

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 752**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015 PCT/FR2015/052414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015 E 15770570 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3191514**

54 Título: **Ligandos que potencian la bioactividad de las gonadotropinas**

30 Prioridad:

10.09.2014 FR 1458469
31.08.2015 FR 1558078

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2020

73 Titular/es:

REPROPHARM VET (100.0%)
Centre Inra Val de Loire site de Tours
37380 Nouzilly, FR

72 Inventor/es:

KARA, ELODIE;
DECOURTYE, JÉRÉMYE;
CASTERET, SOPHIE y
MAUREL, MARIE-CHRISTINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 797 752 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

Ligandos que potencian la bioactividad de las gonadotrofinas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra la hormona foliculoestimulante (FSH) capaces de potenciar la bioactividad de las gonadotrofinas.

10 La presente invención encuentra sus aplicaciones principalmente en medicina humana y veterinaria, para inducir la ovulación en un mamífero hembra.

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes ([]) se refieren al listado de referencias presentado al final del texto.

15 Estado de la técnica

Las gonadotrofinas (o gonadotropinas) son hormonas glicoproteicas complejas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la reproducción en vertebrados al actuar en las funciones de las gónadas (ovarios y testículos). Dos de estas hormonas se secretan en todos los vertebrados: la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). En dos grupos de mamíferos, equinos y primates, existe además una gonadotropina coriónica (CG) secretada por la placenta: coriogonadotropina humana (hCG) y coriogonadotropina equina (eCG) que actúan mediante los receptores LH.

20 La hormona luteinizante (LH) es producida por células gonadotrópicas del lóbulo anterior de la glándula pituitaria bajo estimulación de GnRH, producida por el hipotálamo. La LH estimula la producción de testosterona en individuos macho, mientras interviene en las modificaciones del ciclo ovárico en las mujeres, donde es responsable del crecimiento folicular terminal y la ovulación después de la transformación del folículo ovulatorio roto en el cuerpo lúteo. Durante la fase lútea del ciclo menstrual, la LH estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, indispensable para desarrollo precoz e implantación del embrión. La LH consiste en una subunidad α común a todas las hormonas glicoproteicas de la misma especie (como FSH, CG y hormona estimulante tiroidea, TSH) y una subunidad β responsable de la especificidad de la actividad hormonal; actividad que existe solo si las dos subunidades están asociadas de manera no covalente en forma de dímero.

25 La hormona foliculoestimulante (o FSH) es producida por la glándula pituitaria anterior bajo estimulación de GnRH producida por el hipotálamo. En individuos macho, estimula las células de Sertoli indispensables para la espermatogénesis. En individuos hembra, es responsable del reclutamiento de los folículos primordiales, inmaduros, su crecimiento y diferenciación en folículos preovulatorios estimulando los receptores de FSH de las células de la granulosa. La FSH está formada por dos subunidades α y β , y tiene una estructura similar a la de LH. Solo el dímero es capaz de estimular los receptores de FSH.

En individuos hembra, los niveles de LH y FSH son cíclicos: muy bajos durante el periodo de descanso sexual o fuera del periodo ovulatorio, con un pico de secreción en el periodo preovulatorio.

30 45 Las gonadotropinas se usan en medicina veterinaria y humana, para inducir la ovulación en mamíferos hembra. Aunque son eficaces, estos tratamientos presentan un riesgo para la salud debido al uso de hormonas extraídas de fluidos biológicos (sangre, orina) o tejido (pituitaria), particularmente en el campo veterinario. Este es el caso de la gonadotropina coriónica equina (eCG) extraída de la sangre de yeguas preñadas, y la LH y FSH porcina extraída de las glándulas pituitarias de cerdo. En el campo veterinario, también se usa una hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas, Chorulon® (Laboratorio MSD).

50 En el campo de la clínica humana, y particularmente de la Procreación Médicamente Asistida (o PMA), se usan hormonas extraídas de la orina de mujeres menopáusicas como Fostimon® (Laboratorio Genévrier) que es una FSH purificada y Menopur® (Laboratorio Ferring Pharmaceuticals) que es una hMG (gonadotropina menopáusica humana), mezcla de FSH y LH y la Gonadotropina Coriónica Endo5000 que es una hCG purificada (Laboratorio Schering-Plough). También se usan FSH humanas recombinantes, como Gonal-F® (Laboratorio Merck Serono) y Puregon® (Laboratorio Merck Schering-Plough); hCG y LH recombinantes como Ovidrel® y Luveris® (Laboratorio Merck Serono).

55 Además, el uso repetido de estas hormonas induce con mayor frecuencia una reacción inmunitaria que neutraliza el efecto de las hormonas, conduciendo a una disminución de la eficacia terapéutica. Sin embargo, en algunos casos también se ha destacado que la reacción inmunitaria podía producir anticuerpos capaces de potenciar la actividad de la hormona cuando se coadministraba (Patente EP 1518863) [1]. Después, también se han destacado tres anticuerpos monoclonales anti-LH capaces de potenciar su acción, así como la de FSH, para dos de ellos (Solicitud Internacional WO 2012/066519) [2].

60 Descripción de la invención

Los inventores han obtenido ahora anticuerpos monoclonales producidos contra la subunidad β de FSH, capaces de potenciar tanto su acción como la de LH y hCG.

5 Estos anticuerpos monoclonales se denominan CA5 y CH10 respectivamente.

El hibridoma que produjo el anticuerpo CA5 se depositó según el Tratado de Budapest, el 03/10/2013 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), con el número CNCM I-4801.

10 El hibridoma que produjo el anticuerpo CH10 se depositó según el Tratado de Budapest, el 03/10/2013 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), con el número CNCM I-4802.

15 Las secuencias nucleotídicas de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos CA5 y CH10 se determinaron, las secuencias peptídicas correspondientes se dedujeron. Se presentan respectivamente en las tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1

Anticuerpo monoclonal CA5	
Cadena pesada (VH)	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 1)	GAGGTGAAGCTGGTGGAAATCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTT CAGTGATTTCTACATGGAGTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAG AGACTGGAGTGGATTGCTGCAAGTAGAAACAAAGCTAAGGATT ATACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCATCGT CTCCAGAGACACTTCCCAAAGCATCCTCTACCTTCAGATGAATG CCCTGAGAGCTGAGGACACTGCCATTTATTTCTGTGCAAGAGAT GCAAGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT CTGCA
Secuencia peptídica (SEQ ID NO: 2)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKR LEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRA EDTAIFYCARDARFAYWGQGLVTVSA
Cadena ligera (VL)	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 3)	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGT TGGAGAGAAGATTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTT TATATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCAC TAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAG ACCTGGCAGTTTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCGG ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
Secuencia peptídica (SEQ ID NO: 4)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVKAEDLAV YYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIK

ES 2 797 752 T3

Tabla 2

Anticuerpo monoclonal CH10	
Cadena pesada (VH)	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 5)	GAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTA AAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC AATACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGG GTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAGTAATAATTAT GCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATCTC CAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAACT TGAAAAGTGGAGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGAT TACTACGGTAGTAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCA CTCTCACAGTCTCCTCA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 6)	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLK TEDTAMYYCVRQDYDGSSYFDYWGQGTTLVSS
Cadena ligera (VL)	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 7)	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCC AGGAGATAGAGTCTCTCTTTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATT AGCGACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCC AAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCC CCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCT CAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACT GTCAAATGGTCACAGCTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAA
Secuencia peptídica (SEQ ID NO: 8)	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLVHWYQQKSHESPR LLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVVYQCQNG HSFPYTFGGGKLEIK

Las secuencias que codifican las CDR (regiones determinantes de la complementariedad) se determinaron a partir de las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH-CDR) y ligeras (VL-CDR) de los anticuerpos CA5 y CH10 anteriores. Las secuencias peptídicas correspondientes se dedujeron, y se presentan respectivamente en las Tablas 3 y 4 a continuación.

5

Tabla 3

Anticuerpo monoclonal CA5	
VH-CDR1 (SEQ ID NO: 9)	GFTFSDFY
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 10)	SRNKAKDYTT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 11)	ARDARFAY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 12)	QSLLYSSNQKNY
VL-CDR2	WAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 13)	QQYYSYPR

Tabla 4

Anticuerpo monoclonal CH10	
VH-CDR1 (SEQ ID NO: 14)	GFTFNTYA
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 15)	IRSKSNNYAT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 16)	VRQDYYGSSYFDY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 17)	QSISDY
VL-CDR2	YAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 18)	QNGHSFPYT

5 Un ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que comprende el parátipo de un anticuerpo anti-subunidad β de FSH, se describe.

10 En el sentido de la presente invención, por "anticuerpo de subunidad β anti-FSH" se entiende, cualquier anticuerpo obtenido por inmunización de un animal a partir de las primeras inyecciones de FSH seguido de varios refuerzos con inyección de la subunidad β de FSH. Las inyecciones pueden realizarse a partir de FSH de diferentes mamíferos, por ejemplo de FSH ovina, humana, bovina, caprina o porcina, equina, canina, murina, etc... y subunidades β de FSH de origen homólogo o heterólogo. Por tanto los anticuerpos monoclonales CA5 y CH10 se obtuvieron después de una inmunización de FSH ovina y de la subunidad β de FSH ovina.

15 El objeto de la presente invención es, por tanto, un ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que el ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:

el dominio variable de la cadena pesada contiene las siguientes CDR:

- 20
- VH-CDR1, definida por la secuencia GFTFSDFY (SEQ ID NO: 9);
 - VH-CDR2, definida por la secuencia SRNKAKDYTT (SEQ ID NO: 10);
 - VH-CDR3, definida por la secuencia ARDARFAY (SEQ ID NO: 11); y

el dominio variable de la cadena ligera contiene las siguientes CDR:

- 25
- VL-CDR1, definida por la secuencia QSLLYSSNQKNY (SEQ ID NO: 12);
 - VL-CDR2, definida por la secuencia WAS;
 - VL-CDR3, definida por la secuencia QQYYSYPRT (SEQ ID NO: 13).

30 El objeto de la presente invención es, por tanto, un ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que el ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:

el dominio variable de la cadena pesada contiene las siguientes CDR:

- 35
- VH-CDR1, definida por la secuencia GFTFNTYA (SEQ ID NO: 14);
 - VH-CDR2, definida por la secuencia IRSKSNNYAT (SEQ ID NO: 15);
 - VH-CDR3, definida por la secuencia VRQDYYGSSYFDY (SEQ ID NO: 16); y

el dominio variable de la cadena ligera contiene las siguientes CDR:

- 40
- VL-CDR1, definida por la secuencia QSISDY (SEQ ID NO: 17);
 - VL-CDR2, definida por la secuencia YAS;
 - VL-CDR3, definida por la secuencia QNGHSFPYT (SEQ ID NO: 18).
- 45

En el sentido de la presente invención por "CDR" se entiende, las tres regiones hipervariables de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo que constituyen los elementos del parátipo y permiten determinar la complementariedad del anticuerpo con el epítipo del antígeno. Estas tres regiones hipervariables están enmarcadas por cuatro regiones constantes que constituyen el "marco" (FR o regiones marco) y dan una configuración estable al dominio variable.

50

En particular, la presente invención por tanto se refiere a un ligando según la reivindicación 2 o 4.

Un ligando según la presente invención es, por ejemplo:

- el anticuerpo monoclonal CA5 producido por el hibridoma CNCM I-4801;
- el anticuerpo monoclonal CH10 producido por el hibridoma CNCM I-4802;
- un fragmento VH o VL de un anticuerpo anterior usado solo o como una mezcla;
- 5 - un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dsFv o scFv, de un anticuerpo anterior. Preferentemente, se trata de un fragmento Fab o un fragmento scFv, por ejemplo un fragmento scFv de la secuencia peptídica SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22;
- una forma bi-, tri- o tetravalente (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos) de dos, tres o cuatro fragmentos de scFv, respectivamente.
- 10 - Un anticuerpo recombinante que comprende el parátipo de un anticuerpo anterior y cuyas regiones constantes se han modificado para minimizar la inmunogenicidad frente al animal o al hombre al que está destinado, se describe. Por ejemplo, se trata de un anticuerpo quimérico (humanizado, ovinizado, caprinizado, bovinizado, porcino, etc...) o totalmente humanizado, ovinizado, caprinizado, bovinizado, porcino
- 15 A modo de ejemplo no limitante, se determinaron las secuencias nucleotídicas de scFv derivadas de los anticuerpos CA5 y CH10, las secuencias peptídicas correspondientes deducidas, y se presentan respectivamente en las Tablas 5 y 6 a continuación.

Tabla 5

scFv CA5	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 19)	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCGGCGGCCTGGTACAACCT GGTGGCTCACTGCGCCTGAGCTGCGCAACCAGCGGTTTTACCT TTAGCGATTTCTACATGGAATGGGTTCCGCAACCGCCGGGTAA GCGTCTGGAATGGATCGCGGCGAGCCGTAACAAGGCGAAAAGA TTATAACCACTGAATATAGCGCGTCCGGTAAAAGGTCGCTTCATTG TCTCGCGGATACCAGCCAGTCGATTCTGTATCTGCAAATGAAT GCCCTGCGTGCCGAAGACACGGCCATCTACTTCTGTGCGCGTG ATGCACGCTTTGCCTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGT TAGCGCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGTGGCGGTAGCGGTGG CGGTGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTG GCGGTGTCAGTCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGTAAAAGCT CGCAGAGCCTGCTGTAATCATCGAACCAGAAAATTACCTGGC ATGGTATCAACAGAAGCCGGTTCAGTCGCCGAACTGCTGATC TACTGGGCCTCAACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTA CTGGCAGCGGCAGCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTC GGTGAAGGCCGAAGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTAC TATAGCTACCCTCGTACCTTCGGCGGCGGCACGAACTCGAGA TTAACATCACCATCACCATCACTAACTCGAGATCAAGTAA</p>
Secuencia peptídica (SEQ ID NO 20)	<p>QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALR AEDTAIFYCARDARFAYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAV YYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIKHHHHH</p>

Tabla 6

scFv CH10	
Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 21)	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAATCAGGCGGGCGCCTGGTCCAACCG AAAGGTAGCCTGAAACTGTCGTGCGCCGCCAGCGGCTTTACGT TCAACACTTACGCGATGAATTGGGTGCGTCAGGCGCCTGGTAA AGGCCTGGAATGGGTGGCACGCATCCGTTCAAAAAGCAACAAT TACGCGACGTATTATGCAGACAGCGTAAAAGATCGCTTTACCAT CAGCCGTGATGATTCACAGTCAATGCTGTACCTGCAAATGAATA ACCTGAAAACCTGAAGACACTGCGATGTATTATTGTGTTCCGCCAG GACTATTACGGTAGCTCGTATTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCA CCACCCTGACGGTGAGCTCGGGTGGCGGTGGCTCAGGTGGTG GTGGTAGCGGGCGGTGGCGGTAGCGATATCCAGATGACCCAGA CCCCGGCAACCCTGAGCGTTACCCCTGGTGACCGCGTTTCGCT GAGCTGCCGTGCCTCGCAGAGCATTTCGGACTATCTGCACTGG TATCAGCAAAAATCACACGAATCACCGCGTCTGCTGATTAAGTA CGCCAGCCAATCGATTAGCGGTATTCCGAGCCGCTTTTCGGGC TCGGGTTCCGGGCTCGGATTTTACCCTGTCAATTAATAGCGTAGA GCCGGAAGATGTAGGCGTCTACTATTGTCAGAACGGCCATTCA TTCCCGTACACGTTTGGCGGGCGGCACCAAGCTCGAGATTAAGC ATCACCATCATCACCATTAACCTCGAGATCAAGTAA</p>
Secuencia peptídica (SEQ ID NO: 22)	<p>QVQLQQSGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNLL KTEDTAMYCYRQDYFGSSYFDYWGGQTTLTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQTPATLSVTPGDRVLSLSCRASQSISDYLHWYQQ KSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGV YYCQNGHSFPYTFGGGKLEIKHHHHHH</p>

Una secuencia nucleotídica que codifica un ligando según la invención, se describe.

5 Un vector recombinante, en particular un vector de expresión, que comprende una secuencia nucleotídica como anteriormente, se describe.

10 Una célula hospedadora que comprende una secuencia nucleotídica como se describió anteriormente o un vector recombinante como se describió anteriormente, se describe. Por ejemplo, se trata de los hibridomas CNCM I-4801 y CNCM I-4802 o una célula transformada con una secuencia nucleotídica o un vector recombinante según la invención.

15 Un método para producir un ligando según la invención, caracterizado por que comprende el cultivo en un medio adecuado de células hospedadoras como se describió anteriormente, y la recuperación de dicho ligando a partir de dicho cultivo, se describe.

Los inventores demostraron que el anticuerpo CA5 potencia fuertemente la FSH porcina, ovina, bovina y, en menor medida, aunque significativamente, FSH humana. Además, los inventores demostraron que los scFv derivados de los anticuerpos CA5 y CH10 tienen las mismas propiedades de unión y potenciación que los anticuerpos de los que derivan.

20 El objeto de la presente invención es también un complejo formado por un ligando y una gonadotropina, o un péptido

activo de la misma, capaz de unirse a dicho ligando y cuya actividad es potenciada por dicho ligando. Por ejemplo, se trata del complejo de un ligando con LH, con hormona gonadotropina coriónica (CG), o con FSH extraída de tejidos o fluidos biológicos o recombinantes, o de un péptido activo del mismo capaz de unirse a dicho ligando y cuya actividad es potenciada por dicho ligando.

5 La presente invención también se refiere a un ligando o complejo según la invención para uso como medicamento, en particular para potenciar la bioactividad de FSH, LH y gonadotropina coriónica (CG) para inducir una ovulación o incluso una poliovulación en un mamífero hembra o para reducir los problemas de infertilidad o hipofertilidad dependiente de hormonas en un mamífero macho o hembra. Dicho medicamento también permite aumentar el nivel
10 de progesterona circulante endógena secretada por uno o más cuerpos lúteos en un mamífero hembra, favoreciendo por tanto el desarrollo embrionario precoz y reduciendo el riesgo de aborto.

15 Un método de producción cárnico, en donde dicho método comprende la administración de ligando y/o complejo de la invención a un animal mamífero hembra no humano, se describe.

La presente invención también se refiere a un ligando y/o complejo de la invención para uso en el tratamiento de infertilidad o hipofertilidad dependiente de hormonas en un mamífero. En el caso de una hembra mamífero que sufre de infertilidad o hipofertilidad, la administración del ligando o complejo de la invención permitirá estimular la procreación natural, médicamente asistida o artificial. Cabe señalar que la administración del ligando o complejo de la invención a
20 un mamífero hembra sana también permitirá activar la ovulación en el contexto de la procreación natural o artificial.

En el sentido de la presente invención por "infertilidad/hipofertilidad dependiente de hormonas" se entiende, infertilidad/hipofertilidad debida a insuficiencia hormonal, por ejemplo, de bajas concentraciones circulantes de FSH y LH o una ausencia de estas hormonas que resultan, por ejemplo, de una causa externa (por ejemplo, pesticidas) o
25 interna (por ejemplo, insuficiencia pituitaria o hipotalámica o un problema de receptividad de las gónadas a LH y/o FSH debido a una anomalía de los receptores o de las gonadotropinas LH, FSH, CG, por ejemplo, una mutación o un polimorfismo de los receptores).

30 Los ligandos y complejos de la invención pueden usarse en humanos o animales, especialmente ovinos, bovinos, caprinos, equinos, porcinos, murinos, caninos, camellos, etc...

Los ligandos, las hormonas o los complejos según la invención pueden administrarse por separado, ya sea secuencialmente, ya sea conjuntamente, por inyección, por ejemplo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, transcutánea, intradérmica, intraorbital, intraocular, oftálmica, o por vía transocular, sin alterar su efecto
35 potenciador.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ligando o complejo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede comprender además una FSH y/o una LH y/o una hormona gonadotropina coriónica (CG).

40 Para un experto en la materia todavía podrán aparecer otras ventajas al leer los ejemplos a continuación, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas con fines ilustrativos.

45 Breve descripción de las figuras

- La figura 1 ilustra el efecto potenciador *in vitro* de los anticuerpos monoclonales CA5 (A) y CH10 (B) en la bioactividad de FSH ovina (oFSH), en células de granulosa bovinas.
- La figura 2 representa el efecto potenciador *in vitro* de los anticuerpos monoclonales CA5 (A) y CH10 (B) en la bioactividad de FSH ovina (oFSH) en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano.
- La figura 3 representa el efecto potenciador *in vitro* del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de FSH ovina (oFSH) en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el vector Glosensor®.
- La figura 4 representa el efecto potenciador del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de FSH porcina (pFSH) en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el vector Glosensor®.
- La figura 5 representa el efecto potenciador *in vitro* del anticuerpo monoclonal CA5 (A a E) y scFv CA5 (F) en la bioactividad de FSH humana (hFSH) en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el vector Glosensor®.
- La figura 6 representa el efecto potenciador *in vitro* del anticuerpo monoclonal CH10 en la bioactividad de FSH ovina (oFSH) en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el vector Glosensor®.
- La figura 7 representa el efecto potenciador del anticuerpo monoclonal CH10 en la bioactividad de la FSH humana (hFSH) *in vitro* en una línea celular HEK 293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el vector Glosensor®.
- La figura 8 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de la FSH

ovina (oFSH) (A) y en la bioactividad de la FSH humana (hFSH) Gonal-F®, Puregon® y Fostimon® (B) en rata hembra.

- La figura 9 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de FSH humana (hFSH) Gonal-F® (A) y el efecto potenciador de scFv CA5 en la bioactividad de FSH humana (hFSH) Gonal-F® (A), Puregon® y Fostimon® (B) en rata hembra.
- La figura 10 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CH10 en la bioactividad de FSH ovina (oFSH) (A) y en la bioactividad de FSH humana (hFSH) Gonal-F® (B) en rata hembra.
- La figura 11 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CH10 en la bioactividad de FSH humana (hFSH) Puregon® y Fostimon® (A) y el efecto potenciador de scFv CH10 en la bioactividad de FSH humana (hFSH) Gonal-F® (B) en rata hembra.
- La figura 12 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de coriogonadotropinas humanas (hCG) Chorulon® y Endo 5000 en rata macho.
- La figura 13 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CH10 en la bioactividad de coriogonadotropinas humanas (hCG) Chorulon® y Endo 5000® en rata macho.
- La figura 14 representa el efecto potenciador *in vivo* anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de gonadotropinas endógenas en oveja al final de la temporada sexual.
- La figura 15 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de gonadotropinas endógenas en oveja en periodo de temporada sexual.
- La figura 16 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 inyectado solo en gonadotropinas endógenas en ternera: efecto en la secreción de estradiol.
- La figura 17 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 inyectado solo en gonadotropinas endógenas en ternera: efecto en las características del pico preovulatorio de LH.
- La figura 18 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 inyectado solo en gonadotropinas endógenas en ternera: efecto en la secreción de progesterona.
- La figura 19 representa el efecto potenciador *in vivo* del anticuerpo monoclonal CA5 inyectado solo después de 25 UI de hFSH, sobre el crecimiento folicular en mona.
- La figura 20 representa el epítipo conformacional del ligando CA5 en las hormonas hFSH, hCG, hLH, oLH, pLH, oFSH, pFSH y en el receptor FSH humano.
- La figura 21 representa el epítipo conformacional del ligando CH10, en las hormonas hFSH, hCG, hLH, oLH, pLH, oFSH, pFSH y en el receptor FSH humano.
- La figura 22 representa el efecto potenciador *in vitro* de diferentes fragmentos del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de FSH ovina y FSH humana.
- La figura 23 representa el efecto potenciador *in vivo* en rata de diferentes fragmentos del anticuerpo monoclonal CA5 en la bioactividad de FSH humana.

Ejemplos

EJEMPLO 1: OBTENCIÓN DE LIGANDOS DE LA INVENCIÓN, Y SU CARACTERIZACIÓN

1/ Estrategia de inmunización de ratones

Todas las inyecciones se realizaron por vía intraperitoneal en ratones (Balb/C). Para cada estrategia de inmunización se usaron cinco ratones.

Estrategia de inmunización de ratones para el anticuerpo CA5 y el anticuerpo CH10

Una primera inyección (J0) se realizó con 100 µg de FSH de oveja purificada con adyuvante completo de Freund. Después se realizaron varias inyecciones de refuerzo en la siguiente secuencia:

- J21 y J44: 100 µg de FSH de oveja purificada con adyuvante de Freund incompleto;
- J134 y J204: 50 µg de subunidad beta de FSH ovina con adyuvante de Freund incompleto;
- J217, J218 y J219: 30 µg de subunidad beta de FSH ovina sin adyuvante;
- J220: fusión.

2/ Isotipado

El isotipado de los anticuerpos CA5 y CH10 se realizó utilizando el kit de isotipado FastElysa comercializado por RD Biotech (referencia RDB 3255) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El anticuerpo CA5 es una inmunoglobina de clase IgG2a y del isotipo Kappa. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron 0,335 y 0,371 respectivamente.

El anticuerpo CH10 es una inmunoglobina de clase IgM y del isotipo Kappa. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron 0,2 y 0,124 respectivamente.

3/ Secuenciación

Las secuencias nucleotídicas de la parte variable de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de los anticuerpos CA5 y CH10 secretados por los hibridomas CNCM I-4801 y CNCM I-4802 respectivamente, se determinaron a partir de su ARN mensajero (ARNm) según el protocolo a continuación.

Los ARN se extrajeron de las células usando el kit de ARN Nucleospin® (Macherey Nagel, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de ARN purificado se calcularon midiendo la absorbancia (A) a 260 nm y su calidad por la relación A260nm/280nm y visualmente después de migración electroforética en gel de agarosa.

Los ADN complementarios de los ARNm se sintetizaron después usando un oligo-dT₁₈ como cebador por reacción de retrotranscripción con la enzima M-MLV (Ref. M1701, Promega, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La síntesis de la segunda cadena de ADN se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el siguiente protocolo: se añaden a 4 µl de la reacción de retrotranscripción en un volumen final de 50 µl; el tampón de reacción (1X final), 200 µM de cada dNTP, 300 nM de cebadores sentido y antisentido, 1,25 U de GoTaq polimerasa (Ref. M3175, Promega, EE. UU.).

Para la amplificación de la parte variable de las cadenas ligeras, se utilizaron 9 pares diferentes de cebadores (MKRev2 a 8 + MKC5For) y 3 pares diferentes para los de las cadenas pesadas (CA5: VHRev1 + VHFor, CH10: VHRev1 + MµCFor).

Tabla 7: Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para secuenciar las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CA5.

Anticuerpo CA5		
Cadena pesada (VH)		
Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
VHRev1	CGGGATCCTCTAGAGGTCCAACTGCAGGAGTCA GG	SEQ ID NO: 23
VHFor	CAGGGGCCAGTGGATAGAC	SEQ ID NO: 24
Cadena ligera (VL)		
MKRev5	GACATTGTGATGACCCAGTCT	SEQ ID NO: 25
MKC5For	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO: 26

Tabla 8: Las secuencias nucleotídicas de los cebadores se usan para secuenciar la parte 5' de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CA5.

Anticuerpo CA5		
Cadena pesada (VH)		
Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
CA5VH_Fw	CACTTTTACATGGTATCCAGTG	SEQ ID NO: 27
CA5VH_Rev	GTTTCTACTTGCAGCAATCCACT	SEQ ID NO: 28
Cadena ligera (VL)		
CA5VL_Fw	GAWTCACAGRCCCAGGTYC	SEQ ID NO: 29
CA5VL_Rev	CCCAGTAAATCAGCAGTTTAGGA	SEQ ID NO: 30

Tabla 9: Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para secuenciar las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CH10.

Anticuerpo CH10		
Cadena pesada (VH)		
Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
VHRev1	CGGGATCCTCTAGAGGTCCAAGTGCAGGAGTCA GG	SEQ ID NO: 23
M μ CFor	GGGGAAGACATTTGGGAAGG	SEQ ID NO: 31
Cadena ligera (VL)		
MKRev2	GATATTGTGATGACGCAGGCT	SEQ ID NO: 32
MKRev3	GATATTGTGATAACCCAG	SEQ ID NO: 33
MKRev4	GACATTGTGCTGACCCAATCT	SEQ ID NO: 34
MKRev6	GATATTGTGCTAACTCAGTCT	SEQ ID NO: 35
MKRev8	GACATCCAGCTGACTCAGTCT	SEQ ID NO: 36
MKC5For	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO: 37

Tabla 10: Las secuencias nucleotídicas de los cebadores se usan para secuenciar la parte 5' de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CH10.

5

Anticuerpo CH10		
Cadena pesada (VH)		
Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
CH10VH_Fw	ATGGTGTTGGGGCTGAAGTG	SEQ ID NO: 38
CH10VH_Rev	CAGTTCATGGCGTAGGTATTGA	SEQ ID NO: 39
Cadena ligera (VL)		
CH10VL_Fw	TTCTGGAYTTCAGCCTCCAG	SEQ ID NO: 40
CH10VL_Rev	GATTGGGAAGCATATTTGATGAG	SEQ ID NO: 41

10

El programa de PCR utilizado se compone de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95 °C, hibridación 30 segundos a 47 °C y amplificación durante 1 minuto a 72 °C y finalmente una amplificación final durante 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos se desalaron con el kit de extracción QIAquick®Gel (Ref. 28704, Qiagen GmbH, Alemania) después se ligaron con el vector plasmídico pGEMT easy (Ref. A1360, Promega, EE. UU.) para transformarse en bacterias. El ADN plasmídico extraído de diferentes clones bacterianos se envió para análisis de secuenciación (Macrogen Europe, Países Bajos).

15

Las secuencias nucleotídicas 5' terminales de VH y VL de los 2 anticuerpos se determinaron posteriormente mediante el diseño de cebadores específicos anclados en las secuencias líder de los ADNc (cebador Fw). Estos cebadores se diseñaron siguiendo la identificación de homología por alineamiento entre las secuencias VL y VH obtenidas previamente y la base de datos del software IMGT/V-QUEST (Brochet et al., Nucl. Acids Res., 36: W503-508, 2008; Giudicelli et al., Cold Spring Harb Protoc., 2011(6): 695-715, 2011) [3, 4] y para la extracción de las secuencias líder de interés de IMGT/GENE-DB (Giudicelli et al., Nucl. Acids Res., 33: D256-261, 2005) [5]. Los cebadores antisentido (Rev) se diseñaron en las respectivas secuencias VH y VL determinadas previamente de cada uno de los anticuerpos. El protocolo utilizado para obtener la parte 5' es el mismo que el descrito en el párrafo anterior.

20

25

Las secuencias nucleotídicas consenso se dedujeron del alineamiento de secuencias usando el software MultAlin (Corpet, Nucl. Acids Res., 16(22): 10881-10890, 1988) [6]. La transcripción en secuencias polipeptídicas y la anotación de las CDR se realizaron utilizando el software IMGT/V-QUEST. Los resultados se presentan en las tablas 11 a 14.

