

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 040**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/71** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2015 PCT/EP2015/052075**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2015 E 15702743 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 3102597**

54 Título: **Proteínas de fusión monoméricas solubles del receptor de tipo II de la hormona antimulleriana y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**03.02.2014 EP 14153715**

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

**05.07.2018**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**UNIVERSITE PARIS-SUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DI CLEMENTE, NATHALIE y**

**CATE, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 675 040 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

Proteínas de fusión monoméricas solubles del receptor de tipo II de la hormona antimülleriana y usos de las mismas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión del Receptor de tipo II de la Hormona Antimülleriana solubles monoméricas (AMHRII) y a usos de las mismas, en particular para la detección o cuantificación de la forma escindida bioactiva de la Hormona Antimülleriana en una muestra.

10

**Estado de la técnica**

La hormona antimülleriana (AMH), un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF) -beta, tiene un papel importante en el desarrollo reproductivo normal masculino y femenino[1]. Además, la AMH tiene aplicaciones clínicas en endocrinología reproductiva y potencialmente en oncología, que han centrado la atención en la vía de transducción de señales de la AMH, con el objetivo de identificar nuevos enfoques para la intervención terapéutica y el diagnóstico [2,3]. Al igual que otros miembros de la familia TGF-beta, la AMH señala mediante el ensamblaje de un complejo de los componentes de tipo I y de tipo II del receptor transmembrana de serina/treonina quinasa, dando como resultado la fosforilación y activación de la quinasa del receptor de tipo I por el dominio de quinasa constitutivamente activo del receptor de tipo II. El receptor de tipo I activado fosforila a continuación las proteínas citoplasmáticas Smad 1, 5 u 8, que migran al núcleo y, junto con otros factores de transcripción, regulan genes sensibles [4,5]. El AMHRII, el receptor de tipo II y la AMH, son mutuamente específicos, mientras que los ALK 2, 3 y 6 sirven como receptores de tipo I tanto para AMH como para los miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) [6,7]. La AMH se traduce como un precursor homodimérico, que contiene una pro-región N-terminal y un dominio maduro C-terminal más pequeño. El precursor se somete a una escisión obligatoria en sitios monobásicos entre los dos dominios, pero los homodímeros pro-región y C-terminal permanecen asociados en un complejo no covalente. A diferencia de otros ligandos de TGF- $\beta$ , el complejo no covalente se puede unir a AMHRII, que induce la disociación de la pro-región [8]. Se ha propuesto un mecanismo similar para el complejo no covalente BMP-7 [9]. Se presenta un modelo en la Figura 1, que muestra el procesamiento de AMH, el ensamblaje del complejo de señalización del receptor de AMH y la señalización intracelular.

En el embrión de vertebrados macho, la AMH es responsable de la regresión de los conductos de Müller, el anágeno del útero, las trompas de Falopio y la parte superior de la vagina. En el varón adulto, la AMH desempeña un papel en la diferenciación y función de las células de Leydig [10]. En mujeres, el papel de la AMH ha sido elucidado predominantemente en roedores, donde se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de folículos primordiales así como sobre la capacidad de respuesta de los folículos en crecimiento a la hormona folículoestimulante (FSH) [11,12]. La AMH se expresa en las células de Sertoli del testículo fetal y postnatal y en las células de la granulosa del ovario postnatal, mientras que AMHRII se expresa en las células mesenquimales que rodean el conducto de Muller (tanto en hombres como en mujeres), en las células de Sertoli, en las células de Leydig y en las células de la granulosa. La expresión de AMHRII persiste en el aparato reproductor femenino adulto y también se ha detectado en el sistema nervioso [13,14,15].

Además de su papel en la fisiología reproductiva normal, la AMH ahora se reconoce como un marcador clínico importante para diagnosticar y evaluar los trastornos reproductivos tanto en hombres como en mujeres. En varones, la AMH sérica se puede utilizar para evaluar la función de células de Sertoli en niños con estados intersexuales que pueden ayudar a distinguir entre los defectos de diferenciación sexual masculina causados por la determinación testicular anormal y aquellos resultantes de la alteración aislada de la secreción o acción de testosterona [16]. En mujeres, el nivel de AMH sérica es un marcador fiable para el tamaño del conjunto de folículos ováricos y un factor de predicción de la respuesta ovárica a la hiperestimulación ovárica controlada [17]. Además, Los niveles de AMH son 2-3 veces más altos en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP) y existe una correlación entre la gravedad de la enfermedad y los niveles de AMH [18]. Se ha sugerido que el aumento del crecimiento folicular, que ocurre durante las primeras etapas de SOP, puede deberse a una deficiencia de AMH [19], mientras que la detención folicular observada en etapas posteriores podría deberse a niveles excesivos de AMH [20].

La AMH y el AMHRII también han sido de interés en el campo de la oncología. El AMHRII se expresa en una serie de tumores y líneas celulares tumorales [3,21] y la AMH ha demostrado inhibir el crecimiento de algunos de estos tumores [3]. Además de desarrollar la AMH como potencial agente terapéutico [3], se ha sugerido que podrían generarse anticuerpos agonistas que se unen específicamente al AMHRII y desencadenan la regresión de tumores de ovario, al imitar la capacidad de la AMH para ensamblar un complejo de señalización de receptor activo [ 22]. Como alternativa, los anticuerpos contra el AMHRII podrían combinarse con toxinas para tratar cánceres que expresan el AMHRII [23,24].

Se han desarrollado diversos ensayos ELISA para detectar AMH y medir los niveles de AMH en fluidos corporales humanos [25-27]. La mayoría de estos ensayos, si no todos, emplean anticuerpos monoclonales (mAb) que detectan los dominios pro-región y maduros. Uno de los mAb se usa para capturar la AMH, mientras que el otro se biotinila y se usa para detectar la AMH capturada. Si bien estos ensayos son muy sensibles y pueden detectar AMH en niveles

bajos en fluidos corporales humanos, no distinguen entre AMH no escindida inactiva y el complejo AMH no covalente escindido activo. Hasta la fecha, por lo tanto, todas las mediciones de AMH hechas en muestras normales y de enfermedad han presentado niveles totales de AMH (es decir, AMH no escindida más AMH escindida bioactiva) y no han proporcionado información sobre el nivel de AMH que está activa.

5

### Objeto de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de fusión del Receptor de tipo II de la Hormona Antimülleriana solubles monoméricas (AMHRII) y a usos de las mismas, en particular para la detección o cuantificación de la forma escindida bioactiva de la Hormona Antimülleriana en una muestra. En particular, la presente invención está definida por las reivindicaciones.

10

### Descripción detallada de la invención

Se han desarrollado diversos ELISA para medir los niveles de hormona antimülleriana (AMH) en los fluidos corporales humanos, pero no distinguen entre AMH no escindida inactiva y AMH escindida bioactiva, que puede unirse al receptor de tipo II de AMH, AMHRII. Debido a que es posible que ciertas patologías puedan correlacionarse con el nivel de AMH activa, los inventores han desarrollado un ELISA que detecta AMH escindida bioactiva, mediante el uso de un nuevo receptor AMHRII soluble. Sorprendentemente han descubierto que cuando se sintetizan en las células el receptor soluble dimérico AMHRII-Fc y el AMHRII endógeno, tanto el AMHRII-Fc secretado como una porción de AMHRII celular contienen un(os) enlace(s) disulfuro intercatenario(s) que une(n) moléculas individuales en oligómeros de orden superior a través de sus dominios extracelulares. Además, sorprendentemente, han descubierto que cuando producen un receptor AMHRII soluble, AMHRII-Fc/Fc, que solo contiene un dominio extracelular y, por lo tanto, ningún enlace disulfuro intercatenario, este tiene una afinidad y estequiometría mayores para AMH que la proteína AMHRII-Fc dimérica. Esto indica que el enlace disulfuro compromete la capacidad de la proteína AMHRII-Fc dimérica y probablemente del AMHRII endógeno en las células para unirse a la AMH. Debido a que la proteína AMHRII-Fc/Fc tiene una mayor afinidad por la AMH, se ha podido usar para desarrollar un ELISA sensible para detectar AMH escindida bioactiva en suero humano. Estos resultados plantean el principio de que una "proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII" (es decir, una proteína que contiene solo un dominio extracelular del AMHRII) puede usarse para detectar la forma escindida bioactiva de la hormona antimülleriana (es decir, AMH escindida bioactiva) en una muestra, p.ej obtenida de un sujeto (incluidos seres humanos pero también otras especies de mamíferos).

15

20

25

30

35

40

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII en la que un dominio extracelular del AMHRII se fusiona con un polipéptido heterólogo, tal como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII tiene las siguientes características: la proteína es soluble en particular en fluidos biológicos, la proteína tiene la capacidad de unirse a AMH escindida bioactiva y la proteína contiene solo un dominio extracelular del AMHRII por molécula de proteína de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII se produce en una célula eucariota.

45

50

Como se usa en el presente documento, el "AMHRII" tiene su significado general en la técnica y se refiere al Receptor de Hormona Antimülleriana de tipo II (AMHRII). El término "AMHRII" incluye AMHRII de origen natural y variantes conservadoras de función del mismo. El AMHRII puede ser de cualquier fuente, pero normalmente es un AMHRII mamífero (por ejemplo, un primate humano y no humano, como un gato, perro, vaca, cabra, oveja...) y más particularmente un AMHRII humano. La secuencia de proteína del AMHRII y ácidos nucleicos para codificar tales proteínas son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, La Solicitud de acceso de UniProtKB N° Q16671 (SEQ ID NO: 1) proporciona la secuencia de aminoácidos completa del AMHRII de Homo sapiens. Sin embargo, debe entenderse que, como los expertos en la materia conocen la secuencia de estas moléculas, se puede usar cualquier proteína AMHRII o variante de secuencia génica siempre que tenga las propiedades de un AMHRII.

55

60

65

Las "variantes conservadoras de función" son aquellas en las que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación y función generales del polipéptido, que incluyen, pero sin limitación, sustitución de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (tal como, por ejemplo, la polaridad, el potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de manera que el porcentaje de proteína o la similitud de secuencia de aminoácidos entre dos proteínas cualquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99% según se determina de acuerdo con un esquema de alineación tal como mediante el Método de conglomerados, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de función" también incluye un polipéptido que tiene al menos el 60% de identidad de aminoácidos como se determina mediante algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos 80% e incluso más preferentemente al menos 90% y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o parental con la que se compara.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio extracelular del AMHRII" o "DEC del AMHRII" tiene

su significado general en la técnica y se refiere al dominio del AMRHII que se une a la forma activa de AMH. En particular, el dominio extracelular del AMRHII comprende la secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 18 hasta el resto en la posición 145 en la SEQ ID NO: 1 o una variante conservadora de función de la misma. La variante conservadora de función comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 18 hasta el resto en la posición 145 en la SEQ ID NO: 1. Más particularmente, la variante conservadora de función comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 18 hasta el resto en la posición 145 en la SEQ ID NO: 1. La capacidad de una variante para unirse a AMH escindida bioactiva puede evaluarse mediante cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas convencionales son experimentos de precipitación y experimentos ELISA como se describe en el presente documento más adelante en los procedimientos experimentales.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMRHII comprende un dominio extracelular del AMRHII que se fusiona directamente o mediante un espaciador en su extremo C-terminal con el extremo N-terminal del polipéptido heterólogo, o en su extremo N-terminal con el extremo C-terminal del polipéptido heterólogo. Como se usa en el presente documento, el término "directamente" significa que el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del polipéptido se fusiona con el (primero o el último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del polipéptido heterólogo. En otras palabras, en esta realización, el último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido está directamente unido por un enlace covalente al primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido heterólogo, o el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido está directamente unido por un enlace covalente al último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido heterólogo. Como se usa en el presente documento, el término "espaciador" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une el polipéptido de la invención al polipéptido heterólogo. Tal espaciador puede ser útil para evitar impedimentos estéricos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido heterólogo" se refiere a cualquier polipéptido que no es parte del AMRHII y que consiste en una "etiqueta" que puede usarse para detectar y/o inmovilizar la proteína de fusión monomérica soluble del AMRHII de la invención. "Etiqueta" significa cualquier polipéptido que facilita su asociación con otra molécula. Se desvela que el polipéptido heterólogo comprende dominios para la secuencia de reconocimiento de enzimas; para asociar moléculas no proteínicas tales como biotina o carbohidratos o cualquier otra modificación postraduccional de la proteína. Como un ejemplo no limitativo, las siguientes secuencias polipeptídicas pueden ser una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en una secuencia peptídica que acepta biotina (por ejemplo, péptido transportador de biotina carboxilo), péptido hexa-His, Strep-Tag, Strep-Tagil, FLAG, c-myc, hemaglutinina de influenza humana (HA), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína de unión a quitina, proteína de unión a calmodulina (CBP), dominio de unión a celulosa, S-tag, FIAsH, RsaA y otros tipos similares de secuencias peptídicas que tienen la capacidad de facilitar la asociación con otra molécula. Por ejemplo, las secuencias de péptidos que aceptan biotina se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5.723.584 expedida el 3 de marzo de 1998, en la patente de Estados Unidos N.º 5.874.239 expedida el 23 de febrero de 1999, en la patente de Estados Unidos N.º 5.932.433, expedida el 3 de agosto de 1999 y en la Patente de Estados Unidos N.º 6.265.552, expedida en julio de 2001. El polipéptido heterólogo se puede elegir de manera que se pueda generar un anticuerpo contra él. De acuerdo con la invención, el polipéptido heterólogo es un dominio Fc.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio Fc" tiene su significado general en la técnica y se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye dominios Fc de secuencia nativa y dominios Fc variantes. Normalmente, el dominio Fc de IgG consiste en los dominios de la región constante CH2 y CH3. Aunque los límites del dominio Fc de otras cadenas pesadas de inmunoglobulina pueden variar, el dominio Fc de la cadena pesada de IgG-1 humana se define habitualmente para que se extienda desde un resto de aminoácido en la posición 111 hasta el extremo carboxilo del mismo. En algunas realizaciones, el dominio Fc se obtiene de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de secuencia nativa. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc variante. En otra realización más, el dominio Fc es un dominio Fc funcional. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 104 hasta el resto en la posición 330 en la SEQ ID NO: 2 (UniProtKB Referencia P01857). Los restos 104 a 110 codifican parte de la región de bisagra, que conecta las regiones Fab y Fc y contiene dos cisteínas que forman enlaces disulfuro intercatenarios entre dos cadenas pesadas de IgG.

El dominio extracelular del AMRHII puede fusionarse al extremo N o al extremo C del dominio Fc. En algunas realizaciones, el extremo C-terminal del dominio extracelular del AMRHII se fusiona al extremo N-terminal del dominio Fc.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMRHII de la presente invención consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMRHII fusionado a un dominio Fc y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc en el que las cadenas se encuentran unidas por disulfuro dentro de sus dominios Fc.

La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se prepara de acuerdo con cualquier método bien conocido en la técnica. Normalmente, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII se prepara de forma recombinante transformando una célula hospedadora con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína.

5 En algunas realizaciones, cuando la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc en el que las cadenas se encuentran unidas por disulfuro dentro de sus dominios Fc, se puede preparar de acuerdo con el método descrito en el EJEMPLO. En resumen, una célula hospedadora se transforma con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para la primera cadena (es decir, la primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc) y con un vector codificante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para la segunda cadena ( es decir, la cadena que tiene un único dominio Fc). Se espera que se expresen 3 proteínas por la célula hospedadora: una proteína AMHRII-Fc dimérica, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención y una proteína Fc dimérica. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se puede purificar y aislar, a continuación, de acuerdo con cualquier método bien conocido en la técnica. Normalmente, se usa preferentemente una proporción de 1 vector que codifica la primera cadena por 1 vector que codifica la segunda cadena para la preparación de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención.

20 Normalmente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADNc.

25 Como se usa en el presente documento, Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

30 En algunas realizaciones, el vector es un vector bicistrónico que incluye las dos moléculas de ácido nucleico (es decir, la molécula de ácido nucleico que codifica la primera cadena y la molécula de ácido nucleico que codifica la segunda cadena).

35 Se puede usar cualquier vector de expresión para célula animal. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al., 1990), pAGE103 (Mizukami T et al., 1987), pHSG274 (Brady G et al., 1984), pKCR (O'Hare K et al., 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al., 1990) y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integradores, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares. Otros ejemplos de vectores virales incluyen adenovirus, retrovirus, herpes virus y vectores AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, Células PsiCRIP, Células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir tales virus recombinantes sin capacidad de replicación, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y US 94/19478. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para célula animal incluyen el promotor y potenciador temprano de SV40, promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia murina Moloney, promotor y potenciador de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

45 El término "transformación" significa la introducción de una molécula de ácido nucleico "extraña" (es decir, extrínseca o extracelular) en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese la molécula de ácido nucleico introducida para producir la sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha "transformado". De acuerdo con la invención, la célula hospedadora es una célula eucariota. Se podrían usar líneas celulares eucariotas típicas tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6, YB2/0 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones postraduccionales correctas de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención. Las células 293 c18 (también llamadas células 293E; ATCC número CRL-10852) expresan la proteína del antígeno nuclear 1 (EBNA1) del virus Epstein Barr (EBV) y son particularmente útiles para expresar genes en vectores que también contienen el origen de replicación del EBV (oriP).

60 Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula hospedadora transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica la primera cadena y con una molécula de ácido nucleico que codifica la segunda cadena. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se obtiene a continuación por la célula hospedadora de la invención y recuperando la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención expresada por la célula hospedadora, a partir del cultivo. La proteína de fusión soluble del AMHRII de la presente invención se purifica a continuación mediante procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención puede encontrar diversas aplicaciones.

