

**HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE BOVINA RECOMBINANTE,
COMPOSICIÓN QUE LA COMPRENDE Y MÉTODO PARA INDUCIR
SUPEROVULACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DEL CELO EN BOVINOS
UTILIZANDO DICHA HORMONA**

5

Campo Técnico

La presente invención se relaciona con el campo técnico de producción de péptidos recombinantes, en particular, hormonas biológicamente activas, como la hormona folículo estimulante bovina. Adicionalmente, se relaciona con composiciones de uso veterinario, particularmente con una composición que comprende la hormona folículo estimulante recombinante bovina y su uso para incrementar la reproducción en bovinos y otros ungulados.

Antecedentes

En la industria agropecuaria, las mejoras en la ciencia reproductiva y la multiplicación de genotipos más productivos están directamente ligadas a incrementos en la productividad, por lo que es de vital importancia aumentar el rendimiento reproductivo en los animales de interés comercial, particularmente, bovinos y ovinos. Una de las formas de aumentar el rendimiento reproductivo de estos animales es inducir la superovulación de hembras con un genotipo deseable. Para esto, se utiliza un tratamiento hormonal con la hormona folículo estimulante (FSH, del inglés Follicle-Stimulating Hormone), la cual induce la ovulación de varios ovocitos al ser inyectada en las hembras. La FSH es una hormona glicoproteína que es un heterodímero, una beta, específica para la FSH y una alfa, común para la hormona luteinizante (LH) y otras.

Actualmente, la FSH es extraída de la hipófisis de cerdos sacrificados, donde hormonas inyectables de este origen como Folltropin-V[™] y Pluset[™] son las más usadas actualmente por la industria pecuaria. Debido a su origen y estructura, estas hormonas exógenas tienen una serie de riesgos asociados a su uso como el riesgo de contaminación con patógenos, tales como priones o microorganismos, contaminación de la preparación hormonal con LH, ya que esta es purificada en

conjunto con la FSH, inclusive siendo declarado su efecto por algunas preparaciones. El efecto de esta contaminación reduce el proceso de superovulación, reduce la eficiencia de la fertilización y afecta la calidad de los embriones. Además, debido a su origen animal, estas preparaciones hormonales

5 tienen un tiempo de vida en circulación en torno a 5 horas, lo que requiere una cantidad considerable de inyecciones durante el protocolo de superovulación. Adicionalmente, al tener un origen porcino, esta hormona puede inducir una respuesta inmune humoral al ser administrada en otras especies, como los bovinos.

Debido a todos los inconvenientes antes mencionados, en la industria pecuaria se

10 ha buscado mejorar la calidad de la FSH administrada, principalmente, mediante técnicas moleculares donde se ha generado FSH de origen recombinante. En el estado de la técnica, se han propuesto distintas alternativas de FSH bovina recombinante. El documento WO 2008/098169 A2, se refiere a la producción de una FSH bovina recombinante (BoviPure FSH™) donde se fusiona la subunidad α

15 con la subunidad β usando una secuencia espaciadora, para generar una secuencia de ADN única que codifica a esta proteína recombinante. La secuencia espaciadora corresponde al péptido Carboxil-terminal de la gonadotropina coriónica humana (CTP), lo cual genera una secuencia lineal. Con esto, generan una FSH recombinante, donde no se explicita si existe algún aumento en la vida media de

20 esta proteína u otra ventaja similar. El uso del CTP como secuencia espaciadora para generar una FSH recombinante, también se divulga en el documento US 2015/0335713 A1, el cual se refiere a un método para aumentar el desempeño reproductivo de bovinos hembra con respecto a la superovulación y generación de embriones viables utilizando FSH recombinante. Esta FSH recombinante se generó

25 a partir de la unión de la subunidad β con la subunidad α de FSH bovino utilizando como péptido espaciador el CTP o repetidos de G₄S, en una cadena aminoacídica única. En el documento de divulgación general del año 2005 (Ruman JI, Pollak S, Trousdale RK, Klein J, Lustbader JW. Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine

30 folliculogenesis. Fertil Steril. 2005 Apr;83 Suppl 1:1303-9.), también promueven la generación de FSH recombinante en una secuencia única mediante el uso del péptido espaciador CTP.

Dentro del estado de la técnica, con el fin de aumentar la vida media y actividad biológica de la FSH se ha utilizado mutaciones sitios dirigidas tanto en la unidad alfa y beta de la FSH, como muestra el documento US 5,338,835, el cual se refiere a la producción de FSH recombinante entre otras, mediante la generación de una proteína de fusión donde se une la subunidad α común de la FSH y LH con la subunidad β de la FSH, a su vez, acoplada en su Carboxilo-terminal (C-Ter) a un péptido de 34 aminoácidos CTP, como péptido espaciador, generando una secuencia lineal. En este documento, se prueba la FSH recombinante versus la FSH nativa en ratas, mostrando que la FSH recombinante tiene una vida media mayor que la FSH nativa.

También, se han generado FSH recombinantes mediante la co-transfección de la subunidad alfa y beta en líneas celulares humanas como HEK293, como divulga el documento WO 2014/183175 A1, el cual se refiere a la elaboración de un método para producir y/o purificar hormonas, enfocándose en FSH con origen humano o animal, utilizando células humanas como líneas celulares para la expresión de estas. Esta FSH recombinante se probó en ratas, obteniendo que la FSH recombinante aumenta del peso del ovario de la rata luego de una inyección diaria de FSH recombinante con hormona gonadotropina coriónica humana durante un periodo de 3 días.

En el artículo de Gifre, L. *et al.*, 2017 (Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia-Fruitós, E. Trends in recombinant protein use in animal production. Microbial cell factories. 2017, 16(1), 40.), se realizó un completo estudio sobre el mercado de distintos suplementos hormonales, entre ellos, FSH nativa y recombinante, donde muestran que el objetivo actual del mercado es buscar una FSH recombinante de larga duración, para su uso en el mercado agropecuario.

Para reducir entonces, la serie de inconvenientes de la FSH porcina que está actualmente en el mercado, existe la necesidad de generar una nueva FSH recombinante, mejorada y con mayor vida media, así reduciendo el número de inyecciones y el costo asociado a eso.

Sumario de la invención

Un primero objeto de la presente invención es una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende:

- 5 (i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
- (ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y
- 10 (iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta.

La primera secuencia polinucleotídica sintética mencionada que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, incluye en su extremo 5' una secuencia que codifica una señal de secreción endógena. Por otra parte, el segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2, incluye en su extremo 3' una secuencia que codifica una región de múltiples histidinas.

En una modalidad preferida, la secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la secuencia identificada como SEC ID No. 4.