ES 2 797 752 T3

Tabla 11: Secuencias nucleotídicas y peptídicas de las partes variables pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CA5.

Anticuerpo (CA5)	
Cadena pesada (VH)	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1	GAGGTGAAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCAG TGATTTCTACATGGAGTGGGTCGCCAGCCTCCAGGGAAGAGAC TGGAGTGGATTGCTGCAAGTAGAAACAAAGCTAAGGATTATACAA CAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCATCGTCTCCAGAG ACACTTCCCAAAGCATCCTCTACCTTCAGATGAATGCCCTGAGAG CTGAGGACACTGCCATTTATTTCTGTGCAAGAGATGCAAGGTTTG CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 2	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRL EWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDT AIYFCARDARFAYWGQGLVTVSA
Cadena ligera (VL)	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTT GGAGAGAAGATTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTA TATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAA CCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGC AGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCGGACGTTCCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 4	DIVMSQSPSSLAVSVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKP GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYY CQQYYSYPRTFGGGTKLEIK

ES 2 797 752 T3

Tabla 12: Secuencias nucleotídicas y peptídicas de las partes variables pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CH10.

Anticuerpo CH10	
Cadena pesada (VH)	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5	GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAA AGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAA TACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTT TGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAAC ATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTACCCATCTCCAGAGA TGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAAATGAACAACTTGAAA GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGATTACTACGGT AGTAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 6	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRQDYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS
Cadena ligera (VL)	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCA GGAGATAGAGTCTCTCTTTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGC GACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGG CTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCTCAGTATCA ACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAATG GTCACAGCTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 8	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSIDYLNHWYQQKSHESPRLL IKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVVYQCQNGHSFP YTFGGGTKLEIK

Tabla 13: CDR de las partes variables pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CA5

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 9)	GFTFSDFY
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 10)	SRNKAKDYTT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 11)	ARDARFAY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 12)	QSLLYSSNQKNY
VL-CDR2	WAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 13)	QQYYSYPRT

Tabla 14: CDR de las partes variables pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo CH10

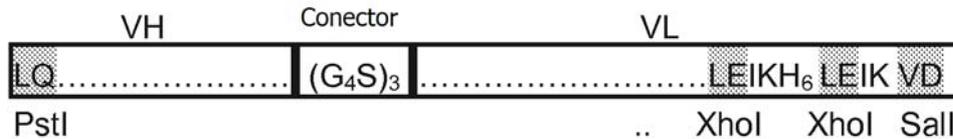
VH-CDR1 (SEQ ID NO: 14)	GFTFNTYA
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 15)	IRSKSNNYAT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 16)	VRQDYYGSSYFDY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 17)	QSISDY
VL-CDR2	YAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 18)	QNGHSFPYT

4/ Construcción, producción y caracterización de los scFv

5 a/ Construcción de los fragmentos de anticuerpo scFv

ATG Biosynthetics GmbH (Alemania) sintetizó los genes de síntesis de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de los anticuerpos CA5 y CH10.

10 Cada secuencia se diseñó a partir de la fusión de partes variables pesadas y ligeras (SEQ ID NO: 1/ SEQ ID NO: 3 para CA5; SEQ ID NO: 5/ SEQ ID NO: 7 para CH10) unidas por una secuencia que codifica el péptido (Gly₄Ser)₃ asegurando la funcionalidad de la proteína y terminada por una secuencia que codifica el péptido His₆ (péptido HIS-etiqueta) que permitirá la purificación de los scFv. Para permitir su inserción en el plásmido de expresión, las secuencias se flanquearon con los sitios enzimáticos de restricción PstI y Sall. Una secuencia adicional se añadió
 15 entre el extremo 3' de VL y el sitio Sall autorizando la eliminación del péptido His₆ si se desea. Los codones se optimizaron para expresión en *E. coli*. A continuación se detalla una representación esquemática de la construcción de los genes de síntesis de los scFvs:



20 Los fragmentos de anticuerpo se insertaron entre los sitios enzimáticos PstI y XhoI del plásmido de expresión pSW1 (ATG: Biosynthetics GmbH, Alemania) según E. S. Ward y colaboradores (Ward et al., Nature, 341: 544-546, 1989) [7] que contiene, bajo el control de un promotor inducible LacZ, una secuencia señal PelB que se fusionó en fase de lectura con el gen del fragmento de anticuerpo recombinante, permite el direccionamiento de la proteína sintetizada
 25 hacia el periplasma bacteriano. En el periplasma, esta secuencia señal es eliminada por una peptidasa.

Después de control por secuenciación de la calidad de las construcciones, los plásmidos pSW1-CA5 y pSW1-CH10 se transformaron por choque térmico en bacterias HB2151 (T53040, Interchim, Francia) hechos competentes (Li et al., Afr. J. Biotechnol., 9(50): 8549-8554, 2010) [8].
 30

ES 2 797 752 T3

Tabla 15: Secuencias nucleotídica y peptídica del scFv CA5.

scFv CA5	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 19	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCGGCGGCCTGGTACAACCT GGTGGCTCACTGCGCCTGAGCTGCGCAACCAGCGGTTTTACCT TTAGCGATTTCTACATGGAATGGGTTCCGCAACCGCCGGGTAAG
	CGTCTGGAATGGATCGCGGCGAGCCGTAACAAGGCGAAAGATT ATACCACTGAATATAGCGCGTCCGGTAAAAGGTCGCTTCATTGTC TCGCGCGATACCAGCCAGTCGATTCTGTATCTGCAAATGAATGC CCTGCGTGCCGAAGACACGGCCATCTACTTCTGTGCGCGTGAT GCACGCTTTGCCTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTTA GCGCCGGTGGTGGCGGTTACAGGTGGTGGCGGTAGCGGTGGCG GTGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTGGC GGTGTCACTCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGAAAAGCTCGC AGAGCCTGCTGTACTCATCGAACCCAGAAAAATTACCTGGCATGG TATCAACAGAAGCCGGGTCAGTCGCCGAAACTGCTGATCTACTG GGCCTCAACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTACTGGC AGCGGCAGCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTCGGTGA AGGCCGAAGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTACTATAGC TACCCTCGTACCTTCGGCGGCGGCACGAAACTCGAGATTAACA TCACCATCACCATCACTAACTCGAGATCAAGTAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 20	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKR LEWIAASRNKAKDYTTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAE DTAIYFCARDARFAYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC QQYYSPRTFGGGTKLEIKHHHHH

Tabla 16: Secuencias nucleotídica y peptídica del scFv CH10.

scFv CH10	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 21	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAATCAGGCGGGCGGCCTGGTCCAACCG AAAGGTAGCCTGAAACTGTCGTGCGCCGCCAGCGGCTTTACGT TCAACACTTACGCGATGAATTGGGTGCGTCAGGCGCCTGGTAAA GGCCTGGAATGGGTGGCACGCATCCGTTCAAAAAGCAACAATTA CGCGACGTATTATGCAGACAGCGTAAAAGATCGCTTTACCATCA GCCGTGATGATTCACAGTCAATGCTGTACCTGCAAATGAATAAC CTGAAAACCTGAAGACACTGCGATGTATTATTGTGTTCCGCCAGGA CTATTACGGTAGCTCGTATTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCA CCCTGACGGTGAGCTCGGGTGGCGGTGGCTCAGGTGGTGGTG GTAGCGGCGGTGGCGGTAGCGATATCCAGATGACCCAGACCCC GGCAACCCTGAGCGTTACCCCTGGTGACCGCGTTTTCGCTGAGC TGCCGTGCCTCGCAGAGCATTTCGGACTATCTGCACTGGTATCA GCAAAAATCACACGAATCACCGCGTCTGCTGATTAAGTACGCCA GCCAATCGATTAGCGGTATTCCGAGCCGCTTTTCGGGCTCGGG TTCGGGCTCGGATTTTACCCTGTCAATTAATAGCGTAGAGCCGG AAGATGTAGGCGTCTACTATTGTCAGAACGGCCATTATTCCCG TACACGTTTGGCGGCGGCACCAAGCTCGAGATTAAGCATCACC ATCATCACCATTAACCTCGAGATCAAGTAA</p>
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 22	<p>QVQLQQSGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNHLKT EDTAMYYCVRQDYGGSSYFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQTPATLSVTPGDRVLSCRASQSIDYLVHWYQQKSH ESPRLLIKYASQISGISRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYC QNGHSFPYTFGGGKLEIKHHHHH</p>

b/ Producción de los fragmentos de anticuerpo recombinantes

5 - *Cultivo bacteriano*

Un precultivo se realizó en 5 ml de medio 2xYT que contenía 50 µg/ml de ampicilina durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se sembraron 500 µl de este precultivo en 500 ml del mismo medio y se dejaron crecer a 37 °C a 150 RPM hasta obtener una DO_{600nm} de 1,4. La síntesis del scFv se indujo por la adición de 0,1 mM de IPTG 16 h a 16 °C a 150 RPM.

- *Extracción*

15 El medio de cultivo se centrifugó durante 30 minutos a 4500 g a 4 °C. El resto de la preparación se realizó a 4 °C. Para extraer el periplasma bacteriano, el sedimento se resuspendió e incubó en 10 ml de TES (Tris 0,2 M pH8, EDTA 0,5M, sacarosa 0,5 M) durante 30 minutos a los que después se añadieron 15 ml de TES diluido a 1/4 para incubar nuevamente 30 minutos. El extracto bacteriano se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se dializó contra PBS durante la noche. El sobrenadante dializado se trató inmediatamente para purificar el scFv o se conservó a -20 °C hasta su uso.

20 La producción de scFv en el periplasma se analizó mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-His-Tag HRP (Ref. R93125 Life technologies, Francia) según las recomendaciones de uso del fabricante.

- Purificación

5 El periplasma se centrifugó durante 20 minutos a 5.000 g a 4 °C. El sobrenadante se incubó con Gel de Afinidad por Níquel HIS-Select® (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) con agitación durante 1h a 4 °C. El gel se lavó con tampón fosfato sódico 0,05 M, NaCl 0,3 M pH8, después el mismo tampón suplementado con imidazol 20 mM hasta obtener una DO_{280nm} de aproximadamente 0. El scFv se eluyó después con un tampón fosfato sódico 0,05 M, NaCl 0,3 M, imidazol 250 mM pH8. El eluato se dializó contra PBS durante la noche. Se conservó a -20 °C.

10 - Control de calidad

El scFv purificado se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % después de tinción con azul de Coomassie y por cromatografía de exclusión en una columna Sephadex™ 75 10/300 GL (Ref. 17-5174-01 GE Healthcare, Alemania).

15 5/ Especificidad

La especificidad de los anticuerpos y su scFv se estudió mediante la técnica ELISA. Cada hormona evaluada se preparó a una concentración de 10 µg/ml en tampón carbonato sódico 0,1M pH 9,6 y se distribuyó a una velocidad de 20 100 µl por pocillo en una placa ELISA. El tiempo de adsorción fue de 18 horas a + 4 °C. Después de cinco lavados, los pocillos se trataron con 100 µl de PBS suplementado con Tween al 0,1 % y BSA al 1 % durante 45 minutos a 37 °C, después cada anticuerpo o scFv se distribuyó a una velocidad de 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. En cada hormona evaluada, los anticuerpos y los scFv se distribuyeron a diferentes concentraciones en un intervalo de 10 a 250 µg/ml para anticuerpos y de 10 a 150 o 200 µg/ml para scFv.

25 Después de cinco lavados, un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) se distribuyó a una tasa de 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Dependiendo del isotipo del anticuerpo monoclonal estudiado, el anticuerpo secundario era un HRP anti-IgG1 (Ref. 115-035-205, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc), un HRP anti-IgG2a (Ref. 115-035-206, Jackson Laboratories) o un HRP anti-IgM (Ref. 115-035-075, Jackson Laboratories). Para los scFv, se usó un HRP anti-Etiqueta His (Ref. R93125 Life technologies, Francia). Después de cinco lavados, la actividad enzimática se reveló con TMB distribuido a razón de 100 µl/pocillo. El tiempo de desarrollo fue de 5 a 30 minutos a temperatura ambiente dependiendo de la velocidad de la reacción. Después de detener la reacción con H₂SO₄ 1M (50 µl/pocillo) la intensidad de la reacción coloreada se midió (densidad óptica) usando un espectrofotómetro para placas ELISA.

35 Para los anticuerpos CA5 y CH10 y sus scFv, el porcentaje de reacción cruzada se calculó en relación con los valores obtenidos con FSH ovino (oFSH) considerado como el valor de referencia del 100 %. El porcentaje de reacción cruzada se calculó de manera convencional comparando las curvas de dosis-respuesta obtenidas con el intervalo de concentraciones del anticuerpo o del scFv. A partir de la curva obtenida con la hormona de referencia:

- 40 - ya sea A la concentración que proporciona el 50 % de la densidad óptica máxima (DE 50). A partir de la curva obtenida con otra hormona,
- ya sea B la concentración correspondiente al mismo valor de densidad óptica que el utilizado para definir A.

45 El porcentaje de reacción cruzada es igual a A dividido entre B y multiplicado por 100: [(A/B) X 100].

- Especificidad del anticuerpo CA5 y su scFv

50 La tabla 17 ilustra los porcentajes de reacciones cruzadas del anticuerpo CA5 con las subunidades (s.u.) α y β de FSH ovina y la subunidad β de FSH humana:

Tabla 17

CA5	oFSH	s.u. α oFSH	s.u. β oFSH	s.u. β hFSH
Reacción cruzada	100 %	6 %	80 %	50 %

55 El anticuerpo CA5 reconoce muy poco la subunidad α ovina pero reconoce fuertemente la subunidad β de la FSH ovina (80 %); también se cruza con la subunidad β de FSH humana, menos fuertemente (50 %). Su especificidad es anti-subunidad β FSH.

60 La tabla 18 ilustra los porcentajes de reacciones cruzadas de CA5 y scFv CA5 con FSH porcina (pFSH) y diferentes FSH humanas:

Tabla 18

	oFSH	pFSH	hFSH (Gonal F)	hFSH (Puregon)	hFSH (Fostimon)	hMG (Menopur)
CA5	100 %	134 %	128 %	70 %	76 %	61 %
scFv CA5	100 %	61 %	ND	ND	10 %	10 %

El anticuerpo CA5 muestra un fuerte reconocimiento de FSH porcina y FSH humana Gonal-F. También se cruza significativamente con otras FSH humanas entre 61 y 76 %. El anticuerpo CA5 reconoce mejor la FSH probada en su forma dimérica, que tiende a indicar especificidad contra un epítipo conformacional.

El scFv CA5 reconoce significativamente pFSH (61 %) y más débilmente hFSH (Fostimon) y hMG (Menopur). La reacción cruzada en las otras dos FSH humanas no pudo medirse (ND) debido a una unión demasiado débil. La unión de scFv CA5, al igual que el anticuerpo completo, por tanto, parece depender de la conformación de la hormona, probablemente alterada durante la adsorción en el plástico de la placa de ELISA.

La especificidad de scFv CA5 se evaluó con respecto a LH porcina (pLH), ovina (oLH), bovina (bLH), eCG y hCG Chorulon y Endo 5000. Los resultados se ilustran en la tabla 19:

Tabla 19

	oLH	pLH	bLH	eCG	Chorulon	Endo 5000
scFv CA5	25 %	29 %	33 %	ND	10 %	ND

La unión de scFv CA5 es significativa con respecto a LH animal con una reacción cruzada entre 35 y 40 %. Por el contrario, solo hCG Chorulon se reconoce débilmente (10 %). El enlace demasiado débil en las otras dos hCG adsorbidas no permitió cuantificar una reacción cruzada. Estos resultados refuerzan la hipótesis de especificidad hacia un epítipo conformacional dados los efectos biológicos de CA5 y su scFv obtenidos *in vitro* e *in vivo* en la actividad de hCG (ver resultados en los Ejemplos 2 y 3).

Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos por transferencia de Western al incubar el anticuerpo CA5 en oFSH migrado en gel de poliacrilamida al 5 % en condiciones desnaturizantes o no desnaturizantes. Solo la banda de β oFSH se reconoció en condiciones no desnaturizantes y dio una señal importante. No se observó señal en oFSH migrada bajo condiciones desnaturizantes.

Una estimación de la constante de disociación Kd del scFv, frente a diferentes FSH, LH y CG estudiadas, se calculó en GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5) usando la función "Un sitio - Unión específica" en un modelo de enlace de saturación ("*saturation binding experiment model*", GraphPad PRISM software). Los diferentes valores obtenidos se muestran en las tablas 20 y 21.

Tabla 20

scFvCA5	oFSH	pFSH	hFSH Gonal-F	hFSH Puregon	hFSH Fostimon	hMG Menopur
Kd (10^{-6} M)	0,54	1,24	1,43	2,67	2,03	2,41

Tabla 21

scFv CA5	oLH	pLH	bLH	eCG	hCG Chorulon	hCG Endo 5000
Kd (10^{-6} M)	1,95	2,47	2,43	4,07	3,80	3,14

La comparación de las constantes de disociación Kd calculadas así indica una mayor afinidad del scFv CA5 por FSH en ovino y porcino con un valor de 0,54 y 1,24 μ M, respectivamente. Con la excepción de la FSH humana recombinante Gonal F (Kd 1,43 μ M), scFv CA5 tiene menor afinidad por las FSH humanas (Kd de 2,03 a 2,67 μ M). En comparación con oFSH y pFSH, scFv CA5 tiene una afinidad media respecto a LH ovina y porcina (Kd de 1,95 y 2,47 μ M respectivamente). Las Kd estimadas frente a hCG y eCG (Kd de 3,14 a 4,07 μ M) indican una menor afinidad de scFv CA5 por estas hormonas.

- Especificidad del anticuerpo CH10 y su scFv

La tabla 22 ilustra los porcentajes de reacciones cruzadas del anticuerpo CH10 con las subunidades (s.u.) α y β de FSH ovina y la subunidad β de FSH humana:

Tabla 22

CH10	oFSH	s.u. α oFSH	s.u. β oFSH	s.u. β hFSH
Reacción cruzada	100 %	43 %	88 %	40 %

El anticuerpo CH10 reconoce preferentemente la subunidad β de FSH ovina (88 %) y dos veces menos la subunidad β de FSH humana y la subunidad α ovina (40 % y 43 %). Según estos resultados, la especificidad de CH10 es anti-subunidad β FSH, preferentemente oFSH. Reconoce, en menor grado, pero no despreciable, la subunidad α ovina a diferencia del anticuerpo CA5. Todos estos resultados pueden conducir a la hipótesis de un epítipo que implica principalmente β pero también α , en la zona de asociación de las dos subunidades, por ejemplo.

La tabla 23 ilustra los porcentajes de reacciones cruzadas de CH10 y del scFv CH10 obtenidos con FSH porcina (pFSH) y diferentes FSH humanas

Tabla 23

	oFSH	pFSH	hFSH (Gonal F)	hFSH (Puregon)	hFSH (Fostimon)	hMG (Menopur)
CH10	100 %	24 %	50 %	71 %	100 %	48 %
scFv CH10	100 %	175 %	32 %	67 %	30 %	61 %

El anticuerpo CH10 y su scFv muestran un fuerte reconocimiento de las FSH animales y una reacción cruzada que varía del 30 al 100 % para las FSH humanas.

La especificidad de scFv CH10 se evaluó con respecto a LH porcina (pLH), ovina (oLH), bovina (bLH), eCG y hCG Chorulon y Endo 5000. Los resultados se ilustran en la tabla 24:

Tabla 24

	oLH	pLH	bLH	eCG	Chorulon	Endo 5000
scFv CH10	68 %	63 %	52 %	ND	ND	ND

La unión de scFv CH10 con respecto a LH animales es significativa con una reacción cruzada entre 52 y 68 %. Por el contrario, el enlace demasiado débil en las hCG y eCG adsorbidas no permitió cuantificar una reacción cruzada. Estos resultados refuerzan la hipótesis de especificidad hacia un epítipo conformacional dados los efectos biológicos de CH10 y su scFv obtenido *in vitro* e *in vivo* en la actividad de hCG Chorulon y Endo 5000 (ver resultados en los Ejemplos 2 y 3).

Una estimación de la constante de disociación K_d de scFv CH10, frente a diferentes FSH, LH y CG estudiadas, se calculó en GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5) usando la función "Un sitio - Unión específica" en un modelo de enlace de saturación ("*saturation binding experiment model*", GraphPad PRISM software). Los valores obtenidos se muestran en las tablas 25 y 26.

Tabla 25

scFv CH10	oFSH	pFSH	hFSH Gonal-F	hFSH Puregon	hFSH Fostimon	hMG Menopur
K_d (10^{-6} M)	2,85	5,22	1,82	11,5	1,59	7,36

Tabla 26

scFv CH10	oLH	pLH	bLH	eCG	hCG Chorulon	hCG Endo 5000
K_d (10^{-6} M)	1,55	2,47	1,94	1,97	1,47	2,09

Las constantes de disociación K_d calculadas así indican una afinidad del scFv CH10 tanto para las FSH ovina y porcina (K_d de 7,51 y 5,22 μ M) como para las FSH humanas Gonal F, Fostimon y hMG Menopur (K_d de 1,82, 1,59 y 7,36 μ M respectivamente). Las K_d calculadas frente a hCG y eCG (K_d de 1,47 a 2,09 μ M) indican una buena afinidad del scFv CH10 por estas hormonas en comparación con las FSH.

EJEMPLO 2: MEDICIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO POTENCIADOR DE LIGANDOS DE LA INVENCION EN LA BIOACTIVIDAD DE FSH

El efecto potenciador de los ligandos de la invención en la bioactividad de FSH se demostró mediante la comparación de la respuesta biológica obtenida con diferentes tipos o líneas celulares estimuladas con FSH sola o con el complejo FSH/anticuerpo monoclonal (AcM).

En cada caso, la comparación de las curvas de dosis-respuesta obtenidas permitió cuantificar el efecto potenciador *in vitro* del AcM en la actividad biológica de la FSH complejada. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5).

1/ En cultivos primarios de células de granulosa bovina

El efecto potenciador de los AcM CA5 y CH10 en la bioactividad de la FSH ovina (oFSH) se caracterizó por primera vez en células de granulosa bovina que expresan endógenamente el receptor de FSH bovina.

Los sobrenadantes de hibridomas a la concentración final de 0,1 µg/ml de anticuerpos CA5 o CH10 se incubaron con un intervalo de FSH ovina o humana que varía de 3 ng/ml a 25 ng/ml, 30 min a 37 °C.

Las células de granulosa bovina se pincharon en los ovarios de las vacas a partir de folículos con diámetros que variaban de 2 a 6 mm, según el protocolo descrito por Chopineau et al. (Mol. Cell Endocrinol., 92(2): 229-39, 1993) [8] y Wehbi et al. (Endocrinology, 151(6): 2788-2799, 2010) [9]. Las células de granulosa bovina suspendidas en medio 5A de McCoy (Lonza, Bélgica, referencia BE12-688F), preparadas a razón de 80.000 células por 0,5 ml, se estimularon durante 3 horas a 37 °C, con agitación, en presencia de IBMX 48 µg/ml (Sigma Aldrich, Francia, referencia I5879), en un intervalo de FSH de 3 ng/ml a 25 ng/ml, solo o previamente complejada con un anticuerpo monoclonal según el protocolo anterior. La respuesta biológica medida fue la secreción de AMPc.

Tras la centrifugación, el AMPc producido se analizó en el sobrenadante de cultivo usando un kit ELISA (Biomedical Technologies Inc., MA, EE.UU., BT-730).

Los resultados se muestran en la figura 1.

Los resultados muestran una amplificación de la secreción de AMPc en un factor 1,3 veces para CA5, un factor de 5,5 veces para CH10 en la actividad de FSH ovina. Análisis estadístico por análisis de varianza con dos variables (ANOVA *bidireccional*, El software GraphPad PRISM) muestra un efecto significativo que varía de $p < 0,05$ (*) para CA5 a $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) para CH10.

2/ En la línea celular HEK293 transfectadas de manera estable con el receptor FSH humano

El efecto potenciador de los AcM en FSH de diferentes especies se midió en células HEK 293 que expresan establemente el receptor de FSH humano. Este sistema permitió medir la producción de AMPc después de la activación del receptor de FSH después de una estimulación con FSH sola o por el complejo FSH/ACM durante 1 hora a 37 °C.

Para ello, 60.000 células se repartieron en pocillos de placas de 96 pocillos (Becton Dickinson, NJ, EE.UU., referencia 353072) y se cultivaron 24h a 37 °C, CO₂ al 5 % en atmósfera húmeda, en 100 µl de medio MEM (Ozyme, Francia, BE12-611F) que contiene SVF 10 % (Lonza, Bélgica, referencia DE14-801F), penicilina/estreptomicina 1 % (Sigma Aldrich, Francia, P-4333) y G418 400 µg/ml (Sigma Aldrich, Francia, referencia A1720). Después de 2h de abstinencia en medio MEM, las células se estimularon durante 1h a 37 °C. El sobrenadante de cultivo se recolectó y analizó usando un kit ELISA (Biomedical Technologies Inc., MA, EE.UU., BT-730). Los resultados expresan la cantidad de AMPc secretada en el punto final. Se analizaron utilizando el software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5).

La figura 2 representa el efecto potenciador de los anticuerpos monoclonales CA5 y CH10 en la bioactividad de FSH ovina (oFSH) *in vitro* en células HEK 293 transfectadas de manera estable con el receptor de FSH humano. Para ello, las células se estimularon con un intervalo de 3 ng/ml a 32,5 ng/ml de FSH ovina, ya sea con los mismos puntos de intervalo de FSH previamente incubados, 30 minutos a 37 °C, con el anticuerpo monoclonal (concentración final 0,1 µg/ml) antes de la estimulación de las células. Un análisis de varianza de dos variables (ANOVA *bidireccional*, software GraphPad PRISM) permitió comparar las curvas de dosis-respuesta obtenidas con FSH sola o con el complejo FSH/anticuerpo monoclonal. El anticuerpo CA5 mostró un efecto potenciador que varía de 160 % a 200 % en la actividad de oFSH; este efecto es significativo para la concentración de 32,5 ng/ml de oFSH ($p < 0,05$). El anticuerpo CH10 ejerce un mayor efecto potenciador en oFSH para todas las concentraciones probadas que varían de 225 % para el punto de 3 ng/ml ($p < 0,01$) a 260 % para los puntos 10 ng/ml y 33 ng/ml respectivamente ($p < 0,001$).

3/ En la línea celular HEK293 transfectadas de manera estable con el receptor de FSH humano y con el sistema Glosensor®

El efecto potenciador de los AcM en las FSH de diferentes especies se midió en tiempo real en células HEK 293 que expresan de manera estable el receptor de FSH humano y el vector GloSensor™ (Promega, Francia). Este sistema celular permitió controlar la producción de AMPc después de estimulación del receptor de FSH por el agonista (FSH sola o complejo FSH/anticuerpo monoclonal) en tiempo real. Después de la unión del AMPc a la proteína GloSensor™, el sustrato GloSensor™ (Promega, Francia, referencia E1291) se hidrolizó y conduce a una emisión de luminiscencia

medida con un lector PolarStar Optima (BMG Labtech, Alemania) y expresado en ULR (Unidad de luminiscencia relativa). Esta línea estable fue desarrollada por el equipo de Biología y Bioinformática de Sistemas de Señalización en el centro INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, Francia) y se puso a disposición de forma gratuita para estos ensayos.

5 Para ello, las células HEK 293 se cultivaron a razón de 80.000 células por pocillo de microplaca de 96 pocillos blanca con fondo transparente (Dominique Dutscher, Francia, referencia 655903) y cultivadas en 100 μ l de medio MEM (Ozyme, Francia, BE12-611F) suplementado con SVF 10 % (Lonza, Bélgica, referencia DE14-801F), penicilina/estreptomicina 1 % (Sigma Aldrich, Francia, referencia P-4333), Higromicina B 200 μ g/ml (Life Technologies™, Francia, 10687010) y G418 400 μ g/ml (Sigma Aldrich, Francia, referencia A1720) durante la noche.
 10 Después de 2h de abstinencia en 100 μ l de medio MEM suplementado con BSA 1 % (PAA, Francia, referencia K45012) y que contiene 4 % de sustrato GloSensor™ durante 2h a temperatura ambiente protegido de la luz, la placa celular se colocó en el lector PolarStar Optima y se realizó una primera lectura durante 5 minutos para medir el nivel basal de luminiscencia. Después la placa se retiró del lector y se añadieron 11 μ l de ligando (FSH sola o complejo FSH/anticuerpo monoclonal) a la misma para obtener las concentraciones indicadas. La luminiscencia emitida se midió
 15 después durante aproximadamente 1h30.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Prism (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5). La función no lineal "log (agonista) frente a respuesta" se usó para trazar la respuesta en función de la concentración de FSH. Esto hizo posible caracterizar y comparar la CE50 para FSH sola y FSH complejada con el anticuerpo monoclonal. Para cada ejemplo, el efecto significativo del complejo FSH/anticuerpo potenciador se midió mediante análisis de varianza de dos variables (ANOVA *bidireccional*, software GraphPad PRISM) comparando las dos curvas en su totalidad.

