

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 697**

51 Int. Cl.:

A61K 35/55 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2008 PCT/US2008/085072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09073574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08856937 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2244717**

54 Título: **Actividad de la hormona folículo estimulante equina recombinante**

30 Prioridad:

30.11.2007 US 991297 P

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

13.12.2018

73 Titular/es:

**ASPENBIO PHARMA, INC. (100.0%)
1585 South Perry Street
Castle Rock, CO 80104, US**

72 Inventor/es:

**COLGIN, MARK;
BOIME, IRVING;
ROSER, JANET y
NISWENDER, KORY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 693 697 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

Actividad de la hormona folículo estimulante equina recombinante

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio sobre la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 60/991.297, presentada el 30 de noviembre de 2007, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad en la medida en que no sea inconsistente con la divulgación del presente documento.

10

Antecedentes de la invención

La progesterona se requiere para mantener la preñez, y las bajas concentraciones de progesterona se asocian con la infertilidad. Las concentraciones de progesterona en sangre están influidas por las tasas de secreción y de metabolismo/eliminación. Hay una evidencia de que las vacas lecheras actuales mantienen concentraciones de progesterona en sangre más bajas que las medidas en el ganado vacuno de hace varias décadas (Lucy et al. (1998) "Reproductive endocrinology of lactating dairy cows selected for increased milk production", J. Anim. Sci., 76 (Supl. 1):296). Un cuerpo lúteo más grande secreta más progesterona y tiene un efecto positivo sobre el reconocimiento de la preñez y en las tasas de preñez, pero hay evidencias de que las vacas lecheras tienen cuerpos lúteos más pequeños de lo deseable en algunas circunstancias (Lucy 2001, citado anteriormente; Vasconcelos et al. (2001) "Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate," Theriogenology, 56:307-314). El hígado es el sitio principal del metabolismo de la progesterona. Los estudios recientes demuestran que un aumento en la ingesta de alimento aumenta el flujo sanguíneo en el hígado y aumenta la tasa de eliminación de progesterona, reduciendo de este modo las concentraciones de progesterona sérica (Sangsritavong et al. (2000) "Liver blood flow and steroid metabolism are increased by both acute feeding and hypertrophy of the digestive tract", J. Anim. Sci., 78(Supl 1)221; y Wiltbank, M.C. et al. (2001) "Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows", J. Dairy Sci., 84(Supl. 1):84).

La baja progesterona sérica durante la fase lútea del ciclo del estro se asociaría con una tasa de concepción baja en la primera inseminación. Las bajas concentraciones de progesterona pueden ser resultado de una secreción inadecuada o niveles alternativamente altos de metabolismo/eliminación, incluso cuando la inseminación ha producido un embrión potencialmente viable. La baja progesterona permitiría la generación de prostaglandina por el endometrio uterino en aproximadamente el día 16 del ciclo del estro bovino, dando como resultado la luteólisis y la inducción de la ovulación, por lo tanto, la muerte del embrión y fracaso al mantener la preñez (Binelli, M. et al. (2001) "Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle," Theriogenology, 56:1451-1463). El aumento de progesterona sérica o el mantenimiento de los niveles apropiados de progesterona sérica en animales fértiles es un método terapéutico prometedor para mantener la preñez y evitar la pérdida de la preñez.

En la actualidad, se usan varias terapias hormonales para aumentar la fertilidad o para mantener la preñez. Thatcher et al. (2001 Theriogenology 55:75-89) describen los efectos de los tratamientos hormonales sobre el rendimiento reproductivo del ganado vacuno. Los tratamientos hormonales incluyen la administración de somatotropina bovina (bST, del inglés *bovine somatotrophin*) y gonadotropina coriónica humana (hCG, del inglés *human chorionic gonadotropin*). D'Occhio et al. (2000 Anim. Reprod. Sci. 60-61:433-442) describen diversas estrategias para la gestión de ganado vacuno de carne usando implantes agonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, del inglés *gonadotropin releasing hormone*). De Rensis et al. (2002 Theriogenology 58(9):1675-1687) describen el efecto de la administración de GnRH o de hCG en vacas lecheras antes de la inseminación artificial. Martínez et al. (1999 Anim. Reprod. Sci. 57:23-33) describe la capacidad de la hormona luteinizante (LH, del inglés *luteinizing hormone*) y de la GnRH para inducir la aparición de la onda folicular en novillas de carne en los días 3, 6 y 9 del ciclo del estro, tras la ovulación (día 0), sin inseminación. Santos et al. (2001 J. Animal Science 79:2881-2894) describen el efecto sobre el rendimiento reproductivo de la administración intramuscular de 3.300 UI de hCG a vacas lecheras de alta productividad en el día 5 tras la inseminación artificial. Lee et al. (1983 Am. J. Vet. Res. 44(11):2160-2163) describen el efecto sobre vacas lecheras de la administración de GnRH en el momento de la inseminación artificial. Las Patentes de EE.UU. N.º 5.792.785 (presentada el 11 de agosto de 1998) y 6.403.631 (presentada el 11 de junio de 2002) describen métodos y composiciones para la administración de melatonina antes y después de la inseminación para potenciar el éxito de la preñez en un animal. Chagas e Silva et al. (2002 Theriogenology 58(1):51-59) describe perfiles de progesterona en plasma tras la transferencia del embrión en ganado de vacas lecheras. Weems et al. (1998 Prostaglandins and other Lipid Mediators) describen los efectos de las hormonas sobre la secreción de progesterona en los cuerpos lúteos (CL) de vacas no preñadas y preñadas. La patente de Estados Unidos N.º 4.780.451 (presentada el 25 de octubre de 1988) describe composiciones y métodos usando LH y hormona folículo estimulante para producir superovulación en ganado vacuno; Farin et al. (1988 Biol. Reprod. 38:413-421) describe el efecto sobre el peso lúteo ovino de la administración intravenosa de 300 UI de hCG en los días 5 y 7,5 del ciclo del estro, sin inseminación. Hoyer y Niswender (1985 Can. J. Physiol. Pharmacol. 63(3):240-248) describen la regulación de la esteroidogénesis en células lúteas ovinas. Juengel y Niswender (1999 J. Reprod. Fertil. Supl. 54:193-205) describen la regulación molecular de la progesterona lútea en rumiantes domésticos. La patente de Estados Unidos 5.589.457 (presentada el 31 de diciembre de 1996) describe métodos para sincronizar la ovulación en ganado vacuno usando GnRH, LH, y/o hCG y PGF2α.

Muchos de estos tratamientos usan hormonas o análogos de hormonas de la familia de hormonas glucoproteicas, que consiste en las proteínas hipofisarias de hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (CG). Las gonadotropinas, que incluyen CG, FSH y LH, son esenciales para la función reproductora. Son heterodímeros compuestos de dos subunidades α y β asociadas de manera no covalente. Ambas subunidades son oligosacáridos (N)-ligados que contienen asparagina y, en el caso de la subunidad CG β , los hidratos de carbono O-ligados también están presentes en un grupo de aminoácidos en el extremo C-terminal. Las subunidades β humanas están codificadas por genes separados, y las proteínas LH β y CG β son estructuralmente y funcionalmente similares; teniendo una identidad de aminoácidos de más del 80 % (Pierce JG, Parsons (1981) "Glycoprotein hormones: structure and function", *Biochem.* 50:465-495). Dentro de una especie, la secuencia de aminoácidos de la subunidad α es común para las cuatro hormonas (Pierce JG, Parsons (1981) *Biochem.* 50:465-495).

