

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 743**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 15/04 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/GB2016/050175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16702975 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3250224**

54 Título: **Implantación de embriones**

30 Prioridad:

27.01.2015 GB 201501302
27.01.2015 US 201562108222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

73 Titular/es:

OSTARA BIOMEDICAL LTD (100.0%)
Liverpool Science Park 131 Mount Pleasant
Liverpool, Merseyside L3 5TF, GB

72 Inventor/es:

GOPICHANDRAN, NADIA;
ORSI, NICOLAS MICHEL y
BROOKE, DAVID ANDREW

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 790 743 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

Implantación de embriones

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para mejorar la tasa de éxito de la implantación de embriones y la tasa de éxito de la preñez en hembras no humanas, tras proporcionar un ambiente uterino inmunopermisivo antes de la inseminación o implantación de embriones. Los métodos de la presente invención se usan para hacer que el útero sea más receptivo o menos hostil a, por ejemplo, embriones transferidos, esperma u otro aloinjerto. La invención también incluye *entre otros* composiciones y formulaciones para su uso en los métodos de la invención.

Antecedentes

15 El ambiente uterino, si es hostil/no receptivo, puede ser responsable de bajas tasas de implantación de embriones de buena calidad tanto en humanos como en animales. Se cree que un ambiente uterino inadecuadamente preparado también puede ser responsable de muchos casos de fracaso reproductivo en términos de implantación fallida y aborto espontáneo. De manera similar, se reconoce que una falla en la preparación uterina en humanos es causante de complicaciones en el embarazo, como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal, que impiden el desarrollo placentario apropiado.

20 Los animales genéticamente alterados o modificados proporcionan modelos valiosos para evaluar nuevas terapias génicas y farmacológicas. *in vivo* y son la razón principal por la que el número de experimentos con animales ha aumentado en la última década. En el Reino Unido, en 2011 se llevaron a cabo más de cuatro veces más procedimientos científicos que usan animales genéticamente modificados en comparación con 1995. El uso de animales genéticamente modificados ahora representa más del 50 % de todos los procedimientos científicos en animales. La mayor categoría de uso es la cría (para producir animales genéticamente modificados), los roedores representan casi 1,8 millones de procedimientos en el Reino Unido solo en 2012, en una tendencia de fondo para que este número aumente anualmente. La transferencia de embriones en roedores respalda el desarrollo de enfoques transgénicos, la rederivación de cepas específicas y facilita el transporte de filas de animales a través de grandes distancias. Típicamente, la transferencia de embriones requiere la inducción de pseudopreñez en las hembras receptoras. Este fenómeno prepara al útero para implantar embriones, sin embargo, la tasa de éxito de la transferencia de embriones genéticamente modificados, a pesar de la inducción de la pseudopreñez, sigue siendo relativamente baja.

35 Los ratones son ovuladores espontáneos y pueden convertirse en pseudopreñantes después de un celo en el que la hembra se aparea con un macho genéticamente estéril como la cepa T145H-Re (que es estéril debido a una translocación cromosómica) que se obtiene de Harlan Laboratories Inc o con un macho vasectomizado. Ambos conjuntos de machos eyaculan el plasma seminal desprovisto de esperma funcional. Sin embargo, tanto los ratones genéticamente estériles como los vasectomizados son relativamente costosos. En el caso de los machos vasectomizados, no se puede garantizar que la esterilidad sea 100 % efectiva y necesita evaluaciones para cada macho, mientras que la producción de machos genéticamente estériles genera hembras excedentes no deseadas.

45 Alternativamente, puede inducirse una pseudopreñez mediante la simulación de los estímulos vaginales normales que se logra mediante el apareamiento con estimulación mecánica artificial, por ejemplo, mediante una herramienta de grabado vibrante (Kenney y otros; J Reprod. Fert. 1977, 49, 305-309). Se encontró que el número y la tasa de intromisiones fueron influencias cruciales en el éxito reproductivo (Diamond; Science, 1970, 169, 4, 995-997). Si bien este enfoque ha visto cierto éxito en ratas y ratones, la estimulación mecánica no tuvo ningún efecto sobre la inducción de pseudopreñez en el hámster dorado (Diamond y otros. J. Reprod. Fert. 1968, 17, 165-168). Cuando la hembra se aparea con un macho infértil o se estimula mecánicamente, el cuerpo lúteo persiste sin un embrión, lo que lleva a una pseudopreñez. La hembra desarrollará glándulas mamarias, lactato y construirá nidos en el estado de pseudopreñez. Existe la necesidad de mejorar los métodos para inducir un estado de pseudopreñez en animales para evaluaciones de laboratorio.

55 Aunque los protocolos para la transferencia de embriones en una variedad de especies de roedores están relativamente bien establecidos, su mala optimización significa que hay un desperdicio significativo de animales, lo que plantea una serie de problemas financieros y éticos en las unidades animales en todo el mundo. El enfoque estándar de la técnica anterior actualmente se basa en el apareamiento de hembras receptoras con machos vasectomizados para inducir pseudopreñez en lugar de estimulación mecánica, donde la actividad copulatoria y la exposición seminal del tracto reproductivo materno desencadena una respuesta inflamatoria neuroendocrina y localizada (al útero, principalmente) que involucra una cascada compleja de eventos mediados por citocinas y prostaglandinas orientados a crear un ambiente inmunopermisivo en el útero, de esta manera favorece el desarrollo embrionario previo a la implantación y/o la implantación de blastocistos y el establecimiento de la preñez. Incluso en ausencia de fertilización, el desarrollo lúteo y la producción de progesterona son compatibles, y la fisiología materna se orquesta para hacer que el útero sea receptivo a los embriones transferidos por hasta 10-13 días. Esta técnica se usa habitualmente para apoyar el desarrollo de embriones normales (regeneración/rederivación de cepas criopreservadas) o genéticamente modificados (transgénicos/quiméricos/clonados).

Sin embargo, la eficacia de este enfoque es limitada. Típicamente, cuatro veces más hembras se preparan para el procedimiento en comparación con las que quedan embarazadas. Cuando se implantan embriones frescos o congelados, esto representa un desperdicio considerable de material biológico y esfuerzo valiosos. Además, cantidades de machos jóvenes vasectomizados también necesitan mantenerse junto con las posibles receptoras: estas solo pueden aparearse 2-3 veces a la semana y típicamente se reemplazan cada 6-9 meses para mantener el rendimiento.