- *Anticuerpo monoclonal CA5*

25 La figura 3 ilustra las curvas de cinética de producción de AMPc expresadas en unidades de luminiscencia relativas en función del tiempo (en minutos) obtenidas para las concentraciones 0 - 0,1 - 0,3 - 1 y 3 nM de FSH ovina sola o complejada con el anticuerpo CA5. Se observa que las células "estimuladas" por el anticuerpo solo, sin FSH, no muestran ninguna respuesta: la señal luminiscente permanece en su nivel basal (curva 3A). El anticuerpo CA5 solo no ejerce ningún efecto agonista o antagonista sobre el receptor de FSH humano expresado por las células HEK 293. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CA5 (concentración final 6 nM), complejado con oFSH aumenta de forma muy significativa y notable la actividad estimulante de la hormona. Por tanto se observa un aumento de la respuesta celular máxima de 350 % y 330 % para las concentraciones de 0,1 y 0,3 nM de oFSH (curvas B y C) y un aumento de 230 % y 140 % respectivamente para las concentraciones de 1 y 3 nM de oFSH (curvas D y E). La amplitud del efecto
 30 potenciador se vuelve menos importante con las concentraciones más altas de oFSH (1 y 3 nM) debido a una saturación de la respuesta celular y de la señal luminiscente a 11000 ULR en este caso. El valor CE50 medido por GraphPad Prism es 2,36.10⁻⁹M para oFSH y 2,83.10⁻¹⁰M para el complejo oFSH/CA5 que refleja un aumento de 1 unidad de LogCE50 (de 10^{-8,6} a 10^{-9,54}) cuando FSH forma complejo con el anticuerpo CA5. La diferencia entre las dos curvas de oFSH frente a oFSH/CA5 es altamente significativa para todas las dosis de oFSH probadas (p<0,001).
 35 40

El efecto potenciador del anticuerpo CA5 medido en FSH porcina se ilustra en la figura 4. Se observa un aumento de 190 % del máximo de la respuesta a 0,03 nM de pFSH cuando se compleja con el anticuerpo CA5 (concentración final 6 nM) (curva A), pero este aumento no es significativo. El efecto potenciador alcanza 250 % a la concentración de 0,1 nM de pFSH (curva B) y es significativo (p<0,01). El nivel de respuesta obtenido con pFSH 0,03 nM complejado con CA5 es equivalente al obtenido con pFSH 0,1 nM solo (500 ULR frente a 585 ULR respectivamente); lo que significa que el complejo pFSH 0,03 nM/CA5 induce la misma amplitud de respuesta que pFSH solo a una concentración 3,3 veces mayor (0,1 nM; es decir, 0,5 Log).
 45

Finalmente, se ha estudiado el efecto potenciador de CA5 en la actividad de la FSH humana recombinante (Gonal-F, Laboratorio SERONO). La figura 5 ilustra las curvas de cinética de producción de AMPc expresadas en unidades de luminiscencia relativas en función del tiempo (minutos) obtenidas durante la estimulación con las concentraciones 0,03 - 0,1 - 0,2 - 0,3 nM de FSH sola o complejada con el anticuerpo CA5 (6 nM). Un efecto potenciador del 235 % se observó con la concentración 0,03 nM hFSH, 200 % con 0,1 y 0,2 nM hFSH después 170 % con la concentración más alta 0,3 nM hFSH debido a la saturación del sistema celular (máximo 10530 ULR). El cálculo de CE50 por GraphPad Prism indicó un valor de 5,86.10⁻¹⁰M para hFSH y 1,36.10⁻¹⁰M para el complejo hFSH/CA5 reflejando un aumento de 0,63 en LogCE50 (de 10^{-9,23} a 10^{-9,86}) cuando FSH está complejada con el anticuerpo CA5. El efecto potenciador de scFv CA5 también se estudió en la bioactividad de hFSH a 0,01 nM. Un aumento significativo del 160 % (p<0,01) se obtuvo a la concentración de scFv 36 nM (Figura 5). Este aumento fue similar al del anticuerpo completo, CA5 bivalente. Este resultado significa que el fragmento monovalente tiene las mismas propiedades potenciadoras de la actividad de FSH que el anticuerpo CA5.
 50 55 60

Aunque significativo (p<001), el efecto potenciador del anticuerpo CA5 en la bioactividad de FSH humana sigue siendo menos significativo que en la bioactividad de FSH ovina para la cual se obtuvo un aumento de una unidad Log entre la CE50 de oFSH y la del complejo oFSH/CA5.

- *Anticuerpo monoclonal CH10*

65

El efecto modulador del anticuerpo CH10 se estudió en FSH ovina (oFSH) y en FSH humana (hFSH) (Gonal F, Laboratorio SERONO).

5 La Figura 6 ilustra el efecto amplificador del anticuerpo CH10 (10 nM) en la bioactividad de la oFSH preparada a las concentraciones 0,01 - 0,03 y 0,1 nM. A bajas concentraciones (0,01 y 0,03 nM), se obtiene un aumento del 185 % en la respuesta celular con el complejo oFSH/CH10 (curvas A y B). A la concentración de 0,1 nM de oFSH, el aumento es del 312 % con el complejo oFSH/CH10 (curva C). Estos aumentos son muy significativos ($p < 0,001$).

10 El efecto potenciador de CH10 (1,3 nM) se midió en FSH humana preparada de 0,1 nM a 3 nM (Figura 7A y B). Se observó un aumento moderado pero significativo ($p < 0,001$) quedaría de 140 % a 150 %. Las CE50 medidas con GraphPad Prism fueron de $2,85 \cdot 10^{-10} \text{M}$ para hFSH y $3,17 \cdot 10^{-10} \text{M}$ para el complejo hFSH/CH10 (Figura 7C).

15 El efecto potenciador de CH10 se ejerce más específicamente en FSH ovina, animal. Un efecto débil del anticuerpo CH10 se observó en FSH humana.

EJEMPLO 3: MEDICIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO POTENCIADOR DE LIGANDOS DE LA INVENCIÓN EN LA BIOACTIVIDAD DE FSH Y LH/CG EN MODELO DE RATA

20 Después de su caracterización *in vitro*, el efecto potenciador de cada anticuerpo monoclonal se caracterizó *in vivo*, en rata hembra por su efecto en la bioactividad de FSH y en rata macho por su efecto en la bioactividad de LH/CG, que también reconocen.

25 Para medir la bioactividad de FSH, el protocolo utilizado fue el del ensayo biológico descrito por Steelman y Pohley (Steelman SL, Pohley FM. *Endocrinology*, 53:604-616. 1953) [12]. Para medir la bioactividad de LH, el protocolo utilizado fue el del ensayo descrito por Scobey et al. (Scobey et al, *Reprod. Biol. Endocr.* 3:61, 2005) [13].

30 El efecto de los anticuerpos en la actividad de la FSH se evaluó utilizando FSH ovina y humana. El efecto de los anticuerpos en la actividad de LH se evaluó en dos preparaciones de hCG (gonadotropina coriónica humana).

35 El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU., versión 5). Los resultados relacionados con experimentos realizados en lotes de 5 animales, análisis de varianza de una variable, no paramétrico (ensayo de Kruskal Wallis), seguido de una corrección de Dunns, se aplicó o un ensayo no paramétrico (ensayo de Mann-Whitney). Para los resultados relacionados con números mayores ($n > 30$) obtenidos de la compilación de varios bioensayos, se aplicó un ensayo paramétrico (ensayo t de Student no emparejado) seguido de una corrección de Bonferroni.

1/ Efecto potenciador de los anticuerpos en la bioactividad de FSH en Rata

40 El efecto potenciador de los anticuerpos CA5 y CH10 y su scFv se estudió en FSH ovina y en varias preparaciones de FSH humana utilizadas en la reproducción humana Gonal-F y Puregon (FSH recombinante de los laboratorios Merck Serono y Merck Schering-Plough, respectivamente), Fostimon y Menopur (extractos de FSH comercializados por los laboratorios Genevrier y Merck Schering-Plough, respectivamente).

45 Como se describe en el protocolo de Steelman y Pohley, las ratas inmaduras de 21 días de edad recibieron 2 inyecciones por la mañana y por la noche durante tres días consecutivos, 100 μl de una mezcla de hCG y FSH que comprende una cantidad constante de hCG (3,5 UI) añadida con una cantidad variable de FSH que varía de 0,5 a 1,5 UI para FSH humana (Gonal F, Puregon, Fostimon, Menopur) o de 0,5 a 2 μg para FSH ovina (hormona extraída). Las inyecciones se realizaron por vía subcutánea en la nuca. Cada experimento comprendía al menos 4 lotes: un lote tratado con solución salina fisiológica (suero Φ), un lote tratado con el anticuerpo o scFv solo, un lote tratado con la mezcla hCG+FSH, un lote tratado con la mezcla de hCG/FSH suplementada con 2 μg de anticuerpo o scFv purificado.

50 En el caso de un tratamiento con el complejo hormona/anticuerpo o scFv, antes de la inyección, la mezcla FSH + anticuerpo se incubó previamente durante 20 minutos a 37 °C o a temperatura ambiente, después se añadió a hCG. La hCG puede mezclarse indiferentemente con FSH durante la incubación del complejo.

55 El cuarto día, las ratas se pesaron y sus ovarios extrajeron, se disecaron y después se pesaron. Los resultados se expresan en miligramos de ovario/100 gramos de peso corporal. El aumento del peso de los ovarios es proporcional a la cantidad de FSH bioactiva inyectada. Esto permite cuantificar y comparar la bioactividad de la misma cantidad de hormona inyectada sola o en complejo con un anticuerpo.

60 La comparación de la bioactividad de FSH inyectada sola o en complejo con el anticuerpo o scFv permite medir el diferencial de respuesta y cuantificar así el efecto potenciador del anticuerpo o de su scFv.

65 *Efecto del anticuerpo CA5 y su scFv*

La figura 8A ilustra un ejemplo representativo del efecto del anticuerpo CA5 en la bioactividad de FSH ovina. Cada lote incluía 5 hembras. El lote tratado con el anticuerpo CA5 inyectado solo presentó el mismo peso promedio de los ovarios que las hembras del lote de control que recibieron solución salina fisiológica (25,6 mg y 29,15 mg, respectivamente). El lote que recibió terapia hormonal estándar (hCG 3,5 UI +oFSH 0,5 µg) dio un peso ovárico promedio de 85,7 mg significativamente más alto que el lote de control (p<0,05). El lote tratado con FSH ovina complejada previamente con el anticuerpo CA5 presentó un peso promedio de 198 mg, es decir, un aumento muy significativo de la bioactividad de FSH del 231 % en comparación con el lote que recibió el tratamiento hormonal estándar (p<0,0001). El efecto potenciador de CA5 en la actividad de FSH ovina, *in vivo*, se analizó en varios experimentos, cuyos resultados generales se presentan en la tabla 27. El aumento del peso medio de los ovarios, registrado en tres experimentos, después de estimulación con el complejo hormona/CA5 es altamente significativo (p<0,0001).

Tabla 27

lote	Media ± etm	eficaz	estadísticas
Suero Φ	25,6 ± 2,4	13	NS
CA5	29,15 ± 4,6	15	
hCG+oFSH	98,12 ± 6,37	13	***
hCG+oFSH+CA5	165,8 ± 11,54	12	p<0,0001

El efecto de CA5 en FSH humana también se analizó en un gran número durante varios experimentos. Los resultados se presentan en la tabla 28 a continuación.

Tabla 28

lote	Media ± etm	eficaz	estadísticas
hCG+hFSH	73,93 ± 1,525	77	***
hCG+hFSH+CA5	128,3 ± 4,323	80	p<0,0001

El aumento medio del peso ovárico registrado en mujeres tratadas con el complejo hFSH Gonal F/CA5 es 173 %: el peso medio del ovario pasa de 73,93 mg en mujeres que reciben tratamiento convencional a 128,3 mg en mujeres que fueron tratadas con el complejo hormona/CA5. Esta diferencia es altamente significativa (p<0,0001, ensayo t no emparejado).

Finalmente, el efecto potenciador se estudió en otras dos preparaciones de FSH humana (Puregon y Fostimon). Los resultados ilustrados en la figura 8B son un ejemplo representativo. Un aumento significativo del 153 % se registró en la actividad de FSH humana Puregon (p<0,05) y del 142 % en la actividad de FSH humana Fostimon (NS). Por comparación, El aumento de la actividad de FSH humana Gonal F fue del 179 % en este experimento (p<0,05).

En conclusión, el anticuerpo CA5 ejerce un efecto potenciador importante en la FSH ovina y un efecto potenciador igualmente significativo en la actividad de FSH humana, de diferentes preparaciones farmacéuticas.

El efecto de scFv CA5 se estudió en el mismo protocolo que el anticuerpo completo. La figura 9A ilustra los resultados obtenidos. El mismo efecto potenciador en la actividad de la FSH humana Gonal F se obtuvo con el anticuerpo completo o con su scFv significativamente (p <0.05).

Diferentes métodos de inyección de las mezclas hormona/scFv se evaluaron y se compararon con el protocolo convencional (inyección subcutánea). Por tanto, un bioensayo tuvo como objeto comparar una inyección de la mezcla hormonal por vía intraperitoneal con una inyección de la mezcla hormonal por vía intraperitoneal seguida de una segunda inyección retardada del scFv CA5 15 minutos después (figura 9A). En ese caso, un aumento del 146 % se obtuvo en las mujeres tratadas con el complejo hormona/scFv con un peso promedio de los ovarios que pasó de 61 mg (lote hCG+hFSH Gonal F) a 89 mg (lote scFv después hCG+hFSH Gonal F). Estos resultados son importantes porque demuestran que el efecto potenciador de scFv CA5 puede tener lugar *in vivo* incluso si scFv se inyecta solo, independientemente de la hormona y en diferido. El complejo hormona/scFv puede formarse *in vivo* en el animal tratado.

El efecto potenciador de scFv CA5 también se estudió en la actividad de FSH humanas Fostimon y Puregon (Figura 9B). Un aumento significativo de 140 % se obtuvo en la actividad de FSH Puregon (p<0,05) y un aumento no significativo de 126 % en la actividad de FSH Fostimon (NS).

Efecto del anticuerpo CH10 y su scFv

El efecto potenciador de CH10 en la actividad de FSH ovina, *in vivo*, se analizó durante varios experimentos, cuyos resultados globales se presentan en la Figura 10A. La comparación sobre tres experimentos de la respuesta entre las ratas tratadas, con la mezcla hCG+oFSH y las tratadas con el complejo hormona/CH10 destaca un aumento significativo del 145 % ($p < 0,01$). El pesomedio en los ovarios registrado fue $87,55 \pm 3,724$ mg en hembras tratadas con la mezcla hCG+oFSH ($n = 12$) a $126,6 \pm 9,6$ mg/100 g de peso corporal en ratas tratadas con el complejo hormona/CH10 ($n = 13$). No se observó ningún efecto del anticuerpo CH10 solo en la respuesta ovárica.

El efecto potenciador de CH10 en la FSH humana Gonal-F también se analizó en un gran número durante varios experimentos. Los resultados se presentan en la tabla 29 a continuación y en la Figura 10B.

Tabla 29

lote	Media \pm etm	eficaz	estadísticas
hCG+hFSH GONAL F	$73,93 \pm 1,525$	77	***
hCG+hFSH Gonal F+CA5	$128,3 \pm 4,323$	80	$p < 0,0001$

Un aumento del 170 % en el peso ovárico medio se registró en las mujeres tratadas con el complejo Gonal F/CH10. Esta diferencia es altamente significativa ($p < 0,0001$, ensayo t no emparejado).

También se buscó el efecto potenciador de CH10 en las FSH humanas Puregon y Fostimon (Figura 11A). Se obtuvo un aumento significativo de 145 % y 174 % respectivamente ($p < 0,05$). La figura 11B ilustra el efecto del complejo hFSH Gonal F/scFv CH10 en inyección convencional por vía subcutánea y en inyección retardada en el tiempo por vía intraperitoneal. Se obtuvo un aumento significativo del 160 % ($p < 0,05$) mediante inyección convencional y un aumento del 150 %, aunque no significativo, mediante inyecciones independientes de scFv CH10 y hFSH por vía intraperitoneal. Por tanto, el efecto potenciador de scFv CH10 puede tener lugar *in vivo*, ya sea inyectado por separado o preincubado con la hormona.

Efecto potenciador de los anticuerpos en la bioactividad de LHICG en Rata

Debido al alto coste de la LH ovina, estos ensayos biológicos se realizaron con hCG, fácilmente disponible, en una forma muy pura y económica. El efecto de los anticuerpos se estudió en dos preparaciones de hCG humana (gonadotropina coriónica humana) extraídas, una utilizada en reproducción humana en el contexto de tratamientos de procreación médicamente asistida: ENDO 5000 (laboratorio Schering-Plough) y la otra utilizada en medicina veterinaria: Chorulon (laboratorio MSD).

Según el protocolo de Scobey y colaboradores [13], la bioactividad de LH o hCG se cuantificó en relación con el aumento del peso de las vesículas seminales cuyo desarrollo es andrógeno-dependiente. El peso varía en proporción a la actividad de hCG y, por tanto, permite cuantificar y comparar la actividad biológica de la hormona inyectada sola o en complejo con el anticuerpo estudiado. El protocolo se realizó con ratones de 25 días inyectados por vía subcutánea, una vez al día durante cuatro días con 100 μ l de 1,5 UI de hCG o de una mezcla de 1,5 UI de hCG + 2 μ g de anticuerpo previamente incubado durante 20 minutos a 37 °C. El quinto día, las ratas se pesaron y después se sacrificaron. Sus vesículas seminales (VS) se extrajeron, se disecaron y se pesaron. El peso de las vesículas seminales se expresa en mg/100 g de peso corporal para poder comparar y combinar los resultados obtenidos con diferentes lotes. En cada experimento, cada una de las condiciones se probó en un lote de 5 ratas. El mismo experimento se repitió varias veces.

El efecto de CA5 en las dos preparaciones de hCG: Chorulon y Endo 5000 se ilustra en la figura 12. El histograma A es un ejemplo representativo de un bioensayo realizado en 6 lotes de 5 ratas. Un efecto potenciador muy significativo ($p < 0,0001$, ensayo de Krustal y Wallis) se obtuvo con el complejo hCG Chorulon/CA5 con un aumento del 196 % en el peso de las vesículas seminales en comparación con el lote tratado con hCG sola. También se obtuvo un efecto significativo con el complejo hCG ENDO 5000/CA5 con un aumento de peso del 193 % ($p < 0,01$). Se observa que el lote tratado con el anticuerpo CA5 solo no muestra ningún cambio en el peso de las vesículas seminales en comparación con los animales de control tratados con solución salina fisiológica: el anticuerpo solo no tiene efecto en el órgano diana a diferencia del complejo.

La suma de los resultados obtenidos durante las repeticiones de este bioensayo con las dos hCG confirma un efecto potenciador altamente significativo ($p < 0,0001$, Ensayo-t no emparejado) del complejo hormona/CA5:

- en un número de 53 y 56 animales respectivamente, el peso medio de las VS fue de 28,8 mg/100 g en ratas tratadas con hCG Chorulon y 46,7 mg/100 g en ratas tratadas con el complejo (aumento del 162 %) (Figura 12B)
- en un número de 26 y 30 animales respectivamente, el peso medio de las VS fue de 24,64 mg/100 g en ratas tratadas con hCG ENDO 5000 y 48,13 mg/100 g en ratas tratadas con el complejo (aumento del 195 %) (Figura 12C).

El anticuerpo CH10 también exhibió un efecto potenciador significativo en hCG Chorulon y hCG ENDO 5000, *in vivo*,

en rata.

La figura 13A ilustra un caso representativo de bioensayo realizado en 6 lotes de 5 ratas. Un efecto potenciador muy significativo ($p < 0,0001$, ensayo de Krustal y Wallis) se obtuvo con el complejo hCG Chorulon/CH10 con un aumento del 193 % en el peso de las vesículas seminales en comparación con el lote tratado con hCG sola. Un efecto significativo también se obtuvo en el lote tratado con el complejo hCG ENDO 5000/CH10 con un aumento de peso del 199 % ($p < 0,0001$). Se observa que el lote tratado con el anticuerpo CH10 solo no muestra ningún cambio en el peso de las vesículas seminales en comparación con los animales de control tratados con solución salina fisiológica. CH10 no complejado con la hormona, por tanto, no tiene un efecto específico en el órgano diana.

La compilación de los resultados obtenidos durante las repeticiones de este bioensayo con las dos hCG confirma un efecto potenciador altamente significativo ($p < 0,0001$, Ensayo-t no emparejado) del complejo hormona/CH10:

- en un número de 34 y 35 animales respectivamente, el peso medio de las VS fue de 29,6 mg/100 g en ratas tratadas con hCG Chorulon frente a 50,04 mg/100 g en ratas tratadas con el complejo (aumento del 169 %) (Figura 13B)
- en un número de 13 y 15 animales respectivamente, el peso medio de las VS fue de 24,64 mg/100 g en ratas tratadas con hCG ENDO 5000 y 51,39 mg/100 g en ratas tratadas con el complejo (aumento del 208 %) (Figura 13C).

EJEMPLO 4: MEDICIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO POTENCIADOR DE LOS LIGANDOS DE LA INVENCIÓN EN LA BIOACTIVIDAD DE LAS GONADOTROPINAS ENDÓGENAS EN OVEJA

Después de haber demostrado y caracterizado el efecto potenciador *in vivo*, de los anticuerpos monoclonales CA5 y CH10, en un roedor (animal de tamaño pequeño), el objeto era estudiar el efecto de cada anticuerpo en la actividad de FSH en un animal de producción, más grande: la oveja.

Para ello, se realizó un estudio en ovejas de Ile de France, en pubertad, todas de la misma edad, para evaluar el efecto potenciador de los anticuerpos en las hormonas propias de las ovejas tratadas (hormonas endógenas). El estudio de especificidad demostró una fuerte unión de los anticuerpos CA5 y CH10 para FSH ovina y una unión más variable para LH ovina. En este sentido, un tratamiento que comprende solo la inyección de un anticuerpo solo se desarrolló para evaluar su eficacia.

En los protocolos implementados en oveja, por tanto, cada anticuerpo se inyectó solo y no se incubó previamente con FSH exógena como se hizo en estudios en rata. Además, cada anticuerpo se inyectó en ovejas libres de cualquier estimulación previa del ovario: los animales no recibieron ningún tratamiento hormonal para estimular la ovulación con una gonadotropina antes de la inyección del anticuerpo.

El efecto potenciador de los anticuerpos anti-FSH CA5 y CH10 se evaluó durante los protocolos realizados en la temporada sexual completa (enero) o al final de la temporada sexual (finales de marzo). Todos los protocolos se realizaron en ovejas cuyo ciclo ovulatorio se sincronizó previamente mediante la instalación de una esponja vaginal impregnada con un progestágeno (45 mg de acetato de fluorogestona (FGA) - MSD) durante 14 días. El efecto potenciador se analizó comparando la respuesta ovulatoria (número de ovulaciones) y la colocación de uno o más cuerpos lúteos funcionales de buena calidad (amplitud de la secreción de progesterona) en ovejas control (lote de suero fisiológico), ovejas estimuladas con un tratamiento de FSH porcina (lote de FSH) y ovejas estimuladas con un anticuerpo solo (lote de anticuerpo).

En cada protocolo, una dosificación de la LH plasmáticas se realizó mediante el método ELISA para detectar y marcar el pico preovulatorio de LH. Para evaluar la respuesta ovulatoria, se realizó una observación endoscópica de los ovarios por laparoscopia, bajo anestesia, ocho días después de la extracción de la esponja vaginal, para contar la cantidad de cuerpos lúteos y observar su aspecto.

Para evaluar la funcionalidad y la calidad del cuerpo o cuerpos lúteos, un ensayo ELISA cuantitativo de progesterona se realizó a partir de muestras de sangre diarias del primer al 21^{er} día después de extraer la esponja.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism Versión 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

Anticuerpo CA5

El efecto potenciador del anticuerpo CA5 (IgG) se evaluó en dos protocolos (1 y 2) durante la temporada sexual y al final de la temporada sexual.

En el protocolo 1, realizado al final de la temporada sexual:

- el lote "anticuerpo CA5" (n = 6) recibió tres inyecciones de CA5 purificado por vía intramuscular: 2 mg 4 días antes

- de extraer la esponja, 1 mg antes de la extracción y 1 mg al extraer la esponja.
- el lote "control" (n = 5) recibió una inyección de solución salina fisiológica, por vía intramuscular, 24h antes de extraer la esponja
 - el lote "FSH" (n = 5) recibió una inyección intramuscular de 100 µg de FSH porcina (pFSH) 24h antes de extraer la esponja y 90 µg 12h antes de extraerla.

El análisis de la respuesta ovulatoria dio los resultados presentados en la tabla 30 a continuación.

Tabla 30

	Lote suero Φ	Lote FSH	Lote CA5 solo	Estadísticas
Número de ovejas por lote	5	5	6	
Número de ovejas que han ovulado por lote	2/5 (40 %)	2/5 (40 %)	2/6 (35 %)	NS
Número de cuerpos lúteos por oveja ovulada	1,5 ± 0,7	3 ± 2,8	1,5 ± 0,7	NS
Momento del pico de LH (horas después de la extracción)	72 ± 17	60 ± 0	78 ± 25	NS

El análisis estadístico se realizó mediante un ensayo exacto de Fisher.

En comparación con los lotes de control y FSH, Los resultados obtenidos en el lote CA5 no muestran efecto significativo en la respuesta ovulatoria. Ninguno de los parámetros medidos presentan tendencia.

El perfil de secreción de progesterona durante la fase lútea obtenida en los tres lotes, se ilustra en la figura 14. Para cada individuo, los valores de concentración de progesterona (ng/ml) se normalizaron por número de cuerpos lúteos. Cada curva representa la media de los valores de progesterona obtenida en las hembras de cada lote en un tiempo t.

Un efecto significativo del anticuerpo CA5 se observó en la intensidad de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y en el inicio de su establecimiento (Figura 14A). De hecho en la curva CA5 se observa, con respecto a las curvas de los lotes de FSH y suero Φ, un comienzo de la secreción de progesterona desde J4 seguido de un aumento significativo de la secreción que se mantiene durante toda la fase lútea hasta el final del ciclo. Los valores medios de progesterona en J10 son 1,38 ng/ml - 0,92 et 0,52 ng/ml respectivamente para los lotes CA5, FSH y suero Φ y de 2,58 - 1,7 y 1,18 ng/ml en J15. La comparación de las tres curvas se realizó mediante un ensayo t no paramétrico emparejado (ensayo de Wilcoxon). Por tanto, la curva del lote CA5 es más alta que la curva del lote FSH y significativamente diferente (p<0,01), lo mismo con la curva del lote de control (p<0,001). La curva del lote de FSH es más alta y significativamente diferente de la del lote de control (p<0,001).

Para cuantificar este aumento significativo y constante en el nivel de secreción de progesterona hasta el final del ciclo en ovejas en estimulación con CA5, se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) con el software GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se ilustran en la figura 14B y muestran que el AUC de la curva CA5 (23,61 unidades arbitrarias) tiende a ser mayor que el AUC de la curva de suero Φ (8 unidades) pero esta diferencia no es significativa. Asimismo, El AUC de la curva FSH (12 unidades) no es significativamente diferente de la curva de control.

En conclusión, la inyección de CA5 en ovejas da los mismos resultados que un tratamiento convencional con FSH en términos de inducción de ovulación, pero permite el establecimiento más rápido de la secreción de progesterona y el mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional más eficaz con un mayor nivel circulante de progesterona, garantizando un mejor éxito del desarrollo embrionario precoz y el mantenimiento de la gestación (disminución del riesgo de aborto).

En el protocolo 2, realizado en temporada sexual:

- el lote "anticuerpo CA5" (n = 7) recibió una única inyección intramuscular de 2 mg de anticuerpo CA5 24h antes de extraer la esponja.
- el lote "control" (n = 9) recibió una inyección de solución salina fisiológica, por vía intramuscular, 24h antes de extraer la esponja
- el lote "FSH" (n = 11) recibió una inyección intramuscular de 100 µg de FSH porcina (pFSH) 24h antes de extraer la esponja y 90 µg 12h antes de extraerla.

El análisis de la respuesta ovulatoria dio los resultados presentados en la tabla 31 a continuación. El análisis estadístico se realizó mediante un ensayo exacto de Fisher.

Tabla 31

	Lote suero Φ	Lote FSH	Lote CA5 solo	Estadísticas
Número de ovejas por lote	9	11	7	
Número de ovejas que han ovulado por lote	4/9 (44 %)	4/11 (36 %)	7/7 (100 %)	*** p<0,0001
Número de cuerpos lúteos por oveja del lote	0,67 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	1,5 \pm 0,4	NS, p=0,06
Número de cuerpos lúteos por oveja ovulada	1,5 \pm 0,3	3 \pm 1,4	1,5 \pm 0,4	NS
Momento del pico de LH (horas después de la extracción)	64 \pm 13	56 \pm 7	57 \pm 4,4	NS

En comparación con los lotes de control y FSH, Los resultados obtenidos en el lote CA5 muestran un efecto muy significativo del anticuerpo inyectado solo en la respuesta ovulatoria. En efecto, el 100 % de las hembras (7/7) que recibieron una inyección de 2 mg de anticuerpos ovularon frente al 44 % y 36 % respectivamente para el lote suero Φ y el lote FSH (p<0,0001, ensayo exacto de Fisher). El número de cuerpos lúteos obtenidos por hembra del número total en el lote es incluso superior en el lote "CA5" y casi significativamente (p = 0,06, ensayo t de Mann-Whitney): 1,5 cuerpos lúteos frente a 0,9 (FSH) y 0,67 (suero Φ) respectivamente. El número medio de cuerpos lúteos por hembra en ovulación no fue significativamente diferente entre los tres lotes.

El tiempo medio de inicio del pico LH no es significativamente diferente entre los tres lotes. A pesar de todo se observa una tendencia hacia una menor variabilidad en la llegada del pico LH (y, por tanto, del momento de la ovulación) en el lote CA5 en comparación con el lote FSH y especialmente el suero Φ .

El perfil de secreción de progesterona durante la fase lútea después de la ovulación, se ilustra en la figura 15A. Para cada individuo, los valores de concentración de progesterona (ng/ml) se normalizaron por número de cuerpos lúteos. Cada curva en la figura representa la media de los valores de progesterona obtenidos en las hembras de cada lote. Un efecto notable del anticuerpo CA5 se observó en la intensidad de la secreción de progesterona: se observó un aumento significativo y muy significativo en la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo a lo largo de la fase lútea en comparación con las curvas del lote FSH y del lote suero Φ . Los valores medios en J10 son 2,44 ng/ml, 1,3 y 0,62 ng/ml respectivamente para los lotes CA5, FSH y suero Φ , y 2,88 - 1,42, y 1,18 ng/ml en J15. La comparación de las tres curvas se realizó mediante un ensayo t no paramétrico emparejado (ensayo de Wilcoxon). La curva del lote CA5 es significativamente mayor y diferente de la curva del lote FSH (p<0,01), lo mismo con la curva del lote de control (p<0,001). La curva del lote FSH es significativamente diferente de la del lote de control (p<0,001).

Para cuantificar este aumento notable y constante en el nivel de secreción de progesterona por el cuerpo lúteo a lo largo de la fase lútea del ciclo en ovejas con estimulación de CA5, se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) con el software GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se ilustran en la figura 15B y muestran que el AUC de la curva CA5 (24,20 unidades) es significativamente mayor en un factor de 3 del AUC de la curva de suero Φ (8,1) (p<0,05, ensayo t no paramétrico de Mann-Whitney). Por el contrario, el AUC de la curva FSH no es significativamente diferente de la curva de control.

En conclusión, el uso del anticuerpo CA5 en forma de una inyección intramuscular única de 2 mg dio resultados significativamente mejores que un tratamiento convencional con FSH al permitir:

- 1- inducción de la ovulación en el 100 % de las hembras estimuladas
- 2- desarrollo de un cuerpo lúteo de mejor calidad con una secreción de progesterona mucho mayor que la observada después del tratamiento con FSH y un establecimiento muy rápido desde J4. Cabe señalar que el impacto de esta propiedad adicional de CA5 en comparación con el tratamiento con FSH es muy significativo. En efecto, la concentración plasmática de progesterona es un factor fundamental en el desarrollo embrionario, particularmente en sus primeras etapas.

El establecimiento más rápido de la secreción de progesterona y el mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional más eficaz con un mayor nivel circulante de progesterona es la garantía de un mejor éxito del desarrollo embrionario precoz y el mantenimiento de la gestación con una disminución del riesgo de aborto.

Todos los resultados indican que los anticuerpos potenciadores, particularmente CA5, inyectado *in vivo* en oveja es capaz de formar complejos con hormonas gonadotrópicas endógenas del animal y de potenciar la actividad biológica de las hormonas específicas del animal.

