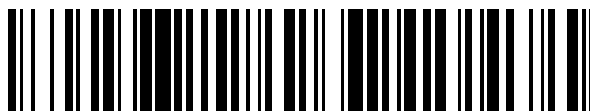


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 763**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A01K 67/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2013 PCT/EP2013/073928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2013 E 13791813 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2919803**

54 Título: **FSH recombinante bovina en dosis única posterior a la sincronización folicular**

30 Prioridad:

16.11.2012 EP 12306428

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

20.02.2020

73 Titular/es:

**CEVA SANTÉ ANIMALE (100.0%)
10 Avenue de La Ballastière
33500 Libourne Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**SOUZA, ALEXANDRE;
ISAKA, NAOMI;
CARRIE, AUDE y
THIBAUD, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 763 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

FSH recombinante bovina en dosis única posterior a la sincronización folicular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de un análogo de FSH recombinante bovino (rFSH) o una composición que comprende un análogo de rFSH recombinante bovino para aumentar el rendimiento reproductivo en un bovino, donde dicho análogo de rFSH bovino recombinante comprende una secuencia de aminoácido específica y dicho análogo de rFSH se administra a dicho bovino después de la sincronización del folículo, en una sola administración a una dosis de 50 µg.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de aumentar el rendimiento reproductivo en mamíferos no humanos como ganado, caballos u otros ungulados puede tener un beneficio significativo para los propietarios. Esto se puede lograr aumentando la fertilidad y/o la fecundidad en tales mamíferos no humanos. A día de hoy se han propuesto varios métodos o protocolos para aumentar el rendimiento reproductivo, basados en el uso de estradiol y otras hormonas como la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona estimulante del folículo) o progestágenos (como la progesterona) para imitar niveles naturales o cercanos a los naturales de hormonas que se producen en la especie objetivo. Algunos de estos protocolos incluyen una etapa para sincronizar la ovulación en las mujeres para facilitar la estimulación, el crecimiento y la ovulación de los folículos de forma sincronizada, lo que permite la inseminación artificial en un momento dado evitando la necesidad de la detección del estro. Estos llamados protocolos de sincronización se utilizan ampliamente en rebaños comerciales de lácteos y carne de res en todo el mundo.

20 Uno de los tratamientos más comunes utilizados para sincronizar la aparición de ondas foliculares implica el uso de diferentes tipos de estrógenos. Sin embargo, esta hormona esteroidea no puede usarse en muchas partes del mundo y se han desarrollado métodos alternativos para controlar las fases folicular y lútea, con el objetivo, por ejemplo, de mejorar el proceso de superovulación en vacas donantes de embriones en países donde el estradiol no está disponible. Un enfoque que parece ser una opción prometedora es iniciar tratamientos con FSH en el momento de la aparición de una nueva onda folicular, después de una ovulación inducida por GnRH. Además, debido a que la vida media de los productos de la FSH disponibles actualmente es generalmente corta (aproximadamente 6 h), los protocolos superovulatorios implican tratamientos con FSH dos veces al día durante 4 a 5 días, lo que tarda bastante tiempo, es estresante y está sujeto a errores. Además, estos protocolos frecuentes implicados en las superovulaciones desarrolladas actualmente hacen que sea casi imposible aplicarlos, por ejemplo, en ganado vacuno criado en pasturas. Por lo tanto, el enfoque superovulatorio estándar se basa en inyecciones múltiples de FSH en el momento de la aparición de la onda folicular, que normalmente aparece entre los 8 y 12 días después del estro natural. Este método se conoce como "a base de estro" y, aunque es eficiente en términos de producción de embriones, está condicionado por la etapa del ciclo del estro y requiere la detección del estro. Estudios posteriores han encontrado que las tasas de fertilización son significativamente más bajas en los programas "basados en estro" en comparación con los protocolos de sincronización modernos que permiten un intervalo más ideal desde la inseminación hasta la ovulación.

35 Se han realizado estudios para determinar si el alargamiento del protocolo de estimulación de FSH puede aumentar la respuesta ovulatoria. Los autores parecen concluir que extender el período de inyección de FSH de 4 días consecutivos a 7 días consecutivos podría sostener el crecimiento del folículo y provocar que más folículos adquieran la capacidad de ovular. Se están realizando más estudios para confirmar esta hipótesis en diferentes razas de ganado.

40 En otro protocolo publicado, las vacas fueron tratadas con FSH durante 3 días en lugar de 4, y las últimas 2 inyecciones, en el día 4, fueron reemplazadas por 2 inyecciones de eCG (gonadotropina coriónica equina) (Barros *et al.*, 2008). Este tratamiento pareció aumentar el número de embriones, aunque el tiempo de tratamiento aún fue largo. Además, eCG es una molécula bastante larga y se ha descrito que induce la formación de anticuerpos cuando se usa repetidamente, lo que quizás limite un uso amplio/frecuente de este tipo de protocolos.

45 Con el fin de reducir el número de inyecciones de FSH, se ha desarrollado un protocolo alternativo en el que la FSH está incorporada en un polímero de liberación lenta (hialuronano). Usando esta formulación de liberación lenta, se realizó una inyección única después de los programas de superovulación "a base de estro". Sin embargo, los autores concluyeron que el hialuronano era demasiado viscoso o que la inyección intramuscular única daba como resultado una respuesta superovulatoria más baja (Bo *et al.*, 2010).