Un segundo objeto de la presente invención es un vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a:

- 25 (i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
- 30

(ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iv) una secuencia de corte y poliadenilación.

Particularmente, en una modalidad preferida el vector previamente mencionado es un vector lentiviral.

En una modalidad preferida, el vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la SEC ID No. 4 y una secuencia corte y poliadenilación.

Un tercer objeto de la presente invención es una célula transducida que expresa una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende un vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica dicha hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, donde dicho vector comprende una construcción de ADN que contiene: una secuencia promotora operativamente unida a:

(i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iv) una secuencia de corte y poliadenilación.

En una modalidad preferida, la célula transducida es una célula de ovario de hámster chino.

En una modalidad preferida, la célula transducida con el vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la SEC ID No. 4 y una secuencia de corte y poliadenilación.

Un cuarto objeto de la presente invención es una secuencia polipeptídica sintética de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende:

- (i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
- (ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y
- (iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación.

Preferentemente, el primer polipéptido de secuencia SEC ID No. 5 incluye en su extremo amino terminal una secuencia señal de secreción endógena, mientras que el segundo polipéptido de secuencia SEC ID No. 6 incluye en su extremo carboxilo terminal una región de múltiples histidinas.

En una modalidad preferida, la secuencia polipeptídica sintética de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la secuencia SEC ID No. 8.

Un quinto objeto de la presente invención es un método para obtener una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende los pasos de:

- 5 - proporcionar una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende:
 - 10 (i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
 - 15 (ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y
 - 20 (iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
- 25 - clonar dicha secuencia polinucleotídica sintética en un vector de expresión que comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la secuencia polinucleotídica sintética una secuencia de corte y poliadenilación;
- transducir células con dicho vector de expresión y cultivar dichas células transducidas en un medio de cultivo;
- obtener dicho medio de cultivo que contiene la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena producido por las células transducidas; y
- purificar la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena del medio de cultivo.

Preferentemente, la secuencia polinucleotídica sintética que codifica la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la SEC ID No. 4., y la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la SEC ID No. 8.

- 5 En otra modalidad preferida, el vector de expresión utilizado en el método mencionado previamente es un vector lentiviral.

Preferentemente, las células que se transducen son células de ovario de hámster chino, en un medio preferiblemente libre de suero y libre de proteínas.

- 10 La purificación de la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena se realiza, en una modalidad preferida, mediante cromatografía de afinidad por columnas.

- Un sexto objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un polinucleótido sintético de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, donde dicha hormona tiene una secuencia aminoacídica que comprende:

- (i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;
 - (ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y
 - (iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación; y
- excipientes farmacéuticamente aceptables

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8.

Un último objeto de la presente invención es un método de tratamiento para la superovulación de ungulados, que comprende:

- administrar una dosis de una composición farmacéutica que comprende:

(i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación;

- donde dicha composición farmacéutica se administra cada 12 horas, durante 72 horas.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende la secuencia polipéptidica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8. En consecuencia, de manera preferente, la dosis total que se administra es de entre 100 y 1000 μ g de la secuencia polipéptidica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8.

Breve descripción de las Figuras

La FIG. 1 muestra una imagen de la secuencia polipeptídica de la FSH recombinante bovina de simple cadena.

La FIG. 2 muestra una imagen de la estructura tridimensional de la proteína FSH recombinante bovina de simple cadena.

La FIG. 3 muestra el mapa del vector de expresión de la FSH recombinante bovina de simple cadena (scbFSH en el mapa) de la presente invención.

La FIG. 4 muestra el casete de expresión detallado de la scbFSH recombinante bovina de simple cadena, así como toda la secuencia de eventos moleculares requeridos para la detección y selección de clones celulares altamente productores de scbFSH.

- 5 La FIG. 5 Muestra el procedimiento de general de trabajo seguido para la obtención de clones de células CHO productores de scbFSH.

La FIG. 6 Muestra un *Western blot* donde se detecta la expresión de scbFSH a partir de cuatro clones productores preseleccionados. En cada carril se aplicaron 100 microlitros de medio de cultivo condicionado de cada uno de los clones.

- 10 La FIG. 7 muestra un cromatograma de purificación de FSH recombinante bovina de simple cadena, donde NoB corresponde a la proteína no unida, W, corresponde al pico de proteínas posterior al lavado de la columna, y E corresponde al pico de proteínas posterior de añadir el buffer de elución.

- 15 La FIG. 8 muestra una electroforesis de SDS-PAGE (A) y un *Western blot* (B) de scbFSH con los resultantes de la purificación de ésta, donde In es la muestra de entrada (medio de cultivo con FSH recombinante bovina de simple cadena), NoB corresponde a la proteína no unida, W (lavado) corresponde al pico de proteínas posterior al lavado de la columna, E corresponde al pico de proteínas posterior de añadir el buffer de elución.

- 20 La FIG. 9 muestra el perfil de oligosacáridos N-enlazados a la molécula purificada de FSH recombinante bovina de simple cadena. **(A)** Abundancia relativa de oligosacáridos totales N-enlazados a la glicoproteína purificada. **(B)** Oligosacáridos tratados con la enzima neuroaminidasa, que remueve el monosacárido ácido siálico terminal.

- 25 La FIG. 10 muestra la comparación del análisis de pureza de FSH recombinante bovina de simple cadena con respecto a la FSH comercial Folltropin-V®.

- La FIG. 11 muestra el resultado de un ensayo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos con FSH recombinante bovina de simple cadena. **(A)** medio de maduración sin FSH, **(B)** medio de maduración conteniendo 1 µg/mL de FSH Folltropin-V®, **(C)** medio de maduración conteniendo 0,01 IU/mL Pluset, **(D)** medio de maduración que contiene 1,5 ng/mL de FSH recombinante bovina de simple cadena.
- 30

La FIG. 12 es una imagen ilustrativa de los folículos detectados mediante ultrasonografía transrectal, en bovinos tratados con FSH recombinante bovina de simple cadena.