5 En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención se usa para la detección y cuantificación de la forma escindida bioactiva de la hormona antimulleriana (AMH) (es decir, AMH escindida bioactiva) en una muestra.

10 Como se usa en el presente documento, el término "Hormona Antimulleriana" (AMH) corresponde a una hormona glicoproteica de 140 kDa. La AMH se sintetiza como un gran precursor con una secuencia señal corta seguida por la hormona pre-pro que forma homodímeros. Antes de la secreción, la hormona madura se somete a glucosilación y dimerización para producir un dímero de 140 kDa de subunidades monoméricas de 70 kDa unidas por disulfuro idénticas; cada monómero contiene un dominio N-terminal (también llamado región "pro") y un dominio C-terminal (también denominado región "madura"). "La AMH no escindida", como se usa en el presente documento, corresponde al dímero de 140 kDa de subunidades monoméricas de 70 kDa unidas por disulfuro idénticas; cada monómero contiene un dominio N-terminal (también llamado región "pro") y un dominio C-terminal (también denominado región "madura"). Aproximadamente el 10% de la AMH producida en células y secretada en el medio se escinde en sitios monobásicos para generar homodímeros N-terminal de 110 kDa y C-terminal de 25 kDa que permanecen asociados en un complejo no covalente. De este modo, "la AMH secretada", como se usa en el presente documento, contiene aproximadamente el 90% del homodímero de 140 kDa y aproximadamente el 10% del complejo no covalente escindido. "La AMH escindida bioactiva", como se usa en el presente documento, corresponde a los homodímeros N-terminal de 110 kDa y C-terminal de 25 kDa que permanecen asociados en un complejo no covalente, como se define en Pepinsky et al., 1988. "La AMH N-terminal", como se usa en el presente documento, corresponde al homodímero N-terminal de 110 kDa, como se define en Pepinsky et al., 1988. "La AMH C-terminal", como se usa en el presente documento, corresponde al homodímero C-terminal de 25 kDa, como se define en Pepinsky et al., 1988. Como se muestra en Pepinsky et al. 1988, la AMH no escindida se puede convertir en AMH escindida completamente bioactiva mediante tratamiento con la proteasa plasmina.

20 Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para detectar o cuantificar la presencia de la AMH escindida bioactiva en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención.

30 En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica, como extractos tisulares, lisados celulares o medio de cultivo, o es un fluido corporal como sangre completa, suero, plasma, fluido folicular, fluido seminal, fluido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva u orina. En una realización particular, la muestra es una muestra de suero, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de fluido folicular, una muestra de fluido seminal.

35 Normalmente, la detección o cuantificación de la AMH escindida bioactiva se consigue mediante cualquier método conocido en la técnica usando una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, técnicas convencionales de electroforesis e inmunodiagnóstico, tales como transferencia western, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayo en sándwich, ensayo inmunoradiométrico, reacción de precipitación de difusión de gel, ensayo de inmunodifusión, reacción de precipitación, ensayo de aglutinación (como ensayo de aglutinación en gel, ensayo de hemaglutinación, etc.), ensayo de fijación del complemento, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de proteína A, 45 ensayo de inmunoelectroforesis, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de exclusión por tamaño, afinidad en fase sólida, etc.

50 En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención comprende un marcador tal como un agente quimioluminiscente, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente o un radioisótopo. Los ejemplos de agente quimioluminiscente incluyen una enzima que produce una señal quimioluminiscente en presencia de un(os) sustrato(s) que produce(n) energía quimioluminiscente cuando reacciona(n) con la enzima. Los ejemplos de tal enzima incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Otros ejemplos de un agente quimioluminiscente incluyen un marcador quimioluminiscente directo no enzimático, como el sistema de éster de Acridinio. Los ejemplos de un agente colorimétrico incluyen una enzima tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y acetilcolinesterasa (AChE). Los ejemplos de agente de transferencia de energía incluyen quelatos de lantánidos fluorescentes. Los ejemplos de agentes fluorescentes incluyen colorantes fluorescentes. Los ejemplos de radioisótopos incluyen <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H. El marcador se puede acoplar directa o indirectamente mediante cualquier método conocido en la técnica.

60 En algunas realizaciones, la detección o cuantificación de la AMH escindida bioactiva en una muestra se logra con un soporte sólido en el que la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se inmoviliza en él (por ejemplo, se recubre directa o indirectamente en él). El soporte sólido puede estar en forma de placas, tubos de ensayo, perlas, micropartículas, papel de filtro, membrana, filtros de vidrio, partículas magnéticas, chips de vidrio o silicona u otros materiales conocidos en la técnica.

65 En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se

inmoviliza en el soporte cuando un anticuerpo recubierto en la superficie del soporte sólido se une al polipéptido heterólogo.

5 En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se inmoviliza directamente sobre el soporte por el polipéptido heterólogo (por ejemplo, un dominio Fc) que se encuentra recubierto en la superficie del soporte sólido.

10 En algunas realizaciones, el método para detectar o cuantificar la presencia de la AMH escindida bioactiva de la presente invención comprende la etapa de poner en contacto la muestra con una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII que consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc en donde las cadenas están unidas por disulfuro dentro de sus dominios Fc.

15 En dicha realización, el inmunoensayo de acuerdo con la invención puede implicar el uso de dicha proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención en combinación con un anticuerpo anti-AMH. Normalmente, el anticuerpo anti-AMH se usa para "detectar" la AMH y la proteína de fusión monomérica soluble de AMHRII se usa para "capturar" la AMH. Los ejemplos de dicho ensayo son experimentos ELISA como se describe en el presente documento a continuación en el EJEMPLO. En algunas realizaciones, la detección y cuantificación de AMH escindida bioactiva en una muestra se logran i) proporcionando un recubrimiento de soporte sólido con una cantidad de anticuerpos específicos para el dominio Fc de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-Fc de cabra como se describe en el EJEMPLO), ii) añadiendo una cantidad de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención, iii) poniendo la muestra que contiene AMH en contacto con el soporte sólido, iv) añadiendo una cantidad del anticuerpo anti-AMH que está conjugado a un primer marcador y v) agregando una cantidad de un compañero de unión que es específico para el marcador del anticuerpo AMH y que está conjugado con el segundo marcador. Mientras que la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII captura la AMH presente en la muestra, el anticuerpo anti-AMH se une a la AMH (es decir, para crear complejos "sándwich") y el compañero de unión conjugado con el segundo marcador se une al primer marcador conjugado con el anticuerpo anti-AMH. La medición de la cantidad de compañero de unión unido que es específico para el marcador del anticuerpo anti-AMH revela la cantidad de AMH presente en la muestra. Normalmente, el anticuerpo anti-AMH se dirige a un epítipo dirigido a la región C-terminal de la AMH, que no evita la interacción entre la AMH escindida bioactiva y el dominio extracelular de la proteína de fusión del AMHRII. Un ejemplo de tal anticuerpo incluye el mAAb 22A2 monoclonal de ratón. Normalmente, el primer marcador es biotina y el compañero de unión es por lo tanto estreptavidina. En algunas realizaciones, la estreptavidina se conjuga con HRP (peroxidasa de rábano picante). Normalmente, las etapas de lavado (con cualquier tampón apropiado tal como PBS con o sin un detergente no iónico) se realizan después de los pasos i), ii), iii), iv) y v). Normalmente, se realiza una etapa de bloqueo después de la etapa i) con un tampón que contiene BSA o leche y/o suero (de cabra o bovino) para bloquear la unión no específica de las proteínas añadidas en las etapas ii) a v).

40 Los métodos para la detección y cuantificación de AMH escindida bioactiva como se describe anteriormente son particularmente adecuados en ensayos de diagnóstico.

45 El método de diagnóstico de la invención se puede llevar a cabo con cualquier sujeto. Un "sujeto" es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano. Sin embargo, los métodos de diagnóstico de la invención también encuentran aplicaciones en el campo veterinario y pueden aplicarse a cualquier sujeto mamífero tal como un gato, perro, vaca, cabra, oveja... Los sujetos pueden ser hombres o mujeres y pueden ser de cualquier edad, incluidos los sujetos prenatales (es decir, en el útero), recién nacidos, lactantes, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos.

50 En particular, un objeto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico para determinar la fertilidad de un sujeto (es decir, un humano o no), para predecir la tasa de éxito de la hiperestimulación ovárica controlada, para diagnosticar trastornos intersexuales como insensibilidad a andrógenos y disgenesia gonadal, para evaluar la pubertad masculina ( en particular para niños que padecen pubertad precoz) o para diagnosticar y/o controlar la presencia de un cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método cuantificar la AMH escindida bioactiva en una muestra obtenida de dicho sujeto, como se describe anteriormente en el presente documento.

55 En alguna realización, el método de diagnóstico está destinado a diagnosticar y/o controlar la presencia de un cáncer en un sujeto. Normalmente, el cáncer es un cáncer de receptor de AMH tipo II y/o cáncer que expresa AMH. En algunas realizaciones, el método está destinado a diagnosticar y/o controlar un cáncer, dicho cáncer es una neoplasia que proviene de tumores de células de la granulosa, un cáncer de ovario, un cáncer de mama, un cáncer de útero o un cáncer de próstata. En una realización particular, el cáncer es un cáncer de ovario que proviene de tumores de células de la granulosa. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer testicular.

65 En alguna realización, el método de diagnóstico está destinado a determinar la fertilidad de un sujeto. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico de la invención está destinado a determinar la fertilidad de un sujeto femenino. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico de la invención está destinado a determinar la fertilidad de un sujeto masculino.

En algunas realizaciones, el método de diagnóstico está destinado para predecir la tasa de éxito de la hiperestimulación ovárica controlada. La hiperestimulación ovárica controlada es una técnica utilizada en la reproducción asistida que implica el uso de medicamentos de fertilidad para inducir la ovulación por múltiples folículos ováricos. Normalmente, la hiperestimulación ovárica controlada consiste en la administración de un principio activo seleccionado del grupo que consiste en agonistas o antagonistas de GnRH asociados con la hormona foliculoestimulante recombinante (FSH) o la gonadotropina coriónica humana (hCGH).

En alguna realización, el método de diagnóstico es particularmente adecuado en ensayos de diagnóstico para trastornos intersexuales como la insensibilidad a los andrógenos o en ensayos de diagnóstico para el hipogonadismo hipogonadotrópico. El método también es particularmente adecuado para la evaluación de problemas con la pubertad masculina, en particular para niños que padecen disgenesia gonadal.

Otro objeto de la invención es un método para diagnosticar el síndrome del conducto Müllero persistente (PMDS) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método cuantificar la AMH escindida bioactiva en una muestra obtenida de dicho sujeto, como se describe anteriormente en el presente documento. Por lo general, el método es para diagnosticar el PMDS causado por una mutación en el gen AMH.

De acuerdo con la invención, el método de diagnóstico para determinar la fertilidad de un sujeto o para diagnosticar y/o controlar la presencia de un cáncer o para diagnosticar el PMDS en un sujeto que lo necesita, comprende los pasos de i) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto, ii) poner en contacto la muestra con una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención como se define anteriormente en el presente documento en condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII y la AMH escindida bioactiva presente en la muestra, iii) cuantificar la cantidad de complejos formados para determinar la cantidad de AMH escindida bioactiva presente en la muestra y iv) correlacionar la cantidad de AMH escindida bioactiva con la determinación de la fertilidad de un sujeto o con el diagnóstico y/o el control de un cáncer o con el diagnóstico de PMDS en un sujeto.

La cantidad de AMH escindida bioactiva cuantificada puede compararse, por lo tanto, con un valor de referencia predeterminado que es, por ejemplo, la cantidad correspondiente detectada en las muestras de sujetos control, o en muestras anteriores obtenidas del sujeto. En algunas realizaciones, los valores de referencia predeterminados se refieren a la cantidad de al menos una de las formas biológicas de AMH que puede determinarse por el método de la invención en un sujeto que no ha sido diagnosticado de un cáncer o en un sujeto que se considera fértil o en un sujeto que no ha sido diagnosticado de PMDS. Normalmente, una mayor cantidad de AMH total en una muestra que el valor de referencia predeterminado es indicativo de la fertilidad de un sujeto, mientras que una cantidad menor que el valor de referencia predeterminado es un marcador de infertilidad. La capacidad de medir la AMH escindida bioactiva por el método de la invención puede permitir que estas correlaciones y evaluaciones sean más precisas. Una mayor cantidad de AMH total en una muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado es indicativo de la presencia de un cáncer. La cuantificación de la cantidad de AMH escindida bioactiva también es de interés para controlar, por ejemplo, la eficacia de la cirugía y la recurrencia del cáncer. Por lo tanto, los niveles séricos de AMH generalmente se normalizan unos días después de la cirugía, por lo que los niveles persistentes de AMH son indicativos de cáncer residual. Normalmente; una menor cantidad de AMH total en una muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado es indicativo de la presencia de PMDS. De nuevo, la capacidad de medir la AMH escindida bioactiva por el método de la invención puede permitir mejor control y/o diagnóstico de cáncer y PMDS.

Otro objeto de la invención es un kit para uso en el método de la invención como se describe anteriormente en el presente documento que comprende una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención.

En algunas realizaciones, el kit comprende una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII que consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc en el que las cadenas se encuentran unidas por disulfuro dentro de sus dominios Fc. En dichas realizaciones, el kit de la presente invención también comprende un anticuerpo anti-AMH. Normalmente, el anticuerpo anti-AMH se dirige a un epítipo dirigido a la región C-terminal de la AMH, que no evita la interacción entre la AMH escindida bioactiva y el dominio extracelular de la proteína de fusión del AMHRII. Un ejemplo de tal anticuerpo incluye el mAb 22A2 monoclonal de ratón. Normalmente, el anticuerpo anti-AMH está marcado con biotina. En algunas realizaciones, el kit de la presente invención comprende i) una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención, ii) un anticuerpo anti-AMH marcado con biotina como se describe anteriormente, iii) un soporte sólido recubierto con anticuerpos anti-dominio Fc (por ejemplo, anticuerpos anti-Fc de cabra) y iv) un compañero de unión estreptavidina conjugada con HRP.

El kit también puede contener componentes adicionales opcionales para realizar el método de la invención. Dichos componentes opcionales son, por ejemplo, envases, mezclas, tampones, instrucciones para llevar a cabo el ensayo, marcadores, soportes y cualquier reactivo adicional para llevar a cabo el método. Otro componente opcional es AMH escindida bioactiva recombinante para generar curvas patrón.

La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención puede encontrar aplicaciones terapéuticas. En particular, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII puede representar un receptor señuelo que puede atrapar la AMH escindida bioactiva circulante y por lo tanto actúa como un antagonista de AMH. En algunas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc en el que las cadenas se encuentran unidas por disulfuro dentro de sus dominios Fc.

En particular, se puede usar la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención para mejorar la fertilidad femenina y/o para tratar trastornos de infertilidad femenina y/o para mejorar o tratar la infertilidad masculina. Como se usa en el presente documento, la expresión "mejorar la fertilidad femenina" generalmente se refiere a aumentar las posibilidades de concepción. Por ejemplo, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención es adecuada para mejorar la tasa de éxito de la hiperestimulación ovárica controlada. Normalmente, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención ejerce su efecto al aumentar el reclutamiento de folículos primordiales, pero también al aumentar la sensibilidad de los folículos a FSH. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención también puede encontrar aplicación en técnicas de preservación de la fertilidad en pacientes con cáncer basado en la criopreservación de tejido ovárico.

Los sujetos que pueden recibir un tratamiento para mejorar la fertilidad pueden ser hembras de cualquier especie de mamífero, incluyendo seres humanos. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se administra a una mujer y en particular a una mujer durante sus años reproductivos. En otras realizaciones, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se administra a un animal domesticado hembra (por ejemplo, ganado bovino, ovejas, cabras, caballos y similares) o a una hembra de animal de compañía (por ejemplo, perro, gato, y similares).

Normalmente la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se administra a un sujeto en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que es suficiente para cumplir su propósito previsto. La cantidad exacta de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención que se administrará variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, sexo, peso y estado general de salud del sujeto a tratar, la respuesta biológica o médica deseada (por ejemplo, reclutamiento de folículos primordiales, mejora de la fertilidad femenina, y similares). En muchas realizaciones, una cantidad efectiva es aquella que aumenta el reclutamiento de folículos primordiales.

Normalmente, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención (opcionalmente después de la formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados), en una dosificación deseada, se administra a un sujeto que lo necesita mediante cualquier ruta adecuada. Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención que incluyen comprimidos, cápsulas, soluciones inyectables, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc. Los métodos de administración incluyen la administración intravenosa de una composición líquida, la administración transdérmica de una formulación líquida o sólida, la administración tópica oral o la administración intersticial o interoperatoria. La administración puede verse afectada por la implantación de un dispositivo cuya función primaria puede no ser un vehículo de administración de fármacos. La administración también puede realizarse mediante incubación en una muestra *ex vivo* (por ejemplo, biopsia ovárica).

Como se menciona anteriormente, la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención se administra per se o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la presente invención y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### Descripción de las figuras

**Figura 1. Modelo que muestra el procesamiento de la AMH, el ensamblaje del complejo de señalización del receptor de AMH y la señalización intracelular.**

**Figura 2. Diagrama esquemático que muestra IgG, AMHRII y la proteína de fusión AMHRII-Fc.** DEC: dominio extracelular. TM: dominio transmembrana. El análisis por SDS-PAGE de la proteína de fusión AMHRII-Fc se analizó en condiciones reductoras y no reductoras y se detectó mediante tinción con azul de Coomassie.

