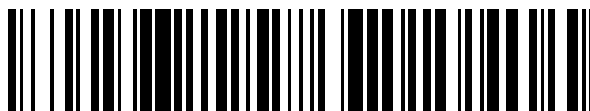


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 659**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/16** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/59** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2013 PCT/US2013/052510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2013 E 13826476 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2880164**

54 Título: **Superagonistas de acción prolongada de la hormona glicoproteica**

30 Prioridad:

**30.07.2012 US 201261677331 P**

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

**17.10.2019**

73 Titular/es:

**TROPHOGEN INC. (100.0%)  
9714 Medical Center Dr. Suite 1114  
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**SZKUDLINSKI, MARIUSZ y  
WEINTRAUB, BRUCE, D.**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 727 659 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**

Superagonistas de acción prolongada de la hormona glicoproteica

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general a hormonas glicoproteicas modificadas que tienen actividad superagonista, y a su uso en el tratamiento de afecciones asociadas con la actividad de la hormona glicoproteica. De manera más específica, esta invención se refiere a moléculas de glicoproteínas modificadas que contienen sustituciones de aminoácidos y uno o más péptidos insertados en la subunidad alfa en comparación con la subunidad alfa de tipo silvestre, en donde tales moléculas modificadas presentan propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con las glicoproteínas de tipo silvestre.

**15 Antecedentes de la invención**

Las gonadotropinas folitropina (hormona foliculoestimulante, FSH) y gonadotropina coriónica, (CG) lutropina (hormona luteinizante, LH) y tiotropina (hormona estimulante de la tiroides, TSH) constituyen la familia de las hormonas glicoproteicas. Cada hormona es un heterodímero de dos subunidades unidas de manera no covalente: alfa y beta. Dentro de la misma especie, la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa es idéntica en todas las hormonas, mientras que la secuencia de la subunidad beta es específica de las hormonas (Pierce, Ann. Rev. Biochem. 50:465-495 (1981)). El hecho de que las secuencias de las subunidades estén altamente conservadas de los peces a los mamíferos implica que estas hormonas han evolucionado a partir de una proteína ancestral común (Fontaine, Gen. Comp. Endocrinol. 32:341-347 (1977)).

Estudios previos con hormonas glicoproteicas modificadas han revelado datos alentadores. Por ejemplo, además de proporcionar hormonas glicoproteicas modificadas con mayor actividad, otras mutaciones han demostrado un aumento en la unión de afinidad del receptor (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2005/089445 y WO 2005/101000). Sin embargo, mientras aumentaba la afinidad, los estudios demostraron que las hormonas de glicoproteínas modificadas se eliminaron tan rápido, si no más rápido que sus homólogos de tipo silvestre. Con el fin de generar un superagonista clínicamente útil con actividad mejorada, el superagonista de la glicoproteína modificada debería tener una semivida biológica mejorada además de una afinidad de unión al receptor mejorada. Sin embargo, los intentos previos de modificar aún más las hormonas glicoproteicas para aumentar la semivida y mejorar la biodisponibilidad han sido menos que satisfactorios y, en cambio, las hormonas glicoproteicas modificadas demostraron solo una respuesta atenuada.

**35 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un polipéptido de subunidad alfa seleccionado del grupo que consiste en polipéptido de subunidad alfa bovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), polipéptido de subunidad alfa de ovino de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), polipéptido de subunidad alfa equina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 4), y polipéptido de subunidad alfa porcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 5), en donde dicho polipéptido de la subunidad alfa comprende:

(A) un inserto de aminoácido que comprende al menos un aminoácido que proporciona un posible sitio de glicosilación, en el que dicho inserto se coloca inmediatamente después de la posición 6, 7 u 8 de dicho polipéptido de la subunidad alfa; y

(B) una o más de las siguientes sustituciones de un aminoácido de tipo silvestre de dicho polipéptido de subunidad alfa con un aminoácido básico:

- (i) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 15 está sustituido con Arginina (R),
- (ii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 de la SEQ ID NO: 2, 3 o 5 está sustituido con Arginina (R),
- (iii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 18 está sustituido con Arginina (R), Lisina (K) o Histidina (H),
- (iv) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 20 está sustituido con Arginina (R), y
- (v) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 24 está sustituido con arginina (R).

En este documento se describe una hormona de glicoproteína modificada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos básicos en Q13, E14, P16 o Q20 y un inserto de VNVTINVT (SEQ ID NO: 20) entre D3 y Q5 de la subunidad alfa de una hormona glicoproteica.

Tal como se describe en este documento, la hormona glicoproteica modificada puede comprender al menos dos o al menos tres sustituciones de aminoácidos básicos en Q13, P16 y Q20. En algunas realizaciones, la hormona glicoproteica modificada comprende además una sustitución de aminoácidos básicos en E14. En algunas

realizaciones, el aminoácido básico es arginina.

Tal como se describe en este documento, la subunidad alfa puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 11 y además puede comprender la subunidad beta de la hormona leutenizante (LH), la gonadotropina coriónica (CG), la hormona foliculoestimulante (FSH) u hormona estimulante de la tiroides (TSH). La subunidad alfa puede derivar de una subunidad alfa humana (SEQ ID NO: 6).

La invención abarca una hormona glicoproteica modificada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos básicos en K15, K17, K20 o K24 y un inserto de NVTINV (SEQ ID NO: 1) entre F6 y T7 de la subunidad alfa de una hormona glicoproteica.

En algunas realizaciones, la hormona glicoproteica modificada comprende al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro sustituciones de aminoácidos básicos a K15, K17, K20 y K24. En algunas realizaciones, la hormona glicoproteica modificada comprende además una sustitución de aminoácidos básicos en E18. En algunas realizaciones, el aminoácido básico es arginina.

En algunas realizaciones, la subunidad alfa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 7 y además comprende la subunidad beta de la hormona leutenizante (LH), la gonadotropina coriónica (CG), la hormona foliculoestimulante (FSH) u hormona estimulante de la tiroides (TSH). En algunas realizaciones, la subunidad alfa deriva de una subunidad alfa bovina, porcina u ovina (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 3, respectivamente).

La invención abarca una hormona glicoproteica modificada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos básicos en K15, E18, K20 o K24 y un inserto de NVTINV (SEQ ID NO: 1) entre F6 y T7 o alternativamente un inserto de NV entre F6 y T7 más un inserto de INV entre T7 y T8 de la subunidad alfa de una hormona de glicoproteína.

En algunas realizaciones, la hormona glicoproteica modificada comprende al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro sustituciones de aminoácidos básicos a K15, E18, K20 y K24. En algunas realizaciones, la hormona de glicoproteína modificada incluye un inserto de NVTINV (SEQ ID NO: 1) entre F6 y T7 de la subunidad alfa. En algunas realizaciones, la hormona glicoproteica modificada incluye un inserto de NV entre F6 y T7 más un inserto de INV entre T7 y T8 de la subunidad alfa. En algunas realizaciones, el aminoácido básico es arginina o histidina. En algunas realizaciones, el aminoácido básico es arginina.

Como se describe y/o se reivindica en este documento, la subunidad alfa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 4 y además comprende la subunidad beta de la hormona leutenizante (LH), la gonadotropina coriónica (CG), la hormona foliculoestimulante (FSH) u hormona estimulante de la tiroides (TSH). En algunas realizaciones, la subunidad alfa deriva de una subunidad alfa equina (SEQ ID NO: 4).

La invención también abarca un uso médico que comprende la administración de las hormonas de glicoproteínas modificadas anteriores al animal. La invención también abarca un método no terapéutico para estimular la ovulación en un animal no humano que comprende administrar cualquiera de las hormonas glicoproteicas modificadas anteriores a dicho animal. En algunas realizaciones el animal es una vaca, una oveja, un cerdo o un caballo

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estimulación de AMPc en células CHO-FSHR con análogos de bFSH seleccionados producidos por transfección transitoria. La Figura 1A muestra una comparación de Folltropin®-V (pFSH), bFSH-TS (tipo silvestre) con análogo de bFSH-5R. La figura 1B muestra la atenuación de la bioactividad *in vitro* del análogo de hFSH-TR4402 (4402 transicional) por dos extensiones N-terminales (ANITV, NITV) y una neoglicosilación interna (V78N) (ensayo SPA AMPc). La Figura 1C muestra una comparación del análogo bFSH-5R con el Inserto 1 (5R + Inserto 1) y el Inserto 2 (5R + Inserto 2).

Las Figuras 2A y 2B muestran el ensayo de selección PK de varios análogos de bFSH después de una sola inyección subcutánea en ratones. En todos los experimentos, se utilizaron 5 ratones para cada preparación. Se tomaron muestras de sangre a las 24, 32 y 48 h después de la inyección, se dedujeron los niveles plasmáticos y los datos se expresaron como % de la dosis inyectada (% de DI). Los niveles de FSH en muestras de plasma se analizaron utilizando el ELISA de FSH (Endocrine Technologies).

Las figuras 3A-D muestran el análisis de diferentes lotes de producción de TR55601. La Figura 3A ilustra el análisis de heterogeneidad de carga utilizando IEF seguido del análisis por transferencia de Western. La sialilación subóptima del Lote 3 (Carriles 2 y 3) está en marcado contraste con las isoformas óptimas altamente ácidas detectadas en el Lote 4 (Carriles 5 y 6). Carril 1, marcador IEF 3-10; Carril 2, TR55601/lote 3 (8 µg); Carril 3, TR55601/lote 3 (4 µg); Carril 4 y 8, TR4401 (1 µg); Carril 5, TR55601/lote 4 (8 µg); Carril 6, TR55601/lote 4 (4 µg); Carril 8, marcador IEF 3-10. La Figura 3B ilustra el Análisis de isoformas cargadas utilizando neuraminidasa (*Vibrio cholerae*), IEF y análisis por transferencia de Western. Muestra de TR55601/lote 4 no

5 tratada (Carriles 2 y 3) y la muestra de TR55601/lote 4 tratadas con neuraminidasa antes de aplicar a 3-10 IEF gel (Carriles 4-6). Carril 1, marcador IEF 3-10; Carril 2, TR55601/lote 4 sin tratar (8 µg); Carril 3, TR55601/lote 4 sin tratar (4 µg); Carril 4, TR55601/lote 4 tratado (4 µg); Carril 5, TR55601/lote 4 tratado (2 µg); Carril 6, TR55601/lote 4 tratado (1 µg). El perfil de IEF para las isoformas digeridas con neuraminidasa se ha desplazado al rango de pI de 7,8 a 10,0. El desplazamiento promedio de pI es de aproximadamente 5 unidades de pH y múltiples bandas (cerca de 10 bandas) transformadas en una banda principal (pI ~ 9,5) y tres bandas menores (pI 7,8-10,0), lo que indica que la mayoría de la heterogeneidad de carga observada (Figura 3A - Lote 4) depende de los restos terminales de ácido siálico con un componente menor de otras modificaciones tales como la desamidación y/o la degradación proteolítica. Las bandas básicas residuales (pI 4,8-5,5) mostradas en 3B son inespecíficas, derivadas de la preparación de neuraminidasa. La Figura 3C muestra el análisis de isoformas cargadas de TR55601-Lote 5 por IEF 3-10 en gel de gradiente pI (IEF 3-10) seguido de análisis por transferencia de Western. Carril 1, marcador IEF 3-10; Carril 2, TR55601-Lote 5 (4 µg); Carril 3, TR55601-Lote 5 (4 µg); Carril 4, TR55601-Lote 4 (4 µg); Carril 5, TR55601-Lote 4 (8 µg); Carril 6, TR55601-Lote 3 (4 µg); Carril 7, TR55601-Lote 3 (8 µg). La Figura 3D ilustra el análisis SDS-Análisis por transferencia de Western de TR55601 Lote 5 en comparación con TR55601 Lote 4 y Fol-V. Carril 1, marcador proteico; Carril 2: Lote 4, 500 ng; Carril 3: Lote 5, 1 ul; Carril 4: carril vacío; Carril 5: Lote 4, 4 ug; Carril 6: Lote 5, 15 ul; Carril 7: Fol-V, 673 ng, Carril 8: marcador proteico.

20 La Figura 4 muestra los resultados del bioensayo clásico de Steelman-Pohley con aumento de hCG del peso ovárico en ratas Sprague-Dawley inmaduras (22 días de vida). Los pesos ováricos se midieron 72 horas después de la dosificación. Los datos se presentan como el peso ovárico total promedio de dos ovarios + EEM (n = 5 por dosis, por grupo). Las ratas se estimularon con una sola inyección de artículo de prueba o vehículo, suplementado con 40 UI de hCG. Se utilizaron los siguientes grupos de dosificación: El grupo 1 estaba recibiendo hCG solo (sin FSH), los grupos 2-5 recibieron TR55601 Lote 4 (0,33 µg, 1,0 µg, 3,33 µg y 10 µg, respectivamente de izquierda a derecha), los grupos 6-8 recibieron Folltropin-V® (3.333 µg, 10.000 µg y 30.000 µg respectivamente de izquierda a derecha), y el Grupo 9-10 recibió TR4401 (1,0 µg y 3,33 µg).

30 La Figura 5 demuestra un protocolo de sincronización de ondas foliculares para la superovulación, la inducción de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo. Las 8 inyecciones de Folltropin-VR (Bioniche) se reemplazan con una inyección simple o doble de TR55601.

35 La Figura 6 muestra el número medio de folículos (3 a 5 mm de diámetro) durante el tratamiento de hiperestimulación en vacas de carne tratadas con 60 µg de rFSH administrados mediante una inyección I.M. única o 300 mg de Folltropin-V (Control) administrados en inyecciones I.M. dos veces al día durante 4 días (3 experimentos combinados).

40 La Figura 7 muestra el número medio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante el tratamiento de hiperestimulación en vacas de carne tratadas con 60 µg de rFSH administrados mediante una única inyección I.M. o 300 mg de Folltropin-V (Control) administrados en inyecciones I.M. dos veces al día durante 4 días (3 experimentos combinados).

45 La Figura 8 muestra el número medio de folículos >9 mm de diámetro durante el tratamiento de hiperestimulación en vacas de carne tratadas con 60 µg de rFSH administrados mediante una inyección I.M. única o 300 mg de Folltropin-V (Control) administrados en inyecciones I.M. dos veces al día durante 4 días (3 experimentos combinados).

50 La Figura 9 muestra los perfiles de diámetro medio de todos los folículos de  $\geq 3$  mm de diámetro durante el tratamiento de hiperestimulación en vacas de carne tratadas con 60 µg de rFSH administrados mediante una única inyección I.M. o 300 mg de Folltropin-V (Control) administradas en inyecciones IM dos veces al día durante 4 días (3 experimentos combinados).

55 La Figura 10A muestra una comparación en la producción de AMPc para el inserto en la subunidad alfa humana (A2), el inserto sin la valina en amino terminal (Inserto 2), las 5 sustituciones de arginina solo sin el inserto (5R) y el control del medio solamente. La Figura 10B muestra la CE50 para las tres construcciones ensayadas.

60 La Figura 11A muestra una comparación de la producción de AMPc en respuesta a la subunidad alfa modificada humana con el inserto de la SEQ ID NO: 1 y las subunidades alfa bovinas modificadas que carecen del inserto. La Figura 11B muestra una comparación de la producción de AMPc en respuesta a la subunidad alfa modificada humana y las subunidades bovinas con y sin diversos insertos.

### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención proporciona moléculas hormonales de glicoproteínas hiperactivas modificadas que sorprendentemente presentan una potencia mejorada y una mayor actividad biológica en comparación con sus homólogos de tipo silvestre. Que están modificadas significa que, mientras que la proteína contiene una secuencia de aminoácidos que difiere de las hormonas glicoproteicas de tipo silvestre, la secuencia ha sido cambiada de modo

que no es idéntica a la secuencia conocida de hormonas glicoproteicas de otra especie. La hiperactividad se puede evaluar de acuerdo con una variedad de parámetros, incluyendo la potencia y la eficacia. La potencia es un parámetro de bioactividad que se determina midiendo la mitad de la respuesta máxima. Las diferencias en la potencia se determinan comparando el valor de la respuesta de las hormonas glicoproteicas del análogo a medio camino entre las condiciones de partida y el máximo (CE<sub>50</sub>) frente a la de las hormonas glicoproteicas de tipo silvestre. Se pueden medir las respuestas de hormonas glicoproteicas *in vitro* utilizando proteínas purificadas, o se puede estimar después de la transfección transicional de un ácido nucleico que codifica la proteína modificada. También se pueden medir las respuestas de hormonas glicoproteicas. *in vivo*, es decir, en un animal que responde a dicho análogo de la hormona glicoproteica. Dichas respuestas abarcan cualquier respuesta celular, biológica, cuantitativa o cualitativa conocida de la unión de la hormona glicoproteica a su receptor, por ejemplo, la producción de AMPc, la síntesis de proteínas tales como la progesterona, la tasa de fertilidad, la tasa de formación de blastocistos, el desarrollo embrionario por ovocito fecundado, etc. La eficacia (V<sub>máx</sub>) o la respuesta máxima es otro parámetro de la bioactividad. Como se analiza en este documento, los parámetros de bioactividad pueden variar según el número de receptores y el acoplamiento de receptores en la línea celular de ensayo. En sistemas con números de receptores más bajos o acoplamiento dañado, las diferencias son más perceptibles en términos de V<sub>máx</sub> (eficacia). En sistemas donde los receptores están sobreexpresados, las diferencias en potencia son más visibles.

Por ejemplo, en los casos en que la hormona glicoproteica modificada es una molécula FSH o CG modificada, los parámetros cuantitativos y cualitativos tales como la cantidad de ovocitos, la tasa de fertilidad y las tasas de formación de blastocitos y embriones se pueden medir a la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos. La dosis máxima eficaz para el número de ovocitos es la cantidad óptima de FSH hiperactiva tanto para la calidad como para la cantidad de ovocitos. La dosis máxima eficaz para el número de ovocitos depende del peso y la tasa metabólica de un animal. Por ejemplo, la dosis máxima eficaz para un animal más grande con una tasa metabólica más lenta es mayor que la dosis máxima eficaz para un animal más pequeño con una tasa metabólica más alta. La dosis máxima eficaz se determina empíricamente para cada animal.