Todos los mamíferos sintetizan LH, pero solo se ha identificado CG en primates y équidos. Al contrario de los primates, las proteínas LH β equina y CG β equina están codificadas por el mismo gen y tienen la misma secuencia de proteínas. Sin embargo, los oligosacáridos N-ligados en la CG equina de la placenta (eCG) contienen galactosa y ácido siálico terminal, mientras que el sulfato de GalNAc es el resto terminal principal en la LH equina (eLH) hipofisaria. El contenido en hidratos de carbono de la eCG sobrepasa el 40 % de su masa y es la más glucosilada de todas las especies de hormonas de glucoproteína (Bousfield et al. (2001) "Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin and equine luteinizing hormone β by solid-phase Edman degradation", *Biol Reprod.* 64: 136-147; Moore y Ward (1980) "Pregnant mare serum gonadotropin. An in vitro biological characterization of the lutropin-follitropin dual activity", *J Biol Chem* 255: 6923-6929). Esto se atribuye a una mayor abundancia de unidades de hidratos de carbono O-ligadas en comparación con la CG de primate. Por el contrario, el contenido en hidratos de carbono de la eLH es del 25 % (Bousfield et al. (2001) *Biol Reprod.* 64:136-147).

En la yegua y el semental, el uso de una variedad de hormonas de otras especies no es satisfactorio debido a su potencial para generar una fuerte respuesta inmunitaria. Una de esas hormonas que induce una respuesta de anticuerpos es hCG (Roser et al., 1979). Como alternativas, se ha probado GnRH, los extractos de hipófisis de equino y la gonadotropina coriónica equina (eCG; formalmente denominada gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG)). La buserelina de acción corta (un agonista de GnRH) ha sido exitosa en la inducción de la ovulación pero requiere más de una inducción para inducir la ovulación en un período de 48 horas. La cistorelina (GnRH natural) es también de acción corta y requiere más de una inyección y su uso no está autorizado en caballos. La deslorelina (un análogo de GnRH) funciona muy bien en la estimulación de la ovulación en 24-48 horas. La deslorelina ha estado en el mercado en dos formas; un implante de liberación lenta o un inyectable de liberación lenta. Se ha descubierto que el implante, Ovuplant™, es eficaz en la inducción de la ovulación en 48 horas, pero en algunas yeguas evitó que volvieran a estar en celo durante semanas cuando se aplicaban según las indicaciones (Johnson et al., 2002). Actualmente, Ovuplant™ está en el mercado. La forma inyectable de GnRH funciona bien y está disponible de algún modo como un "reactivo de la composición".

Los extractos de hipófisis pueden ser productos terapéuticos eficaces para la reproducción, pero contienen contaminantes y muchos varían en sus cantidades de LH y de FSH. El tratamiento con extractos hipofisarios o GnRH de una yegua o de un semental da como resultado la exposición de las gónadas a una proporción relativamente fija de LH y de FSH, ofreciendo posibilidades limitadas de manipulación de las gónadas para el desarrollo folicular, la ovulación o la espermatogénesis. Además, los extractos hipofisarios de equino contienen solo el 8-10 % de LH y el 6-8 % de FSH (Guillou y Combarous, 1983), lo que requiere el uso de grandes dosis de tratamiento para ser eficaces. Los extractos hipofisarios de equino parecen aumentar el número de folículos durante la ovulación, pero el número de ovulaciones y el número de embriones obtenidos no parece que se correlacione siempre con el número de folículos desarrollados (Scoggins et al., 2002). La CG de equino ha demostrado tener poco, si lo hay, efecto en la yegua para estimular el desarrollo folicular y la ovulación durante el estro, probablemente debido a su incapacidad para unirse al tejido ovárico durante el estro (Stewart y Allen, 1979).

Con el fin de usar gonadotropinas de equino para mejorar la eficacia en la reproducción en equinos y en otras especies, la disponibilidad de proteínas purificadas es esencial. En la actualidad, las fuentes para gonadotropinas de equino son el suero (eCG-PMSG) y los extractos hipofisarios completos. Obtener cantidades suficientes de estas hormonas naturales para tal tarea es caro y difícil. Las preparaciones de gonadotropinas hipofisarias puras de equino sin contaminación cruzada no están fácilmente disponibles. Dado el problema de las variaciones entre animales de las gonadotropinas de equino naturales y la heterogeneidad de la carga en los hidratos de carbono N-ligados, la capacidad para generar las correspondientes proteínas recombinantes producirá gonadotropinas de una composición más homogénea que se puede estandarizar con respecto a la masa y a la bioactividad. Tales proteínas serán críticas para calibrar los ensayos clínicos de laboratorio y para el manejo de la reproducción, como acortar el tiempo de ovulación en yeguas en transición y en ciclo para la reproducción natural e inseminación artificial. El uso de las formas recombinantes, al contrario de las hormonas extraídas del suero y del tejido hipofisario, evitaría la cocontaminación de patógenos y agentes con una propensión a provocar enfermedades relacionadas con priones.

Hay una necesidad en la materia de agentes terapéuticos mejorados y seguros para aumentar la eficacia de la reproducción en caballos y en ganado vacuno, principalmente aumentando la ovulación, y después manteniendo la preñez de las yeguas y vacas tras la inseminación.

En el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un análogo de eFSH que tiene al menos el 95 % de homología con la SEQ ID NO 8 para su uso en un método de aumento de la actividad reproductora en uno o más ungulados, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz del análogo al uno o más ungulados, en donde la cantidad eficaz está entre aproximadamente 200 µg y 850 µg, y en donde se administra una dosis del análogo de la eFSH a cada uno o más ungulados, al menos una vez al día, durante 4 a 9 días en un único ciclo del estro. La presente invención proporciona un análogo de la hormona folículo estimulante (FSH), en particular, un análogo de la FSH de equino, y métodos de uso de tales análogos para mejorar la eficacia de la reproducción de los caballos, del ganado vacuno y de otros mamíferos. La FSH de equino recombinante (eFSH recombinante o reFSH) puede potenciar la reproducción, no solo en los caballos, sino también en otras especies, promoviendo la superovulación, el desarrollo folicular y la producción de embriones. El uso de un análogo de reFSH para estimular el desarrollo folicular y/o la superovulación ofrece la ventaja de usar un producto de FSH pura sin los contaminantes proteicos o la actividad de LH no deseada del extracto hipofisario de equino. La presente invención también proporciona un método fiable para producir reFSH biológicamente activa. Preferentemente, las subunidades del análogo de FSH recombinante se unen entre sí para formar un análogo de FSH de cadena simple.

También se desvela un método de estimulación del desarrollo folicular o de superovulación en mamíferos, preferentemente ungulados tales como caballos o ganado vacuno, que comprende la administración de una dosis eficaz de la eFSH recombinante al animal. En una realización adicional, la eFSH recombinante se administra en múltiples inyecciones intramusculares. Preferentemente, la eFSH es una eFSH recombinante de cadena simple. En una realización, la presente invención proporciona un análogo de eFSH recombinante de cadena simple, que comprende una subunidad beta de eFSH conectada a una secuencia de enlazador de CTP conectada a una subunidad alfa de eFSH. La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para uno de estos análogos de eFSH (FSHβCTPα) se muestra en la Figura 1. Se ha establecido un bioensayo basado en células y se ha desarrollado un ELISA para este análogo. Además, se han logrado expresiones tanto amplificadas como a escala.

Se desvelan composiciones bioactivas y métodos de uso de tales composiciones que incluyen los análogos de eFSH activa, en particular, los análogos de eFSH recombinante de cadena simple. Tales productos de análogos de eFSH recombinante activa son beneficiosos para mejorar la actividad reproductora, la superovulación, el desarrollo folicular y la producción de embriones en equinos y en otras especies de mamíferos. Los análogos de eFSH recombinantes también evitan los problemas de contaminación cruzada y no desencadenan una fuerte respuesta inmunitaria en los animales tratados.