El apareamiento ocurre predominantemente cuando la hembra receptora está en celo. El ciclo de celo dura de 4-5 días en el ratón y la rata (equivalente al ciclo menstrual promedio de 28 días de una mujer), lo que lleva a la necesidad de depender de un gran grupo de hembras receptoras potenciales para participar en posibles apareamientos con machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera. Típicamente, el 75 % de las receptoras no están en celo en poblaciones de ciclo aleatorio, lo que lleva a un gran número de hembras y machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera que se mantienen y, en el caso de los primeros, a menudo no se usan como sustitutos para garantizar cantidades adecuadas de receptoras para su uso en transferencias programadas. Esto es particularmente evidente en los casos donde los embriones a transferir son particularmente valiosos. Las mejoras a este enfoque se han basado en la inducción de celo programado a través del efecto Whitten en las hembras receptoras. Esta estrategia se basa en la estimulación feromonal de las hembras receptoras, que típicamente las lleva al celo 3 días después de la exposición a la cama sucia de orina de los machos sementales. Sin embargo, la etapa del ciclo de las hembras en el momento de la exposición feromonal, la proximidad a las jaulas de los sementales y la edad de las receptoras pueden tener efectos adversos en la confiabilidad de este enfoque, lo que lo hace relativamente ineficiente.

Las posibilidades de que las hembras estén en celo (sexualmente receptivas) en el momento adecuado son 1:4 debido a la duración de su ciclo (4 días). Por lo tanto, si se requieren 4 receptoras, 16 hembras se aparearán con 16 machos, lo que se traduce en una tasa de éxito del 25 %. Esta cifra puede ser incluso más baja ya que algunas hembras se negarán a aparearse con su pareja. El punto clave es que aunque la mayoría de los criadores seleccionan hembras en celo, o inducen celo antes de aparearse con machos estériles, aún solo un porcentaje relativamente bajo (a menudo alrededor del 50 %, pero tan bajo como el 15 % en algunas instalaciones) de hembras en celo se convertirá en 'taponada' y, por lo tanto, se supone que está pseudopreñada. Además, las hembras también tienen una vida útil muy limitada de unos pocos meses de edad como receptoras de transferencia de embriones. Las hembras acumulan rápidamente grasa abdominal a medida que maduran, lo que hace que las transferencias laparotómicas de embriones (el método más común y exitoso) sean técnicamente demasiado desafiantes.

Se conoce que la eyaculación de líquido seminal es una mezcla compleja rica en una variedad de citocinas y prostaglandinas, y que algunas de las citocinas pueden tener un efecto positivo en el ambiente vaginal/uterino y otras pueden tener efectos nocivos que afectan en última instancia la receptividad al implante embrionario. Por ejemplo, la citocina proinflamatoria GM-CSF (CSF-2) está presente en la eyaculación de líquido seminal y también se conoce que es liberada por las células epiteliales endometriales en respuesta al plasma seminal a las pocas horas del coito (Robertson y otros. *Reprod Fertil Dev*, 1990. 2(4): p. 359-68) y que se requiere GM-CSF materno para la viabilidad y el crecimiento fetal (Robertson y otros. *Biology of Reproduction*, 1 de febrero de 1999 vol. 60 no. 2 251-261). Además el documento núm. WO1999067364 A1 describe medios suplementados con GM-CSF para promover el crecimiento de blastocistos y el documento núm. WO 2014087218 describe al GM-CSF como única sustancia que actúa para prevenir abortos involuntarios recurrentes.

La citocina IL-12 también está presente en la eyaculación del líquido seminal y se ha demostrado que es perjudicial para la preñez (Reina y otros. *Am J Reprod Immunol*. 2004 mayo;51(5):345-51) y es abortiva en altas concentraciones, particularmente en sinergia con la IL-18 y la IL-2, a través de la activación de linfocitos maternos (Hayakawa y otros. *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41: 320-329). Otros estudios han demostrado que las inyecciones de IL-12 (100 ng i.p. diariamente en los días 5, 6, 7 y 8 de preñez) en ratones CBA/J provocaron un aumento en la tasa de abortos en comparación con los controles (Zencussen y otros. *Scand J Immunol*. 2002 junio;55(6):560-9).

Mediante las composiciones y métodos de la presente invención, se prevé que la necesidad de ratones machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera puede reducirse drásticamente junto con una reducción significativa del uso de ratones hembras.

La presente invención tiene como objetivo mejorar las tasas de preñez en hembras de mamíferos en términos de preñeces establecidas y/o aumento del número de crías después de la inseminación artificial o natural o después del trasplante de embriones frescos o congelados o conservados de cualquier otra manera.

Breve resumen de la descripción

La presente invención reside en el uso de IL-12 y GM-CSF para mejorar las tasas de preñez y/o para reducir la alorreactividad materna contra el líquido seminal/la esperma o los embriones y/o para proporcionar un ambiente uterino inmunopermisivo en hembras antes de la implantación de un embrión o antes de la inseminación.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método no terapéutico para mejorar las tasas de preñez en hembras no humanas antes de la implantación de un embrión o antes de la inseminación, que comprende administrar una composición que consiste en IL-12 y GMCSF.

5 El método usa una composición de sustancia que consiste en IL-12 y GMCSF.

Preferentemente, la IL-12 es IL-12 p40 o IL-12p70.

10 Se describe pero no se reivindica, la composición para su uso en el método de la invención puede incluir además dos o tres de TGFβ, Eotaxina y RANTES.

15 Se describe pero no se reivindica, la composición para su uso en el método de la invención puede incluir además una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete citocinas adicionales seleccionadas del grupo que comprende MIP, G-CSF, MCP-1, IL-17, 1L-13, IL-9 y TNF-α.

20 La descripción describe la posibilidad de proporcionar una serie de combinaciones específicas de las citocinas descritas mediante el uso de la combinación básica de IL-12 y GM-CSF, con o sin otras citocinas adicionales para su uso en la inducción de un útero que sea más receptivo o menos hostil a la transferencia de embrión(es) o espermatozoides. Se describe pero no se reivindica un método que usa composiciones que comprenden una variedad de múltiples citocinas, ya que se reconoce que las altas concentraciones de una citocina específica en el líquido seminal no reflejan necesariamente su importancia biológica.

25 Se describe pero no se reivindica un método que usa composiciones que comprenden una o más de las citocinas adicionales seleccionadas del grupo que comprende IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, IL-18, FGF, IFN-α2, IFN-γ, IP-10, PDGF, VEGF, CTACK, KC, GROα, HGF, ICAM-1, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β-NGF, SCF, SCGF-β, SDF-1α, TNF-β, TRAIL y VCAM-1.

