tanto, un polipéptido es sustancialmente similar a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren en una o más sustituciones conservadoras.

50 En una realización, el término "homólogo humano" de un transcripto génico se refiere a una secuencia de ADN que presenta al menos aproximadamente el 55% de homología con la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la secuencia de un gen de proteína SIM humana recombinante codificada por el genoma de seres humanos o un animal, por ejemplo, un ratón o un animal transgénico. En una realización, el término "homólogo humano" de una proteína que se identifica como asociada con una proteína SIM humana recombinante se refiere a una secuencia de aminoácidos que presenta el 40% de homología con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína que se identifica como asociada con una proteína SIM humana recombinante codificada por el genoma del animal transgénico de la presente invención, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 60% de homología, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 70% de homología, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 75% de homología, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% de homología, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 85% de homología, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de homología, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de homología. Tal como se comentó anteriormente, la homología es de al menos 55 aproximadamente el 50% al 100%, y todos los intervalos entremedias (es decir, el 55%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%, etc.). El experto en la técnica puede cerciorarse fácilmente de la

determinación de homólogos humanos de los genes de la presente invención.

El término "sustitución conservadora", cuando se describe un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la actividad del polipéptido. Por tanto,

- 5 una "sustitución conservadora" de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a una sustitución de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad del polipéptido o a una sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que presentan propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, con carga positiva o negativa, polares o apolares, etc.), de tal manera que la sustitución de aminoácidos incluso críticos no altere sustancialmente la actividad. En la técnica se conocen bien tablas de sustituciones conservadoras que
- 10 proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Por ejemplo, los siguientes seis grupos contienen, cada uno, aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos de otros: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). (Véase también Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984)). Además, las sustituciones, delecciones o adiciones
- 15 individuales que alteran, añaden o delecionan un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también son "sustituciones conservadoras".

Tal como se usa en el presente documento, el término "no conservadora" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente que presenta propiedades químicas diferentes. Las

- 20 sustituciones no conservadoras incluyen, pero no se limitan a, ácido aspártico (D) que se reemplaza por glicina (G); asparagina (N) que se reemplaza por lisina (K); o alanina (A) que se reemplaza por arginina (R).

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s)

- 25 secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

30 La alineación óptima de las secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-53 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988), mediante

- 35 implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante inspección visual. (Véase generalmente Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 4^a ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1999)).

40 Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones por pares progresivas para mostrar el porcentaje de identidad de secuencia. También representa gráficamente un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineaciones progresivas de Feng y Doolittle (J. Mol. Evol. 25:351-60 (1987). El método usado es similar al método descrito

- 45 por Higgins y Sharp (Comput. Appl. Biosci. 5:151-53 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. Luego se alinea esta agrupación con la siguiente secuencia o agrupación de secuencias

- 50 alineadas más relacionada. Se alinean dos agrupaciones de secuencias mediante una extensión sencilla de la alineación por pares de dos secuencias individuales. Se logra la alineación final mediante una serie de alineaciones por pares progresivas. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para las regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros de programa. Por ejemplo, puede compararse una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros:

- 55 peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos de extremo ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y el porcentaje de similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe por Altschul et al. (J. Mol. Biol.

- 60 215:403-410 (1990). (Véase también Zhang et al., Nucleic Acid Res. 26:3986-90 (1998); Altschul et al., Nucleic Acid Res. 25:3389-402 (1997). El software para realizar análisis por BLAST está disponible de manera pública a través de la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia en cuestión, que o bien coinciden con o bien satisfacen alguna puntuación de umbral

- 65 T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al. (1990), citado anteriormente). Estos

aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Luego se extienden los aciertos de palabras en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulada. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en cantidad

- 5 X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa, por defecto, una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-9 (1992)), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,1, más normalmente menos de aproximadamente 0,01, y lo más normalmente menos de aproximadamente 0,001.

- 20 25 El término "inserciones" o "deleciones" están normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente produciendo el péptido de manera sintética mientras se realizan sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia usando técnicas de ADN recombinante.

25 30 El término "sustitución", cuando se refiere a un péptido, se refiere a un cambio en un aminoácido por una entidad diferente, por ejemplo, otro aminoácido o resto de aminoácido. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

- 30 35 40 Un "análogo" de una molécula tal como una proteína SIM humana recombinante, por ejemplo, SEQ ID NO: 4 ó 5, se refiere a una molécula similar, en cuanto a función, o bien a la molécula completa o bien a un fragmento de la misma. También se pretende que el término "análogo" incluya variantes alélicas, de especie e inducidas. Los análogos normalmente difieren de los péptidos que se producen de manera natural en una o algunas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos presentan normalmente al menos el 80 o el 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N-terminales o C-terminales. Ejemplos de aminoácidos no naturales son, por ejemplo, pero sin limitarse a; aminoácidos acedisustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, β-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetil-lisina, ε-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ε-N-metilarginina. Pueden examinarse fragmentos y análogos para determinar la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos tal como se describe a continuación.

45 Por "unido covalentemente" quiere decirse unido o bien directa o bien indirectamente (por ejemplo, a través de un ligador) mediante un enlace químico covalente.

- 45 50 55 60 El término "proteína de fusión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína recombinante de dos o más proteínas. Las proteínas de fusión pueden producirse, por ejemplo, mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína que se une al ácido nucleico que codifica para otra proteína, de tal manera que constituyen un único marco de lectura abierto que puede traducirse en las células en un único polipéptido que alberga todas las proteínas previstas. El orden de disposición de las proteínas puede variar. Como ejemplo no limitativo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína SIM humana recombinante de fusión se deriva de la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína SIM humana recombinante o un fragmento derivado funcional o una variante de la misma, fusionada en marco con un extremo, ya sea el extremo 5' ó 3', de un gen que codifica para una primera pareja de fusión, tal como un fragmento Fc de IgG1. De esta manera, en la expresión del gen, la proteína SIM humana recombinante o un fragmento derivado funcional o una variante de la misma se expresa de manera funcional y se fusiona con el extremo N-terminal o C-terminal de Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, la modificación de la sonda de polipéptido es de tal manera que la funcionalidad de la proteína SIM humana recombinante o un fragmento derivado funcional o una variante de la misma permanece sustancialmente inalterada en cuanto a su actividad biológica por la fusión con la primera pareja de fusión, tal como Fc de IgG1.

65 Por "se une específicamente" o "unión específica" quiere decirse un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido deseado pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de manera natural un polipéptido de la invención.