Sin embargo, independientemente del sistema utilizado, las proteínas de la hormona glicoproteica hiperactiva modificada de la invención pueden demostrar al menos un aumento de aproximadamente 2 a 10 veces en potencia o al menos un aumento de aproximadamente 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o incluso 100 veces en la potencia en comparación con un homólogo de tipo silvestre, o un aumento de aproximadamente el 2 al 10 % en la eficacia máxima, o al menos un aumento de un 20%, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90%, o incluso un 100% en la eficacia máxima en comparación con un homólogo de tipo silvestre. Los análogos hiperactivos de la invención también pueden proporcionar un aumento de aproximadamente cinco a diez veces en la potencia o un aumento del 5% al 10% en la eficacia máxima en comparación con la FSH de tipo silvestre. Algunas de las proteínas modificadas de la invención pueden demostrar al menos un aumento de aproximadamente treinta a cincuenta veces en la potencia o un aumento del 30% al 50% en la eficacia máxima en comparación con el tipo silvestre. Por lo tanto, las proteínas de la hormona glicoproteica modificada de la presente invención pueden ser útiles para tratar sujetos con un número bajo de receptores o deficiencias en la respuesta del receptor, ya que las proteínas modificadas de la invención pueden mantener al menos un aumento de 10 veces en la potencia o incluso un aumento del 10% en la eficacia máxima en sistemas con bajo número de receptores o respuesta.

La tasa de absorción de una hormona glicoproteica hiperactiva modificada puede resultar en un aumento de la duración de la acción. Un análogo de la hormona glicoproteica modificada con una tasa de absorción reducida y una duración de acción aumentada puede ser beneficioso para los sujetos hiposensibles, como los que sufren trastornos de fertilidad. La tasa de absorción se mide por K<sub>a</sub>. La tasa de eliminación se mide por K<sub>e</sub>.

Las moléculas de hormonas glicoproteicas modificadas de la invención incluyen proteínas modificadas de especies seleccionadas del grupo que consiste en vacas, caballos, cerdos, ovejas. La hormona glicoproteica de los peces (también conocida como GTH-1) se puede usar en acuicultura, es decir, para ayudar al crecimiento de especies de peces en peligro de extinción u otras especies en cautividad. Otras especies de hormonas glicoproteicas modificadas se pueden usar en el cultivo agrícola y, además, en un entorno de laboratorio para probar los efectos de diferentes mutaciones combinadas en diversas afecciones relacionadas con la hormona glicoproteica masculina y femenina.

Las moléculas de hormonas glicoproteicas modificadas de otras especies tienen sustituciones en las posiciones correspondientes a las moléculas de hormonas glicoproteicas modificadas de humanos (por ejemplo, Tabla 1), vacas (véase la Tabla 2), ovejas, caballos y cerdos descritas en el presente documento, que se pueden identificar utilizando cualquier programa de alineación, que incluyen, pero sin limitación, DNASIS, ALIONment, SIM y GCG y programas tales como Gap, BestFit, FrameAlign y Compare.

Las moléculas de hormonas glicoproteicas modificadas de la presente invención comprenden al menos una subunidad alfa modificada según se reivindica. Los aminoácidos básicos pueden introducirse en las posiciones correspondientes a las posiciones 15, 17, 20 y 24 de alfa bovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), alfa porcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 5) y alfa ovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), y las posiciones 15, 20 y 24 de alfa equina de

tipo silvestre (SEQ ID NO: 4). El resto de glutamato en la posición 18 (bovino, porcino, ovino y equino) también se puede sustituir con un aminoácido básico. En algunas realizaciones, el aminoácido básico puede ser arginina o histidina. En algunas realizaciones, el aminoácido básico puede ser arginina.

- 5 Un péptido con la secuencia NVTINV (SEQ ID NO: 1) o TNVTINV (SEQ ID NO: 12) o VNVTINVT (SEQ ID NO: 20) puede insertarse entre los aminoácidos D3 y Q5 de la subunidad alfa humana (SEQ ID NO: 6) y entre F6 y T7 de la subunidad alfa bovina, porcina, ovina y equina. Como alternativa, la subunidad alfa de la hormona glicoproteica modificada bovina, porcina, ovina o equina puede incluir un inserto de NV entre F6 y T7 más un inserto de INV entre T7 y T8. Las proteínas modificadas de la invención también pueden contener sustituciones adicionales, en particular, sustituciones conservativas que no alteran las propiedades mejoradas de la proteína. Típicamente, sin embargo, dichas proteínas modificadas contendrán menos de cinco sustituciones en posiciones distintas a las enumeradas anteriormente, y pueden mostrar una identidad de secuencia de aminoácidos completa con la correspondiente hormona glicoproteica alfa de tipo silvestre en posiciones distintas de las posiciones enumeradas anteriormente.
- 10
- 15 Los aminoácidos básicos comprenden los aminoácidos lisina, arginina e histidina, y cualquier otro aminoácido básico que pueda ser una modificación de cualquiera de estos tres aminoácidos, aminoácidos básicos sintéticos que normalmente no se encuentran en la naturaleza, o cualquier otro aminoácido que esté cargado positivamente a pH neutro. Los aminoácidos básicos, entre otros, se seleccionan del grupo que consiste en lisina y arginina.
- 20 Las moléculas alfa modificadas ejemplares que tienen las sustituciones de aminoácidos básicos y el inserto peptídico se exponen en la SEQ ID NO: 11 (humana), la SEQ ID NO: 7 (bovina), la SEQ ID NO: 8 (ovina), la SEQ ID NO: 10 (porcina) y la SEQ ID NO: 9 (equina). La presente invención proporciona glicoproteínas modificadas con secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99% o más de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 10.
- 25

Las subunidades alfa modificadas de las proteínas de la hormona glicoproteica modificada descritas y/o reivindicadas en el presente documento también pueden tener una subunidad alfa que comprende dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos básicos. Los aminoácidos sustituidos pueden ser restos de lisina, restos de glutamato, restos de prolina o restos de glutamina. Por ejemplo, en subunidades alfa bovinas de tipo silvestre, una o más de las lisinas en las posiciones 15, 17, 20 y 24 pueden estar sustituidas, así como el glutamato en la posición 18 con un aminoácido básico, tal como una arginina y una histidina. En subunidades alfa humanas de tipo silvestre, una o más de las glutaminas en las posiciones 13 y 20 pueden estar sustituidas, así como el glutamato en la posición 14 y la prolina en la posición 16 con un aminoácido básico, tal como una arginina y una histidina. En subunidades alfa porcinas de tipo silvestre, una o más de las lisinas en las posiciones 15, 17, 20 y 24 pueden estar sustituidas, así como el glutamato en la posición 18 con un aminoácido básico, tal como una arginina y una histidina. En subunidades alfa ovinas de tipo silvestre, una o más de las lisinas en las posiciones 15, 17, 20 y 24 pueden estar sustituidas, así como el glutamato en la posición 18 con un aminoácido básico, tal como una arginina y una histidina. En subunidades alfa equinas de tipo silvestre, una o más de las lisinas en las posiciones 15, 20 y 24 pueden estar sustituidas, así como el glutamato en la posición 18 con un aminoácido básico, tal como una arginina y una histidina.

30

35

40

A modo de ejemplo, se presentan subunidades alfa bovinas modificadas adicionales en las secuencias que se exponen en la SEQ ID NO: 13 a 19 y 22. La presente invención proporciona glicoproteínas modificadas con secuencias de aminoácidos con al menos un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99% o más de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 13 a 19 y 22.

45

A modo de ejemplo, se presentan subunidades alfa equinas adicionales modificadas en las secuencias que se exponen en la SEQ ID NO: 38 a 42. La presente invención proporciona glicoproteínas modificadas con secuencias de aminoácidos con al menos un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99% o más de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 43 a 44.

50

Se pueden diseñar subunidades alfa adicionales modificadas comparando las secuencias de aminoácidos de la subunidad alfa de interés con la de otras especies para identificar los restos básicos correspondientes en las proteínas de otras especies. Dichos métodos se describen en la patente de EE.UU. 6.361.992. También se puede considerar la actividad biológica relativa de la hormona glicoproteica de diversas especies en cuanto a qué especies elegir para la comparación y la sustitución. Además, el modelo de homología basado en la estructura de las hormonas glicoproteicas relacionadas es útil para identificar restos de aminoácidos expuestos en la superficie. Para modificar las posiciones de aminoácidos adicionales, las secuencias de hormonas glicoproteicas de humanos y no humanos pueden alinearse utilizando programas informáticos convencionales como DNASIS (Hitachi Software Engineering) o cualquiera de los otros programas de alineación mencionados anteriormente, incluyendo pero sin limitación ALIONment, SIM y programas de GCG tales como Gap, BestFit, FrameAlign y Compare. Los restos de aminoácidos que difieren entre la hormona glicoproteica humana y la hormona glicoproteica no humana se pueden sustituir utilizando una de las técnicas mencionadas anteriormente, y la hormona glicoproteica resultante puede analizarse para determinar su potencia utilizando uno de los ensayos mencionados en el presente documento.

55

60

65

En consecuencia, la presente invención también proporciona una proteína FSH modificada que tiene una potencia aumentada sobre una FSH de tipo silvestre de la misma especie que comprende las subunidades alfa modificadas descritas en el presente documento.

5 La presente invención también proporciona una proteína LH modificada que tiene una potencia aumentada sobre una LH de tipo silvestre de la misma especie que comprende las subunidades alfa modificadas descritas en el presente documento.

10 La presente invención también proporciona una proteína de TSH modificada que tiene una potencia aumentada sobre una TSH de tipo silvestre de la misma especie que comprende las subunidades alfa modificadas descritas en el presente documento.

15 La presente invención también proporciona una proteína CG modificada que tiene una potencia aumentada sobre una CG de tipo silvestre de la misma especie que comprende las subunidades alfa modificadas descritas en el presente documento.

20 La presente invención también abarca fragmentos de los análogos descritos en el presente documento que tienen actividad superagonista o antagonista. Por ejemplo, los fragmentos de las cadenas alfa modificadas de la invención se pueden usar solos o en combinación con un fragmento o una cadena beta de longitud completa para crear compuestos superagonistas. En algunos casos, los fragmentos de las moléculas de subunidad alfa modificadas de la invención también pueden usarse como antagonistas, por ejemplo, para limitar la duración de la actividad de un producto terapéutico de hormona glicoproteica después de haber sido administrado.

25 La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican las hormonas glicoproteicas modificadas descritas en el presente documento. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con sustituciones conservativas de aminoácidos. Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden codificar polipéptidos que transportan azúcar. Los ácidos nucleicos aislados pueden tener al menos aproximadamente un 30%, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias identificadas anteriormente. Los ácidos nucleicos aislados pueden codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95% o un 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos codificadas por los números de registro identificados anteriormente. El ácido nucleico aislado que codifica un transportador puede hibridar con las secuencias de ácido nucleico identificadas anteriormente.

35 El ácido nucleico que codifica las proteínas de la hormona glicoproteica modificada puede fusionarse genéticamente con secuencias de control de la expresión para la expresión. Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores que son aplicables en el organismo hospedador objetivo. Dichos promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica para diversos hospedadores de organismos procariontes y eucariotes y se describen en la bibliografía. Por ejemplo, dichos promotores pueden aislarse de genes de origen natural o pueden ser promotores sintéticos o quiméricos.

45 La presente invención también proporciona casetes de expresión para insertar el ácido nucleico que codifica una proteína de hormona glicoproteica modificada en moléculas de ácido nucleico diana tales como vectores. Para este fin, el casete de expresión está provisto de secuencias de nucleótidos en los flancos 5 'y 3' para facilitar la eliminación e inserción en posiciones de secuencia específicas como, por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o secuencias diana para recombinación homóloga como, por ejemplo, catalizado por recombinasas. Además de la molécula de ácido nucleico o del casete de expresión de la invención, el vector puede contener genes adicionales tales como marcadores genéticos que permiten la selección de dicho vector en una célula hospedadora adecuada y en condiciones adecuadas. En general, el vector también contiene uno o más orígenes de replicación. Los vectores también pueden comprender secuencias de terminación para limitar la longitud de la transcripción más allá del ácido nucleico que codifica los transportadores de la presente invención.

55 De forma ventajosa, las moléculas de ácido nucleico contenidas en los vectores están unidas de manera operativa a secuencias de control de expresión que permiten la expresión, es decir, que aseguran la transcripción y la síntesis de un ARN traducible, en células procariontes o eucariotas.

60 El término aislado se refiere a moléculas separadas de otros constituyentes celulares/tisulares (por ejemplo, ADN o ARN), que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. El término aislado como se usa en el presente documento también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material vírico y medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o que está sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por otra parte, un ácido nucleico o péptido aislado puede incluir fragmentos de ácido nucleico o de péptido que no son de origen natural, tales como fragmentos y que no se encontrarían en el estado natural.

65 Los términos plásmido y vector se usan indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente

utilizada. Sin embargo, la invención también proporciona otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conocen en la técnica a continuación. Un vector puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en los que puede insertarse una secuencia o secuencias deseadas mediante restricción y ligamiento para transporte entre diferentes ambientes genéticos o para la expresión en una célula hospedadora. Los vectores están típicamente compuestos de ADN, aunque los vectores de ARN también están disponibles. Los vectores incluyen, aunque sin limitación, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula hospedadora, y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción de endonucleasas en los que el vector puede cortarse de una manera determinada y en los que se puede unir una secuencia de ADN deseada de manera que el nuevo vector recombinante conserva su capacidad de replicarse en la célula hospedadora. En el caso de los plásmidos, puede producirse replicación de la secuencia deseada muchas veces a medida que aumenta el número de copias del plásmido en una bacteria hospedadora o solo una sola vez por hospedador antes de que el hospedador se reproduzca por mitosis. En el caso de los fagos, puede producirse replicación de forma activa durante una fase lítica o de forma pasiva durante una fase lisogénica.

Los vectores pueden contener adicionalmente una secuencia del promotor. Un promotor puede incluir una secuencia de ácido nucleico no traducida normalmente localizada aguas arriba de la región codificante que contiene el sitio para iniciar la transcripción del ácido nucleico. La región promotora también puede incluir otros elementos que actúan como reguladores de la expresión génica. En otras realizaciones de la invención, el vector de expresión contiene una región adicional para ayudar en la selección de las células que tienen incorporado el vector de expresión. La secuencia del promotor a menudo está unida (inclusive) en su término 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se prolonga hacia aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, así como los dominios de unión a proteínas responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, pero no siempre, contendrán cajas TATA y cajas CAT. La activación de los promotores puede ser específica para ciertas células o tejidos, por ejemplo, mediante factores de transcripción expresados solo en ciertos tejidos, o el promotor puede ser ubicuo y capaz de expresarse en la mayoría de las células o tejidos.

Los vectores pueden contener además una o más secuencias de marcadores adecuadas para su uso en la identificación y selección de células que se han transformado o transfectado con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o la sensibilidad a los antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables por ensayos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células transformadas o transfectadas, hospedadores, colonias o placas. Los vectores pueden ser los que tienen capacidad de replicación autónoma y de expresión de los productos génicos estructurales en los segmentos de ADN con los que están unidos de forma operativa. Un vector de expresión es uno en el que puede insertarse un ácido nucleico deseado mediante restricción y ligamiento de modo que se una de forma operativa con secuencias reguladoras y puede expresarse como un transcrito de ARN. Expresión se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, un transgén o una región codificante en una célula.

Una secuencia codificante y una secuencia reguladora están unidas de manera operativa cuando están unidas covalentemente de tal manera que se coloca la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras en 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias codificantes o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de tal manera que el transcrito resultante pueda traducirse en la proteína o el polipéptido deseados.

Algunos aspectos de la presente invención incluyen la transformación y/o la transfección de ácidos nucleicos. La transformación es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo al interior de una célula procarionta. La transfección es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo al interior de una célula eucariota. El ácido nucleico transformante o transfectante puede o no estar integrado (unido covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariontas, por ejemplo, el ácido nucleico transformante puede mantenerse en un elemento episomal, tal como un plásmido o un vector vírico. Con respecto a células eucariotas, una célula transfectada de manera estable es aquella en la que el ácido nucleico transfectante se ha llegado a integrar en un cromosoma de modo que se hereda por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones que comprenden una población de células hijas que contienen el ácido nucleico transfectado.

Existen numerosos vectores de expresión de *E. coli* (*Escherichia coli*) conocidos por los expertos en la técnica que son útiles para la expresión del inserto de ácido nucleico. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas



especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariontes también se pueden hacer vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una serie de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (Trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tienen secuencias de sitio de unión a ribosomas, por ejemplo, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. Si es necesario, se puede proporcionar una metionina en amino terminal mediante la inserción de un codón Met en 5' y en marco con el inserto de ácido nucleico aguas abajo. Asimismo, la extensión en carboxilo-terminal del inserto de ácido nucleico puede eliminarse utilizando procedimientos convencionales de mutagénesis de oligonucleótidos.

Adicionalmente, se puede utilizar la expresión en levadura. Hay varias ventajas para los sistemas de expresión en levadura. En primer lugar, existen evidencias de que las proteínas producidas en un sistema de secreción de levadura exhiben el correcto par disulfuro. En segundo lugar, la glicosilación postraduccional se lleva a cabo de manera eficaz por los sistemas secretores de levadura. La región líder del factor pre-pro-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (codificada por el gen MF<sup>-1</sup>) se usa habitualmente para dirigir la secreción de proteínas de la levadura. (Brake, Proc. Nat. Acad. Sci., 81:4642-4646 (1984)). La región líder del factor pre-pro-alfa contiene un péptido señal y un pro-segmento que incluye una secuencia de reconocimiento para una proteasa de levadura codificada por el gen KEX2: esta enzima escinde la proteína precursora en el lado carboxilo de una secuencia señal de escisión del dipéptido Lys-Arg. La secuencia de codificación de FSH se puede fusionar en marco a la región líder del factor pre-pro-alfa. Esta construcción se pone luego bajo el control de un promotor de transcripción fuerte, tal como el promotor del alcohol deshidrogenasa I o un promotor glucolítico. El ácido nucleico que codifica la secuencia va seguido de un codón de terminación de la traducción que va seguido por señales de terminación de la transcripción. Como alternativa, las secuencias codificantes de ácido nucleico pueden fusionarse a una segunda secuencia codificante de proteína, tal como Sj26 o beta-galactosidasa, que puede usarse para facilitar la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad. La inserción de sitios de escisión de proteasas para separar los componentes de la proteína de fusión es aplicable a construcciones utilizadas para la expresión en levaduras. También se puede lograr una glicosilación postraduccional eficaz y la expresión de proteínas recombinantes en los sistemas de Baculovirus.