La Tabla 1 a continuación enumera los acrónimos para las citocinas que se mencionan en la presente invención:

30

Tabla 1: Citocinas analizadas mediante el uso de ensayos bio-plex	
IL-1α	Interleucina 1α
IL-1β	Interleucina 1β
IL-1ra	antagonista del receptor de Interleucina 1
IL-2da	antagonista del receptor de Interleucina 2
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-9	Interleucina-9
IL-10	Interleucina-10
IL12 (p40)	Interleucina-12 (p40)
IL-12 (p70)	Interleucina-12 (p70)
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-16	Interleucina-16
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
Eotaxina	Eotaxina

65

	FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
	G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
5	GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
	IFN-α 2	Interferón- α 2
	IFN-γ	Interferón- γ
10	IP-10	IFN- γ inducible proteína-10
	LEPTINA	Hormona asociada al control de peso
	MCP-1	Proteína quimiotáctica de macrófagos-1
15		
	MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 α
	MIP-1β	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 β
20	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
	RANTES	Quimiocinas expresadas y secretadas por células T normales reguladas tras la activación
25	TNF-α	Factor de necrosis tumoral
	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
	CTACK	Célula T cutánea que atrae quimiocinas
30	KC	Citocina derivada de queratinocitos
	GROα	Oncogén- α regulado por el crecimiento
	HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
	ICAM 1	Molécula de adhesión celular intercelular
35	LIF	Factor inhibidor de leucemia
	MCP3	Proteína quimioatrayente de monocitos-3
	M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
40	MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
	MIG	Monocina inducida por IFN- γ
	\square-NGF	Factor de crecimiento nervioso básico
45	SCF	Factor de células madre
	SCGF-β	Factor de crecimiento de células madre- β
	SDF-1α	Factor derivado de células estromales-1 α
50	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1
	TNF-β	Factor de necrosis tumoral- β
	TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
55	VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1

La presente invención reside en aprovechar las propiedades de los agentes seminales que promueven la receptividad uterina y en proporcionar una alternativa químico-física a los machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera, preferentemente en forma de un inserto vaginal como un pesario, gel, aerosol o afín a cualquier otro portador soluble.

La presente invención, ventajosamente, dado que la demanda de modelos animales transgénicos no humanos aumentará aún más, proporciona una alternativa a los machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera que inducen pseudopreñez y también reduce ventajosamente el número de hembras que se requieren tras mejorar la receptividad uterina a los embriones transferidos.

La presente invención evita ventajosamente la necesidad de machos vasectomizados o estériles de cualquier otra manera dado que su contribución se relaciona únicamente con la activación de las respuestas inflamatorias neuroendocrinas y uterinas que se requieren para inducir la pseudopreñez.

5 Preferentemente, la composición que consiste en IL-12 y GM que se usa en el método de la presente invención está en forma de un inserto vaginal o un dispositivo intrauterino para mejorar las tasas de preñez y/o para reducir la alorreactividad materna contra el líquido seminal/la esperma o los embriones y/o para proporcionar un ambiente uterino inmunopermisivo en hembras antes de la implantación de un embrión o antes de la inseminación.

10 Preferentemente, la hembra es un mamífero.

Preferentemente, la hembra de mamífero se selecciona del grupo que comprende ratón, rata, conejo, gerbo, curiel, hámster, primate (mono, simio), canino, felino, porcino o cualquier otro animal de laboratorio o especie en peligro de extinción en las que se colocan embriones.

15 Preferentemente, la hembra es un mamífero y aún con mayor preferencia es una raza/especie rara o una raza/especie en peligro de extinción.

20 Preferentemente, la hembra puede seleccionarse del grupo que comprende animales de las órdenes de Artiodactyla, Carnivora, Cetacea, Chiroptera, Dermoptera, Edentata, Hyracoidae, Insectivora, Lagomorpha, Marsupialia, Perissodactyla, Pholidata, Pinnipedia, Primates, Proboscidea, Rodentia, Sirenia y Tubulidentata.

25 Preferentemente, la cantidad de IL-12 y GM presente en la composición se libera, de cualquiera de sus formas de suministro como se describe de ahora en adelante, *in situ* ya sea por encima o dentro de su intervalo fisiológico aproximado encontrado en el líquido seminal.

Las citocinas se miden en pg/ml según los valores estandarizados que se reconocen en la técnica.

30 La presente invención reside en el aprovechamiento de las propiedades de los agentes seminales, especialmente las citocinas (que son moduladores de proteínas de la respuesta inmune y que promueven la receptividad uterina), tras proporcionar una formulación químico-física preferentemente en una forma adecuada para el suministro vaginal para su inserción en la hembra antes del apareamiento/la inseminación o antes de la implantación de embriones. La formulación que se introduce libera agentes que mejoran la receptividad del ambiente uterino.

35 El enfoque que se usa en la presente invención es imitar la señalización bioquímica mediada por plasma seminal mediante el uso de un sistema de suministro que se basa en un pesario, se basa en un gel, se basa en una solución, se basa en una emulsión, se basa en un polvo o se basa en un aerosol. Los pesarios se usan habitualmente en una serie de especies domésticas grandes (por ejemplo, ganado bovino) para la sincronización de la ciclicidad del celo para la transferencia de embriones/inseminación artificial. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha usado ningún pesario con las composiciones de la presente composición o para la función que se describe de promover la receptividad uterina y/o inducir un estado de pseudopreñez.

40 Preferentemente, las citocinas son recombinantes. Es decir que se preparan mediante ingeniería genética de una bacteria u otro tipo de célula mediante el uso de la tecnología recombinante.

45 La presente invención proporciona composiciones para las hembras que comprenden preparaciones de citocinas recombinantes, típicamente en forma de un pesario que se coloca en la vagina o una espuma de aerosol que se libera en la vagina antes de la inseminación/transferencia de embriones para reducir la alorreactividad inmune materna contra el esperma/los embriones, de esta manera mejora la tasa/el resultado de la preñez. El uso de este modo de suministro como estrategia para mejorar la receptividad endometrial es novedoso.

50 Preferentemente, la composición incluye además adyuvantes tales como conservantes, antioxidantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol o ácido fenol sórbico. Además, puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares o cloruro de sodio, por ejemplo. También puede ser beneficioso incluir ceras, agua y codisolventes.

55 Preferentemente la composición está en una forma adecuada para el suministro vaginal tal como una cápsula vaginal, gel vaginal, comprimido vaginal, polvo vaginal, solución vaginal, pesario vaginal, copa vaginal, esponja vaginal o espuma o aerosol vaginal. Con la máxima preferencia, la composición está en forma de un pesario vaginal.

Preferentemente, la formulación vaginal se disuelve o no se disuelve, es degradable o no degradable.

60 Preferentemente, las composiciones de la presente invención se preparan como un supositorio vaginal, comprimido, polvo, comprimido bioadhesivo, cápsula, micropartícula, micropartícula bioadhesiva, microcápsula, microesfera, liposoma, crema, loción, espuma, aerosol, película, pomada, solución, gel, o un gel, comprimido o cápsula de

liberación sostenida, o un supositorio de liberación sostenida que se administra a la vagina o se incorpora en un dispositivo vaginal.

También se describen, pero no son parte de la invención que se reivindica, las composiciones que se preparan para administración oral o rectal o como un comprimido recubierto para su uso en el suministro del tracto gastrointestinal para que puedan ser absorbidas por la mucosa del tracto gastrointestinal. La razón de estos modos de administración es que el sistema inmune de la mucosa en el sistema digestivo está vinculado al del tracto reproductivo. De este modo, se producirá la preparación de la mucosa, de esta manera facilitará la implantación del embrión, la tolerancia al aloinjerto/gameto/embrión, la autoinmunotolerancia o la tolerancia de la microflora endógena/exógena de los tractos reproductivo y digestivo.

Preferentemente, las composiciones de la presente invención se preparan como preparaciones multicapa, multinúcleo, microencapsuladas. Con mayor preferencia, los componentes activos de la composición se usan como material seco encapsulado en una cubierta/recubrimiento como una cápsula de gelatina.