El efecto potenciador del anticuerpo CA5 en oveja es capaz de inducir una estimulación más fuerte del ovario que el tratamiento estándar con la hormona FSH: la inducción de las ovulaciones es del 100 % en la temporada sexual y en todos los casos un aumento significativo en la concentración circulante de progesterona, del 200 al 300 % se mantiene durante toda la fase lútea. Este efecto adicional es importante para reducir las tasas de fracaso del desarrollo embrionario dependiente de progesterona y los riesgos de aborto.

EJEMPLO 5: MEDICIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO POTENCIADOR DEL LIGANDO CA5 DE LA INVENCIÓN EN A BIOACTIVIDAD DE LAS GONADOTROPINAS ENDÓGENAS EN TERNERA

5 Después de haber demostrado y caracterizado el efecto potenciador del anticuerpo monoclonal CA5 *in vivo* en rata y oveja, el objeto era estudiar su efecto en la actividad de gonadotropinas endógenas en un animal más grande: la ternera. Para ello, un tratamiento que no comprende más que la inyección del anticuerpo solo se realizó en la ternera Prim 'Holstein para evaluar su eficacia. Estas terneras estaban libres de cualquier estimulación previa del ovario, los animales no habiendo recibido tratamiento hormonal para estimular la ovulación con una gonadotropina antes de la inyección del anticuerpo.

10 El protocolo destinado a evaluar el efecto potenciador del anticuerpo CA5 se realiza en terneras Prim'Holstein de 20 a 22 meses, cuyo ciclo ovulatorio se sincronizó previamente colocando un implante de progestágeno (3,3 mg de Norgestomet, Crestar® - MSD) durante 7 días. Una inyección de GnRH (0,004 mg de acetato de busarelina, Crestar® Pack - MSD) se realizó el día de la colocación del implante, seguido de una inyección de prostaglandinas 24 horas antes de la extracción del implante (Prosolvin® - Virbac).

Los animales se separaron en dos lotes:

- 20 - el lote "CA5" (n = 4) recibió dos inyecciones de 11 mg de anticuerpo CA5 purificado por vía intramuscular: las primeras 24 horas después de la colocación del implante y las segundas 24 horas antes de la extracción del implante de progestágeno.
- el lote "control" (n = 3) recibió dos inyecciones de solución salina fisiológica, por vía intramuscular, las primeras 24 horas después de la colocación del implante y las segundas 24 horas antes de la extracción del implante de progestágeno.

30 El efecto potenciador se analizó comparando la respuesta ovulatoria (ovulación o no) y el establecimiento de un cuerpo lúteo funcional de buena calidad (tamaño del cuerpo lúteo y amplitud de la secreción de progesterona) en terneras de control (lote solución salina fisiológica) y en terneras tratadas solo con el anticuerpo (lote CA5).

Un ensayo de LH y estradiol en plasma se realizó mediante el método ELISA para detectar y marcar el pico preovulatorio de LH, y para seguir la secreción de estradiol. Para evaluar la respuesta ovulatoria y el tamaño del cuerpo lúteo, se realizaron ecografías de ovario diariamente. Finalmente, para evaluar la funcionalidad y la calidad del cuerpo lúteo, se realizó un ensayo ELISA cuantitativo de progesterona a partir de muestras de sangre diarias desde el día de la colocación del implante el 21^{er} día después de la extracción del implante.

Las novillas se inseminaron y se realizó un diagnóstico de gestación por ecografía 35 días después de la inseminación.

40 Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism Versión 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

La respuesta ovulatoria se comparó primero en los dos lotes de terneras midiendo los niveles circulantes de estradiol. Los resultados presentados en la Figura 16A ilustran el perfil de secreción de estradiol en dos terneras representativas de cada lote. El pico de estradiol observado en J0 es de mayor amplitud en el tratamiento con una concentración de 9,2 pg/ml frente a 6,6 pg/ml en el control en J0 y de 10,5 pg/ml frente a 8,8 pg/ml en el control en J1,5 (no significativo). El promedio de los resultados de las terneras de cada lote se representa como un porcentaje de la concentración basal de estradiol medida en el momento de la colocación del implante (Figura 16B). Las mismas tendencias se encuentran con un pico de estradiol cuya amplitud tiende a ser mayor en el lote tratado con el anticuerpo CA5 en comparación con las terneras del lote de control: en la extracción del implante (J0) con 149 ± 16 % frente a 133 ± 7 % y, en J1,5 después de la extracción del implante, 161 ± 6 % frente a 144 ± 8 % (no significativo). El nivel de estradiol entre J3 y J8 indica en los dos lotes un segundo pico de secreción, más reducido, reflejando una segunda especie folicular. En el lote CA5, el aumento en la concentración de estradiol tiende a ser más precoz que en el grupo control: en J6 es 113 ± 3 % en terneras tratadas con CA5 frente a $104 \pm 0,5$ en los controles.

55 El análisis del área bajo la curva del pico de estradiol en los dos lotes de terneras (Figura 16C) también ilustra una tendencia, aunque no significativa, para obtener un pico de estradiol más alto en el lote tratado con CA5 (área de $129,5 \pm 20$ unidades) que en el lote de control (área de $97,5 \pm 18$ unidades).

60 En general, los resultados muestran una tendencia, aunque no significativa, a tener una mejor secreción de estradiol en terneras tratadas con el anticuerpo CA5, que puede reflejar una mejor calidad de la fase folicular.

Los resultados para el pico preovulatorio de LH se ilustran en la Figura 17. No muestran ninguna diferencia en comparación con el momento de aparición del pico de LH (Figura 17A): en el lote de control, el pico de LH ocurrió $44h \pm 8h$ después de la extracción del implante frente a $40,5h \pm 5,1h$ en el lote tratado con el anticuerpo CA5. La concentración máxima del pico de LH es $4,8 \pm 1,8$ ng/ml de LH en el grupo de control contra $9,8 \pm 1,2$ ng/ml en terneras tratadas con el anticuerpo CA5 (Figura 17B). La concentración máxima de LH durante el pico preovulatorio tiende a

ser mayor en el lote tratado con el anticuerpo, pero esta tendencia no es significativa. La misma tendencia se observa con respecto al área bajo la curva del pico preovulatorio de LH: es $64,5 \pm 5,8$ unidades arbitrarias en terneras de control frente a $98 \pm 4,8$ en terneras tratadas con el anticuerpo CA5 (Figura 17C). Sin embargo, esta tendencia hacia un pico de LH más alto en terneras tratadas con CA5 no es significativa.

El análisis ecográfico después de la ovulación cada que todas las terneras en los dos lotes tenían una mono-ovulación.

Después se analizó la calidad de la fase lútea midiendo regularmente el tamaño del cuerpo lúteo por ecografía para seguir su desarrollo. Los resultados ilustrados en la figura 18A indican que el lote de terneras tratadas con CA5 tienden a tener un cuerpo lúteo más grande (26 ± 2 mm de diámetro) que el lote de terneras de control (22 ± 1 mm de diámetro). Esta diferencia aún no es significativa.

La medición de la concentración plasmática de progesterona durante toda la fase lútea se muestra en la Figura 18B. Muestra una diferencia muy significativa entre los dos lotes ($p < 0,001$). El nivel de progesterona circulante se expresa como un porcentaje de la concentración basal medida al extraer el implante. En J9 después de la extracción, es 668 ± 85 % en el lote de control frente a 1266 ± 254 % en el lote tratado con el anticuerpo, un aumento de 1,9 veces en comparación con el lote de control. En J20 después de la extracción, es 646 ± 74 % en el lote de control frente a 1598 ± 327 % en el lote tratado con el anticuerpo, un aumento de 2,47 veces en comparación con el lote de control. Estos resultados reflejan una mejor calidad del cuerpo lúteo con una tendencia a tener un diámetro mayor y especialmente una mayor secreción de progesterona en terneras tratadas con el anticuerpo CA5. Cabe señalar que una mejor calidad funcional del cuerpo lúteo durante la fase lútea es primordial en el éxito del implante del embrión y su desarrollo precoz. Disminuye el riesgo de abortos precoces.

Los diagnósticos de gestación realizados 35 días después de la inseminación artificial indicaron que todas las terneras en cada uno de los lotes eran gestantes.

En conclusión, estos resultados muestran que las terneras tratadas con el anticuerpo CA5 tienden a tener una mejor respuesta estrogénica, aunque no son significativas durante la fase folicular y tienen una secreción significativamente mayor de progesterona durante la fase lútea.

EJEMPLO 6: MEDICIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO POTENCIADOR DEL LIGANDO CA5 DE LA INVENCIÓN EN LA BIOACTIVIDAD DE LAS GONADOTROPINAS ENDÓGENAS EN MONA.

Después de haber demostrado y caracterizado el efecto potenciador del anticuerpo monoclonal CA5 *in vivo* en rata, oveja y ternera, su efecto potenciador se estudió en una especie parecida a la humana: el mono Cinomolgo (*macaca fascicularis*). Para ello, se realizó un estudio en macacos en pubertad de al menos 36 meses de edad, para evaluar el efecto potenciador del anticuerpo en la FSH humana y en la hormona endógena del macaco tratado.

Para ello, se realizó un estudio en cuatro macacos pubescentes de al menos 36 meses de edad. El anticuerpo CA5 se inyectó 20 minutos después de una inyección de FSH exógena, es decir, solo. El primer día de la menstruación, los macacos recibieron una inyección de 1,5 mg de preparación de GnRH de liberación prolongada (Décapeptyl® L.P. 3 mg - IPSEN Pharma) por vía intramuscular. Quince días después, las cuatro monas recibieron un tratamiento diferente:

- animal tratado con 25 UI durante 8 días (lote "25UI X 8"): se realizó una inyección diaria de 25 UI de FSH humana (pluma precargada Gonal-f® - Merck Serono) por vía subcutánea, durante 8 días
- animal tratado con 25 UI un día (lote "25UI X 1"): una inyección única de 25 UI de FSH humana (pluma precargada Gonal-f® - Merck Serono) por vía subcutánea, se realizó el primer día de tratamiento
- animal tratado con CA5 + hFSH (lote "CA5+hFSH"): se realizó una inyección única de anticuerpo CA5 (80 µg) por vía subcutánea 20 minutos después de la inyección de 25 UI de FSH humana (pluma precargada Gonal-f® - Merck Serono), solo el primer día de tratamiento
- animal tratado con CA5 solo (lote "CA5"): una inyección única de anticuerpo CA5 solo (88,5 µg), se realizó por vía subcutánea sin inyección de hormona exógena, solo el primer día de tratamiento.

El efecto potenciador se analizó comparando el crecimiento folicular inducido por el tratamiento. Para ello, se realizaron ecografías de ovario transabdominales cada 48 horas para contar los folículos y medir su superficie (expresada en mm²).

El efecto obtenido con una inyección del anticuerpo CA5 realizada 20 minutos después de la inyección de 25 UI de hFSH (lote "CA5+hFSH") se comparó con el de una inyección de 25 UI de hFSH (lote "25UI X1") y la de 8 inyecciones diarias de 25 UI de hFSH (lote "25UI X8"). Los resultados ilustrados en la Figura 19A muestran que al 9º día después de comenzar el tratamiento con FSH, la mona tratada con una sola inyección de 25 UI de hFSH no presenta ningún folículo estimulado (área bajo la curva, nula). Por el contrario, la mona tratada solo una vez con la mezcla "CA5+hFSH" el primer día de tratamiento, tenía 8 folículos en crecimiento con un área folicular total de 37 mm² igual a la medida en Ramón que recibió 8 inyecciones de hFSH ("25UI X8") que fue de 35 mm² con 11 folículos estimulados. Por tanto, una sola inyección del complejo CA5+hFSH 25 UI estimuló los ovarios con la misma eficacia que 8 inyecciones de 25 UI

de hFSH. Este resultado destaca un efecto potenciador de CA5, *in vivo* en la mona, dando como resultado una estimulación folicular. En efecto, la semivida de FSH es inferior a 1 hora, los efectos observados con CA5 no pueden atribuirse únicamente a un efecto en la hFSH inyectada, sino que también reflejan un efecto en la FSH endógena de la mona.

5 Después se estudió el efecto de una inyección del anticuerpo CA5 inyectado solo ("CA5") y se comparó con el de una inyección de 25 UI de hFSH ("25UI X1") y el de 3 inyecciones diarias de 25 UI de hFSH (lote "25UI X3"). Un efecto estimulante del anticuerpo inyectado solo se observó de forma óptima solo 3 días después de su inyección. Los resultados ilustrados en la Figura 19B muestran que el 3er día de tratamiento la mona que recibió una sola inyección de anticuerpo solo ("CA5") presenta estimulación ovárica con 5 folículos en crecimiento que representan un área de 32,6 mm². Comparativamente, la mona que ha recibido tres inyecciones de 25 UI de hFSH ("25UI X3") presentaba solo una estimulación muy débil con 1 solo folículo en crecimiento cuya área era 1,6 mm². Después del 3er día de tratamiento, la estimulación ovárica inducida por CA5 solo no se mantuvo y los folículos estimulados desaparecieron. Para mantener el efecto de estimulación en los ovarios probablemente habría sido necesaria una inyección adicional de anticuerpo o un ajuste de la dosis inyectada en J1. Sin embargo, este resultado indica que el anticuerpo CA5 inyectado solo fue capaz de formar complejo con la FSH endógena de la mona y potenciar su actividad biológica lo suficiente como para inducir un inicio de estimulación ovárica.

20 EJEMPLO 7: PREDICCIÓN DEL EPÍTOPO RECONOCIDO POR LOS LIGANDOS CA5 Y CH10 DE LA INVENCIÓN, Y PREDICCIÓN DE SU PARÁTOPO.

25 El epítipo respectivo de los anticuerpos CA5 y CH10 se determinó en hormonas gonadotrópicas de diferentes especies utilizando un algoritmo de acoplamiento de proteínas basado en un modelo de la estructura de proteínas mediante un diagrama de Voronoï y una optimización mediante diferentes métodos de aprendizaje evolutivo de las funciones de puntuación que permiten diferenciar conformaciones nativas y no nativas (Bernauer et al., *Bioinformatics* 2007, 5:555) [14], (Bernauer et al., *Bioinformatics* 2008, 24:652) [15], (Bourquard et al., *PLoS One* 2011, 6:e18541) [16] y (Bourquard et al., *Sci. Reports* 2015, 5: 10760) [17].

30 Cada anticuerpo se acopló con FSH humana (hFSH), LH humana (hLH), CG humana (hCG), FSH ovina (oFSH) y LH ovina (oLH), FSH porcina (pFSH) y LH porcina (pLH). Las estructuras cristalográficas de hFSH y hCG están disponibles en Protein Data Bank (PDB): 4MQW y 1QFW respectivamente. Se utilizó la estructura de la FSH humana complejada con el dominio extracelular del receptor de la FSH humana (Fan y Hendrickson, *Nature* 2005, 433:269) [18]. Para otras hormonas (hLH, oFSH, oLH, pFSH y pLH), se produjeron modelos de homología y después se usaron para acoplamiento.

35 1/ Epítipo y parátipo del ligando CA5.

40 Como la estructura 3D del anticuerpo CA5 no está disponible, el estudio se realizó a partir de secuencias de los fragmentos monovalentes VH y VL de CA5. Para ello, se realizaron modelos por homología de las partes variables. Los modelos de VH y VL se realizaron por separado, a partir de diferentes estructuras, y su orientación relativa se determinó a partir de la estructura que sirvió de soporte para el modelado de VH. Las estructuras utilizadas para los modelos de homología están disponibles en Protein Data Bank (PDB): 3OKK para VH de CA5 y 3MBX para VL de CA5.

45 Los resultados del acoplamiento se ilustran en la Figura 20. Parece que el ligando CA5 se acopla de manera similar a las siete hormonas diana. El epítipo se define por varias regiones ubicadas de manera discontinua en la subunidad beta esencialmente y por dos restos en la subunidad alfa de las gonadotropinas estudiadas. El epítipo también se relaciona con diez restos del ectodominio del receptor de FSH humano. El epítipo del ligando CA5 es, por tanto, muy conformacional: está formado por varias regiones secuenciales de la hormona y de una secuencia del receptor, que están espacialmente cerca en la conformación nativa de la hormona y el receptor activado.

50 Los diferentes restos de la hormona y del receptor implicados en la interfaz con el ligando CA5 están rodeados por rectángulos en la figura 20. Los cinco restos observados en gris en la subunidad beta de hFSH están implicados en la interacción principal y tienen un papel importante en el reconocimiento de anticuerpos/antígenos: es la serina en la posición 22 (Ser22), glicina en la posición 65 (Gly65), cisteína en la posición 66 (Cys66), arginina 97 (Arg97) y Glicina 98 (Gly98) en la subunidad beta de hFSH. Los restos Gly65 y Cys66 están presentes en la secuencia de todas las otras hormonas diana.

60 El ligando CA5 también reconoce los restos 97 a 100 y 102 a 109 en el extremo C-terminal de la subunidad beta FSH. Esta región que constituye una zona de seguridad, desempeña un papel importante en la estabilización de la asociación del dímero alfa/beta de la hormona. Por tanto, parece que la unión del ligando CA5 a la hormona asegura el cierre de la zona de seguridad y, por tanto, contribuye a la estabilidad del dímero, indispensable para la bioactividad de la hormona (solo el dímero está activo).

65 El anticuerpo CA5 se dirige principalmente contra la subunidad beta de hFSH.

Solo dos restos de la subunidad alfa están implicados en la interfaz: son los restos de arginina en la posición 35 (Arg35) y el ácido glutámico en la posición 56 (Glu56) espacialmente cerca de la hormona nativa. Su función es fijar el extremo C-terminal de la subunidad beta para mantener la "zona de seguridad" alrededor de la subunidad alfa. Estos dos restos están constantemente presentes y reconocidos en todas las hormonas diana. Desempeñan un papel muy importante en la bioactividad de la hormona.

Otra característica del epítipo del anticuerpo CA5 es la participación de los Restos His2-His3-Arg4-Ile5, His7, Leu14, Gln16-Glu17, Lys19 y Arg35 de la región N-terminal del receptor de FSH humano, en la interfaz reconocida por el anticuerpo CA5.

Tabla 32: Epítipo y parátipo del ligando CA5. Los restos sombreados están implicados en la zona de interacción principal.

Regiones epitópicas en FSH humana		Parátipo del anticuerpo CA5
αFSH	Arg35	VL : CDR1
	Glu56	VL : CDR1
βFSH	Thr9	VH : CDR2
	Arg18 Phe19 Cys20 Ile21 Ser22 Ile23 Asn24	VH : CDR1-CDR2-CDR3
	Arg62 Val63 Pro64 Gly65 Cys66 Ala67	VH : CDR1-CDR2-FR
	Arg97 Gly98 Leu99 Gly100 - Ser102 Tyr103 Cys104 Ser105 Phe106 Gly107 Glu108 Met109	VH : CDR3 VL : CDR1-CDR2-CDR3-FR
Regiones epitópicas en el receptor humano de FSH		
His2 His3 Arg4 Ile5 - His7		VL : CDR2-FR
Leu14 - Gln16 Glu17 - Lys19		VL : CDR1-CDR2-FR
Arg35		VL : CDR1

La tabla 32, ilustra las diferentes regiones que constituyen el epítipo del ligando CA5 y las que constituyen su parátipo.

Las dos cadenas VH y VL están implicadas en el reconocimiento de la hormona, por sus tres CDR y ciertos restos de sus marcos.

Los cinco restos implicados en la interacción principal son reconocidos por Asn53 de CDR2 de VH, los restos Asp31, Phe27 y Thr28 de CDR1 de VH y los restos Ser33 y Asn34 de CDR1 de VL.

Solo la cadena VL está implicada en el reconocimiento del ectodominio del receptor de FSH, particularmente los restos Gln35 y Lys36 de su CDR1, el resto Ser58 de su CDR2 y varios restos del marco 3.

En conclusión, el ligando CA5 reconoce un epítipo conformacional que implica la subunidad alfa, la subunidad beta de hFSH y su extremo C-terminal formando la zona de seguridad, así como el ectodominio del receptor de FSH. La cadena VL es la única implicada en la interacción con el ectodominio receptor. Las dos cadenas VH y VL están implicadas en la interacción con las subunidades hormonales. El epítipo conformacional del ligando CA5 permite, por una parte, estabilizar la asociación del dímero de la hormona y, por otra parte, estabilizar la unión de la hormona a su receptor. Estos dos mecanismos son complementarios y fundamentales para lograr una mejor interacción de la hormona en su receptor y obtener así una mejor eficacia. Por tanto podrían constituir las bases mecanicistas del efecto potenciador del ligando CA5 en las gonadotropinas.

2/ Epítipo y parátipo del ligando CH10.

Como la estructura 3D del anticuerpo CH10 no está disponible, el estudio se realizó a partir de secuencias de los fragmentos monovalentes VH y VL de CH10. Para ello, se realizaron modelos por homología de las partes variables. Los modelos de VH y VL se realizaron por separado, a partir de diferentes estructuras, y su orientación relativa se determinó a partir de la estructura que sirvió de soporte para el modelado de VH. Las estructuras utilizadas para los modelos de homología están disponibles en Protein Data Bank (PDB): 4QNP para VH de CH10 y 3D85 para VL de CH10.

Los resultados del acoplamiento se ilustran en la Figura 21. Parece que el ligando CH10 se acopla de manera similar a las siete hormonas diana. El epítipo se define por varias regiones ubicadas de forma discontinua en las subunidades alfa y beta de FSH y también se relaciona con ocho restos del extremo N-terminal del receptor FSH humano. El epítipo del ligando CH10 es, por tanto, conformacional: consta de varias regiones secuenciales de la hormona y de una secuencia en el extremo N-terminal del receptor de FSH. Todas estas regiones se encuentran espacialmente próximas

en la conformación nativa de la hormona y el receptor activado.

Los diferentes restos de la hormona y del receptor implicados en la interfaz con el ligando CH10 están rodeados por rectángulos en la figura 21. Los cuatro restos observados en gris en la subunidad alfa (Asp6-Cys7-Pro8 y Glu56 en hFSH) y los dos restos observados en gris en la subunidad beta (Ser2-Cys3 en hSFH) están implicados en la interacción principal y tienen un papel importante en el reconocimiento de anticuerpos/antígenos. Entre los otros restos implicados en la interfaz, aquellos ubicados en la parte C-terminal de la subunidad beta están implicados en la región llamada "zona de seguridad" cuyo papel es estabilizar la asociación del dímero alfa/beta de la hormona. Por tanto, parece que la unión del ligando CH10 a la hormona asegura el cierre de la zona de seguridad y, por tanto, contribuye a la estabilidad del dímero, indispensable para la bioactividad de la hormona. Además, el ligando CH10 reconoce de manera importante el resto Glu56 en la subunidad alfa, que participa en la fijación de la "zona de seguridad" a la subunidad alfa.

Otra característica del epítipo del anticuerpo CH10 es la participación de los restos Cys1-His2, His7-Cys8-Ser9, Lys14, Gln16 y Arg35 de la región N-terminal del receptor de FSH humano en la interfaz reconocida por el anticuerpo.

Tabla 33: Epítipo y parátipo del ligando CH10. Los restos sombreados están implicados en la zona de interacción principal.

Regiones epitópicas en FSH humana		Parátipo del anticuerpo CH10
αFSH	Gln5 Asp6 Cys7 Pro8 Glu9	VH : FR
	Phe33 – Arg35	VL : CDR3
	Glu56	VL : CDR3
βFSH	Ser2 Cys3 Glu4 Leu5 Thr6 Asn7 Ile8 Thr9	VH : CDR2-CDR3-FR VL : CDR1
	Ser22 - Asn24 - - Trp27 - Ala29 Gly30 Tyr31	VH : CDR2-CDR3-FR VL : CDR3-FR
	Leu99 Gly100 Pro101 Ser102 Tyr103 - - - Gly107 Glu108 Met109	VH : CDR3 VL : CDR1-CDR2-CDR3-FR
Regiones epitópicas en el receptor humano de FSH		
	Cys1 His2 - - - - His7 Cys8 Ser9	VL : FR
	Leu14 - Gln16	VL : CDR1-FR
	Arg35	VL : CDR1-FR

La tabla 33, ilustra las diferentes regiones que constituyen el epítipo del ligando CH10 y las que constituyen su parátipo.

CDR2 y CDR3 de la cadena VH y CDR1, CDL2 y CDR3 de la cadena VL están implicadas en el reconocimiento de la hormona, así como ciertos restos del marco 3 de la cadena VH y de los marcos 1 y 2 de la cadena VL.

Los restos implicados en la interacción principal son reconocidos por los restos Thr60 de CDR2, Tyr61-Tyr62-Asp64-Lys67 del marco 3 de la cadena VH y los restos His92 y Ser93 de CDR3 de la cadena VL.

Solo la cadena VL está implicada en la interacción en el ectodominio del receptor por su CDR1 y sus marcos 1 y 2.

EJEMPLO 8: CONSTRUCCIÓN, PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES FRAGMENTOS DEL LIGANDO CA5 DE LA INVENCION.

Se construyeron diferentes fragmentos del anticuerpo CA5 para evaluar su capacidad de potenciar la actividad biológica de FSH ovina y humana (Gonalf® Merck Serono). Se produjo un fragmento que comprende solo la cadena variable ligera llamada "VL CA5", un fragmento que comprende la cadena variable pesada sola llamada "VH CA5" y un "scFv CA5 invertido" construido en un orden VL-VH invertido con respecto a la secuencia VH-VL (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) del scFv CA5 descrito en el Ejemplo 1, párrafo 4 de la presente invención.

1/ Construcción y producción de fragmentos de anticuerpo

ATG:Biosynthetics GmbH (Alemania) sintetizó los genes sintéticos que codifican los fragmentos VL CA5 y scFv CA5 invertidos derivados del anticuerpo CA5. El CA5 scFv invertido consiste en la fusión VL CA5 del scfv CA5-conector-VH CA5 del CA5 scFv (SEQ ID NO: 19). Cada gen sintético se consigue mediante la fusión de la secuencia del plásmido pSW1 [7], entre el sitio HindIII y el final de la secuencia que codifica la proteína PeIB y la secuencia de la

proteína de interés a sintetizar (SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 48), flanqueada por el sitio de restricción XhoI. Las secuencias se insertan entre los sitios HindIII y XhoI del plásmido pSW1. Los codones se optimizaron para expresión en *E. coli*.

- 5 El plásmido de expresión pSW1-VH CA5 se obtuvo por inserción, en el plásmido pSW1 [7] en los sitios PstI-XhoI, del fragmento resultante de la digestión por estas mismas enzimas del plásmido pSW1 scFv CA5 invertido.

Después de control por secuenciación de la calidad de las construcciones, los plásmidos pSW1-VL CA5, pSW1-VH CA5 y pSW1 scFv CA5 invertido se transformaron por choque térmico en bacterias HB2151 (T53040, Interchim, Francia) hechas competentes [8].

10

Tabla 34: Secuencias nucleotídica y peptídica del VL CA5.

VL CA5	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 44	GATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTGGCGGTGTCAG TCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGTAAAAGCTCGCAGAGCCTG CTGTACTCATCGAACCAGAAAAATTACCTGGCATGGTATCAACA GAAGCCGGGTGTCAGTCGCCGAAACTGCTGATCTACTGGGCCTCA ACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTACTGGCAGCGGCA GCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTCGGTGAAGGCCGA AGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTACTATAGCTACCCTC GTACCTTCGGCGGCGGCACGAACTTGAGATTAACATCACCAT CACCATCACTAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 45	DIQMTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAV YYCQQYYSPRTFGGGTKLEIKHHHHH*

Tabla 35: Secuencias nucleotídica y peptídica del VH CA5

VH CA5	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 46	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCGGCGGCCTGGTACAACCT GGTGGCTCACTGCGCCTGAGCTGCGCAACCAGCGGTTTTACCT TTAGCGATTTCTACATGGAATGGGTTCCGCAACCGCCGGGTAAG CGTCTGGAATGGATCGCGGCGAGCCGTAACAAGGCGAAAGATT ATACCACTGAATATAGCGCGTCGGTGAAAGGTCGCTTCATTGTC TCGCGCGATACCAGCCAGTCGATTCTGTATCTGCAAATGAATGC CCTGCGTGCCGAAGACACGGCCATCTACTTCTGTGCGCGTGAT GCACGCTTTGCCTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTTA GCGCCCATCACCATCACCATCACTAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 47	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKR LEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAE DTAIYFCARDARFAYWGQGLTVSAHHHHH*

15

Tabla 36: Secuencias nucleotídica y peptídica del scFv CA5 invertido

scFv CA5 invertido	
Secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 48	GATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTGGCGGTGTCAG TCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGTAAAAGCTCGCAGAGCCTG CTGTAICTCATCGAACCAGAAAAATTACCTGGCATGGTATCAACA GAAGCCGGGTCAGTCGCCGAAACTGCTGATCTACTGGGCCTCA ACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTACTGGCAGCGGCA GCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTCGGTGAAGGCCGA AGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTACTATAGCTACCCTC GTACCTTCGGCGGCGGCACGAACTTGAGATTAAGGTGGTGG CGGTTACAGGTGGTGGCGGTAGCGGTGGCGGTGGCTCACAGGT GCAGCTGCAGCAGTCAGGCGGCGGCCTGGTACAACCTGGTGG CTCACTGCGCCTGAGCTGCGCAACCAGCGGTTTTACCTTTAGCG ATTTCTACATGGAATGGGTTCCGCAACCGCCGGGTAAGCGTCTG GAATGGATCGCGGCGAGCCGTAACAAGGCGAAAGATTATACCA CTGAATATAGCGCGTCCGTGAAAGGTCGCTTCATTGTCTCGCGC GATACCAGCCAGTCGATTCTGTATCTGCAAATGAATGCCCTGCG TGCCGAAGACACGGCCATCTACTTCTGTGCGCGTGATGCACGC TTTGCCTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTTAGCGCCC ATCACCATCACCATCACTAA
Secuencia peptídica SEQ ID NO: 49	DIQMTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAV YYCQQYYSPRTFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQ SGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYF CARDARFAYWGQGLTVSAHHHHH*

La producción de los fragmentos se realizó según el método descrito previamente en el ejemplo 1 de la presente invención.

5

2/ Medición in vitro del efecto de los fragmentos VL CA5, VH CA5 y scFv CA5 invertido en la bioactividad de FSH

El efecto *in vitro* de los fragmentos "VL CA5", "VH CA5" y "scFv CA5 invertido" en la bioactividad de FSH ovina y humana se estudió con la línea celular HEK293 transfectada de manera estable con el receptor de FSH humano y el sistema Glosensor® según el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 2 de la presente invención. Los fragmentos "VL CA5" y "VH CA5", solos o como una mezcla, se ensayaron a 40 nM cada uno. El CA5 scFv invertido se probó a una concentración de 80 nM al igual que CA5 scFv de referencia. La FSH ovina y la FSH humana (Gonal f®) se probaron a 0,1 nM.