5 Descripción detallada de la invención

- La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina, una secuencia polipeptídica sintética de dicha hormona folículo estimulante recombinante bovina, una composición farmacéutica que la contiene, y su uso para incrementar la reproducción en bovinos y otros ungulados. La ventaja de la presente hormona recombinante es su larga vida media demostrada *in vivo*, particularmente en bovinos, los cuales además tienen una respuesta biológica significativamente superior a la respuesta que usualmente se obtiene con hormonas comercialmente disponibles hasta la fecha.
- Todos los términos técnicos y científicos utilizados para describir la presente invención tienen el mismo significado entendido para una persona con conocimientos básicos en el campo técnico en cuestión. No obstante, para definir con más claridad el alcance de la invención marcado por las reivindicaciones, a continuación se incluye una lista de la terminología utilizada en esta descripción.
- Se debe entender por el término “FSH” corresponde a la sigla en inglés de Hormona Folículo Estimulante, como un polipéptido glicoproteico que se produce en la hipófisis cuya vida media de la hormona en su estado natural es de entre 2 a 4 horas. Esta hormona estimula el crecimiento y desarrollo folicular, y se utiliza comúnmente para inducir la superovulación en ungulados.
- El término “subunidad alfa” corresponde a la subunidad alfa del heterodímero correspondiente a la hormona folículo estimulante, la cual es común a varias proteínas como la hormona luteinizante (LH) u otras hormonas. A su vez, el término “subunidad beta” corresponde a la subunidad beta del heterodímero correspondiente específicamente a la hormona folículo estimulante.
- Se debe entender por el término “secuencia de nucleótidos” o “polinucleótidos”, una doble hebra de ADN, o una hebra simple de ADN, natural o sintética, o productos

de la transcripción de dicho ADN (por ejemplo, moléculas de ARN). A su vez, “secuencia de ADN que codifica un producto de interés”, se debe entender como una secuencia de nucleótidos que transcribe una molécula de ARN funcional, o que codifica un péptido, polipéptido o una proteína funcional de interés para la presente invención. Se debe entender, que la presente invención no se relaciona a secuencias de nucleótidos genómicos en su estado natural, sino que se refiere a secuencias de nucleótidos en un estado aislado, o purificado, o parcialmente purificado, sintético o recombinante, obtenida mediante cualquier método de ingeniería genética conocido en el estado de la técnica.

- Se debe entender por el término “secuencia de péptidos” o “polipéptidos” una secuencia de aminoácidos, natural o sintética, o productos de la traducción de ARN. Cuando estos polipéptidos tienen una estructura estable y tridimensional se denominan proteínas.

El término “recombinante” se refiere a cualquier secuencia nucleotídica (ADN, ARN) o aminoacídica modificada mediante cualquier método de ingeniería genética conocido en el estado de la técnica, que genera como resultado una nueva secuencia nucleotídica o aminoacídica distinta a la que se encuentra en la naturaleza.

Se debe entender por el término “identidad” o “similitud” entre secuencias de nucleótidos, el porcentaje de nucleótidos idénticos que las secuencias comparadas comparten entre sí, en una ventana particular de comparación. El porcentaje de identidad se puede calcular utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Por ejemplo, las secuencias y porcentajes de identidad se pueden obtener utilizando recursos informáticos disponibles en Internet como el programa computacional BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) o el programa computacional FastDB. La identidad de secuencias también se puede determinar mediante ensayos de hibridación de estas. Mientras mayor sean los grados de astringencia de hibridación utilizados en el ensayo, mayor será la complementariedad de las secuencias requerida para que éstas hibriden. Las condiciones de alta astringencia están descritas por Sambrook y colaboradores. (Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989).

Se debe entender por el término “construcción de ADN” o “casete de expresión”, una secuencia de nucleótidos creada de forma artificial mediante herramientas ingeniería genética, que generalmente comprende una secuencia promotora de la transcripción, unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés, y adyacente a la misma, una secuencia de ADN de corte y poliadenilación. Para que esta construcción de ADN se exprese en un hospedero apropiado, en el caso de la presente invención, una célula eucariota, o un organismo superior, debe insertarse en un vector de expresión, el cual contiene todas secuencias de ADN necesarias para la adecuada expresión dentro de dicho hospedero, junto con una serie de marcadores moleculares que permitan detectar y seleccionar aquellos hospederos que han sido transformados.

El término “secuencia espaciadora” corresponde a una secuencia de nucleótidos que une secuencias de genes que codifican proteínas multiméricas que en la naturaleza se unen mediante enlaces no covalentes. De esta manera, la secuencia espaciadora permite obtener una proteína multimérica de simple cadena sin interferir en la actividad biológica propia de dicha proteína. El término “secuencia espaciadora” también puede referirse a la secuencia peptídica que es codificada por la secuencia espaciadora polinucleotídica. En particular para la presente invención, la secuencia espaciadora une las secuencias beta y alfa de la hormona folículo estimulante recombinante bovina, manteniendo las propiedades estéricas de plegamiento de ambas subunidades y sin interferir en la unión de esta molécula al receptor, generando así una cadena aminoacídica única.

Se debe entender por el término “célula transducida”, una célula hospedera sometida al proceso de transducción mediante el cual se incorpora una secuencia de ADN exógena. Dicha célula puede ser una célula somática eucariota o un embrión.

El término “ungulados” son mamíferos placentarios se apoyan y caminan con los extremos de los dedos, y que puede o no estar revestido por una pesuña. Algunos ejemplos de ungulados son animales para ganado tales como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, cérvidos, entre otros, sin limitarse a los previamente mencionados.

Se debe entender por el término “superovulación” al número aumentado de folículos ovulados o a la producción de múltiples embriones por la inyección de FSH.

Se debe entender por el término “cantidad efectiva” a la cantidad de FSH que debe administrarse para que produzca el efecto deseado.

- 5 Como se ha descrito, un primer objeto de la presente invención se refiere a una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una FSH recombinante bovina de simple cadena. Ésta secuencia se diseñó sin alterar la estructura tridimensional de la secuencia polipeptídica codificada en la secuencia polinucleotídica sintética. Para lograr dicha secuencia que codifica la FSH recombinante bovina de simple
- 10 cadena, se unió la cadena alfa con la cadena beta de la FSH, de forma tal que la unión cumpliera con dos requisitos fundamentales: (1) que ambas subunidades conservaran suficiente libertad estérica con el fin de no afectar su plegamiento y capacidad de ensamblaje, tal como ocurre naturalmente con el heterodímero, y (2) que el péptido resultante de la secuencia enlazadora no afectara la interacción con
- 15 la unión de la FSH recombinante con su receptor. Bajo estos requisitos, se obtuvo una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena que comprende: (i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de esta con al
- 20 menos 85% de identidad de secuencia con esta; unida covalentemente a (ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de esta con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y unida covalentemente a (iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos,
- 25 el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de esta con al menos 85% de identidad de secuencia con esta. Al estar covalentemente unidas estas tres secuencias o sus variantes, se forma una configuración del tipo subunidad de FSH (beta)-linker-(alfa).
- Si bien se menciona que preferentemente la SEC ID No. 1 corresponde a la
- 30 subunidad beta de la secuencia de la subunidad beta de la FSH de *Bos taurus*, la presente invención no se limita al uso de dicha secuencia y puede utilizarse la secuencia de la subunidad beta de cualquier otro ungulado. De igual forma, si bien

la modalidad preferida de la invención es la SEC ID No. 2 correspondiente a la subunidad alfa de la secuencia de la subunidad alfa de la FSH de *Bos Taurus*, la presente invención no se limita al uso de dicha secuencia y puede utilizarse la secuencia de la subunidad alfa de cualquier otro ungulado. A su vez, la secuencia
5 espaciadora SEC ID No. 3 puede provenir de cualquier otra secuencia o ser cualquier secuencia espaciadora conocida en el estado de la técnica, con la condición de que dicha secuencia sea lo suficientemente flexible para permitir el correcto plegamiento de las dos subunidades de la FSH recombinante bovina de simple cadena.