50 El documento EP2134165 propone un método alternativo para aumentar la reproducción utilizando una FSH de cadena única en la que ambas subunidades están unidas covalentemente por un conector peptídico, que se administra en una dosis única de 7 a 13 días después del estro. Según este método, los animales se preparan para la inyección de FSH identificando la fecha de estro de referencia (o celo) (día del último celo) y luego la FSH se administra en una sola inyección entre los días 7 a 8 del ciclo del animal. Los resultados parecen satisfactorios, pero

se requiere observación y monitoreo individual de los animales para determinar el régimen de tratamiento más efectivo.

Compendio de la invención

5 La presente invención se refiere a un uso de un análogo de FSH recombinante bovino (rFSH) o una composición que comprende un análogo de rFSH recombinante bovino para aumentar el rendimiento reproductivo en un bovino, en el que dicho análogo de rFSH recombinante bovino comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 y dicho análogo de rFSH se administra a dicho bovino después de la sincronización del folículo, en una sola administración a una dosis de 50 µg.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-12.

10 La memoria descriptiva también describe métodos mejores para aumentar la reproducción, especialmente la fertilidad y la fecundidad, en bovinos.

15 Un objeto de la invención se refiere al uso de un análogo recombinante de rFSH, tal como se define en el presente documento, o de una composición que comprende dicho análogo de rFSH, para aumentar el rendimiento reproductivo en bovinos que han sido sometidos previamente a un protocolo de sincronización folicular y/o tratamiento, en el que dicho análogo de rFSH se administra en una sola administración a una dosis de 50 µg.

Otro objeto de la invención se basa en el uso de un análogo de rFSH tal como se define en el presente documento (o una composición que comprende dicho análogo de rFSH) para aumentar el rendimiento reproductivo en uno o varios bovinos, en el que dicho análogo de rFSH se administra a cada uno de dichos bovinos después de la sincronización del folículo, en una sola administración a una dosis de 50 µg.

20 Este uso es particularmente ventajoso para mejorar el rendimiento de los protocolos o procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV).

25 A este respecto, la memoria descriptiva describe un método de fecundación *in vitro* (FIV) que comprende una etapa de obtención de ovocitos de un donante bovino y una etapa de fertilización *in vitro* de dichos ovocitos, en el que el donante bovino es tratado mediante una única administración de un análogo de rFSH, tal como se define en el presente documento, a una dosis de 50 µg, para aumentar la producción de ovocitos y en el que la administración se realiza después de la sincronización del folículo del donante bovino.

30 La memoria descriptiva también describe un método para mejorar la calidad y la cantidad de cuerpos lúteos en un bovino, que comprende administrar a dicho bovino un análogo de rFSH, tal como se define en el presente documento, en el que dicho análogo de rFSH se administra a dicho bovino en una única administración a una dosis de 50 µg, después de la sincronización del folículo del bovino.

En una realización particular, la invención se refiere al uso como se definió anteriormente, que comprende:

(a) proporcionar un bovino, o un grupo de bovinos, que haya sido tratado para sincronizar los folículos; o tratar a un bovino, o un grupo de bovinos, para sincronizar el folículo;

35 (b) administrar a dicho bovino o grupo de bovinos una dosis única de dicho análogo de rFSH a una dosis de 50 µg, preferiblemente por inyección, más preferiblemente por inyección intramuscular; y

(c) opcionalmente inseminar al bovino o grupo de bovinos, preferiblemente por inseminación artificial, o recoger los ovocitos del bovino o del grupo de bovinos, preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la etapa de administración (b).

40 Este uso evita la necesidad de detectar o monitorear el estro y es más eficaz, especialmente para grupos de bovinos.

En otra realización particular, la invención se refiere al uso que comprende:

(a) tratar a un bovino o a un grupo de bovinos para sincronizar los folículos;

(b) administrar a dicho bovino o grupo de bovinos una dosis única de dicho análogo de rFSH a una dosis de 50 µg, preferiblemente por inyección, más preferiblemente por inyección intramuscular;

45 (c) recuperar los ovocitos del bovino, preferentemente por aspiración folicular;

(d) opcionalmente, fertilizar *in vitro* los ovocitos recuperados; e

(e) implantar opcionalmente los ovocitos fertilizados en un bovino receptor, preferiblemente en un bovino receptor previamente tratado mediante la administración de una dosis única de dicho análogo de rFSH a una dosis de 50 µg.

El análogo de rFSH para su uso en la presente invención es una rFSH de una sola cadena. El análogo de rFSH se utiliza preferentemente en forma esencialmente pura, opcionalmente en asociación con uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. La rFSH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3.

- 5 El uso de la invención permite aumentar la fertilidad y/o fecundidad y, especialmente, la superovulación, la tasa de ovulación, la producción de ovocitos o la calidad y cantidad de cuerpos lúteos (CL) en bovinos.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Protocolo utilizado para aumentar el rendimiento reproductivo con un análogo de rFSH.