En una realización, los análogos de eFSH se usan para aumentar la actividad reproductora en ungulados, específicamente en caballos y en vacas. En particular, un análogo de eFSH recombinante de cadena simple se usa para estimular la superovulación, aumentar la producción de embriones y aumentar la reproducción en animales hembra. La administración de eFSH con el fin de aumentar la reproducción, aumentar el número de embriones producidos o inducir la superovulación es deseable en una serie de especies que incluyen, pero sin limitación, vacas, ovejas, cabras, cérvidos, yaks, búfalos acuáticos, bisontes, antílopes, gacelas, alces europeos, renos, alces americanos, borrego cimarrón, jirafas, y camélidos que incluyen camellos bactrianos y dromedarios, llamas, cerdos, caballos, alpacas y vicuñas. El método es particularmente eficaz para aumentar la superovulación, el desarrollo folicular, la producción de embriones y las preñeces en equinos y en bovinos. Los análogos de eFSH usados en las realizaciones de la presente invención son al menos puros al 95 % y preferentemente son polipéptidos recombinantes. Más preferentemente, el análogo de eFSH es una eFSH recombinante de cadena simple biológicamente activa.

Se desvela un método de preparación de análogos de eFSH recombinante mediante la expresión de ADN que codifica las subunidades alfa y beta de eFSH. En una realización, se produce un análogo de eFSH recombinante en donde la subunidad alfa está unida de manera covalente a la subunidad beta usando un péptido enlazador. La FSH natural se produce como subunidades alfa y beta separadas que no se unen de manera no covalente dentro del cuerpo del animal. La eFSH recombinante de cadena sencilla de la presente invención tiene un alto nivel de expresión y de bioactividad y se cree que tiene una elevada eficacia y duración *in vivo* en comparación con la eFSH natural debido a que las subunidades alfa y beta no tienen que ensamblarse primero y no se disocian libremente entre sí. En una realización, un análogo de eFSH recombinante (denominado FSHβCTPα en el presente documento) es un análogo de eFSH recombinante de cadena simple en el que las subunidades alfa y beta de la FSH de equino están enlazadas entre sí usando un péptido de carboxilo terminal de gonadotropina coriónica de equino.

Las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa y beta de la eFSH usadas en el presente documento se dan en la SEQ ID NO 5 y en la SEQ ID NO 6, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican estas secuencias de aminoácidos se dan en la SEQ ID NO 1 y en la SEQ ID NO 2, respectivamente, aunque las secuencias de ADN adicionales pueden codificar las mismas subunidades alfa y beta debido a la redundancia del código genético. Se entiende que un análogo de eFSH puede tener pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos en comparación con las secuencias de eFSH proporcionadas sin que afecte a la función. Adicionalmente, un análogo de eFSH puede tener aminoácidos adicionales o delecionados en comparación con las secuencias de eFSH proporcionadas sin que afecte a la función. Preferentemente, el análogo de eFSH contiene adiciones o deleciones de 25 aminoácidos o menos, más preferentemente de 10 aminoácidos o menos, o más preferentemente de 5 aminoácidos o menos, que las secuencias de eFSH proporcionadas en la SEQ ID NO 5 y en la SEQ ID NO 6.

En una realización, el análogo de eFSH de cadena simple tiene las subunidades alfa y beta que son al menos el 80 % idénticas en secuencia con las subunidades alfa y beta de la FSH de equino de la SEQ ID NO 5 y la SEQ ID NO 6. Preferentemente, el análogo de eFSH comprende un primer polipéptido que tiene al menos el 85 % de homología con la SEQ ID NO 5 y un segundo polipéptido que tiene al menos el 85 % de homología con la SEQ ID NO 6. Más preferentemente, el primer polipéptido tiene al menos el 90 % de homología con la SEQ ID NO 5 y el segundo polipéptido tiene al menos el 90 % de homología con la SEQ ID NO 6. Aún más preferentemente, el primer polipéptido tiene al menos el 95% de homología con la SEQ ID NO 5 y el segundo polipéptido tiene al menos el 95% de homología con la SEQ ID NO 6.

Preferentemente, el análogo de eFSH es un polipéptido de cadena simple en el que el primer polipéptido que se corresponde con la subunidad alfa y el segundo polipéptido que se corresponde con la subunidad beta están unidos de manera covalente. Por unidos de manera covalente, se refiere a que el primer polipéptido ese une al segundo polipéptido de manera directa o a través de un péptido enlazador, en donde un extremo del péptido enlazador se une al primer polipéptido y el otro extremo del péptido enlazador se une al segundo polipéptido. Los péptidos enlazadores capaces de unirse a los polipéptidos en la síntesis de proteínas recombinantes son bien conocidos en la materia, y se puede usar cualquier péptido enlazador adecuado para expresarse como parte del análogo de la eFSH. Preferentemente, el péptido enlazador tiene entre aproximadamente 10 y 50 aminoácidos, más preferentemente entre aproximadamente 20 y 40 aminoácidos. En una realización, la secuencia del enlazador es una secuencia de enlazador de CTP o una secuencia de enlazador que tiene al menos el 90 % de homología de secuencia con el enlazador de CTP de equino. En una realización adicional, el enlazador de péptidos es el péptido de carboxilo terminal (CTP, del inglés *carboxy terminal peptide*) de la gonadotropina coriónica. Debería entenderse que las posiciones de las subunidades alfa y beta son reversibles, ya que el análogo de eFSH puede tener la configuración (subunidad alfa)-enlazador-(subunidad beta) o (subunidad beta)-enlazador-(subunidad alfa). En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican el análogo de eFSH se incorporan en un vector de expresión que se transfiere a una célula o línea celular capaz de expresar el vector.

En una realización, se usa un análogo de eFSH para producir un evento de superovulación que da como resultado la recuperación de embriones viables. En otra realización, se usa un análogo de eFSH para aumentar el desarrollo folicular o la producción del embrión. La inducción de la superovulación y el aumento de la producción del embrión son útiles para el trasplante de los embriones y la fertilización *in vitro*. En una realización, se administra una cantidad eficaz de un análogo de eFSH a uno o más ungulados, preferentemente equinos o bovinos, con el fin de aumentar la producción. En la presente invención, la eFSH recombinante de cadena simple se puede administrar a los animales como una dosis única o como múltiples dosis durante varios días para cada ciclo del estro. En una realización, la eFSH recombinante se administra diariamente durante aproximadamente 2 a 10 días, preferentemente durante aproximadamente 4 a 9 días, más preferentemente durante aproximadamente 5 a 8 días. Se puede administrar una dosis única de la eFSH recombinante por día al animal, se pueden administrar dos o más dosis por día, por ejemplo, a intervalos de 6 horas, de 8 horas o de 12 horas. En una realización, se administra una única dosis diaria o, como alternativa, se administran múltiples dosis diarias al animal pero en menores cantidades que en tratamientos comparables de análogos de FSH. Esto se puede atribuir a una elevada actividad y a una mayor duración por el análogo de FSH de cadena simple.

En una realización, el análogo de eFSH se administra al animal aproximadamente 6 a 16 días tras la ovulación, preferentemente entre aproximadamente el día 8 y aproximadamente el día 14 tras la ovulación. El análogo de eFSH se puede administrar como una única inyección intramuscular cada día o en múltiples inyecciones cada día. Se revisan los síntomas de celo en los animales y después se reproducen mediante inseminación natural o artificial. En una realización adicional, la inseminación tiene lugar aproximadamente 2 a 8 días, preferentemente 4 a 6 días, tras la administración final de la eFSH. En otra realización adicional, los embriones se extraen por enjuague aproximadamente 6-8 días para su posterior uso.

Las hormonas adicionales, tales como la hormona luteinizante, la gonadotropina coriónica y la prostaglandina, se administran de forma opcional, así como el análogo de eFSH. En una realización, se administra prostaglandina al animal además de la administración del análogo de eFSH recombinante. La prostaglandina se administra opcionalmente como una única dosis, típicamente mediante inyección, o como dosis múltiples administradas con varias horas de diferencia. En una realización, al animal se le da una primera dosis de prostaglandina tras la administración del análogo de eFSH seguida por una segunda dosis de prostaglandina que se le da al animal aproximadamente 6 horas a 1 día después de la primera dosis de prostaglandina.