Las células de mamíferos permiten la expresión de proteínas en un entorno que favorece importantes modificaciones postraduccionales, como el plegamiento y el emparejamiento de cisteína. La adición de estructuras complejas de carbohidratos y la secreción de proteínas activas. Los vectores útiles para la expresión de proteínas activas en células de mamíferos se caracterizan por la inserción de la secuencia codificante de proteínas entre un promotor vírico fuerte y una señal de poliadenilación. Los vectores pueden contener genes que confieren resistencia a la higromicina, resistencia a la gentamicina u otros genes o fenotipos adecuados para su uso como marcadores seleccionables, o resistencia al metotrexato para la amplificación de genes. La secuencia codificante de la proteína quimérica se puede introducir en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) usando un vector que codifica la resistencia al metotrexato u otras líneas celulares usando marcadores de selección adecuados. La presencia del ADN del vector en células transformadas se puede confirmar mediante análisis de transferencia de Southern. La producción de ARN correspondiente a la secuencia codificante del inserto puede confirmarse mediante análisis de transferencia de Northern. En la técnica se han desarrollado varias otras líneas de células hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas humanas intactas, e incluyen las líneas celulares CHO, las células HeLa, líneas celulares de mieloma, células de Jurkat, etc. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y los sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión ejemplares son promotores procedentes de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, etc. Los vectores que contienen los segmentos de interés de ácido nucleico pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, normalmente se usa la transfección con cloruro de calcio para células procariontes, mientras que el fosfato de calcio, DEAE dextrano, o la transfección mediada por lipofectina o la electroporación se pueden utilizar para otros hospedadores celulares.

Los vectores alternativos para la expresión de genes en células de mamíferos, los similares a los desarrollados para la expresión del interferón gamma humano, el activador del plasminógeno tisular, el factor de coagulación VIII, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, proteasa NexinI y proteína eosinófila básica principal, se pueden emplear. Además, el vector puede incluir secuencias promotoras de CMV y una señal de poliadenilación disponible para la expresión de ácidos nucleicos insertados en células de mamíferos (como COS-7).

La expresión del gen o gen híbrido puede ser *in vivo* o *in vitro*. La síntesis *in vivo* comprende transformar células procariontes o eucariotas que pueden servir como células hospedadoras para el vector. Como alternativa, la expresión del gen puede tener lugar en un sistema de expresión *in vitro*. Por ejemplo, los sistemas de transcripción *in vitro* están disponibles comercialmente, los cuales se usan habitualmente para sintetizar cantidades relativamente grandes de ARNm. En dichos sistemas de transcripción *in vitro*, el ácido nucleico que codifica la hormona glicoproteica se clonaría en un vector de expresión adyacente a un promotor de transcripción. Por ejemplo, los

vectores de clonación y expresión Bluescript II contienen múltiples sitios de clonación que están flanqueados por promotores de transcripción procarióticos fuertes (Stratagene). Hay kits disponibles que contienen todos los reactivos necesarios para la síntesis *in vitro* de un ARN a partir de un molde de ADN como los vectores Bluescript (Stratagene). El ARN producido *in vitro* por un sistema como este se puede traducir *in vitro* para producir la hormona glicoproteica deseada (Stratagene).

Otro método para producir una hormona glicoproteica es unir dos péptidos o polipéptidos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipamiento de laboratorio disponible actualmente usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente a una hormona glucoproteína híbrida puede sintetizarse mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína se puede sintetizar y escindirse posteriormente de la resina, exponiendo de este modo un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente mediante un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un péptido híbrido. (Grant, Synthetic Peptides: A User Guide, W.H. Freeman (1992) y Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1993)). Como alternativa, el péptido o polipéptido puede sintetizarse independientemente *in vivo* como se describió anteriormente. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar una hormona glicoproteica mediante reacciones de condensación de péptidos similares. Por ejemplo, la unión enzimática o química de segmentos peptídicos clonados o sintéticos puede permitir que los fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos de mayor tamaño, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen, Biochemistry, 30:4151 (1991); Dawson, Science, 266:776-779 (1994)).

Las hormonas glicoproteicas modificadas de la presente invención pueden ser proteínas recombinantes obtenidas mediante la clonación de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir los fragmentos de polipéptido de los mismos. Por ejemplo, se puede determinar el dominio activo de una subunidad alfa modificada que, junto con la subunidad beta, puede interactuar con un receptor de la hormona glicoproteica y causar un efecto biológico asociado con la hormona glicoproteica. En un ejemplo, los aminoácidos descubiertos que no contribuyen a la actividad o a la especificidad de unión o afinidad de la hormona glicoproteica pueden eliminarse sin una pérdida en la actividad respectiva.

Por ejemplo, los aminoácidos en amino o carboxilo-terminal pueden eliminarse secuencialmente de la hormona glicoproteica natural modificada y la respectiva actividad se puede probar en uno de los muchos ensayos disponibles descritos anteriormente. En otro ejemplo, las proteínas modificadas de la invención pueden tener una porción de aminoácidos en amino terminal o carboxilo terminal, o incluso una región interna de la hormona, reemplazada con un fragmento de polipéptido u otro resto, tal como biotina, lo que puede facilitar la purificación de la hormona glicoproteica modificada. Por ejemplo, una glicoproteína modificada puede fusionarse con una proteína de unión a la maltosa, a través de la química peptídica de la clonación de los respectivos ácidos nucleicos que codifican los dos fragmentos de polipéptidos en un vector de expresión de tal manera que la expresión de la región codificante dé como resultado un polipéptido híbrido. El polipéptido híbrido se puede purificar por afinidad pasándolo sobre una columna de afinidad de amilosa, y la glicoproteína modificada se puede separar después de la región de unión a maltosa escindiendo el polipéptido híbrido con el factor Xa específico de proteasa.

Los fragmentos activos de las moléculas de la hormona glicoproteica modificada de la invención también pueden sintetizarse directamente u obtenerse mediante la alteración química o mecánica de la hormona glicoproteica más grande. Un fragmento activo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 5 aminoácidos consecutivos derivados de la secuencia de aminoácidos de origen natural, que tiene la actividad relevante, por ejemplo, actividad de unión o reguladora. Los fragmentos, tanto si están unidos a otras secuencias como si no, también puede incluir inserciones, deleciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del péptido no se vea alterada o dañada significativamente en comparación con la hormona glicoproteica modificada. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como para eliminar/añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, para aumentar su biolongoevidad, etc. En cualquier caso, el péptido debe poseer una propiedad bioactiva, tal como la actividad de unión, regulación de la unión en el dominio de unión, etc. Las regiones funcionales o activas de la hormona glicoproteica pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la hormona, seguido de la expresión y la prueba del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto facultativo y pueden incluir mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el receptor.

La presente invención también abarca proteínas de fusión y proteínas quiméricas que comprenden las mutaciones descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, fusiones a la glucoproteína FSH. Dicha proteína de fusión puede prepararse uniendo las secuencias de ácido nucleico apropiadas que codifican las secuencias de aminoácidos deseadas entre sí mediante métodos conocidos en la técnica, en el marco de codificación adecuado, y expresando la proteína de fusión por cualquiera de los medios descritos anteriormente. Como alternativa, tal proteína de fusión se puede hacer mediante técnicas de síntesis de proteínas, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos. Los análogos de cadena única y las proteínas quiméricas de la invención pueden incorporar un

enlazador peptídico entre las subunidades alfa y beta, o entre diferentes porciones de la proteína quimérica.

### Caracterización de los superagonistas de la hormona glicoproteica

- 5 El efecto de la modificación o modificaciones a las hormonas glicoproteicas de tipo silvestre descritas en el presente documento se puede determinar de varias maneras. Por ejemplo, los cambios en los sistemas de segundo mensajero dentro de las células transfectadas con un ácido nucleico que codifica las hormonas glicoproteicas modificadas pueden medirse y compararse con células similares transfectadas con un ácido nucleico que codifica la hormona glicoproteica de tipo silvestre. Como alternativa, la actividad de una hormona glicoproteica modificada
- 10 puede determinarse a partir de ensayos de unión al receptor, de los ensayos de captación de timidina, de los ensayos de producción de progesterona, o de los ensayos de secreción de T4. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente cualquier ensayo apropiado para determinar la actividad de una hormona de glicoproteína de tipo silvestre o modificada.
- 15 En una realización de la presente invención, la hormona glicoproteica modificada tiene una potencia que aumenta sobre la potencia de la hormona glicoproteica de tipo silvestre. Este aumento de la potencia se puede evaluar mediante cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente o en cualquier otro ensayo apropiado que determine fácilmente un experto en la materia. El aumento de la potencia no tiene que ser consistente de un ensayo a otro o de una línea celular a otra. ya que éstos, por supuesto, variarán.
- 20 En otra realización de la presente invención, la hormona glicoproteica modificada tiene una eficacia máxima que aumenta con la eficacia máxima de la hormona glicoproteica de tipo silvestre. Este aumento de la eficacia máxima puede evaluarse mediante cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente o en cualquier otro ensayo apropiado que determine un experto en la materia. El aumento de la eficacia máxima no tiene que ser consistente de un ensayo a otro o de una línea celular a otra. ya que éstos, por supuesto, variarán.
- 25 Otros ensayos adecuados para caracterizar los análogos descritos en el presente documento se describen en el documento PCT/US99/05908. Por ejemplo, se pueden usar diversos inmunoensayos que incluyen, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas como los radioinmunoensayos, ELISA, ensayos de enfoque isoelectrónico (IEF), inmunoensayos de intercalado, ensayos de radiometría inmunológica, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ*, análisis por transferencia de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.
- 30 Por ejemplo, cuando la subunidad beta es la de FSH, las mejoras en la calidad y cantidad de los ovocitos se pueden evaluar mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. La FSH hiperactiva se puede usar para mejorar la calidad y cantidad de ovocitos de animales, incluyendo, pero sin limitación, humano, ratón, rata, primate, conejo, cerdo, caballo, oveja y perro. Preferentemente, se administra una FSH hiperactiva a un humano o cualquier animal. Es común que las mejoras en la cantidad y calidad de los ovocitos se determinen utilizando diferentes puntos finales del proceso de fecundación *in vitro* tales como la formación de ovocitos, la fecundación de los ovocitos y la formación de los blastocistos. Los experimentos de fecundación *in vitro* pueden seguir un "protocolo de superovulación" en el cual los sujetos se tratan con un análogo de FSH hiperactivo de acuerdo con la presente invención, lo que conduce a la liberación y maduración de múltiples ovocitos. En experimentos de fecundación *in vitro*, la FSH (FSH hiperactiva y FSH recombinante de tipo silvestre) pueden administrarse con hCG para desencadenar la ovulación. Se puede usar un animal de control que reciba solo hCG o gonadotropina sérica de yegua embarazada (PMSG). La calidad de los ovocitos puede mejorarse aumentando la tasa de fertilidad de los ovocitos en un animal. La tasa de fertilidad de una hormona foliculoestimulante hiperactiva se puede determinar *in vivo* o *in vitro* comparando la tasa de fertilidad lograda con una FSH hiperactiva con la tasa de fertilidad lograda con la misma cantidad de FSH recombinante de tipo silvestre. También se puede usar un animal de control que recibe hCG. La tasa de fertilidad se puede medir por el porcentaje de embriones de dos células que se desarrollan por número total de ovocitos. Si la fecundación se lleva a cabo *in vitro*, se pueden contar dos embriones celulares en las placas de fecundación. En ratones, dos embriones celulares se desarrollan aproximadamente veinticuatro horas después de la fecundación. La tasa de fertilidad varía según la cantidad de FSH hiperactiva administrada. Un animal puede recibir múltiples dosis de FSH hiperactiva. La tasa de fertilidad aumenta en al menos aproximadamente el 10 por ciento como resultado de la administración de FSH hiperactiva en la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos. La tasa de fertilidad puede aumentar en al menos un 20 por ciento, preferentemente al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90% o un 100% como resultado de la administración de FSH hiperactiva en la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos. La hormona foliculoestimulante hiperactiva puede mejorar la calidad de los ovocitos al mejorar la tasa de formación de blastocistos por ovocito fertilizado. La velocidad de formación de blastocistos se puede medir determinando el porcentaje de embriones de dos células que forman blastocistos. La tasa de formación de blastocistos aumenta si el blastocisto se forma *in vivo* o *in vitro*. La tasa de formación de blastocistos depende de la cantidad de hormona foliculoestimulante hiperactiva administrada. La tasa de formación de blastocistos aumenta al menos aproximadamente el 10 por ciento como resultado de la administración de una hormona foliculoestimulante hiperactiva en la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos. La tasa de formación de blastocistos puede aumentar al menos aproximadamente un 20 por ciento, preferentemente al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90% o un 100% como resultado de la administración de FSH hiperactiva en la dosis

máxima eficaz para el número de ovocitos.

La hormona foliculoestimulante hiperactiva puede mejorar la calidad de los ovocitos al aumentar el número total de embriones por ovocito fecundado. El aumento en el número total de embriones por ovocito fecundado aumenta si la fecundación es *in vivo* o *in vitro*. El aumento en el número total de embriones por ovocito fecundado depende de la cantidad de hormona foliculoestimulante hiperactiva administrada. El número total de embriones por ovocito fecundado aumenta al menos aproximadamente el 10 por ciento como resultado de la administración de una hormona foliculoestimulante hiperactiva en la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos. El número total de embriones por ovocito fecundado puede aumentar en al menos un 20 por ciento, preferentemente al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90% o un 100% como resultado de la administración de FSH hiperactiva en la dosis máxima eficaz para el número de ovocitos.

Por ejemplo, cuando la subunidad beta es la de CG, Las actividades potentes similares a la hormona luteinizante (LH) pueden evaluarse mediante bioensayos *in vitro* y *in vivo*. La CG hiperactiva induce la ovulación, prolonga la vida útil del cuerpo lúteo, aumenta la síntesis de progesterona y promueve la formación de cuerpos lúteos accesorios en ciertas especies. Tales acciones resultan en una colección de ovocitos más eficaz, un aumento en la calidad de los ovocitos en ciertas especies. un aumento de las tasas de embarazo y de mantenimiento del embarazo.

### **Análogos de la hormona glicoproteica con mayor vida media en suero**

Las proteínas de la hormona glicoproteica modificada de la invención también pueden modificarse adicionalmente de modo que la vida media en plasma se incremente en comparación con los homólogos de tipo silvestre. Las proteínas de la hormona glicoproteica modificadas de la invención pueden comprender además un posible sitio de glicosilación que incluye secuencias que comprenden sitios de N-glicosilación y/o de O-glicosilación. Por ejemplo, la colocación del péptido NVTINV (SEQ ID NO: 1) o VNVTINVT (SEQ ID NO: 20) en la subunidad alfa proporciona el posible sitio de glicosilación de la subunidad alfa. Los péptidos de la SEQ ID NO: 20 o la SEQ ID NO: 1 pueden colocarse en las secuencias de tipo silvestre humanas entre D3 y Q5. Los péptidos de la SEQ ID NO: 20 o la SEQ ID NO: 1 pueden colocarse en las secuencias de tipo silvestre bovinas, equinas, porcinas y equinas entre F6 y T7. El péptido insertado puede comprender además un resto de treonina adicional en el extremo amino terminal. Otros péptidos para insertar con el fin de alterar la glicosilación incluyen los péptidos NV, INV y TNV, así como TNVTINV (SEQ ID NO: 12). Por ejemplo, una subunidad alfa modificada de glicohormona puede incluir un inserto de NV entre F6 y T7 más un inserto de INV entre T7 y T8. También puede proporcionarse una mayor vida media mediante pegilación o conjugación de otros grupos químicos apropiados o mediante la construcción de proteínas de fusión que tengan una vida media aumentada o cualquier otro método. Dichos medios se conocen en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. 5.612.034, la patente de los Estados Unidos 6.225.449 y la patente de los Estados Unidos 6.555.660.

La vida media también se puede aumentar al aumentar el número de restos cargados negativamente dentro de la molécula, por ejemplo, el número de restos de glutamato y/o de aspartato. Dicha alteración se puede lograr mediante mutagénesis de sitio dirigido. Dicha alteración también se puede lograr a través de la inserción de una secuencia de aminoácidos que contiene uno o más restos cargados negativamente en las proteínas de la hormona glicoproteica modificada.

La semivida de una proteína es una medida de la estabilidad de la proteína e indica el tiempo necesario para una reducción de la mitad en la concentración de la proteína. La semivida sérica de las proteínas de la hormona glicoproteica modificada descrita en el presente documento se puede determinar mediante cualquier método adecuado para medir los niveles de hormona en muestras de un sujeto a lo largo del tiempo, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, inmunoensayos que usan anticuerpos para medir los niveles en muestras de suero tomadas durante un período de tiempo después de la administración de las proteínas de la hormona glicoproteica modificada, o por detección de moléculas de hormonas marcadas, es decir, moléculas radiomarcadas, en muestras tomadas de un sujeto después de la administración de las hormonas glicoproteicas marcadas.

### **Usos médicos y no terapéuticos.**

#### **Métodos de tratamiento**

Las proteínas de la hormona glicoproteica modificada de la presente invención se pueden usar para tratar una afección asociada con la actividad de la hormona glicoproteica. El sujeto puede ser un animal, tal como un mamífero, un reptil, un pez, un ave y un anfibio. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano, una vaca, una oveja, un cerdo o un caballo. Un animal incluye ganado y mascotas domesticadas, tales los cánidos y los félidos. En el presente documento se proporciona una hormona glicoproteica modificada que comprende la subunidad alfa de la invención para su uso en el tratamiento de la disfunción ovulatoria, defectos de la fase lútea, infertilidad inexplicable, infertilidad por factor masculino, concepción limitada en el tiempo, baja expresión del receptor de FSH, baja sensibilidad del receptor de FSH, deficiencias de unión al receptor de FSH, deficiencias de acoplamiento del receptor FSH, baja producción de testosterona, calvicie de patrón masculino, o fallo o lesión hipofisaria. También se proporciona un método no terapéutico para estimular la ovulación en un animal, que comprende administrar una

hormona glicoproteica modificada de la invención a dicho animal.