10

15

20

La figura 22 ilustra las curvas de cinética de producción de AMPc expresadas en unidades de luminiscencia relativas en función del tiempo (en minutos) obtenidas en presencia de 0,1 nM de FSH ovina (oFSH) sola o en complejo con los diferentes fragmentos de CA5. Se compararon cuatro condiciones con oFSH solo: el complejo oFSH+ VL CA5 (Figura 22A), el complejo oFSH+VH CA5 (Figura 22B), el complejo oFSH+scFv CA5 invertido (Figura 22C) y finalmente el complejo oFSH con una mezcla equimolar de 40 nM de VL CA5 y 40 nM de VH CA5 (Figura 22D). Se observa que en todos los casos, se obtiene un efecto potenciador muy significativo ($p < 0,001$), que aumentan la respuesta celular a 30 mn de estimulación en un factor de 2,1 a 2,4 veces en comparación con la respuesta inducida por la FSH sola. Estos resultados indican que los fragmentos VH y VL solos son capaces de ejercer un efecto potenciador en la bioactividad de oFSH de la misma manera que todo el scFv. Validan la participación de las dos cadenas variables en

el efecto potenciador, descrito en el modelo del ejemplo 7 de la presente invención. La mezcla de VH CA5 + VL CA5, así como CA5 scFv invertido (VL-VH) ejerce el mismo efecto potenciador que CA5 scFv original (VH-VL).

El mismo estudio se realizó con FSH humana (Gonal f®) a la concentración de 0,1 nM, sola o complejada con los diferentes fragmentos de CA5. Se compararon cuatro condiciones con hFSH sola: el complejo hFSH+ VL CA5 (Figura 22E), el complejo hFSH+VH CA5 (Figura 22F), el complejo hFSH+scFv CA5 invertido (Figura 22G) y finalmente el complejo hFSH con una mezcla equimolar de 40 nM de VL CA5 y 40 nM de VH CA5 (Figura 22H). Se observa que el fragmento "VL CA5" a la concentración de 40 nM complejado con hFSH, no ejerce un efecto potenciador significativo a diferencia del fragmento "VH CA5" que amplifica muy significativamente ($p < 0,001$) la respuesta celular máxima en un 225 % de una manera comparable a scFv CA5 (aumento del 275 %) en comparación con estimulación con hFSH sola (Figuras 22E y 22F). Asimismo, el scFv CA5 invertido "VL-VH CA5" (Figura 22G) y la mezcla de las dos cadenas VH + VL (Figura 22H) complejadas con hFSH inducen un aumento significativo ($p < 0,001$) en la respuesta celular en 225 % y 230 % respectivamente, cercana a la obtenida con scFv CA5 complejado con hFSH (aumento entre 250 y 260 %). Estos resultados indican que la mezcla VL CA5 + VH CA5 así como scFv CA5 invertido complejado con hFSH inducen un efecto potenciador significativo cercano al inducido por scFv CA5 de referencia. Solo el fragmento VH ejerce un efecto potenciador significativo sobre hFSH en este ensayo a diferencia de VL CA5.

3/ Medición *in vivo* del efecto potenciador de los fragmentos VL CA5, VH CA5 y scFv CA5 invertido en la bioactividad de FSH en rata

Después de su caracterización *in vitro*, el efecto potenciador de diferentes fragmentos de CA5 se caracterizó *in vivo*, en rata hembra para caracterizar su efecto en la bioactividad de FSH.

Para medir la bioactividad de FSH, el protocolo utilizado fue el del ensayo biológico de Steelman y Pohley (Steeleman SL, Pohley FM. *Endocrinology*, 53:604-616. 1953) [12] como se describe en el ejemplo 3 de la presente invención.

La figura 23 ilustra el efecto de los diferentes fragmentos en la bioactividad de hFSH. Cada lote contenía 5 ratas. El lote tratado con hFSH complejada con scFv CA5 invertido dio un peso medio de los ovarios de 210 mg, idéntico al del lote tratado con scFv CA5 complejado con hFSH (200 mg), es decir, un aumento del 190 % en comparación con el lote que recibió tratamiento hormonal solo ($p < 0,05$). Los lotes tratados con los fragmentos VL CA5 o VH CA5 complejados con hFSH tenían un peso medio de los ovarios de 240 mg y 230 mg respectivamente, un aumento de 218 % y 209 % respectivamente en comparación con el lote que recibió tratamiento hormonal solo ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente).

Estos resultados demuestran significativamente que el orden de construcción de scFv (VL-VH frente a VH-VL) complejado con hFSH no afecta a las propiedades potenciadoras de scFv en la bioactividad de FSH. Estos resultados también demuestran muy significativamente que las cadenas VH CA5 o VL CA5 complejadas con la hormona también son capaces de potenciar la bioactividad de la hormona. Esto traduce la implicación respectiva de las dos cadenas en este efecto según lo predicho por el modelo de interacción descrito en el ejemplo 7 de la presente invención.

Listados de referencias

- 1- Patente EP 1518863
- 2- Solicitud internacional WO 2012/066519
- 3- Brochet et al., *Nucl. Acids Res.*, 36: W503-508, 2008
- 4- Giudicelli et al., *Cold Spring Harb Protoc.*, 2011(6): 695-715, 2011
- 5- Giudicelli et al., *Nucl. Acids Res.*, 33: D256-261, 2005
- 6- Corpet, *Nucl. Acids Res.*, 16(22): 10881-10890, 1988
- 7- Ward et al. *Nature*, 341: 544-546, 1989
- 8- Li et al., *Afr. J. Biotechnol.*, 9(50): 8549-8554, 2010
- 9- Chopineau et al., *Mol. Cell Endocrinol.*, 92(2): 229-239, 1993
- 10- Wehbi et al., *Endocrinology*, 151(6): 2788-2799, 2010
- 11- Reverchon et al., *Human Reprod.*, 27(6): 1790-1800, 2012
- 12- Steelman SL, Pohley FM., *Endocrinology*, 53:604-616, 1953
- 13- Scobey et al, *Reprod. Biol. Endocr.* 3:61, 2005
- 14- Bernauer et al., *Bioinformatics*, 5:555, 2007
- 15- Bernauer et al., *Bioinformatics*, 24:652, 2008
- 16- Bourquard et al., *PLoS One*, 6:e18541, 2011
- 17- Bourquard et al., *Sci. Reports*, 5:10760, 2015
- 18- Fan y Hendrickson, *Nature*, 433:269, 2005.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> REPROPHARM
KARA, Elodie
DECOURTYE, Jérémie

ES 2 797 752 T3

CASTERET, Sophie
MAUREL, Marie-Christine

5 <120> LIGANDOS QUE POTENCIAN LA BIOACTIVIDAD DE LAS GONADOTROFINAS

<130> BNT213486PC01

<150> FR1558078

<151> 10-09-2014

10

<160> 70

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> VH CA5

<400> 1

gagggtgaagc tgggtggaatc tggaggaggc ttggtacagc ctggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcaa cttctggggtt caccttcagt gatttctaca tggagtgggt ccgccagcct 120

ccaggggaaga gactggagtg gattgctgca agtagaaaca aagctaagga ttatacaaca 180

gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggtc atcgtctcca gagacacttc ccaaagcatc 240

ctctaccttc agatgaatgc cctgagagct gaggacactg ccatttattt ctgtgcaaga 300

25

gatgcaaggt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CA5

35

<400> 2

ES 2 797 752 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Ala Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

5 <210> 3
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VL CA5

<400> 3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaagattact 60
 atgagctgca agtccagtca gaggcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 cctcggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa 339

15 <210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> VL CA5

<400> 4

ES 2 797 752 T3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 5
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH CH10
 <400> 5

gaggtgcagc ttgttgagtc tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctctggatt caccttcaat acctacgcca tgaactgggt cgcaggct 120

ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaaca 180

tattatgccg attcagtgaa agacaggttc accatctcca gagatgattc acaaagcatg 240

ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgaga 300

caggattact acggtagtag ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

15 tcctca 366

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH CH10

25 <400> 6

ES 2 797 752 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Lys	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	50	55	60	
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Gln	Ser	Met	65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	85	90	95	
Tyr	Cys	Val	Arg	Gln	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	115	120								

5

<210> 7
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> VL CH10

15

<400> 7

gacattgtga	tgactcagtc	tccagccacc	ctgtctgtga	ctccaggaga	tagagtctct	60
ctttcctgca	gggccagcca	gagtattagc	gactacttac	actggtatca	acaaaaatca	120
catgagtctc	caaggcttct	catcaaatat	gcttcccaat	ccatctctgg	gatcccctcc	180
aggttcagtg	gcagtggatc	agggtcagat	ttcactctca	gatatcaacag	tgtggaacct	240
gaagatgttg	gagtgatta	ctgtcaaaaat	ggtcacagct	ttccgtacac	gttcggaggg	300
gggaccaagc	tggaataaaa	a				321

20

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> VL CH10
 <400> 8

ES 2 797 752 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH-CDR1 CA5
 <400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Tyr
 1 5

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

20 <220>
 <223> VH-CDR2 CA5
 <400> 10

Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr
 1 5 10

25 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> VH-CDR3 CA5
 35 <400> 11

ES 2 797 752 T3

		Ala	Arg	Asp	Ala	Arg	Phe	Ala	Tyr				
		1				5							
5		<210> 12 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
10		<220> <223> VL-CDR1 CA5 <400> 12											
		Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr
		1				5					10		
15		<210> 13 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
20		<220> <223> VL-CDR3 CA5 <400> 13											
25		<210> 14 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
30		<220> <223> VH-CDR1 CH10 <400> 14											
35		Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr			
		1				5							
40		<210> 15 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
45		<220> <223> VH-CDR2 CH10 <400> 15											
50		Ile	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr		
		1				5					10		
55		<210> 16 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
		<220> <223> VH-CDR3 CH10											

ES 2 797 752 T3

<400> 16

Val Arg Gln Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> VL-CDR1 CH10

<400> 17

Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

15 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR3 CH10

25 <400> 18

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 19
<211> 771
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> scFv CA5

<400> 19

ES 2 797 752 T3

caggtgcagc tgcagcagtc aggcggcggc ctggtacaac ctggtggctc actgcgcctg 60
 agctgcgcaa ccagcggttt taccttttagc gatttctaca tggaatgggt tcgccaaccg 120
 ccgggtaagc gtctggaatg gatcgcggcg agccgtaaca aggcgaaaga ttataccact 180
 gaatatagcg cgtcggtgaa aggtcgcttc attgtctcgc gcgataccag ccagtcgatt 240
 ctgtatctgc aaatgaatgc cctgcgtgoc gaagacacgg ccatctactt ctgtgcgcgt 300
 gatgcacgct ttgcctattg gggccaaggc accctggtga ccgtagcgc cggtggtggc 360
 ggttcaggty gtggcggtag cgggtggcggg ggctcagata ttcagatgac ccagaccccc 420
 tcaagcctgg cgggtgtcagt cggcgaagag attactatga gctgtaaaag ctcgcagagc 480
 ctgctgtact catcgaacca gaaaaattac ctggcatggt atcaacagaa gccgggtcag 540
 tcgccgaaac tgctgatcta ctgggcctca acccgtgaga gcggcgtacc ggatcgcttt 600
 actggcagcg gcagcggcac ggactttacg ctgacgatta gctcggtgaa ggccgaagac 660
 ctggcggttt attattgcca acagtactat agctaccctc gtaccttcgg cggcggcacg 720
 aaactcgaga ttaaacaatca ccatcaccat cactaactcg agatcaagta a 771

5 <210> 20
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> scFv CA5

<400> 20

ES 2 797 752 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Ala Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ala
130 135 140

Val Ser Val Gly Glu Glu Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
145 150 155 160

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

ES 2 797 752 T3

	180		185		190														
	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp			
			195					200					205						
	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr			
		210					215					220							
	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr			
	225					230					235					240			
	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	His	His	His	His	His	His								
					245						250								

5 <210> 21
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> scFv CH10

<400> 21

```

caggtgcagc tgcagcaatc aggcggcggc ctggtccaac cgaaaggtag cctgaaactg      60
tcgtgcgccg ccagcggctt tacgttcaac acttacgcga tgaattgggt gcgtcaggcg      120
cctggtaaag gcctggaatg ggtggcacgc atccgttcaa aaagcaacaa ttacgcgacg      180
tattatgcag acagcgtaaa agatcgcttt accatcagcc gtgatgattc acagtcaatg      240
ctgtacctgc aatgaataa cctgaaaact gaagacactg cgatgtatta ttgtgttcgc      300
caggactatt acggtagctc gtatttcgat tactggggcc aaggcaccac cctgacggtg      360
agctcgggtg gcggtggctc aggtggtggt ggtagcggcg gtggcggtag cgatatccag      420
atgaccagca ccccggaac cctgagcggt acccctgggt accgcgtttc gctgagctgc      480
cgtgcctcgc agagcatttc ggactatctg cactgggtatc agcaaaaatc acacgaatca      540
ccgcgtctgc tgattaagta cgccagccaa tcgattagcg gtattccgag ccgcttttcg      600
ggctcggggt cgggctcggg ttttaccctg tcaattaata gcgtagagcc ggaagatgta      660
ggcgtctact attgtcagaa cggccattca ttcccgtaca cgtttggcgg cggcaccaag      720
ctcagagatta agcatcacca tcatcaccat taactcgaga tcaagtaa      768
  
```

15 <210> 22
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> scFv CH10

ES 2 797 752 T3

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Gln Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile
180 185 190

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe
195 200 205

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys His His His His His His

ES 2 797 752 T3

	245	250
5	<210> 23 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> VHRev1	
	<400> 23 cgggatcctc tagaggtcca actgcaggag tcagg	35
15	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> VHFor	
	<400> 24 caggggccag tggatagac	19
25	<210> 25 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> MKRev5	
35	<400> 25 gacattgtga tgaccagtc t	21
40	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> MKC5For	
45	<400> 26 ggatacagtt ggtgcagcat c	21
50	<210> 27 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CA5VH_Fw	
55	<400> 27 cactttaca tggatccag tg	22
60	<210> 28 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> CA5VH_Rev	

ES 2 797 752 T3

	<400> 28 gtttctactt gcagcaatcc act	23
5	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> CA5VL_Fw	
15	<220> <221> misc_feature <222> (3)..(3) <223> W = A o T	
20	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(10) <223> R = G o A	
25	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> Y = T o C	
30	<400> 29 gawtcacagr cccaggtyc	19
35	<210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> CA5VL_Rev	
45	<400> 30 cccagtaaat cagcagttta gga	23
50	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> MuCFor	
60	<400> 31 ggggaagaca ttggaagg	20
65	<210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> MKRev2	
60	<400> 32 gatattgtga tgacgcaggc t	21
65	<210> 33 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> MKRev3
 5 <400> 33
 gatattgtga taaccag 18
 <210> 34
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MKRev4
 15 <400> 34
 gacattgtgc tgaccaatc t 21
 <210> 35
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MKRev6
 25 <400> 35
 gatattgtgc taactcagtc t 21
 <210> 36
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MKRev8
 35 <400> 36
 gacatccagc tgactcagtc t 21
 <210> 37
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MKC5for
 45 <400> 37
 ggatacagtt ggtgcagcat c 21
 <210> 38
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH10VH_Fw
 60 <400> 38
 atgggtgtgg ggctgaagtg 20
 <210> 39
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 797 752 T3

<220>
 <223> CH10VH_Rev
 5 <400> 39
 cagttcatgg cgtaggtatt ga 22
 <210> 40
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH10VL_Fw
 15 <400> 40
 ttctggaytt cagcctccag 20
 <210> 41
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH10VL_Rev
 25 <400> 41
 gattggaag catattgat gag 23
 <210> 42
 <211> 14
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Conector
 <400> 42
 40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento VL de scFv
 50 <400> 43
 Leu Glu Ile Lys His His His His His Leu Glu Ile Lys Val Asp
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> VL CA5
 60 <400> 44

ES 2 797 752 T3

gatattcaga tgaccagac cccgtcaagc ctggcgggtgt cagtcggcga agagattact 60
 atgagctgta aaagctcgca gagcctgctg tactcatcga accagaaaaa ttacctggca 120
 tggatcaac agaagccggg tcagtcgccg aaactgctga tctactgggc ctcaaccctg 180
 gagagcggcg taccggatcg ctttactggc agcggcagcg gcacggactt tacgctgacg 240
 attagctcgg tgaaggccga agacctggcg gtttattatt gccaacagta ctatagctac 300
 cctcgtacct tcggcggcgg cacgaaactt gagattaaac atcaccatca ccatcactaa 360

5 <210> 45
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VL CA5

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys His His His His His His
 115

15 <210> 46
 <211> 372
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH CA5

25 <400> 46

ES 2 797 752 T3

```

caggtgcagc tgcagcagtc agggggcggc ctggtacaac ctggtggctc actgcgctg      60
agctgcgcaa ccagcggttt taccttttagc gatttctaca tggaatgggt tcgccaaccg      120
ccgggtaagc gtctggaatg gatcgcgggc agccgtaaca aggcgaaaga ttataccact      180
gaatatagcg cgtcggtgaa aggtcgcttc attgtctcgc gcgataccag ccagtcgatt      240
ctgtatctgc aaatgaatgc cctgcgtgcc gaagacacgg ccatctactt ctgtgcgctg      300
gatgcacgct ttgcctattg gggccaaggc accctggtga ccgttagcgc ccatcaccat      360
caccatcact aa                                                                372

```

5 <210> 47
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH CA5

<400> 47

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                               5                               10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
                               20                               25                               30

Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
                               35                               40                               45

Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50                               55                               60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile
65                               70                               75                               80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
                               85                               90                               95

Phe Cys Ala Arg Asp Ala Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                               100                              105                              110

Val Thr Val Ser Ala His His His His His His
115                               120

```

15 <210> 48
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

ES 2 797 752 T3

<220>

<223> ScFv CA5 invertido

<400> 48

5