**Figura 3. Diagrama esquemático que muestra una estrategia para generar una forma monomérica del DEC del AMHRII.** Un sitio de escisión para la endoproteinasa LysC se encuentra muy cerca de la unión del DEC del AMHRII y el dominio Fc. En este punto, no se sabía que los DEC estaban conectados covalentemente por un(os) enlace(s) disulfuro.

**Figura 4. Análisis por SDS-PAGE de AMHRII-Fc digerida con endoproteinasa LysC.** Después de la digestión con LysC, las proteínas que contenían Fc se eliminaron con Proteína A Sefarosa. El DEC funcionó como un dímero con un PM de alrededor de 42 kDa antes de la reducción y como un monómero con un PM de alrededor de 23 kDa después de la reducción, lo que indica que los DEC estaban unidos covalentemente mediante un enlace disulfuro, como se muestra en el diagrama esquemático.

**Figura 5. Diagrama esquemático que muestra otra estrategia para generar una versión monomérica del DEC del AMHRII.** Un vector de expresión (pRLC010-1) que contiene un ADNc que codifica la proteína de fusión AMHRII-Fc se coexpresó con otro vector de expresión (pEAG1423) que contiene un ADNc que codifica una secuencia señal y los dominios bisagra, CH2, CH3 de IgG1 humana en células 293E. Se muestran las tres proteínas que se espera que sean producidas por las células transfectadas.

**Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de células 293E transfectadas con vectores que contienen ADNc de AMHRII-Fc y de Fc en diversas proporciones.** Se detectaron la proteína de fusión dimérica AMHRII-Fc, la proteína Fc dimérica y la proteína heterodimérica AMHRII-Fc/Fc.

**Figura 7. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la Proteína A Sefarosa y las columnas de cromatografía de exclusión por tamaño utilizadas para purificar la proteína de fusión AMHRII-Fc/Fc.**

**Figura 8. AMHRII-Fc se une al mAb 13H8 anti-AMHRII con una mayor afinidad y estequiometría que AMHRII-Fc/Fc.** El esquema muestra la configuración del ELISA usada para evaluar la unión de mAb 13H8 a AMHRII-Fc y a AMHRII-Fc/Fc. (El esquema solo está destinado a mostrar los pasos para el ELISA y no debe interpretarse que implica interacciones monovalentes o bivalentes). Se capturaron los receptores solubles a diversas concentraciones mediante un anticuerpo Fc antihumano de cabra recubierto en la placa ELISA, se incubaron con mAb 13H8 y se detectó 13H8 unido con un anticuerpo Fc anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

**Figura 9. AMHRII-Fc/Fc se une a AMH escindida bioactiva con una mayor afinidad y estequiometría que AMHRII-Fc.** El esquema muestra la configuración del ELISA usada para evaluar la unión de AMH a AMHRII-Fc y a AMHRII-Fc/Fc. Se capturaron los receptores solubles a diversas concentraciones mediante un anticuerpo Fc anti-humano de cabra recubierto en la placa ELISA, se incubaron con AMH escindida bioactiva y se detectó AMH escindida bioactiva unida con un mAb de AMH anti-C-terminal (22A2) y con un anticuerpo Fc anti-ratón de cabra conjugado con HRP. Se analizaron dos preparaciones diferentes de AMHRII-Fc/Fc.

**Figura 10. AMHR-Fc (D) y AMHR-Fc (M) muestran un comportamiento de unión similar a la AMH escindida cuando se presentan en solución.** El esquema muestra la configuración del ELISA utilizada para evaluar la unión de receptores solubles a AMH escindida bioactiva capturada en mAb 22A2 de AMH anti-C-terminal.

**Figura 11. Desarrollo de un ELISA sensible para AMH escindida activa utilizando un nuevo receptor de tipo II soluble de alta afinidad.** A) El diagrama esquemático muestra los formatos del ELISA usados para detectar la AMH escindida con los dos receptores solubles. Se capturó AMHRII-Fc o AMHRII-Fc/Fc (1 µg/ml) en un anticuerpo Fc anti-humano de cabra recubierto en la placa ELISA y se incubó con AMH escindida a diversas concentraciones. Se detectó la AMH escindida unida con un mAb biotinilado anti-C-terminal (22A2) y estreptavidina conjugada con HRP. B) AMHRII-Fc/Fc mostró una señal más alta que AMHRII-Fc en todas las concentraciones de AMH escindida ensayadas. El recuadro muestra que las respuestas son lineales en el intervalo de 1 a 10 ng/ml. Los puntos de datos son promedios de seis réplicas. C) Tres lotes diferentes de AMHRII-Fc/Fc purificado por cromatografía de exclusión por tamaño mostraron respuestas similares en el ELISA. El recuadro muestra el análisis por SDS-PAGE de los tres lotes en condiciones no reductoras después de la tinción con azul de Coomassie. Los puntos de datos son promedios de seis réplicas. D) La AMH escindida diluida en suero humano podría detectarse con alta sensibilidad con el ELISA que emplea el receptor AMHRII-Fc/Fc. Se diluyó la AMH escindida en tampón de ensayo (PBS que contenía BSA al 1% y suero de cabra al 1%) o suero humano (que contenía AMH escindida no detectable o no escindida) a 100 ng/ml y se diluyó en la placa dos veces con tampón de ensayo. La sensibilidad del ensayo todavía estaba en el intervalo de 1 a 10 ng/ml; el recuadro muestra que la respuesta fue lineal en este intervalo. Como control negativo, se sustituyó la AMHRII-Fc (3 µg/ml) por AMHRII-Fc/Fc tratada con meta-peryodato de sodio y que ya no es capaz de unirse a AMH escindida. Los puntos de datos son promedios de dos réplicas.

**Figura 12. El cAMH-ELISA no detecta AMH no escindida.** A) El diagrama esquemático muestra el formato del ELISA para detectar tanto AMH escindida como no escindida (total). Se capturó AMH en un mAb AMH anti-N-terminal (10.6) y se detectó con un mAb biotinilado anti-C-terminal (22A2) y estreptavidina conjugada con HRP. B) El ELISA para AMH total detectó AMH escindida y no escindida con similar sensibilidad. C) El diagrama esquemático que muestra el formato cAMH-ELISA se explica en la leyenda de la Figura 2A. D) Solamente se detectó AMH escindida con el cAMH-ELISA; el recuadro muestra que la respuesta a AMH escindida fue lineal en el intervalo de 1 a 10 ng/ml. Para ambos ELISA, se diluyeron AMH escindida y no escindida en suero humano a 100 ng/ml y se diluyeron dos veces en la placa con tampón de ensayo. Los puntos de datos son promedios de

dos réplicas.

**Figura 13. Medición de niveles de AMH escindida y el nivel de escisión de AMH en muestras que contienen una mezcla de AMH escindida y no escindida.**

Se prepararon seis muestras que contenían niveles variables de AMH escindida y no escindida en suero humano al 90% y se midió la AMH total usando ELISA para AMH total (Figura 3A) o se midió la AMH escindida usando el cAMH-ELISA (Figura 3B). Los niveles reales de AMH total y escindida en cada muestra se recalcularon usando los valores determinados experimentalmente para AMH total en las muestras Control 0 (0% escindida) y Control 100 (100% escindida), que contenían únicamente AMH no escindida o escindida, respectivamente. A) Valores experimentales frente a valores reales para AMH total en las seis muestras. B) Valores experimentales frente a valores reales para la AMH escindida en las seis muestras. C) Valores experimentales frente a valores reales para el nivel de escisión de AMH en las seis muestras. El nivel de escisión de AMH (experimental y real) en cada muestra se calculó dividiendo el nivel de AMH escindida entre el nivel de AMH total en esa muestra (experimental y real). Los valores experimentales que se muestran en A son los promedios de seis puntos de datos; los valores experimentales que se muestran en B son los promedios de N puntos de datos indicados por encima de la barra.

**Figura 14. Caracterización de AMH en muestras de pacientes mediante análisis bioquímico.**

Se capturó AMH en el fluido folicular del paciente con un mAb de AMH anti-N-terminal (10.6) conjugado con Sefarosa, se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, seguido de transferencia western usando un Ac policlonal anti-AMH (L44). Se hizo migrar AMH no escindida y escindida como controles para permitir la identificación del precursor de AMH no escindida y la pro-región N-terminal producida después de la escisión. La banda que migra justo debajo de la banda pro-región es la cadena pesada de IgG humana, que es detectada por el anticuerpo Fc anti-conejo secundario. El nivel de escisión de AMH en las muestras de pacientes se estimó a partir de las intensidades del precursor de AMH no escindida y las bandas pro-región N-terminal.

### Ejemplo

#### Métodos:

**Digestión de AMHR11-Fc con Endoproteinasa LysC.** La AMHR11-Fc, mostrada en la Figura 2, fue preparada como se describe anteriormente [8]. Para separar los dominios DEC y Fc, se incubaron 487 µg de AMHR11-Fc con 0,65 µg de endoproteinasa LysC en un volumen de 1 ml durante 60 min a 37°C y 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 20 µl de leupeptina 2 mM para detener la digestión, seguido de 200 µl de Proteína A Sefarosa (50% suspensión en PBS) y se agitó el tubo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación para eliminar el dominio Fc unido a la resina, se recogió el sobrenadante y se estimó la proteína del DEC del AMHR11 recuperada en 120 µg, según se determinó por SDS-PAGE. Para reducir la proteína del DEC del AMHR11, se incubaron 60 µg de proteína del DEC del AMHR11 con TCEP 0,1 mM en un volumen de 606 µl durante 60 minutos a 37°C. Se añadió NEM a 1 mM para inactivar la reacción y se añadió Tris (pH 7,4) a 10 mM. Las proteínas se almacenaron a -80°C.

**Producción y purificación de AMHR11-Fc/Fc.** Se generó una proteína de fusión monomérica soluble del AMHR11, AMHR11-Fc/Fc, que contiene una cadena AMHR11-Fc y una cadena Fc que están unidas por disulfuro dentro de los dominios Fc (Figura 5). Un vector de expresión (pRLC010-1) que contiene un ADNc que codifica la proteína de fusión AMHR11-Fc se coexpresó con otro vector de expresión (pEAG1423) que contiene un ADNc que codifica una secuencia señal y los dominios bisagra, CH2, CH3 de IgG1 humana en células 293E. Ambos vectores contienen el origen de replicación del EBV (oriP), que les permite replicarse episómicamente en células 293E, debido a la expresión de la proteína EBNA1.

En experimentos piloto, se usaron diferentes relaciones de los dos vectores para evaluar las condiciones óptimas para producir la proteína AMHR11-Fc/Fc. Se transfectaron células 293E (sembradas en placas de 6 pocillos 24 horas antes; 9,6 cm<sup>2</sup> de área de cultivo/pocillo) con un total de 2 µg de ADN de los dos plásmidos en diversas proporciones como se muestra en la Figura 6 o solamente con el plásmido pRLC010-1 que expresa la proteína de fusión AMHR11-Fc. Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células se colocaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 2 días a 37°C. Se recolectó el medio condicionado (1,5 ml) de los pocillos, se añadieron 40 µl de Proteína A Sefarosa (suspensión al 50% en PBS) y se agitaron los tubos durante 40 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la proteína se eluyó de la resina mediante la adición de 30 µl de tampón de muestra no reductor 2X y calentando a 65°C durante 10 min. Las proteínas eluidas se sometieron a SDS-PAGE (gel de gradiente del 4-20%) en condiciones no reductoras y se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie.

En la transfección a gran escala, se sembraron las células 293E en 4 matraces triples (500 cm<sup>2</sup> de área de cultivo/matraz triple; 100 ml de medio/ matraz triple) y se transfectaron con un total de 400 µg de los plásmidos pRLC010-1 y pEAG1423 (en una proporción 1:1) usando lipofectamine 2000 como se describe anteriormente. El medio condicionado se recogió cada 2 días durante los siguientes 12 días. Para recuperar las proteínas que contienen Fc, se cargaron 2 litros de medio acondicionado en una columna de 2 ml de Proteína A Sefarosa durante la noche por gravedad. Se lavó la columna con PBS (6 x 1,5 ml), seguido de NaFosfato 25 mM (pH 5,5), NaCl 100 mM (6 x 1,5 ml). Se eluyeron las proteínas que contenían Fc con NaFosfato 25 mM (pH 2,8), NaCl 100 mM. Se

recogieron y neutralizaron fracciones de 0,5 ml mediante la adición de 25 µl de NaFosfato 0,5 M (pH 8,6). Se analizaron las fracciones obteniendo espectros de absorción de 240 a 320 nm y mediante SDS-PAGE. Se resolvieron adicionalmente las fracciones individuales de la columna de Proteína A Sefarosa por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), usando un sistema de cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) y una columna Superdex 200. Se cargaron en la columna 0,25 ml de la fracción n.º 6 de la columna de Proteína A Sefarosa, que contenía 2,55 mg de proteína, eluída con PBS a razón de 20 ml/h, y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se analizaron las fracciones como se describe anteriormente. Se almacenaron todas las fracciones a -80°C.

*ELISA.* Las proteínas AMH y los mAb anti-AMH se describen previamente [8,25]. El ELISA para detectar AMH total (escindida y no escindida) en suero humano empleó un mAb anti-pro-región recubierto en la placa (ya sea mAb 10.6 o 11F8) para capturar la AMH y un mAb de AMH biotinilado anti-C-terminal (mAb 22A2) para detectar la AMH capturada. Este ensayo es similar a los que se han publicado previamente [25-27]. Se ha descrito previamente el ELISA para medir el receptor de AMHRII soluble que se une a AMH escindida bioactivo capturada en un mAb de AMH anti-C-terminal (22A2; recubierto en una placa de ELISA)[8].

Para comparar las propiedades de las proteínas de fusión AMHRII-Fc dimérica y AMHRII-Fc/Fc monomérica para la unión de AMH escindida bioactiva, se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorp) con un anticuerpo Fc antihumano de cabra (Jackson ImmunoResearch; catálogo n.º 109-005-098) durante la noche a 4°C en bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,6 (10 µg/ml; 50 µl/pocillo). Las placas se lavaron cinco veces con agua y a continuación se bloquearon durante 1-2 horas a temperatura ambiente usando 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo que contenía BSA al 1% (Sigma; A-7906) y suero de cabra al 1% (Invitrogen; 16210064) en PBS. Este tampón se usó para todas las diluciones posteriores. Se descartó el tampón de bloqueo y las proteínas de fusión del receptor se diluyeron en serie en la placa en un factor de tres. Las placas se incubaron durante 1 hora, seguido de cinco lavados con PBS. Se añadieron 50 µl de AMH escindida bioactiva a cada pocillo a una concentración de 1 µg/ml y se incubaron durante 2 h. Las placas se lavaron cinco veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. Se añadió mAb de AMH anti-C-terminal 22A2 de ratón a una concentración de 1 µg/ml y las placas se incubaron durante 1 h. Después de cinco lavados con PBS/Tween-20 al 0,05%, se añadió Fc anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:3000 y se incubaron las placas durante 1 h. Después de cinco lavados con PBS/Tween-20 al 0,05%, se añadieron 50 µl de sustrato de TMB a cada pocillo. Se inactivaron las reacciones mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2M y se leyeron las absorbancias a 450 nm.

Para comparar las propiedades de las proteínas de fusión AMHRII-Fc dimérica y AMHRII-Fc/Fc monomérica para la unión de mAb 13H8 anti-AMHRII de ratón, las condiciones fueron como las descritas anteriormente, excepto por los siguientes cambios. Después de la incubación con las proteínas de fusión del receptor y los lavados posteriores con PBS, se añadió mAb 13H8 a una concentración de 1 µg/ml y se incubaron las placas durante 1 hora. Después de cinco lavados con PBS/Tween-20 al 0,05%, se añadió Fc anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) y las placas se desarrollaron como se describe anteriormente.

Para medir el nivel de AMH escindida bioactiva, ya sea diluida en suero humano o en suero del paciente, las condiciones fueron las descritas anteriormente para la detección de AMH escindida bioactiva excepto por los siguientes cambios. Después de la "etapa de bloqueo, se añadió la proteína AMHRII-Fc/Fc a los pocillos a una concentración de 3 µg/ml (34 nM) y se incubó durante 1 h. Después de cinco lavados con PBS, las muestras de AMH escindida bioactiva (diluidas en tampón BSA o suero humano) o las muestras de pacientes se diluyeron en serie en la placa en un factor de dos y se incubaron las placas durante 2 h. Después de cinco lavados con PBS/Tween-20 al 0,05%, se añadió mAb de AMH anti-C-terminal 22A2 de ratón a una concentración de 1 µg/ml y las placas se incubaron durante 1 h. Después de cinco lavados con PBS/Tween-20 al 0,05%, se añadió estreptavidina conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:3000 y se incubaron las placas durante 1 h y se desarrollaron como se describe anteriormente. Como control negativo, se usó AMHRII-Fc, que se había tratado con meta-peryodato de sodio, en lugar de AMHRII-Fc/Fc a una concentración de 3 µg/ml. La AMHRII-Fc tratada con peryodato es casi completamente inactiva en la unión de AMH escindida bioactiva.

### **Resultados:**

*AMHRII-Fc contiene un(os) enlace(s) disulfuro intercatenario entre los DEC monómeros del AMHRII.* Con el fin de obtener una medición precisa de la afinidad de AMHRII por AMH escindida bioactiva, se quería hacer una forma monomérica de AMHRII. Como se muestra en la figura 2, la proteína de fusión AMHRII-Fc que se fabricó hace varios años es dimérica, debido a enlaces disulfuro intercatenarios entre dos dominios Fc. Por lo tanto, cada molécula de proteína de fusión contiene dos dominios extracelulares (DEC). El análisis de gel en la Figura 2 confirma que AMHRII-Fc consiste principalmente de dímero y una cantidad menor de tetrámero y oligómeros de orden superior. La presencia de dos dominios DEC puede dificultar la medición de la afinidad de AMHRII-Fc por AMH, porque puede haber un aumento en la afinidad aparente por AMH debido a un efecto de avididad, que es la fuerza acumulada de las interacciones de unión individuales.