Por ejemplo, la cantidad y la calidad de los ovocitos se pueden mejorar administrando un análogo de FSH hiperactivo tal como se describe en el presente documento a un animal. Por ejemplo, se ha encontrado sorprendentemente que al administrar una FSH hiperactiva que contiene una subunidad alfa modificada, se obtiene un aumento considerable en la cantidad y calidad de los ovocitos. Los efectos de una FSH hiperactiva sobre la cantidad y calidad de los ovocitos pueden mejorarse aún más al aumentar la semivida sérica de FSH de la FSH hiperactiva. La semivida sérica de FSH se puede aumentar modificando aún más la FSH hiperactiva. Otras modificaciones, incluyendo pero sin limitación las descritas anteriormente, se pueden utilizar para aumentar la semivida sérica de la FSH.

Las proteínas de hormona glicoproteica modificadas FSH, CG, LH o TSH de la presente invención también se pueden usar en regímenes terapéuticos de reproducción asistida en un sujeto masculino o femenino que comprende administrar al sujeto una cantidad auxiliar de las proteínas de la hormona glicoproteica modificada. En tales usos, los análogos se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, citrato de clomifeno y GnRH (hormona liberadora de gonotropina). Las proteínas de hormona glicoproteica modificadas de la presente invención pueden administrarse como una combinación de una o más glicoproteínas. Por ejemplo, una subunidad alfa modificada puede combinarse con una subunidad beta de la FSH, una subunidad beta de CG, una subunidad beta de TSH, y/o una subunidad beta de LH, juntas o por separado, y las glicoproteínas modificadas se administran a un sujeto. Por ejemplo, en un sujeto con deficiencia de gonadotropina aislada (IGD), la FSH, CG, TSH y LH modificadas se pueden administrar al sujeto para restablecer la función normal de las gónadas. Es ampliamente conocido en la técnica que las hormonas glicoproteicas como la FSH, CG, TSH, LH son integrales en la fisiología reproductiva femenina, y estas hormonas glicoproteicas pueden administrarse a un sujeto para superar una serie de trastornos reproductivos y, por lo tanto, ayudar a la reproducción.

Se analizan los regímenes de dosificación de inyección única y múltiple para la glicoproteína CG equina modificada. Para hiperestimulación utilizando análogo de eCG en caballos, vacas o cerdos, se utiliza inyección de análogo de eCG única o dividida a 2:1. Los estudios de rango de dosis para el análogo de eCG incluyen una sola inyección im de 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 mcg. La dosis optimizada se prueba en una proporción de 2:1 y la segunda dosis dividida opcional coincidirá con el tratamiento con PGF2alfa el día 6 u otra fecha. La administración de la eCG modificada produce superovulación en caballos, vacas y cerdos.

Un facultativo experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad eficaz de la hormona glicoproteica para administrar y dependerá de factores tales como el peso, el tamaño, la gravedad de la afección específica y el tipo de sujeto en sí. La cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente mediante procedimientos de optimización habituales. La presente invención proporciona hormonas glicoproteicas con potencia aumentada en relación con la hormona glicoproteica de tipo silvestre. Estas hormonas glicoproteicas modificadas permitirán que un facultativo experto administre una dosis más baja de una hormona glicoproteica modificada en relación con las hormonas glicoproteicas de tipo silvestre para lograr un efecto terapéutico similar, o como alternativa, administre una dosis de la hormona glicoproteica modificada similar a la dosis de la hormona glicoproteica de tipo silvestre para lograr un mayor efecto terapéutico.

Dependiendo de si la hormona glicoproteica se administra por vía oral, parenteral o de otra manera, la administración de la prostaglandina puede ser en forma de sólido, dosificación semisólida o líquida, tal como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, cremas y suspensiones, o similares, preferentemente en una forma de dosificación unitaria adecuada para la administración de una dosificación eficaz. La hormona glicoproteica puede incluir una cantidad eficaz de la hormona glicoproteica seleccionada en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente indeseable o indeseable de otra manera, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con la hormona glicoproteica seleccionada sin causar efectos biológicos inaceptables o interactuar de una manera inaceptable con la hormona glicoproteica. Los métodos reales para preparar dichas formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes, para los expertos en la materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición (Mack Publishing).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir e ilustrar la presente invención. Como tales, no se considerarán como limitantes del alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán bien que muchas otras realizaciones también están dentro del alcance de la invención, como se describe anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### Diseño de análogos de subunidades alfa

Una glicoproteína superagonista de FSH humana con modificaciones a la subunidad  $\alpha$  en Q13R+E14R+P16R+Q20R (4R humana) con una subunidad  $\beta$  de tipo silvestre demostró una superioridad de unión

significativa sobre sus homólogos de tipo silvestre.

La Tabla 1 muestra una comparación de la estructura primaria de los aminoácidos de la alfa humana de tipo silvestre (TS) y la de los superagonistas de hFSH seleccionados. Se muestran las porciones N-terminales de alfa humana de tipo silvestre (restos de aminoácidos 1-28 de 92 restos totales) y formas mutadas. La localización 4 sustituciones de superagonistas para arginina (R) está en el área sombreada. Las 4 inserciones diferentes seleccionadas que introducen una o dos cadenas de carbohidratos unidas a N adicionales se marcan entre el aminoácido D3 y Q5 de la secuencia de tipo silvestre.

10 Tabla 1.

TS	APD		V	QDCPECTL	QENPFFFSQ	PGAPILQQ
TR4401 (4R)	APD		V	QDCPECTL	RRNRFFFS	PGAPILQQ
TR44701 (4R+ins1)	APD	NVT	NVT	QDCPECTL	RRNRFFFS	PGAPILQQ
TR44601 (4R+ins2)	APD	NVT	NVT	QDCPECTL	RRNRFFFS	PGAPILQQ
TR44201 (4R+ins3)	APD		NVT	QDCPECTL	RRNRFFFS	PGAPILQQ
TR44301 (4R+ins4)	APDV		NVT	QDCPECTL	RRNRFFFS	PGAPILQQ

Los segmentos en la Tabla 1 se enumeran como sigue: SEQ ID NO: 43: hFSH TS; SEQ ID NO: 33, hFSH alfa (4R); SEQ ID NO: 34, hFSH alfa (4R+Ins1); SEQ ID NO: 35, hFSH alfa (4R+Ins2); SEQ ID NO: 36, hFSH alfa (4R+Ins3); SEQ ID NO: 37, hFSH alfa (4R+Ins4).

15 Las sustituciones de FSH bovina (bFSH) en algunas realizaciones son altamente análogas a los restos mutagenizados previamente en la subunidad alfa de la FSH humana e incluyen una combinación de 5 mutaciones llamada "5R" (K15R+K17R+E18R+K20R+K24R). Ejemplo SEQ ID NO: 7. Para aumentar la probabilidad de que las secuencias de reconocimiento de glicosilación introducidas (NXT o NXS) conduzcan a la unión de la cadena de carbohidratos N-ligada, se establecieron 18 construcciones de subunidades alfa bovinas diferentes y se clonaron en vectores de expresión desarrollados previamente. 12 construcciones contenían las secuencias peptídicas de extensión en N-terminal ANITV, ANTTA, ANTTA, ANITVNITV, ANTSANTTA y ANTSANTSA.

20 La Tabla 2 muestra una comparación de la estructura primaria de los aminoácidos de la alfa bovina de tipo silvestre (TS) y la de los superagonistas de bFSH seleccionados. Se muestran las porciones N-terminales de alfa bovina de tipo silvestre (restos de aminoácidos 1-32 de 96 restos totales) y alfa bovina mutante. La localización de 5 sustituciones de superagonistas a arginina (R) o lisina (K) están marcadas en el área sombreada entre los aminoácidos C14 y P25, codificado como 5R de 4R+1K. Los 4 insertos diferentes seleccionados que introducen una o dos cadenas de carbohidratos N-ligadas adicionales se marcan entre los aminoácidos F6 y T8 de la secuencia de tipo silvestre.

25 Los segmentos en la Tabla 2 se enumeran como sigue: SEQ ID NO: 44, bFSH TS; SEQ ID NO: 23, bFSH alfa (5R); SEQ ID NO: 24, bFSH alfa (4R+1K); SEQ ID NO: 25, bFSH alfa (5R+Ins1); SEQ ID NO: 26, bFSH alfa (5R+Ins2); SEQ ID NO: 27, bFSH alfa (5R+Ins3); SEQ ID NO: 28, bFSH alfa (5R+Ins4); SEQ ID NO: 29, bFSH alfa (4R+1K+Ins1); SEQ ID NO: 30, bFSH alfa (4R+1K+Ins2); SEQ ID NO: 31, bFSH alfa (4R+1K+Ins3); SEQ ID NO: 32, bFSH alfa (4R+1K+Ins4).

30 Tabla 2

TS	FPDGEF		TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
5R	FPDGEF		TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
4R+1K	FPDGEF		TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
5R+ins1	FPDGEF	NVTINVT	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
5R+ins2	FPDGEF	TNVTINVT	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
5R+ins2	FPDGEF	NV	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
5R+ins4	FPDGEF	TNV	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
4R+1K+ins1	FPDGEF	NVTINVT	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
4R+1K+ins2	FPDGEF	TNVTINVT	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
4R+1K+ins3	FPDGEF	NV	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ
4R+1K+ins4	FPDGEF	TNV	TMQGCPECL	RRNRFFFS	PDAPITYQQ

40 También se produjeron subunidades alfa de glicoproteína equina que incluyen mutaciones y algunas realizaciones incluyen la sustitución de K15R, E18R, K20R y K24R. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 38-40. Además, subunidades alfa de glicoproteína equina que tienen K15R, E18R, K20R y K24R también se generaron (por ejemplo, la SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42). Estas subunidades alfa mutadas también contienen insertos de NVTINT entre

F6 y T7 de la subunidad (por ejemplo, las SEQ ID NO: 9, 40 y 42) o insertos de NV entre F6 y T7 más INV entre T7 y T8 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 38, 39, y 41).

5 La transfección transicional de análogos de bFSH con polietilenimina (PEI) dio como resultado un aumento de 3,7-4,5 veces la expresión del análogo de bFSH en comparación con los métodos basados en lipofectamina (datos no mostrados). Los niveles de expresión de diversos análogos de FSH basados en ELISA específico de heterodímero no indicaron una pérdida importante de la formación del dímero de FSH y no admiten las reivindicaciones anteriores de que era necesario una construcción de cadena simple para alcanzar un alto nivel de expresión.

10 La selección de análogos de bFSH expresados de forma transicional incluyó un bioensayo *in vitro* basado en AMPc y ensayos de cribado de PK (véase las Figuras 1 y 2). Hubo un aumento significativo de 3-4 veces en la potencia de bFSH con sustituciones 5R en comparación con los controles de FSH porcina (pFSH-Folltropin®-V) y bFSH (Figura 1A). De manera destacable, en contraste con muchos estudios previos (Figura 1B), (Heikopp, Eur. J. Biochem 261: 81-84, 1999; Trousdale, Fertil. Steril. 91: 265-270, 2009) se ha descubierto que los nuevos insertos de neoglicosilación no disminuyen la bioactividad *in vitro* del análogo de FSH 5R bovino (Figura 1C). Sitios de neoglicosilación idénticos agregados en el extremo N-terminal redujeron la bioactividad *in vitro* de bFSH, de manera similar al efecto atenuante de la neoglicosilación sobre la actividad intrínseca de la eritropoyetina (Elliott, Exp. Hematol. 32: 1146-1155, 2004; Elliott, Nat. Biotechnol. 21: 4144-421, 2003; Sinclair, J. Pharm. Sci. 94: 1626-1635, 2005) y el efecto de muchas otras prolongaciones de las estrategias de semivida, incluida la pegilación de sitio dirigido (Fishburn, J. Pharm. Sci. 97: 4167-4183, 2008; Uchiyama, Vet. J. 184: 208-211, 2010). El estudio de selección de PK en ratones de dos días indicó que todos los análogos de FSH "5R" bovinos neoglicosilados habían aumentado la semivida terminal en comparación con la bFSH-TS y Folltropin®-V (Figura 2A y 2B). Los datos del ensayo de cribado de PK indicaron una semivida en plasma muy prolongada debido a la glicosilación en uno o dos sitios de neoglicosilación introducidos (Inserto 1 y 2) en comparación con la bFSH-TS, Folltropin®-V y los controles de TR4401. Los niveles observados fueron comparables con la molécula de cadena simple de bFSH con un enlazador de 29 aminoácidos y 4-5 cadenas de carbohidratos O-ligadas. Dos análogos probados inicialmente hechos como un superagonista combinado y los insertos de neoglicosilación, llamados "Insertos 1 y 2" tenían bioactividad *in vitro* comparable al control del superagonista 5R solo (Figura 1C) y aún así prolongaron la semivida en ratones (Figura 2B). Tales análogos de acción prolongada sin reducción de la actividad superagonista no tienen precedentes y se traducen en el impresionante rendimiento esperado *in vivo* en vacas

Varios cientos de miligramos de varias FSH y TSH humanas se produjeron de forma recombinante (rFSH o rTSH) con células CHO utilizando matraces, agitadores, botellas de rodillos y biorreactores. Durante el trabajo inicial, se optimizó un sistema de vector d retrovirus dicistrónico para la expresión de altos niveles de FSH y de análogos de TSH en células CHO-DG44. Se probó la preparación de rFSH humana. Una dosis única de 60 µg de rFSH indujo el desarrollo del folículo, lo que dio como resultado un alto número de embriones de buena calidad que igualaban las ocho inyecciones de Folltropin®-V (300 mg) previamente optimizadas, administradas dos veces al día durante 4 días, lo que respalda sus propiedades únicas, como la absorción retardada después de la inyección IM, así como un mayor tiempo de residencia del receptor de FSH. Véanse las Figuras 3 y 5-8. El superagonista de rFSH en una dosis de 10 µg mostró una capacidad excepcional para reclutar y mantener durante 12 días un grupo mejorado de folículos en crecimiento, en particular folículos en un rango de tamaño de 3-5 mm, que también se sabe que en humanos tienen un número bajo de receptores de FSH (datos no mostrados). Esta mejora inesperada y el apoyo de pequeños folículos por el rFSH, no observado con la dosis de control previamente optimizada Folltropin®-V, proporciona una nueva forma de reclutar folículos que responden a la FSH en etapas aleatorias del ciclo y aumenta el potencial para una IVF exitosa y la superovulación en varios respondedores malos causados por la disminución del número o función del receptor de la FSH (Perez Mayorga, J. Clin. Endocrinology 152: 3268-3369, 2000; Levallet, Arch. Med. Red. 30: 486-494, 1999; Rannikko, Mol. Hum. Reprod. 8: 311-317, 2002; Cai, Feril. Steril. 87: 1350-1356, 2007). Sin embargo, debido a la diferencia de 40 aminoácidos entre la subunidad alfa basada en la FSH bovina y la FSH humana con 4 sustituciones de arginina, se observaron algunos efectos remanentes de tratamientos previos con la rFSH en las mismas vacas, que estuvo de acuerdo con el estudio de datos anterior que muestra las propiedades inmunogénicas de la FSH humana en conejos y monos Rhesus (Cai, Int. J. Toxicol. 30: 153-161, 2011; De Castro, Theriogenology 72: 655-662, 2009).

55 La introducción de restos de arginina (R) o lisina (K) en un área permisiva de modificación seleccionada de la subunidad alfa común ha demostrado que modula la actividad de las hormonas glicoproteicas durante la evolución (Szkudlinski, Nat. Biotechnol). 14: 1257-1263, 1996; Szkudlinski, Physiol. Rev. 82: 473-502, 2002) y desempeñan un papel importante en la interacción electrostática con el grupo con carga negativa ubicado en la región de bisagra de los receptores de la hormona glicoproteica (Mueller, Trends Endocrinol. Metab. 21: 111-122, 2010; Mueller, J. Biol. Chem. 284: 16317-16324, 2009; Mueller, Endocrinol. 152: 3268-3278, 2011). El desarrollo de superagonistas específicos de bFSH incluye sustituciones mínimas a 4-5 R y/o K para producir una molécula más potente y eficaz con posible absorción retardada para aumentar la duración de la acción como se muestra en los datos del presente documento y otros estudios para hFSH y otros análogos de la hormona glicoproteica (Szkudlinski, Physiol. Rev. 82: 473-502, 2002). También se han investigado los insertos de aminoácidos de longitud mínima que contienen uno o dos sitios de neoglicosilación de carbohidratos para aumentar la semivida y producir un análogo de inyección única sin reducir el aumento de la potencia/eficacia del superagonista (ver Figura 4). Para mayor análisis, se pueden usar 8 construcciones que contienen los insertos de péptidos NVTINV, NVTINVT, NV y NVT ubicados entre los

aminoácidos 6 y 8 de la secuencia de tipo silvestre. Como se muestra en los datos del presente documento y en contraste con los estudios previos de neoglicosilación y pegilación (Trousdale, Feril. Steril. 91: 265-270, 2009; Uchiyama, Vet J. 184: 208-211, 2010; Perlman, J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 3227-3235, 2003) es posible diseñar un inserto de aminoácido de longitud mínima que contenga carbohidratos complejos para aumentar la semivida sin reducir la potencia/eficacia superagonista aumentada. Estos nuevos análogos pueden expresarse por transfección transicional en células CHO-K1 utilizando el método del sistema de alta expresión optimizado utilizando PEI y botellas de rodillos.

La purificación de los 4-6 análogos seleccionados expresados por transfección transicional se puede realizar usando una etapa de captura usando la columna SP Sepharose, seguido de la selección de los análogos con la cromatografía de intercambio iónico Mono Q antes del pulido final con filtración en gel. La pureza de los análogos de bFSH puede ser superior al 98%. La recuperación acumulada puede alcanzar el 50% con una purificación total de 50 veces. Todos los análogos se pueden caracterizar *in vitro* por inmunoensayo ELISA, bioensayo robusto *in vitro* de AMPc utilizando la línea celular CHO-FSHR, electroforesis SDS-PAGE y análisis de gel de enfoque isoelectrónico (IEF). Los análogos purificados seleccionados también se pueden analizar por cuantificación rigurosa por HPLC de fase inversa, análisis de composición de carbohidratos y evaluaciones de estabilidad y estados de agregación.