- 65 Por "sustancialmente puro" quiere decirse un ácido nucleico, polipéptido u otra molécula que se ha separado de

los componentes que lo acompañan de manera natural. Normalmente, un polipéptido es sustancialmente puro cuando está al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o incluso al menos aproximadamente el 99%, en peso, libre de las proteínas y moléculas orgánicas que se producen de manera natural con las que está asociado de manera natural. Por ejemplo, puede obtenerse un polipéptido sustancialmente puro mediante extracción a partir de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula que no expresa normalmente esa proteína, o mediante síntesis química.

- 5 Por "estabilidad proteolítica mejorada" quiere decirse una reducción en la tasa o el grado de proteólisis de una secuencia peptídica en al menos aproximadamente el 2%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% en comparación con una secuencia de control en las mismas condiciones (por ejemplo, *in vivo* o en un sistema *in vitro* tal como en una célula o un lisado celular). Un péptido con estabilidad proteolítica mejorada puede contener cualquier modificación, por ejemplo, inserciones, delecciones o mutaciones puntuales que reducen o eliminan un sitio sujeto a escisión proteolítica en un sitio particular. Los sitios de escisión proteolítica pueden identificarse basándose en secuencias diana conocidas o usando un software informático (por ejemplo, el software descrito por Gasteiger *et al.*, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En John M. Walquer, ed. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005)). Alternativamente, los sitios proteolíticos pueden determinarse experimentalmente, por ejemplo, mediante inmunotransferencia de tipo Western para la proteína tras la expresión o incubación en un sistema celular o lisado celular, seguida por secuenciación de los fragmentos identificados para determinar los sitios de escisión.
- 10 25
- 15 El término "recombinante", tal como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético y/o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con la totalidad o una porción del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término recombinante, tal como se usa con respecto a una proteína o un polipéptido, significa un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. El término recombinante, tal como se usa con respecto a una célula huésped, significa una célula huésped en la que se ha introducido un polinucleótido recombinante. Con respecto a un material (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector), recombinante también se usa en el presente documento para referirse a que el material se ha modificado mediante la introducción de un material heterólogo (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector).
- 20 30
- 35

Los términos "sujeto" e "individuo" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un animal, por ejemplo, un ser humano, al que se le proporciona tratamiento, incluyendo tratamiento profiláctico, con la composición farmacéutica según la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" significa un ser humano o animal. Habitualmente, el animal es un vertebrado tal como, pero sin limitarse a, un primate, roedor, animal doméstico o animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, macacos cangrejeros, monos araña y macacos, por ejemplo, macacos de la India. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres. Los animales domésticos y de caza incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies felinas, por ejemplo, gato doméstico, especies caninas, por ejemplo, perro, zorro, lobo, especies aviares, por ejemplo, gallina, emú, aveSTRUZ, y peces, por ejemplo, trucha, bagre y salmón. Paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de los anteriores, por ejemplo, todos los anteriores, pero excluyendo uno o más grupos o especies tales como seres humanos, primates o roedores. En determinadas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un ser humano. Los términos "paciente" y "sujeto" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Un sujeto puede ser masculino o femenino. Además, un sujeto puede ser un bebé o un niño.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Pueden usarse ventajosamente mamíferos distintos de seres humanos como sujetos que representan modelos animales de trastornos asociados con enfermedad autoinmunitaria o inflamación. Además, pueden usarse los métodos y las composiciones descritas en el presente documento para animales domesticados y/o mascotas. Un sujeto humano puede ser de cualquier edad, género, raza o grupo étnico, por ejemplo, caucásico (blanco), asiático, africano, negro, afroamericano, afroeuropéo, hispano, de Oriente Medio, etc. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente u otro sujeto en un entorno clínico. En algunas realizaciones, el sujeto ya puede estar sometiéndose a un tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "administrar" e "introducir" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la colocación de la proteína SIM recombinante, o un agente o vector que expresa la proteína SIM recombinante tal como se da a conocer en el presente documento en un sujeto mediante un método o una vía que da como resultado al menos la localización parcial de una

proteína SIM recombinante en un sitio deseado. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada que dé como resultado el bloqueo de la foliculogénesis en el sujeto.

El término "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento para aliviar al menos uno o más síntomas de la enfermedad o el trastorno, y se refiere a una cantidad suficiente de composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína SIM humana recombinante tal como se da a conocer en el presente documento, significa una cantidad suficiente de la

composición para tratar un trastorno, en una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Por tanto, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la composición tal como se da a conocer en el presente documento que es suficiente para efectuar una reducción terapéutica o profilácticamente significativa en un síntoma o marcador clínico asociado con un cáncer o una afección mediada por cáncer. Por tanto, no es posible especificar la "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto habitual en la técnica puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada usando sólo experimentación de rutina. Un médico con experiencia habitual puede juzgar la eficacia del tratamiento, por ejemplo, puede evaluarse la eficacia en modelos animales de fecundidad, y cualquier tratamiento o administración de las composiciones o formulaciones que conduzca a la prevención del embarazo o a la prevención de una disminución en la reserva ovárica de folículos (ROF) indica un tratamiento eficaz.

Una reducción terapéutica o profilácticamente significativa de un síntoma es, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 100%, al menos aproximadamente el 125%, al menos aproximadamente el 150% o más en un parámetro medido en comparación con un sujeto de control o no tratado. Los parámetros medidos o medibles incluyen marcadores de enfermedad clínicamente detectables, por ejemplo, niveles elevados o reducidos de un marcador biológico, así como parámetros relacionados con una escala clínicamente aceptada de síntomas o marcadores para una enfermedad o un trastorno. Sin embargo, se entenderá que el médico tratante decidirá el uso diario total de las composiciones y formulaciones tal como se da a conocer en el presente documento dentro del alcance del criterio médico razonable. La cantidad exacta requerida variará dependiendo de factores tales como el tipo de enfermedad que está tratándose.