En una realización, cada dosis del primer análogo de eFSH administrada al animal está entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 5 mg. Preferentemente al animal se le administra el análogo de eFSH entre aproximadamente 1,0 µg y aproximadamente 0,2 mg, más preferentemente entre aproximadamente 200 µg y aproximadamente 0,1 mg, incluso más preferentemente entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 850 µg. Se puede administrar el análogo de eFSH usando cualquier medio conocido en la materia, que incluye, pero sin limitación, la inyección intramuscular y la inyección intravenosa. Preferentemente, el análogo de eFSH se administra a través de la inyección intramuscular.

Otra realización proporciona un kit para inducir superovulación, desarrollo folicular, o aumentar el número de

embriones en un único ciclo del estro en un mamífero tal como un equino o un bovino que comprende: al menos una dosis que comprende una cantidad eficaz de un análogo de eFSH recombinante de cadena simple que comprende un primer polipéptido que tiene al menos el 95 % de homología con la SEQ ID NO 5 y un segundo polipéptido que tiene al menos el 95 % de homología con la SEQ ID NO 6, en donde el primer y el segundo polipéptido están unidos de manera covalente; un dispositivo para administrar una dosis del análogo de eFSH; e instrucciones para administrar la dosis del análogo de eFSH. En una realización adicional, el kit comprende dos o más dosis que comprenden una cantidad eficaz de una eFSH recombinante de cadena simple. En una realización, la cantidad eficaz del análogo de eFSH en cada dosis está entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 0,2 mg, más preferentemente entre aproximadamente 200 µg y aproximadamente 0,1 mg, incluso más preferentemente entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 850 µg y puede variar dependiendo del kit. El dispositivo para administrar la dosis al animal puede ser cualquier dispositivo conocido en la materia, tal como agujas y jeringas. Opcionalmente, el dispositivo es un dispositivo de inyección adecuado para administrar una única dosis del análogo de eFSH. El kit también puede comprender componentes tales como hormonas adicionales, tales como prostaglandina, y dispositivos de inyección para la administración de las hormonas adicionales.

En una realización, una composición de la invención comprende una composición de proteína tal como se describe en el presente documento, tal como una composición de eFSH, en una formulación farmacéutica. En una realización adicional, la invención proporciona un método de síntesis de una composición de la invención o de una formulación farmacéutica de la misma. Una formulación farmacéutica comprende uno o más excipientes, vehículos y/u otros componentes tal como se entiende en la materia. Preferentemente, los componentes cumplen los estándares del Formulario Nacional ("NF", del inglés *National Formulary*), de la Farmacopea de los Estados Unidos ("USP", del inglés *United States Pharmacopoeia*), o del Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations. En una realización, una cantidad eficaz de una composición de la invención puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de una afección médica que comprende la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención. En una realización, la invención proporciona un medicamento que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones de la invención. En una realización, la invención proporciona un método para preparar un medicamento para un fin o tratamiento de una afección descrita en el presente documento.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, en el presente documento puede haber una discusión sobre creencias o entendimientos de los principios o mecanismos subyacentes relacionados con la invención. Se reconoce que, independientemente de la corrección definitiva de cualquier explicación o hipótesis, una realización de la invención puede, sin embargo, ser operativa y útil.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos y de ADN de un análogo de eFSH recombinante de cadena simple (FSHβCTPα) de la presente invención, en donde la subunidad beta y la subunidad alfa se unen entre sí de forma covalente usando un CTP de equino (subrayado).

La Figura 2 es un dibujo esquemático del análogo de eFSH de la Figura 1 en donde las subunidades alfa y beta se unen entre sí usando un oligosacárido O-ligado (caja sombreada) con las subunidades dispuestas en tándem, de manera que la subunidad beta está en N-terminal para la subunidad alfa para formar una molécula de eFSH de cadena simple.

La Figura 3 representa un SDS-PAGE que muestra la FSHβCTPα producida usando los métodos de la presente invención como un único punto de 45 kDa.

La Figura 4 es un gráfico que compara la actividad biológica *in vitro* de FSHβCTPα (marcada en la figura como eFSH APNB) con la eFHS natural (extractos hipofisarios naturales, Bioniche Animal Health) en un ensayo de hFSHR en CHO (CHO-hFSHR). Tal como se muestra en la Figura 4, el análogo de eFSH recombinante de cadena simple tiene una actividad biológica aproximadamente igual o mayor que la eFSH natural, especialmente a dosis más bajas.

La Figura 5 es un gráfico que compara las concentraciones de estradiol en medios consumidos de túbulos seminíferos de equino incubados con eFSH natural (de extractos hipofisarios purificados) y con FSHβCTPα a diversas dosis. Se observó una respuesta a la dosis significativa con el análogo de eFSH recombinante. A 50 ng/ml, la respuesta a la dosis de FSHβCTPα fue mayor que la de eFSH natural.

Descripción detallada de la invención

Tal como se usa en el presente documento, "reproducción" se refiere a los métodos conocidos en la materia que pertenecen a hacer que un animal femenino se quede preñado. Tales métodos incluyen la inseminación natural y artificial. Los métodos de reproducción pueden incluir un tiempo de espera tras la observación del estro conductual o después de forzar el estro.

Tal como se usa en el presente documento, "estro" se refiere al período durante el cual es más probable que un animal

se quede preñado. Tal como se usa en el presente documento, "forzar el estro" se refiere a los métodos conocidos en la materia para forzar el celo. Forzar el estro puede incluir períodos de espera, según sea adecuado. Tal como se usa en el presente documento, "estro conductual" se refiere a la demostración conductual de que un animal está en celo, que incluye mostrarse receptivas al macho.

5 "Yeguas" se refiere a los equinos hembra y "sementales" se refiere a los equinos macho. Tal como se usa en el presente documento, "vaca" se refiere a los bovinos hembra, incluyendo las novillas.

10 Tal como se usa en el presente documento, "aumento de la actividad reproductora" y "aumento de la eficacia reproductiva" se refieren al aumento en la probabilidad de que un animal hembra se quede preñada y finalmente produzca un embrión viable o descendencia viva. Esto se puede lograr aumentando la probabilidad de que un animal hembra inseminado se quede preñado, aumentando la probabilidad de que el animal preñado produzca uno o más embriones viables y/o aumentando la probabilidad de que se mantenga preñada.

15 Tal como se usa en el presente documento "sincronización de la ovulación" se refiere al proceso mediante el cual se fuerza la ovulación de un grupo de animales, de manera que cada animal probablemente ovule en un intervalo de 3-4 días. Tal como se usa en el presente documento, "sincronización del estro" se refiere a un proceso mediante el cual se fuerza el estro de un grupo de animales, de manera que cada animal probablemente esté en estro en un intervalo de aproximadamente 2-5 días. Tal como se usa en el presente documento, "presincronización del estro" o "presincronización de la ovulación" se refiere a un proceso mediante el cual el ciclo del estro, a menudo para un grupo de animales, se bloquea o se fuerza en una etapa particular del ciclo, de manera los procedimientos de sincronización del estro o de la ovulación que se van a realizar después tengan más éxito.

20 Tal como se usa en el presente documento, "mamífero preñado" se refiere a un mamífero que actualmente está preñado y también incluye un mamífero que se ha inseminado y que puede estar preñado o a una multitud de mamíferos inseminados, algunos de los cuales probablemente estén preñados. Tal como se usa en el presente documento, "inseminación" se refiere a la introducción de semen mediante cualquier método conocido en la materia, incluyendo, pero sin limitación, la inseminación natural y artificial.

25 Tal como se usa en el presente documento, "mantener la preñez" se refiere a aumentar la probabilidad de que un animal que se ha inseminado dé positivo en preñez o dé descendencia viva, o aumentar la probabilidad de que una multitud de animales que se han inseminado den positivo en preñez o den descendencia viva. Por "se mantiene la preñez" significa que un animal permanece preñado en ese momento y que no ha perdido el embrión.