Otros experimentos incluyen el análogo de la FSH bovina TR55601 (subunidad alfa: SEQ ID NO: 7), que incluye sustituciones a la arginina (R) en 15K, 17K 18K 20K y 24K de la subunidad alfa, así como un inserto NVTINV (SEQ ID NO: 1) entre 6F y 7T de la subunidad alfa. Se generaron y probaron varios lotes de TR55601 utilizando los IEF y el análisis por transferencia de Western. Las Figuras 3A-D muestran resultados ejemplares del análisis. Las figuras 3A-3D demuestran, en parte, que TR55601/lote 4 y lote 5 presentan una distribución óptima y verifican la eficacia de las mutaciones en este lote. Los lotes 4 y 5 y los lotes con resultados de detección similares se utilizaron en tratamientos con animales. Por ejemplo, El análisis IEF-transferencia de Western ilustra las isoformas ácidas optimizadas de TR56001 del lote 4 y del lote 5 en las figuras 3A-C. Por otra parte, tal como se muestra en las Figuras 3a y 3C, el lote 3 no se verificó completamente y no se usó en tratamientos con animales. Los análogos de bFSH y en particular las muestras de TR55601 también se estudiaron con ensayos de cribado de PK en ratones. Los ratones se inyectaron por vía subcutánea con muestras seleccionadas de bFSH y se tomaron muestras de sangre a las 24, 32 y 48 horas después de las inyecciones. Los plasmas se aislaron y se analizaron con ELISA de bFSH (Endocrine Technologies, Inc.). La semivida prolongada del lote 4 de las muestras TR55601 se confirmó con los ensayos de cribado de PK. Datos no mostrados.

El perfil farmacocinético completo de los análogos candidatos seleccionados se puede realizar mediante la administración sc de una sola dosis de 10 µg por rata y 10 tiempos diferentes de extracciones de sangre (1, 5, 15, 30 min y 1, 2, 6, 24 y 48h) que abarcan tanto la fase de distribución como la de eliminación. Los niveles plasmáticos de FSH bovina se pueden cuantificar en plasma usando ELISA de bFSH. Se puede realizar un análisis completo de PK.

Los análogos se seleccionaron para construir vectores de expresión bicistrónicos y la selección y amplificación de la expresión análoga en células CHO-DG44 en preparación para la producción a gran escala, estudios de purificación y superovulación en bovinos. Las células CHO-DHFR(-) DG44 se cotransfectaron con los vectores de expresión y se sometieron a amplificación génica en medio de cultivo que contenía incrementos por etapas de metotrexato (MTX). Las células se calificaron para la siguiente etapa de amplificación después de recuperar su morfología poligonal (2-3 semanas). Los clones que presentan un nivel de secreción > 2 pg/célula/día pueden someterse a un segundo tratamiento, dirigido a amplificar el gen marcador GS (MSX). Se puede obtener un aumento adicional de 2-5 veces, alcanzando un nivel de secreción de hasta 10 pg/célula/día.

#### **Preparación y experimentación con análogos de subunidades alfa**

Aunque la rFSH indujo una respuesta superovulatoria después de una única inyección intramuscular (I.M.) y 60 µg parecen estar muy cerca de la dosis óptima, hubo una disminución significativa en la respuesta superovulatoria cuando las vacas fueron expuestas al rFSH por tres o más veces. Por lo tanto, se diseñaron los experimentos para probar una nueva formulación de rFSH llamada TR 55601 rFSH, que incluye una subunidad alfa (SEQ ID NO: 7) que tiene una sustitución "5R" y un inserto de NVTINT entre F6 y T7. El objetivo fue determinar primero el efecto de un tratamiento de dosis única o dividida con rFSH para inducir una respuesta superovulatoria en vacas de carne y luego evaluar más a fondo la respuesta superovulatoria de la inyección única de rFSH y determinar si la respuesta superovulatoria seguía siendo alta cuando las vacas se expusieron a rFSH dos o tres veces.

Se analizaron las muestras de TR55601 FSH. *in vivo* en ratas con el bioensayo clásico de FSH de Steelman-Pohley (Steelman et al., Endocrinol. 53: 604-616, 1953). A las ratas Sprague-Dawley hembra (200-220 g) se les inyectó una dosis única del artículo de prueba (por ejemplo, bFSH) o vehículo, suplementado con 40 UI de hCG. Los pesos ováricos se midieron 72 horas después de la dosificación. Véase la Figura 4. Cada grupo se trata con hCG para proporcionar unas condiciones de partida. TR55601 bFSH, en todas las concentraciones, aumenta significativamente el peso del ovario.

La Figura 5 muestra un protocolo de sincronización de onda folicular para superovulación, inducción de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo. en donde las 8 inyecciones de Folltropin-VR (Bioniche) se reemplazan con una



inyección simple o doble de TR55601. El tratamiento incluyó la inserción de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P4) y la administración de benzoato de estradiol (BE) en el día 0. Los tratamientos superovulatorios se iniciaron el día 4 con TR55601 administrado como inyección única o doble. La segunda inyección de dosis dividida coincidió con los tratamientos con PGF<sub>2α</sub> en el día 6. El dispositivo de progesterona se eliminó con la última inyección de FSH en el día 7. En el día 8, los donantes recibieron LH porcina y se inseminaron sin detección de estrógeno 12 y 24 horas más tarde, o una vez en el día 8 (16 h después de la pLH). Los óvulos/embriones se recolectaron sin cirugía en el día 15 (2, 3). Se utilizó Folltropin-V® como control; se administraron 300 mg\* totales en 8 inyecciones intramusculares (IM) dos veces al día durante 4 días (mg\*, basado en el estándar de referencia NIH-FSH-P1 altamente impuro).

En particular, 30 vacas Red Angus no lactantes fueron estratificadas y bloqueadas en función de sus antecedentes previos de producción de embriones y se asignaron al azar a uno de los tres grupos de tratamiento. Las vacas en el grupo de control (n=10) recibieron 300 mg de Folltropin-V, I.M. en un protocolo de dosis decreciente dos veces al día administrado durante un período de 4 días. Específicamente: Día 4, 3,0 ml (mañana y tarde); Día 5, 2,5 ml (mañana y tarde); Día 6, 1,5 ml (mañana y tarde) y Día 7, 0,5 ml (mañana y tarde). Las vacas en el grupo de tratamiento de 60 µg de rFSH recibieron una única inyección I.M. de 60 µg de rFSH y las vacas en el grupo de tratamiento 40-20 µg de rFSH recibieron una inyección I.M. de 40 µg de rFSH el día 4, seguido de otra inyección I.M. de 20 µg de rFSH en el día 6.

Entonces, 25 de las 30 vacas se sobreestimuladas nuevamente con Folltropin-V (Control) o una inyección única de 60 µg de rFSH. Los animales en el grupo de Control (n = 10) permanecieron en el grupo de control, y 8 de cada 10 vacas en el grupo de 60 µg de rFSH en el Experimento 1 fueron tratadas nuevamente con una sola inyección I.M. de rFSH. Además, 7 de cada 10 vacas tratadas previamente con la inyección simple dividida de rFSH se trataron con una sola inyección I.M. de rFSH. El intervalo entre las colecciones de embriones fue de 29 días.

24 de las 25 vacas utilizadas en el segundo experimento fueron sobreestimuladas nuevamente con Folltropin-V (Control) o una inyección única de 60 µg de rFSH. De nuevo, las vacas de control permanecieron en el grupo de control y las vacas rFSH se mantuvieron en el grupo de rFSH. El intervalo entre colecciones de embriones es de 30 días.

En el día 0 (comienzo del experimento), todos los animales recibieron 5 mg de estradiol-17β más 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal impregnado con progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health). En el día 4 (día esperado de aparición de la onda folicular), todas las vacas fueron sobreestimuladas de acuerdo con los grupos descritos anteriormente. Las dosis de 60 µg para la inyección I.M. única de rFSH constituyeron 7,5 ml y Folltropin-V se administró en 8 inyecciones I.M. en un protocolo de dosis decreciente. Todos los animales recibieron 500 µg de cloprostenol I.M. (Cyclase, Syntex, Argentina) el día 6 por la mañana y por la tarde. Los Cue-mate se extrajeron en la tarde del día 6. En la mañana del día 8, las vacas recibieron 100 µg de gonadorelina (Gonasyn, Syntex Argentina) y se inseminaron 12 y 24 horas después. Todas las vacas fueron inseminadas con semen congelado del mismo toro. Los óvulos/embriones se recolectaron sin cirugía en el día 15 y se evaluaron siguiendo las recomendaciones del IETS.

Todas las vacas fueron examinadas por ultrasonidos en los días 0, 4, 6 y 8 para determinar la presencia de un CL y el número y tamaño del folículo y para determinar los perfiles de crecimiento del folículo. La respuesta ovulatoria se confirmó contando el número de CL y los folículos > 10 mm de diámetro mediante ecografía y palpación rectal en el día 15.

En todos los experimentos, los puntos de datos se evaluaron primero para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza. Debido a las diferencias en las varianzas entre los grupos, los datos se transformaron por raíz cuadrada y se analizaron por ANOVA de una vía. El análisis de la respuesta general después de que se concluyeron los tres experimentos se realizará mediante ANOVA de dos vías para detectar el efecto del número de experimento y el tratamiento y su interacción. Los medios fueron comparados por la prueba de LSD protegida. Los datos de los folículos se analizaron mediante el procedimiento MIXED para detectar el efecto del tratamiento, el día y su interacción en los números de folículos y perfiles de crecimiento. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa informático Infostat Analytical Software (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

La respuesta superovulatoria y los datos de óvulos/embriones se resumen en la Tabla 3. Aunque el número medio de CL y las vacas con ≤2 CL el día de la recolección de óvulos/embriones no difirió entre los grupos, la inyección dividida de rFSH dio lugar a un mayor número (P <0,05) de folículos no ovulados. El número medio de óvulos/embriones totales, los óvulos fecundados y los embriones transferibles (grados 1, 2 y 3) tampoco difirieron.

La Tabla 3 muestra la superovulación con dosis únicas o divididas de TR55601 (rFSH).

Tabla 3: Numero medio (± EEM) de cuerpos lúteos (CL), folículos > 10 mm de diámetro, número de vacas con ≤ 2 CL en el momento de la recolección de óvulos/embriones, número de óvulos/embriones, óvulos fertilizados y embriones de grados 1, 2 y 3 embriones (embriones transferibles) en vacas de carne tratadas con una sola inyección (60 µg) o inyección única dividida (40-20 µg) I.M. de rFSH (TR55601) o 300 mg de Folltropin-V® (Control) administrado en

inyecciones I.M. de dos veces al día durante 4 días.

Tratamiento	N	CL	fóliculo > 10 mm	Vacas con ≤2 CL el día 15	Total de óvulos/embriones	Óvulos fecundados	Embriones de grado 1	Embriones de grados 1 y 2	Embriones de grados 1, 2 y 3	N.º "0" emb.
Control	10	14,1±2,1	3,2±1,1a	0	12,7±2,4	10,5±1,6	7,5±1,4	8,1±1,4	9,0±1,5	0
60 µg de rFSH	10	12,7±2,8	4,6±1,1ab	2	11,6±3,0	9,1±2,2	5,4±1,2	6,6±1,5	6,6±1,5	2
40-20 µg de rFSH	10	13,9±1,5	8,5±1,9b	0	11,2±1,9	9,9±1,6	6,2±1,4	7,4±1,7	7,9±1,7	0
p-valor		0,6407	0,0262	0,1173	0,7317	0,6008	0,4339	0,6035	0,4462	0,1173

5 La respuesta superovulatoria y los datos de óvulos/embriones para la segunda dosis se resumen en las Tablas 4 y 5. El número medio de CL, los folículos > 10 mm y las vacas con ≤2 CL el día de la recolección de óvulos/embriones no difirieron entre los grupos. El número medio de óvulos/embriones totales, los óvulos fertilizados y los embriones transferibles (grados 1, 2 y 3) tampoco difirieron entre los grupos.

10 Las tablas 4 y 5 muestran la superovulación con una dosis única de TR55601 (rFSH).

Tabla 4. Número medio (± EEM) de CL, folículos > 10 mm de diámetro y número de vacas con <2 CL en el momento de la recolección de óvulos/embriones. Las vacas se trataron con una inyección única (60 µg) I.M. de rFSH o 300 mg de Folltropin-V (Control) administrada en inyecciones I.M. dos veces al día durante 4 días.

Tratamiento	N	CL	Folículos > 10 mm	Vacas con ≤2 CL el día 15
Control	10	12,7±2,4	3,7±0,9	0
60 µg de rFSH	15	14,7±1,9	5,3±1,3	1
p-valor		0,5730	0,3752	0,4047

15 Tabla 5. Número medio (± EEM) de óvulos/embriones, óvulos fertilizados y embriones de grado 1, 2 y 3 (embriones transferibles) en vacas de carne tratadas con una sola (60 µg) inyección I.M. de rFSH (TR55601) o 300 mg de Folltropin-V® (Control) administradas en inyecciones I.M. dos veces al día durante 4 días.

Tratamiento	N	Total de óvulos/embriones	Óvulos fecundados	Embriones de grado 1	Embriones de grados 1 y 2	Embriones de grado 1, 2 y 3 (transferibles)	Vacas con "0" emb. transf.
Control	10	11,9 ± 2,5	10,5 ± 2,2	3,2 ± 0,8	4,7 ± 1,1	4,9 ± 1,2	2
60 µg de rFSH	14	13,4 ± 3,3	11,6 ± 3,0	3,5 ± 1,0	5,1 ± 1,5	6,1 ± 1,8	4
p-valor		0,8263	0,7958	0,8903	0,8608	0,9992	0,6326

20 Para el experimento de dosificación final, en este momento solo están disponibles los datos del folículo. No hubo diferencias significativas en los perfiles de crecimiento de los folículos y en el número de folículos el día anterior a la inseminación entre los grupos de rFSH y Folltropin-V. Los datos de la ovulación y de óvulos/embriones estarán disponibles en breve y se presentarán por separado para el Experimento 3 y luego se combinarán con los Experimentos 1 y 2. Los datos del folículo para el Experimento 3 están disponibles y se combinaron con los de los experimentos 1 y 2, y se presentan en la Tabla 6.

La Tabla 6 muestra tres superovulaciones con TR55601 (rFSH) a intervalos de 30 días.

30 Tabla 6. Número medio (± EEM) de CL, folículos > 10 mm de diámetro, número de vacas con ≤ 2 CL en el momento de la recolección de óvulos/embriones, número de óvulos/embriones, óvulos fertilizados y embriones de grados 1, 2 y 3 (embriones transferibles) en vacas de carne tratadas con una sola inyección (60 µg) o una inyección dividida (40-20 µg) I.M. de rFSH (TR55601) o 300 mg de Folltropin-V® (Control) administrada dos veces al día durante 4 días. Las vacas fueron tratadas tres veces consecutivas en intervalos de ~ 30 días (3 experimentos combinados).

Efectos principales										
Experimentos	N	CL	Folículos > 10 mm	Vacas con ≤2 CL el día 15	Óvulos/embriones totales	Óvulos fecundados	Embriones de grado 1	Embriones de grados 1 y 2	Embriones de grado 1, 2 y 3 (transferibles)	Vacas con "0" emb. transf.
Experimento 1	24	14,1±1,4	5,0±1,0	1	13,0±1,6	11,0±1,1	7,3±0,8	8,4±0,9	8,9±1,0	1

(continuación)

Efectos principales										
Experimentos	N	CL	Folículos > 10 mm	Vacas con ≤2 CL el día 15	Óvulos/embriones totales	Óvulos fecundados	Embriones de grado 1	Embriones de grados 1 y 2	Embriones de grado 1,2 y 3 (transferibles)	Vacas con "0" emb. transf.
Experimento 2	24	13,7± 1,5	7,4± 0,9	1	10,7± 1,8	8,9± 1,4	4,5± 1,0	5,6± 1,1	6,6± 1,3	2
Experimento 3	24	15,5± 1,9	5,3± 1,0	3	12,8± 2,2	11,1± 1,9	3,4± 0,7	5,0± 1,0	5,6± 1,2	6
p-valor		0,9426	0,9195	0,4233	0,5881	0,5169	0,0031	0,0219	0,0480	0,0695
Tratamientos										
Control	30	13,9± 1,2	3,7± 0,6	0	11,3± 1,5	9,7± 1,2	4,9± 0,6	6,0± 0,8	6,7± 1,0	2
60 µg de rFSH	42	14,8± 1,3	5,9± 0,6	5	12,8± 1,5	10,8± 1,3	5,2± 0,7	6,6± 0,8	87,3± 0,9	7
p-valor		0,9684	0,0224	0,0501	0,7893	0,9184	0,9361	0,9571	0,9840	0,2059
Interacción del tratamiento del experimento		0,8664	0,7260		0,7720	0,8597	0,9385	0,9790	0,9769	

Las características del folículo desde el inicio del tratamiento hasta justo antes de la inseminación artificial se muestran en la Tabla 7 y las Figuras 6-9.

5 Las tablas 7 muestran los números de folículos en el modelo de superovulación en vacas no lactantes. El desarrollo del folículo (media ± EEM) se detectó mediante ecografía de las vacas de carne tratadas con 60 µg de rFSH administradas mediante inyección única i.m. o inyecciones i.m. de 300 mg de Folltropin®-V administradas dos veces al día durante 4 días.

10 Tabla 7

Tratamiento	N	Día 0 Folículos de 3 a 5 mm	Día 4 Folículos de 3 a 5 mm	Día 8 folículos ≥ 9 mm
rFSH	18	13,2± 1,1	18,9± 1,7	14,7± 2,7
Folltropin-V	18	12,4± 1,2	17,4± 1,3	18,4± 1,9
p-valor		0,66	0,47	0,12

15 Los números de folículos de 3 a 5 mm de diámetro no difirieron entre los grupos de tratamiento (Figura 6). Tampoco los números de folículos de 6 a 8 mm de diámetro (Figura 7), folículos > 9 mm (Figura 8) o el diámetro medio del folículo a lo largo de los días de tratamiento (Figura 9).

20 Se puede interpretar que los resultados obtenidos en esta serie de experimentos sugieren que el producto rFSH induce una respuesta superovulatoria en vacas de carne que no es diferente de la de Folltropin-V. Tampoco hay evidencia de una disminución en la respuesta superovulatoria en comparación con Folltropin-V cuando las vacas se tratan tres veces consecutivas. La respuesta superovulatoria en la dosis final parece ser similar a las dos primeras y esto se confirmará después de la recolección de óvulos/embriones. Existe preocupación por el mayor número de folículos no ovulados (> 10 mm) en vacas tratadas con rFSH (principalmente debido a un alto número de folículos no ovulados en dos vacas) que debe investigarse más a fondo. También se requieren más estudios para determinar la dosis óptima de rFSH para superovular vacas de carne y lecheras y para determinar los efectos a largo plazo del tratamiento consecutivo con rFSH más de tres veces.