El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma que es eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, por ejemplo, para prevenir el embarazo o prevenir una disminución en la reserva ovárica de folículos (ROF) en el sujeto femenino. En algunas realizaciones, una cantidad profilácticamente eficaz es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, para el tratamiento de un sujeto que padece o está en riesgo de padecer EOP o ROD). Una dosis de SIM o variante de proteína SIM para medidas anticonceptivas (por ejemplo, cantidad eficaz profiláctica) puede ser mayor que la cantidad profiláctica para prevenir una disminución en la reserva ovárica (por ejemplo, para prevenir una disminución en la reserva ovárica de folículos (ROF)). Una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína SIM humana recombinante o un fragmento funcional o una variante de la misma también es una en la que los efectos beneficiosos superan a cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la evitación de o al retraso en la manifestación de uno o más síntomas o marcadores medibles de una enfermedad o un trastorno, por ejemplo, de EOP o ROD (reserva ovárica disminuida). Un retraso en la manifestación de un síntoma o marcador es un retraso relativo al tiempo al que tal síntoma o marcador se manifiesta en un sujeto de control o no tratado con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o el trastorno. Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" incluyen no sólo la evitación o prevención de un síntoma o marcador de la enfermedad, sino también una gravedad o un grado reducido de uno cualquiera de los síntomas o marcadores de la enfermedad, en relación con aquellos síntomas o marcadores en un individuo de control o no tratado con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o el trastorno, o en relación con los síntomas o marcadores que probablemente surgen basándose en medidas históricas o estadísticas de poblaciones afectadas por la enfermedad o el trastorno. Por "gravedad reducida" quiere decirse al menos un 10% de reducción en la gravedad o el grado de un síntoma o marcador de enfermedad medible, en relación con un control o una referencia, por ejemplo, al menos el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o incluso el 100% (es decir, sin síntomas o marcadores medibles).

Una "composición" o "composición farmacéutica" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refiere a una composición que contiene habitualmente un excipiente, tal como un portador farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es adecuado para su administración a células. Las células pueden formar parte de un sujeto, por ejemplo, para propósitos terapéuticos, diagnósticos o profilácticos. Las células también pueden cultivarse, por ejemplo, células como parte de un ensayo para examinar posibles composiciones farmacéuticas, y las células pueden formar parte de un animal transgénico para propósitos de

- investigación. La composición también puede ser un cultivo celular, en la que un polipéptido o polinucleótido que codifica para un regulador metabólico de la presente invención está presente en las células y/o en el medio de cultivo. Además, las composiciones para administración tópica (por ejemplo, mucosa oral, mucosa respiratoria) y/u oral pueden formar disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues orales o polvos, tal como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, University of the Sciences in Philadelphia (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons, 21^a ed.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- “Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, a un diluyente, a un material de encapsulación o a una formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos.
- La expresión “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, un diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en mantener la actividad de o portar o transportar los agentes objeto desde un órgano, o una porción del cuerpo, a otro órgano, u otra porción del cuerpo. Además de ser “farmacéuticamente aceptable” tal como se define ese término en el presente documento, cada portador también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación. La formulación farmacéutica contiene un compuesto de la invención en combinación con uno o más componentes farmacéuticamente aceptables. El portador puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, una crema o una cápsula. Estas preparaciones farmacéuticas son un objeto adicional de la invención. Habitualmente, la cantidad de compuestos activos es de entre el 0,1 y el 95% en peso de la preparación, preferiblemente entre el 0,2 y el 20% en peso, en las preparaciones para uso parenteral y preferiblemente entre el 1 y el 50% en peso en las preparaciones para administración oral. Para el uso clínico de los métodos de la presente invención, una composición de suministro dirigida de la invención se formula en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa; a través de la mucosa, por ejemplo, intranasal; enteral, por ejemplo, oral; tópica, por ejemplo, transdérmica; ocular, por ejemplo, mediante escarificación corneal, u otro modo de administración. La composición farmacéutica contiene un compuesto de la invención en combinación con uno o más componentes farmacéuticamente aceptables. El portador puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, una crema o una cápsula.
- El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido; un plásmido es una especie del género abarcado por “vector”. El término “vector” se refiere normalmente a una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación y otras entidades necesarias para la replicación y/o el mantenimiento en una célula huésped. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes y/o secuencias de ácido nucleico a los que se unen operativamente se denominan en el presente documento “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad a menudo están en forma de “plásmidos” que se refieren a bucles circulares de ADN bicatenario que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma, y comprenden normalmente entidades para la expresión estable o transitoria del ADN codificado. Pueden usarse otros vectores de expresión en los métodos tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras, bacteriófagos o vectores virales, y tales vectores pueden integrarse en el genoma del huésped o replicarse de manera autónoma en la célula particular. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. También pueden usarse otras formas de vectores de expresión conocidas por los expertos en la técnica que cumplen funciones equivalentes, por ejemplo, vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores preferidos son aquellos con capacidad de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente se denominan en el presente documento “vectores de expresión”. Los vectores de expresión pueden dar como resultado la expresión estable o transitoria del ADN. Un vector de expresión a modo de ejemplo para su uso en la presente invención es pcDNA3.1.
- El término “vectores virales” se refiere al uso como virus, o vectores asociados a virus como portadores del constructo de ácido nucleico en la célula. Los constructos pueden integrarse y empaquetarse en genomas virales defectuosos no replicantes como adenovirus, virus adenoasociados (AAV) o virus del herpes simple (VHS), u otros, incluyendo vectores retrovirales y lentivirales, para la infección o transducción en células. El vector puede incorporarse o no en el genoma celular. Los constructos pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Alternativamente, el constructo puede incorporarse en vectores con capacidad de replicación episómica, por ejemplo, vectores de VEP y VEB.
- El término “vector inducible” se refiere a un vector cuya expresión génica puede controlarse. Por ejemplo, el nivel de expresión génica puede aumentarse, disminuirse o reducirse hasta cero. En algunas realizaciones, el vector inducible puede comprender un interruptor que controla la expresión génica.

Tal como se usa en el presente documento, un “promotor” o una “región promotora” o un “elemento promotor” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refiere a un segmento de una secuencia de ácido nucleico, normalmente, pero sin limitarse a, ADN o ARN o análogos de los mismos, que controla la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que se une operativamente. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento, la unión y el inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Esta porción de la región promotora se denomina promotor. Además, la región promotora incluye secuencias que modulan esta actividad de reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden actuar en *cis* o pueden responder a factores que actúan en *trans*. Los promotores, dependiendo de la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o regulados.