Para generar una versión monomérica del DEC del AMHRII, se digirió AMHRII-Fc con endoproteinasas LysC, que se escinde después de las lisinas y se ha utilizado para eliminar el fragmento Fc de los anticuerpos (Figura 3). Como se muestra en la Calle 2 de la figura 4, la digestión con LysC dio como resultado la generación de dos bandas de peso

molecular más bajo (MW): el fragmento Fc que migra alrededor de 54 kDa y una banda más difusa que migra justo debajo del marcador de proteína de 44 kDa. Después de la incubación de las proteínas digeridas con Proteína A Sefarosa para eliminar las proteínas que contienen Fc, la banda más prominente que quedó en el sobrenadante fue la banda difusa que migró alrededor de 40 - 42 kDa. Se suponía que esta banda era el DEC del AMHRII, pero dado que el PM del DEC monómero del AMHRII debería ser de alrededor de 13,6 kDa, se sospechó que el DEC podría estar migrando en el gel como un dímero. Esto se confirmó después de que la reducción de la banda de 40 - 42 kDa con DTT produjera una banda de aproximadamente 22 kDa (Figura 4; carril 4). Esto indica que hay al menos un enlace disulfuro intercatenario entre los DEC monómeros dentro de la proteína de fusión AMHRII-Fc, como se muestra en la inserción en la Figura 4.

Se ha confirmado ahora que una fracción del AMHRII endógeno expresado en la línea celular SMAT1 de ratón y el AMHRII humano transfectado en células COS forma oligómeros de PM más elevado. Estos oligómeros de mayor PM se convierten en una especie de 72 kDa (el PM del AMHRII monomérico) en SDS-PAGE después de la reducción, en consonancia con los oligómeros superiores que contienen al menos un enlace disulfuro intercatenario entre los DEC del AMHRII. Es poco probable que el enlace disulfuro pueda estar entre dominios intracelulares, ya que el enlace disulfuro sería inestable debido al entorno reductor de la célula. El descubrimiento de que AMHRII existe como un dímero unido por disulfuro en las células fue un resultado inesperado, ya que se cree que AMHRII se dimeriza por interacción con AMH y que AMHRII probablemente existiría en la superficie de las células como un monómero (ver Figura 1). Se quería evaluar si el/los enlace(s) disulfuro intercatenario(s) podría(n) afectar la capacidad de AMHRII para unirse a AMH. Sin embargo, se encontró que ni el dímero DEC purificado ni el monómero, generado después de la escisión con LysC, podrían unirse a AMH. Se sospechó que esto fue el resultado de la digestión con LysC; hay una única lisina en el DEC del AMHRII, pero está en un bucle cerca del extremo N y estaría muy expuesta a la proteinasa LysC. Por tanto, con el fin de evaluar el efecto del (los) enlace(s) disulfuro intercatenario(s) sobre la unión de AMH, se tuvo que encontrar una forma alternativa de generar una forma monomérica del DEC del AMHRII.

Producción de AMHRII-Fc/Fc, un receptor monomérico soluble de AMHRII. Se generó una proteína de fusión soluble del AMHRII, que es monomérica (es decir, contiene solo un DEC monómero por molécula), usando la estrategia mostrada en la Figura 5. Un vector de expresión (pRLC010-1) que contiene un ADNc que codifica la proteína de fusión AMHRII-Fc se coexpresó con otro vector de expresión (pEAG1423) que contiene un ADNc que codifica una secuencia señal y los dominios bisagra, CH2, CH3 de IgG1 humana (es decir la mayor parte del dominio Fc) en células 293E. Se espera que se produzcan tres proteínas por las células 293E: AMHRII-Fc dimerica, Fc dimerico y un dímero unido por disulfuro compuesto por una cadena de AMHRII-Fc y una cadena de Fc, a la que nos referimos como AMHRII-Fc/Fc. La proteína posterior es monomérica (con respecto a AMHRII) ya que solo contiene un DEC del AMHRII.

Primero se realizó un experimento piloto para verificar que las células 293E estaban produciendo las tres proteínas y para determinar la proporción óptima de los dos plásmidos para la transfección. Como se muestra en la figura 6, se detectaron las tres proteínas en el medio condicionado de células 293 cotransfectadas con los dos plásmidos. En una proporción 1: 1 de los dos plásmidos, se produjo una cantidad mayor de dímero Fc, pero también se produjo una cantidad menor de dímero AMHRII-Fc. A proporciones más altas de los ADNc de AMHR-Fc y Fc, se produjo menos dímero Fc, pero se produjeron cantidades más altas de dímero AMHRII-Fc. Debido a que se consideró crítico separar tanto dímero AMHRII-Fc de la proteína AMHRII-Fc/Fc durante las etapas de purificación posteriores, se eligió una proporción de 1: 1 para minimizar la producción del dímero AMHRII-Fc.

Se realizó una preparación a gran escala de AMHRII-Fc/Fc. Se transfectaron células 293E en 4 matraces triples a una proporción de ADNc de AMHRII-Fc a ADNc de Fc de 1: 1 y se recogió medio condicionado cada dos días durante los 12 días siguientes. La proteína AMHRII-Fc/Fc se purificó como se describe en la sección de MÉTODOS usando Proteína A Sefarosa y cromatografía de exclusión por tamaño. El análisis por SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) de las fracciones recogidas después de ambos pasos de cromatografía se muestra en la Figura 7. La fracción 12 de la columna SEC se usó para los experimentos descritos a continuación (referidos como 3-12). También se analizó otra fracción recogida de una columna de SEC diferente, referida como 1-11.

La AMHRII-Fc/Fc monomérica tiene una afinidad mayor por la AMH escindida activa que la AMHRII-Fc dimerica.

Primero se comparó AMHRII-Fc/Fc con AMHRII-Fc en términos de su capacidad para unirse a un mAb anti-AMHRII de ratón (13H8). El formato ELISA se muestra en la Figura 8. Se revistió un anticuerpo Fc antihumano de cabra en la placa de ELISA y se capturaron los dos receptores solubles a diversas concentraciones. Los pocillos de ensayo que contenían receptores solubles capturados se incubaron a continuación con mAb 13H8 y se detectó el mAb 13H8 unido con un anticuerpo secundario Fc anti-ratón. Como se muestra en la figura 8, AMHRII-Fc se unió a un nivel superior a mAb 13H8 y con una mayor afinidad que AMHRII-Fc/Fc. Debido a que AMHRII-Fc tiene dos DEC del AMHRII, mientras que AMHRII-Fc/Fc tiene solo uno, se esperaba que AMHRII-Fc se uniera al doble de mAb 13H8 que AMHRII-Fc/Fc. De hecho, en el ELISA mostrado en la Figura 8, AMHRII-Fc/Fc se unió a poco menos de la mitad de la cantidad unida por AMHRII-Fc. Esto es casi seguro debido a la contaminación de la preparación de AMHRII-Fc/Fc por Fc; por lo tanto, la proporción M/D puede utilizarse para corregir la contaminación de Fc.

La diferencia en la afinidad por mAb 13H8 exhibida por los dos receptores también puede deberse al hecho de que

AMHRII-Fc tiene dos DEC. Incluso a baja concentración, mAb 13H8 puede unirse a AMHRII-Fc de forma bivalente debido a los dos DEC y, por lo tanto, se unen a AMHRII-Fc con una afinidad aparente más alta debido al efecto de avidéz. Por el contrario, El mAb 13H8 solo puede unirse a AMHRII-Fc/Fc de forma bivalente a mayores concentraciones, cuando dos moléculas de AMHRII-Fc Fc están lo suficientemente cerca una de la otra en la placa de ELISA para permitir la unión por un anticuerpo 13H8.

A continuación se comparó AMHRII-Fc/Fc con AMHRII-Fc en términos de su capacidad para unirse a AMH escindida bioactiva, utilizando el formato ELISA mostrado en la Figura 9. Sorprendentemente, Los resultados fueron exactamente opuestos a los observados con mAb 13H8: AMHRII-Fc/Fc se unió a un nivel superior a AMH escindida bioactiva y con una afinidad mayor que AMHRII-Fc. El nivel de AMH escindida bioactiva unida a altas concentraciones de dos receptores proporciona una indicación del número de DEC funcionales en cada preparación de receptor (es decir, aquellos capaces de unirse a AMH escindida). Por ejemplo, si la preparación de AMHRII-Fc contiene dos DEC funcionales, entonces debería poder unirse al doble de AMH escindida bioactiva que la preparación de AMHRII-Fc/Fc, que solo tiene un DEC. Pero, tal y como se muestra en la figura 9, la preparación de AMHRII-Fc se unió a menos AMH escindida que la preparación de AMHRII-Fc/Fc, lo que indica que, en promedio, solo uno de cada dos (o menos) de los DEC es funcional en la preparación de AMHRII-Fc. Esto se puede deber al(los) enlace(s) disulfuro intercatenario(s) formado(s) entre dos DEC monómeros de cada dímero AMHRII-Fc, lo que hace que algunos DEC sean inactivos para unirse a AMH.

AMHRII-Fc/Fc también se unió a AMH escindida bioactiva con una afinidad aparente mayor que AMHRII-Fc (aproximadamente 10-20 veces mayor). Esto puede indicar que la proteína AMHRII-Fc/Fc es más capaz de realizar una interacción bivalente con AMH escindida bioactiva que la proteína AMHRII-Fc, lo que debería permitir que se una con una afinidad aparente mayor. La menor afinidad de AMHRII-Fc por AMH escindida bioactiva también puede deberse a el(los) enlace(s) disulfuro intercatenario(s) formado(s) entre dos DEC monómeros de un dímero AMHRII-Fc. Es posible que el (los) enlace(s) disulfuro(s) intercatenario(s) comprometa(n) la capacidad de AMHRII-Fc para unirse a AMH escindida bioactiva de forma bivalente, de manera tan fácil como los receptores AMHRII-Fc/Fc.

Para probar nuestra hipótesis de que la mayor afinidad de AMHRII-Fc/Fc en comparación con AMHRII-Fc se debe a su capacidad para formar más fácilmente una interacción bivalente con AMH escindida bioactiva, se evaluó la capacidad de ambos receptores solubles de unirse a AMH escindida bioactiva en una placa ELISA. En este formato, los receptores solubles se presentan en solución, en un estado en el que un receptor monomérico no puede unirse a AMH escindida bioactiva de forma bivalente. Como se muestra en la figura 10, ambos receptores solubles se comportaron de forma similar en este formato en su capacidad para unirse a AMH, en términos de afinidad y estequiometría. Este resultado permite una serie de conclusiones. 1) La AMHRII-Fc dimérica es funcionalmente monomérica, ya que se une a la AMH escindida bioactiva con una afinidad similar a la AMHRII-Fc/Fc monomérica. Esto es consistente con los resultados de la Figura 9, que indican que AMHRII-Fc se une a menos AMH escindida bioactiva que AMHRII-Fc/Fc y que al menos un DEC de cada dímero AMHRII-Fc no es funcional. 2) La afinidad de AMHRII-Fc/Fc por AMH escindida bioactiva es menor cuando el receptor soluble se presenta en solución y no puede unirse a AMH escindida bioactiva de forma bivalente, indicando que la mayor afinidad de AMHRII-Fc/Fc por AMH escindida bioactiva observada en la Figura 9 se debe a su capacidad para unirse a AMH escindida bioactiva de forma bivalente y, por lo tanto, con una afinidad aparente mayor cuando se presenta sobre una superficie. 3) Por el contrario, la menor afinidad de AMHRII-Fc por AMH escindida bioactiva en comparación con AMHRII-Fc/Fc (Figura 9) implica que no puede formar una interacción bivalente con AMH escindida bioactiva tan fácilmente como AMHRII-Fc/Fc cuando se presenta en una superficie. El(Los) enlace(s) disulfuro intercatenario(s) es(son) la explicación más probable para esta observación.

En su conjunto, estos resultados muestran que la proteína AMHRII-Fc está comprometida en su capacidad para unirse a AMH escindida bioactiva, presumiblemente debido a el(los) enlace(s) disulfuro formado(s) entre los DEC. Debido a que AMHRII también forma oligómeros unidos por disulfuro en las células, una porción del receptor AMHRII endógeno en las células también puede verse comprometida para unirse a AMH escindida bioactiva. Este es un hallazgo muy inesperado. Además, también se ha demostrado que se puede expresar una versión soluble del DEC del AMHRII, que no tiene este enlace disulfuro intercatenario y se une a AMH escindida bioactiva con una afinidad aparente mayor.

Desarrollo de un ELISA sensible para AMH escindida activa. Con el fin de desarrollar un ELISA para la AMH escindida activa, se probaron varios formatos diferentes usando la proteína de fusión AMHRII-Fc. Un formato de ELISA que se probó consistió en capturar AMH escindida en mAb anti-AMH recubierto en placas de ELISA, seguido de unión y detección de AMHRII-Fc. Sin embargo, la sensibilidad en este formato nunca fue mejor que 10 ng/ml (datos no mostrados). Por el contrario, la captura de la proteína de fusión AMHRII-Fc en un Ac Fc antihumano, seguido de unión y detección de AMH escindida, produjo una mejor sensibilidad, permitiendo la detección por debajo de 10 ng/ml (Figura 11B). Aunque este nivel de sensibilidad fue adecuado para detectar AMH escindida en el tampón de ensayo, no fue suficiente para detectar de forma reproducible AMH en suero humano (datos no mostrados). Debido a que la proteína AMHRII-Fc/Fc tiene una mayor afinidad y estequiometría para unirse con AMH escindida que AMHRII-Fc, se usó para mejorar la sensibilidad del ELISA para AMH escindida, que se muestra en el diagrama esquemático en la Figura 11A. Se añadieron las dos proteínas de fusión a una concentración constante (1 µg/ml) a las placas recubiertas con un Ac Fc antihumano. Después de lavar la placa, se añadió AMH escindida a las

concentraciones indicadas y se detectó AMH unida a los receptores solubles con mAb biotinilado de AMH anti-C-terminal 22A2 y un conjugado de estreptavidina-HRP. Tal como se muestra en la Figura 11B, AMHRII-Fc/Fc produjo una señal mayor que AMHRII-Fc en todas las concentraciones de AMH escindidas analizadas y la respuesta fue lineal en los intervalos de 1 a 10 ng/ml (recuadro). En la Figura 11C, se probaron tres preparaciones diferentes de AMHRII-Fc y todas dieron resultados consistentes. Las señales más bajas observadas con el Lote número 2 podrían deberse al mayor nivel de proteína Fc contaminante en comparación con los otros dos lotes (Figura 11C; recuadro).

Como se muestra en la Figura 11D, este formato ELISA que emplea la proteína de fusión AMHRII-Fc/Fc también podría detectar la AMH escindida que se había diluido en suero humano, en el mismo intervalo de concentración. El suero humano utilizado en este experimento y en los experimentos posteriores fue de un individuo con un nivel prácticamente indetectable de AMH (medido con el ELISA que detecta tanto AMH escindida como no escindida). Hubo una ligera disminución en la señal cuando se diluyó AMH en suero humano, pero el efecto no causó un problema con la reproducibilidad. También se realizó un control negativo: AMHRII-Fc tratado con meta-peryodato de sodio, que hemos demostrado que inactiva casi por completo el receptor para unirse a AMH. Cuando se usó esta proteína de fusión en lugar de AMHRII-Fc/Fc (Figura 11D), se observó poca o ninguna unión de AMH escindida, indicando que la señal observada con AMHRII-Fc/Fc es el resultado de la unión específica a la AMH escindida. Nos referimos a este ELISA como cAMH-ELISA, para distinguirlo de los ELISA que miden la AMH total (escindida y no escindida).

El cAMH-ELISA puede usarse para medir el nivel de escisión de AMH en una muestra que contiene una mezcla de AMH no escindida y escindida. Se quería probar si el cAMH-ELISA podría usarse para medir el nivel de AMH escindida en una muestra que contiene una mezcla de AMH no escindida y escindida. Pero primero fue necesario demostrar que el cAMH-ELISA solo detecta AMH escindida y no AMH no escindida, en un intervalo de concentraciones de AMH. Para hacer esto, comparamos el cAMH-ELISA con el ELISA convencional, que detecta ambas formas de AMH. El total de AMH ELISA (Figura 12A) que utilizamos es similar a los que se usan actualmente para medir los niveles de AMH en muestras de pacientes: se usa un mAb biotinilado de AMH anti-C-terminal (22A2) para detectar AMH capturada en un mAb de AMH anti-N-terminal (10.6). Para AMH no escindida, utilizamos AMH producida en células transfectadas con un ADNc de AMH, que contiene una mutación en el sitio de escisión monobásico; la AMH producida por estas células transfectadas no muestra evidencia de escisión por SDS-PAGE y, por lo tanto, está completamente no escindida. Tal como se muestra en la Figura 12B, el ELISA para AMH total detectó AMH escindida y no escindida con similar sensibilidad. Por el contrario, solamente se detectó AMH escindida con el cAMH-ELISA (Figuras 12C, D). En estos ELISA, la AMH escindida y no escindida se había diluido en suero humano, lo que demuestra que el suero o los componentes en el suero, no afectan la capacidad de AMHRII-Fc/Fc para interactuar específicamente con AMH escindida o hacer que no se una específicamente a AMH no escindida.