### Especificidad del inserto para una semivida mejorada

30 Para determinar si la semivida mejorada observada es específica de la secuencia del inserto de la SEQ ID NO: 1, la subunidad alfa humana con el inserto se modificó para eliminar la valina en amino terminal. Los dos fueron probados por su capacidad para producir AMPc, junto con el análogo que carece del inserto. Los estudios demostraron que el inserto es específico de la secuencia y confiere una unión y una semivida superiores a la subunidad alfa (véase la Figura 9). Luego se examinaron las condiciones de producción en diversas condiciones de crecimiento para optimizar la producción máxima (véase la Tabla 8).

35 La Tabla 8 muestra la optimización de la producción de la subunidad alfa humana.

Muestras	CD promedio	Interpolación ng/ml	Factor de dilución	ng/ml*dil	Concentración (ng/ml)	EEM	Rendimientos ng/placa
Inserto I en medio GLP Sigma 6	1,1753	23,10155	800	18481,24	22783,156	4301,916	2506,1472
Inserto I en medio Excel 302	0,92265	16,92817	1600	27085,072	20802,18	2805,404	2669,6131
	1,1518	22,49597	800	17996,776			
	0,827	14,75474	1600	23607,584			

ES 2 727 659 T3

(continuación)

Muestras	CD promedio	Interpolación ng/ml	Factor de dilución	ng/ml*dil	Concentración (ng/ml)	EEM	Rendimientos ng/placa
Inserto I en medio Lonza	1,1652 0,90045	22,84037 16,41683	800 1600	18272,296 26266,928	22269,612	3997,316	2820,8175
Inserto I en medio Hyclone	1,9813 1,37845 0,9435 0,57165	24,68149 13,94756 8,538053 4,64663	400 800 1600 3200	9872,596 11158,048 13660,885 14869,216	12390,185	1140,7851	1734,6261

Después se examinó el inserto junto con el homólogo bovino y se confirmó que el aumento de la semivida es específico de la secuencia del inserto (véase Figura 11).

5

Lista de secuencias

<110> Szkudlinski, Mariusz W. Weintraub, Bruce D.

10

<120> Superagonistas de acción prolongada de la hormona glicoproteica

<130> 056815-5010-WO

15

<150> US 61/677,331

<151> 30/07/2012

<160> 44

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inserto de glicoproteína modificada

30

<400> 1

**Asn Val Thr Ile Asn Val**

**1**

**5**

35

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 2

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
 20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys  
 35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys  
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val Arg Val  
 65 70 75 80

Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 85 90 95

<210> 3  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*

5

<400> 3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
 20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys  
 35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys  
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val Arg Val  
 65 70 75 80

Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 85 90 95

10

<210> 4  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

15

<400> 4

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Lys Leu  
 1 5 10 15

Arg Glu Asn Lys Tyr Phe Phe Lys Leu Gly Val Pro Ile Tyr Gln Cys  
 20 25 30

Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Arg  
 35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys  
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met Gly Asn Ile Lys Leu  
 65 70 75 80

Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys Tyr His His Lys Ile  
 85 90 95

<210> 5  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 5

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Leu Gly Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
 20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys  
 35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys  
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Ala Arg Val  
 65 70 75 80

Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 85 90 95

10

<210> 6  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 6

ES 2 727 659 T3

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu Gln Glu Asn  
1 5 10 15

Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys  
20 25 30

Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met  
35 40 45

Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys  
50 55 60

Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His  
65 70 75 80

Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
85 90

<210> 7  
<211> 102  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

5

<400> 7

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly  
1 5 10 15

Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp  
20 25 30

Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
35 40 45

Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
50 55 60

Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val  
65 70 75 80

Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr  
85 90 95

Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
100

10

<210> 8  
<211> 102  
<212> PRT  
<213> *Ovis aries*

15

ES 2 727 659 T3

<400> 8

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly  
 1 5 10 15

Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Lys Pro Asp  
 20 25 30

Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45

Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60

Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val  
 65 70 75 80

Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr  
 85 90 95

Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

5

<210> 9  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

10

<400> 9



ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Thr Gln Asp  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Phe Arg Leu Gly  
 20 25 30  
 Val Pro Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45  
 Thr Pro Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60  
 Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val  
 65 70 75 80  
 Met Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr  
 85 90 95  
 Cys Tyr His His Lys Ile  
 100

<210> 10  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 10

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Leu Gly  
 20 25 30  
 Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45  
 Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60  
 Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val  
 65 70 75 80  
 Met Gly Asn Ala Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr  
 85 90 95  
 Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

10

<210> 11

ES 2 727 659 T3

<211> 100  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

Ala Pro Asp Val Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Cys Thr Leu Arg Arg Asn Pro Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro  
 20 25 30  
 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro  
 35 40 45  
 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu  
 50 55 60  
 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr  
 85 90 95  
 Tyr His Lys Ser  
 100

10 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Inserto de glicoproteína modificada

<400> 12

Thr Asn Val Thr Ile Asn Val  
 1 5

20 <210> 13  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

25 <400> 13

ES 2 727 659 T3

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

5 <210> 14  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 14

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Glu Cys Lys Leu Lys Arg Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp  
 20 25 30  
 Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45  
 Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60  
 Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val  
 65 70 75 80  
 Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr  
 85 90 95  
 Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

10 <210> 15  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 15 <213> *Bos taurus*

ES 2 727 659 T3

<400> 15

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro  
 20 25 30  
 Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr  
 35 40 45  
 Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile  
 50 55 60  
 Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Val Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser  
 85 90 95  
 Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

5 <210> 16  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

10 <400> 16

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu Lys Arg Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro  
 20 25 30  
 Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr  
 35 40 45  
 Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile  
 50 55 60  
 Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Val Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser  
 85 90 95  
 Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

ES 2 727 659 T3

5 <210> 17  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 17

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys  
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr  
 20 25 30

Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg  
 35 40 45

Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr  
 50 55 60

Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val  
 65 70 75 80

Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His  
 85 90 95

Lys Ser

10 <210> 18  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 15 <400> 18

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys  
 1 5 10 15

Lys Leu Lys Arg Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr  
 20 25 30

Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg  
 35 40 45

Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr  
 50 55 60

Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val  
 65 70 75 80

Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His  
 85 90 95

Lys Ser

<210> 19  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 19

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu  
 1 5 10 15

Cys Lys Leu Lys Arg Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile  
 20 25 30

Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala  
 35 40 45

Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala  
 50 55 60

Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn  
 65 70 75 80

Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr  
 85 90 95

His Lys Ser

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT

10

ES 2 727 659 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inserto de glicoproteína modificada

5

<400> 20

Val Asn Val Thr Ile Asn Val Thr  
1 5

10

<210> 21

<211> 99

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 21

Ala Pro Asp Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys  
1 5 10 15

Cys Thr Leu Arg Arg Asn Pro Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile  
20 25 30

Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu  
35 40 45

Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser  
50 55 60

Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly  
65 70 75 80

Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr  
85 90 95

His Lys Ser

20

<210> 22

<211> 99

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

25

<400> 22

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu  
1 5 10 15

Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile  
20 25 30

Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala  
35 40 45

Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala  
50 55 60

Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn  
65 70 75 80

Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr  
85 90 95

His Lys Ser

5 <210> 23  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> superagonista bFSH (5R)  
<400> 23

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu  
1 5 10 15

Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
20 25 30

15 <210> 24  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> superagonista bFSH (4R+1K)  
<400> 24

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu  
1 5 10 15

Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
20 25 30

25 <210> 25



ES 2 727 659 T3

<211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> superagonista bFSH (5R+Ins1)  
 <400> 25

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly**  
 1 5 10 15

**Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp**  
 20 25 30

**Ala Pro Ile Tyr Gln Cys**  
 35

10  
 <210> 26  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> superagonista bFSH (5R+Ins2)

20 <400> 26

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln**  
 1 5 10 15

**Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro**  
 20 25 30

**Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys**  
 35

25 <210> 27  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> superagonista bFSH (5R+Ins3)

<400> 27

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys**  
 1 5 10 15

**Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr**  
 20 25 30

**Gln Cys**

35 <210> 28

ES 2 727 659 T3

<211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> superagonista bFSH (5R+Ins4)  
 <400> 28

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu**  
**1 5 10 15**

**Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile**  
**20 25 30**

**Tyr Gln Cys**  
**35**

10  
 <210> 29  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> superagonista bFSH (4R+1K+Ins1)  
 20 <400> 29

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly**  
**1 5 10 15**

**Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp**  
**20 25 30**

**Ala Pro Ile Tyr Gln Cys**  
**35**

25 <210> 30  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> superagonista bFSH (4R+1K+Ins2)  
 <400> 30

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln**  
**1 5 10 15**

**Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro**  
**20 25 30**

**Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys**  
**35**

35 <210> 31

ES 2 727 659 T3

<211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> superagonista bFSH (4R+1K+Ins3)

<400> 31

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys**  
**1 5 10 15**

**Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr**  
**20 25 30**

**Gln Cys**

<210> 32  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> superagonista bFSH (4R+1K+Ins4)

20 <400> 32

**Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu**  
**1 5 10 15**

**Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile**  
**20 25 30**

**Tyr Gln Cys**  
**35**

25 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> superagonista de hFSH (4R)

<400> 33

**Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu Arg Arg Asn**  
**1 5 10 15**

**Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys**  
**20 25**

35 <210> 34  
 <211> 36  
 <212> PRT

ES 2 727 659 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> superagonista de hFSH (4R+Ins1)

5

<400> 34

**Ala Pro Asp Val Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu**  
**1 5 10 15**

**Cys Cys Thr Leu Arg Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro**  
**20 25 30**

**Ile Leu Gln Cys**  
**35**

10

<210> 35

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> superagonista hFSH (4R+Ins2)

<400> 35

**Ala Pro Asp Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys**  
**1 5 10 15**

**Cys Thr Leu Arg Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile**  
**20 25 30**

**Leu Gln Cys**  
**35**

20

<210> 36

<211> 31

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> superagonista hFSH (4R+Ins3)

30

<400> 36

**Ala Pro Asp Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu Arg**  
**1 5 10 15**

**Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys**  
**20 25 30**

35

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> superagonista hFSH (4R+Ins4)

ES 2 727 659 T3

<400> 37

Ala Pro Asp Val Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu  
1 5 10 15

Arg Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys  
20 25 30

5

<210> 38  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> *Equus caballus*

10

<400> 38

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys  
1 5 10 15

Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Phe Arg Leu Gly Val  
20 25 30

Pro Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr  
35 40 45

Pro Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser  
50 55 60

Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met  
65 70 75 80

Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys  
85 90 95

Tyr His His Lys Ile  
100

15

<210> 39  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> *Equus caballus*

20

<400> 39

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys  
 1 5 10 15

Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Phe Arg Leu Gly Val  
 20 25 30

Pro Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr  
 35 40 45

Pro Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser  
 50 55 60

Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met  
 65 70 75 80

Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys  
 85 90 95

Tyr His His Lys Ile  
 100

<210> 40  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

5

<400> 40

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Thr Gln Asp  
 1 5 10 15

Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Phe Arg Leu Gly  
 20 25 30

Val Pro Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45

Thr Pro Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60

Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val  
 65 70 75 80

Met Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr  
 85 90 95

Cys Tyr His His Lys Ile  
 100

10

<210> 41

ES 2 727 659 T3

<211> 101  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

5 <400> 41

Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Gln	Asp	Cys
1				5					10					15	
Pro	Glu	Cys	Arg	Leu	Arg	His	Asn	Arg	Tyr	Phe	Phe	Arg	Leu	Gly	Val
			20					25					30		
Pro	Ile	Tyr	Gln	Cys	Lys	Gly	Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr
		35					40					45			
Pro	Ala	Arg	Ser	Arg	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Pro	Lys	Asn	Ile	Thr	Ser
	50						55						60		
Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Arg	Val	Thr	Val	Met
65					70					75					80
Gly	Asn	Ile	Lys	Leu	Glu	Asn	His	Thr	Gln	Cys	Tyr	Cys	Ser	Thr	Cys
				85					90					95	
Tyr	His	His	Lys	Ile											
			100												

10 <210> 42  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

15 <400> 42

ES 2 727 659 T3

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Thr Gln Asp  
 1 5 10 15

Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg His Asn Arg Tyr Phe Phe Arg Leu Gly  
 20 25 30

Val Pro Ile Tyr Gln Cys Lys Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro  
 35 40 45

Thr Pro Ala Arg Ser Arg Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60

Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val  
 65 70 75 80

Met Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr  
 85 90 95

Cys Tyr His His Lys Ile  
 100

<210> 43  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

5

<400> 43

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro  
 1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys  
 20 25

10

<210> 44  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

15

<400> 44

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys  
 20 25 30

20



## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de subunidad alfa seleccionado del grupo que consiste en polipéptido de subunidad alfa bovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), un polipéptido de subunidad alfa ovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), un polipéptido de subunidad alfa equina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 4), y un polipéptido de la subunidad alfa porcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 5), en donde dicho polipéptido de la subunidad alfa comprende:
- (A) un inserto de aminoácidos que proporciona un posible sitio de glicosilación, en el que dicho inserto se coloca inmediatamente después de la posición 6 o 7 de dicho polipéptido de subunidad alfa; y
- (B) una o más de las siguientes sustituciones de un aminoácido de tipo silvestre de dicho polipéptido de subunidad alfa con un aminoácido básico:
- (i) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 15 está sustituido con Arginina (R),
- (ii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 de la SEQ ID NO: 2, 3 o 5 está sustituido con Arginina (R),
- (iii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 18 está sustituido con Arginina (R), Lisina (K) o Histidina (H),
- (iv) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 20 está sustituido con Arginina (R), y
- (v) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 24 está sustituido con arginina (R).
2. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en donde dicho inserto es de uno a ocho aminoácidos de longitud.
3. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en donde dicho retrovirus se selecciona del grupo que consiste en:
- (A) Asparagina (N);
- (B) Treonina (T);
- (C) Cisteína (C);
- (D) Asparagina-Valina (NV);
- (E) Treonina-Asparagina-Valina (TNV);
- (F) Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (TINVT)
- (G) Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (NVTINV) (SEQ ID NO: 1);
- (H) Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (NVTINVT);
- (I) treonina-asparagina-valina-treonina-isoleucina-asparagina-valina (TNVTINV) (SEQ ID NO: 12); y
- (J) Valina-Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (VNVTINVT) (SEQ ID NO: 20).
4. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido básico es histidina, lisina o arginina.
5. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido básico es arginina.
6. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de subunidad alfa comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones.
7. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido de subunidad alfa comprende dos o tres insertos.
8. El polipéptido de la subunidad alfa bovina, ovina, porcina o equina de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de subunidad alfa comprende:
- (A) un inserto de aminoácidos que proporciona un posible sitio de glicosilación, en el que dicho inserto se coloca inmediatamente después de la posición 6 o 7 de dicho polipéptido de la subunidad alfa, y en el que dicho inserto se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) Asparagina (N);
- (b) Treonina (T);
- (c) Cisteína (C);
- (d) Asparagina-Valina (NV);
- (e) Treonina-Asparagina-Valina (TNV);
- (f) Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (TINVT)
- (g) Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (NVTINV) (SEQ ID NO: 1);
- (h) Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (NVTINVT);
- (i) Treonina-Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (TNVTINV) (SEQ ID NO: 12);
- y
- (j) Valina-Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (VNVTINVT) (SEQ ID NO: 20);
- y

(B) al menos una sustitución de un aminoácido de tipo silvestre con un aminoácido básico, en donde dicha sustitución se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (i) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 15 está sustituido con Arginina (R),  
 (ii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 de la SEQ ID NO: 2, 3 o 5 está sustituido con Arginina (R),  
 (iii) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 18 está sustituido con Arginina (R), Lisina (K) o Histidina (H),  
 (iv) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 20 está sustituido con Arginina (R), y  
 (v) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 24 está sustituido con arginina (R).

10 9. El polipéptido de la subunidad alfa bovina, ovina, porcina o equina de la reivindicación 1, en el que se producen una o más de las siguientes sustituciones:

- 15 (A) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 15 está sustituido con Arginina (R),  
 (B) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 de la SEQ ID NO: 2, 3 o 5 está sustituido con Arginina (R),  
 (C) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 18 está sustituido con Arginina (R), Lisina (K) o Histidina (H),  
 (D) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 20 está sustituido con Arginina (R), y  
 (E) el aminoácido de tipo silvestre en la posición 24 está sustituido con Arginina (R),

20 y en la que inmediatamente después de la posición 6 de dicho polipéptido de subunidad alfa, se inserta uno de los siguientes polipéptidos:

- 25 (a) Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (NVTINV) (SEQ ID NO: 1);  
 (b) Treonina-Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (TNVTINV) (SEQ ID NO:12);  
 (c) Valina-Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina-Treonina (VNVNTINV) (SEQ ID NO: 20);  
 (d) Asparagina-Valina (NV); y  
 (e) Treonina-Asparagina-Valina (TNV).

30 10. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, la reivindicación 3 o la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido de subunidad alfa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, un 85%, un 86%, un 87%, un 88%, un 89%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, el 98%, o el 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO:10.

35 11. Una hormona de glicoproteína modificada que comprende el polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, la reivindicación 3, la reivindicación 8, o la reivindicación 9, y la subunidad beta de la hormona leutenizante (LH), la gonadotropina coriónica (CG), hormona foliculoestimulante (FSH) u hormona estimulante de la tiroides (TSH).

40 12. Una hormona de glicoproteína modificada que comprende el polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, la reivindicación 3, la reivindicación 8, o la reivindicación 9, y la subunidad beta de la hormona foliculoestimulante (FSH).

45 13. Una hormona de glicoproteína modificada que comprende el polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, la reivindicación 3, la reivindicación 8, o la reivindicación 9 para uso en el tratamiento de la disfunción ovulatoria, defectos de la fase lútea, infertilidad inexplicable, infertilidad por factor masculino, concepción en tiempo limitado, baja expresión del receptor de FSH, baja sensibilidad del receptor de FSH, deficiencias de unión al receptor de FSH, deficiencias de acoplamiento del receptor FSH, baja producción de testosterona, calvicie de patrón masculino, o fallo o lesión hipofisaria.