30 Tal como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un análogo de eFSH que es eficaz para producir el resultado deseado.

35 Tal como se usa en el presente documento, "administración" se refiere a cualquier método de administrar un agente terapéutico a un animal conocido en la materia. Los ejemplos de administración incluyen, pero sin limitación, inyectar el agente terapéutico por vía subcutánea, intramuscular e intravenosa.

40 Tal como se usa en el presente documento, "agente terapéutico" se refiere a cualquier fármaco, hormona, análogo o compuesto usado para tratar, modificar o mejorar una afección fisiológica. En la presente invención, las afecciones fisiológicas son aquellas relacionadas con la reproducción, tales como la ovulación o el mantenimiento de la preñez.

45 Tal como se usa en el presente documento, "análogo" se refiere a un compuesto que imita el efecto fisiológico de un compuesto natural. Los análogos normalmente serán estructuralmente similares al compuesto natural pero pueden tener diferencias estructurales o químicas como resultado de los métodos de producción o debido a que las diferencias confieren una actividad beneficiosa al análogo. Un análogo de eFSH es una composición que tiene una estructura y función similares a la eFSH natural.

50 Tal como se usa en el presente documento, las afirmaciones en relación con la pureza tales como "aproximadamente puros al 95 %" se refieren a la pureza tal como se mide mediante cualquier método conocido en la materia, que incluye, pero sin limitación, la electroforesis de proteínas. Tal como se usa en el presente documento, las afirmaciones en relación con la homología de secuencias tanto para aminoácidos como para ADN, tales como "una homología del 95 % o más", se refieren a comparaciones de secuencias tal como se entiende y se practica en la materia.

55 Una realización de la invención abarca un análogo de eFSH recombinante de cadena sencilla que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90 % o más, preferentemente el 95 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 8. Otra realización es un ácido nucleico o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un aminoácido de cadena simple que tiene una homología del 90 % o más, preferentemente del 95 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 8. Otra realización es un ácido nucleico o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un aminoácido de cadena simple que tiene un primer polipéptido con una homología del 90 % o más, preferentemente una homología del 95 % o más, con la SEQ ID NO 5 y un segundo polipéptido con una homología del 90 % o más, preferentemente una homología del 95 % o más, con la SEQ ID NO 6. También se incluyen análogos de eFSH recombinantes de

cadena simple funcionales codificados por fragmentos de la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEQ ID NO 8.

Ejemplo 1 - Diseño genético y actividad *in vitro* de la eFSH recombinante de cadena simple

- 5 Para construir una eFSH recombinante de cadena simple, la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad alfa se insertó en marco en el extremo 3' de la subunidad beta de eFSH usando la mutagénesis con PCR de extensión solapada. El péptido de carboxilo terminal que lleva los oligosacáridos O-ligados se usó como un enlazador (recuadro sombreado) con las subunidades dispuestas en tándem de manera que la subunidad beta está N-terminal para la subunidad alfa, tal como se muestra en la Figura 2. Este método de diseño genético de eFSH recombinante es similar a los métodos de diseño genético de análogos de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sugahara et al. (1995) Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 2041-2045; Narayan et al. (1995) "Functional expression of yoked human chorionic gonadotropin in baculovirus-infected insect cells," Mol Endocrinol 9: 1720-1726).
- 10
- 15 La construcción de cadena simple se insertó en un vector y se transfectó a células de ovario de hámster chino (CHO), dando como resultado un polipéptido de eFSH de cadena simple, que se aisló y se purificó. Un SDS-PAGE de FSHβCTPα, un análogo de eFSH recombinante de cadena simple que tiene la secuencia de la SEQ ID NO 8 y producido mediante el presente método, se muestra en la Figura 3 como un punto predominante de 45 kDa.
- 20 La actividad biológica *in vitro* de FSHβCTPα se comparó con la eFHS natural (extractos hipofisarios naturales, Bioniche Animal Health) en un ensayo de hFSHR en CHO (CHO-hFSHR). Tal como se muestra en la Figura 4, FSHβCTPα (marcado como eFSH APNB en la figura) tiene una actividad biológica aproximadamente igual o mayor que la eFSH natural, especialmente a dosis más bajas (menos de 0,25 ng/ml). Adicionalmente, la Figura 5 compara las concentraciones de estradiol en medios consumidos de túbulos seminíferos de equino incubados con eFSH natural y con FSHβCTPα a diversas dosis (n=9). Se observó una respuesta a la dosis significativa con FSHβCTPα y a 50 ng/ml, la respuesta a la dosis de FSHβCTPα fue mayor que la de eFSH natural (p<0,05).
- 25

Ejemplo 2 - Eficacia de la eFSH recombinante de cadena simple en yeguas en ciclo

- 30 Se probó adicionalmente la eficacia *in vivo* de la FSHβCTPα en yeguas en ciclo. Se alojaron quince yeguas, de seis a dieciséis años de edad en potreros al aire libre y se les dio progesterona varios días antes de la ovulación, lo que se denominó día 0. Después se trató a las yeguas con progesterona y estradiol para suprimir la posterior gonadotropina y la actividad ovárica. El ciclo del estro de las yeguas se reanudó tras la retirada del tratamiento de progesterona y de estradiol. El uso de progesterona y estradiol para controlar el estro y la ovulación es bien conocido en la materia Loy et al. (1981) "Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin", Theriogenology 15:191-200; Varner et al. (1988) "Estrogens, oxytocin and ergot alkaloids - Uses in reproductive management of mares"; Proc. Am. Assoc. Equine. Pract., 219-241; Lofstedt, R.M. (1988) "Control of the estrous cycle of the mare"; The Veterinary Clinics of North America - Equine Practice, 189-190).
- 35
- 40 Se separó a las quince yeguas en tres grupos de tratamiento, de 5 yeguas cada grupo, recibiendo uno de los grupos 500 µg del análogo de reFSH (FSHβCTPα), recibiendo un grupo 850 µg del análogo de reFSH (FSHβCTPα), y recibiendo un grupo 1 ml de solución salina (grupo de control). El análogo de eFSH recombinante o la solución salina se administraron dos veces al día (bidario o BID) en los días 8-14 tras la ovulación. Los animales se reprodujeron aproximadamente 16-22 días tras la ovulación (aproximadamente 2-8 días después de la última administración de eFSH recombinante) y se comprobó su preñez. Los efectos de los tratamientos sobre el crecimiento folicular se muestran en la Tabla 1, y los efectos sobre el número de folículos, ovulaciones y preñeces se muestran en la Tabla 2.
- 45

Tabla 1 - Crecimiento folicular tras los tratamientos

	Grupos de tratamiento		
	0,85 mg de reFSH BID	0,50 mg de reFSH BID	Control
Yeguas (n)	5	5	5
N.º de folículos de 20-29 mm al final del tratamiento (día 15)	5,6 ± 1,24 ^a	4,8 ± 1,24 ^a	0,2 ± 0,20 ^b
Tiempo (días) para folículos de 35 mm tras la retirada de P+E	2,6 ± 0,51 ^a	3,3 ± 0,32 ^a	7,8 ± 0,51 ^b

^{a,b} Los valores dentro de las filas con diferentes superíndices difieren (p <0,05).

Tabla 2 - Número de folículos, ovulaciones y preñeces

	Grupos de tratamiento		
	0,85 mg de reFSH BID	0,50 mg de reFSH BID	Control
Yeguas (n)	5	5	5

	Grupos de tratamiento		
	0,85 mg de reFSH BID	0,50 mg de reFSH BID	Control
N.º de folículos preovulatorios (≥35 mm) ^a	4,2 ± 0,58 ^b	3,4 ± 0,75 ^b	1,4 ± 0,24 ^c
N.º de ovulaciones por yegua (intervalo)	2,8 ± 0,51 (1-4)	3,0 ± 0,93 (1-6)	2,0 ± 0,32 (1-3)
N.º de folículos no ovulatorios (≥35 mm) ^a	2,4 ± 1,12	2,0 ± 0,84	0,0 ± 0,00
N.º de vesículas embriónicas detectadas por cada yegua preñada	1, 2	1, 1, 5	1, 1, 1, 2

^a Los valores del período de examen ultrasónico se detectaron 12 horas antes de la primera ovulación y 12 horas después de la última ovulación.
^{b,c} Los valores dentro de las filas con diferentes superíndices difieren (p <0,05).