- 10 Las variantes de las secuencias SEC ID No. 1, SEC ID No. 2 y SEC ID No. 3, pueden tener una identidad de al menos el 80% con la secuencia original, donde preferentemente tienen una identidad de secuencia de al menos un 85%, aún más preferentemente al menos un 95% de identidad, donde independiente de las variaciones que sufran las secuencias originales, estas mantienen su función
15 biológica.

La primera secuencia polinucleotídica sintética mencionada que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, incluye en su extremo 5' una secuencia que codifica una señal de secreción endógena, aunque en otra modalidad preferida la secuencia
20 polinucleotídica podría tener una señal de secreción heteróloga. Esta secuencia señal permite que cuando la secuencia polinucleotídica de la presente invención sea transducida a una célula a través de un vector de expresión, ésta sea secretada al medio para ser purificada fácilmente. En particular, la secuencia nucleotídica que codifica esa señal de secreción endógena corresponde a las primeras 54 bases
25 de la SEC ID No. 1.

Por otra parte, el segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2, incluye en su extremo 3' una secuencia que codifica una región de múltiples histidinas, aunque en otra modalidad preferida la secuencia polinucleotídica podría
30 no tener dicha región, o tener otro tipo de región como el del sistema Strep-tag®. En particular, esta región comprende entre 6 y 10 histidinas, preferentemente 6 histidinas, y que se utiliza para la purificación de la FSH recombinante bovina de

simple cadena. Particularmente, la secuencia nucleotídica que codifica esta región corresponde a las últimas 27 bases de la SEC ID No. 2.

En una modalidad preferida, la secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la secuencia identificada como SEC ID No. 4. Esta secuencia está formada por la unión de las secuencias nucleotídicas SEC ID No. 1, SEC ID No. 2 y SEC ID No. 3, que incluyen la secuencia nucleotídica que codifica la señal de secreción endógena que forma parte de la SEC ID No. 1, y la secuencia que codifica la región de histidinas que forma parte de la SEC ID No. 2.

Un segundo objeto de la presente invención es un vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a:

(i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, más preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia;

(ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de la especie *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, más preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia; y

(iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, más preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia; y

(iv) una secuencia de corte y poliadenilación.

Particularmente, en una modalidad preferida el vector previamente mencionado es un vector lentiviral, pero puede utilizarse un vector plasmídico, o cualquier vector de expresión conocido en el estado de la técnica para estos fines.

En una modalidad preferida, el vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la SEC ID No. 4 y una
5 secuencia de corte y poliadenilación. En una modalidad preferida, la construcción de ADN también incluye una proteína para la detección de la expresión, que preferentemente en ese caso se utiliza la proteína fluorescente verde (GFP), sin limitarse a este marcador en particular. Las secuencias nucleotídicas que codifica la SEC ID No. 4 y la secuencia que codifica la proteína fluorescente verde se
10 encuentran bajo el mismo promotor inmediato temprano de citomegalovirus, aunque puede utilizarse cualquier otro promotor adecuado de aquellos ya conocido en el estado de la técnica. En esta modalidad preferida, la secuencia nucleotídica que codifica la proteína fluorescente verde se utiliza sólo para detectar el nivel de expresión, para seleccionar mediante fluorescencia aquellos clones de células
15 transducidas que expresan los niveles más altos de la proteína de interés, en este caso particular, la FSH recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 4. Posteriormente y con metodología estándar de laboratorio, se elimina la proteína fluorescente verde con el fin de obtener sólo la FSH recombinante bovina de simple cadena.

20 Un tercer objeto de la presente invención es una célula transducida que expresa una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende un vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica dicha hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, donde dicho vector comprende una construcción de ADN que contiene:
25 una secuencia promotora operativamente unida a:

(i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo
30 estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

5 (iv) una secuencia de corte y poliadenilación.

En una modalidad preferida, la célula transducida es una célula de ovario de hámster chino, aunque la invención no está limitada a esta célula hospedera. Se contempla posibilidad de transducción de otros tipos celulares tales como: HEK 293, NS0, BHK-21, PER.C6 o U937. Es más, se puede utilizar cualquier sistema de expresión de proteínas recombinante, tales como sistema de expresión en células de insectos, levaduras, algas, animales genéticamente modificados o incluso en sistemas libres de células.

En una modalidad preferida, la célula transducida con el vector para la expresión de una secuencia polinucleotídica sintética que codifica una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la SEC ID No. 4 y una secuencia de corte y poliadenilación. Preferentemente, el vector de expresión que se utiliza para la transducción de las células es el vector de expresión lentiviral mencionado previamente.

20 Un cuarto objeto de la presente invención es una secuencia polipeptídica sintética de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende:

(i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia

SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación.

Las variantes de las secuencias SEC ID No. 5, SEC ID No. 6 y SEC ID No. 7, pueden tener una identidad de al menos el 80% con la secuencia original, donde
5 preferentemente tienen una identidad de secuencia de al menos un 85%, aún más preferentemente al menos un 95% de identidad, donde independiente de las variaciones que sufran las secuencias originales, estas mantienen su función biológica.

Si bien se menciona que preferentemente la SEC ID No. 5 corresponde a la
10 subunidad beta de la secuencia de la subunidad beta de la FSH de *Bos taurus*, la presente invención no se limita al uso de dicha secuencia y puede utilizarse la secuencia de la subunidad beta de cualquier otro ungulado. De igual forma, si bien la modalidad preferida de la invención es la SEC ID No. 6 correspondiente a la subunidad alfa de la secuencia de la subunidad alfa de la FSH de *Bos Taurus*, la
15 presente invención no se limita al uso de dicha secuencia y puede utilizarse la secuencia de la subunidad alfa de cualquier otro ungulado. A su vez, la secuencia espaciadora SEC ID No. 7 puede provenir de cualquier otra secuencia o ser cualquier secuencia espaciadora conocida en el estado de la técnica, con la condición de que dicha secuencia sea lo suficientemente flexible para permitir el
20 correcto plegamiento de las dos subunidades de la FSH recombinante bovina de simple cadena, y que contenga al menos 2 sitios de N-glicosilación.