El término “secuencias reguladoras” se usa de manera intercambiable con “elementos reguladores” en el presente documento, y se refiere a un segmento de ácido nucleico, normalmente, pero sin limitarse a, ADN o ARN o análogos de los mismos, que modula la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que se une operativamente y, por tanto, actúa como moduladores transcripcionales. Las secuencias reguladoras modulan la expresión de genes y/o secuencias de ácido nucleico a los que se unen operativamente. La secuencia reguladora a menudo comprende “elementos reguladores” que son secuencias de ácido nucleico que son dominios de unión transcripcionales y son reconocidos por los dominios de unión a ácido nucleico de proteínas transcripcionales y/o factores de transcripción, represores o potenciadores, etc. Las secuencias reguladoras típicas incluyen, pero no se limitan a, promotores transcripcionales, promotores inducibles y elementos transcripcionales, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica para sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias para controlar la terminación de la transcripción y/o traducción. Las secuencias reguladoras pueden ser una secuencia reguladora individual o múltiples secuencias reguladoras, o secuencias reguladoras modificadas o fragmentos de las mismas. Las secuencias reguladoras modificadas son secuencias reguladoras en las que se ha cambiado o modificado la secuencia de ácido nucleico por algún medio, por ejemplo, pero sin limitarse a, mutación, metilación, etc.

El término “unido operativamente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la relación funcional de las secuencias de ácido nucleico con las secuencias reguladoras de nucleótidos, tales como promotores, 30 potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias señal. Por ejemplo, la unión operativa de secuencias de ácido nucleico, normalmente ADN, a una secuencia reguladora o región promotora se refiere a la relación física y funcional entre el ADN y la secuencia reguladora o el promotor de tal manera que se inicia la transcripción de tal ADN a partir de la secuencia reguladora o el promotor, mediante una ARN polimerasa que reconoce, se une a y transcribe de manera específica el ADN. Con el fin de optimizar la expresión y/o transcripción *in vitro*, puede ser necesario modificar la secuencia reguladora para la expresión del ácido nucleico o ADN en el tipo de célula para el que se expresa. La conveniencia o la necesidad de tal modificación puede determinarse empíricamente. No es necesario que los potenciadores se ubiquen en estrecha proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción mejoran. Además, puede decirse que un gen transcrita a partir de un promotor regulado en *trans* por un factor transcrita por un segundo promotor está unido 40 operativamente al segundo promotor. En tal caso, se dice que la transcripción del primer gen está unida operativamente al primer promotor y también se dice que está unida operativamente al segundo promotor.

Los términos “disminuir”, “reducido”, “reducción” o “inhibir” se usan todos en el presente documento para significar una disminución en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, los términos “reducido”, “reducción”, “disminuir” o “inhibir” pueden significar una disminución en al menos el 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, una disminución en al menos aproximadamente el 20%, o al menos aproximadamente el 30%, o al menos aproximadamente el 40%, o al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o una disminución de hasta entre aproximadamente el 90 y el 95% o entre el 90 y el 99%, o cualquier disminución de al menos el 10%-95% o el 10-99% en comparación con un nivel de referencia.

El término “estadísticamente significativo” o “significativamente” se refiere a la significación estadística y generalmente significa una diferencia de dos desviaciones estándar (2DE) o mayor.

55 Pueden hallarse definiciones de términos habituales en biología celular y biología molecular en “The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 19^a edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9). También pueden hallarse definiciones de términos habituales en biología molecular en Benjamin Lewin, Genes X, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew *et al.* (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) y Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan *et al.*, eds.

65 Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, a los protocolos y reactivos, etc., particulares descritos en el presente documento y, como tal, puede variar. La terminología usada en el presente documento tiene el único propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la

presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas en singular incluyen la referencia en plural y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aparte de en los ejemplos de

5 funcionamiento, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes o condiciones de reacción usados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

10 Todas las patentes y otras publicaciones identificadas en el presente documento por referencia tienen el propósito de describir y dar a conocer, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que pueden usarse junto con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. A este respecto, no debe interpretarse nada como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder tal divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en 15 cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponibles para los solicitantes y no constituye ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material conocido en la práctica o las pruebas de la invención, en el presente documento se describen los métodos, dispositivos y materiales a este respecto.

25 Aunque se han representado y descrito en detalle realizaciones preferidas en el presente documento, resultará evidente para los expertos en la técnica relevante que pueden realizarse diversas modificaciones, adiciones, sustituciones, y similares, sin apartarse del espíritu de la invención y, por tanto, se considera que estas se encuentran dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones siguientes. Además, en la medida en que no se haya indicado ya, los expertos habituales en la técnica entenderán que una cualquiera de 30 las diversas realizaciones en el presente documento descritas e ilustradas puede modificarse adicionalmente para incorporar las características mostradas en cualquiera de las demás realizaciones dadas a conocer en el presente documento.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

La descripción de la presente invención se ha presentado con propósitos de ilustración y descripción, pero no se pretende que sea exhaustiva o limite la invención a la forma dada a conocer. El alcance de la presente invención se limita sólo por el alcance de las siguientes reivindicaciones. Resultarán evidentes muchas modificaciones y 40 variaciones para los expertos habituales en la técnica. Se eligió y describió la realización descrita y mostrada en las figuras con el fin de explicar mejor los principios de la invención, la aplicación práctica y permitir a otros expertos habituales en la técnica entiendan la invención para diversas realizaciones con diversas modificaciones que se ajusten al uso particular contemplado.

45 EJEMPLO 1

Tratamiento con AAV9-SIM en ratones

50 Recientemente, se han desarrollado y empleado virus adenoasociados (AAV), que normalmente infectan a mamíferos, incluyendo seres humanos, pero que no son patógenos, como vectores de terapia génica en ensayos clínicos en Europa con gran éxito. En un estudio, los inventores demuestran que AAV9 que expresa proteínas SIM y proteínas variantes SIM (por ejemplo, LR-SIM, RF-SIM, LRF-SIM) (véase la figura 4) tuvo éxito, cuando se suministró como dosis única, al provocar la secreción de altos niveles de SIM en la sangre (figura 5). La concentración de SIM estaba en el intervalo de ug/ml cuando se administraron 3×10^{11} partículas virales por vía 55 intraperitoneal, y los niveles fueron extremadamente estables, persistiendo sin ninguna reducción durante el periodo de 60 días del experimento (figura 1A), y la expresión persiste al menos 6 meses o más en ratones en experimentos fisiológicos.

60 Cuando se inyecta por vía intraperitoneal, el virus presenta un tropismo significativo a los músculos de la pared corporal y el páncreas, tal como se evidencia por infecciones de control de AAV-GFP. Dosis de desde 1×10^{11} hasta 1×10^{12} pueden inducir la producción de SIM en el intervalo de 0,3-1,5 ug/ml (figura 1A), que es suficiente para un bloqueo completo de la foliculogénesis, tal como se evidencia por la observación de una cantidad normal de folículos primordiales y la ausencia de las demás fases de desarrollo (primario, secundario, antral) (figura 1B). Los ovarios tratados con AAV-SIM resultantes son mucho más pequeños que los ovarios tratados con AAV-GFP 65 de control debido a la falta de folículos en crecimiento (la figura 1C), pero no muestran evidencias de toxicidad y conservan los folículos primordiales (figura 1C, véase la flecha). Se observaron resultados similares después de

inyecciones únicas de virus que suministran constructos de SIM etiquetados con Flag (datos no mostrados).