5 Tal como se muestra en las tablas anteriores, el análogo de eFSH recombinante presentó una actividad *in vivo* a ambas dosis (850 y 500 µg) tal como se muestra mediante un elevado número de folículos y de ovulaciones por yegua, y mediante el reducido tiempo requerido para lograr un tamaño de folículo de 35 mm tras la retirada del tratamiento de progesterona y estradiol.

Ejemplo 3 - Eficacia de la eFSH recombinante de cadena simple sobre la superovulación

10 En este experimento, a veinte yeguas de ciclo normal, de tres a trece años de edad, se les administró bien FSH natural (extracto hipofisario purificado) o bien eFSH recombinante de cadena simple. Se examinaron las yeguas mediante ecografía transrectal a los cinco días después de la ovulación. Si el folículo más grande era de < 25 mm de diámetro, se asignaba a las yeguas de forma aleatoria a uno de los cuatro grupos de tratamiento y se les administraba un análogo de eFSH (FSHβCTPα):

15 Grupo A 12,5 mg de eFSH de Bioniche dos veces al día (grupo de control positivo, n=5)

Grupo B 500 de eFSH recombinante (FSHβCTPα) dos veces al día (n=5)

20 Grupo C 850 de eFSH recombinante (FSHβCTPα) una vez al día (n=5)

Grupo D 850 de eFSH recombinante (FSHβCTPα) dos veces al día (n=5)

25 Todas las yeguas recibieron 10 mg de dinoprost (prostaglandina) la tarde del segundo día del tratamiento y los tratamientos prosiguieron hasta que una cohorte de folículos alcanzó 32-35 mm de diámetro. Las yeguas recibieron 1,5 mg de eLH recombinante para inducir la ovulación aproximadamente 38 horas después del último tratamiento de FSH.

30 La media aritmética de los días de tratamiento con FSH fueron 6,6 (Grupo A), 7,2 (Grupo B), 8,0 (Grupo C) y 6,0 (Grupo D). El número de folículos > 35 mm de diámetro en el momento de la administración de reLH fue de 3,2, 3,2, 3,0 y 4,2, respectivamente. El número de ovulaciones detectado para los mismos grupos fue 3,8, 3,2, 5,4 y 3,4. El número de folículos > 35 mm de diámetro que permanece en el momento de la ovulación para los mismos grupos fue de 0,8, 1,6, 0,6 y 2,6. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Tratamiento	N.º de yegua	Días de tratamiento	N.º de folículos > 35 mm en la administración de LH	N.º de ovulaciones	N.º de folículos > 35 mm en la ovulación	N.º de embriones de alta calidad
12,5 mg bid	408	6	2	3	0	
Bioniche	625	5	2	3	2	
	579	10	2	2	0	
	418	6	3	3	2	
	419	6	7	8	0	
		6,6	3,2	3,8	0,8	
0,5 mg bid	503	6	3	3	0	
reFSH	525	6	4	5	0	
	106	8	3	3	3	
	507	8	3	3	2	

Tratamiento	N.º de yegua	Días de tratamiento	N.º de folículos > 35 mm en la administración de LH	N.º de ovulaciones	N.º de folículos > 35 mm en la ovulación	N.º de embriones de alta calidad
	502	8	3	2	3	
		7,2	3,2	3,2	1,6	
0,85 sid	424	9	4	6	0	
reFSH	644	8	4	5	0	
	850	5	2	6	1	
	645	10	3	4	2	
	97	8	2	6	0	
		8	3	5,4	0,6	
0,85 bid	128	4	3	3	0	
reFSH	66	5	4	4	1	
	459	7	3	5	0	
	454	5	6	4	6	4
	152	9	5	1	6	7
		6	4,2	3,4	2,6	

Estos resultados indican que la reFSH tiene una bioactividad *in vivo* en yeguas de ciclo normal y puede ser una herramienta útil para estimular el desarrollo folicular/la superovulación. Todos los grupos de eFSH recombinante (FSH β CTP α) estimularon el desarrollo folicular y produjeron múltiples embriones viables. Para todos los parámetros medidos, los valores para los grupos de tratamiento de reFSH fueron al menos tan eficaces como el grupo de control positivo (eFS hipofisaria purificada).

La dosis de 850 de reFSH dada dos veces al día (bid) provocó la sobreestimulación del desarrollo folicular. La estimulación folicular continuó en yeguas de este grupo durante días después de que se detectasen la mayoría de las ovulaciones. Se pudieron producir embriones viables a pesar de la sobreestimulación, sin embargo, este efecto no se notó en la misma medida en los otros grupos de reFSH. En consecuencia, para aplicaciones prácticas, puede ser preferible la dosis de 500 administrada dos veces al día. Un protocolo híbrido entre dos inyecciones y una única inyección al día (sid, del inglés *single injection daily*) probablemente también es eficaz.

Habiendo descrito completamente la presente invención con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplos con fines de claridad de comprensión, será obvio para un experto en la materia que se puede realizar la misma modificando o cambiando la invención dentro de un intervalo amplio y equivalente de las condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar al alcance de la invención o a cualquiera de las realizaciones específicas de la misma, y que tales modificaciones o cambios pretenden estar abarcadas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Cuando un grupo de materiales, composiciones, componentes o compuestos se desvela en el presente documento, se entiende que todos los miembros individuales de estos grupos y todos los subgrupos de los mismos se desvelan por separado. Cuando se use un grupo de Markush u otro agrupamiento en el presente documento, todos los miembros individuales del grupo y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles del grupo pretenden estar incluidas de forma individual en la divulgación. Cada formulación o combinación de componentes descrita o ejemplificada en el presente documento se puede usar para poner en práctica la invención, a menos que se indique otra cosa. Cuando se da un intervalo en la memoria descriptiva, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición, todos los intervalos intermedios y subintervalos, así como los valores individuales incluidos en los intervalos dados pretenden estar incluidos en la divulgación. Adicionalmente, los puntos extremos de un intervalo dado se incluyen dentro del intervalo. En la divulgación y en las reivindicaciones, "y/o" significa adicionalmente o como alternativa. Además, cualquier uso de un término en singular también abarca las formas en plural.

Un experto en la materia apreciará que los materiales de partida, los reactivos, los métodos de purificación, los materiales, los sustratos, los elementos del dispositivo, los métodos analíticos, los métodos de ensayo, las mezclas y las combinaciones de los componentes que no sean aquellas ejemplificadas de manera específica se pueden emplear en la práctica de la invención sin recurrir a la experimentación indebida. Todos los equivalentes funcionales conocidos en la materia, de cualquiera de tales materiales y métodos pretenden estar incluidos en la presente invención. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de que se excluyan los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento puede

ponerse en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se desvele de forma específica en el presente documento.