Las composiciones para la administración vaginal se preparan preferentemente mediante la mezcla de las composiciones de la presente invención con ingredientes farmacéuticos o excipientes o portadores no irritantes adecuados tales como la manteca de cacao, el polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto se derriten en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo. Un ejemplo típico de un pesario vaginal incluiría los ingredientes activos y los excipientes siguientes: triglicéridos de cadena media y grasa dura.

Alternativamente, la composición puede incorporarse en un dispositivo intravaginal o un recubrimiento de dicho dispositivo, por ejemplo, un tampón o recubrimiento de dispositivo similar a un tampón, o incorporarse en una esponja, espuma, tira, polvo, pesario u otro material. El material absorbente o la matriz de dichos dispositivos pueden impregnarse con una composición de la presente invención como una solución líquida, loción de suspensión, polvo, crema, microemulsiones o suspensión de liposomas, nanopartículas bioadhesivas o micropartículas bioadhesivas. Preferentemente, el dispositivo vaginal se disuelve o no se disuelve, es degradable o no degradable.

Preferentemente, las composiciones incluyen además un agente mucoadhesivo, promotor de la sorción o potenciador de penetración. Las composiciones de la presente invención se suministran mediante suministro vaginal transmucosa y comprenden poner en contacto la mucosa vaginal con las composiciones de la presente invención.

Preferentemente, las composiciones para el suministro vaginal son para el suministro rápido, el suministro controlado, el suministro continuo o el suministro por pulsos.

Se prevé que la composición de la presente invención se formulará en una modalidad como un pesario con una fusión de cera lenta o una fusión de cera rápida para lograr un suministro continuo o rápido, respectivamente. En una modalidad alternativa, la composición de la invención se formulará en una espuma o gel con aditivos apropiados para permitir la liberación controlada.

Preferentemente, en el caso de proporcionar la composición de la presente invención como pesario vaginal, comprimido, comprimido bioadhesivo, cápsula, polvo, micropartículas, micropartículas bioadhesivas, el recubrimiento será abrasivo. Esta es una modificación apropiada a la composición que se suministra, especialmente si el pene del macho de la especie que se prepara para la receptividad uterina tiene una epidermis áspera, espinas queratinosas, etc. En este caso es conveniente que el vehículo de suministro vaginal insertado tenga un recubrimiento externo rugoso similar al del pene para provocar una respuesta inflamatoria materna para mejorar la penetración de la preparación en la mucosa, provocar una respuesta inflamatoria inicial y ayudar a la estimulación neuroendocrina genérica.

En una modalidad particularmente preferida de la invención la composición está en forma de pesario. Preferentemente el pesario tiene el tamaño y la forma adecuados para insertarse en la vagina de la hembra. El pesario puede tener un núcleo sólido y una capa porosa externa. Las dimensiones típicas de un pesario para ratones son un diámetro total de 4 mm y una longitud de 7 mm. El diámetro y la longitud del pesario dependen del tamaño de la vagina de la especie en la que se inserta, es deseable que el pesario tenga el tamaño y la forma para que cuando se inserte en la vagina se retenga sin incomodidad.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método no terapéutico para reducir la alorreactividad materna en un mamífero hembra no humano contra el líquido seminal/la esperma, los embriones, que comprende exponer la mucosa del tracto vaginal a una composición como se describió en la presente anteriormente, el método comprende:

- (i) introducir al menos un vehículo de suministro vaginal que comprende la composición de la presente invención en la vagina de la hembra;
- (ii) insertar opcionalmente vehículo(s) de suministro vaginal adicional(es);

(iii) permitir que transcurra un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes activos del vehículo de suministro vaginal se liberen y penetren en la vagina y se absorban transmucosalmente y/o difundan y/o se transporten al útero; y

(iv) inseminar a la hembra ya sea mediante el apareamiento con un macho o mediante inseminación artificial, gametos de donantes o tras introducir un embrión u otro aloinjerto en el útero para su implantación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método no terapéutico para mejorar la tasa o el resultado de la preñez en un mamífero hembra no humano antes de la inseminación o implantación de un embrión que comprende exponer la mucosa vaginal a una composición como se describió anteriormente, el método comprende:

(i) introducir al menos un vehículo de suministro vaginal que comprende las composiciones de la presente invención en la vagina de la hembra;

(ii) insertar opcionalmente vehículo(s) de suministro vaginal adicional(es);

(iii) permitir que transcurra un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes activos del vehículo de suministro vaginal se liberen y penetren en la vagina y se absorban transmucosalmente y/o difundan y/o se transporten al útero; y

(iv) inseminar a la hembra ya sea mediante el apareamiento con un macho o mediante inseminación artificial, gametos de donantes o tras introducir un embrión u otro aloinjerto en el útero para su implantación.

En una modalidad adicional de la invención, las etapas (iii) y (iv) se realizan simultáneamente/en una secuencia cronológica cercana en el caso de la inseminación artificial o natural. Los métodos de la invención usan una composición que comprende pesarios recombinantes que contienen citocinas, gel, aerosol o espuma que se colocan en la vagina en el momento de la inseminación/transferencia de embriones para reducir la alorreactividad inmune materna contra los espermatozoides/embriones/gametos o la microflora endógena o exógena, de esta manera mejora la tasa de preñez.

El número de dosis y el período entre dosis pueden variarse de acuerdo con las exigencias y pueden variar en dependencia de la especie o raza, el estado de super/ovulación, el efecto estacional, el estado de lactancia y el número de preñeces fallidas anteriores o inseminaciones o tratamientos de IVF previos. También puede variar en dependencia de la edad materna y si la hembra es *primigrávida*.

Preferentemente, los métodos de la invención cuando se usan para animales de laboratorio no humanos incluyen además la etapa de sincronización del celo en hembras receptoras.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit de partes y opcionalmente, un conjunto de instrucciones escritas, por lo tanto, el kit comprende una serie de vehículos de suministro vaginal que contienen las composiciones para su uso en los métodos de la invención y un aparato para insertar dichos vehículos de suministro vaginal en la vagina del mamífero hembra no humana receptora.

Se apreciará que las características descritas para el primer aspecto de la invención son igualmente aplicables a todos y cada uno de los aspectos de la invención y se aplican *mutatis mutandis*.

La invención se describirá a manera de ejemplo solamente con referencia a las figuras siguientes en donde:

Breve descripción de las figuras

Las modalidades de la invención se describen a continuación con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales: La Figura 1 muestra el modelo matemático bayesiano de redes de citocinas en plasma seminal de ratón. Los nodos (citocinas) están codificados por colores de acuerdo con la probabilidad condicional de que las concentraciones relativas del mediador correspondiente sean altas (verde), bajas (rojo) o medias (blanca) dado el(los) estado(s) de sus nodos principales (los gráficos de barras adyacentes para cada nodo reflejan las probabilidades condicionales subyacentes de categorización en uno de los tres contenedores de concentración de baja a la izquierda a alta a la derecha). La concentración normalizada (baja o alta) determina la intensidad del color del nodo. Los bordes (líneas de conexión causales entre nodos) representan interacciones causales dirigidas entre nodos. Estas citocinas interactuarán con el tracto reproductivo materno para inducir inmunopermisividad a los antígenos paternos.