- 10 Figura 2: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de un análogo de rFSH bovino para usar en la invención que comprende SEQ ID NO: 3. La secuencia del enlazador CTP que une las subunidades beta y alfa está subrayada. Los nucleótidos subrayados y en negrita codifican el péptido señal.

Descripción detallada de la invención

- 15 La presente memoria descriptiva proporciona métodos para aumentar el rendimiento reproductivo en bovinos, y preferiblemente en ganado. En particular, se usa la FSH de cadena única recombinante utilizada en la presente invención para estimular la fertilidad y/o la fecundidad en hembras bovinas, como se ilustra mediante una superovulación, un aumento de la producción de embriones y/o un aumento de la preñez. La FSH de cadena única recombinante como se usa en la invención también es efectiva para estimular el crecimiento y la maduración de los folículos, lo que da como resultado una recuperación mejorada de ovocitos, superovulación y tasa de ovulación, y una calidad y cantidad mejoradas de los cuerpos lúteos (CL).

- 20 La FSH de cadena única recombinante, tal como se usa en la invención, se puede usar en protocolos y/o tratamientos de inseminación, incluso para el trasplante de embriones y la fertilización *in vitro* de bovinos.

Definiciones

- 25 Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "aumentar el rendimiento reproductivo" o "rendimiento reproductivo aumentado" se refiere al aumento de la probabilidad de que un bovino, o una pluralidad de bovinos, sea fértil y fecundo. El aumento del rendimiento reproductivo incluye la estimulación del crecimiento y/o maduración de los folículos, o una mejora en la calidad y cantidad de cuerpos lúteos. El mayor rendimiento reproductivo también incluye una mayor probabilidad de que un bovino, o una pluralidad de bovinos, que han sido inseminados, queden preñados, tengan una descendencia viva o desarrollen embriones viables.

- 30 El aumento del rendimiento reproductivo también incluye aumentar el número de embriones viables que un bovino, o una pluralidad de bovinos producen en el útero y/o *in vitro*. El aumento del rendimiento reproductivo incluye el aumento de la fertilidad, la fecundidad, la superovulación, la tasa de ovocitos, la tasa de ovulación, la producción de embriones y/o preñeces. Un aumento se considera preferiblemente en aproximadamente al menos 1% en comparación con los bovinos no tratados, más preferiblemente en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10% o más.

- 35 El término "fertilidad" o "fértil" se refiere, dentro del contexto de esta invención, a la capacidad de producir ovocitos fertilizables.

El término "fecundo" o "fecundidad" se refiere, dentro del contexto de esta invención, a la capacidad de completar una preñez.

El término "superovulación" se refiere, dentro del contexto de esta invención, a un aumento en el número de folículos ovulados y/o en la creación de óvulos fértiles.

- 40 El término "preñada" se refiere a un bovino o a un grupo de bovinos, algunos de los cuales están actualmente preñados o han sido inseminados y pueden estar preñados.

Como se usa en el presente documento, el término "estro" se refiere al período durante el cual un bovino es más probable que quede preñada. El estro puede detectarse o controlarse mediante la aparición de una demostración de comportamiento de que un bovino está en celo, incluida la demostración del celo.

- 45 La "inseminación" se refiere a la introducción de semen mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, entre otros, la inseminación natural y artificial (IA) y la fertilización *in vitro* (FIV).

A un "grupo" de bovinos se denomina cualquier grupo de al menos 2 bovinos, como un rebaño o una manada.

El término "administración" se refiere a todas las vías de administración, tales como oral, enteral, mucosa, parenteral y percutánea. Preferiblemente, la ruta de administración es una inyección.

La expresión "sincronización folicular" se refiere, dentro del contexto de esta invención, a la sincronización de la aparición de ondas foliculares.

Análogo de FSH recombinante

5 La hormona estimulante del folículo pertenece a la clase de hormonas que proporciona fertilidad. FSH se compone de dos cadenas (o subunidades), denominadas alfa y beta. En condiciones fisiológicas, ambas subunidades están unidas por interacción no covalente. Se han descrito secuencias de nucleótidos y aminoácidos de FSH de distintas especies y están disponibles en bases de datos públicas como la FSH bovina (Kim, KE *et al.*, 1988, "nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone beta-subunit", DNA 1988, 7 (4): 227-233) o FSH humana : número de banco de genes : CAA43996.1.

10 La presente invención utiliza un análogo de FSH. El término "análogo" designa, en general, a un compuesto que imita el efecto fisiológico de un compuesto natural. Un análogo es estructuralmente similar al compuesto natural y puede presentar diferencias estructurales como resultado, por ejemplo, de métodos de producción o porque las diferencias confieren una actividad beneficiosa al análogo.

15 En análogo de FSH de la invención es una FSH que tiene subunidades alfa y beta unidas covalentemente. Tal análogo de FSH también puede denominarse FSH de "cadena sencilla".

20 La invención usa una FSH recombinante en la que la subunidad alfa está unida covalentemente a la subunidad beta mediante un conector peptídico. La invención muestra que tales análogos recombinantes de cadena simple de FSH proporcionan propiedades mejoradas para aumentar el rendimiento reproductivo en bovinos. El análogo de FSH bovino recombinante usado en la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos que se proporciona en la figura 2: SEQ ID NO: 3. El ADNc corresponde a la SEQ ID NO: 4. La primera parte (aminoácidos 1-129) corresponde a la secuencia de la subunidad beta de FSH bovina (SEQ ID NO: 2), la parte central (aminoácidos 130-157) corresponde al conector del péptido carboxilo terminal, y la tercera parte (aminoácidos 158-253) corresponde a la secuencia de la subunidad alfa de FSH bovina (SEQ ID NO: 1, véase también el documento EP2134165).