```

gatattcaga tgacctcagac cccgtcaagc ctggcgggtgt cagtcggcga agagattact      60
atgagctgta aaagctcgca gaggcctgctg tactcatcga accagaaaaa ttacctggca      120
tggtatcaac agaagccggg tcagtcgccg aaactgctga tctactgggc ctcaaccctg      180
gagagcggcg taccggatcg ctttactggc agcggcagcg gcacggactt tacgctgacg      240
attagctcgg tgaaggccga agacctggcg gtttattatt gccaacagta ctatagctac      300
cctcgtacct tcggcggcgg cacgaaactt gagattaaag gtggtggcgg ttcaggtggt      360
ggcggtagcg gtggcgggtgg ctcacaggtg cagctgcagc agtcaggcgg cggcctggta      420
caacctggtg gctcactgcg cctgagctgc gcaaccagcg gttttacctt tagcgatttc      480
tacatggaat gggttcgcca accgccgggt aagcgtctgg aatggatcgc ggcgagccgt      540
aacaaggcga aagattatac cactgaatat agcgcgtcgg tgaaaggtcg cttcattgtc      600
tcgcgcgata ccagccagtc gattctgtat ctgcaaatga atgccctgcg tgccgaagac      660
acggccatct acttctgtgc gcgtgatgca cgctttgcct attggggcca aggcaccctg      720
gtgaccgtta gcgcccata ccatcacat cactaa      756

```

<210> 49

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ScFv CA5 invertido

<400> 49

15

ES 2 797 752 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Glu Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 130 135 140
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
 145 150 155 160
 Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 180 185 190
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

ES 2 797 752 T3

210

215

220

Phe Cys Ala Arg Asp Ala Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ala His His His His His His
 245 250

5 <210> 50
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad alfa hFSH, hCG y hLH

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = Leu o Phe

<400> 50

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

Xaa 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

20 <210> 51
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad alfa oLH y oFSH

30 <400> 51

ES 2 797 752 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> 52
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad alfa pLH y pFSH

10

<400> 52

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

15

<210> 53
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

ES 2 797 752 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta hFSH

5 <400> 53

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
 20 25 30
 Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
 35 40 45
 Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
 50 55 60
 Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
 65 70 75 80
 Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
 85 90 95
 Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
 100 105 110

10 <210> 54
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta hCG

<400> 54

Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr
 20 25 30
 Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Gln Gly Val
 35 40 45
 Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg Asp Val Arg Phe

20

ES 2 797 752 T3

50

55

60

Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asn Pro Val Val
65 70 75 80

Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu Cys Arg Arg Ser
85 90 95

Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp Asp
100 105 110

Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
115 120 125

Pro Ser Pro Ser
130

<210> 55
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<220>
<221> misc_feature
<223> subunidad beta hLH

10

<400> 55

Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Arg Pro Trp Cys His Pro Ile Asn Ala
1 5 10 15

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

Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val Leu Gln
35 40 45

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

Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asp Pro
65 70 75 80

Val Val Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Gly Pro Cys Arg
85 90 95

Arg Ser Thr Ser Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys
100 105 110

15

ES 2 797 752 T3

Asp His Pro Gln Leu Ser Gly Leu Leu Phe Leu
 115 120

5 <210> 56
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta oLH
 <400> 56

Ser Arg Gly Pro Leu Arg Pro Leu Cys Gln Pro Ile Asn Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Lys Glu Ala Cys Pro Val Cys Ile Thr Phe Thr Thr Ser
 20 25 30

Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Leu Ser Met Lys Arg Val Leu Pro Val Ile
 35 40 45

Leu Pro Pro Met Pro Gln Arg Val Cys Thr Tyr His Glu Leu Arg Phe
 50 55 60

Ala Ser Val Arg Leu Pro Gly Cys Pro Pro Gly Val Asp Pro Met Val
 65 70 75 80

Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys His Cys Gly Pro Cys Arg Leu Ser
 85 90 95

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

Pro Pro Leu Pro Asp Ile Leu Phe Leu
 115 120

15 <210> 57
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta pLH

25 <400> 57

Ser Arg Gly Pro Leu Arg Pro Leu Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu
 1 5 10 15

ES 2 797 752 T3

Ala Ala Glu Asn Glu Ala Cys Pro Val Cys Ile Thr Phe Thr Thr Ser
 20 25 30

Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Ser Met Val Arg Val Leu Pro Ala Ala
 35 40 45

Leu Pro Pro Val Pro Gln Pro Val Cys Thr Tyr Arg Glu Leu Ser Phe
 50 55 60

Ala Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Val
 65 70 75 80

Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys His Cys Gly Pro Cys Arg Leu Ser
 85 90 95

Ser Ser Asp Cys Gly Gly Pro Arg Ala Gln Pro Leu Ala Cys Asp Arg
 100 105 110

Pro Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu
 115 120

<210> 58
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta oFSH

10

<400> 58

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 797 752 T3

Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Ser Asp Ile Arg Glu
 100 105 110

5 <210> 59
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta pFSH

<400> 59

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

Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Ser Glu Met Lys Glu
 100 105

15 <210> 60
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Región N-terminal del receptor de hFSH

25 <400> 60

Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys Gln
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu Pro Arg Asn Ala Ile

ES 2 797 752 T3

20

25

30

Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Gln Lys Gly Ala
 35 40 45

Phe

5 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Región epitópica de CA5 en betaFSH
 <400> 61

Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn
 1 5

15 <210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Región epitópica de CA5 en betaFSH
 <400> 62

Arg Val Pro Gly Cys Ala
 1 5