La Figura 2 muestra el modelo matemático bayesiano de redes de citocinas en plasma seminal de rata (los detalles se discutieron anteriormente). Los bordes de nivel de confianza muy alto están coloreados en rojo, en base al análisis de confianza del resultado bayesiano (se basa en la ocurrencia en > 90 % de iteraciones de bootstrap).

Descripción detallada

La referencia en la presente descripción a "embrión" pretende incluir una blástula, un blastocisto, un óvulo fecundado o un organismo en sus primeras etapas de desarrollo, especialmente antes de que haya alcanzado una forma distintivamente reconocible que se implantará en una receptora femenina. Los términos se usan indistintamente.

La referencia en la presente descripción a una "tasa de preñez mejorada" pretende incluir un resultado positivo de la preñez o una supervivencia perinatal mejorada o la viabilidad general después de la inseminación artificial con semen procesado o inseminación natural o después del trasplante de embriones frescos o congelados o conservados de cualquier otra manera. El término preñez como se usa en lo sucesivo, debe interpretarse como que abarca una preñez resultante de la inseminación natural o artificial o después del trasplante de embrión(ones) y gametos frescos o congelados o conservados de cualquier otra manera.

La referencia en la presente descripción a un "inserto vaginal" o un "dispositivo intrauterino" pretende incluir cualquier sistema de suministro que se basa en un pesario, se basa en un gel, se basa en una solución, se basa en una emulsión, se basa en un polvo o se basa en un aerosol, que sea capaz de suministrar las composiciones de la presente invención en la vagina para así permitir que las composiciones de la presente invención tengan un efecto farmacológico en el ambiente vaginal/uterino.

La referencia en la presente descripción a un "pesario" pretende ser un medio de suministro de las sustancias farmacéuticas de la presente invención para que se absorban fácilmente a través de las superficies mucosas de la vagina, o pretende tener acción en el área, por ejemplo contra la inflamación, o en el útero.

El "ingrediente farmacéutico" o "excipiente" se refiere a un compuesto farmacológicamente inactivo farmacéuticamente aceptable que se añade a una composición mucoadhesiva de la invención. El ingrediente o excipiente no tiene propiedades farmacológicas.

El "suministro rápido" se refiere a la liberación y el suministro rápido inicial inmediato de los componentes de la composición. El suministro rápido es seguido típicamente por una reducción dependiente del tiempo en la liberación de los componentes de la composición o dispositivo y el suministro del fármaco al plasma/a los tejidos de la pared uterina (o al tracto gastrointestinal, cuando sea apropiado).

El "suministro controlado" significa una liberación en donde el agente activo se libera del material de una manera prediseñada. La liberación del agente activo puede ser constante durante un período prolongado, puede ser cíclica durante un período prolongado, o puede desencadenarse por el ambiente u otros eventos externos.

El "suministro continuo" se refiere a la liberación continua e ininterrumpida de los componentes de la formulación o dispositivo y el suministro de dichos componentes de manera continua. El suministro continuo puede estar precedido por el suministro rápido.

El "suministro por pulsos" se refiere a una liberación y suministro de los componentes a intervalos intermitentes. Dicho suministro por pulsos puede proporcionarse, por ejemplo, mediante la formulación de la composición en capas individuales intercaladas con capas inactivas de recubrimientos solubles o mediante el uso de diferentes ingredientes farmacéuticos.

40 Análisis de citocinas de líquido seminal

Los ratones machos CD1 sexualmente maduros ($n = 20$) y las ratas Wistar ($n = 20$) se sacrificaron y se recogió líquido seminal de las glándulas seminales *post mortem*, se seleccionó un enfoque *post mortem* para evitar la recogida de muestras por electroeyaculación, ya que la calidad del semen es variable por este método, y porque las muestras se coagulan rápidamente, lo que dificulta su análisis. El muestreo de vesículas seminales es ideal ya que el líquido (en lugar del de las glándulas accesorias) contiene los factores inmunomoduladores del tracto materno investigados y porque las secreciones de las glándulas coagulantes pueden evitarse más fácilmente.

Las muestras de líquido seminal se pesaron individualmente, se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA) y se volvieron a pesar. Mediante inferencia al peso estándar: relación de volumen del líquido seminal murino, fue posible determinar el volumen original aislado y el factor de dilución introducido por el PBS. Esta etapa fue necesaria porque el líquido es demasiado viscoso para ser pipeteado con precisión. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se analizó simultáneamente para las siguientes 23 citocinas: interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, eotaxina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interferón (IFN)- γ , quimiocina derivada de queratinocitos (KC), proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, proteína inhibidora de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , quimiocinas expresadas y secretadas por células T normales reguladas tras la activación (RANTES) y factor de necrosis tumoral (TNF)- α . Esto se logró mediante kits personalizados de inmunoensayo de fase fluida de 23 plex ejecutados en un Luminex-100™ equipado con el programa StarStation™. El diluyente sérico se usó en todos los casos para evitar falsos positivos/negativos y la dilución se ajustó a 1:1 para maximizar la sensibilidad a los niveles basales. Se realizó un análisis similar en líquido seminal de rata.

Ejemplo 1

La Tabla 2 a continuación muestra una variedad de citocinas que se analizaron y se midieron en líquido seminal de ratón. La eotaxina y RANTES parecen ser las citocinas predominantes presentes, con niveles superiores a 500 pg/ml. IL-9, TNF- α y MIP-1a tenían niveles superiores a 100 pg/ml, mientras que varias citocinas como G-CSF e IFN- γ tenían niveles entre 50-100 pg/ml y varios otros como IL-13 y TGF- β tenían niveles inferiores a 50 pg/ml.

Tabla 2

Ratón	Media	SEM
IL-1 α	8,19	1,96
IL-1 β	87,48	9,04
IL-2	3,03	0,49
IL-3	0,35	0,04
IL-4	0,11	0,01
IL-5	0,56	0,07
IL-6	3,63	0,44
IL-9	135,14	33,47
IL-10	19,95	3,36
IL-12 p40	5,25	0,53
IL-12 p70	10,91	1,08
IL-13	20,64	1,86
IL-17	5,10	0,90
Eotaxina	857,22	73,85
G-CSF	45,03	3,33
GM-CSF	4,16	0,39
IFN- γ	46,38	3,95
KC	37,17	3,56
MCP-1	30,23	2,65
MIP-1 α	114,32	8,31
MIP-1 β	6,68	1,36
RANTES	618,62	84,17
TNF- α	102,27	9,11
TGF- β	27,63	6,54

La Tabla 3 a continuación muestra una variedad de citocinas que se analizaron y se midieron en líquido seminal de rata. RANTES parece ser la citocina predominante presente. De las citocinas analizadas, solo RANTES y GRO/KC tenían niveles superiores a 200 pg/ml. La IL-10 e IL-6 tenían niveles superiores a 100 pg/ml, mientras que varias citocinas como MCP-1 tenían niveles entre 50-100 pg/ml y varias otras como IL-17 tenían niveles inferiores a 50 pg/ml.