5 Todas las publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento se incorporan en el presente documento en la medida en que no sean inconsistentes con el presente documento. Algunas referencias proporcionadas en el presente documento se incorporan a modo de referencia para proporcionar detalles de usos adicionales de la invención. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de experiencia de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Las referencias citadas en el presente documento se incorporan a modo de referencia en el presente documento en su totalidad para indicar el estado de la técnica en el momento de su fecha de presentación y se pretende que esta información se pueda emplear en el presente documento, si es necesario, para excluir realizaciones específicas que se encuentran en la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se reivindica un compuesto, debería entenderse que los compuestos conocidos en la materia incluyendo los compuestos desvelados en las referencias desveladas en el presente documento no pretenden incluirse en la reivindicación.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> AspenBio Pharma, Inc. Colgin, Mark Boime, Irving Roser, Janet
- <120> Actividad de la hormona foliculo estimulante equina recombinante
- <130> 56-07
- <150> 60/991.297
- 25 <151> 30/11/2007
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 291
- <212> ADN
- <213> Equus caballus
- 35 <400> 1

```

tcttttcctg atggagagtt tacaacgcaa gactgtcctg aatgcaagct aagggaaaac      60
aagtacttct tcaaactggg cgtcccgatt taccagtgtgta agggctgctg cttctccaga    120
gcgtacccca ctccagcaag gtccaggaag acaatggttg tcccaaagaa catcacctca     180
gaatccacat gctgtgtggc caaagcattt atcaggggtca cagtgatggg aaacatcaag     240
ttggagaacc acaccagtg ctattgcagc acttgctatc accacaagat t                 291

```

- 40 <210> 2
- <211> 387
- <212> ADN
- <213> Equus caballus
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (78)..(78)
- <223> n es a, c, g o t
- 50 <400> 2

ES 2 693 697 T3

atgaagtcag tccagttttg tttccttttc tgttgctgga aagcagtctg ctgcaatagc 60
 tgtgagctga ccaacatnac catcgccgtg gagaaggagg aatgtggctt ctgcataagc 120
 atcaacacca cctggtgtgc gggctactgc tacacccggg acctggtgta caaggaccca 180
 gccccgcca acatccagaa aacatgcacc ttcaaggagc tgggtgacga gacagtgaaa 240
 gtgcctggct gtgctacca cgcggactcc ctgtacacgt acccgggtggc cactgcatgt 300
 cactgtggca aatgtaacag cgacagcact gactgcaccg tgcgaggtct ggggccagc 360
 tactgctcct tcggtgacat gaaggaa 387

5 <210> 3
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

<400> 3

10 tccttttct ctaaggatcc cccatcccaa cctctcacat ccacatccac cccaactcct 60
 ggggccagca gacgttctc tcaccccctc ccaataaaga ct 102

15 <210> 4
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n e s a , c , g o t

<400> 4

ES 2 693 697 T3

atgaagtcag tccagttttg tttccttttc tgttgctgga aagcagtctg ctgcaatagc 60
 tgtgagctga ccaacatnac catcgccgtg gagaaggagg aatgtggctt ctgcataagc 120
 atcaacacca cctgggtgtgc gggctactgc tacaccggg acctggtgta caaggacceca 180
 gcccggccca acatccagaa aacatgcacc ttcaaggagc tgggtgtacga gacagtgaaa 240
 gtgcctggct gtgctacca cgcggactcc ctgtacacgt acccgggtggc cactgcatgt 300
 cactgtggca aatgtaacag cgacagcact gactgcaccg tgcgaggtct ggggccagc 360
 tactgctect tcggtgacat gaaggaatcc tcttctctta aggatcccc atcccaacct 420
 ctcacatcca catccacccc aactcctggg gccagcagac gttcctctca cccctccca 480
 ataaagactt cttttcctga tggagagttt acaacgcaag actgtcctga atgcaagcta 540
 agggaaaaca agtacttctt caaactgggc gtcccgattt accagtgtaa gggctgctgc 600
 ttctccagag cgtacccccc tccagcaagg tccaggaaga caatggtggc cccaaagaac 660
 atcacctcag aatccacatg ctgtgtggcc aaagcattta tcagggtcac agtgatggga 720
 aacatcaagt tggagaacca caccagtgct tattgcagca cttgctatca ccacaagatt 780
 taa 783

<210> 5
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 5

5

10

Ser Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Lys
 1 5 10 15
 Leu Arg Glu Asn Lys Tyr Phe Phe Lys Leu Gly Val Pro Ile Tyr Gln
 20 25 30
 Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser
 35 40 45
 Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ser Thr Cys
 50 55 60
 Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met Gly Asn Ile Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys Tyr His His Lys
 85 90 95
 Ile

ES 2 693 697 T3

5 <210> 6
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 6

Met Lys Ser Val Gln Phe Cys Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Val
 1 5 10 15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Thr Thr Ile Ala Val Glu Lys
 20 25 30

Glu Glu Cys Gly Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Asn
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95

Ala Thr Ala Cys His Cys Gly Lys Cys Asn Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

10 Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Asp Met Lys
 115 120 125

Glu

15 <210> 7
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 7

Ser Ser Ser Ser Lys Asp Pro Pro Ser Gln Pro Leu Thr Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Arg Arg Ser Ser His Pro Leu Pro Ile
 20 25 30

20 Lys Thr

<210> 8
 <211> 260
 <212> PRT

ES 2 693 697 T3

<213> Equus caballus

<400> 8

Met Lys Ser Val Gln Phe Cys Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Val
 1 5 10 15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Thr Thr Ile Ala Val Glu Lys
 20 25 30

Glu Glu Cys Gly Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Asn
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95

Ala Thr Ala Cys His Cys Gly Lys Cys Asn Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

5

ES 2 693 697 T3

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Asp Met Lys
 115 120 125

Glu Ser Ser Ser Ser Lys Asp Pro Pro Ser Gln Pro Leu Thr Ser Thr
 130 135 140

Ser Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Arg Arg Ser Ser His Pro Leu Pro
 145 150 155 160

Ile Lys Thr Ser Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Thr Gln Asp Cys Pro
 165 170 175

Glu Cys Lys Leu Arg Glu Asn Lys Tyr Phe Phe Lys Leu Gly Val Pro
 180 185 190

Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 195 200 205

Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu
 210 215 220

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met Gly
 225 230 235 240

Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys Tyr
 245 250 255

His His Lys Ile
 260

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un análogo de eFSH que tiene al menos el 95 % de homología con la SEQ ID NO 8 para su uso en un método de aumento de la actividad reproductora en uno o más ungalados, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz del análogo al uno o más ungalados, en donde la cantidad eficaz está entre aproximadamente 200 µg y 850 µg, y en donde se administra una dosis del análogo de la eFSH a cada uno o más ungalados, al menos una vez al día, durante 4 a 9 días en un único ciclo del estro.
- 10 2. El análogo para el uso de la reivindicación 1 en donde dichos ungalados son equinos.
3. El análogo para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el análogo se administra entre 6 a 16 días después de la ovulación.
- 15 4. El análogo para el uso de la reivindicación 1, 2 o 3 en el que los uno o más ungalados se inseminan entre 2 a 8 días después de la administración del análogo de eFSH.
5. El análogo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la cantidad eficaz está entre aproximadamente 500 µg y 850 µg.
- 20 6. El análogo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde una dosis del análogo de eFSH se administra una vez al día a los uno o más ungalados durante 4 a 9 días en un único ciclo del estro.
- 25 7. El análogo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde una dosis del análogo de eFSH se administra al menos una vez al día a cada ungalado durante aproximadamente 5 a 8 días en un único ciclo del estro.
8. El análogo para el uso de la reivindicación 7 en donde una dosis del análogo de eFSH se administra dos veces al día a los uno o más ungalados durante 5 a 8 días en un único ciclo del estro.
- 30 9. El análogo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad eficaz del análogo es de aproximadamente 500 µg, que se administra dos veces al día a los uno o más ungalados.
- 35 10. El análogo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el análogo de eFSH se administra mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