25 <210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región epitópica de CA5 en betaFSH
 35 <400> 63

Arg Gly Leu Gly Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met
 1 5 10

40 <210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Región epitópica de CA5 en el receptor de hFSH
 <400> 64

His His Arg Ile His
 1 5

50 <210> 65
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 797 752 T3

<220>
<223> Región epitópica de CA5 en el receptor de hFSH

5 <400> 65

Leu Gln Glu Lys
1

10 <210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Región epitópica de CH10 en alfaFSH

<400> 66

Gln Asp Cys Pro Glu
1 5

20 <210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Región epitópica de CH10 en betaFSH

<400> 67

30 Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr
1 5

35 <210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Región epitópica de CH10 en betaFSH

<400> 68

Ser Asn Trp Ala Gly Tyr
1 5

45 <210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Región epitópica de CH10 en betaFSH

<400> 69

55 Leu Gly Pro Ser Tyr Gly Glu Met
1 5

<210> 70
<211> 5
<212> PRT

ES 2 797 752 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región epitópica de CH10 en el receptor de hFSH

5

<400> 70

Cys	His	His	Cys	Ser
1				5

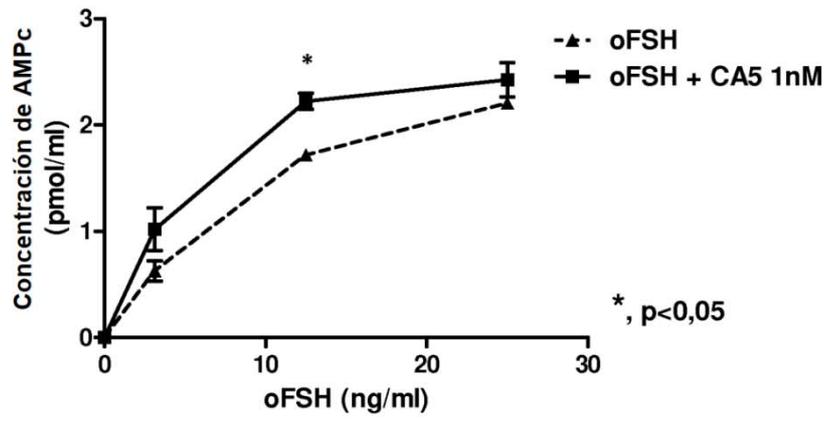
REIVINDICACIONES

- 5 1. Ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que dicho ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:
- el dominio variable de la cadena pesada contiene las siguientes CDR:
- 10 - VH-CDR1, definida por la secuencia GFTFSDFY (SEQ ID NO: 9);
 - VH-CDR2, definida por la secuencia SRNKAKDYTT (SEQ ID NO: 10);
 - VH-CDR3, definida por la secuencia ARDARFAY (SEQ ID NO: 11); y
- el dominio variable de la cadena ligera contiene las siguientes CDR:
- 15 - VL-CDR1, definida por la secuencia QSLLYSSNQKNY (SEQ ID NO: 12);
 - VL-CDR2, definida por la secuencia WAS;
 - VL-CDR3, definida por la secuencia QQYYSPRT (SEQ ID NO: 13).
- 20 2. Ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que dicho ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:
- el dominio variable de la cadena pesada contiene la secuencia SEQ ID NO: 2 o 47; y/o
 - el dominio variable de la cadena ligera contiene la secuencia SEQ ID NO: 4 o 45.
- 25 3. Ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que dicho ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:
- 30 el dominio variable de la cadena pesada contiene las siguientes CDR:
- VH-CDR1, definida por la secuencia GFTFNTYA (SEQ ID NO: 14);
 - VH-CDR2, definida por la secuencia IRSKSNNYAT (SEQ ID NO: 15);
 - VH-CDR3, definida por la secuencia VRQDYGGSSYFDY (SEQ ID NO: 16); y
- 35 el dominio variable de la cadena ligera contiene las siguientes CDR:
- VL-CDR1, definida por la secuencia QSISDY (SEQ ID NO: 17);
 - VL-CDR2, definida por la secuencia YAS;
 - VL-CDR3, definida por la secuencia QNGHSFPYT (SEQ ID NO: 18).
- 40 4. Ligando de la hormona foliculoestimulante (FSH) que potencia la bioactividad de FSH, hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG), caracterizado por que dicho ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo y por que:
- 45 - el dominio variable de la cadena pesada contiene la secuencia SEQ ID NO: 6; y/o
 - el dominio variable de la cadena ligera contiene la secuencia SEQ ID NO: 8.
- 50 5. Ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el ligando se elige del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos.
- 55 6. Ligando según la reivindicación 1, caracterizado por que el ligando es el anticuerpo monoclonal CA5 producido por el hibridoma CNCM I-4801.
7. Ligando según la reivindicación 3, caracterizado por que el ligando es el anticuerpo monoclonal CH10 producido por el hibridoma CNCM I-4802.
- 60 8. Ligando según la reivindicación 5, caracterizado por que la secuencia peptídica del scFv es la secuencia SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22.
9. Ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como un medicamento.
- 65 10. Complejo ligando-gonadotropina elegido entre:
 un complejo de un ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con FSH o un péptido activo de la misma;

un complejo de un ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con LH u hormona gonadotropina coriónica (CG) o un péptido activo de las mismas.

- 5 11. Complejo según la reivindicación 10, para su uso como un medicamento.
12. Ligando para uso según la reivindicación 9 o complejo para uso según la reivindicación 11, en donde dicho medicamento está destinado a inducir la ovulación o una poliovulación en un mamífero hembra.
- 10 13. Ligando para uso según la reivindicación 9 o complejo para uso según la reivindicación 11, en donde dicho medicamento está destinado a aumentar el nivel de progesterona endógena circulante en un mamífero hembra.
14. Composición farmacéutica destinada a su uso para la inducción de la ovulación o de una poliovulación en un mamífero hembra, caracterizada por que comprende un ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y/o un complejo según la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 14, caracterizada por que comprende además una FSH, una LH y/o una CG.
- 20 16. Ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o complejo según la reivindicación 10, para uso en el tratamiento y/o prevención de infertilidad o hipofertilidad en un mamífero.
17. Ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o complejo según la reivindicación 10, para uso para estimular la procreación en un mamífero hembra sano.

A



B

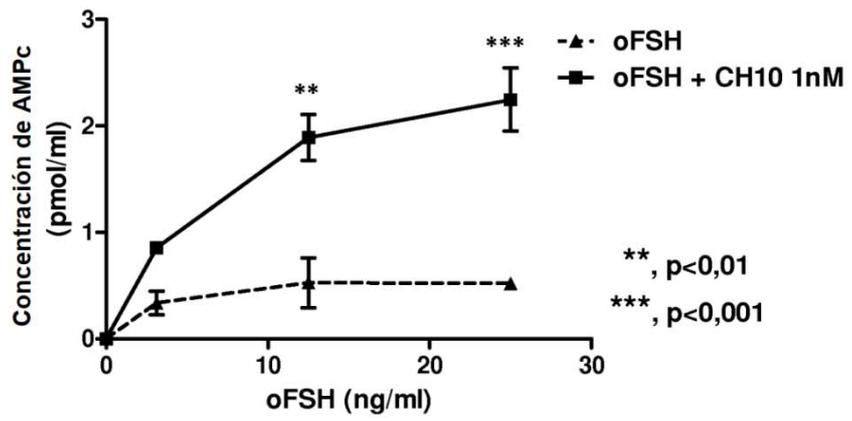


FIGURA 1

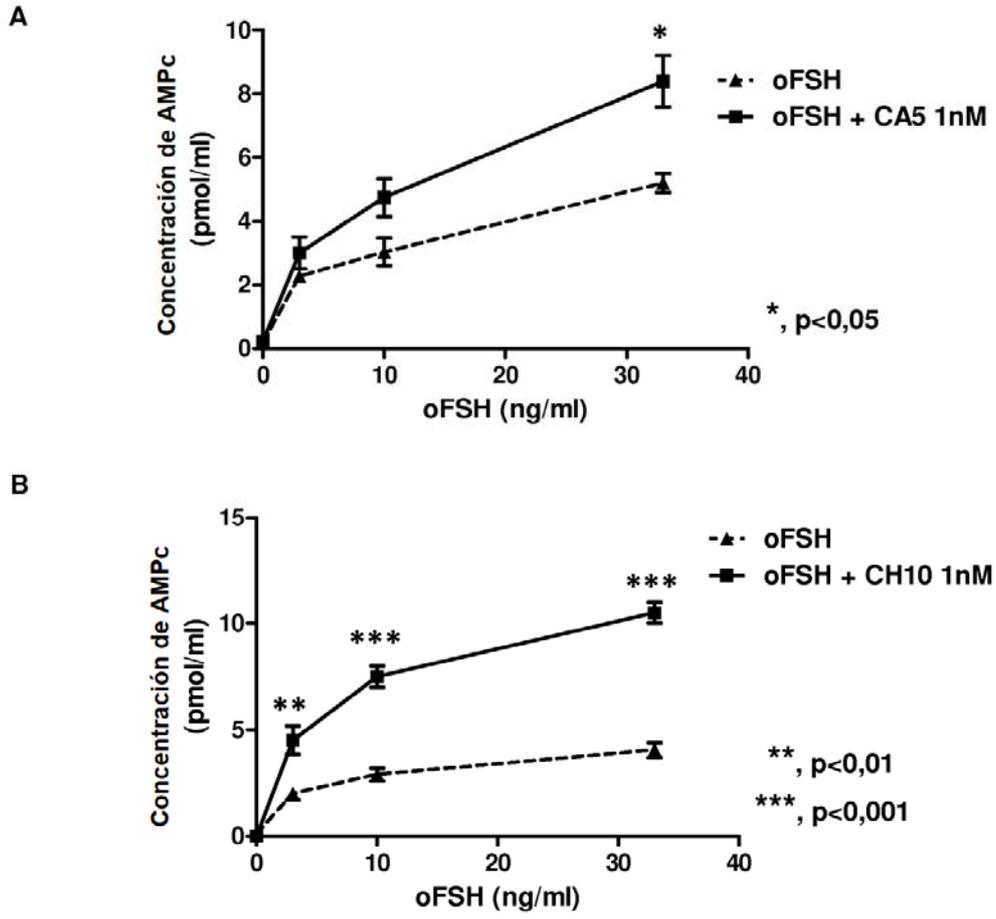
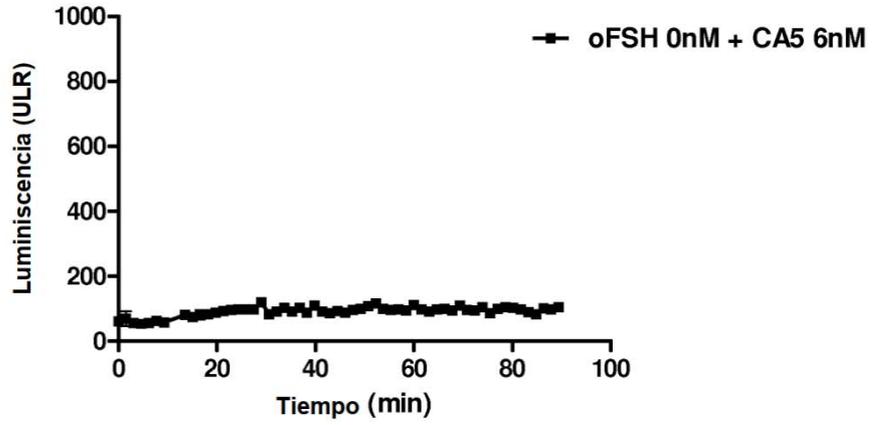
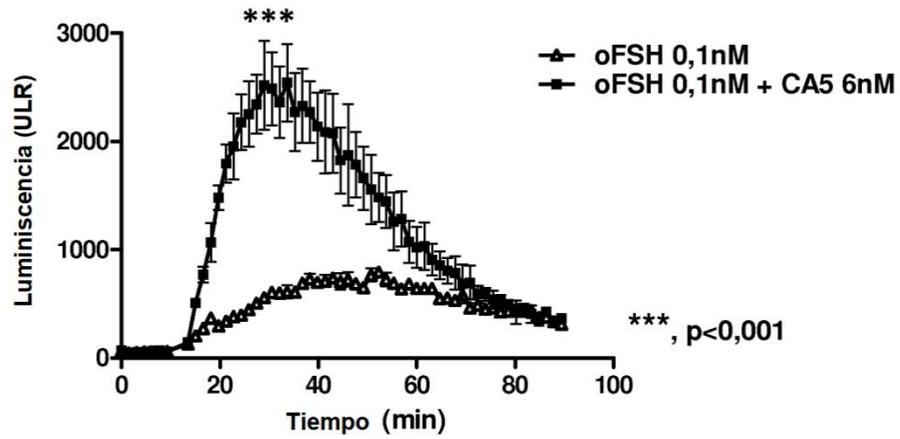


FIGURA 2

A



B



C

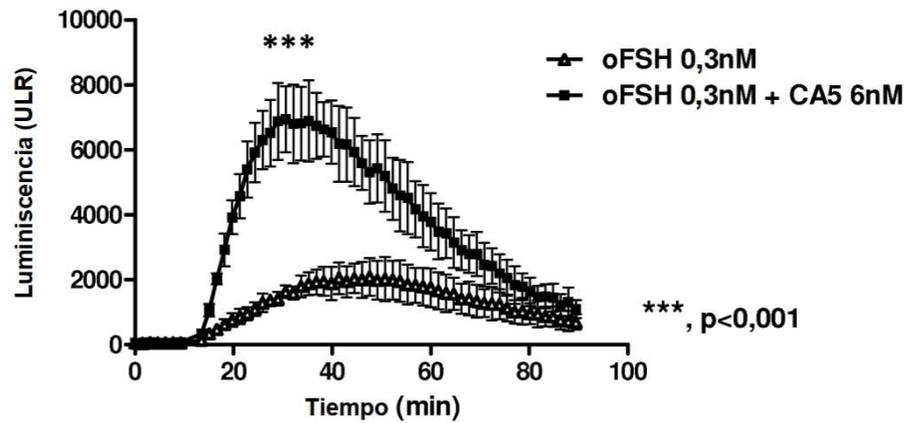
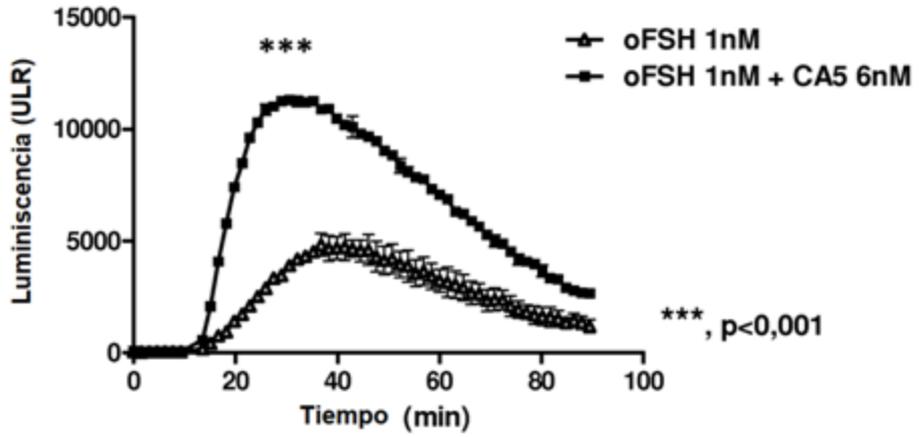
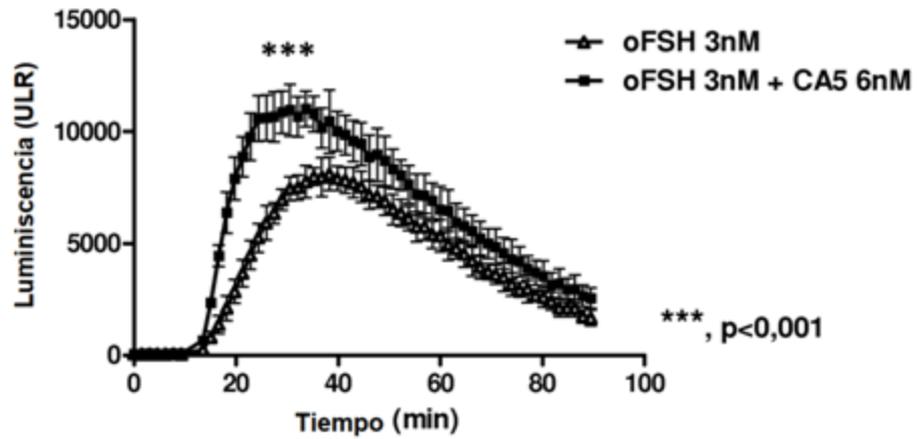


FIGURA 3

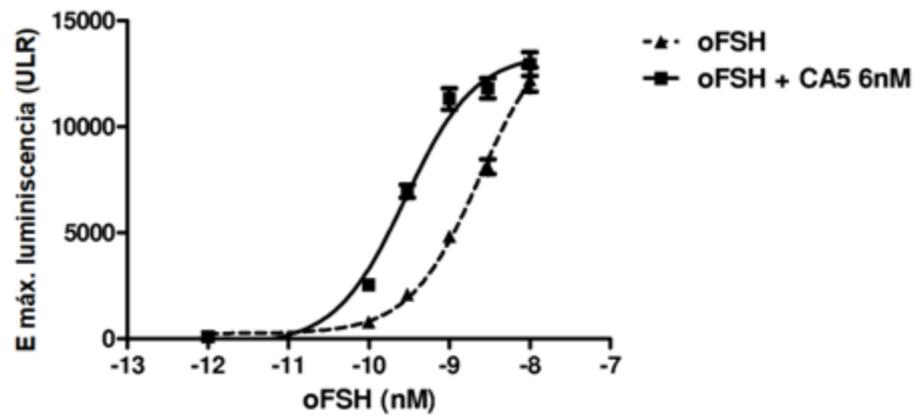
D



E



F



	oFSH	oFSH + CA5 6nM
LogCE50	-8,626	-9,547
CE50	2,365e-009	2,836e-010

FIGURA 3 (final)

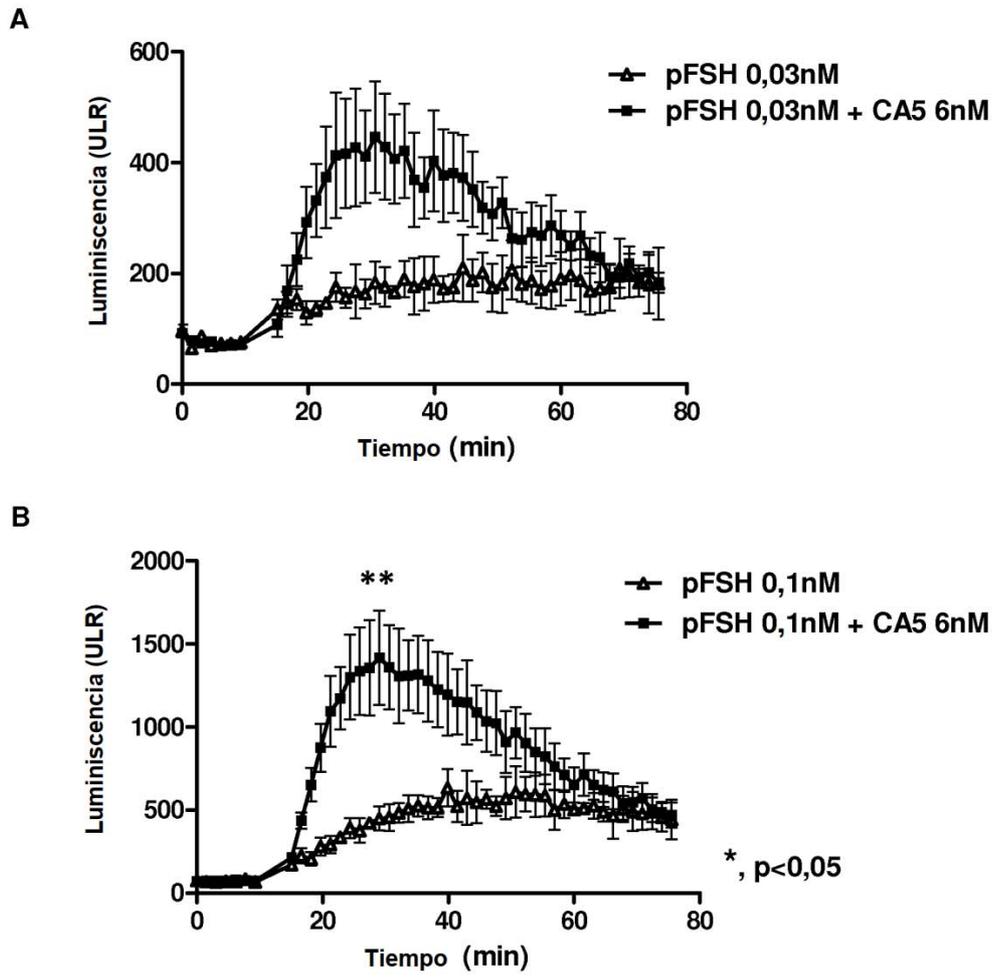


FIGURA 4

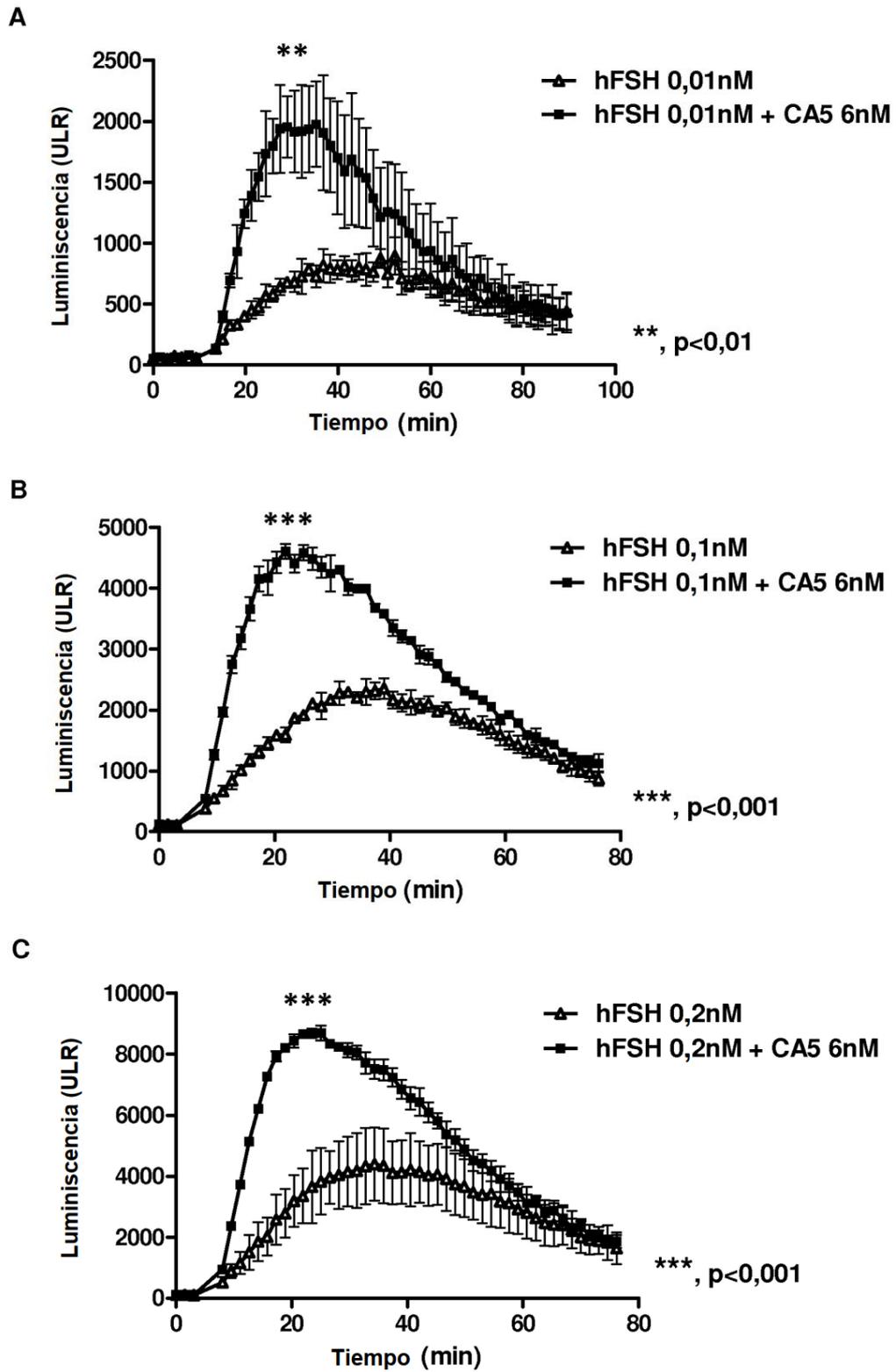
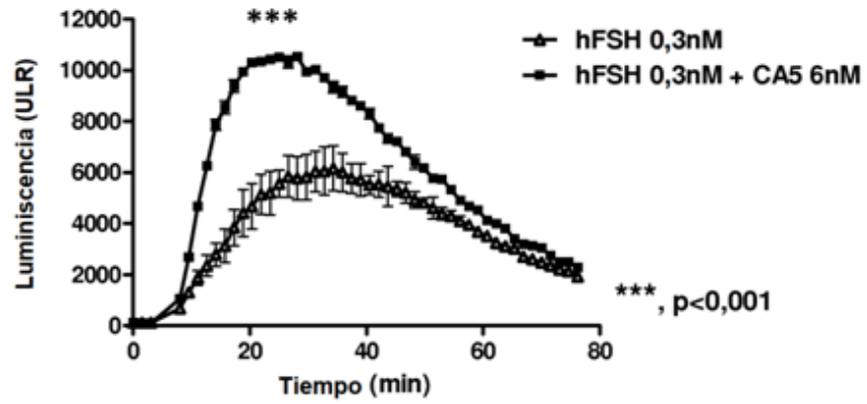
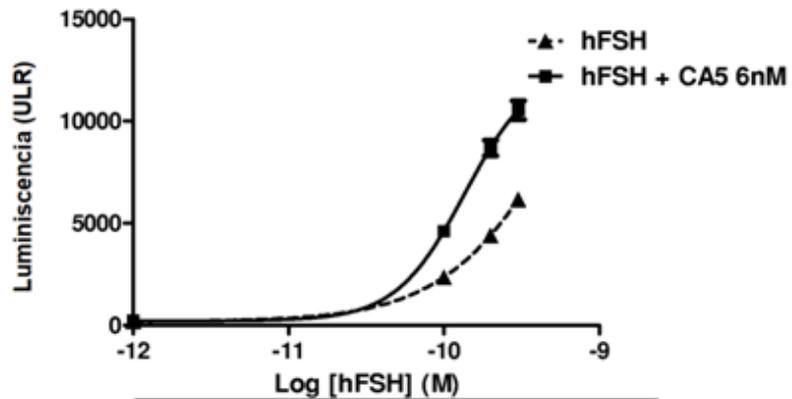


FIGURA 5

D



E



	hFSH	hFSH + CA5 6nM
LogCE50	-9,231	-9,864
HillSlope	1,152	1,965
CE50	5,869e-010	1,367e-010

F

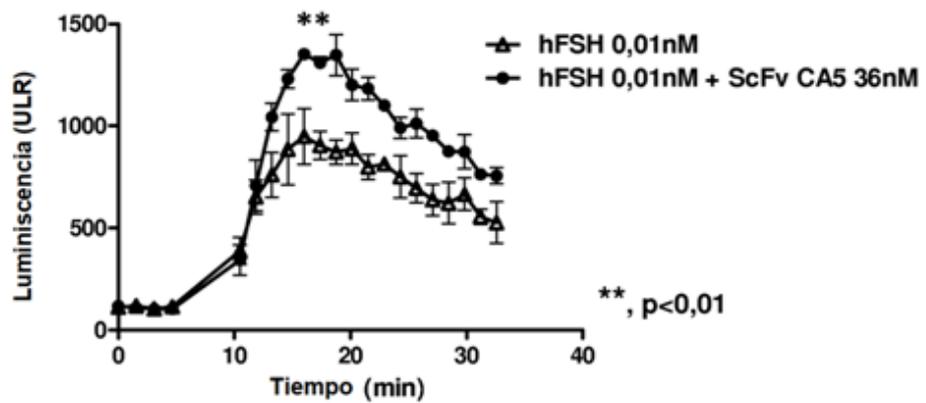
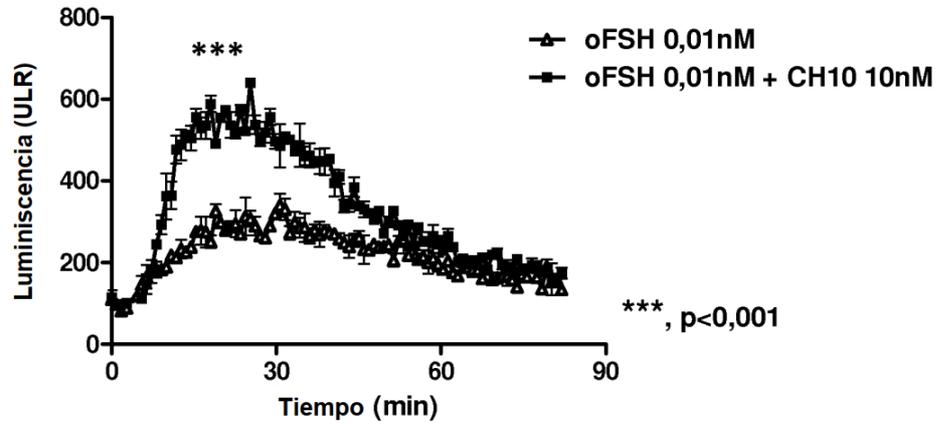
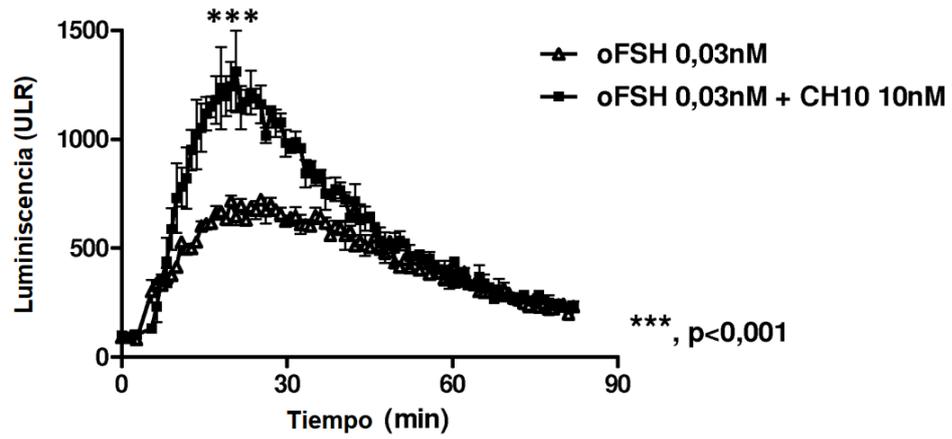


FIGURA 5 (final)

A



B



C

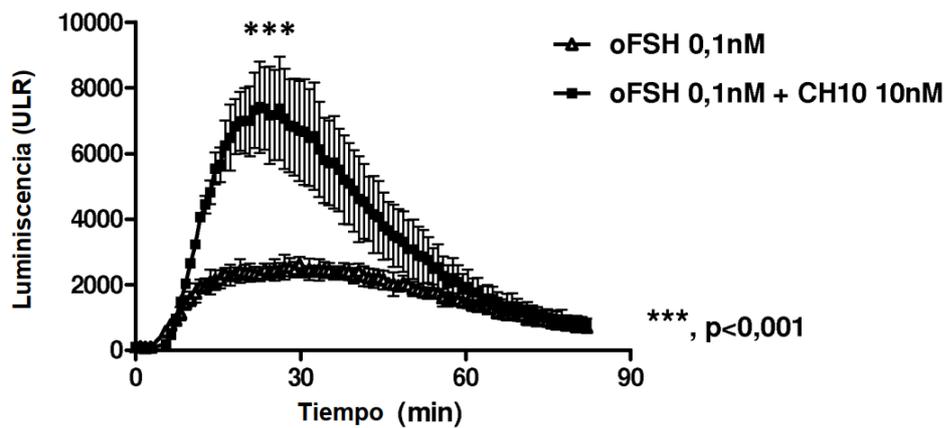


FIGURA 6

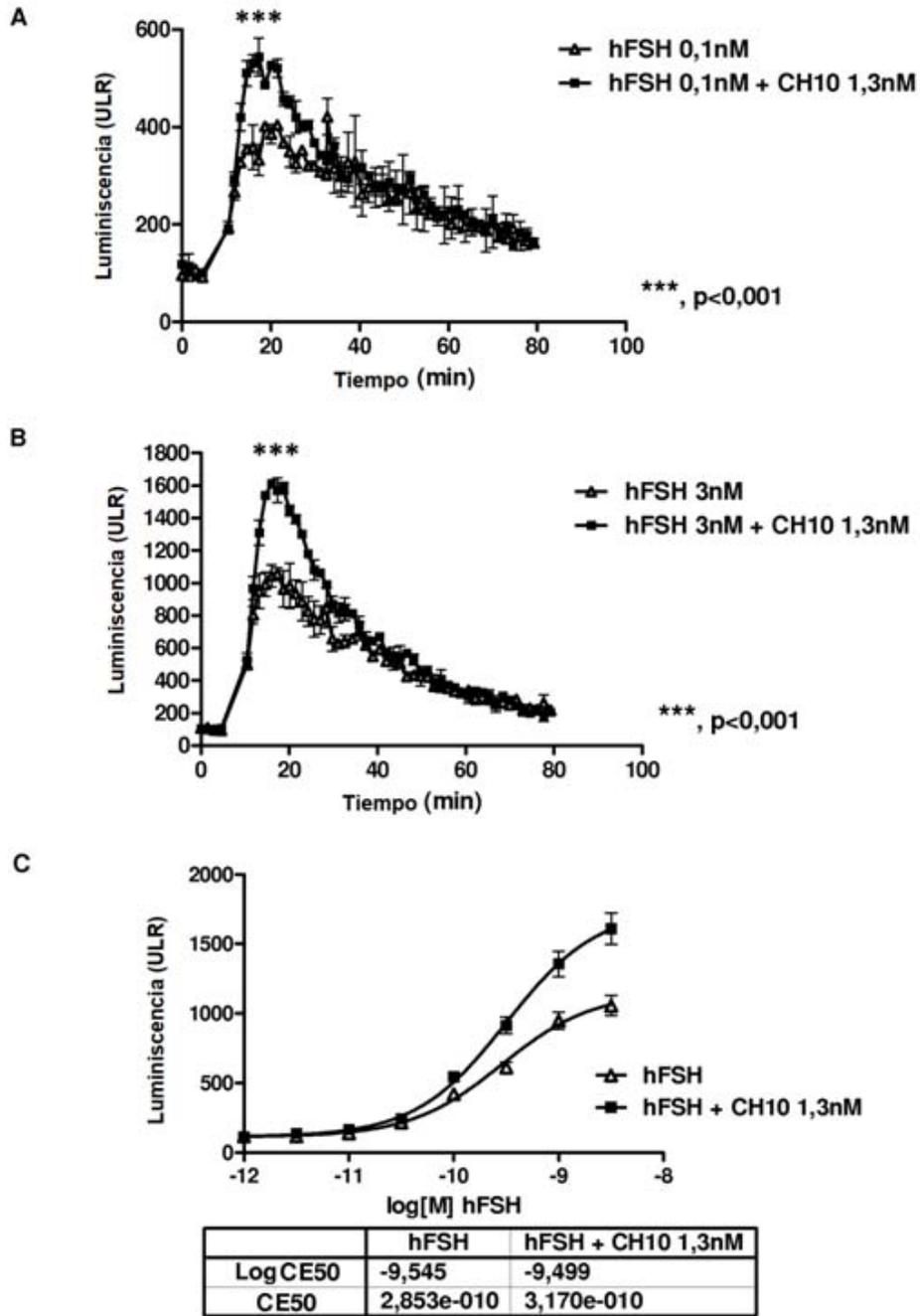


FIGURA 7

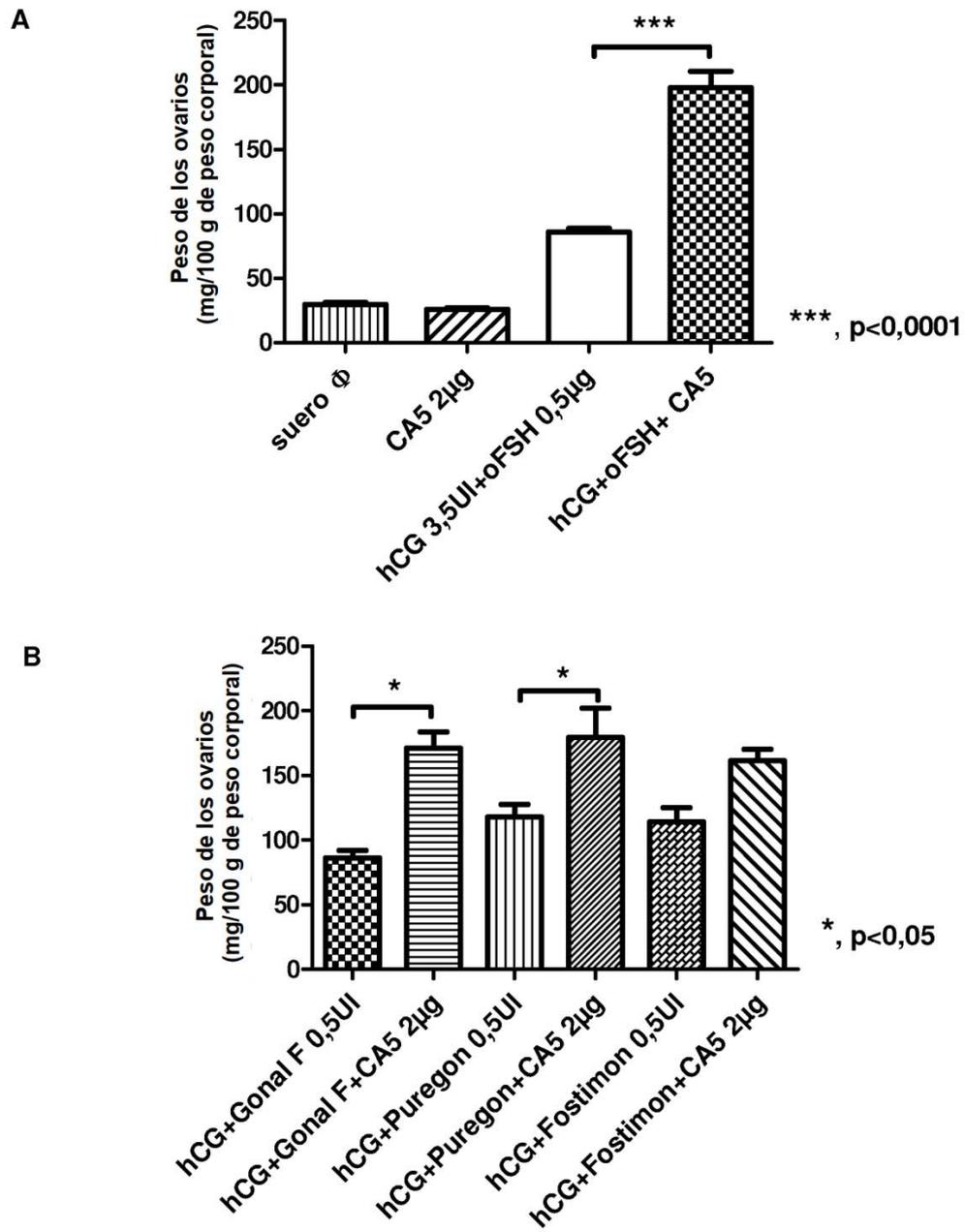
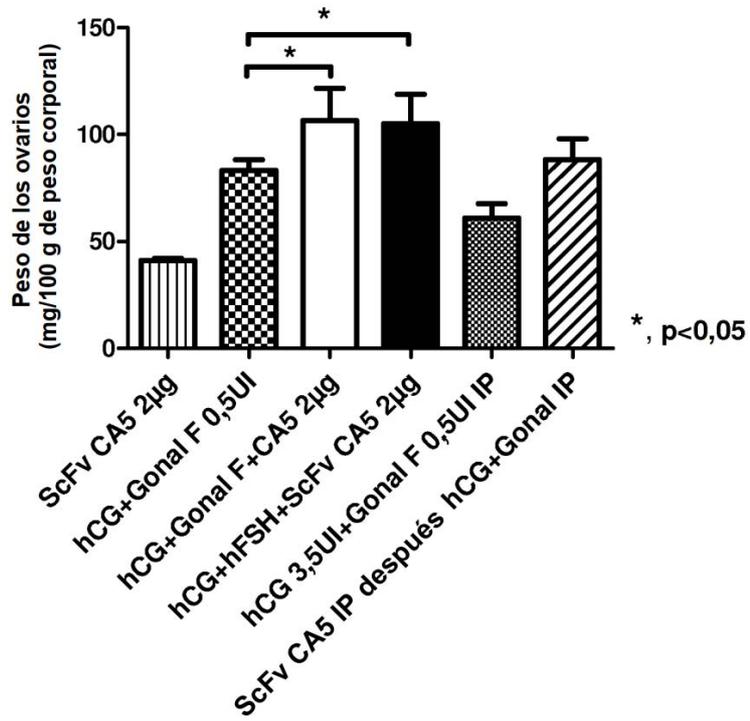