TABLA 3

Rata	Media	SEM
IL-1 α	3,28	0,97
IL-1 β	20,41	0,84
IL-2	29,11	3,40
IL-4	20,17	1,13
IL-5	9,58	0,95

5
10
15
20
25
30

IL-6	149,17	1,13
IL-9	54,56	0,84
IL-10	114,89	1,45
IL-12 p70	55,14	4,31
IL-13	8,29	1,35
IL-17	15,80	1,11
IL-18	6,66	0,89
TNF- α	2,27	0,16
IFN- γ	2,93	0,39
Eotaxina	34,84	1,45
GCSF	1,51	0,07
GMCSF	40,53	2,10
MCP-1	61,56	2,21
LEPTINA	43,69	2,61
MIP-1 α	0,13	0,02
IP-10	4,24	0,34
GRO/KC	228,00	2,10
RANTES	287,31	2,21
VEGF	0,00	0,00
TGF- β	0,00	0,00

Ejemplo 2

35
40

La eotaxina y RANTES parecen ser las citocinas predominantes, cada una está presente en una cantidad de más de 500 pg/ml (véanse las Tablas 1 y 2). Las citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), GM-CSF y MIP-1 β estaban presentes en niveles inferiores a 20 pg/ml y las citocinas IL-1 β , IL-9, IL-13, G-CSF, TNF- α , MCP-1, KC, MIP-1 α e IFN- γ estuvieron presentes en niveles superiores a 20 e inferiores a 150 pg/ml. Sin embargo, como se indicó anteriormente en la presente, el nivel de citocinas presentes no se correlaciona necesariamente con el efecto o la potencia.

45

En base a estos análisis, se preparó una solución de citocinas de ratón recombinantes evaluadas en cultivo celular en PBS mediante el uso de citocinas recombinantes a las concentraciones encontradas en el líquido seminal (Tabla 3). Esta se almacenó a -80 °C hasta que se requirió para embeber el pesario.

TABLA 4 Concentraciones de citocinas *en el útero* en una preparación de pesario de ratón una vez solubilizada.

50
55
60
65

Citocina	Concentración de la solución del pesario (pg/ml)
IL-1 α	8,19
IL-1 β	87,48
IL-6	3,63
IL-9	135,14
IL-10	19,95
IL-12 (p40)	5,25
IL-12 (p70)	10,91
IL-13	20,64
G-CSF	45,03
GM-CSF	4,16

TNF- α	102,27
MCP-1	30,23
RANTES	618,62
Eotaxina	857,22
KC	37,17
MIP-1 α	114,32
MIP-1 β	6,68
IFN- γ	46,38

5

10

15 Ejemplo 3

Los componentes adicionales de la formulación de pesarios para animales de laboratorio se establecieron principalmente por la toxicidad (en caso de ingestión accidental), la palatabilidad (para desaconsejar la ingestión) y el impacto en el pH luminal (la bioactividad de ciertas citocinas es promovida por el pH vaginal). El tamaño y la forma de los pesarios está determinado en gran medida por la especie para la que se destina su uso. Por ejemplo, los pesarios de aproximadamente 4 mm de diámetro son particularmente adecuados para ratones, ya que el tamaño se ha determinado como apropiado para la inserción sin incomodidad indebida y también es de un tamaño adecuado para que se retenga en el vestíbulo vaginal. Los animales de laboratorio más grandes o incluso las razas más grandes de ratones pueden necesitar pesarios más grandes. Los pesarios se hicieron de nylon grabado con láser en un ajuste de entre 5-10 vatios, el uso de esta técnica permite manipular la porosidad (que facilita la 'carga') y la forma y dimensiones generales. Se prevé que los pesarios se proporcionarán en una variedad de tamaños y que los tallos pueden extraerse de una unidad central de retención para su uso como se desee y que puede proporcionarse al usuario una gama de diferentes tamaños de pesarios. Los pesarios se preparan para su uso tras sumergirlos durante una noche en 500 μ l de 100 veces la concentración de la solución de citocina para cargar los pesarios con los agentes activos necesarios para garantizar un líquido seminal como la concentración final en el tracto reproductivo materno. Después, una cabeza del pesario se retira del tallo y se inserta por medio de un dispositivo adecuado directamente en la vagina del ratón. Después, el pesario se deja en la vagina del ratón durante un período de tiempo y después se extrae en el momento de la transferencia de embriones cuando los animales están anestesiados, o se auto-disuelve o el pesario se expulsa una vez que los ingredientes activos han sido absorbidos.

20

25

30

35

Se apreciará que la modalidad anterior es solo un ejemplo de un medio de suministro de las composiciones de la presente invención y que el pesario puede estar en forma de una formulación de tipo cera de fusión lenta o rápida y que el método de suministro de las composiciones de la presente invención puede variar de una especie a otra. Los medios de suministro también pueden estar en forma de un producto biodegradable y por ejemplo, en humanos, una esponja vaginal puede ser un método más conveniente para suministrar las composiciones.

40

Ejemplo 4

Las transferencias de embriones en ratones CD1 se investigaron mediante el uso del protocolo siguiente y combinaciones de citocinas.

45

Los embriones se trataron mediante el uso de M2, que es un medio común para el cultivo *in vitro* de embriones en etapa de pre-implantación. M2 es una solución de bicarbonato de Krebs-Ringer modificada y se usó con HEPES para la transferencia de embriones. Sin embargo, si los embriones se mantuvieron durante un período de tiempo prolongado (tiempo > 4 transferencias de embriones), se transfirieron a una placa que contenía KSOM tamponado con bicarbonato + mezcla de Eagle (aminoácidos) + 1 mg/ml de BSA y se mantuvieron bajo 5 % de CO₂ en una incubadora a 37 °C. Los ratones donantes tienen aproximadamente de 4-6 semanas de edad y las receptoras tienen aproximadamente de 6-10 semanas de edad. Se seleccionaron intervalos de peso específicos, ya que el peso es un factor importante a considerar y los ratones deben ser de 20-30 gramos, ya que los menores de 20 gramos puede que no soporten la preñez y en los mayores de 30 gramos la grasa abdominal presente dificultará la transferencia de embriones.

50

55

Se insertaron los pesarios tras sostener a las hembras por la nuca y permitir que se calmen/relajen, después se recogieron 35 μ l del líquido de lavado en una pipeta Pasteur de punta estrecha y el líquido se introdujo en la vagina. El líquido se purga y se recoge 4-5 veces (se termina en una purga). El pesario se inserta manualmente después del enjuague, con el ratón todavía por la nuca. La cola en el pesario se usa para empujar el pesario hacia el otro lado de los músculos vaginales y puede sentirse cuando el pesario no avanza más. La retención del pesario a menudo es corta en algunos animales y solo se monitorea durante el tiempo necesario para insertar todos los pesarios en el día.