25 Una realización de la invención usa una FSH bovina recombinante de cadena sencilla que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

El análogo de FSH bovino, tal como se describió anteriormente, comprende un FSH recombinante en el que los dominios alfa y beta derivan de FSH bovino y están unidos por un conector peptídico.

La proteína es preferiblemente esencialmente pura, es decir, tiene un nivel de pureza de al menos 95%, más preferiblemente al menos 97, 98 o 99%.

30 En una realización preferida, la FSH, tal como se usa en la invención, se administra en una composición que comprende una formulación farmacéutica adecuada. La formulación farmacéutica puede comprender uno o varios excipientes o vehículos.

35 En una realización preferida, la FSH bovina recombinante de cadena sencilla, tal como se usa en la invención, tiene una actividad superior a 10.000 UI/mg, más preferiblemente superior a 13.000 UI/mg, tal como aproximadamente 16.000 UI/mg. Según el factor de conversión publicado por el comité de práctica de ASRM (Fertility and Sterility, vol. 90, supl. 3, noviembre de 2008, Sociedad Americana de Medicina Reproductiva), 10.000 UI de FSH bovina corresponden a 600 µg.

Tratamiento

40 Como se indicó anteriormente, la invención se refiere a un uso de un análogo de FSH recombinante como se describe anteriormente para aumentar el rendimiento reproductivo en bovinos. La invención puede usarse en programas de inseminación, particularmente en inseminación artificial en bovinos, por ejemplo, para mejorar la tasa de ovulación y/o la superovulación y/o la calidad y cantidad de cuerpos lúteos en los bovinos tratados, así como en programas de fertilización *in vitro*, por ejemplo, para mejorar la recuperación de ovocitos a partir de bovinos donantes y/o la tasa de preñez en bovinos receptores.

45 Más particularmente, un objeto de la invención se refiere a un uso de un análogo de FSH recombinante como se define anteriormente para aumentar el rendimiento reproductivo en bovinos, en el que dicha FSH recombinante se administra a dichos bovinos después de la sincronización del folículo en una única administración a una dosis de 50 µg.

En una realización preferida, el uso comprende:

50 (a) tratar a un bovino o a un grupo de bovinos para sincronizar los folículos, o proporcionar un bovino o un grupo de bovinos que ha sido tratado para sincronizar los folículos;

(b) administrar al bovino o a los bovinos tratados 50 µg de dicho análogo de FSH recombinante en una sola dosis; y

(c) opcionalmente, inseminar al bovino o a los bovinos y/o recoger los ovocitos preferiblemente cerca del momento de la ovulación, más preferiblemente de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la etapa de administración (b).

5 En una primera etapa de tratamiento, se sincroniza la aparición de una nueva onda folicular. La invención muestra que, en combinación con una FSH recombinante de la invención, dicho tratamiento permite una mejor producción de embriones, incluso a dosis más bajas de hormona y con menos inyecciones.

10 El crecimiento folicular no es continuo en bovinos, sino que aparece en ondas (de 2 a 4 ondas por ciclo). Cada onda comienza aproximadamente cuando el folículo dominante en la onda anterior consigue un tamaño máximo, momento en el cual numerosos folículos pequeños comienzan un período de rápido crecimiento. A partir de este grupo de folículos, se permite que uno de los folículos crezca a un tamaño mucho mayor que los demás. Este folículo grande se llama folículo dominante, porque tiene la capacidad de regular y restringir el crecimiento de los folículos más pequeños, llamados folículos subordinados. Unos días después de alcanzar el tamaño máximo, el folículo dominante comienza a retroceder y morir. A medida que el folículo dominante degenera, se reduce su capacidad de restringir los otros folículos; por lo tanto, se inicia una nueva onda folicular. Una consecuencia de este proceso dinámico es que existen folículos de todos los tamaños, incluido al menos un folículo grande, cada día del ciclo estral.

La sincronización de ondas foliculares brinda la oportunidad de tratar a todos los bovinos en un período de tiempo limitado y, por lo tanto, capturar los beneficios económicos de la inseminación. Tras la sincronización del ciclo estral, un alto porcentaje de hembras tratadas muestra un estro y una ovulación fértiles, muy sincronizadas.

20 La sincronización de los protocolos de ovulación o IA temporizada se refiere a métodos y/o protocolos que estimulan artificialmente el crecimiento del folículo y la ovulación programada, de modo que la ovulación se inicia en un momento predeterminado sin necesidad de controlar el comportamiento del estro. Una revisión de los métodos y protocolos comunes aplicados en bovinos se describe en Bo *et al.* en la 28ª reunión anual de AETE, Saint Malo, Francia, del 7 al 8 de septiembre de 2012 (Avances recientes en el control del desarrollo folicular y protocolos de superovulación en bovinos).