Para probar si el cAMH-ELISA podría medir con precisión el nivel de AMH escindida en muestras que contienen una mezcla de AMH escindida y no escindida, preparamos una serie de muestras que contenían varios niveles de AMH escindida combinada con AMH no escindida (en suero humano al 90%), de modo que todas las muestras tenían casi el mismo nivel de AMH total. Por consiguiente, se prepararon muestras que contenían aproximadamente el 0, 20, 40, 60, 80 y 100% de AMH escindida. Se midieron primero los niveles totales de AMH en estas seis muestras usando el ELISA para AMH total y los resultados se muestran en la Figura 13A, donde los niveles determinados experimentalmente se comparan con los niveles reales. Los niveles reales de AMH total y escindida en cada muestra se recalcularon usando los valores determinados experimentalmente para AMH total en las muestras Control 0 (0% escindida) y Control 100 (100% escindida), que contenían únicamente AMH no escindida o escindida, respectivamente. Hubo una concordancia bastante estrecha entre los niveles de AMH total experimental y real.

En la Figura 13B se muestra una comparación de los niveles determinados experimentalmente de AMH escindida medida con el cAMH-ELISA con los niveles reales de AMH escindida en cada muestra. Al igual que con las mediciones de AMH total, hubo una concordancia bastante estrecha entre los niveles experimentales y reales de AMH escindida, aunque se observó una mayor diferencia en la muestra que contenía el nivel más bajo de AMH escindida. Al dividir el nivel de AMH escindida con el nivel de AMH total para cada muestra (experimental y real), se puede calcular el nivel de escisión de AMH (experimental y real) en cada muestra. Como se muestra en la Figura 13C, los niveles de escisión de AMH determinados experimentalmente están en concordancia bastante estrecha con los niveles de escisión reales, mostrando una mayor divergencia con la muestra que contiene el nivel más bajo de escisión de AMH. Estos resultados muestran que el cAMH-ELISA puede detectar con precisión el nivel de AMH escindida en una muestra que contiene una mezcla de AMH escindida y no escindida, aunque la precisión disminuye algo a niveles bajos de escisión de AMH. Los experimentos de ELISA mostrados en la Figura 13 se realizaron con AMH diluida en suero humano, lo que indica que deberían ser posibles mediciones similares en muestras de pacientes.

Medición de niveles de división de AMH escindida y de escisión de AMH en muestras de pacientes. Antes de utilizar el cAMH-ELISA para medir el nivel de AMH escindida activa en muestras de pacientes, se caracterizaron las formas de AMH en una serie de muestras de pacientes utilizando un enfoque bioquímico. Se usó un mAb de AMH anti-N-terminal (10.6), conjugado con Sefarosa para capturar AMH en muestras de pacientes, ya sea suero o fluido folicular. La AMH capturada se analizó después mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se realizó una transferencia Western utilizando un Ac policlonal anti-AMH (L44). Las dos transferencias Western en la Figura 14

muestran el análisis de cuatro muestras de pacientes; se cargaron diferentes cantidades de proteína recuperadas de las precipitaciones de 10.6-Sefarosa en cada transferencia Western para permitir una mejor cuantificación del procesamiento de AMH. Se hizo migrar AMH no escindida y escindida como controles para mostrar las posiciones del precursor de AMH no escindida y la pro-región N-terminal producida después de la escisión. La banda inferior que migra en las muestras del paciente es cadena pesada de IgG humana, que reacciona de forma cruzada con el anticuerpo secundario. La banda pro-región N-terminal se detectó en muestras de los pacientes 399, 400 y 3, lo que indica que estas muestras contienen algún nivel de AMH escindida. Se observó muy poca o ninguna banda pro-región en el paciente 208, indicando que contiene ninguna o muy poca AMH escindida activa. El análisis de densitometría de estas transferencias Western permitió una evaluación de los niveles relativos de precursor de no escindida y bandas pro-región y, por lo tanto, un cálculo del nivel de escisión AMH, que se muestra debajo de las transferencias Western. Las muestras de pacientes muestran varios niveles de escisión de AMH, que varían del 0 al 50%.

En la Tabla 1, se muestran los niveles de AMH total y escindida determinada mediante ELISA para AMH total y escindida, junto con los niveles calculados de escisión de AMH. También se muestra en la Figura 14 el nivel de escisión de AMH determinado a partir de las transferencias Western y se correlaciona bastante bien con los valores determinados por ELISA. Mientras que el paciente 399 contiene un nivel mucho más bajo de AMH total que los pacientes 400 y 3, tiene un nivel relativamente alto de AMH escindida en comparación con las otras muestras de pacientes. La estrecha concordancia entre los niveles de escisión de AMH determinados por ELISA y el análisis bioquímico valida el cAMH-ELISA como una herramienta precisa para evaluar los niveles de escisión de AMH en muestras de pacientes.

Tabla 1: Medición de los niveles de AMH total y escindida en muestras de pacientes.

	Paciente 399	Paciente 400	Paciente 3	Paciente 208	Suero femenino	Suero masculino
<b>[AMH Total ] (ng/ml) (N)</b>	8,5 ± 0,7 (8)	28,0 ± 3,3 (4)	37,6 ± 6,3 (4)	9,2 ± 1,4 (7)	1,9 ± 0,3 (6)	76,0 ± 11 (2)
<b>[AMH Escindida] (ng/ml) (N)</b>	4,0 ± 0,2 (6)	3,5 ± 0,6 (5)	2,3 ± 1,2 (4)	0,0 (2)	0,4 ± 0,2 (2)	ND
<b>% de escisión determinada por ensayos ELISA</b>	47,3 ± 4,8	12,5 ± 2,7	6,2 ± 3,5	0,0	21,8 ± 11	ND
<b>% de escisión estimada a partir de análisis bioquímicos (Figura 14)</b>	50,0	15,0	0,0	0,0	ND	>70
Las concentraciones de AMH total se determinaron usando el ELISA mostrado en la Figura 12A. Las concentraciones de AMH escindida se determinaron usando el cAMH-ELISA que se muestra en la Figura 12B. (N: número de réplicas; ND: no hecho)						

## 25 REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Josso N, di Clemente N (2003) Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex- specific member of the TGF-beta family. Trends Endocrinol Metab 14: 91-97.
2. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, et al. (2008) Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. Trends Endocrinol Metab 19: 340-347.
3. Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF, Jr., et al. (1999) Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. Clin Cancer Res 5: 3488-3499.
4. Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, et al. (2000) Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Mullerian hormone and its type II receptor. J Biol Chem 275: 27973-27978.
5. Massagué J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. Genes Dev 19: 2783-2810.
6. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, et al. (1994) A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Mullerian duct. Development 120: 189-197.
7. di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, et al. (1994) Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. Mol Endocrinol 8: 1006-1020.
8. di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, et al. (2010) Processing of anti-Mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- {beta}. Mol Endocrinol 24: 2193-2206.
9. Sengle G, Ono RN, Lyons KM, Bachinger HP, Sakai LY (2008) A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. J Mol Biol 381: 1025-1039.
10. Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, et al. (1998) Receptors for anti-Mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 594-599.

11. Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, et al. (2001) Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142: 4891-4899.
12. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, et al. (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140: 5789-5796.
- 5 13. Arango NA, Kobayashi A, Wang Y, Jamin SP, Lee HH, et al. (2008) A mesenchymal perspective of Mullerian duct differentiation and regression in Amhr2-lacZ mice. *Mol Reprod Dev* 75: 1154-1162.
14. Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, et al. (2008) Anti-Mullerian- hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 121: 3357-3365.
- 10 15. Wang PY, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT, et al. (2005) Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16421-16425.
16. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fekete C, Michel-Calemard L, Forest MG, et al. (1999) Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Mullerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 627-631.
- 15 17. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, et al. (2010) Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 16: 113-130.
18. Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A (1997) Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril* 67: 962-965.
- 20 19. Stubbs SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, et al. (2005) Anti-Mullerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5536-5543.
20. Jonard S, Dewailly D (2004) The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update* 10: 107-117.
- 25 21. Bakkum-Gamez JN, Aletti G, Lewis KA, Keeney GL, Thomas BM, et al. (2008) Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 108: 141-148.
22. Yuan QA, Simmons HH, Robinson MK, Russeva M, Marasco WA, et al. (2006) Development of engineered antibodies specific for the Mullerian inhibiting substance type II receptor: a promising candidate for targeted therapy of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 5: 2096-2105.
- 30 23. Salhi I, Cambon-Roques S, Lamarre I, Laune D, Molina F, et al. (2004) The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Biochem J* 379: 785-793.
24. Yuan QA, Robinson MK, Simmons HH, Russeva M, Adams GP (2008) Isolation of anti- MISIIR scFv molecules from a phage display library by cell sorter biopanning. *Cancer Immunol Immunother* 57: 367-378.
- 35 25. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, et al. (2000) Detection of minimal levels of serum antiMullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 540-544.
26. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, et al. (2006) Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 147: 3228-3234.
- 40 27. Kumar A, Kalra B, Patel A, McDavid L, Roudebush WE (2010) Development of a second generation anti-Mullerian hormone (AMH) ELISA. *J Immunol Methods* 362: 51-59.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> INSERM
- <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN MONOMÉRICAS SOLUBLES DEL RECEPTOR DE TIPO II DE LA HORMONA ANTIMULLERIANA Y USOS DE LAS MISMAS
- 50 <130> BIO13356 DI CLEMENTE / MC
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1
- <211> 573
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 60 <400> 1

ES 2 675 040 T3

Met Leu Gly Ser Leu Gly Leu Trp Ala Leu Leu Pro Thr Ala Val Glu  
1 5 10 15

Ala Pro Pro Asn Arg Arg Thr Cys Val Phe Phe Glu Ala Pro Gly Val  
20 25 30

Arg Gly Ser Thr Lys Thr Leu Gly Glu Leu Leu Asp Thr Gly Thr Glu  
35 40 45

Leu Pro Arg Ala Ile Arg Cys Leu Tyr Ser Arg Cys Cys Phe Gly Ile  
50 55 60

Trp Asn Leu Thr Gln Asp Arg Ala Gln Val Glu Met Gln Gly Cys Arg  
65 70 75 80

Asp Ser Asp Glu Pro Gly Cys Glu Ser Leu His Cys Asp Pro Ser Pro  
85 90 95

Arg Ala His Pro Ser Pro Gly Ser Thr Leu Phe Thr Cys Ser Cys Gly  
100 105 110

Thr Asp Phe Cys Asn Ala Asn Tyr Ser His Leu Pro Pro Pro Gly Ser  
115 120 125

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gln Gly Pro Gln Ala Ala Pro Gly Glu Ser  
130 135 140

Ile Trp Met Ala Leu Val Leu Leu Gly Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Gly Ser Ile Ile Leu Ala Leu Leu Gln Arg Lys Asn Tyr Arg  
165 170 175

ES 2 675 040 T3

Val Arg Gly Glu Pro Val Pro Glu Pro Arg Pro Asp Ser Gly Arg Asp  
180 185 190

Trp Ser Val Glu Leu Gln Glu Leu Pro Glu Leu Cys Phe Ser Gln Val  
195 200 205

Ile Arg Glu Gly Gly His Ala Val Val Trp Ala Gly Gln Leu Gln Gly  
210 215 220

Lys Leu Val Ala Ile Lys Ala Phe Pro Pro Arg Ser Val Ala Gln Phe  
225 230 235 240

Gln Ala Glu Arg Ala Leu Tyr Glu Leu Pro Gly Leu Gln His Asp His  
245 250 255

Ile Val Arg Phe Ile Thr Ala Ser Arg Gly Gly Pro Gly Arg Leu Leu  
260 265 270

Ser Gly Pro Leu Leu Val Leu Glu Leu His Pro Lys Gly Ser Leu Cys  
275 280 285

His Tyr Leu Thr Gln Tyr Thr Ser Asp Trp Gly Ser Ser Leu Arg Met  
290 295 300

Ala Leu Ser Leu Ala Gln Gly Leu Ala Phe Leu His Glu Glu Arg Trp  
305 310 315 320

Gln Asn Gly Gln Tyr Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Ser Ser  
325 330 335

Gln Asn Val Leu Ile Arg Glu Asp Gly Ser Cys Ala Ile Gly Asp Leu  
340 345 350

Gly Leu Ala Leu Val Leu Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Trp Thr  
355 360 365

Pro Thr Gln Pro Gln Gly Pro Ala Ala Ile Met Glu Ala Gly Thr Gln  
370 375 380

Arg Tyr Met Ala Pro Glu Leu Leu Asp Lys Thr Leu Asp Leu Gln Asp  
385 390 395 400

Trp Gly Met Ala Leu Arg Arg Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Leu  
405 410 415

Leu Trp Glu Ile Leu Ser Arg Cys Pro Asp Leu Arg Pro Asp Ser Ser  
420 425 430

ES 2 675 040 T3

Pro Pro Pro Phe Gln Leu Ala Tyr Glu Ala Glu Leu Gly Asn Thr Pro  
 435 440 445

Thr Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu Ala Val Gln Glu Arg Arg Arg Pro  
 450 455 460

Tyr Ile Pro Ser Thr Trp Arg Cys Phe Ala Thr Asp Pro Asp Gly Leu  
 465 470 475 480

Arg Glu Leu Leu Glu Asp Cys Trp Asp Ala Asp Pro Glu Ala Arg Leu  
 485 490 495

Thr Ala Glu Cys Val Gln Gln Arg Leu Ala Ala Leu Ala His Pro Gln  
 500 505 510

Glu Ser His Pro Phe Pro Glu Ser Cys Pro Arg Gly Cys Pro Pro Leu  
 515 520 525

Cys Pro Glu Asp Cys Thr Ser Ile Pro Ala Pro Thr Ile Leu Pro Cys  
 530 535 540

Arg Pro Gln Arg Ser Ala Cys His Phe Ser Val Gln Gln Gly Pro Cys  
 545 550 555 560

Ser Arg Asn Pro Gln Pro Ala Cys Thr Leu Ser Pro Val  
 565 570

<210> 2  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

10

ES 2 675 040 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

ES 2 675 040 T3

325

330

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII que consiste en una primera cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 18 hasta el resto en la posición 145 en la SEQ ID NO: 1 fusionado a un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos que varía desde el resto en la posición 104 hasta el resto en la posición 330 en la SEQ ID NO: 2 y una segunda cadena que consiste en un dominio Fc donde las cadenas están unidas por disulfuro dentro de su dominios Fc, en donde dicha proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII es soluble en fluidos biológicos, tiene la capacidad de unirse a AMH escindida bioactiva.
2. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la reivindicación 1 que se produce en una célula eucariota.
3. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la reivindicación 1 en donde el extremo C-terminal del dominio extracelular del AMHRII se fusiona al extremo N-terminal del dominio Fc.
4. Una célula hospedadora eucariota para preparar la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la reivindicación 1 que se transforma con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena que tiene un dominio extracelular del AMHRII fusionado a un dominio Fc y con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena que tiene un único dominio Fc.
5. Un método para detectar o cuantificar la presencia de AMH escindida bioactiva en una muestra que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. El método de la reivindicación 5 en el que la detección o cuantificación de la AMH escindida bioactiva en una muestra se logra con un soporte sólido en el que la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII se inmoviliza en él.
7. El método de la reivindicación 5 en el que la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII se usa en combinación con un anticuerpo anti-AMH.
8. El método de la reivindicación 7 que comprende las etapas de i) proporcionar un recubrimiento de soporte sólido con una cantidad de anticuerpos específicos para el dominio Fc de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII, ii) añadir una cantidad de la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de la invención, iii) poner la muestra que contiene AMH en contacto con el soporte sólido, iv) añadir una cantidad del anticuerpo anti-AMH que está conjugado a un primer marcador y v) agregar una cantidad de un compañero de unión que es específico para el marcador del anticuerpo AMH y que está conjugado con el segundo marcador en donde mientras la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII captura la AMH escindida bioactiva presente en la muestra, el anticuerpo anti-AMH se une a la AMH y el compañero de unión conjugado con el segundo marcador se une al primer marcador conjugado con el anticuerpo anti-AMH y en donde, la medición de la cantidad de compañero de unión unido que es específico para el marcador del anticuerpo anti-AMH revela la cantidad de AMH presente en la muestra.
9. El método de la reivindicación 8 en donde el anticuerpo anti-AMH se dirige a un epítipo dirigido a la región C-terminal de la AMH, que no evita la interacción entre la AMH escindida bioactiva y el dominio extracelular de la proteína de fusión del AMHRII.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el primer marcador es biotina y el compañero de unión es estreptavidina conjugada con HRP.
11. Un método de diagnóstico para determinar la fertilidad de un sujeto que es un ser humano o no o para diagnosticar y/o controlar la presencia de un cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método cuantificar la AMH escindida bioactiva en una muestra obtenida de dicho sujeto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
12. El método de diagnóstico de la reivindicación 11 que comprende las etapas de i) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto, ii) poner en contacto la muestra con una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre la proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII y la AMH escindida bioactiva presente en la muestra, iii) cuantificar la cantidad de complejos formados para determinar la cantidad de AMH escindida bioactiva presente en la muestra y iv) correlacionar la cantidad de AMH escindida bioactiva con la determinación de la fertilidad de un sujeto o con el diagnóstico y/o el control de un cáncer.
13. Un kit para su uso en el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 que comprende una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

14. La proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método terapéutico para mejorar la fertilidad femenina y/o para tratar trastornos de infertilidad femenina y/o para mejorar o tratar la infertilidad masculina.
- 5 15. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión monomérica soluble del AMHRII de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