atgaagtcagtcacagttttggtttccttttctggtgctggaaagcagtcctgctgcaatagc
 M K S V Q F C F L F C C W K A V C C N S
 tgtgagctgaccaacatnaccatcgccgtggagaaggaggaatgtggcttctgcataagc
 C E L T N T T I A V E K E E C G F C I S
 atcaacaccacctggtgtgctgggctactgctacacccgggacctggtgtacaaggaccca
 I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y K D P
 gcccgcccaacatccagaaaacatgcaccttcaaggagctggtgtacgagacagtgaaa
 A R P N I Q K T C T F K E L V Y E T V K
 gtgctggtgtgctcaccacgctgactccctgtacacgtaccgggtggccactgcatgt
 V P G C A H H A D S L Y T Y P V A T A C
 cactgtggcaaatgtaacagcgcagcactgactgcaccgtgctgaggtctggggcccagc
 H C G K C N S D S T D C T V R G L G P S
 tactgctccttcggtgacatgaaggaatcctcttctcctaaggatcccccatcccaacct
 Y C S F G D M K E S S S S K D P P S Q P
 ctacatccacatccaccccaactcctggggccagcagacgttcctctcaccctccca
L T S T S T P T P G A S R R S S H P L P
 ataaagacttcttttctgatggagagtttacaacgcaagactgtcctgaatgcaagcta
I K T S F P D G E F T T Q D C P E C K L
 agggaaaacaagtaacttcttcaaactgggcgtcccgatttaccagtgtaagggtgctgc
 R E N K Y F F K L G V P I Y Q C K G C C
 ttctccagagcgtaccccactccagcaaggtccaggaagacaatggtgggtcccaagaac
 F S R A Y P T P A R S R K T M L V P K N
 atcacctcagaatccacatgctgtgtggccaaagcatttatcagggtcacagtgatggga
 I T S E S T C C V A K A F I R V T V M G
 aacatcaagttggagaaccacacccagtgctattgcagcacttgctatcaccacaagatt
 N I K L E N H T Q C Y C S T C Y H H K I
 taa
 *

FIGURA 1

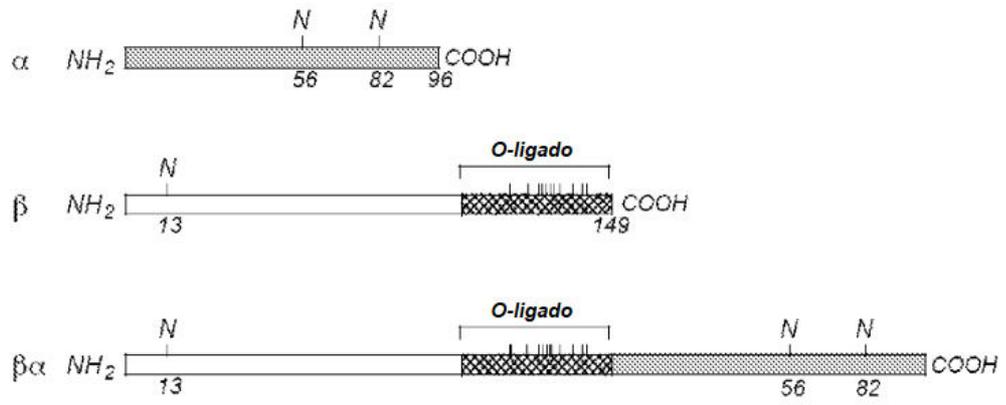


FIGURA 2

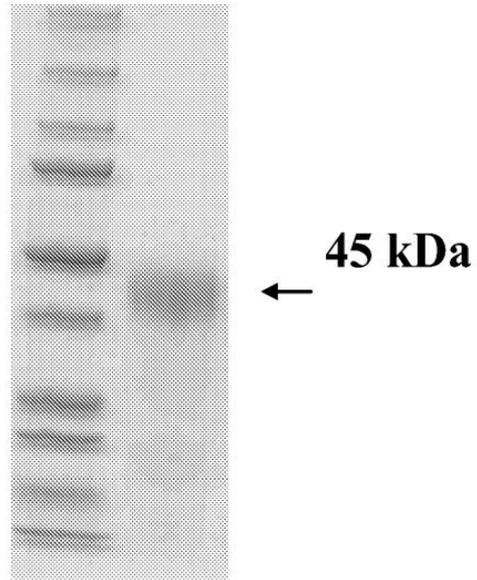


FIGURA 3

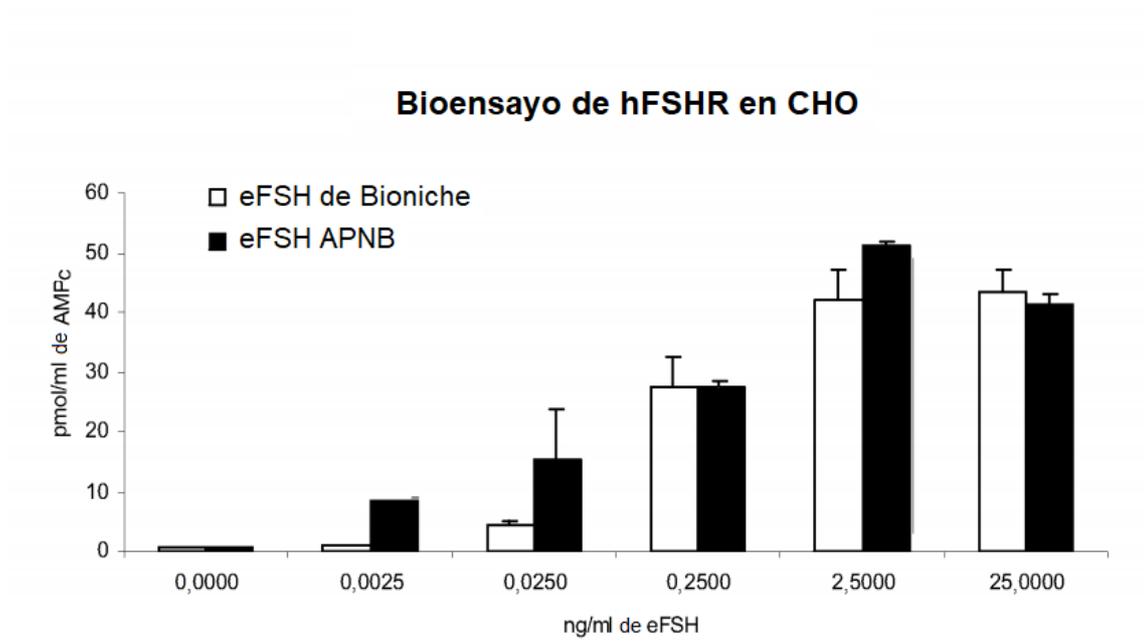


FIGURA 4

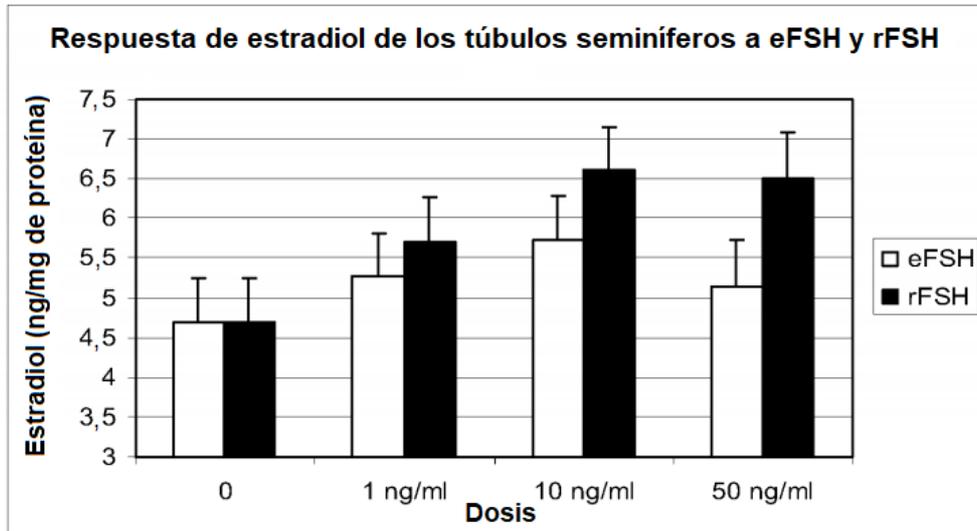


FIGURA 5