



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 245**

51 Int. Cl.:
A61K 38/24 (2006.01)
A61P 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717460 .2**
96 Fecha de presentación : **04.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1610803**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **LH para su uso en el mantenimiento de uno o más embarazos mediante la inducción de la formación de un cuerpo lúteo accesorio.**

30 Prioridad: **04.03.2003 US 452297 P**
31.10.2003 US 516002 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es: **ASPENBIO PHARMA, Inc.**
1585 South Perry Street
Castle Rock, Colorado 80104, US

72 Inventor/es: **McSweeney, Kevin;**
Colgin, Mark;
Newman, Diane;
Roth, Jay. W. y
Hurst, Roger

74 Agente: **Isern Cuyás, María Luisa**

ES 2 358 245 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

LH para su uso en el mantenimiento de uno o más embarazos mediante la inducción de la formación de un cuerpo lúteo accesorio.

5 Existen más de nueve millones de vacas lecheras en Estados Unidos, más de un millón en Canadá y más de cincuenta millones en el mundo. La industria lechera es extremadamente competitiva y la capacidad de una granja para mantener gestaciones después de la inseminación es crítica para la rentabilidad del productor. Se estima que el coste de una vaca no preñada es de aproximadamente cinco dólares al día. Se estima además que las inseminaciones
10 actuales resultan en alrededor de un treinta a un cuarenta por ciento de vacas preñadas el día 45 y de entre estas vacas, del noventa al noventa y cinco por ciento da a luz a terneros al final del período de gestación de 283 días. La eficacia reproductora en las vacas lecheras ha ido disminuyendo constantemente durante un período de tiempo prolongado. La magnitud y la firmeza de esta tendencia son de gran importancia para la industria lechera y alcanzan una disminución constante de aproximadamente el uno por ciento en los índices de concepción al primer servicio al año durante los
15 últimos diez años. El impacto de este cambio en la productividad no se ha evidenciado fácilmente, debido a que la producción de leche de vaca individual ha aumentado de un veinte por ciento durante el mismo período. A la larga, la industria lechera no puede permitirse continuar con el índice actual de disminución del rendimiento reproductor.

20 La fuente de ingresos primarios en la industria lechera es la producción de leche. El progreso en genética y gestión de vacas lecheras ha conducido a incrementos notables en la producción de leche durante las últimas varias décadas, con un veinte por ciento de aumento en la producción por vaca en los últimos diez años solo (USDA National Agricultural Statistics Service, <http://www.usda.gov/nass>). Con el fin de mantener una alta productividad del rebaño, sin embargo, las vacas deben estar preñadas y dar a luz a un ternero para que se renueve el ciclo de lactancia. Además, se deben producir suficientes números de novillas para sustituir las vacas más viejas. Por lo tanto, la futura productividad de la industria lechera depende en gran parte del mantenimiento de la fertilidad y de la reproducción.

Durante el mismo tiempo en el que ha aumentado la producción lechera por vaca, sin embargo, la eficacia reproductora de las vacas lecheras ha disminuido constantemente. Los rebaños lecheros de Colorado se sitúan entre los más productivos de la nación, y el estado figura actualmente en segundo lugar en la producción media anual por vaca
30 (USDA National Agricultural Statistics Service, <http://www.usda.gov/nass>). La industria lechera de Colorado es típica de la tendencia nacional en la disminución de fertilidad de las vacas. Desde 1992 hasta ahora, mientras la producción lechera ha aumentado de 21.000 a 24.000 libras/vaca/año, el promedio de días abiertos (días hasta la concepción) ha aumentado de 130 a 173 días. El índice de concepción al primer servicio para los rebaños de Colorado se ha reducido del 51% al 37%, y el índice de servicios por concepción ha ascendido de 2 a 2,8 durante los últimos 10 años (datos procedentes de Dairy Herd Improvement Association, www.dhiprovo.com).