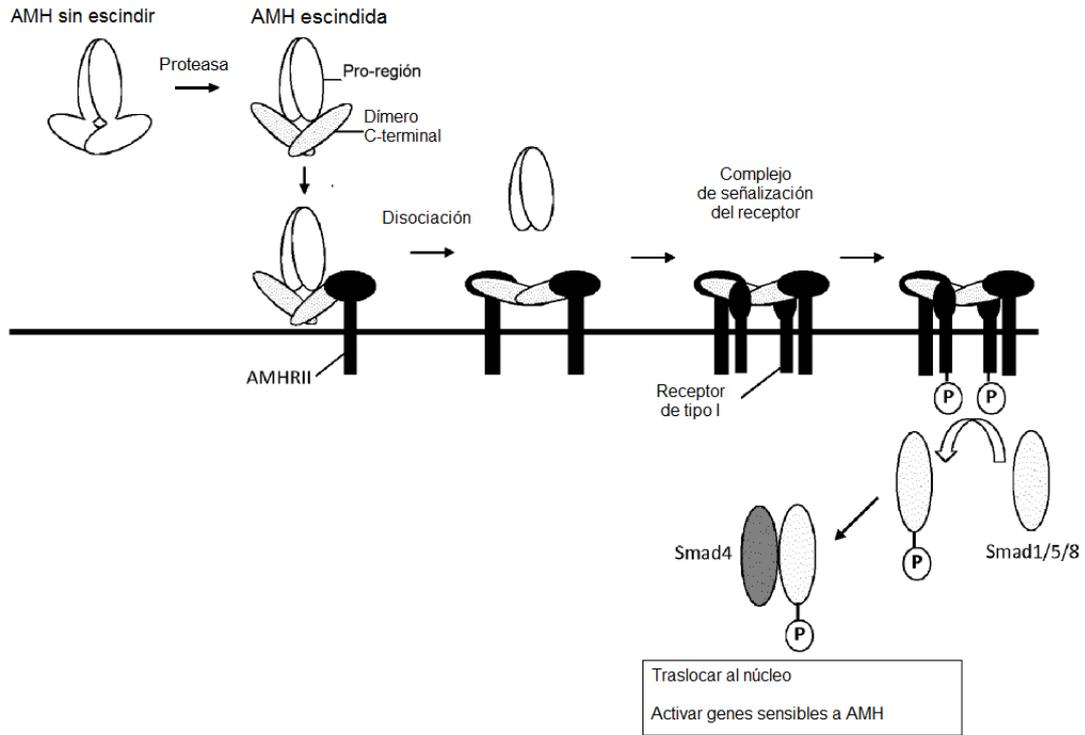


Figura 1

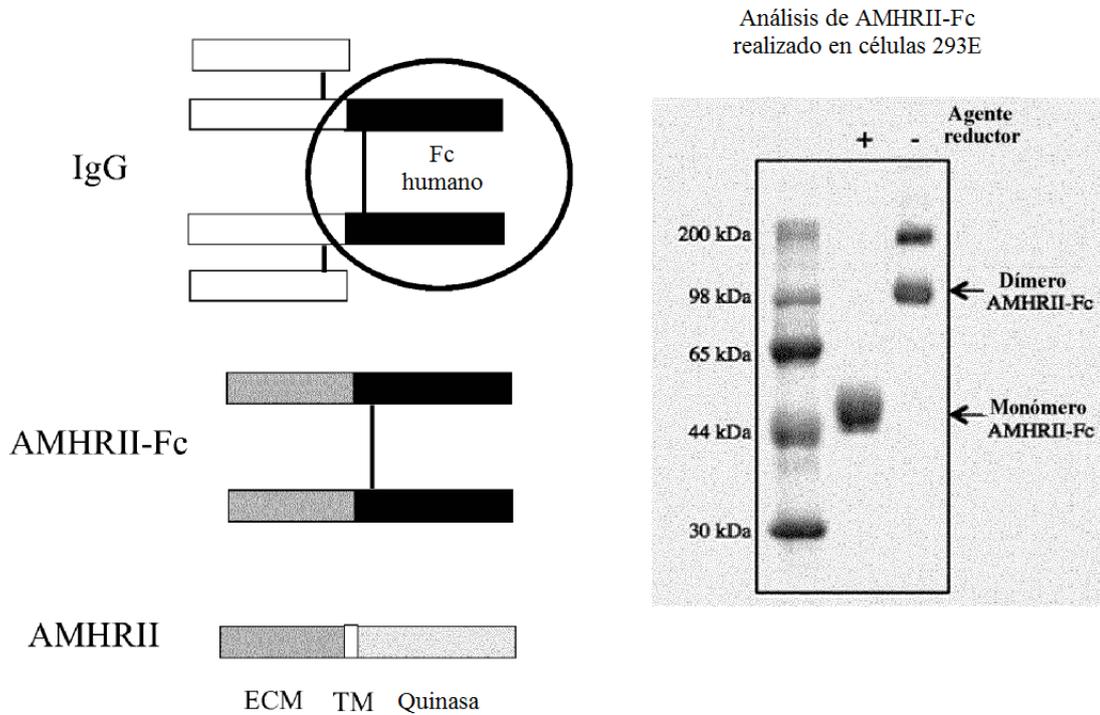


Figura 2

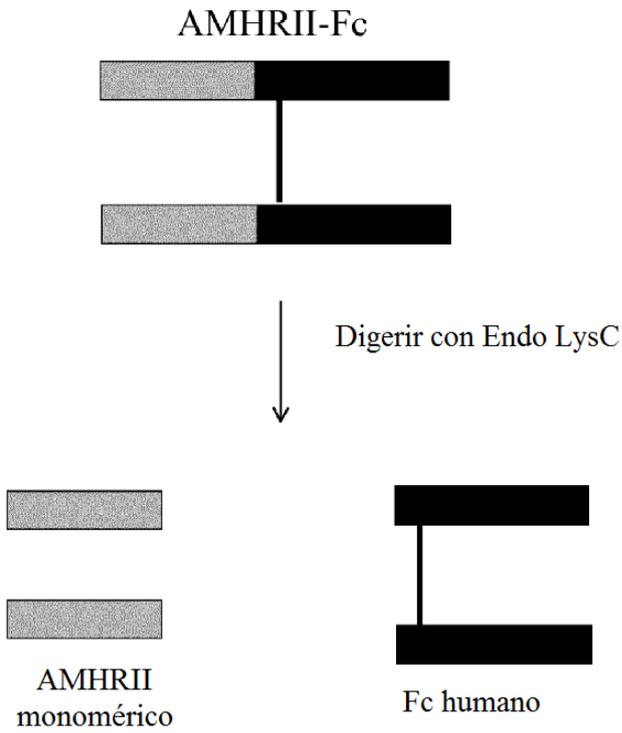


Figura 3

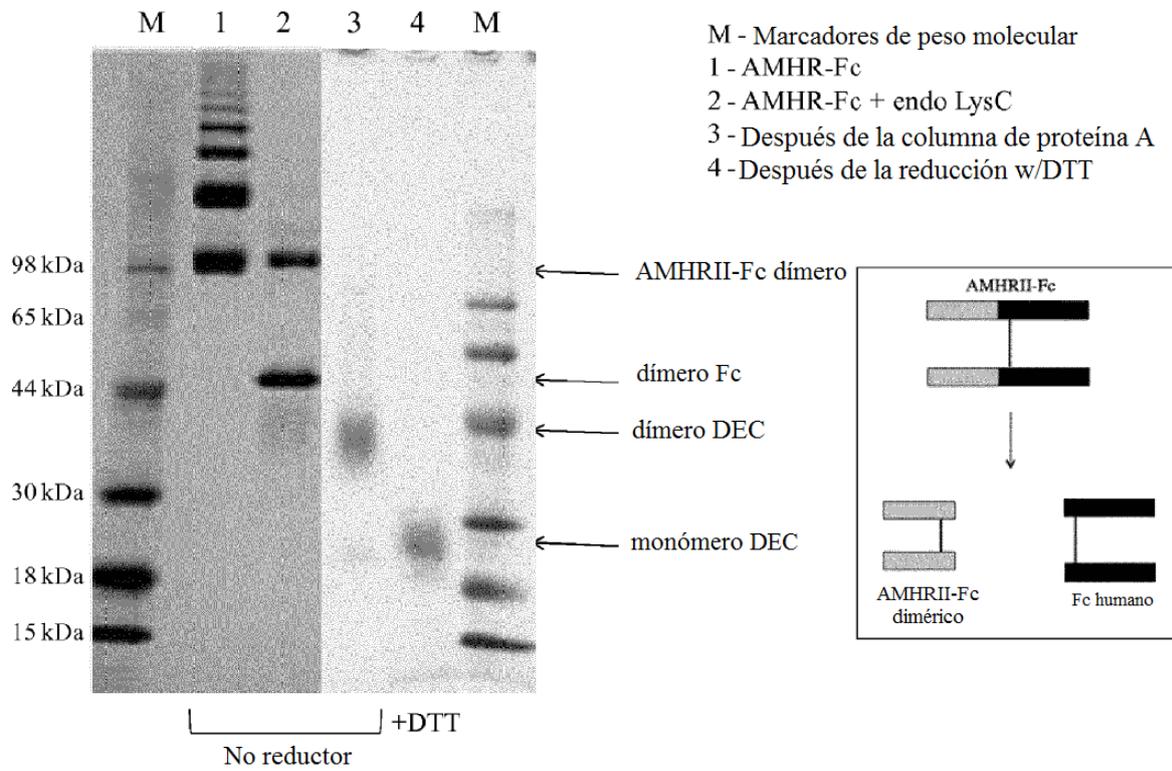


Figura 4

Coexpresión de AMHRII-Fc y ADNc de Fc en células 293E

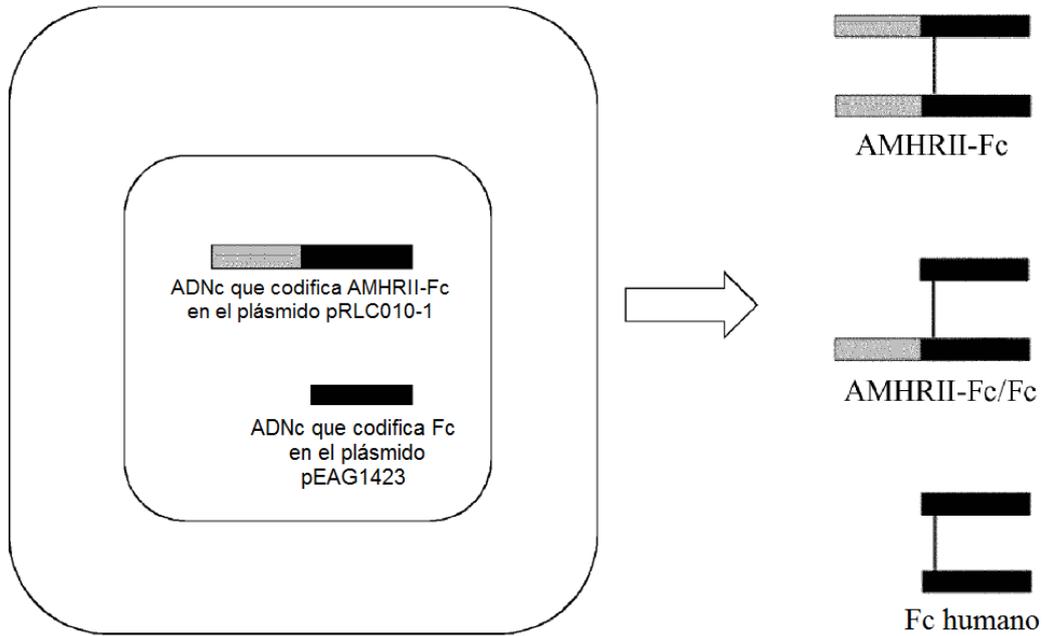


Figura 5

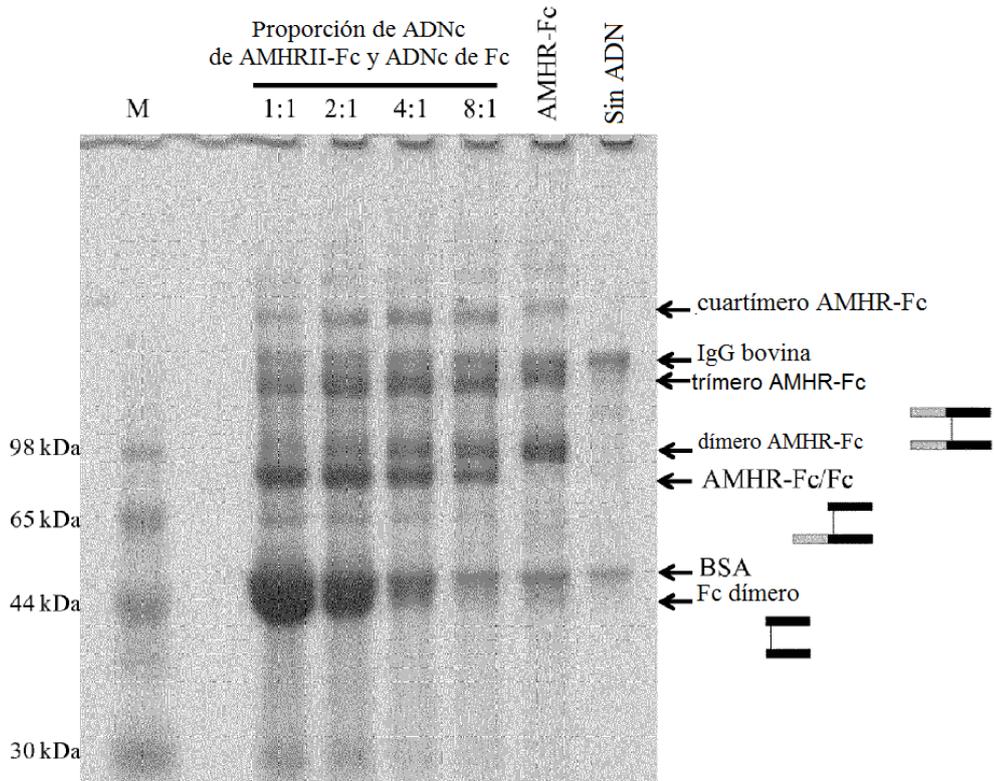


Figura 6

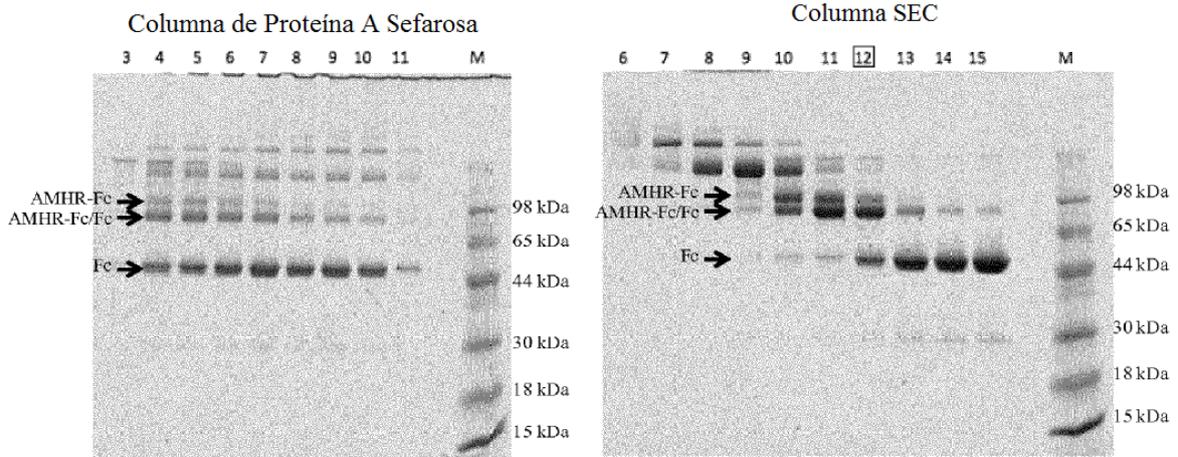


Figura 7

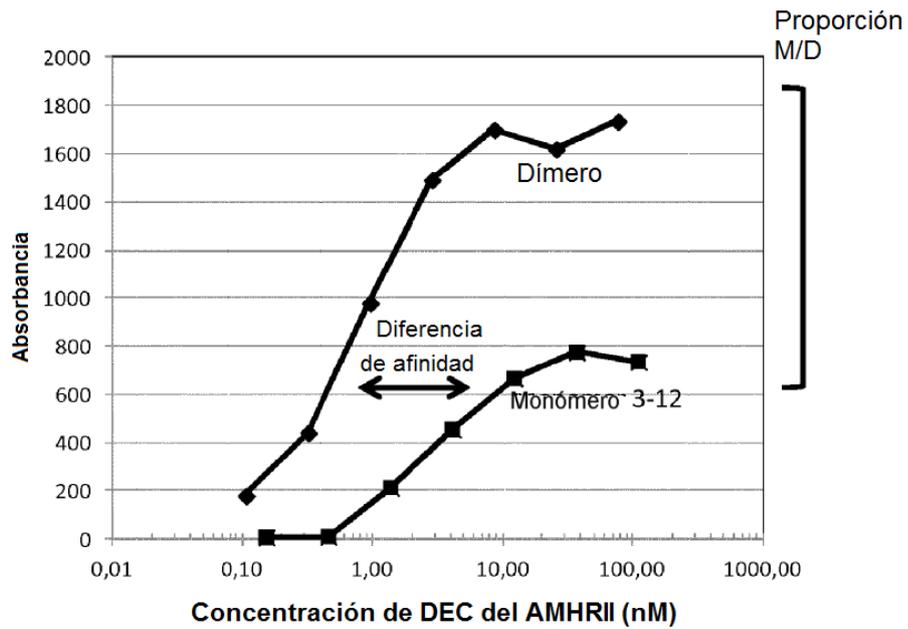
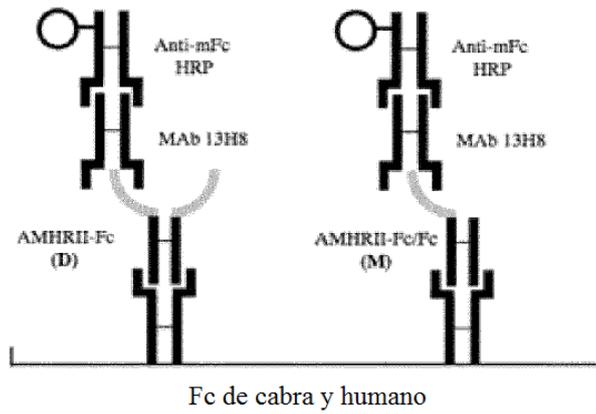