50 14. La glicoproteína modificada de la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de la disfunción ovulatoria, defectos de la fase lútea, infertilidad inexplicable, infertilidad por factor masculino, concepción limitada en el tiempo, baja expresión del receptor de FSH, baja sensibilidad del receptor de FSH, deficiencias de unión al receptor de FSH, deficiencias de acoplamiento del receptor FSH, baja producción de testosterona, calvicie de patrón masculino, o fallo o lesión hipofisaria.

55 15. Un método no terapéutico para estimular la ovulación en un animal no humano, que comprende administrar una hormona de glicoproteína modificada que comprende el polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, la reivindicación 3, la reivindicación 8 o la reivindicación 9 a dicho animal.

60 16. Un método no terapéutico para estimular la ovulación en un animal no humano, que comprende administrar la glicoproteína modificada de la reivindicación 11 o la reivindicación 12 a dicho animal.

65 17. La hormona de glicoproteína modificada para el uso de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, o el método no terapéutico de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde dicho animal es un caballo, una vaca, una oveja o un cerdo.

18. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de subunidad alfa es un

polipéptido de subunidad alfa bovina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) que comprende:

- 5 (A) el polipéptido Asparagina-Valina-Treonina-Isoleucina-Asparagina-Valina (NVTINV) (SEQ ID NO:1) insertado inmediatamente después de la posición 6 de dicho polipéptido de la subunidad alfa; y  
(b) sustituciones a arginina (R) en las posiciones 15, 17, 18, 20 y 24.

19. El polipéptido de la subunidad alfa de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

FIGURA 1

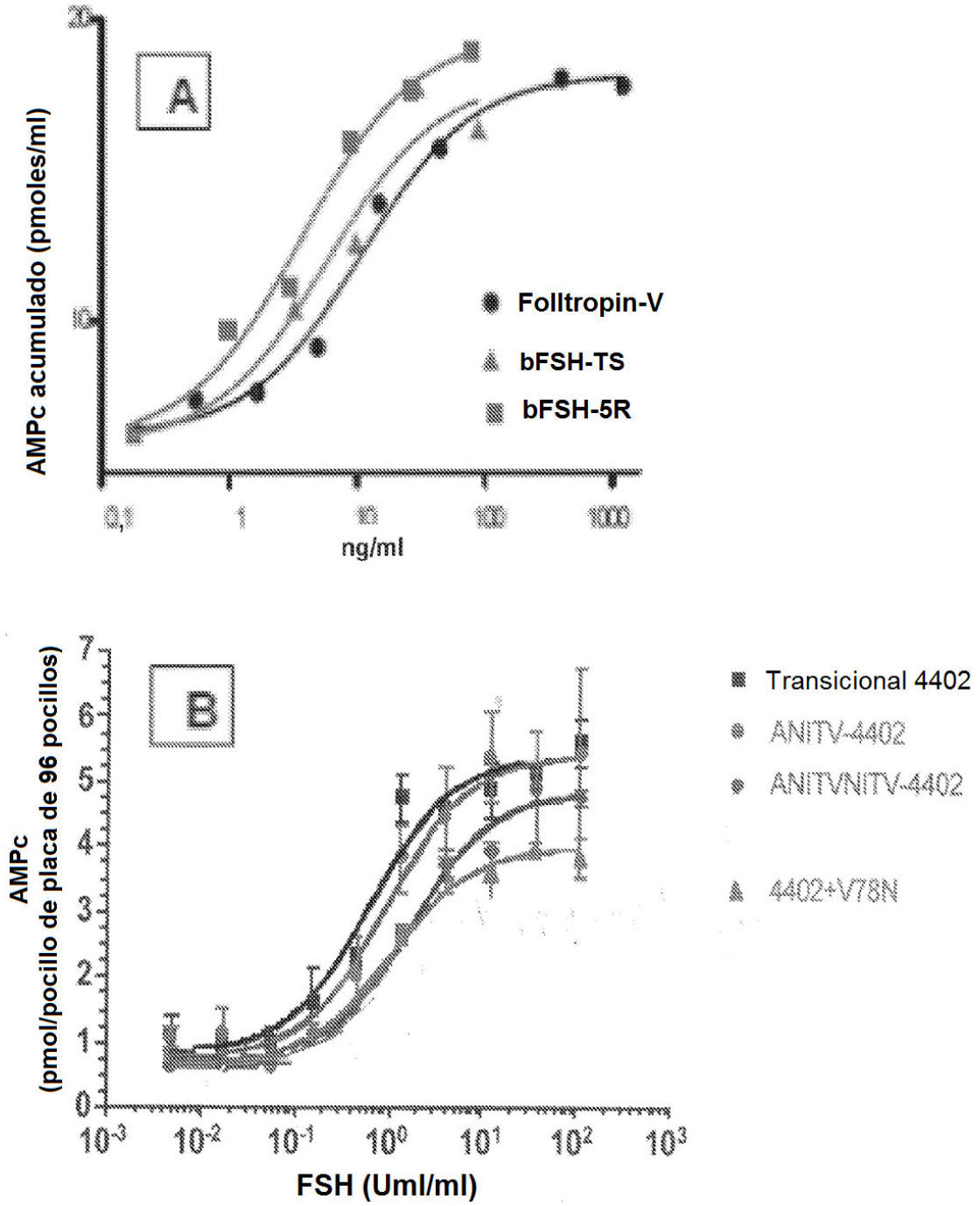


FIGURA 1

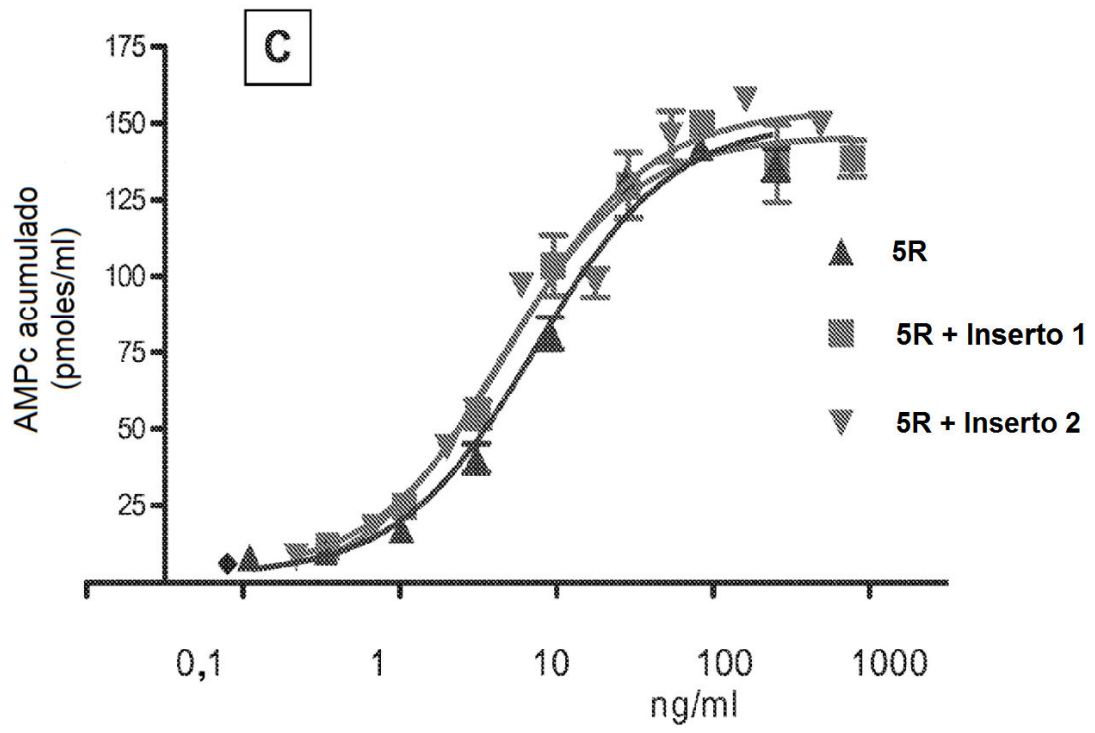
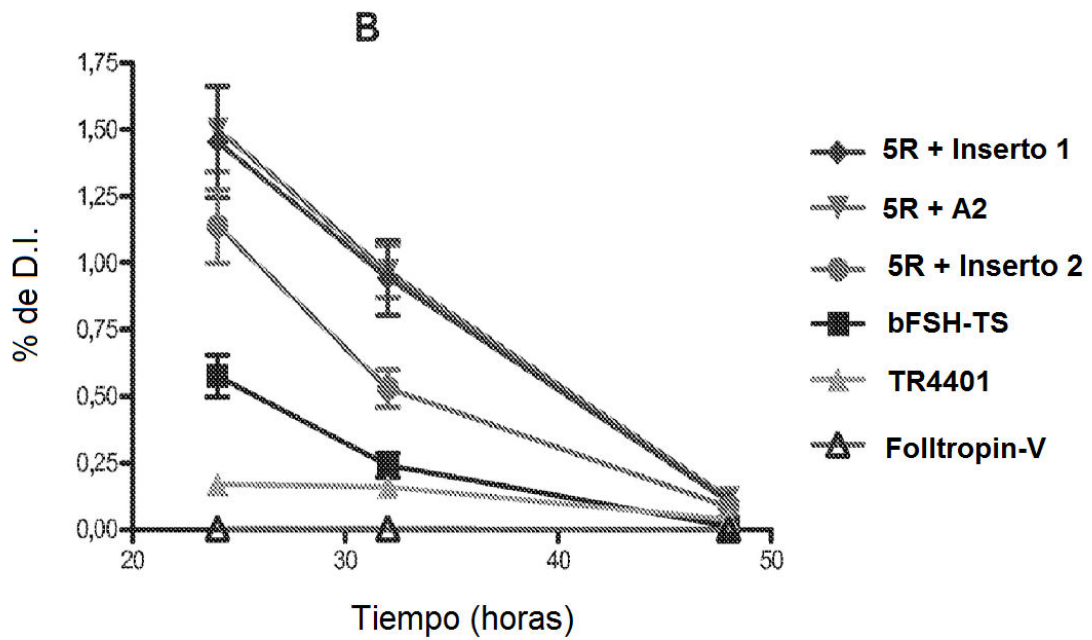
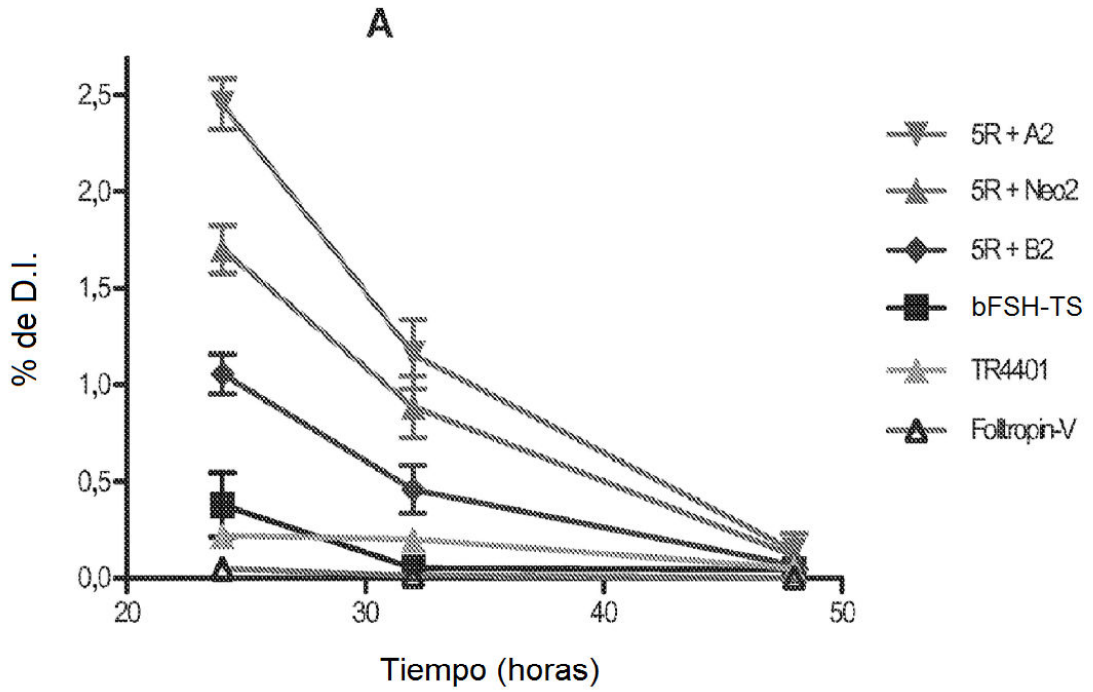