60

Después, se devuelven las hembras a sus cajas con los compañeros de caja a continuación de la transferencia de embriones. Los clips quirúrgicos se retiran 5-7 días después de la cirugía. Cuando se verifican implantaciones (no nacimientos vivos), las hembras se sacrifican 10 días después de la transferencia del embrión y se documenta el

65

número de fetos presentes en el cuerno uterino. En esta etapa, pueden observarse resorciones (más pequeñas y de diferente color que otros fetos) y también se registran. Para los nacimientos vivos, las hembras se alojan en grupo hasta aproximadamente los 18 días de preñez. Pueden monitorearse visualmente para detectar signos de preñez y se pesan antes de la transferencia de embriones y después semanalmente hasta el nacimiento. Esto ayuda a identificar si la hembra puede haber perdido su camada o haberla destruido antes de que se vieran las crías. La masa corporal de la cría se registra a los 7 días de edad y al destete (20-21 días). Las crías también son sexadas al destete.

La Tabla 5 a continuación muestra el protocolo de los días 1 a 6.

Día	Hembras donantes	Hembras receptoras	Comentarios
1	Cama masculina		
2	PMSG	Cama masculina	5 IU
3		PMSG	2,5 IU
4	hCG y apareamiento con machos sementales		5 IU
5	Comprobación de tapones	hCG y apareamiento con machos vasectomizados/administrar tratamiento de pesario	2,5 IU
6	Cultivo de embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Comprobación de los tapones de los apareamientos con machos vasectomizados • Transferencias de embriones 	Se transfirieron 15 embriones unilateralmente al oviducto por laparotomía

Los grupos de tratamiento fueron los siguientes, machos vasectomizados (Vsx) y pesarios que consisten de una mezcla MIP, IL-12, IL-13, G-CSF y GM-CSF (5 mezclas) más otros pesarios de las cinco citocinas como componentes individuales (no se muestran todos los datos) y otros pesarios de combinaciones, GM-CSF con IL-12, GM-CSF con IL-12 e IL-13 y GM-CSF con IL-12 y MIP. Se registraron las preñeces exitosas totales con transferencia de embriones.

La Tabla 6 muestra el tratamiento (pesarios de citocinas) contra el resultado exitoso de la preñez.

Tabla 6

Tratamiento	Exitoso/total
Vsx	1/3
mezcla 5	1/5
IL-12	3/5
GM-CSF + IL-12	4/5
GM-CSF + IL-12 + IL-13	2/5
GM-CSF + IL-12 + MIP	0/5

Estos datos respaldan la presente invención al mostrar que la IL-12 sola o en combinación puede usarse para aumentar exitosamente la tasa de implantación en comparación con los métodos de la técnica anterior.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprenden" y "contienen" y las variaciones de las palabras significa "que incluyen pero sin limitarse a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos componentes, enteros o etapas. A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera de cualquier otra manera. En particular, donde se use el artículo indefinido en la descripción, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera de cualquier otra manera.

Los rasgos, números enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con estos. Todas las características descritas en esta descripción (que incluyen cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no se restringe a los detalles de ninguna modalidad anterior. La invención se extiende a cualquier

característica nueva, o cualquier combinación nueva de las características descritas en esta descripción (incluyendo cualquier reivindicación, resumen y dibujos adjuntos), o a cualquier característica nueva o cualquier combinación nueva, de las etapas de cualquier método o proceso así revelado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método no terapéutico para mejorar las tasas de preñez en hembras no humanas antes de la implantación de un embrión o antes de la inseminación, que comprende administrar una composición que consiste en IL-12 y GM-CSF como ingredientes activos en la vagina de un receptor.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la IL-12 es IL-12 p40 o IL-12p70.
- 10 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está en forma de un inserto vaginal o un dispositivo intrauterino.
- 15 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde los ingredientes activos IL-12 y GM-CSF se liberan *in situ* ya sea por encima o dentro del intervalo fisiológico aproximado como los encontrados en el líquido seminal.
- 20 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la IL-12 y el GM-CSF son recombinantes.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el inserto vaginal es una cápsula vaginal, gel vaginal, comprimido vaginal, polvo vaginal, solución vaginal, pesario vaginal, copa vaginal, esponja vaginal, pulverizador vaginal o espuma o aerosol vaginal.
- 25 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye además un adyuvante, excipiente o portador.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para el suministro rápido, suministro controlado, suministro continuo o suministro por pulsos.
- 30 9. Un pesario para el suministro vaginal transmucoso de IL-12 y GM-CSF como ingredientes activos en un método no terapéutico para mejorar las tasas de preñez.
10. Un pesario de acuerdo con la reivindicación 9 para promover la receptividad uterina en un roedor.
- 35 11. Un pesario de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el roedor es un ratón o una rata.
- 40 12. Un método no terapéutico para reducir la alorreactividad materna en una hembra de mamífero no humano contra el líquido seminal/la esperma, los embriones, que comprende exponer la mucosa vaginal a una composición que consiste en IL-12 y GM-CSF como ingredientes activos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el pesario de las reivindicaciones 9 a 11, el método que comprende:
 - (i) introducir al menos un vehículo de suministro vaginal que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el pesario de las reivindicaciones 9 a 11, en la vagina de la hembra;
 - (ii) insertar opcionalmente vehículo(s) de suministro vaginal adicional(es) según sea necesario;
 - (iii) permitir que transcurra un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes activos del vehículo de suministro vaginal se liberen y penetren en la vagina y se absorban transmucosalmente y/o difundan y/o se transporten al útero; y
 - (iv) inseminar a la hembra ya sea mediante el apareamiento con un macho o mediante inseminación artificial, gametos de donantes o tras introducir un embrión u otro aloinjerto en el útero para su implantación.
- 50 13. Un método no terapéutico para mejorar la tasa o el resultado de la preñez en una hembra de mamífero no humano antes de la inseminación o implantación de un embrión que comprende exponer la mucosa vaginal a una composición que consiste en IL-12 y GM-CSF como ingredientes activos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el pesario de las reivindicaciones 9 a 11, el método que comprende:
 - (i) introducir al menos un vehículo de suministro vaginal que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el pesario de las reivindicaciones 9 a 11, en la vagina de la hembra;
 - (ii) insertar opcionalmente vehículo(s) de suministro vaginal adicional(es) según sea necesario;
 - (iii) permitir que transcurra un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes activos del vehículo de suministro vaginal se liberen y penetren en la vagina y se absorban transmucosalmente y/o difundan y/o se transporten al útero; e
 - (iv) inseminar a la hembra ya sea mediante el apareamiento con un macho o mediante inseminación artificial, gametos de donantes o tras introducir un embrión u otro aloinjerto en el útero para su implantación.
- 60 14. Un kit de partes que comprende varios vehículos de suministro vaginal que contienen la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el pesario de las reivindicaciones 9 a 11 y un aparato para insertar dichos vehículos de suministro vaginal en la vagina de la hembra no humana receptora y opcionalmente un conjunto de instrucciones escritas en consecuencia.