La reducción de la eficacia reproductora de vacas lecheras se ha observado por todos Estados Unidos, y otras partes del mundo donde la producción lechera ha ido aumentando (Lucy, M.C., "Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end?", *J. Dairy Sci.*, 84:1277-1293, 2001; Roche, J.F. y col., "Reproductive management of postpartum cows", *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:703-712, 2000; Royal, M.D. y col., "Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility", *Anim. Sci.*, 70:487-502, 2000; y Macmillan, K.L. y col., "The effects of lactation on the fertility of dairy cows" *Aust. Vet. J.*, 73:141-147, 1996). La fuerte asociación temporal entre la producción lechera en aumento y la fertilidad en disminución no proporciona una causa conocida del fenómeno. Aunque la relación entre la producción lechera y la fertilidad parece ser antagónica (Dematawewa, C.M., y P.J. Berger, "Genetic and phenotypic parameters for 305 day yield, fertility, and survival in Holsteins", *J. Dairy Sci.*, 81:2700-2709, 1998; y Hansen, L.B., "Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint", *J. Dairy Sci.*, 83:1145-1150, 2000), algunos estudios demuestran un efecto neutro de la producción lechera de por sí (Grohn, Y.T. y P.J. Rajala-Schultz, "Epidemiology of reproductive performance in dairy cows", *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:605-614, 2000), y otros estudios muestran que rebaños de mayor producción tienen mejor rendimiento reproductor que rebaños de menor producción (Nebel, R.L. y M.L. McGilliard, "Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows", *J. Dairy Sci.*, 76:3257-3268, 1993; y Stevenson, J.S., "Can you have good reproduction and high milk yield?", *Hoard's Dairyman*, 145:202-203, 1999). Numerosas características de vacas de alta producción pueden influir negativamente en la fertilidad, incluidos el equilibrio de energía negativa y eventos de enfermedades tales como placenta retenida, cetosis, ovario cístico, y mastitis (Lucy 2001, *supra*; Grohn 2000, *supra*; y Staples, C.R. y col., "Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows", *J. Dairy Sci.*, 73:938-947, 1990). Una tendencia destacada en la industria lechera de Estados Unidos es el número reducido de granjas lecheras, el aumento constante del tamaño de los rebaños y el desplazamiento de la producción lechera hacia los estados del oeste (USDA National Agricultural Statistics Service, <http://www.usda.gov/nass>). El mayor tamaño de los rebaños puede contribuir al rendimiento reproductor reducido debido a los cambios asociados en mano de obra lechera y gestión de las vacas, resultando en trabajadores poco formados o con demasiado trabajo para identificar un comportamiento estral, realizar inseminación artificial, llevar a cabo programas de sincronización estral, e identificar y tratar vacas enfermas (Lucy 2001, *supra*). El estrés térmico, que ocurre durante la mayor parte del año en rebaños lecheros del oeste y suroeste de Estados Unidos, tiene un impacto negativo significativo sobre la fertilidad del ganado (Wolfenson, D. y col., "Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects", *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:535-547, 2000).

Estudios recientes con la detección del embarazo por ultrasonidos demuestran pérdidas embrionarias de al menos un 20% entre los 28 y 60 días de embarazo (Pursley, J.R. y col., "Effect of time of artificial insemination on pregnancy

rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows”, J. Dairy Sci., 81:2139-2144, 1998; y Vasconcelos, J.L. y col., “Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows”, Biol. Reprod., 56 (Suppl. 1):140, 1997), y existen probablemente pérdidas aún más elevadas antes de los 28 días que no se detectan mediante examen por ultrasonidos (Lucy 2001, *supra*). Los datos sugieren que las vacas lecheras modernas no logran mantener el embarazo debido al ambiente uterino subóptimo (Gustafsson, H. y K. Larsson, “Embryonic mortality in heifers after artificial insemination and embryo transfer: differences between virgin and repeat breeder heifers”, Res. Vet. Sci., 39:271-274, 1985). Aunque existan muchos factores posibles que podrían ser responsables de las pérdidas embrionarias, una causa potencial es la baja concentración de progesterona en sangre.