Figura 8

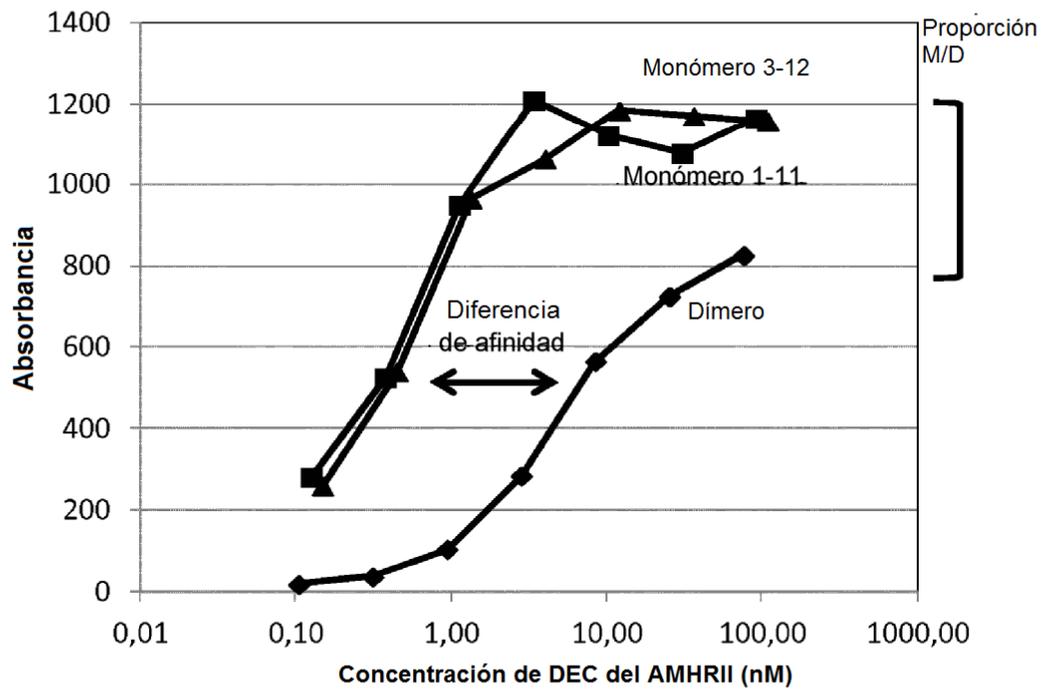
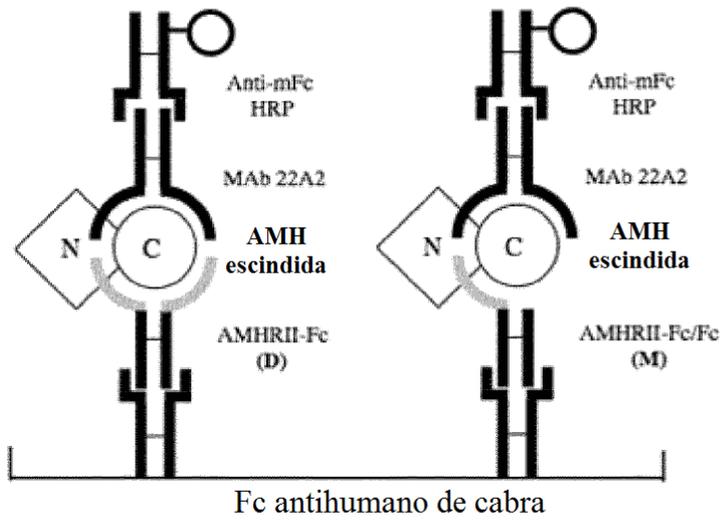


Figura 9

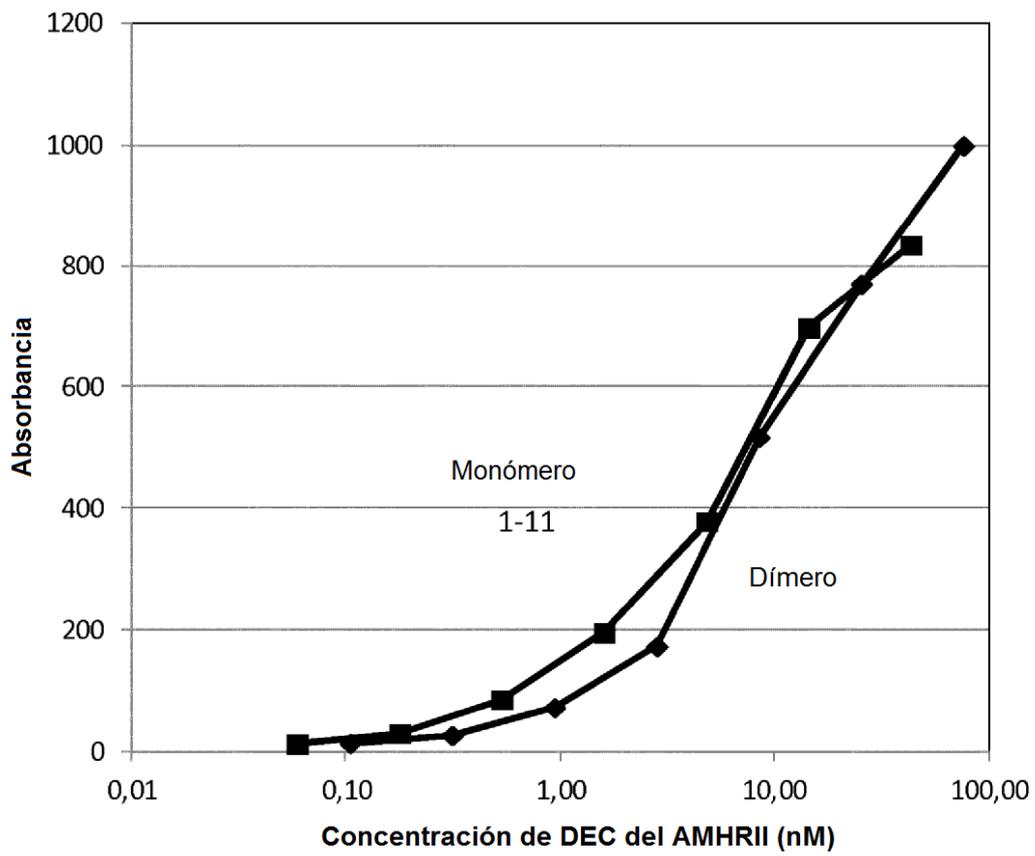
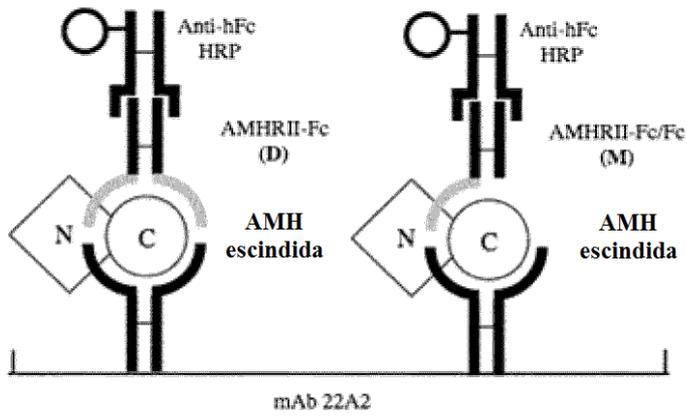