Preferentemente, el primer polipéptido de secuencia SEC ID No. 5 incluye en su extremo amino terminal una secuencia señal de secreción endógena, aunque no es necesaria la presencia de dicha secuencia señal. En otra realización de la
25 presente invención. La SEC ID No. 5 podría no contener dicha secuencia señal pues no es relevante para la obtención de la FSH recombinante bovina de simple cadena. A su vez, el segundo polipéptido de secuencia SEC ID No. 6 incluye en su extremo carboxilo terminal una región de múltiples histidinas, aunque en otra modalidad preferida la secuencia polinucleotídica podría no tener dicha región, o
30 tener otro tipo de región como el del sistema Strep-tag®, que comprende 8 aminoácidos específicos, que otorgan a la proteína un método de purificación particular de proteínas.

En una modalidad preferida, la secuencia polipeptídica sintética de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la secuencia SEC ID No. 8, así como se muestra también en la FIG. 1. Los aminoácidos subrayados en el extremo amino terminal corresponden a la secuencia peptídica de señal de secreción endógena, mientras que los aminoácidos subrayados en el extremo carboxi terminal corresponden a la región de histidinas. En esta realización preferida, se muestran en negrita en la FIG.1 los sitios de N-glicosilación que incluye el péptido de la secuencia espaciadora, que permiten aumentar la vida media de esta proteína recombinante. Esta modalidad preferida permite, por una parte, que la FSH recombinante bovina de simple cadena se exprese y se secrete al medio de cultivo, lo que facilita su recolección, y por otra parte la región de histidinas permite que la proteína que se obtiene se pueda purificar fácilmente mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.

Por otra parte, la modalidad preferida de la FSH recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8 tiene una estructura tridimensional como la que se observa en la FIG. 2, mostrando que, a pesar de ser de simple cadena, esta proteína recombinante es capaz de plegarse de la misma forma que la proteína heterodimérica natural.

Un quinto objeto de la presente invención es un método para obtener una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende los pasos de:

- proporcionar una secuencia polinucleotídica sintética que codifica la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, que comprende:

(i) un primer polinucleótido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 1, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polinucleótido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 2 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polinucleótido que enlaza dichos primer y segundo polinucleótidos, el cual codifica una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 3 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

- 5 - clonar dicha secuencia polinucleotídica sintética en un vector de expresión que comprende una construcción de ADN que contiene una secuencia promotora operativamente unida a la secuencia polinucleotídica sintética una secuencia de corte y poliadenilación;
- transducir células con dicho vector de expresión y cultivar dichas células transducidas en un medio de cultivo;
- 10 - obtener dicho medio de cultivo que contiene la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena producido por las células transducidas; y
- purificar la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena del medio de cultivo.
- 15

Preferentemente, la secuencia polinucleotídica sintética que codifica la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la SEC ID No. 4., y la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena es la SEC ID No. 8.

- 20 En otra modalidad preferida, el vector de expresión utilizado en el método mencionado previamente es un vector lentiviral.

Preferentemente, las células que se transducen son células de ovario de hámster chino, en un medio preferiblemente libre de suero y libre de proteínas.

- 25 La purificación de la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena se realiza, en una modalidad preferida, mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Sin embargo, puede utilizarse cualquier método de purificación que se conozca en el estado de la técnica, sin que necesariamente las secuencias polipeptídicas contengan una región de histidinas en su extremo carboxi terminal. Es decir, puede utilizarse
- 30 técnicas de purificación de proteínas tales como separación por punto isoelectrico, pH, o una columna de intercambio iónico. También pueden separarse por tamaño

o peso molecular vía cromatografía de exclusión o SDS-PAGE, o pueden ser separadas por polaridad o hidrofobicidad a través de cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía de fase reversa.

Un sexto objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido sintético de una hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, donde dicha hormona tiene una secuencia aminoacídica que comprende:

(i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación; y excipientes farmacéuticamente aceptables

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables presentes en la composición farmacéutica son vehículos que permiten administrar el compuesto activo, en este caso, la FSH recombinante bovina de simple cadena, a un ungulado. Dichos excipientes dependerán directamente de la vía de administración que se utilice y de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas que se le quiera otorgar a la composición. Como tal, un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un aglutinante, diluyente, disgregante, lubricante o un compuesto para recubrimiento.

Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento para la superovulación de ungulados que permite aumentar la reproducción de estos, que

comprende administrar una dosis efectiva de una composición farmacéutica que comprende:

(i) un primer polipéptido que codifica la subunidad beta de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 5, o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta;

(ii) un segundo polipéptido que codifica la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante de *Bos taurus* de secuencia SEC ID No. 6 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta; y

(iii) un tercer polipéptido que enlaza dichos primer y segundo polipéptidos, que es una secuencia espaciadora derivada de la keratina 10 humana de secuencia SEC ID No. 7 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que comprende al menos 2 sitios de N-glicosilación;

donde dicha composición farmacéutica se administra en múltiples dosis distanciadas entre varias horas y durante varios días. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra cada 12 horas, durante 72 horas, siendo preferentemente la administración de una dosis de 500 μ g.

En una modalidad preferida, la composición farmacéutica comprende la secuencia polipeptídica sintética de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena de la SEC ID No. 8.

Un último objeto de la presente invención es un método para inducir la sincronización del celo en ungulados, que comprende administrar una única dosis entre 20 y 200 μ g de la composición farmacéutica previamente descrita a los animales.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por cualquier vía conocida en el estado de la técnica, aunque preferentemente se administra a través de una inyección intramuscular o una inyección intravenosa.

Los métodos de tratamiento de la presente invención permiten inducir la superovulación y sincronización del celo en ungulados, preferentemente en ganado, pero el método puede utilizarse en un gran número de especies tales como vacas, ovejas, cabras, búfalos, cerdos, jabalíes, caballos, antílopes, bisontes,

renos, llamas, alpacas, vicuñas, entre otros, sin limitarse a los previos mencionados.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención y sus modalidades preferidas, pero en ninguna circunstancia deberán considerarse para restringir el alcance de la invención, que estará definido por el tenor de las reivindicaciones que aquí se adjuntan.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Diseño y Producción de FSH bovina recombinante de simple cadena (scbFSH)