EJEMPLO 2

- 5 Los ratones tratados con AAV9-LR-SIM, AAV9-LRF-SIM o AAV9-RF-SIM tenían más folículos por portaobjetos (figura 2) y ovarios más pequeños (figura 3) que los ratones tratados con AAV9-GFP de control, lo que demuestra la conservación de folículos ováricos primordiales y la inhibición de la maduración de folículos en los ratones tratados con SIM.
- 10 Además, los inventores demuestran *in vivo* que los ratones tratados con AAV9-LR-SIM no podían quedarse preñadas ni reproducirse, tal como se muestra en la tabla 1. En particular, se trataron ratones C57/BL6 hembra en la madurez sexual (6-8 semanas) con una dosis de 3×10^{11} AAV9-LR-SIM o control AAV9-GFP y se observaron durante un mes para registrar el ciclo y monitorizar los niveles de SIM y esteroides en la sangre. Un mes después del tratamiento, se emparejaron los ratones hembra con un macho en celo de 3-4 meses de edad.
- 15 Se registraron el tiempo acumulado empleado entre parejas de apareamiento así como los tamaños de camada acumulados. Se produjeron 23 crías a partir de 3 parejas de ratones tratados con AAV-GFP, mientras que no se produjeron crías a partir de 3 parejas de ratones tratados con AAV9-LR-SIM (véase la tabla 1), lo que demuestra que la proteína SIM inhibe la reproducción.
- 20 La tabla 1 muestra la producción reproductiva acumulada de ratones hembra tratados con AAV9-LR-SIM o control AAV9-GFP colocados en parejas de apareamiento con ratones macho WT.

	Control GFP	Hembras SIM
parejas	3	2
días	184	184
crías	23	0
crías/días/pareja	0,042	0,000

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 LR - secuencia de ácido nucleico

ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTCAGCAGAGGAGCCAGCTGTGGCACCAGTGGCCTCATCTTCCAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGCAGCCCACAA
GAGCCTCTGGCCTGGTGGCACTGGGCGGGACAGCAATGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGGTGGTGGGGCTCTA
 AGCGCCTATGAGCAGGCCCTCCTGGGGCGTGCAGAGGCCGCTGGGGCCCGAGACCTGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGG
 GTCTGCAACACCCTGACAGGCAGGCTGCCTTGCCCTCTACGGCAGCTGGGGCCTGGCTGCGGGACCCCTGG
 GGGCAGCGCCTGGTGGTCTACACCTGGAGGAAGTGACCTGGAGCCAACACCCCTGCGTGGAGGTTCCAGGAGCCC
 CCGCCTGGAGGAGCTGGCCCCCAGAGCTGGCAGCTGCTGGTGTACCTGGCCTGCCCTGAGGTACTGTG
 ACAGAGGCTGGCTGCCGGTGCAGGAGACGCCCTGCCGAGACACCCGCTACCTGGTGTAGCGGTGGAC
 CGCCCTCGGGGGCCTGGCGGGCTCGGGCTGGCCTGACCCCTGCTCACCGGATGACCCGGCCCTGCTCCTG
 ACCGCCCCGGCTGCAGGCACTGCTGGTGGCGACGACCACCGCTGCTCACCGGATGACCCGGCCCTGCTCCTG
 CTGGCGGGTCCAGGCCCCGGCTGCCGAGACCCCTTCTGGAGGACCTCACGGCCTGGTGGGGCTTCCGCAAGGG
 TCCGGCGAACCTGAGGAGCTGCCACCCAGCGCAGACCCCTTCTGGAGGACCTCACGGCCTGGTGGGGCTG
 CGGGTCCCCCGGGCCTCCGGCCGCGCTGGCCTGGATCCGGACCGCCTGGCGGGCTTCCGCAAGGG
 CTAGTCAACCTGCGGACCCCGCGCGCTGGAGCCACTCGACGGCAGGAGGAGCCGCTGCTGCTGAGG
 CCCACTGCGGCCACCACGGGGATCTGCGCCCTGACGACCCACGTCGGCGCGTGGGCCACGGCCCTGGG
 CGCGCGTGGCTGCTGAAGTCAAGCGCGGCTGCCAGCTGCGAAGCCTCCGGGCTGCGCTCCGCCACAGCC
 CCGCTGCTGGCGCGCTGCTCGCGCTGCCCAGGTGGCCGGCTGGCGATCCCCCTGCGAGCGCTGCTG
 CTCCCTGAAGGGCGCTGAGGGCCTGCGCGTGGAGTGGCGGGGGATCCGGCGGGGGCTGGGACCGC
 AGCGGGGGGCCACCGCCGCGACGGCCGTGCGCGCTGCGCAGCTCAGCTAGACCTCCGGCGAGCGCTCC
 GTACTCATCCCCGAGACCTACCAGGCAACAATTGCCAGGGCTGTGGCTGGCCTGAGTCCGACCGCAACCCG
 CGCTACGGCAACCACGTGGTGTGCTGCTGAAGATGCAAGGCCGTGGGCCCTGGCGGCCACCGCTG
 GTGCCCAACCGCCTACGCGGGCAAGCTGCTCATCAGCCTGTCGGAGGAGCGCATCAGCGCGACCACGTGCC
 5 ATGGTGGCCACCGAGTGTGGCTGCCGGTGA