Una nueva aparición de ondas foliculares se puede realizar mediante tratamiento hormonal o físico. El tratamiento hormonal comprende la administración de hormonas adecuadas como prostaglandina(s), progestágeno(s) o GnRH. El tratamiento físico incluye la ablación folicular.

30 En una realización preferida, la sincronización folicular se obtiene por tratamiento hormonal del bovino o los bovinos, preferiblemente con progestágenos, combinaciones de progestágeno-prostaglandina, prostaglandinas solas, combinaciones de progestágeno-estrógeno y combinaciones de gonadotropina-prostaglandina con o sin progestágenos.

En una realización preferida, la sincronización folicular se obtiene mediante uno de los siguientes tratamientos:

- PGF2alfa o sus análogos;
- 35 - GnRH + PGF2alfa; o
- Progestágeno (como progesterona...), opcionalmente en combinación con estrógeno, PGF2alfa o GnRH.

40 Dosificaciones y/o protocolos específicos se describen en la técnica; tales como Thatcher *et al.*, 2001 (Asociación Americana de Veterinarios de Bovinos (AABP), Vancouver, 95-105); Diskin *et al.*, 2001 (publicación ocasional n.º 26, pág. 175, Sociedad Británica de Ciencias Animales); y Pursley *et al.*, 1995 (Theriogenology, 44, pág. 915). Además, los progestágenos pueden administrarse utilizando dispositivos específicos como implantes (por ejemplo, PRID, de Ceva Santé Animale).

45 En otra realización, la sincronización folicular se obtiene por ablación folicular. La ablación de los folículos designa la eliminación, separación o destrucción de al menos un folículo. La ablación folicular se refiere a métodos físicos de ablación folicular, como la cauterización o aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido en etapas aleatorias del ciclo estral (Bergfelt, 1997). La ablación puede dirigirse a todos los folículos o solo a uno o dos folículos más grandes (Baracaldo *et al.*, 2000), para garantizar que al menos se suprima el folículo dominante.

En una realización preferida, la invención se refiere a un uso que comprende:

50 (a) tratar a un bovino o a un grupo de bovinos con un progestágeno, una combinación de progestágeno-prostaglandina, una prostaglandina, una combinación de progestágeno-estrógeno o una combinación de gonadotropina-prostaglandina con o sin progestágenos para sincronizar los folículos, o proporcionar un bovino o un grupo de bovinos que ha sido tratado con un progestágeno, una combinación de progestágeno-prostaglandina, una prostaglandina, una combinación de progestágeno-estrógeno, o una combinación de gonadotropina-prostaglandina con o sin progestágenos para sincronizar los folículos;

(b) administrar a los bovinos tratados con 50 µg de dicho análogo de FSH recombinante en una sola dosis; y

(c) opcionalmente, inseminar a un bovino tratado de (b) y/o recoger ovocitos de un bovino tratado de (b), preferiblemente cerca del momento de la ovulación, más preferiblemente de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la etapa de administración (b).

5 En la etapa (b), el análogo de FSH recombinante puede administrarse usando cualquier medio o técnica conocida *per se* en la técnica, incluyendo, sin limitación, la administración sistémica, tal como intramuscular, intravenosa, subcutánea, etc. La ruta de administración preferida es la inyección intramuscular.

Los resultados presentados en la sección experimental muestran que, en bovinos sincronizados, una administración única de este tipo provoca la producción de embriones fértiles y aumenta sustancialmente la actividad reproductora.

10 En una realización preferida, el uso comprende además una etapa (c) de inseminar dicho ungulado, preferiblemente cerca del momento de la ovulación, más preferiblemente de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración del análogo de rFSH.

15 Opcionalmente, se administran otras hormonas, como la hormona luteinizante, la gonadotropina coriónica y la prostaglandina, así como la rFSH. En una realización, la prostaglandina se administra al bovino además de la administración del análogo de rFSH. La prostaglandina se administra opcionalmente como una dosis única, típicamente por inyección, o como dosis múltiples administradas con varias horas de diferencia. En una realización, se administra una primera dosis de prostaglandina al bovino después de la administración del análogo de rFSH seguido de una segunda dosis de prostaglandina que se administra al bovino aproximadamente entre 6 horas y 1 día después de la primera dosis de prostaglandina.

20 El uso según una realización particular comprende además inseminar a dicho bovino cerca del momento de la ovulación, y preferiblemente de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración de rFSH.

El uso según una realización particular comprende además recoger ovocitos de dicho bovino, preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración del análogo de rFSH.

25 Alternativamente, el uso de la invención comprende una etapa (c) de recuperación o recogida de ovocitos de un bovino tratado de (b), preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración del análogo de rFSH. Los ovocitos pueden recuperarse mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica, tales como, sin limitación, la aspiración folicular. Los ovocitos recogidos muestran características mejoradas para la fecundidad. Los ovocitos recogidos pueden ser fertilizados *in vitro*, y posteriormente transferidos a bovinos receptores.