Para generar la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, se seleccionaron las secuencias que comprenden al heterómero de la FSH junto con una secuencia espaciadora o *linker*. La subunidad beta de la FSH fue seleccionada a partir de la secuencia aminoacídica de esta misma proteína de *Bos taurus*, la cual corresponde a la secuencia SEC ID No. 5. Ésta posee en su amino terminal un péptido señal de secreción endógeno y sitios de glicosilación. La subunidad alfa también fue obtenida a partir de la secuencia de esta proteína de *Bos taurus*, a la cual se le removió el péptido señal de secreción endógeno. Esta subunidad corresponde a la secuencia SEC ID No. 6. Como la FSH es un heterodímero, para seleccionar la secuencia espaciadora era necesario tomar en cuenta que ambas subunidades debían conservar suficiente libertad estérica a fin de no afectar su plegamiento y capacidad de ensamblarse adecuadamente, como lo hace el heterodímero. La secuencia espaciadora tampoco debía afectar la interacción de la FSH con el receptor. Por este motivo, se seleccionó como secuencia espaciadora una porción del Carboxilo terminal de la keratina-10 humana, a la cual se le añadió dos sitios posibles de N-glicosilación para aumentar la vida media de la hormona; esta secuencia corresponde a la SEC ID No. 7. Posteriormente, *in silico* se generó una secuencia lineal que comprende la subunidad beta (SEC ID No. 5), la secuencia espaciadora (SEC ID No. 7) y la subunidad alfa (SEC ID No. 6). Con esta secuencia aminoacídica, mediante la optimización de codones *in silico* para su expresión en células humanas, se generó una secuencia de ADN. La optimización de los codones fue realizada por la

empresa Genscript (<http://www.genscript.com/>). La secuencia génica resultante de este proceso corresponde a la SEC ID No. 4, la cual fue sintetizada y clonada en el vector de expresión pLWC-LGL. El mapa del vector resultante se puede observar en la FIG. 3. Este vector es del tipo lentiviral que contiene un casete de expresión bicistrónico, donde bajo el mismo promotor de CMV (citomegalovirus) se encuentra la secuencia de la scbFSH y la proteína fluorescente verde (GFP), separadas por una secuencia iRES (Sitio Interno de Entrada al Ribosoma). Ésta última, se encuentra flanqueada por sitios LoxP, para su posterior escisión por la recombinasa CRE, luego de haber seleccionado el mejor clon por la expresión de GFP. Con esta estrategia, se pueden incorporar más copias del transgén en el genoma de la célula, seleccionar los clones que más producen la hormona en base a la intensidad de fluorescencia, escindir el GFP manteniendo la expresión de scbFSH y posteriormente, incorporar nuevas copias del transgén repitiendo el proceso. La FIG 4 muestra un esquema detallado del casete de expresión y de los procesos biológicos de transcripción, traducción, y recombinación involucrados en la producción de clones estables con este casete.

El vector pLCW-scbFSH, el cual ya contiene la secuencia scbFSH clonada, fue cortado con las enzimas de restricción EcoRI, Sall, Pst, NaeI y NgoMIV, para evaluar su correcto clonamiento. En la FIG. 5, se muestra el patrón de digestión con cada una de las enzimas antes mencionadas, en un gel de agarosa al 1% p/v.

Habiendo generado este vector, éste se transfectó en conjunto con 3 vectores ayudantes comerciales pLP1, pLP2 y pLP/VSVF, en células HEK293FT para generar las partículas lentivirales, utilizando polímeros catiónicos (polietilenimina, PEI). Estas partículas se extrajeron del medio de cultivo a las 48 horas post-transfección, se concentraron mediante ultra centrifugación a 23000 rpm durante 1 hora y 30 minutos, y se almacenaron a -80 °C.

Utilizando las partículas lentivirales que contienen el vector con la secuencia para scbFSH, se realizó la transducción de la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO), donde se seleccionaron las poblaciones celulares transducidas, que posean la mayor intensidad de fluorescencia (GFP) a través de citometría de flujo con Cell Sorter. Posteriormente, cada clon aislado se caracterizó en cuanto a la cantidad de scbFSH acumulada en su medio de cultivo.

La scbFSH acumulada en el medio de cultivo de cada uno de los clones preseleccionados se determinó empleando el Bovine FSH ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, inc). Los resultados del ELISA se tomaron como base calcular la productividad específica (Qp) de cada clon, o sea, la cantidad de scbFSH producida por cada célula en un lapso de 24 horas. El clon que mostraba mejores niveles de expresión se transfectó con la recombinasa CRE para escindir la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde, y se usó como base para nuevas rondas de transducción con el vector pLCW-scbFSH. La FIG. 5 muestra un esquema general del procedimiento de inserción secuencial de copias del transgén.

Después de tres rondas de transducción/recombinación, se preseleccionaron cuatro clones para el análisis de expresión de scbFSH. La productividad específica de cada uno de estos clones se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Producción scbFSH por día para cada clon analizado.

Clon	scbFSH (pg/célula por día)
1	32
2	21
3	30
4	19

En la FIG. 6, se muestra un ensayo de *Western blot* donde se detecta la scbFSH contenida en 100 microlitos del medio condicionado de los clones seleccionados. Con los resultados del ELISA y del *Western blot* se seleccionó el Clon 1, para continuar a las siguientes etapas de escalado y purificación de scbFSF. A este clon se le denominó CHO-scbFSH.

El clon CHO-scbFSH se adaptó a condiciones de crecimiento en medio libre de suero HyClone SFM4CHO. Las condiciones de cultivo se establecieron en frascos spinner de 250 mL usando temperaturas entre 35 y 37°C en medio SFM4CHO suplementado con 4mM de glutamina. La células adaptadas a suspensión se transfirieron a un biorreactor a escala de 10 litros (Sistema de fermentación Winpack, FS-07 series). En los cultivos se mantuvieron a 35 grados con una

densidad celular promedio de 2×10^6 células/mL, y una tasa de perfusión 1 volumen por día.

El medio colectado se clarificó mediante filtración secuencial a través de 5 y 0,4 micrómetros. El medio clarificado se almacenó a -80°C hasta su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

Ejemplo 2: Purificación de FSH bovina

La scbFSH contenida en el medio de cultivo se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos usando una matriz Ni Sepharose High Performance, en una columna XK 50/20 (GE healthcare). La cromatografía se realizó en un equipo AKTA PRIME PLUS (GE Healthcare). El medio de entrada se suplementó con 30 mM de imidazol y se ajustó a pH7,4. Para separar proteínas contaminantes, la columna se lavó con 100 mM de imidazol en buffer fosfato. La elución se realizó a 200 mM de imidazol. La FIG. 7 muestra el cromatograma de la purificación. El pico marcado con la letra E corresponde a la fracción eluída donde se encuentra la scbFSH de la presente invención en su forma purificada. Se realizaron ensayos de SDS-PAGE y *Western Blot* para detectar la presencia de la hormona en cada una de las fracciones obtenidas en la purificación (FIG. 8). Se pudo corroborar que la totalidad de la scbFSH eluyó a 200 mM de imidazol. No se observaron pérdidas de la hormona en la fracción correspondiente a las proteínas no-unidas (Nob), ni en la fracción de lavado (W).