SEQ ID NO: 2 LRF - secuencia de ácido nucleico

ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTCAGCAGAGGAGCCAGCTGTGGCACCAGTGGCCTCATCTTCCAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGCAGCCCACAA
GAGCCTCTGGCCTGGTGGCACTGGGCGGGACAGCAATGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGGTGGTGGGGCTCTA
 AGCGCCTATGAGCAGGCCCTCCTGGGGCGTGCAGAGGCCGCTGGGGCCCGAGACCTGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGG
 GTCTGCAACACCCTGACAGGCAGGCTGCCTTGCCCTCTACGGCAGCTGGGGCCTGGCTGCGGGACCCCTGG
 GGGCAGCGCCTGGTGGTCTACACCTGGAGGAAGTGACCTGGAGCCAACACCCCTGCGTGGAGGTTCCAGGAGCCC
 CCGCCTGGAGGAGCTGGCCCCCAGAGCTGGCAGCTGCTGGTGTACCTGGCCTGCCCTGAGGTACTGTG
 ACAGAGGCTGGCTGCCGGTGCAGGAGACCCCTGCCGAGACACCCGCTACCTGGTGTAGCGGTGGAC
 CGCCCTCGGGGGCCTGGCGGGCTCCGGCTGGCCTGACCCCTGAGCCCGGGAGAGGACTCCGGCTGAGT
 ACCGCCCCGGCTGCAGGCACTGCTGGTGGCGACGACCACCGCTGCTCACCGGATGACCCGGCCCTGCTCCTG
 CTGGCGCGTCCAGGCGCCGCGCTGCCGACGGCCAGCTGGACCCGTGCCCTTCCGGCCAGGGCA
 TCCGGCGAACCTGAGGAGCTGCCACCCAGCGCAGACCCCTTCTGGAGGACCTCACGGCCTGGTGGGGCGCTG
 CGGGTCCCCCGGGCCCTCCGGCCGCGCTGGGCTGGATCCGGACCGCCTGGCCGGCTTCCGGCAGGGC
 CTAGTCAACCTGCGGACCCCGCGCGCTGGAGCCCTACTCGACGGCCACGACCCCTGCGTGTGCTGAGG
 CCCACTGCGGCCACCACGGGGATCTGCGCCCTGACGACCCACGTCGGCGCCGTGGGCCACGGCCCTGGG
 CGGGCGCTGGCTGTAAGTCAAGCGCGGCTGCCAGCTGCGAAGCCTCCGGGCTGCGTCCGGCCACAGCC
 CGCGCTGCTGGCGCGCTGCTCGCGCTGCCCAGGTGGCCGGCTGGCGATCCCCCTGCGAGCGCTGCTG
 CTCCCTGAAGGGCGCTGCAAGGGCCTGCGCGTGGAGTGGCGGGGGATCCGGCGGGGGCTGGGACCGC
 AGCgactacaaggatgacgacgacaagGCAGGGGGGCCACCGCCGCGACGGCCGTGCGCGCTGCGCAGCTCAGC
 GTAGACCTCCGCGCCGAGCGCTCCGTAATCCCCGAGACCTACCAGGCAACAATTGCCAGGGCTGTGGCC
 TGCGCTAGTCCGACCGCAACCCCGCGTACGGCAACCACGTGGTGTGCTGCTGAAGATGCAAGGCCGTGGGGCC
 GCCCTGGCGGCCACCGCCTGCGTGGCCACCGCCTACGCGGGCAAGCTGCTCATCAGCCTGTCGGAGGAGCGC
 ATCAGCGCGCACCACGTGCCAACATGGTGGCCACCGAGTGTGGCTGCCGGTGA

10

SEQ ID NO: 3 SIM (560AA) - secuencia de aminoácidos (lo subrayado identifica la secuencia líder de SIM nativa)

mrdlpltsla lvlsalgall gtealraeep avgtsgliffr edldwppgsp qeplclvalg
 gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlatf gvcntdrqa alpslrrlga
 wlrpggqr1 vvlhleevtw eptpslrqfe pppggagpp lallvlypgp gpevtvtrag
 lpgaqslcps rdtrylvlav drpagawrgs glaltrqprg edsrlstarl qallfgddhr
 cftrmtpall llprsepapl pahgqltvf fpprpsael eesppsdapf letltrlvra
 lrpparasa prlalpdal agfpqqlvnl sdpaalerll dgeplllll rptaattgd

aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apllarllal cpggpgglgd
 plralllka lqqlrvewrg rdprgpgraq rsagataadg pcalreisvd lraersvlip
 etyqanncqq vcgwpqsdrn prynhvvl1 lkmqvrgaal arppccvpta yagkllisls
 eerisahhvpm nmvatecgcr

15

SEQ ID NO: 4 LR (559AA) - **rojo** indica secuencia líder de albúmina; **verde** identifica el sitio de escisión

modificado

```
mkwvtfisll flfssaysrg vfrr raeep avgtsglifr edldwppgsp qeplclvalg
gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlattf gvcntgdrqa alpslrrlga
wlrddpgggqr1 vvlhleevtw eptpslrfqe pppggagppe lallvlypgp gpevtvtrag
lpgaqlcps rdtrylvlav drpagawrgs glalqlqprg edsrlstarl qallfgddhr
cftrmtpall llprsepapl pahgqltvf fppprpsael eesppsadpf letltrlvra
lrvpparasa prlalpdal agfpqqlvnl sdpaalerll dgeeplllll rptaattgd
aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apollarllal cpapgpglgd
plralllka lqqlrvewrq rdprgpgraR rsagataadg pcalrelsvd lraersvlip
etyqanncqq vcgwpqsdrn prygnhvll lkmqvrgaal arppccvpta yagkllisls
eerisahhvp nmvatecgcr
```

5 SEQ ID NO: 5 LRF (567AA) etiqueta Flag destacada (DYKDDDDK)

```
mkwvtfisll flfssaysrg vfrr raeep avgtsglifr edldwppgsp qeplclvalg
gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlattf gvcntgdrqa alpslrrlga
wlrddpgggqr1 vvlhleevtw eptpslrfqe pppggagppe lallvlypgp gpevtvtrag
lpgaqlcps rdtrylvlav drpagawrgs glalqlqprg edsrlstarl qallfgddhr
cftrmtpall llprsepapl pahgqltvf fppprpsael eesppsadpf letltrlvra
lrvpparasa prlalpdal agfpqqlvnl sdpaalerll dgeeplllll rptaattgd
aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apollarllal cpapgpglgd
plralllka lqqlrvewrq rdprgpgraR rsDYKDDDDK agataadg pcalrelsvd
lraersvlip etyqanncqq vcgwpqsdrn prygnhvll lkmqvrgaal arppccvpta
yagkllisls eerisahhvp nmvatecgcr
```

SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de secuencia líder de ASH mkwvtfisll flfssaysrg vfrr

10

SEQ ID NO: 7: ácido nucleico de secuencia líder de ASH

```
ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTCA  
GCA
```

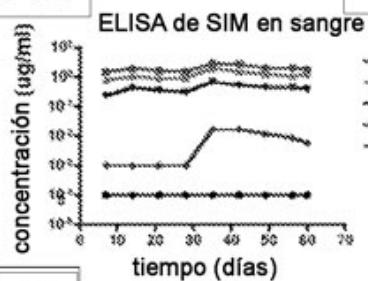
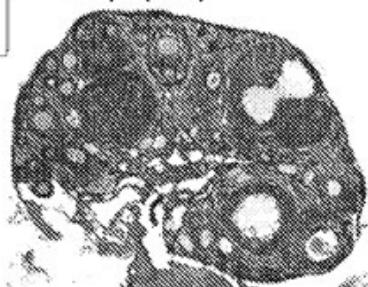
15 SEQ ID NO: 21 - secuencia de aminoácidos de etiqueta Flag DYKDDDDK