Figura 10

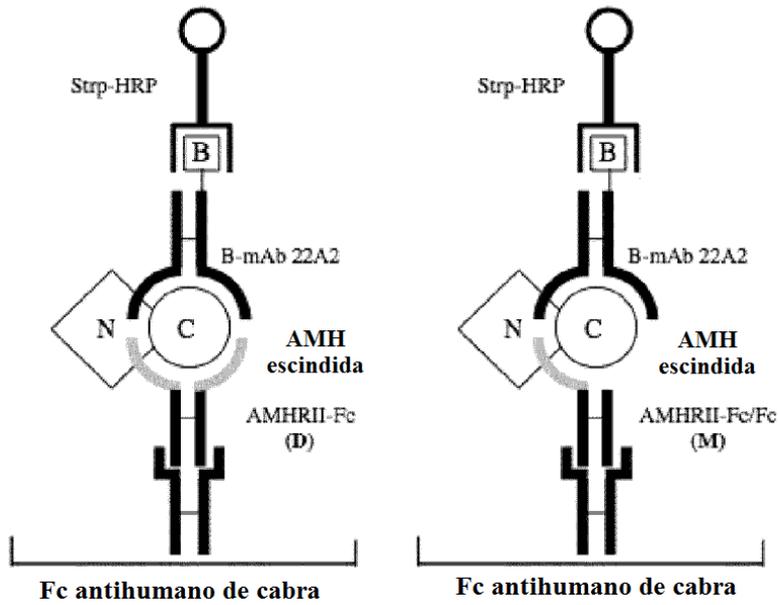


Figura 11A

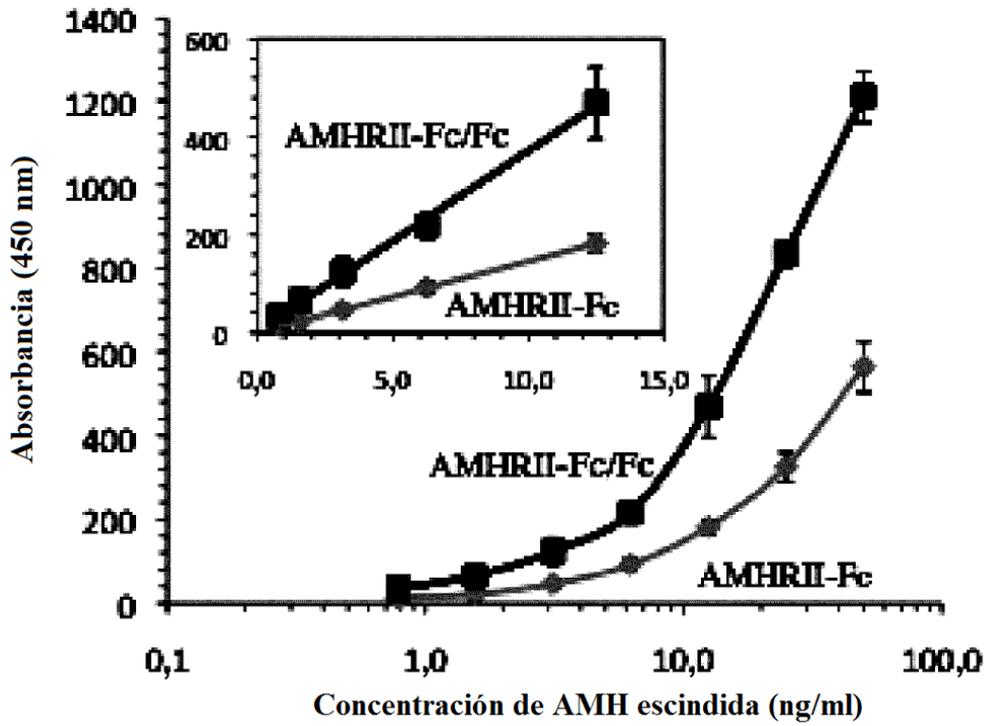


Figura 11B

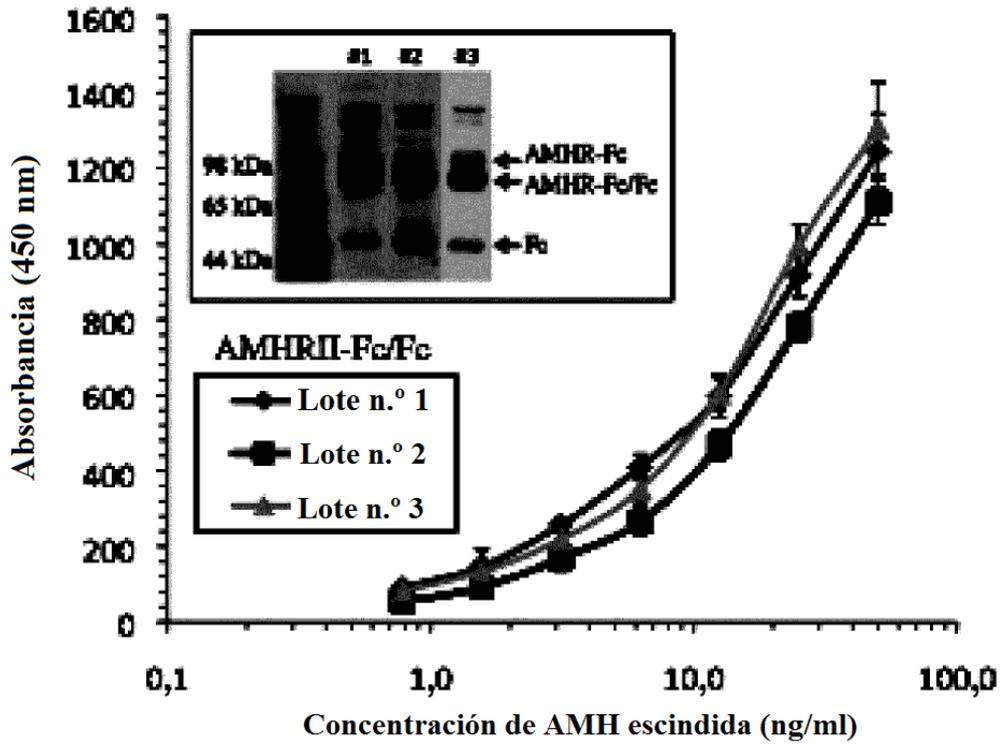


Figura 11C

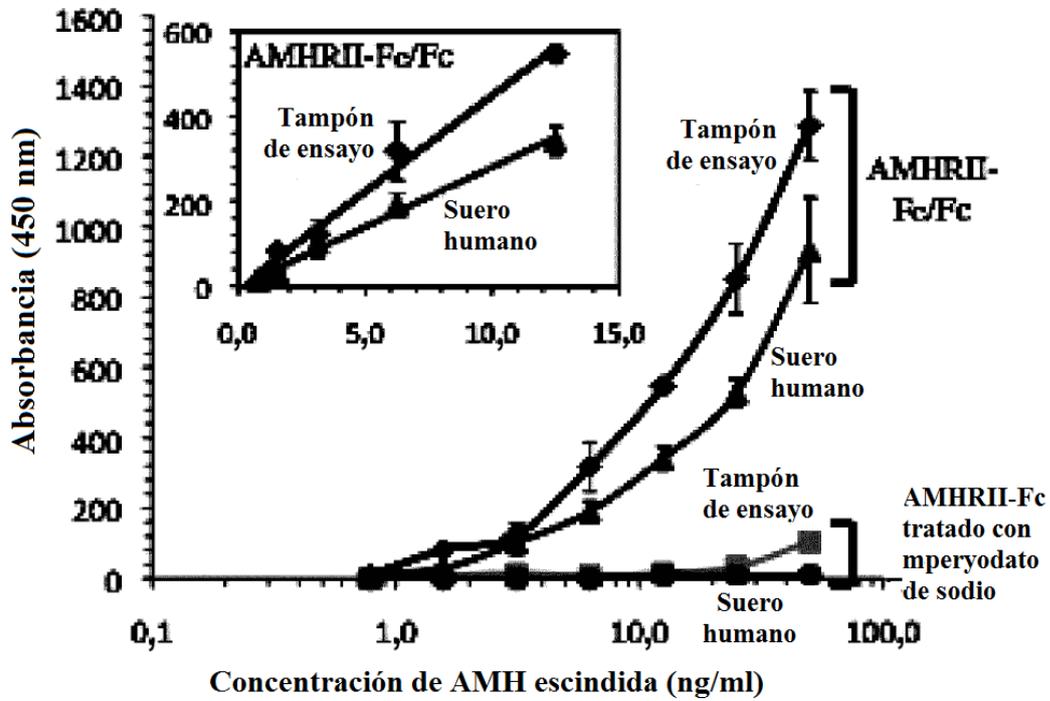


Figura 11D

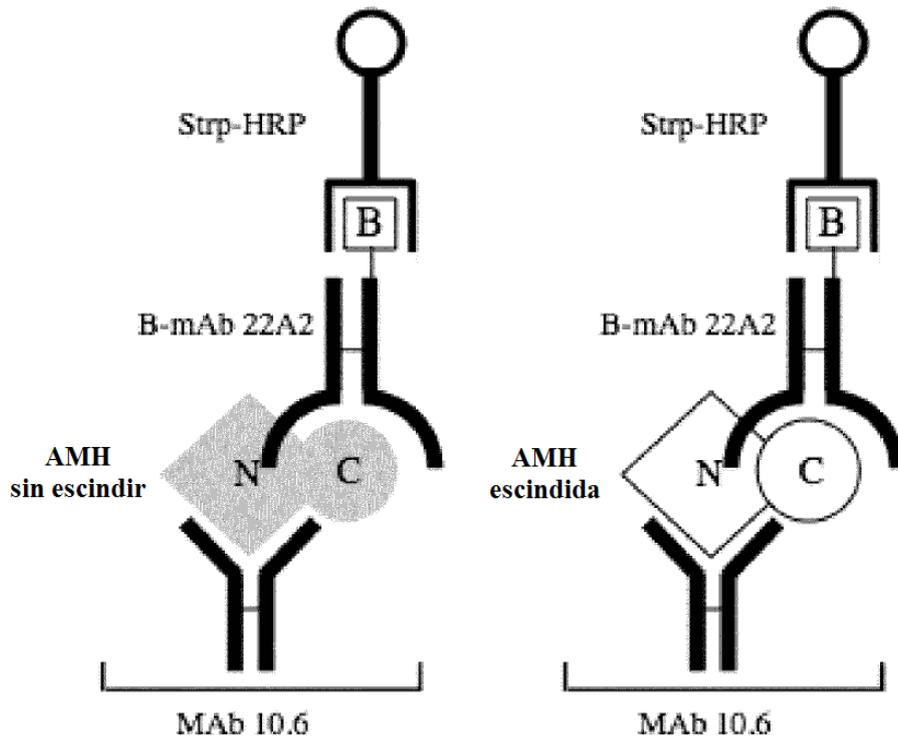


Figura 12A

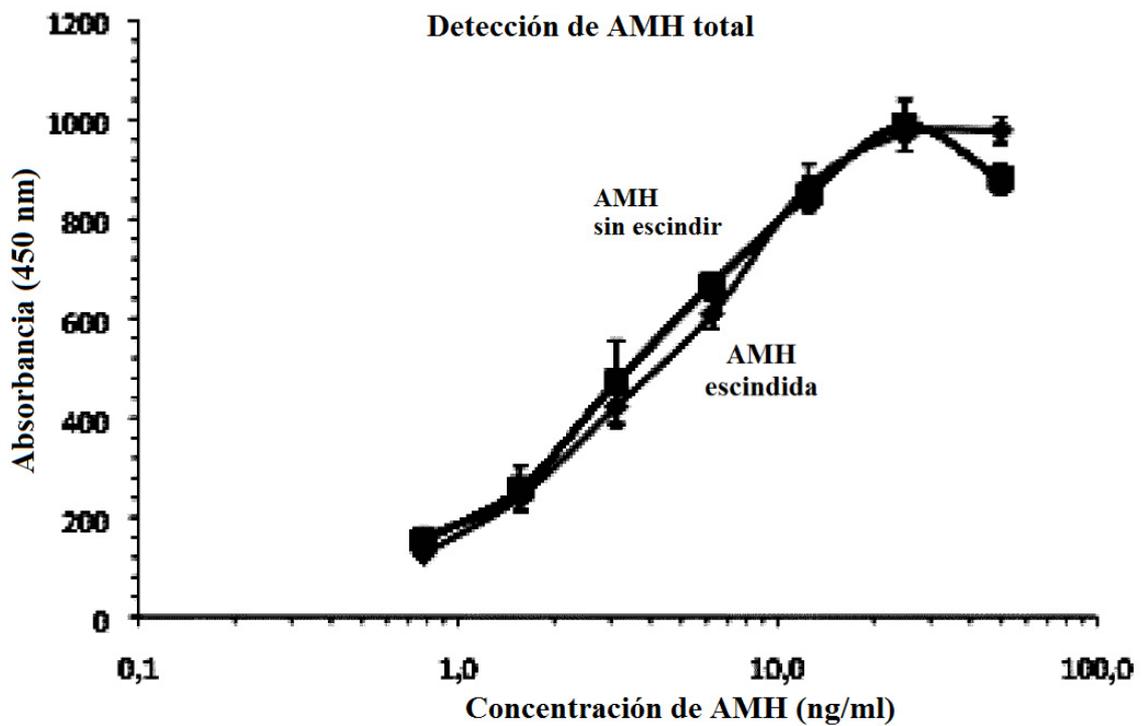


Figura 12B

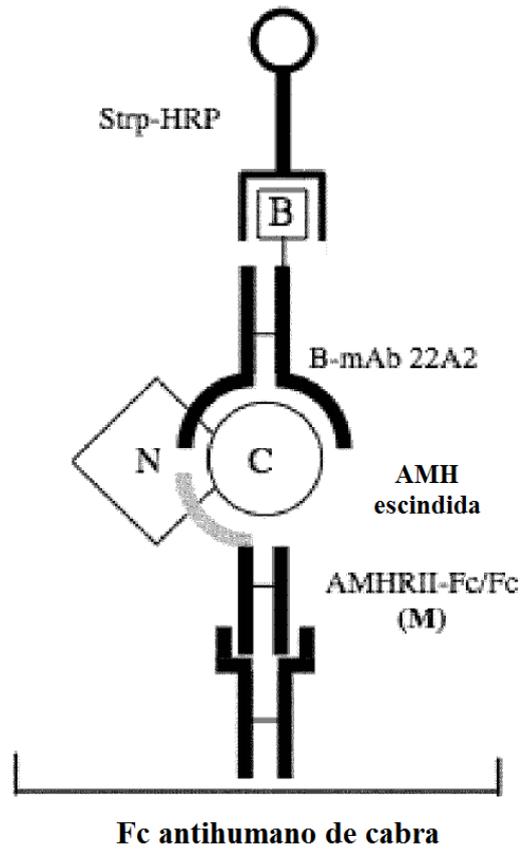


Figura 12C

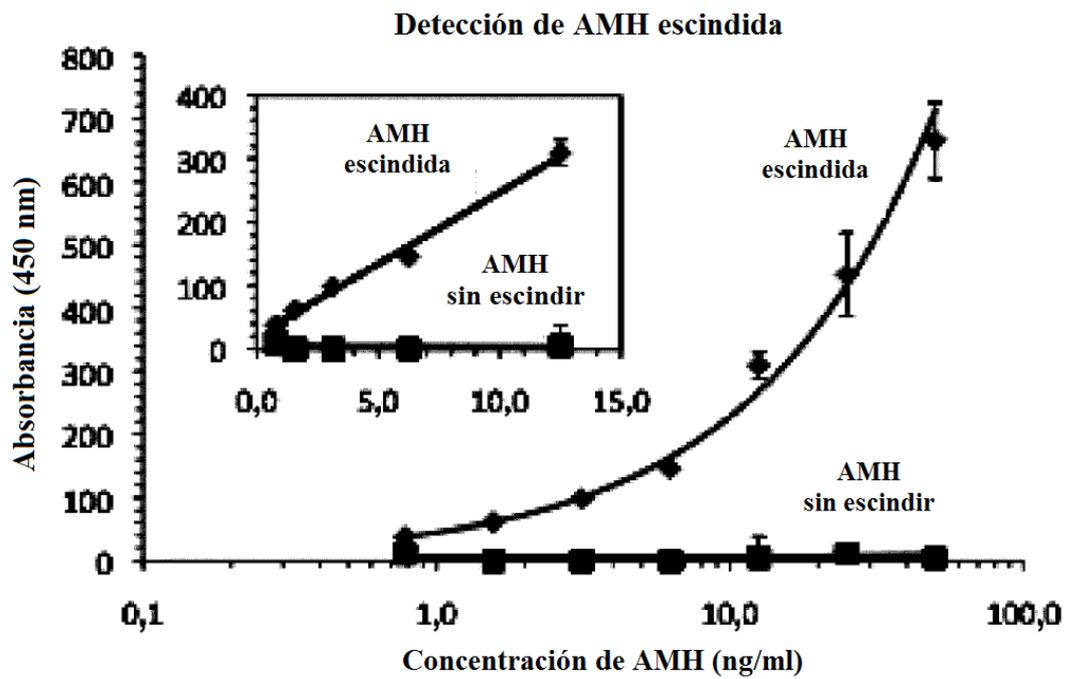


Figura 12D

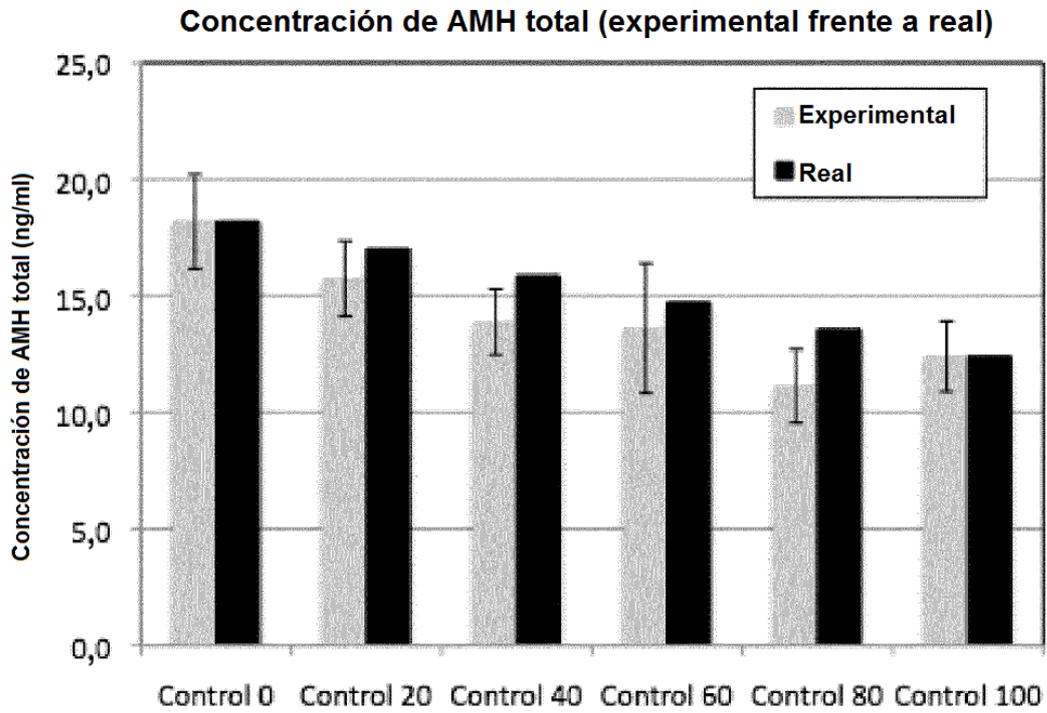


Figura 13A

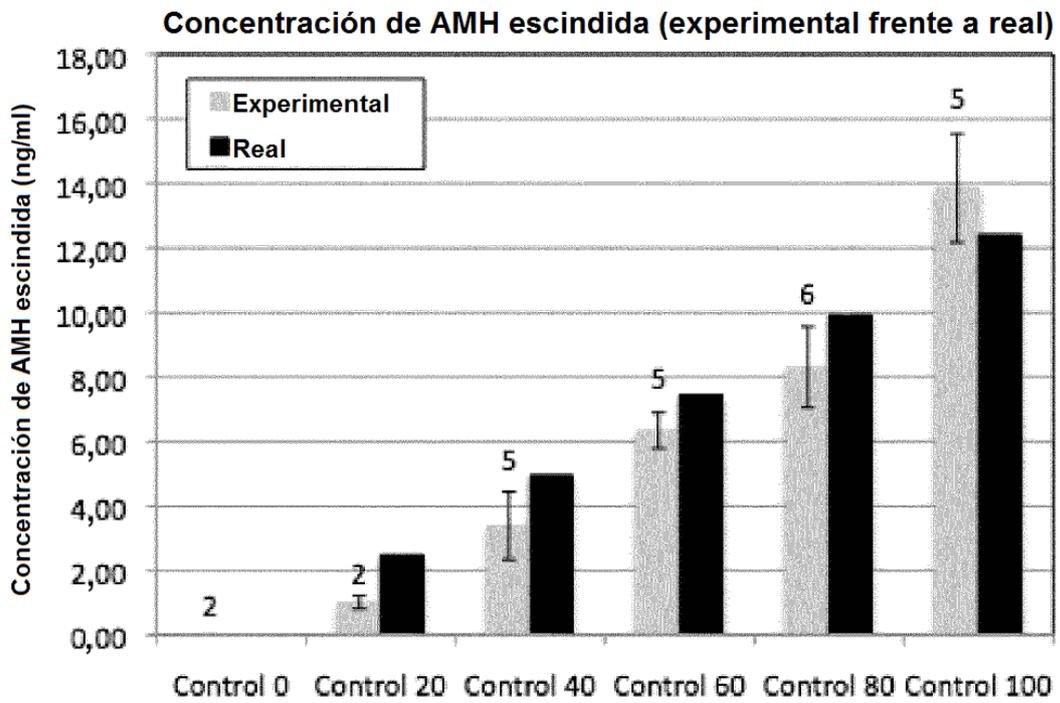
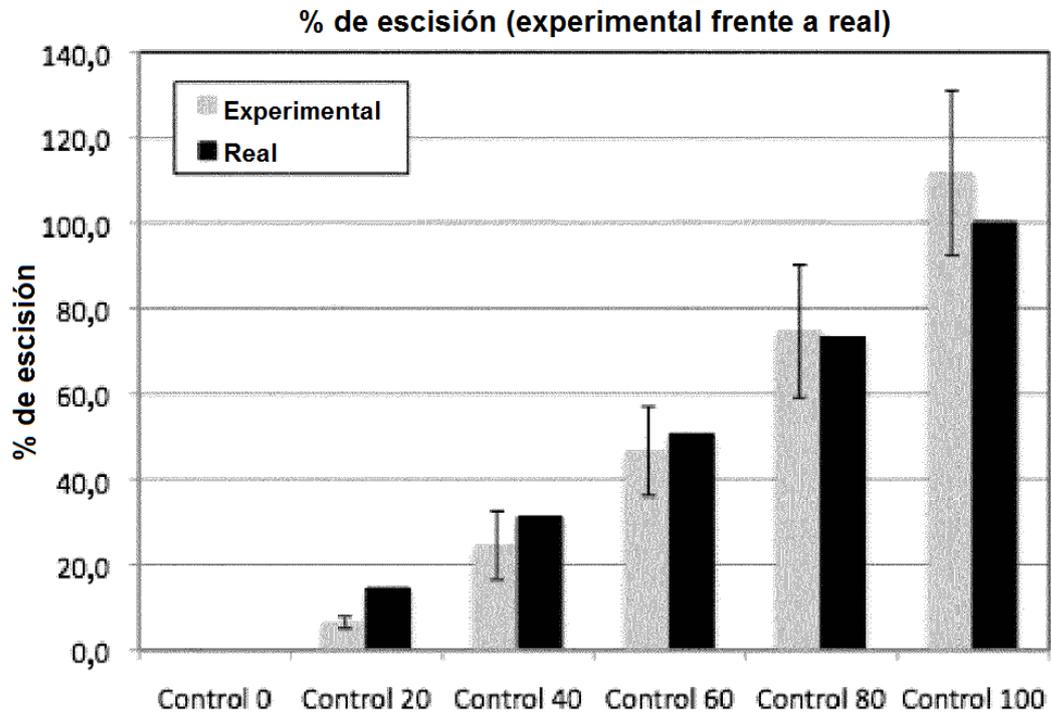
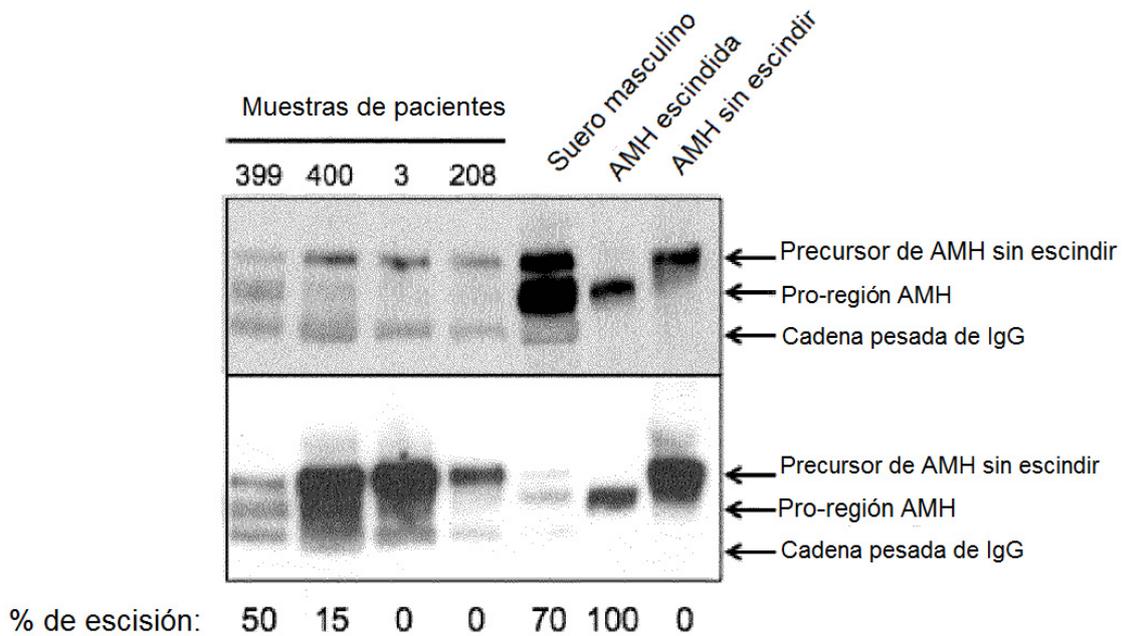


Figura 13B



**Figura 13C**



**Figura 14**