La scbFSH purificada se diafiltró contra buffer fosfato, se cuantificó, y se liofilizó en botellas de vidrio para posteriores usos.

Ejemplo 3: Análisis del perfil oligosacarídico de la scbFSH purificada

En correspondencia con su secuencia de aminoácidos, la molécula scbFSH debería tener un peso molecular de 26,6 kDa. Sin embargo, esta molécula posee un total de 6 sitios potenciales de N-glicosilación. Cuatro de estos sitios son endógenos, mientras que los restantes dos se incorporaron como parte de la secuencia espaciadora o linker que une a las cadenas alfa y beta. Los N-glicanos incorporados a estos sitios suelen ser de tamaño y composición heterogénea, aportando un peso

adicional de entre 3,5 y 5 kDa cada uno. Así, si se considera que los 6 sitios de N-glicosilación han sido ocupados, entonces, la suma de los pesos aportando por concepto de N-glicosilación debería oscilar entre los 21 y 30 kDa, generando una molécula con un peso molecular heterogéneo entre los 48 y 57 kDa. Los ensayos de SDS-PAGE y *Western Blot* demuestran que efectivamente, la scbFSH migra como una banda difusa por encima de los 48 kDa, lo que sugiere que los 6 sitios potenciales de N-glicosilación podrían estar ocupados (Figs 6 y 8).

Para analizar su perfil de oligosacáridos, la molécula scbFSH se digirió con la enzima PNGasa F. Los oligosacáridos liberados se separaron mediante cromatografía líquida en fase normal (NP-HPLC) en una columna TSK-Gel Amide-80 (Tosoh Biosep, Japón). Estos oligosacáridos también se sometieron a una digestión con la enzima neuroaminidasa, a fin de remover los ácidos siálico terminales y determinar así el grado de *sialilación* de los azúcares N-enlazados. La FIG. 9 muestra los cromatogramas de los oligosacáridos N-enlazados antes y después de ser digeridos con la enzima neuroaminidasa. En la sección B de esta figura se observa la desaparición de los picos con mayor tiempo de retención, lo cual evidencia que los oligosacáridos N-enlazados a la scbFSH (sección A) son altamente sialilados. El grado de sialilación de una glicoproteína es relevante, pues el ácido siálico en los extremos de las cadenas oligosacáridicas, evita que la molécula sea captada por los receptores de manosa y galactosa del hígado, protegiendo así la molécula de la metabolización hepática.

Ejemplo 4: Comparación de scbFSH con FSHs comerciales que se utilizan en actualmente en bovinos.

El mercado actual de la FSH para el sector agropecuario está dominado por dos productos comerciales fundamentales: Pluset (25%) y Folltropin-V (70%). Sin embargo, estos productos, como se ha explicado previamente, se extraen de la hipófisis de cerdos, con las consiguientes desventajas vinculadas a los mismos. Puesto que son los únicos productos disponibles para realizar los análisis comparativos pertinentes, para mostrar la viabilidad como alternativa de la scbFSH de la presente invención se llevaron a cabo los siguientes estudios:

a) Pureza y movilidad electroforética

Se evaluó la pureza y movilidad electroforética de scbFSH en comparación con su par comercial Folltropin-V®. Ambas moléculas se sometieron a ensayos de SDS-PAGE y *Western blot*.

En la FIG. 10 muestra la comparación del análisis de pureza de scbFSH con respecto a la FSH comercial Folltropin-V®. **(A)** SDS PAGE al 10%, **(B)** *Western blot* usando un anticuerpo anti cadena beta de la FSH. Para A y B, se aplicaron en el gel cantidades variables de la hormona comercial Folltropin-V® (1, 5, 10, 20 µl), y una cantidad fija de 10 µl de la scbFSH. Ambas hormonas se encontraban a la misma concentración (aprox. 100 µg/mL). **(C)** SDS PAGE al 10% donde se aplican 5, 10 y 20 µg de la scbFSH. **(D)** Determinación de pureza de scbFSH mediante cromatografía en gel filtración en HPLC. La cromatografía en HPLC muestra un único pico que evidencia el alto nivel de pureza de la muestra.

El SDS-PAGE permitió demostrar que la scbFSH producida por vía recombinante es un producto altamente puro, lo cual también se pudo evidenciar mediante de cromatografía en gel filtración en HPLC, donde se pudo observar un único pico. En el ensayo de *Western blot*, Folltropin-V® muestra una banda inmunorreactiva de aproximadamente 23 kDa, resultado de la disociación de las cadenas alfa y beta, mientras que la scbFSH muestra una banda inmunorreactiva en torno a los 50 kDa correspondiente a la suma de los pesos de los pesos de las cadenas alfa y beta de la FSH bovina (aprox. 26,6 kDa), más 21 a 30 kDa adicionales por concepto de N-glicosilación.

b) Actividad Biológica (maduración *in vitro* de ovocitos bovinos)

La actividad biológica de la scbFSH producida por vía recombinante se evaluó en un ensayo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. En este ensayo también se evaluaron las contrapartes comerciales Folltropin-V® y Pluset®. Para ello los ovocitos se aspiraron a partir de ovarios de vacas sacrificadas en matadero. Después de centrifugar a 3000 g durante 10 minutos, se seleccionaron aquellos ovocitos con cúmulus de al menos cinco capas de células, y se lavaron tres veces en medio de lavado (medio Tyrode's con solución tampón HEPES y suplementado con 0,3% de BSA, 0,2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/mL de gentamicina). Una vez lavados, grupos de 25 ovocitos se transfirieron a gotas de 100 µl de medio de maduración (SOF suplementado con 0,8% de BSA, 0,33 mM de piruvato de sodio,

1X aminoácidos esenciales MEM, 1X aminoácidos no-esenciales MEM, 1 mM de glutamina, 5 µg/mL de LH, 1 µg/mL de 17β-estradiol y 50 µg/mL de gentamicina), suplementado, o no, con FSH. Los ovocitos se cultivaron durante 24 horas a 38,5° C, en 5% de CO₂ y 95% de humedad. Pasado este tiempo, los ovocitos se analizaron mediante microscopía y la expansión de los cúmulos se tomó como criterio de maduración inducida por la FSH. En la FIG. 16 se muestran los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se utilizaron los siguientes controles: (A) medio de maduración sin FSH, (B) medio de maduración conteniendo 1 µg/mL FSH Folltropin-V®, (C) medio de maduración conteniendo 0.01 IU/mL Pluset®, (D) medio de maduración conteniendo 1,5 ng/mL scbFSH.