30 La invención se usa en cualquier bovino. Es particularmente adecuado para el tratamiento de ganado bovino y lechero hembra, incluidas las novillas.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en la siguiente sección experimental, que ilustra la invención reivindicada.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto sobre el rendimiento de reproducción de una administración única de un análogo de 50 µg de rFSH en mamíferos no humanos sincronizados

40 Se trataron 14 novillas lecheras con una sola inyección intramuscular de análogo de rFSH bovino (50 µg/novilla). La inyección se realizó 30 h (en una ventana de 24 a 48 h) después de la ablación folicular. El análogo de rFSH bovino usado es como se representa en la figura 2. El protocolo de tratamiento está representado en la figura 1.

Todos los grupos recibieron dos inyecciones de prostaglandina PGF_{2α} a los 2 días y 3 días después de la primera inyección de FSH (F0). La inyección de hCG (Gonadotropina Coriónica humana) se realizó a los 5 días después de F0 y la Inseminación Artificial (IA) se realizó 12 h y 24 h después del tratamiento con hCG. La recogida de embriones por procedimiento no quirúrgico ocurrió 7 días después de la IA.

45 Folltropin®-V (Bioniche Animal Health Product, Canadá) se utilizó como tratamiento de referencia. Folltropin®-V es un extracto de folitropina liofilizada purificada obtenida de las glándulas pituitarias porcinas. La Folltropin®-V (50 mg) se administró por vía intramuscular, dos veces al día, en dosis decrecientes durante cuatro días (la FSH acumulada al final del tratamiento es de 400 mg/novilla). Se trataron 14 novillas lecheras con Folltropin®-V.

Se midieron diferentes parámetros:

50 - Superovulación: la superovulación se consideró exitosa si > 2CL (cuerpos lúteos) el día del lavado;
 - Tasa de ovulación: basada en el grupo general LSM (medias de mínimos cuadrados) de respuesta ovulatoria por vaca; y

- Calidad del embrión: basada en el grupo general LSM (medias de mínimos cuadrados) del número de embriones viables por vaca.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

	rFSH/inyección única 50 µg
Novillas inscritas (n)	14
Novillas superovuladas (n)*	13
Novillas superovuladas (%)	92,8
Tasa de ovulación	81%
Número promedio de CL	14,2
Número de embriones viables (VE)	7,9
VE frente a Folltropin®-V VE	134%

5 Los resultados muestran que el tratamiento de la invención puede inducir claramente una respuesta de superovulación en el ganado. A modo de comparación, en las novillas tratadas con el protocolo de referencia (8 inyecciones de una FSH natural como Folltropin®-V, 400 mg), el tratamiento de la invención (1 inyección única de un análogo de rFSH, 50 µg) dio como resultado una mayor tasa de ovulación (81% frente a 76%) y un mayor número de embriones viables (7,9 frente a 5,9). Por consiguiente, incluso si una novilla no superovulaba con el tratamiento de la invención (mientras que todas lo hacían con el tratamiento de referencia), la calidad de los embriones parecía mejor con la invención. En consecuencia, la combinación de un tratamiento de sincronización folicular con una inyección del análogo de rFSH permite una producción constante de embriones superovulados.

Ejemplo 2: Efecto sobre el rendimiento de reproducción de una administración única de 100 µg del análogo de rFSH en mamíferos no humanos sincronizados (no según la invención)

15 Se trataron 14 novillas lecheras con una única inyección intramuscular de análogo de rFSH bovino (100 µg/novilla). La inyección se realizó 30 h (en una ventana de 24 a 48 h) después de la ablación folicular. El análogo de rFSH bovino usado es como se representa en la figura 2. El protocolo de tratamiento está representado en la figura 1.

20 Todos los grupos recibieron dos inyecciones de prostaglandina PGF2α a los 2 días y 3 días después de la primera inyección de FSH (F0). La inyección de hCG (gonadotropina coriónica humana) se realizó a los 5 días después de la F0 y la inseminación artificial (IA) se realizó 12 h y 24 h después del tratamiento con hCG. La recogida de embriones por procedimiento no quirúrgico ocurrió 7 días después de la IA.

25 Se utilizó Folltropin®-V (Bioniche Animal Health Product, Canadá) como tratamiento de referencia. La Folltropin®-V es un extracto de folitropina liofilizada purificada obtenida de las glándulas pituitarias porcinas. La Folltropin®-V (50 mg) se administró por vía intramuscular, dos veces al día, en dosis decrecientes durante cuatro días (la FSH acumulada al final del tratamiento es de 400 mg/novilla). 14 novillas lecheras fueron tratadas con Folltropin®-V.

Se midieron diferentes parámetros:

- Superovulación: la superovulación se consideró exitosa si > 2CL (cuerpos lúteos) el día del lavado;
- Tasa de ovulación: basada en el grupo general LSM (medias de mínimos cuadrados) de respuesta ovulatoria por vaca; y
- Calidad del embrión: basado en el grupo general LSM (medias de mínimos cuadrados) del número de embriones viables por vaca.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

	rFSH/inyección única 100 µg
Novillas inscritas (n)	14
Novillas superovuladas (n)*	12
Novillas superovuladas (%)	85,7
Tasa de ovulación	88%