SEQ ID NO: 22 - secuencia de ácido nucleico de etiqueta Flag gactacaaggatgacgacgacaag

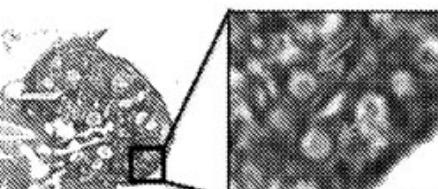
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una proteína variante de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) para su uso en conservar la reserva ovárica, o prevenir la disminución relacionada con la edad en los folículos ováricos primordiales que están reclutándose en un sujeto femenino, en la que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (WT-SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación, y en la que el sujeto femenino:
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- (a) padece cáncer y se tratará con, o está tratándose con, o se ha tratado con, un tratamiento contra el cáncer seleccionado de quimioterapia o radioterapia
- (b) padece, o está en riesgo de padecer, uno o más de: reserva ovárica disminuida (ROD), envejecimiento ovárico prematuro (EOP), endometriosis, síndrome del ovario poliquístico (SOP), mutaciones de FMR1, menos de 26 repeticiones GCC en FMR1, mutaciones de BRAC1, síndrome de Turner, una enfermedad autoinmunitaria, autoinmunidad tiroidea, autoinmunidad suprarrenal o síndromes poliglandulares autoinmunitarios.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína variante SIM comprende los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4 (LR-SIM), o los aminoácidos de 26-560 de SEQ ID NO: 3 (WT-SIM), en la que el residuo de aminoácido 450 de SEQ ID NO: 3 se cambia de Q a R, o un polipéptido que tiene al menos el 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4 (LR-SIM).
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína variante SIM es un homodímero que comprende dos monómeros, comprendiendo cada monómero (i) un dominio N-terminal de la proteína SIM recombinante que comprende los aminoácidos 26-451 de SEQ ID NO: 3 (SIM), en la que el residuo de aminoácido 450 de SEQ ID NO: 3 (SIM) se cambia de Q a R, y (ii) un dominio C-terminal de la proteína SIM recombinante que comprende los residuos de aminoácido 452-546 de SEQ ID NO: 3 (SIM), en la que, opcionalmente, el residuo de aminoácido 452 de SEQ ID NO: 3 se cambia de S a R.
4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína variante SIM se administra como administración continua o administración por parche transdérmico.
5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína variante SIM se administra en una cantidad eficaz suficiente para detener la foliculogénesis o mantener el ovario en un estado quiescente.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cantidad eficaz de proteína variante SIM es suficiente para dar como resultado cualquiera de los siguientes:
- a. una concentración de proteína SIM en la sangre del sujeto que es del 10% al 50% mayor en comparación con la ausencia de administración de la proteína variante SIM;
- 45 b. una concentración de proteína SIM en la sangre del sujeto que es del 50% al 100% mayor en comparación con la ausencia de administración de la proteína variante SIM;
- c. una concentración de proteína SIM en la sangre del sujeto que es de 2 a 5 veces mayor o más de 5 veces mayor en comparación con la ausencia de administración de la proteína variante SIM; o
- 50 d. una concentración de proteína SIM en la sangre del sujeto de entre 1 µg/ml y 5 µg/ml, o
- e. una detención completa de la foliculogénesis.
7. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sujeto femenino es un sujeto humano.
8. Método para la anticoncepción en un sujeto femenino que comprende administrar una composición que comprende una proteína variante de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM) o un ácido nucleico que codifica para dicha proteína variante de tipo sustancia inhibidora mülleriana (SIM), en el que la proteína variante SIM comprende los aminoácidos 26-560 de SEQ ID NO: 3 (SIM) con una modificación de al menos un aminoácido entre los residuos 448-452 de SEQ ID NO: 3 para aumentar la escisión en comparación con en ausencia de la modificación.
- 65 9. Método según la reivindicación 8, en el que la proteína variante SIM es al menos uno de:

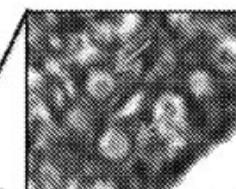
- a. los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4 (LR-SIM) o un polipéptido que tiene al menos el 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 25-559 de SEQ ID NO: 4 (LR-SIM); y/o
- 5 b. un homodímero que comprende dos monómeros, comprendiendo cada monómero (i) un dominio N-terminal de la proteína variante SIM que comprende los aminoácidos 26-451 de SEQ ID NO: 3 (SIM), en el que el residuo de aminoácido 450 de SEQ ID NO: 3 (SIM) se cambia de Q a R, y (ii) un dominio C-terminal de la proteína variante SIM que comprende los residuos de aminoácido 452-546 de SEQ ID NO: 3 (SIM), en el que, opcionalmente, el residuo de aminoácido 452 de SEQ ID NO: 3 se cambia de S a R.
- 10 10. Método según la reivindicación 9, en el que el ácido nucleico que codifica para la proteína variante SIM comprende SEQ ID NO: 1 (LR-SIM) o tiene al menos el 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 (LR-SIM), o comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos el 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 79-1680 de SEQ ID NO: 1, en el que los ácidos nucleicos 1-78 de
- 15 15. SEQ ID NO: 1 se reemplazan por la secuencia de ácido nucleico que codifica para las secuencias líder correspondientes a SEQ ID NO: 8-20.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el ácido nucleico que codifica para la proteína variante SIM está presente en un vector viral (por ejemplo, un vector adenoviral (Adv), un vector de
- 20 AAV, un vector de poxvirus y un vector lentiviral), en el que el ácido nucleico que codifica para la proteína variante SIM está unido operativamente a un promotor o promotor inducible.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el sujeto femenino es un animal o un animal cimarrón.
- 25