La expansión de los complejo cúmulo-ovocitos, así como la extrusión del primer cuerpo polar se tomaron como criterio de maduración. Este ensayo demostró que las tres hormonas son biológicamente activas, en cuanto su capacidad para inducir maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (FIG. 11). No se observaron diferencias significativas en las tasas de maduración entre las hormonas.

c) Actividad Biológica (Inducción de superovulación en ovinos)

La actividad biológica de la scbFSH producida por vía recombinante también se evaluó mediante un ensayo de superovulación en ovinos. En el ensayo también se evaluaron las contrapartes comerciales Folltropin-V® y Pluset® siguiendo, para cada hormona, protocolos consensos según se describe en la tabla a continuación. El ensayo se realizó en ovejas de raza Corriedale de entre 50 y 60 kg, las cuales se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales de acuerdo a los tres tipos de hormonas evaluados. Las diferentes FSH se administraron por vía intramuscular en intervalos de 12 h en dosis decrecientes durante 96 h, comenzando 24 h antes del retiro de la esponja intravaginal con progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon®, Syntex, Argentina). Al final del esquema, se realizó ultrasonografía transrectal y se contaron los folículos con más de 10 mm de diámetro. Los resultados mostrados en la tabla a continuación demuestran que, bajo las condiciones evaluadas, la hormona scbFSH rinde mejores niveles de superovulación que sus contrapartes comerciales Folltropin-V® y Pluset®.

Tabla 2. Resultados del ensayo de superovulación en ovejas utilizando diferentes FSHs.

Hormona	Animal	Dosis/Esquema	No. Folículos	Media $\pm$ Desv. Estándar
Folltropin-V [®]	1	Dosis total de 200 mg de NIH-FSH-P1 8 aplicaciones (<i>una cada 12 h</i>) en forma decreciente de la siguiente manera: 40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 y 10 mg.	10	13,6 $\pm$ 3,6
Folltropin-V [®]	2		11	
Folltropin-V [®]	3		19	
Folltropin-V [®]	4		13	
Folltropin-V [®]	5		15	
Pluset [®]	6	Dosis total de 300 UI 8 aplicaciones (<i>una cada 12 h</i>) en forma decreciente de la siguiente manera: 60, 60, 45, 45, 30, 30, 15 y 15 IU.	13	10,8 $\pm$ 3,7
Pluset [®]	7		7	
Pluset [®]	8		16	
Pluset [®]	9		10	
Pluset [®]	10		8	
scbFSH	11	Dosis total de 250 μ g 8 aplicaciones (<i>una cada 12 h</i>) en forma decreciente de la siguiente manera: 50, 50, 37.5, 37.5, 25, 25, 12.5 y 12.5 μ g.	15	17 $\pm$ 2,9
scbFSH	12		20	
scbFSH	13		18	
scbFSH	14		13	
scbFSH	15		19	

La capacidad de la scbFSH para inducir superovulación en ganado bovino se evaluó en cinco vacas de raza frisón rojo mayores de 5 años de edad con seguimiento de ciclo estral previo a la prueba de campo, determinándose un promedio de 20 días para los animales en estudio y mantención de alimentación *ad libitum* en pradera de trébol ballica.

Se siguió un esquema de superovulación con scbFSH de 96 horas, comenzando en el día 4 después de implantar un dispositivo intravaginal bovino, impregnado con progesterona (*Syntex*). En el esquema de superovulación se usó una dosis total de 500 μ g de scbFSH dividida en 8 dosis de 62,5 μ g cada una, administradas a intervalos de 12 horas. En el día 7 se administraron 5 ml de Lutalyse (Zoetis), y en el día 9 se realizó ultrasonografía transrectal para contar el número total de folículos mayores a 10 mm de diámetro, tanto del ovario izquierdo (OI) como del ovario derecho (OD). Los resultados de este ensayo se recogen en la Tabla 3 a continuación, donde se muestra el número de folículos por ovario, y por animal 24 horas después de haber concluido la inducción hormonal.

Tabla 3. Resultados de ensayo de superovulación en ovinos usando scbFSH

Vaca 1		Vaca 2		Vaca 3		Vaca 4		Vaca 5	
OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD
9	11	10	13	9	11	13	12	11	14
22,6 ± 2,5 folículos/animal									

El ensayo de superovulación en bovinos rindió una respuesta ovárica promedio de $22,6 \pm 2,5$ folículos con un tamaño superior a los 10 mm. Este tipo de respuesta es significativamente superior a la respuesta que usualmente se obtiene con las hormonas comerciales, donde el número de folículos oscila entre los 10 y 17 por animal.

La respuesta ovulatoria en bovinos también constituye una evidencia de la capacidad de la hormona scbFSH para inducir sincronización del celo como paso previo a la inseminación artificial en tiempo fijo (IATF), demostrando el potencial de esta hormona para aplicaciones de reproducción asistida donde se requiere sincronizar el acotar el periodo donde ocurre los nacimientos.

En la FIG. 12 se muestra una imagen ilustrativa de los folículos detectados mediante ultrasonografía transrectal y el tamaño de los mismos.

Ventajas de la solución técnica propuesta

La solución propuesta por la presente invención es una alternativa viable de FSH para emplear en el ganado bovino, que vendría a complementar los productos que actualmente se encuentran en el mercado, y que adicionalmente ofrece las siguientes ventajas:

(1) Evita el riesgo de contaminación con patógenos: Por su origen a partir de animales sacrificados, los productos comerciales tienen el riesgo de ser contaminados con patógenos o priones. En el caso de la scbFSH, por ser un producto recombinante, este riesgo no existe.

(2) No existe contaminación con hormona luteinizante (LH): Todas las FSH obtenidas de hipófisis tienen a la molécula LH como contaminante. Algunas de estas preparaciones, incluso declaran el efecto de la LH. El contenido de LH afecta la eficiencia del proceso de superovulación, afecta la eficiencia de la fertilización y afecta además la calidad de los embriones. En el caso de la scbFSH, por ser un producto recombinante, no tendría este contaminante.

(3) Largo tiempo de vida media en circulación: Las moléculas de FSH actualmente en el mercado tienen un tiempo de vida media en circulación en torno a las 5 horas. Este corto tiempo de vida media obliga a establecer

protocolo de superovulación que implican ocho inyecciones (dos inyecciones por día, durante 4 días). El tiempo de vida media en circulación de la scbFSH está en torno a las 10-13 horas, lo que permite establecer protocolos de superovulación de una sola dosis diaria por 4 días.

- 5 (4) Poco riesgo de inducir respuesta inmune en bovino: Por su origen porcino, las actuales moléculas de FSH pueden inducir una respuesta inmune humoral cuando se administran en otras especies (incluyendo bovinos). En el caso de la scbFSH, por su origen bovino, no tiene posibilidades de inducir respuesta inmune cuando se usa en esta especie.