ES 2 743 763 T3

Número promedio de CL	14,7
Número de embriones viables (VE)	3,8

5 Los resultados muestran que el tratamiento de la invención puede inducir claramente una respuesta de superovulación en el ganado. Como comparación, en las novillas tratadas con el protocolo de referencia (8 inyecciones de una FSH natural como Folltropin®-V, 400 mg), el tratamiento de la invención (1 inyección única de un análogo de rFSH, 100 µg) dio como resultado una mayor tasa de ovulación (88% frente a 76%). En consecuencia, incluso si dos novillas no superovulaban con el tratamiento de la invención (mientras que todas lo hacían con el tratamiento de referencia), la calidad de los embriones parecía equivalente entre los dos productos. El tratamiento logró más del 70% de la respuesta superovulatoria y también cumplió con los criterios en términos de calidad embrionaria. En consecuencia, la combinación de un tratamiento de sincronización folicular con una inyección única del análogo de rFSH permite una producción constante de embriones superovulados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CEVA SANTE ANIMALE

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA AUMENTAR EL RENDIMIENTO DE REPRODUCCIÓN EN MAMÍFEROS NO HUMANOS UTILIZANDO UNA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO RECOMBINANTE BIOLÓGICAMENTE ACTIVA (rFSH)

<130> B1406PC

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> subunidad alfa de FSH bovina

20 <400> 1

Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Thr Val Glu Lys Glu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr
20 25 30

Arg Asp Leu Val Tyr Arg Asp Pro Ala Arg Pro Asn Ile Gln Lys Thr
35 40 45

Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys Val Pro Gly Cys
50 55 60

Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr Glu Cys
65 70 75 80

His Cys Ser Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly
85 90 95

Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Arg Glu Ile Lys Glu
100 105

25 <210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> subunidad beta de FSH bovina

30 <400> 2

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

ES 2 743 763 T3

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

5 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Análogo de rFSH bovino

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Glu Cys His Cys Ser Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Arg Glu Ile Lys
 115 120 125

Glu Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 130 135 140

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Asp
 145 150 155 160

ES 2 743 763 T3

Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu Lys Glu Asn
 165 170 175

Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys
 180 185 190

Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met
 195 200 205

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

Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His
 225 230 235 240

Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
 245 250

<210> 4

- 5 <211> 762
- <212> ADN
- <213> Análogo de rFSH bovino

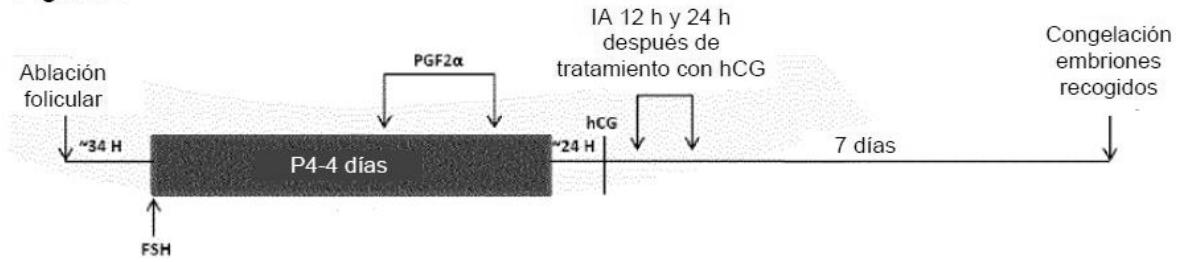
<400> 4

10 atgaagtctg tccagttctg tttccttttc tgttgctgga gagcaatctg ctgcagaagc 60
 tgcgagctga ccaacatcac catcacggtg gagaaagagg aatgtggctt ctgcataagc 120
 atcaacacca cgtggtgtgc aggctactgc tacaccggg acttggtgta cagggacca 180
 gcaaggccca atatccagaa aacgtgtacc ttcaaggagc tggctctacga gacggtgaaa 240
 gtgcctggct gtgctcacca tgcagactcc ctgtacacgt acccagtagc cactgaatgt 300
 cactgcagca agtgcgacag cgacagcact gactgcaccg tgagaggcct ggggcccagc 360
 tactgctcct tcagggaaat caaagaatcc tcttctcaa aggcccctcc cccgagcctt 420
 ccaagtccat ccgactccc ggggccctcg gacaccccga tctctccaca atttctgat 480
 ggagagttta caatgcaggg ctgtcctgaa tgcaagctaa aagaaaaca atacttctcc 540
 aagccagatg ctccaatcta tcagtgcattg ggtgctgct tctccagggc ataccctact 600
 ccagcgaggt ctaagaagac aatgttggtc cccaagaaca tcacctcgga agctacatgc 660
 tgtgtggcca aagcatttac caaggccaca gtgatgggaa atgtcagagt ggagaaccac 720
 accgagtgcc actgcagcac ttgttattat cacaaatcct aa 762