FIG. 1A**FIG. 1B****FIG. 1C**

GFP



LR-SIM



Folículos primordiales

FIG. 2

folículos/portaobjetos

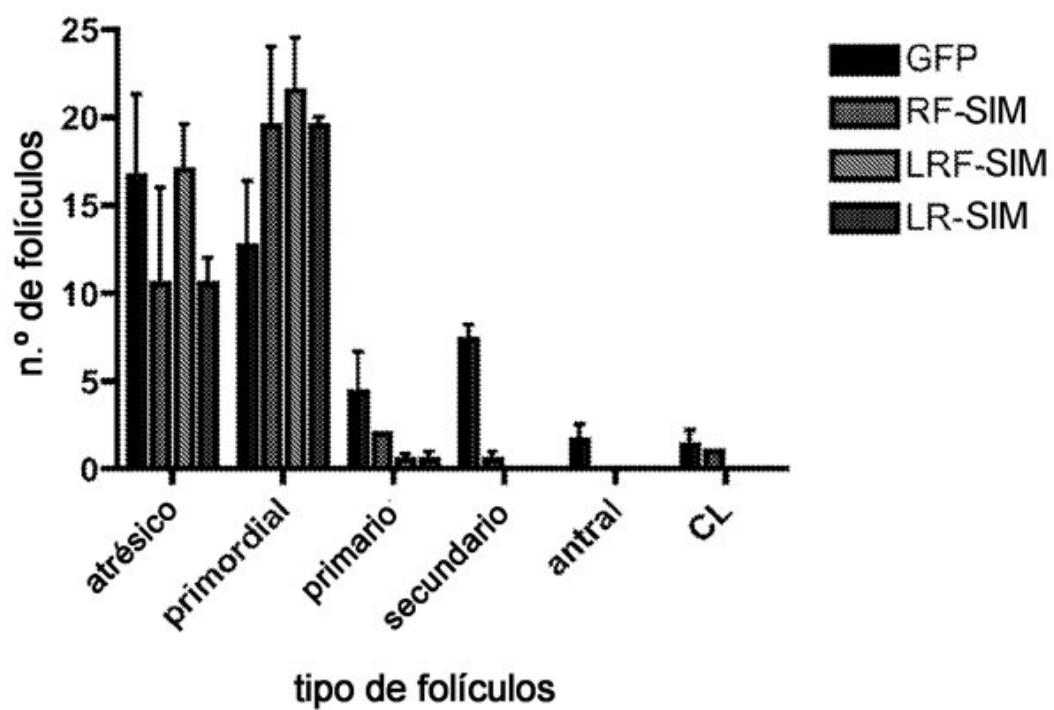


FIG. 3

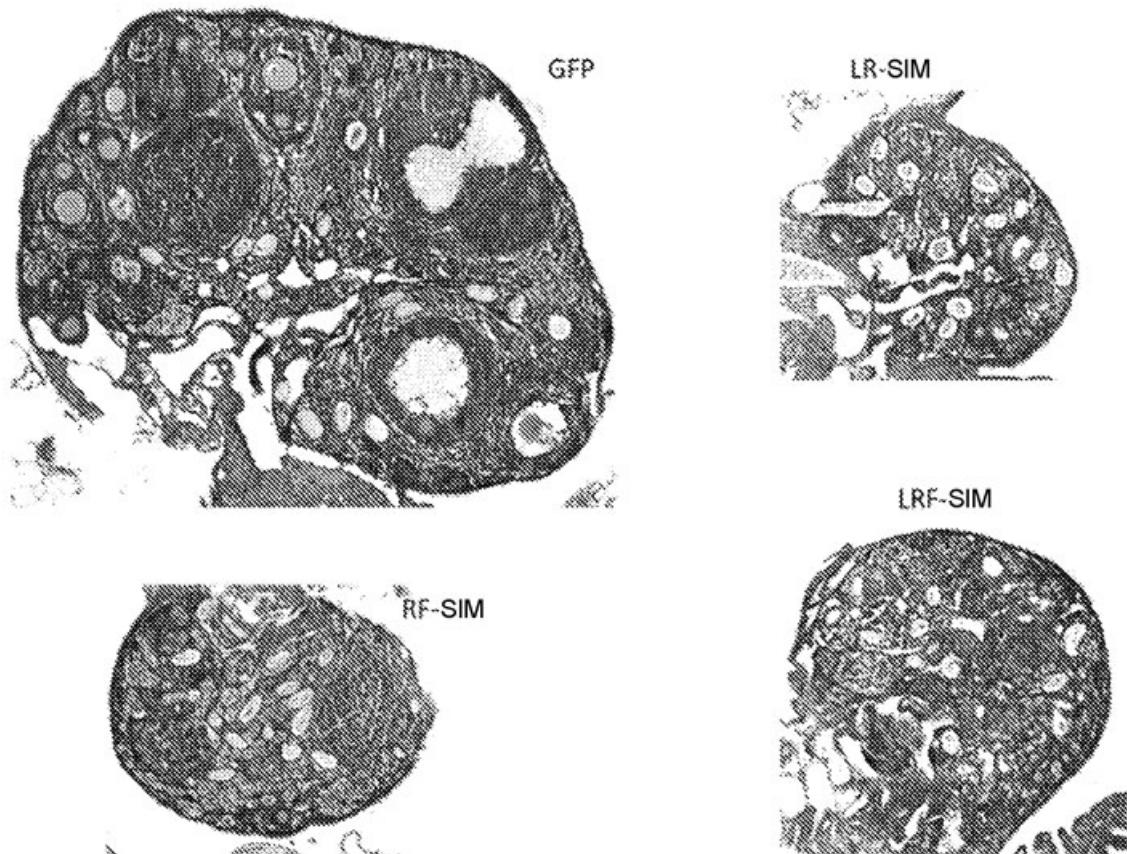


FIG. 4

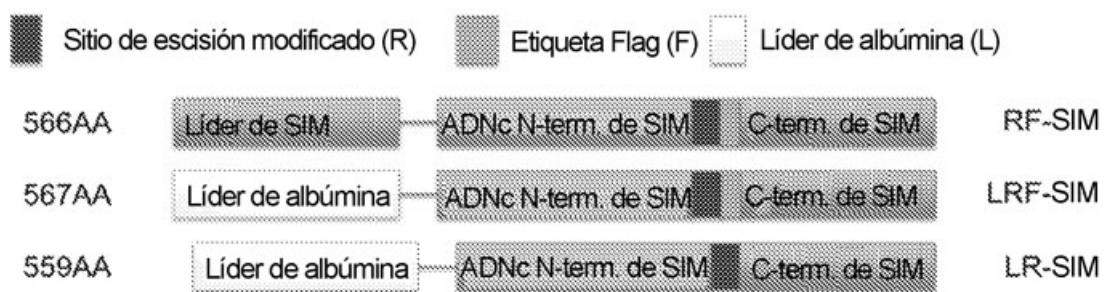


FIG. 5**SIM en suero**