FIGURA 8

A



B

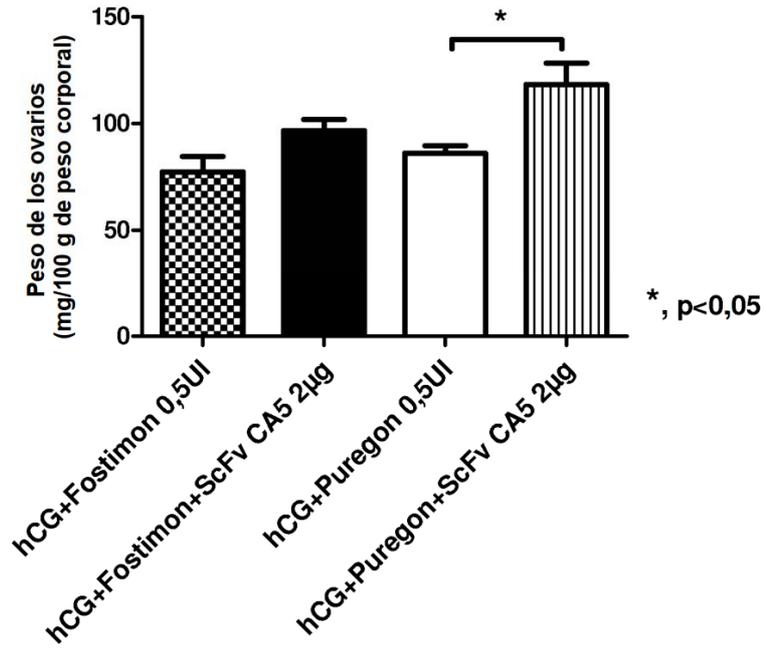


FIGURA 9

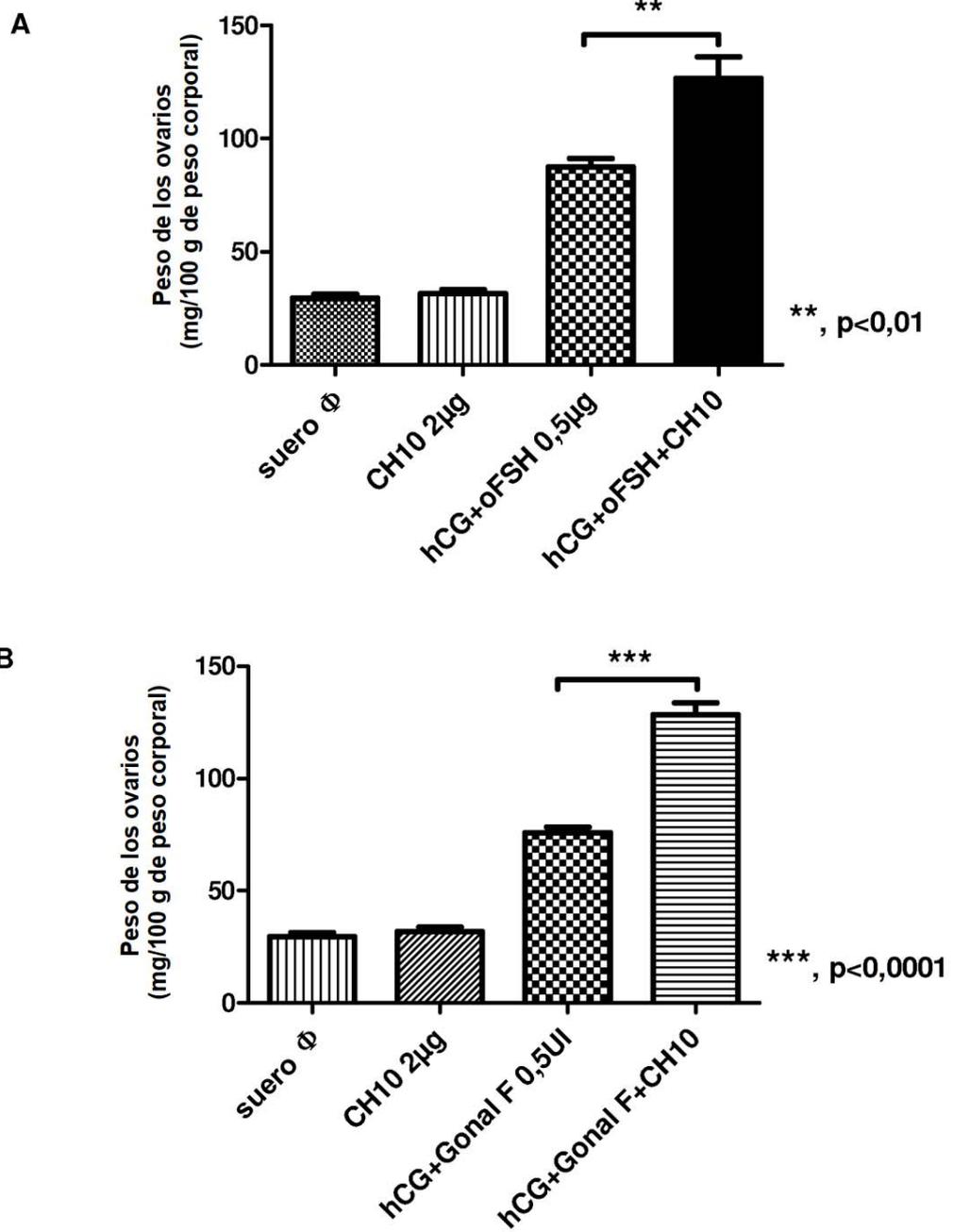


FIGURA 10

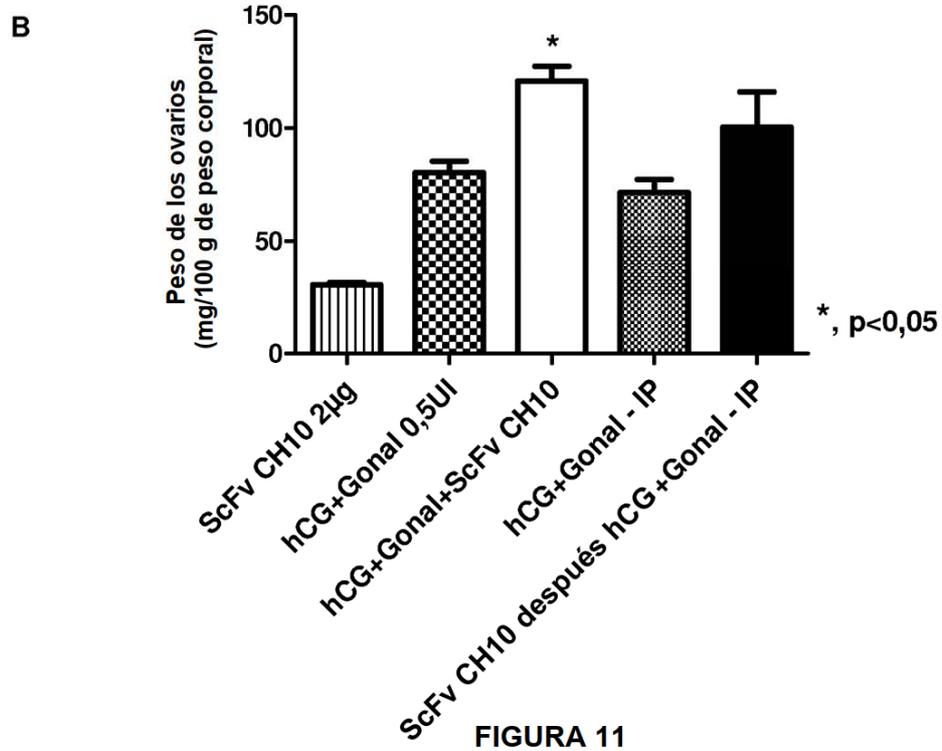
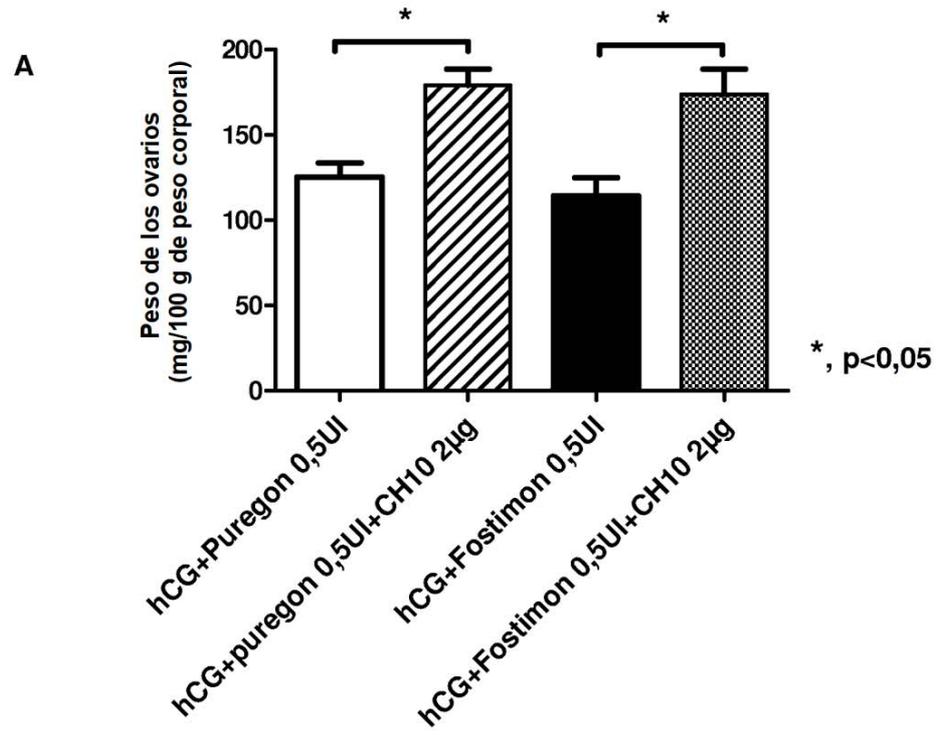
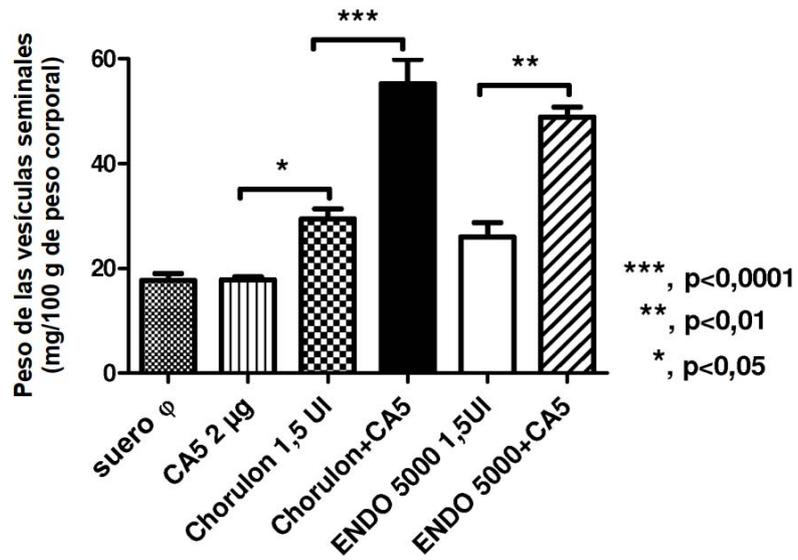
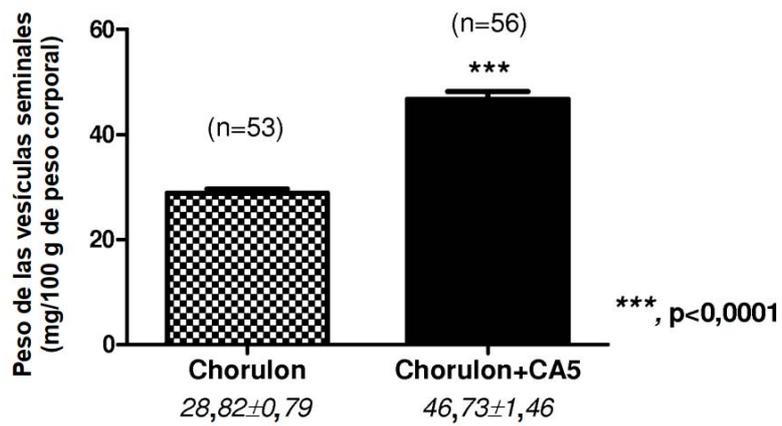


FIGURA 11

A



B



C

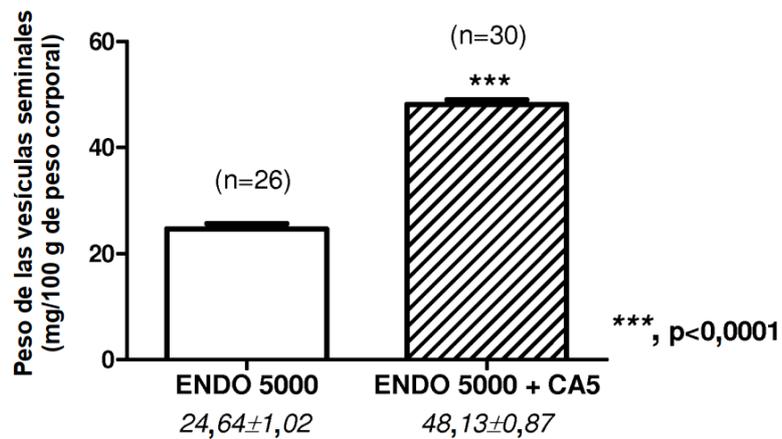


FIGURA 12

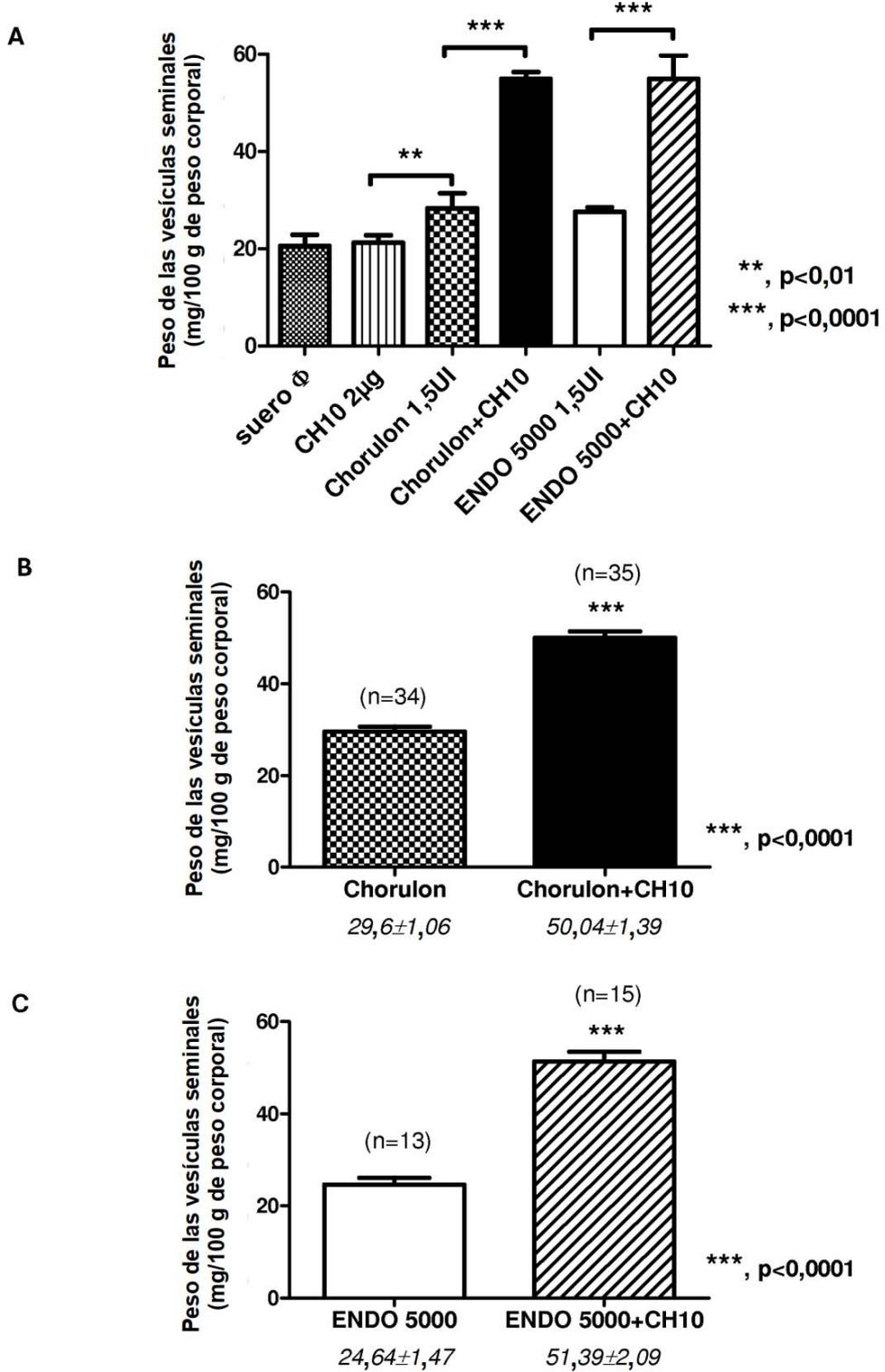


FIGURA 13

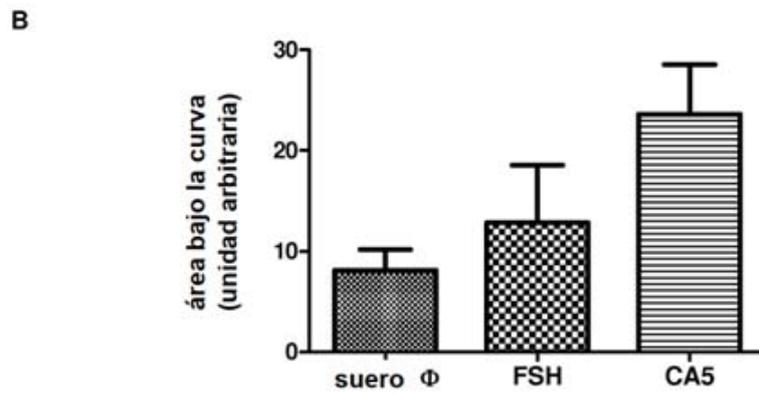
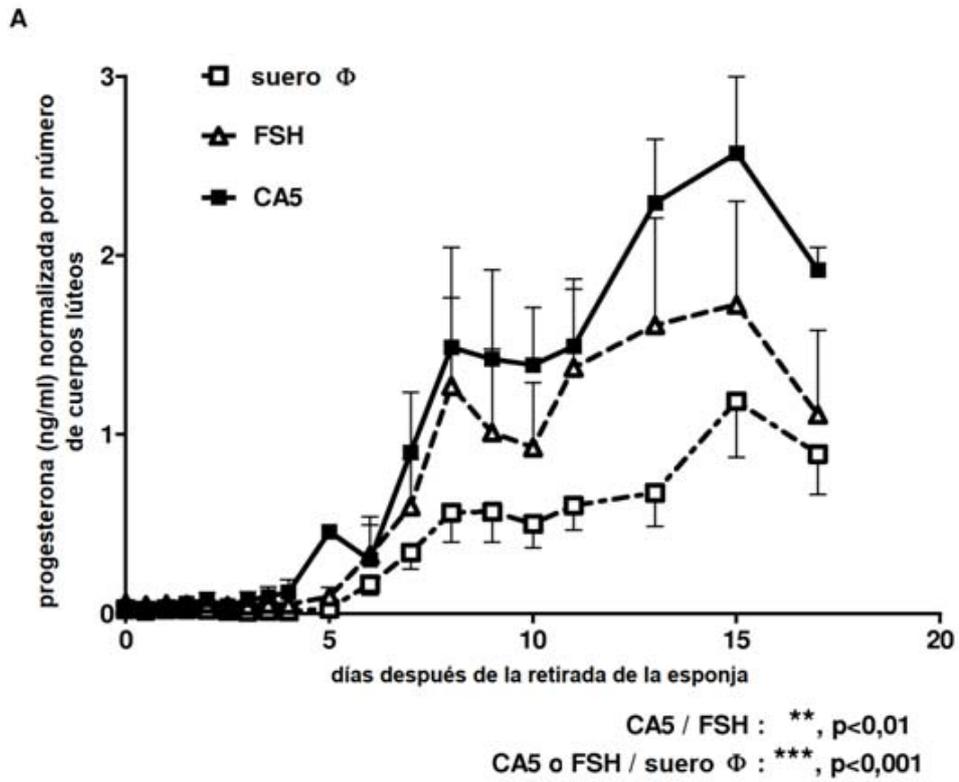


FIGURA 14

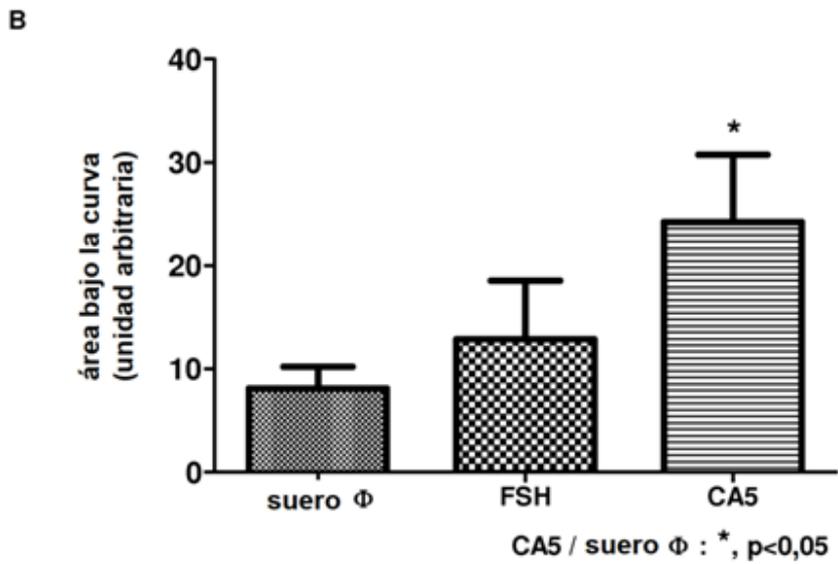
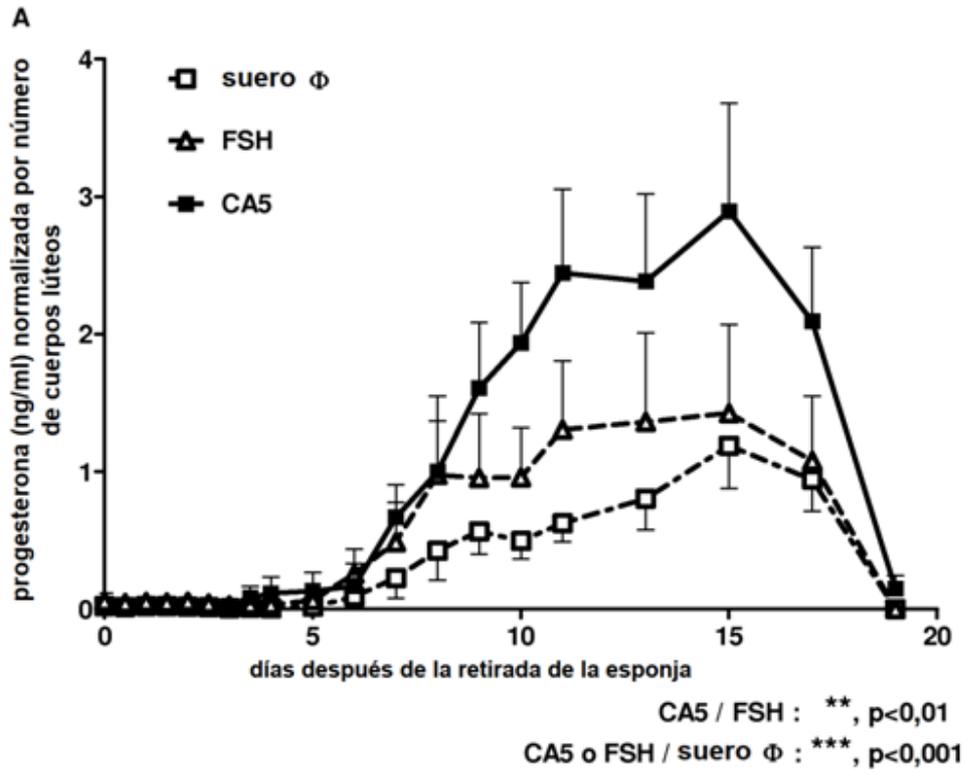


FIGURA 15

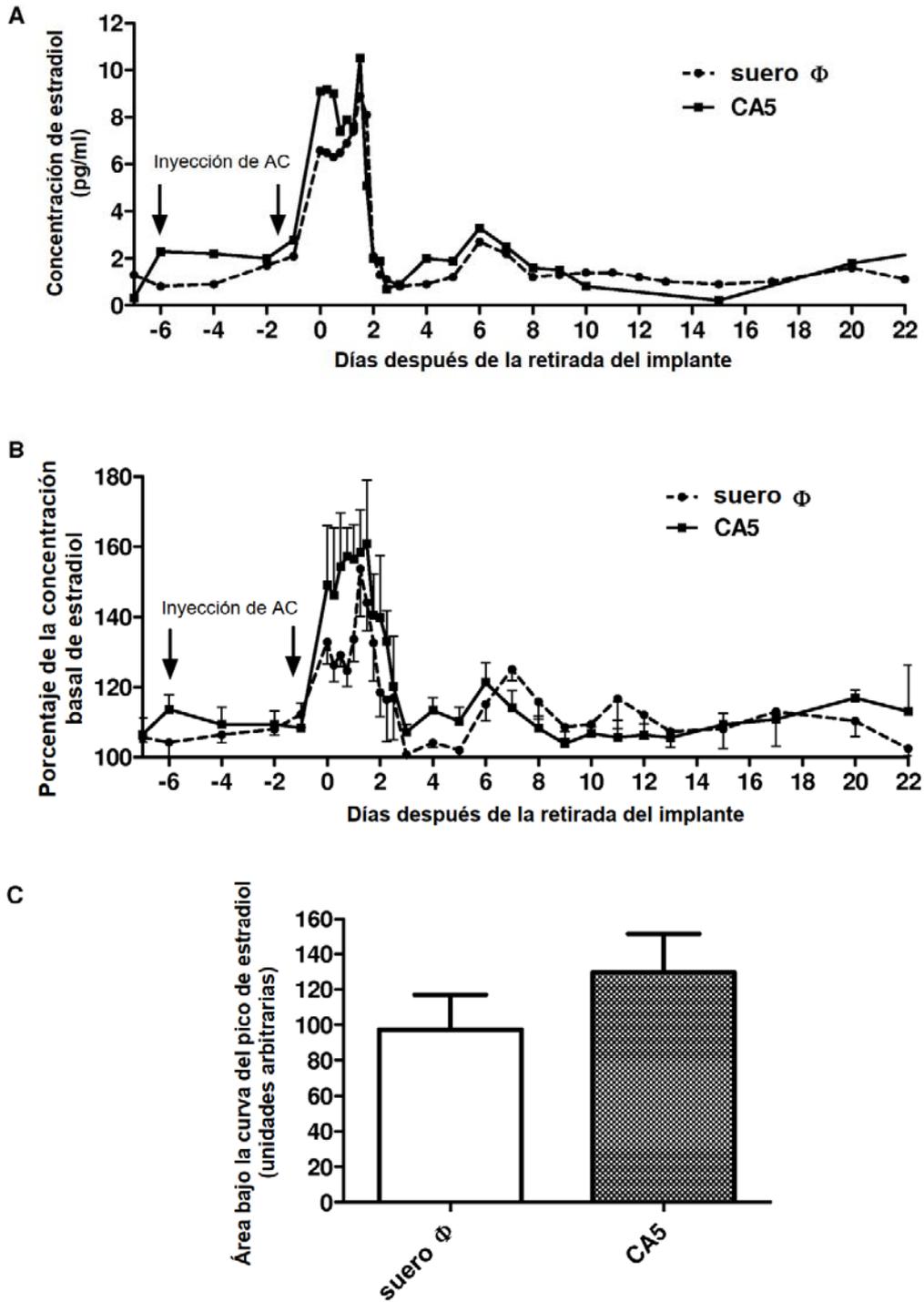


FIGURA 16

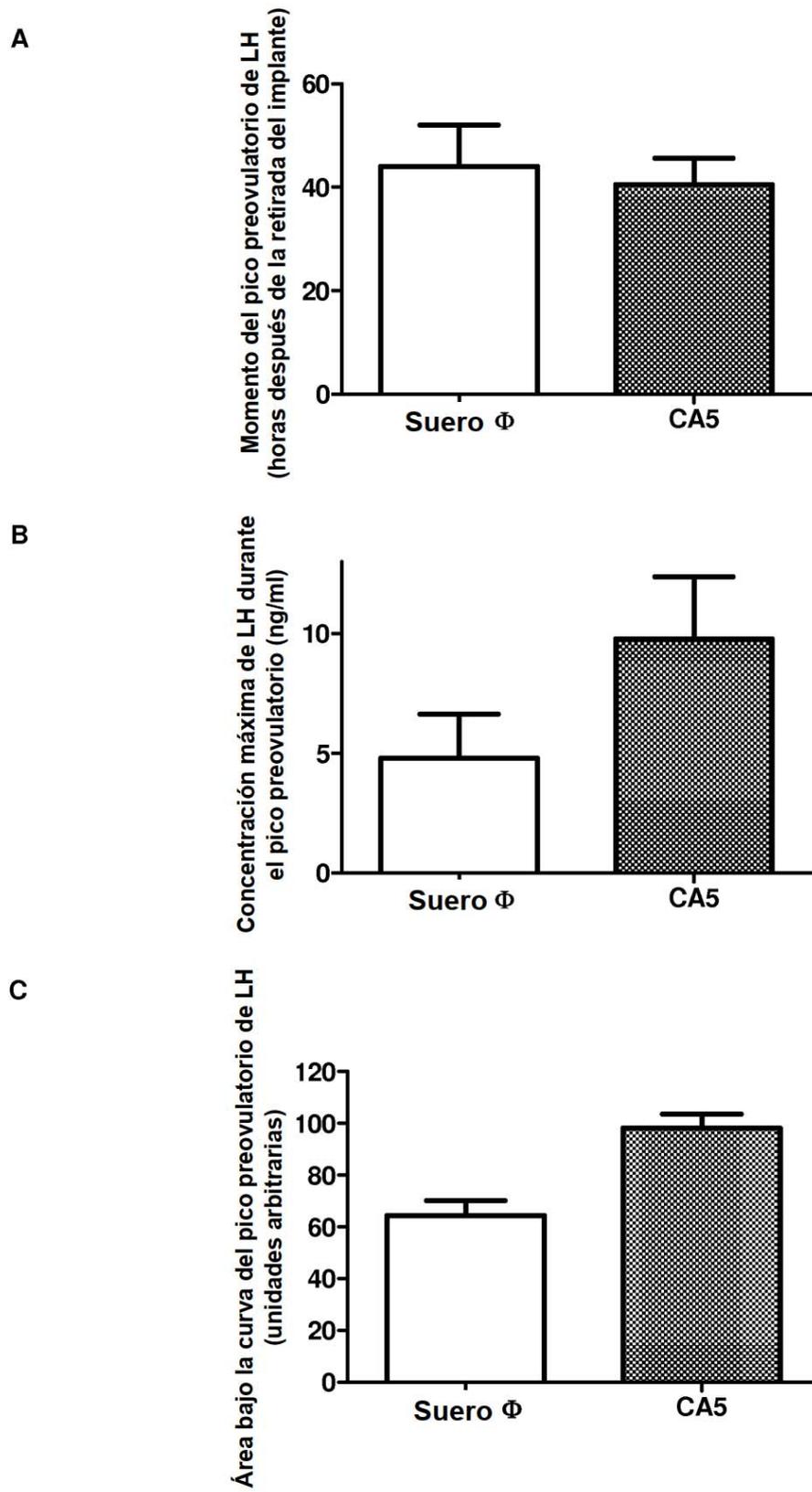


FIGURA 17

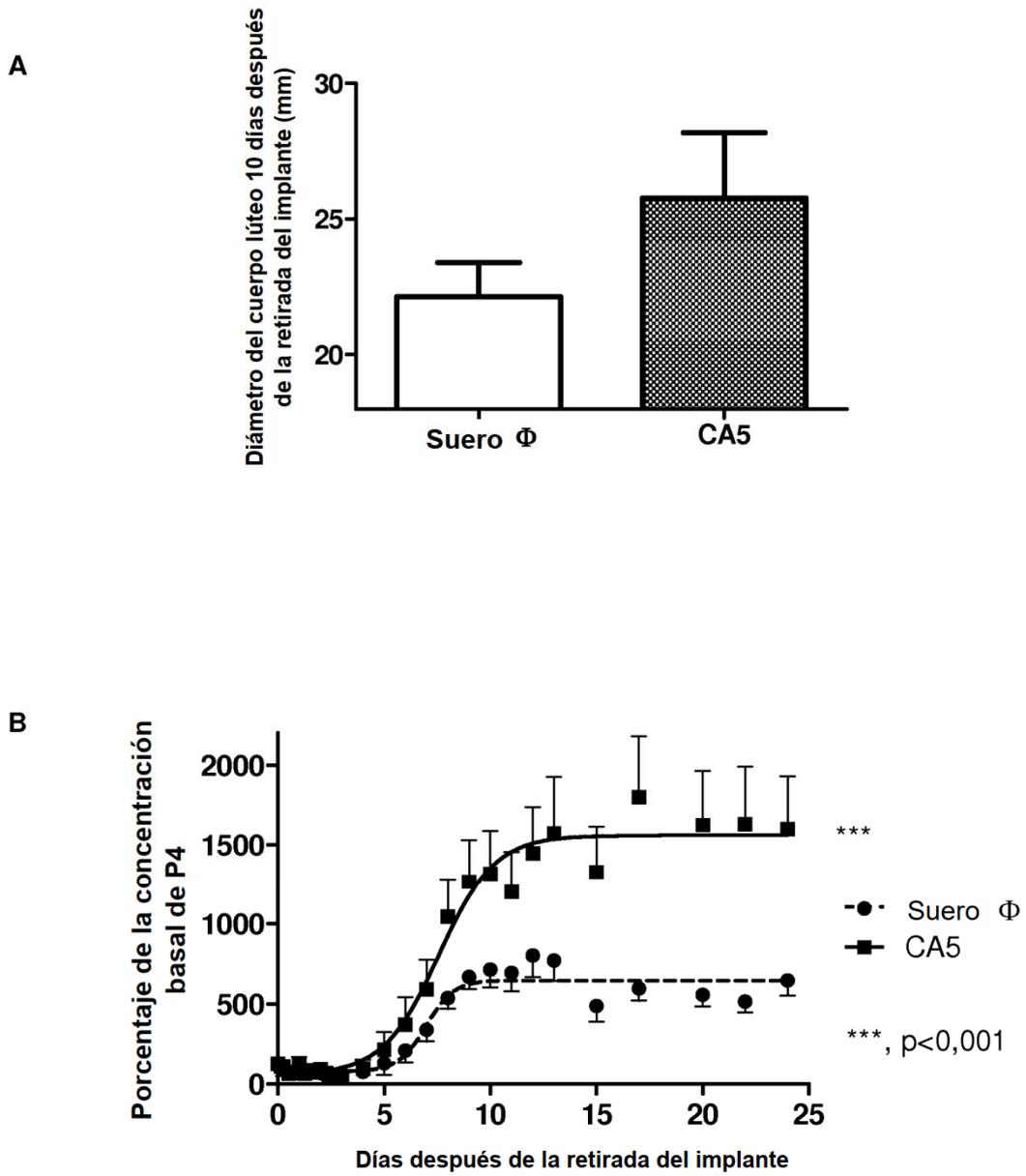


FIGURA 18

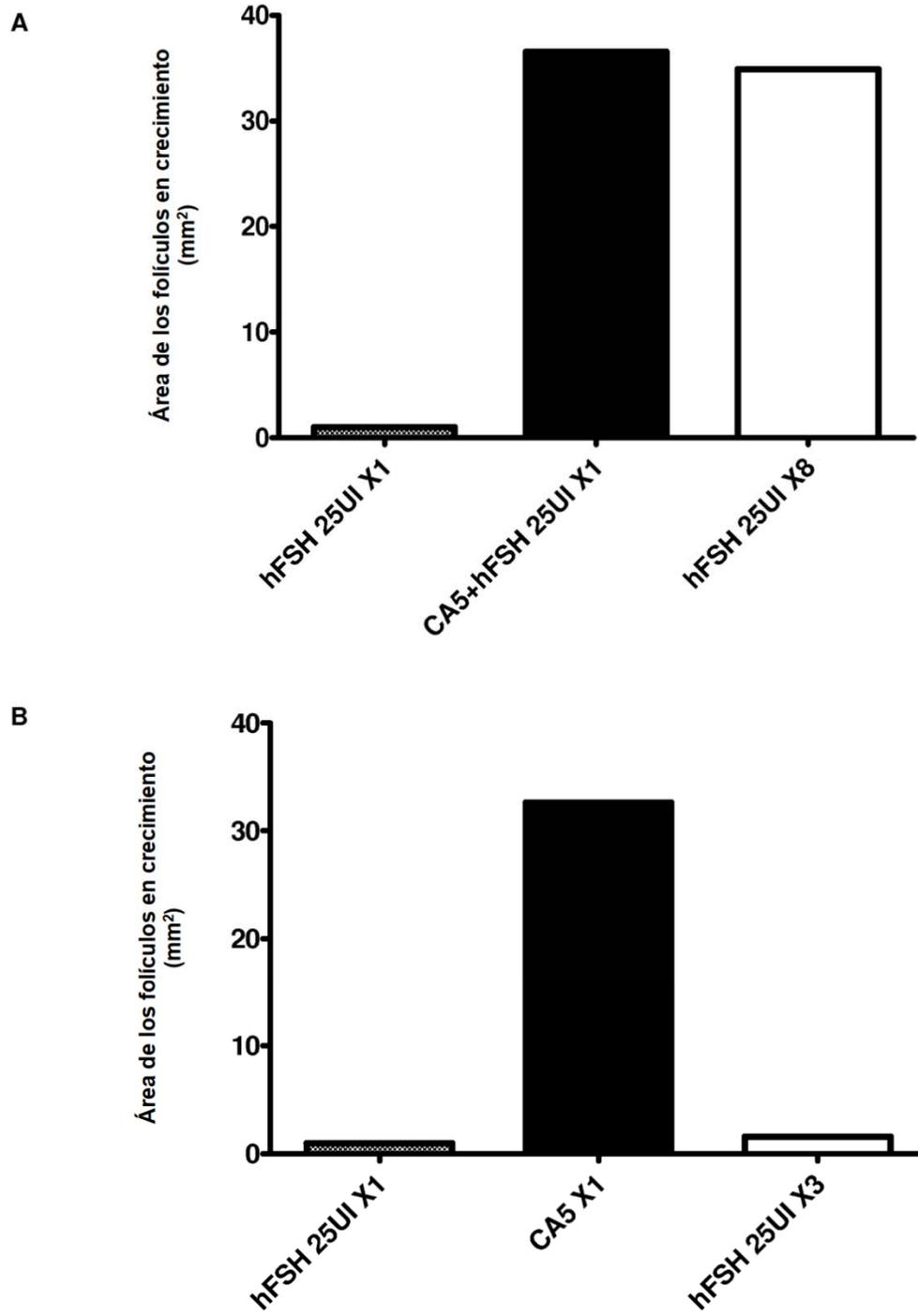


FIGURA 19

Regiones epitópicas del anticuerpo CA5 en las subunidades alfa de FSH y LH humana, ovina y porcina y CG humana.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
hFSH	APD---	VQDQPECTLQENPLFSQFGAPILQCMGCCFS	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVTS	E	STCCVAKSNRVTVMGGFKVENHHTACHCSTCIYYHKS			
hCG	APD---	VQDQPECTLQENPFFSQFGAPILQCMGCCFS	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVTS	E	STCCVAKSNRVTVMGGFKVENHHTACHCSTCIYYHKS			
hLH	APD---	VQDQPECTLQENPFFSQFGAPILQCMGCCFS	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVTS	E	STCCVAKSNRVTVMGGFKVENHHTACHCSTCIYYHKS			
oLH	FPDGEFTMQGQPECKLKENKVF	SKPDAPLYQCMGCCFS	R	AYPTPARSKKTMLVPKNITS	E	AICCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCIYYHKS			
pLH	FPDGEFTMQGQPECKLKENKVF	SKLGLAPLYQCMGCCFS	R	AYPTPARSKKTMLVPKNITS	E	AICCVAKAFTKATVMGNARVENHTECHCSTCIYYHKS			
oFSH	FPDGEFTMQGQPECKLKENKVF	SKPDAPLYQCMGCCFS	R	AYPTPARSKKTMLVPKNITS	E	AICCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCIYYHKS			
pFSH	FPDGEFTMQGQPECKLKENKVF	SKLGLAPLYQCMGCCFS	R	AYPTPARSKKTMLVPKNITS	E	AICCVAKAFTKATVMGNARVENHTECHCSTCIYYHKS			

Regiones epitópicas del anticuerpo CA5 en las subunidades beta de FSH y LH humana, ovina y porcina y CG humana

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90								
hFSH	----	NSCELTNI	T	IATEKEEC	RF	C	I	S	I	N	ITWCAGCYTRDLVYKDPARPNIQKICTFKELVYEIV	R	V	P	GC	A	HHADSLTYTPVATECHCGKCDSDSDCT
hCG	SREPLRPRCPINA	T	LAVEKEGC	P	V	C	I	T	V	N	ITICAGCYPTMRVLQGLPALPQVGNVDRVFESI	R	L	P	GC	P	RGWNPVVSVAVALSCOCALCRRSTIDCG
hLH	SREPLRPWCHPINA	I	LAVEKEGC	P	V	C	I	T	V	N	ITICAGCYPTMMRVLQAVLPLFPQVCTYRDRVFESI	R	L	P	GC	P	RGVDFVVSFFVALSFCGPPORRSTSDCG
oLH	SRGPLRFLCQFINA	T	LAAEKEAC	P	V	C	I	T	F	T	TSICAGCYLSMKRVLVILPPMPQRVCTYHELRFASV	R	L	P	GC	P	PGVDPVVSFFVALSFCGPPORRSTSDCG
pLH	SRGPLRPLCRPINA	T	LAANEAC	P	V	C	I	T	F	T	TSICAGCYPMRVLPAALPVPQPVCTYRELFSASI	R	L	P	GC	P	PGVDPVVSFFVALSFCGPPORRSTSDCG
oFSH	----	NSCELTNI	T	IIVEKEEC	S	F	C	I	S	I	ITWCAGCYTRDLVYKDPARPNIQKICTFKELVYEIV	K	V	P	GC	A	HHADSLTYTPVATECHCGKCDSDSDCT
pFSH	----	NSCELTNI	T	IIVEKEEC	N	F	C	I	S	I	ITWCAGCYTRDLVYKDPARPNIQKICTFKELVYEIV	K	V	P	GC	A	HHADSLTYTPVATECHCGKCDSDSDCT

100	110														
V	R	G	L	G	P	S	Y	C	S	F	G	E	M	K	-----
G	P	K	D	H	P	L	T	C	D	D	P	R	F	Q	D
hLH	G	P	K	D	H	P	L	T	C	D	H	P	Q	D	S
oLH	G	P	R	T	Q	P	L	A	C	D	H	P	P	L	P
pLH	G	P	R	A	Q	P	L	A	C	D	R	P	L	L	P
oFSH	V	R	G	L	G	P	S	Y	C	S	F	S	D	I	R
pFSH	V	R	G	L	G	P	S	Y	C	S	F	S	E	M	K

Zona de seguridad

Región epitópica del anticuerpo CA5 en el receptor humano de la FSH (región N terminal).

1	10	20	30	40																																											
hFSHR	C	I	H	R	I	C	H	S	N	R	V	F	L	C	Q	E	S	K	V	T	E	L	P	S	D	L	P	R	N	A	E	L	R	F	V	L	I	K	L	R	V	I	Q	K	G	A	F

FIGURA 20

Regiones epitópicas del anticuerpo CH10 en las subunidades alfa de FSH y LH humana, ovina y porcina y CG humana.

hFSH	APD----	V	Q	DCP	E	CTLQENPLFSQPGAPILQCMGCC	F	S	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVIS	E	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
hCG	APD----	V	Q	DCP	E	CTLQENPLFSQPGAPILQCMGCC	F	S	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVIS	E	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
hLH	APD----	V	Q	DCP	E	CTLQENPLFSQPGAPILQCMGCC	F	S	R	AYPTPLRSKKTMLVQKNVIS	E	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
oLH	FPDGEFIM	Q	GCP	E	CKLKENKRYFSKLPDAPYQCMGCC	F	S	R	AYPTPARSKKTMIVPKNIIS	E	ATCCVAKAFTKATVMGNRVNENHTECHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
oPLH	FPDGEFIM	Q	GCP	E	CKLKENKRYFSKLPDAPYQCMGCC	F	S	R	AYPTPARSKKTMIVPKNIIS	E	ATCCVAKAFTKATVMGNRVNENHTECHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
oFSH	FPDGEFIM	Q	GCP	E	CKLKENKRYFSKLPDAPYQCMGCC	F	S	R	AYPTPARSKKTMIVPKNIIS	E	ATCCVAKAFTKATVMGNRVNENHTECHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
oFSH	FPDGEFIM	Q	GCP	E	CKLKENKRYFSKLPDAPYQCMGCC	F	S	R	AYPTPARSKKTMIVPKNIIS	E	ATCCVAKAFTKATVMGNRVNENHTECHCSICYYHKS	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	

Regiones epitópicas del anticuerpo CH10 en las subunidades beta de FSH y LH humana, ovina y porcina y CG humana

hFSH	----	N	SC	ELTNIT	IALEKEECRFQI	S	I	N	T	I	W	C	AGY	CYTRDLVYKDPARPNQKICTFKELVYETVRFVPGCAHADSLEYTPVATECHCGKDSIDTCT	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
hCG	SKEPL	R	PC	RPINAT	LAVEKEGCPVCI	T	V	N	T	I	C	C	AGY	CPTMTRVLQGVLPALPQVWVNRDVRRESIRLPGCPRGVNPVVSVAVALSQCALCRRSITDGG	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
hLH	SREPL	R	PC	HPINAI	LAVEKEGCPVCI	T	V	N	T	I	C	C	AGY	CPTMTRVLQGVLPALPQVWVNRDVRRESIRLPGCPRGVNPVVSVAVALSQCALCRRSITDGG	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
oLH	SRGFL	R	PC	OPINAT	LAAEKEACPVCI	T	F	T	S	I	C	C	AGY	CLSMKRVLPVILPPMEQRVCTYHELRFASVRLPGCPVDPVMSFPVALSCHCGPRLSSIDCG	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
oPLH	SRGFL	R	PC	RPINAT	LAAEKEACPVCI	T	F	T	S	I	C	C	AGY	CPSMVRVLPAAALPPVQVQVCTYRELFSASIRLPGCPVDPVMSFPVALSCHCGPRLSSIDCG	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
oFSH	----	-	SC	ELTNIT	ITVEKEECRFQI	S	I	N	T	I	W	C	AGY	CYTRDLVYKDPARPNQKICTFKELVYETVRFVPGCAHADSLEYTPVATECHCGKDSIDTCT	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
oFSH	----	-	-C	ELTNIT	ITVEKEECRFQI	S	I	N	T	I	W	C	AGY	CYTRDLVYKDPARPNQKICTFKELVYETVRFVPGCAHADSLEYTPVATECHCGKDSIDTCT	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90

hFSH	VRG	IGPSY	CSF	GEM	KE	-----
hCG	GPK	DHPLT	CDD	PRF	QDSSSKAPPPSLPSPS	-----
hLH	GPK	DHPLT	CDH	PQL	SGLLFL	-----
oLH	GPR	TOPLA	CDH	PPL	FDLFL	-----
oPLH	GPR	AQPIA	CDR	PLL	PGLLFL	-----
oFSH	VRG	IGPSY	CSF	SDI	RE	-----
oFSH	VRG	IGPSY	CSF	SEM	KE	-----

Zona de seguridad

Región epitópica del anticuerpo CH10 en el receptor humano de la FSH (región N terminal).

hFSHR	CH	HRIC	HCS	NRVF	L	C	Q	E	SKVTEIPSDLPRNAIEL	R	FVLTIKLRVIQKGAF...
1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110

FIGURA 21

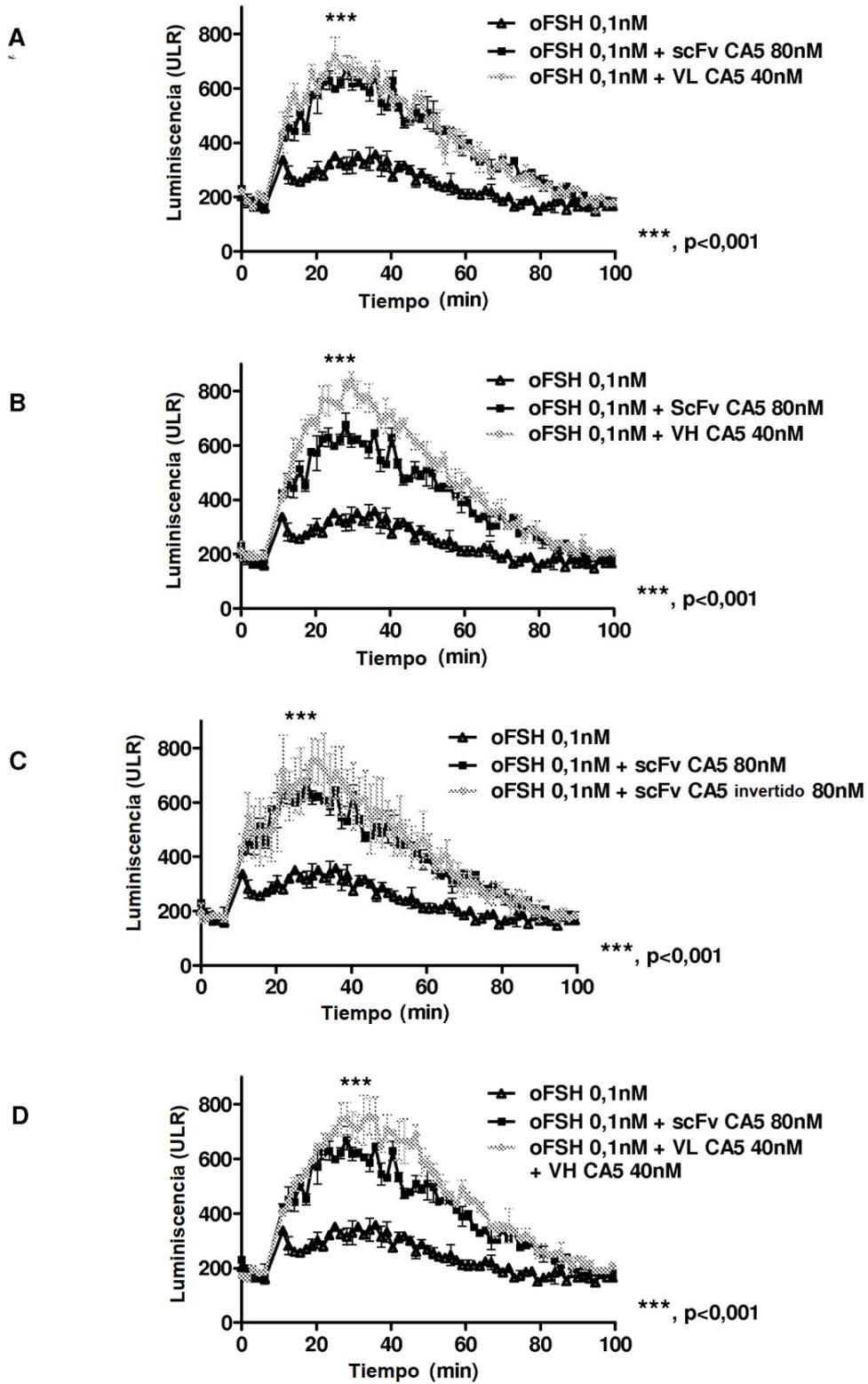


FIGURA 22

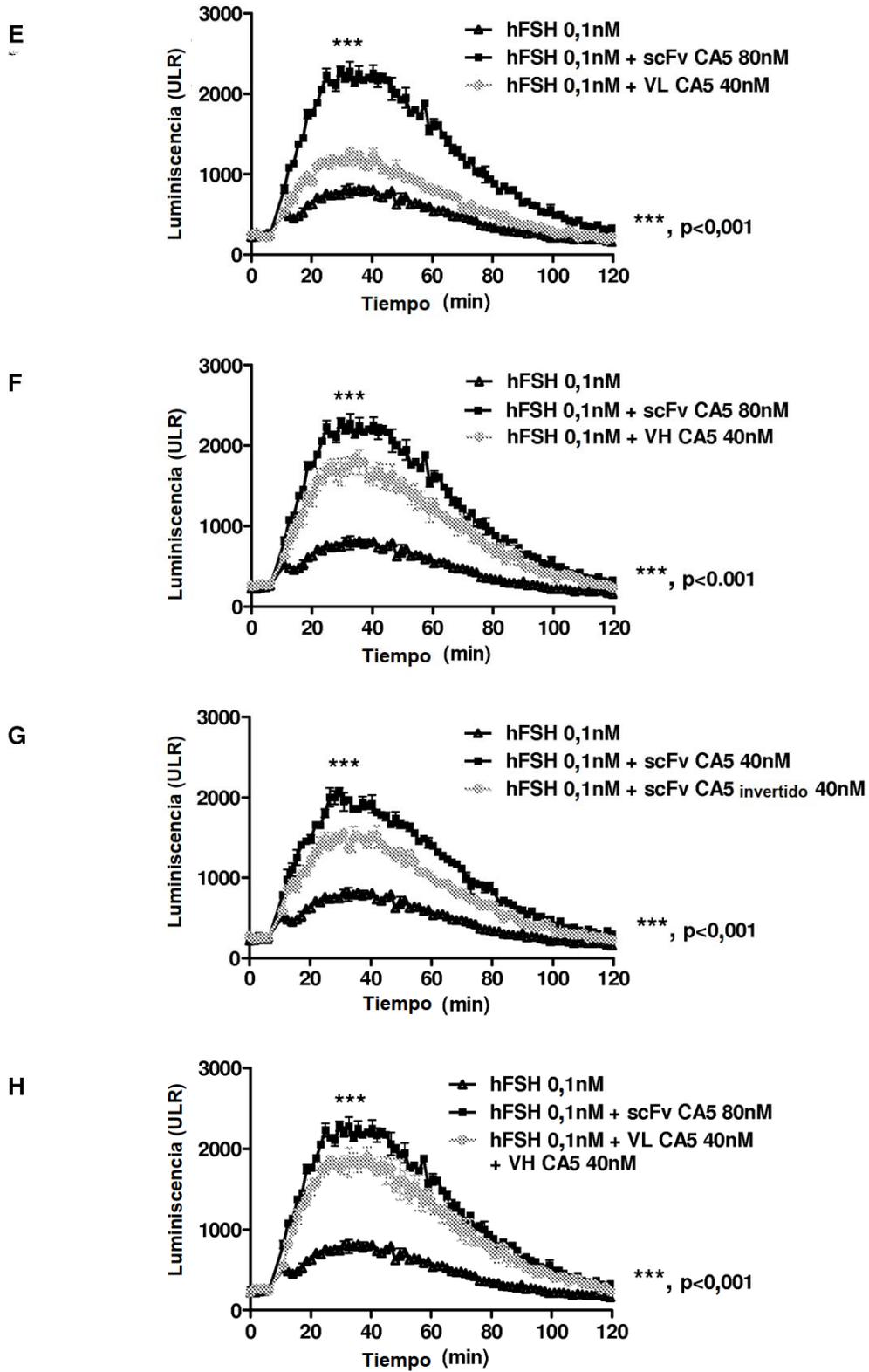


FIGURA 22 (final)

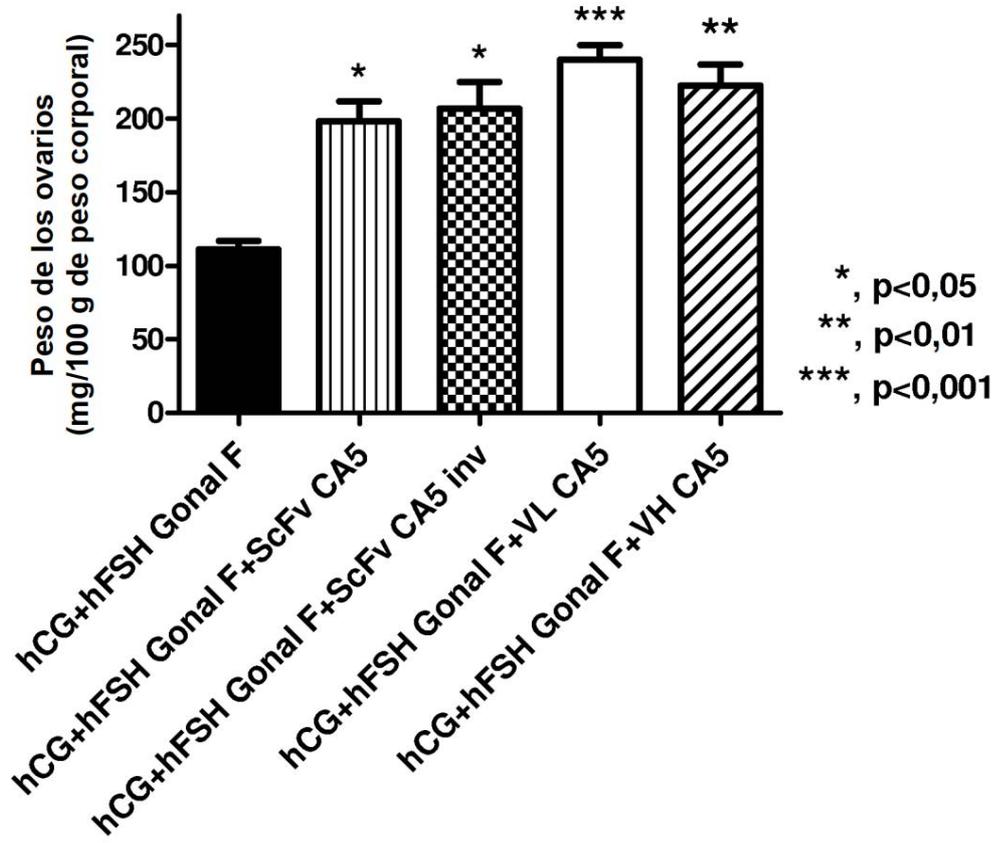


FIGURA 23