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un uso de un análogo de FSH recombinante bovino (rFSH) o una composición que comprende un análogo de rFSH recombinante bovino para aumentar el rendimiento reproductivo en un bovino, en el que dicho análogo de rFSH recombinante bovino comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 y dicho análogo de rFSH se administra a dicho bovino después de la sincronización del folículo, en una única administración a una dosis de 50 µg.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicha rFSH se administra mediante administración sistémica, preferiblemente mediante administración intramuscular, más preferiblemente mediante inyección.
- 10 3. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha rFSH tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la inseminación de dicho bovino cerca del momento de la ovulación y, preferiblemente, de 2 a 7 días, más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración de rFSH.
- 15 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la recogida de ovocitos de dicho bovino, preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la administración del análogo de rFSH.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:
 - (a) proporcionar un bovino o un grupo de bovinos, que ha sido tratado para sincronizar folículos;
 - 20 (b) administrar a dicho bovino o grupo de bovinos una dosis única de dicho análogo de rFSH a una dosis de 50 µg, preferiblemente mediante inyección, más preferiblemente mediante inyección intramuscular; y
 - (c) opcionalmente inseminar al bovino o grupo de bovinos, preferentemente por inseminación artificial, o recoger los ovocitos del bovino o grupo de bovinos, preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la etapa de administración (b).
- 25 7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:
 - (a) tratar un bovino o un grupo de bovinos para sincronizar folículos;
 - (b) administrar a dicho bovino o grupo de bovinos una dosis única de dicho análogo de rFSH a una dosis de 50 µg, preferiblemente mediante inyección, más preferiblemente mediante inyección intramuscular; y
 - 30 (c) opcionalmente inseminar al bovino o grupo de bovinos, preferiblemente por inseminación artificial, o recoger los ovocitos del bovino o grupo de bovinos, preferiblemente cerca del momento de la ovulación y, más preferiblemente, de 2 a 7 días, incluso más preferiblemente de 4 a 6 días después de la etapa de administración (b).
8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la sincronización del folículo se obtiene mediante el tratamiento hormonal del bovino, preferiblemente con PGF2alfa o sus análogos, GnRH y PGF2alfa, o progestágeno, opcionalmente en combinación con estrógeno o PGF2alfa o GnRH, o mediante ablación folicular.
- 35 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento reproductivo se aumenta mediante la inducción de la superovulación en el bovino.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento reproductivo se aumenta mediante el aumento de la preñez en el bovino.
11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento reproductivo se aumenta mediante el aumento de la tasa de ovulación en dicho bovino.
- 40 12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el bovino es ganado vacuno o lechero hembra, incluida una novilla.

Figura 1



GRUPO: rFSH	
Día 0 - AM	Ablación fol.
Día 0 - PM	
Día 1 - AM	
Día 1 - PM	Tratamiento único de rFSH + inserto dispositivo P4
Día 2 - AM	
Día 2 - PM	
Día 3 - AM	
Día 3 - PM	PGF
Día 4 - AM	
Día 4 - PM	PGF
Día 5 - AM	Eliminación dispositivo P4
Día 5 - PM	
Día 6 - AM	hCG, 5.000 UI
Día 6 - PM	IA 12h después de hCG
Día 7 - AM	IA 24h después de hCG
Día 13 - AM	Recogida de embriones 7 días después del tratamiento con hCG

GRUPO: Folltropin®	
Día 0 - AM	Ablación fol.
Día 0 - PM	
Día 1 - AM	
Día 1 - PM	4mL Folltropin + inserto dispositivo P4
Día 2 - AM	4mL Folltropin
Día 2 - PM	3mL Folltropin
Día 3 - AM	3mL Folltropin
Día 3 - PM	2mL Folltropin + PGF
Día 4 - AM	2mL Folltropin
Día 4 - PM	1mL Folltropin + PGF
Día 5 - AM	1mL Folltropin + eliminación dispositivo P4
Día 5 - PM	
Día 6 - AM	hCG, 5.000 UI
Día 6 - PM	IA 12h después de hCG
Día 7 - AM	IA 12h después de hCG
Día 13 - AM	Recogida de embriones 7 días después del tratamiento con hCG

Figura 2

SEQ ID NO: 1

CELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELV
YETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCSDSDTDCTVRGLGPSYCSFREIKE

SEQ ID NO: 2

FPDGFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLV
PKNITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYYHKS

SEQ ID NO: 3

MKSVQFCFLFCCWRAICCRSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDL
VYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCSDSD
STDCTVRGLGPSYCSFREIKESSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPDGFTM
QGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEAT
CCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYYHKS

SEQID NO: 4

atgaagtctgtccagtctgtttccttttctgttgctggagagcaatctgctgcagaagctgcgagctgaccaacatcacca
tcacgggtggagaaagaggaatgtggcttctgcataagcatcaacaccacgtgggtgtgcaggctactgctacaccgggacttg
gtgtacagggaccagcaaggcccaatatccagaaaacgtgtaccttcaaggagctgggtctacgagacggtgaaagtgcctg
gctgtgctcaccatgcagactccctgtacacgtaccagtagccactgaatgtcactgcagcaagtgcgacagcgacagcact
gactgcaccgtgagaggcctggggcccagctactgctccttcagggaaatcaaagaatcctcttctc[aaaggccccctcccc](#)
[gagccttcaagtccatcccgactccccggggccctcggacaccccgatcctcccacaatttctgatggagagtttacaatgca](#)
gggctgtcctgaatgcaagctaaaagaaaacaaatacttctccaagccagatgtccaatctatcagtgcattgggggtgctgctt
ctccagggcataccccactccagcgaggtctaagaagacaatgttggtccccaagaacatcacctcgggaagctacatgctgtg
tggccaaagcatttaccagggccacagtgatgggaaatgtcagagtggagaaccacaccgagtgccactgcagcacttgttat
tatcacaatectaa