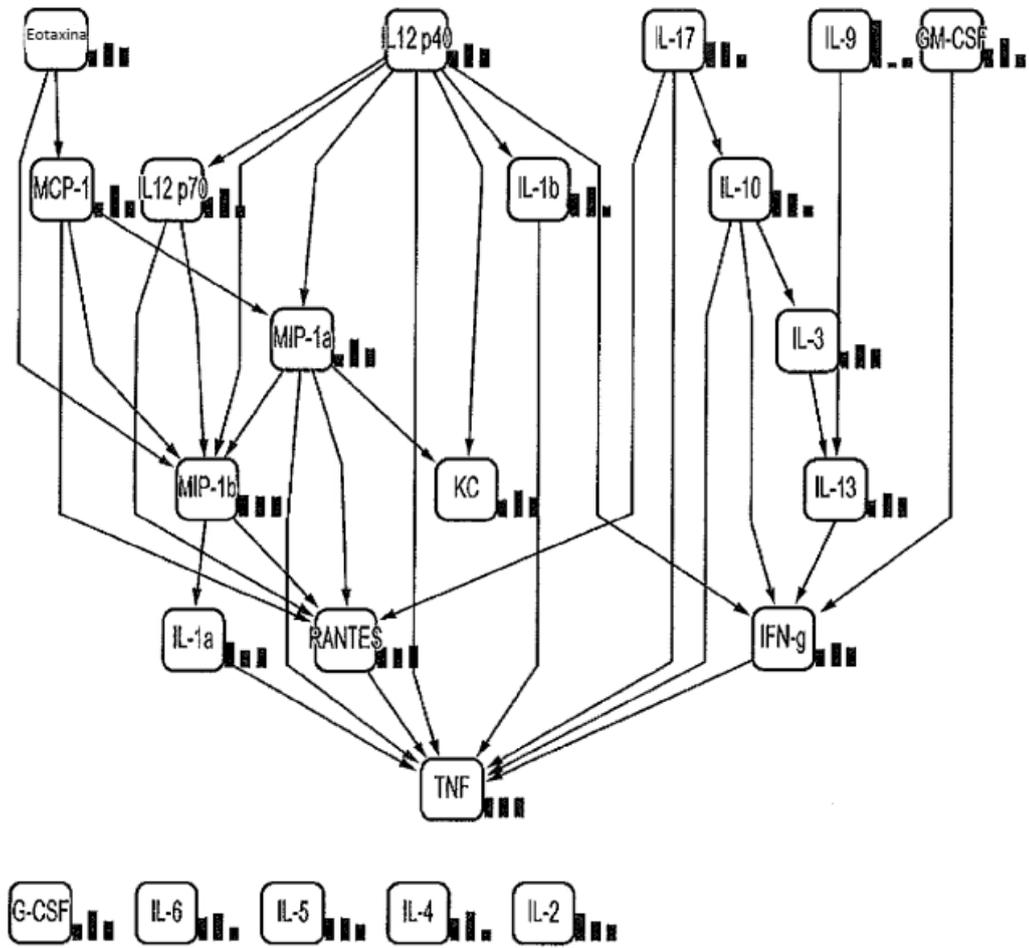


Figura 1

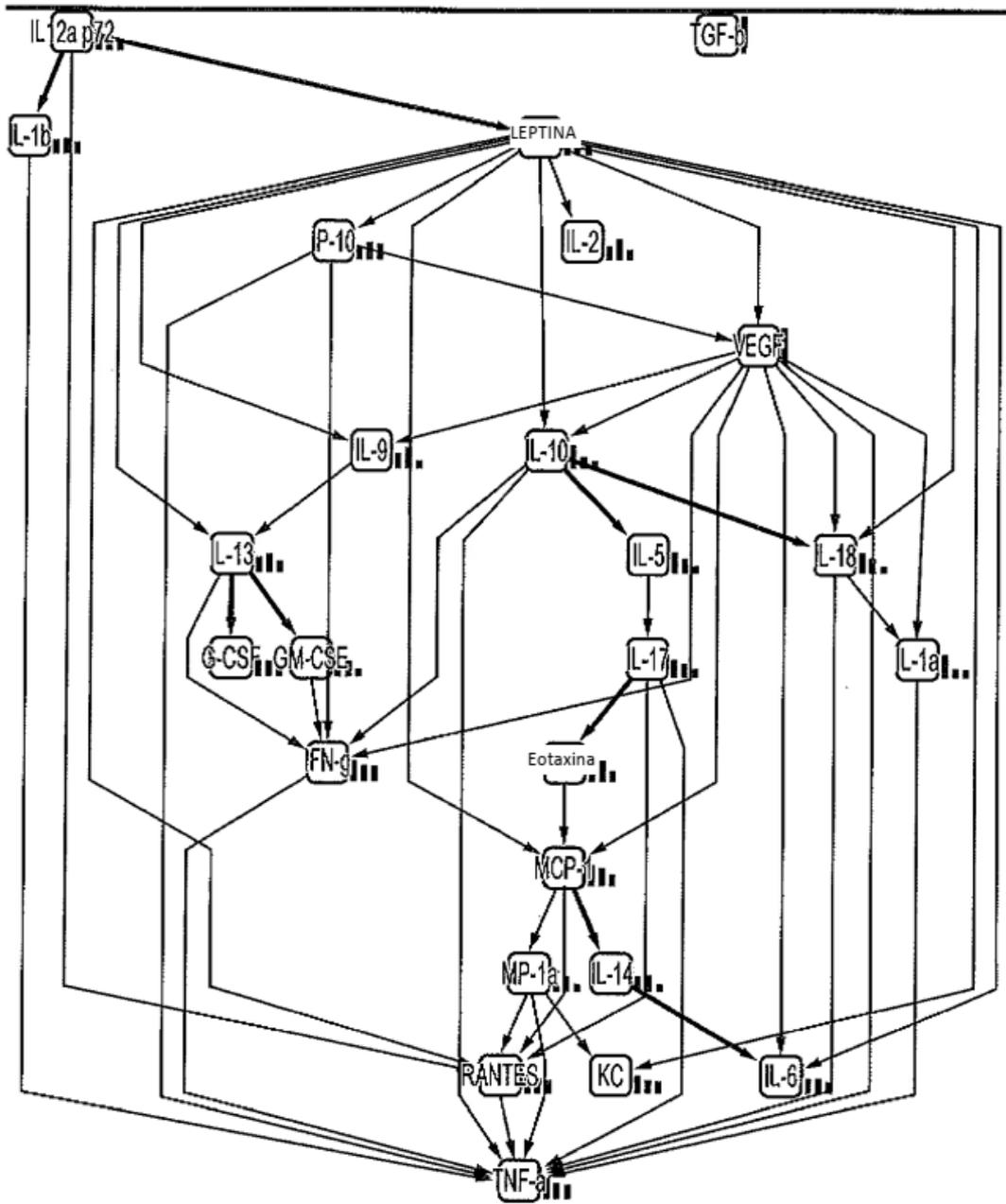


Figura 2