FIGURA 2





**FIGURA 3**

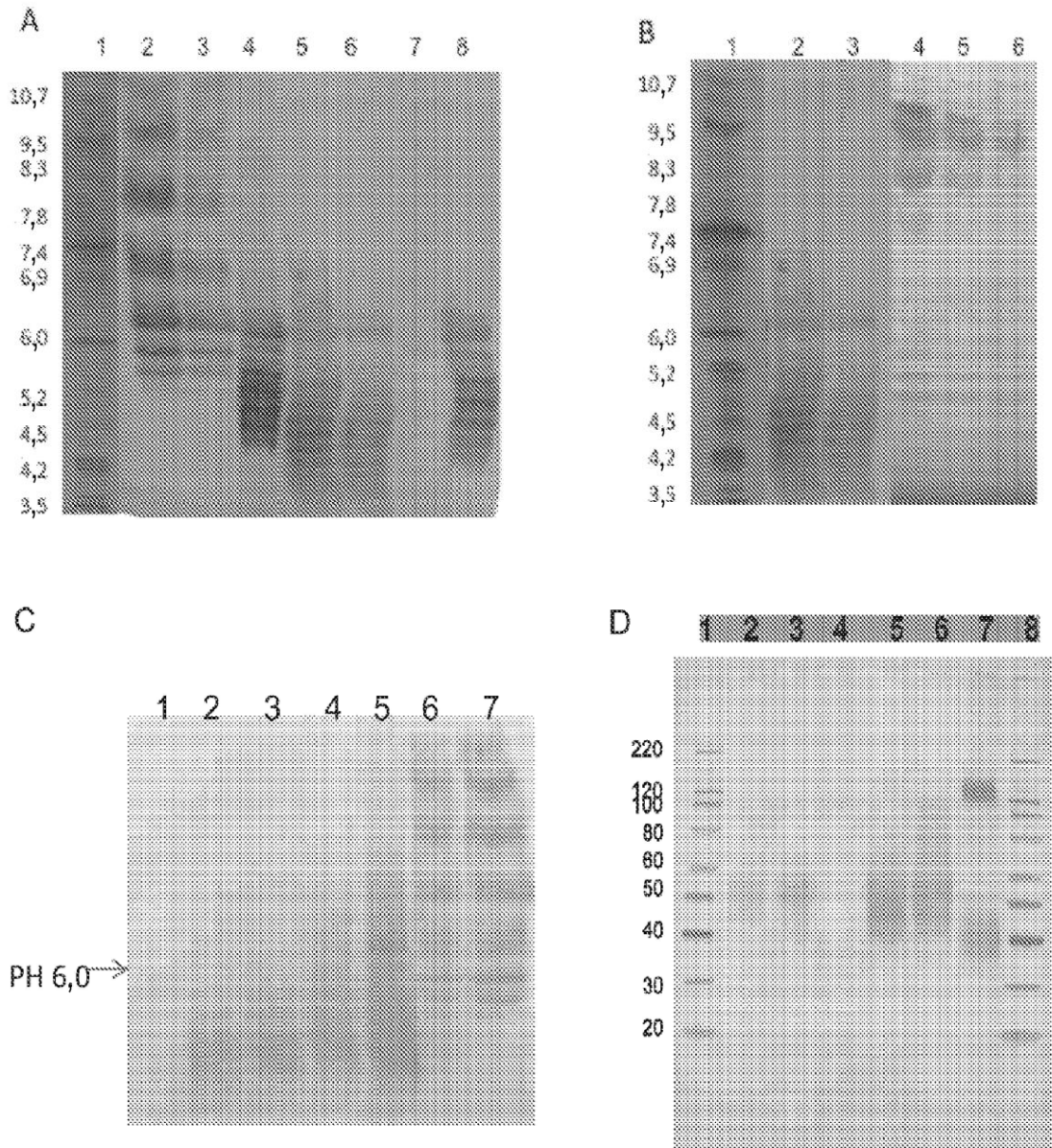


FIGURA 4

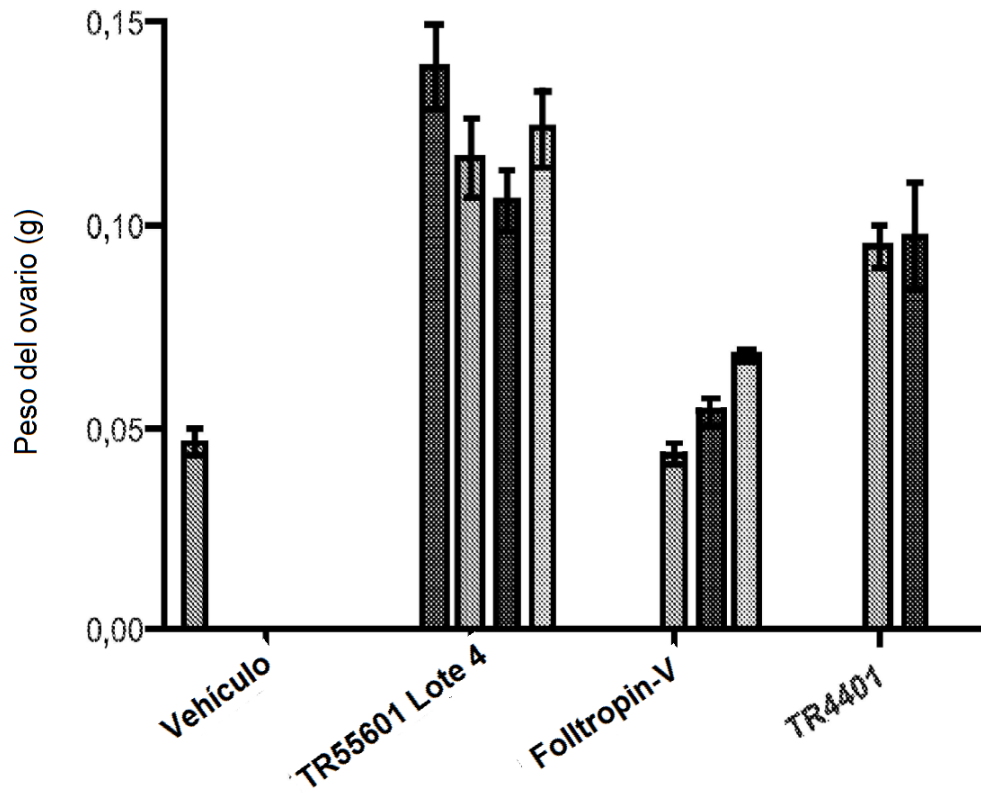




FIGURA 5

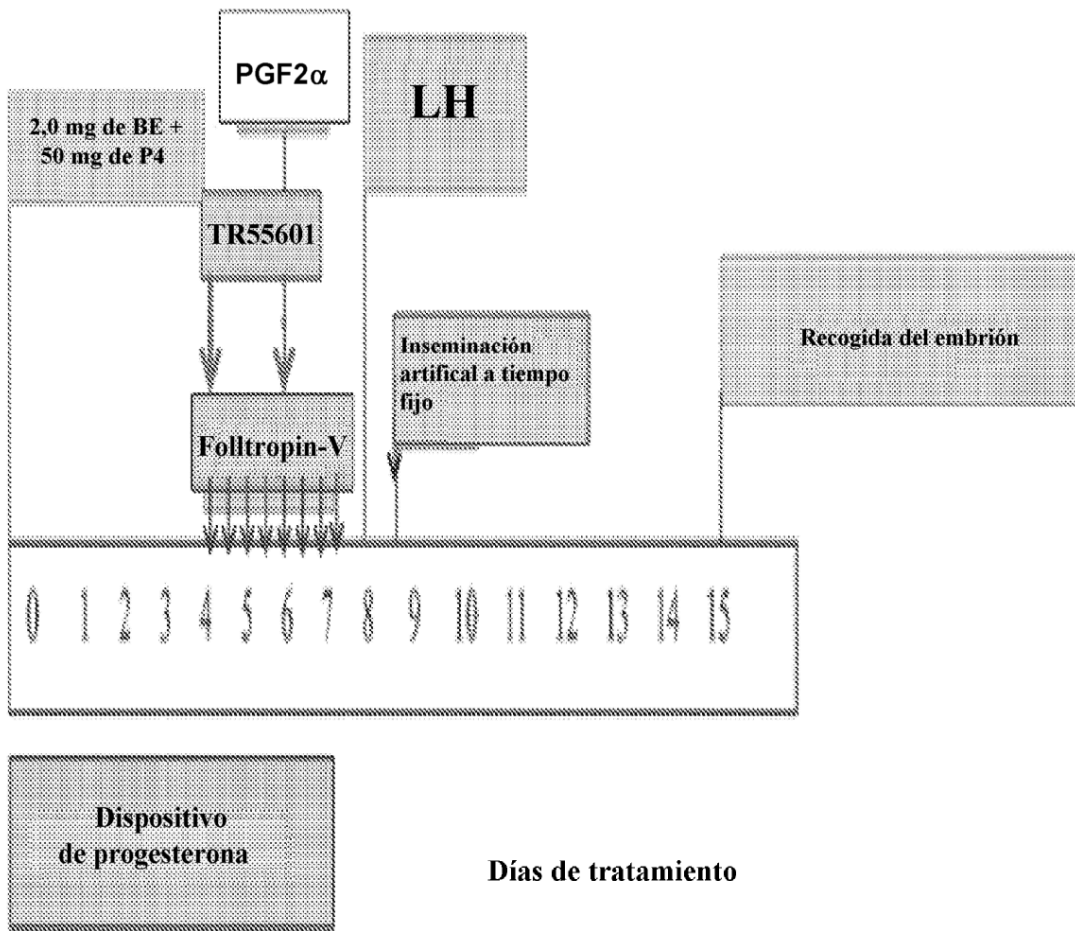


FIGURA 6

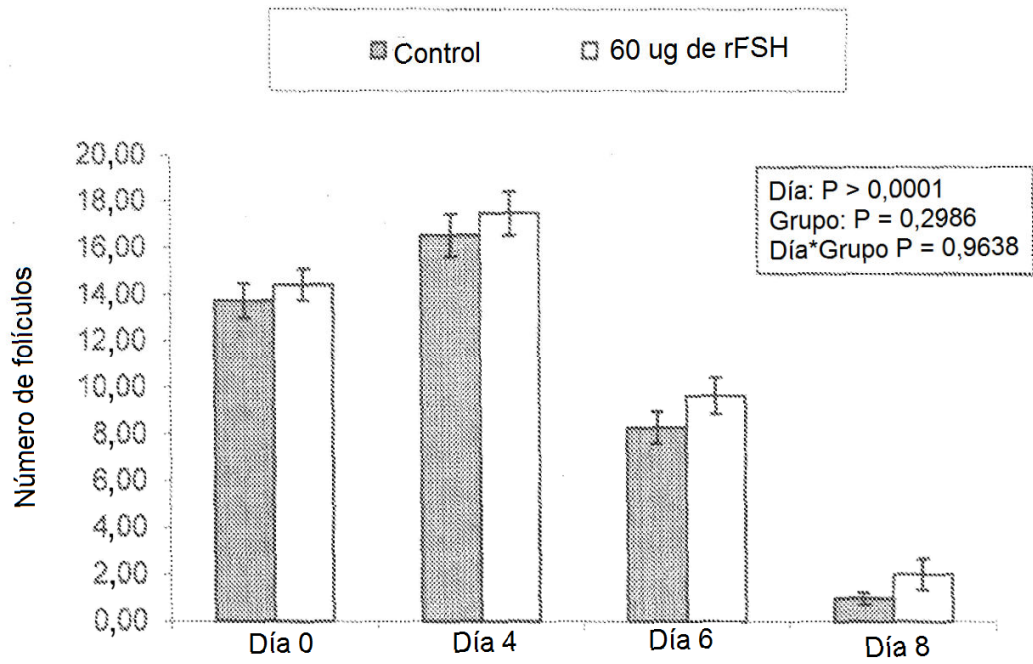


FIGURA 7

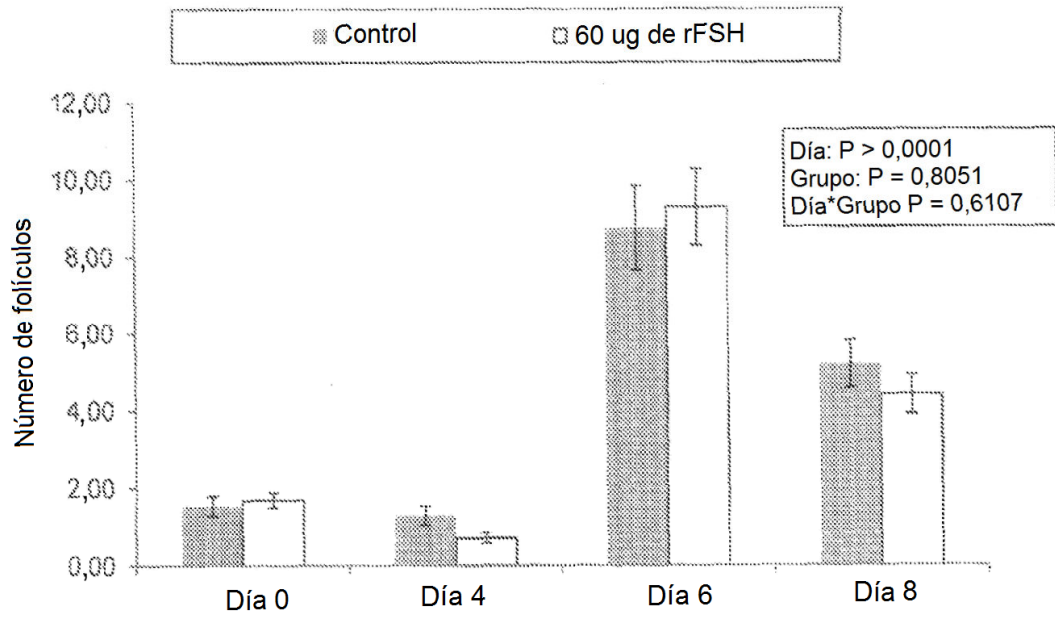


FIGURA 8

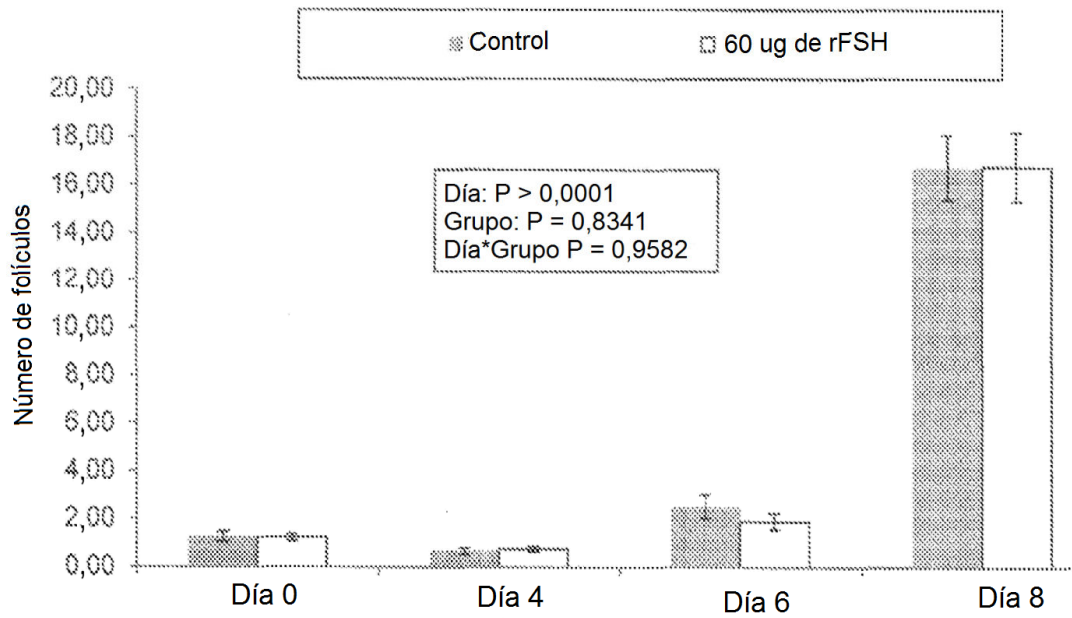


FIGURA 9

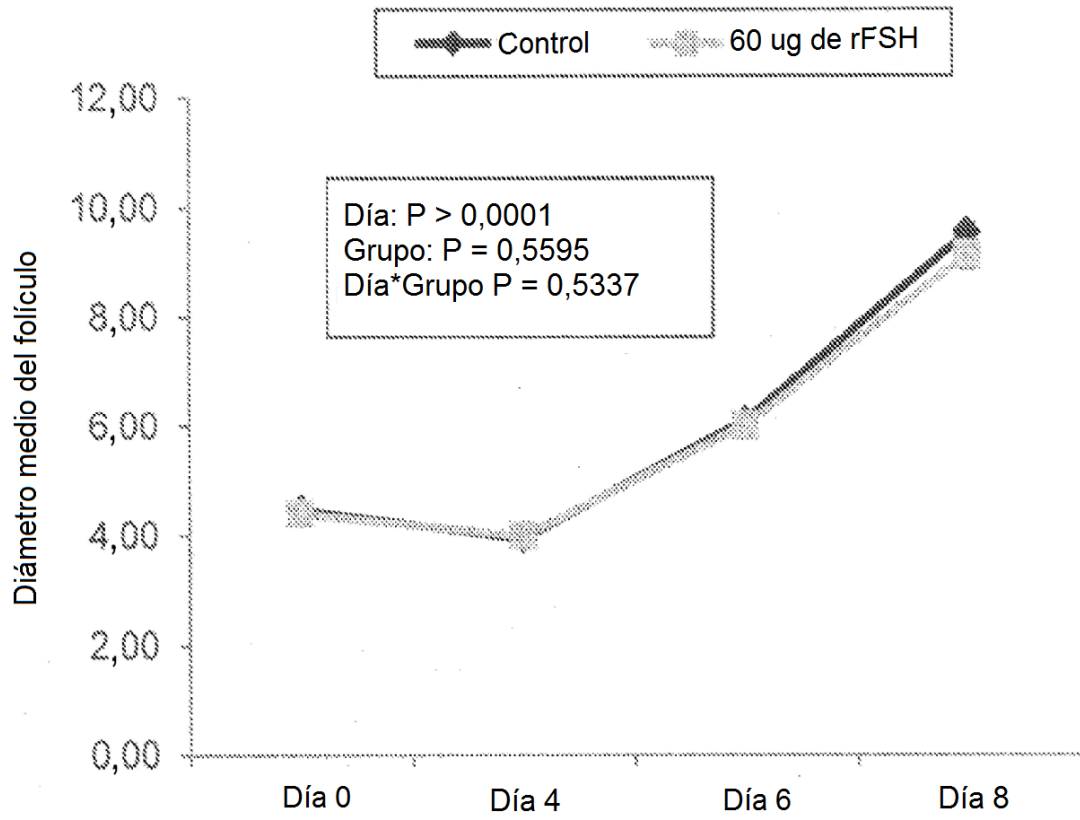
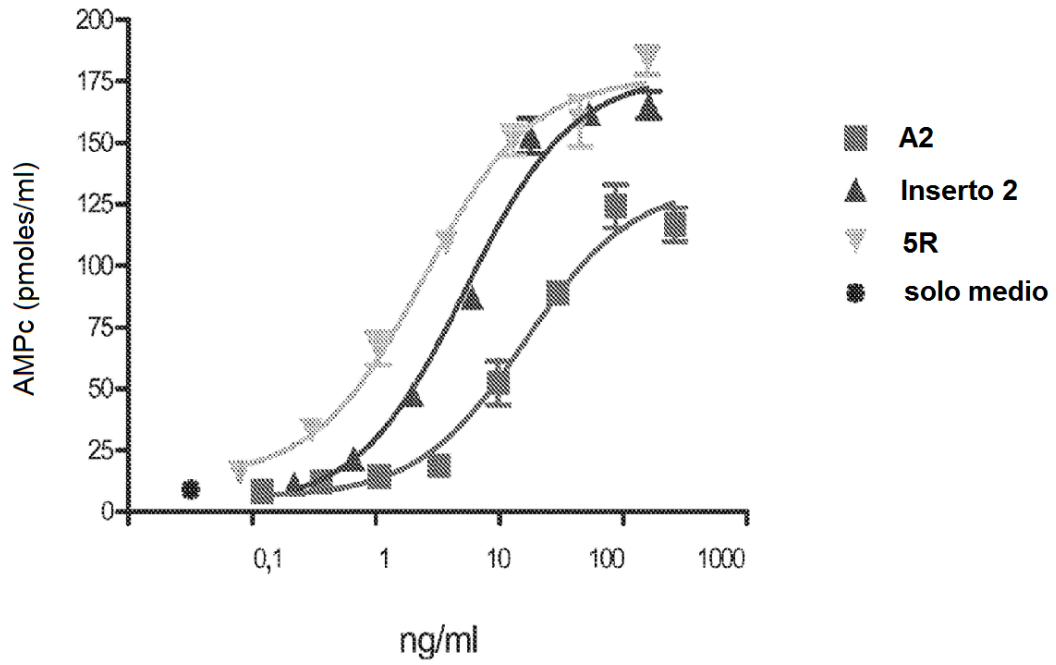


FIGURA 10

A.

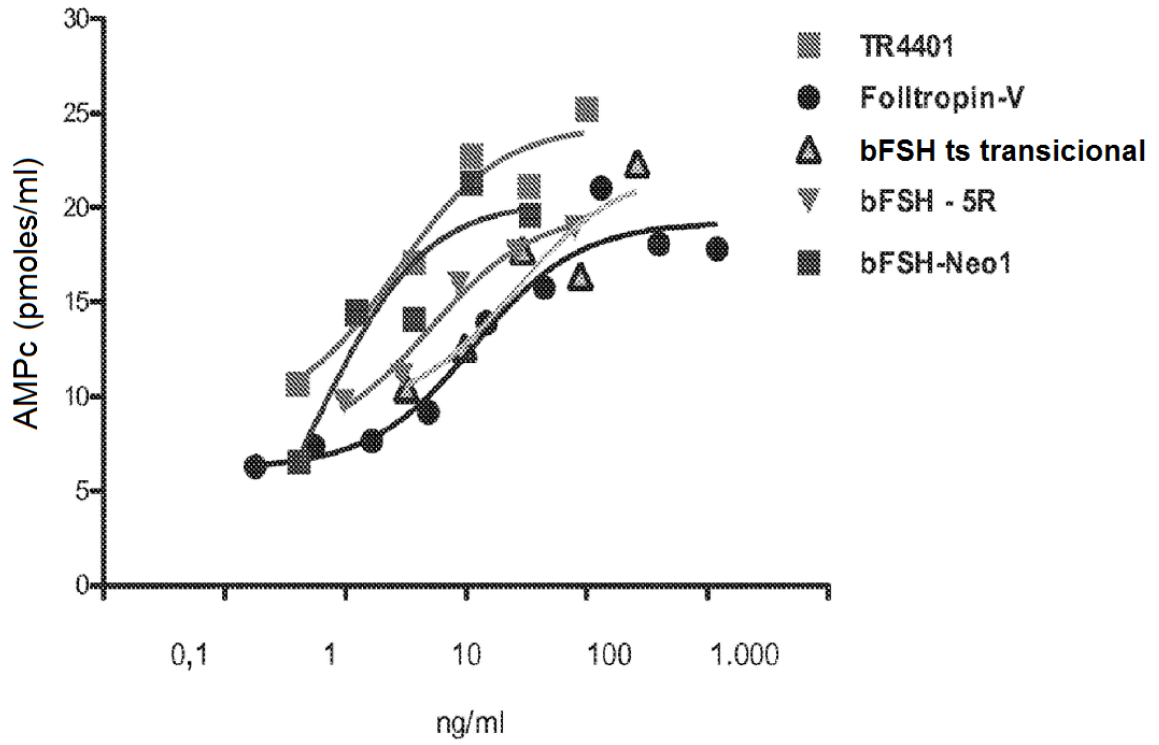


B.

	CE50 (ng/ml)	Parte superior de la curva (V <sub>máx</sub> ) (pmoles de AMPc/ml)
A2	18,22	133,1
Inserto 2	5,28	177,9
5R	2,45	176,7

FIGURA 11

A.



B.