Se necesita la progesterona para mantener el embarazo en el ganado, y bajas concentraciones de progesterona se asocian a la infertilidad. Las concentraciones de progesterona en sangre están influidas por los índices de secreción y el metabolismo/eliminación. Existen hechos de que las vacas lecheras modernas mantienen concentraciones más bajas de progesterona en sangre que las que se midieron en el ganado hace varias décadas (Lucy, M.C. y col., “Reproductive endocrinology of lactating dairy cows selected for increased milk production”, J. Anim. Sci., 76 (Suppl. 1):296, 1998). Los cuerpos lúteos más grandes secretan más progesterona y tienen un efecto positivo sobre el reconocimiento del embarazo y velocidades de embarazo, pero se ha probado que las vacas lecheras tienen cuerpos lúteos más pequeños de lo deseable en algunas circunstancias (Lucy 2001, *supra*; Vasconcelos, J.L.M. y col., “Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate”, Theriogenology, 56:307-314, 2001). El hígado es el sitio esencial del metabolismo de la progesterona. Estudios recientes muestran que la toma aumentada de alimentos incrementa el flujo de sangre en el hígado y aumenta la velocidad de eliminación de la progesterona, reduciendo así las concentraciones de progesterona en suero (Sangsritavong, S. y col., “Liver blood flow and steroid metabolism are increased by both acute feeding and hypertrophy of the digestive tract”, J. Anim. Sci., 78 (Suppl. 1) 221, 2000; y Wiltbank, M.C. y col., “Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows”, J. Dairy Sci., 84 (Suppl. 1):84, 2001).

Poca progesterona en suero durante la fase luteal del ciclo estral estaría asociada con el bajo índice de concepción al primer servicio. Bajas concentraciones de progesterona pueden resultar de una secreción inadecuada, o alternativamente, de altos niveles de metabolismo/eliminación, aun cuando la inseminación ha producido un embrión potencialmente viable. Poca progesterona permitiría la generación de prostaglandina por el endometrio uterino alrededor del día 16 del ciclo estral, resultando en luteólisis e inducción de la ovulación, por lo tanto la muerte embrionaria y el hecho de no lograr mantener el embarazo (Binelli, M. y col., “Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle”, Theriogenology, 56:1451-1463, 2001).

Binelli y col., 2001, *supra*, revisan las estrategias antilueolíticas para mejorar la fertilidad en el ganado.

En vacas, el ciclo estral es de aproximadamente 21 días. Para determinar cuándo una vaca en su ciclo está lista para la reproducción, se puede observar el estro comportamental de la vaca. Alternativamente, se puede inducir o forzar una vaca al estro con terapias hormonales eficaces. El estro de todo un rebaño se puede sincronizar (Patentes de Estados Unidos N° 3.892.855 publicada a 1 de julio de 1975 y N° 4.610.687 publicada a 9 de septiembre de 1986; Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 60/380.042; Wilson, T.W., “Estrous Synchronization for Beef Cattle”, (junio de 2003, Bulletin 1232, the University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences and the U.S. Department of Agriculture Cooperating). La sincronización del estro, o preferentemente la sincronización de la ovulación, se utiliza en programas de reproducción por inseminación artificial a tiempo fijo (TAI). Los programas de reproducción por TAI implican la sincronización estral precisa, que permite la reproducción a tiempo fijo sin monitorear el estro comportamental. Los ejemplos de métodos para forzar el estro incluyen la patente de Estados Unidos N° 5.589.457 (publicada a 31 de diciembre de 1996), Ovsynch (Farmacia Animal Health, Peapack, NJ), Cosynch, Select Synch, Modified Select Synch, MGA/PGF, y Syncro-Mate-B. Dichos métodos emplean típicamente hormonas tales como las prostaglandinas, por ejemplo PGF2 α (Lutalyse®, Pharmacia Upjohn, Peapack, NJ; Bovilene®, Syntex; Animal Health, Des Moines, Iowa; y Estrumate® Haver Lockhart, Shawnee, Kansas), y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Ovsynch implica una inyección de GnRH seguida de una inyección de prostaglandina una semana más tarde, seguida de una segunda inyección de GnRH 48 horas más tarde. La inseminación se realiza entonces idealmente a las 12-18 horas, preferentemente alrededor de 16 horas, después de la segunda inyección de GnRH. Ovsynch es eficaz al máximo nivel cuando se lleva a cabo entre los Días 18-20 de un ciclo estral bovino de 20 días (Thatcher, W.W. y col., (2000) “New Strategies to Increase Pregnancy Rates” www.naab-css.org/education/Thatcher.html). Se puede utilizar Presynch (Farmacia Animal Health, Peapack, NJ) para sincronizar novillas antes de poner en práctica Ovsynch. Ovsynch es eficaz al máximo nivel cuando se aplica entre los Días 18-20 de un ciclo estral bovino de 20 días (estudios muestran que es mejor empezar entre los días 5 y 12). (Moreira, F. y col., (2000) “Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers”, J. Anim. Sci. 78:1568-1576, 2000; Vasconcelos JLM, y col., (1999) “Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows”, Theriogenology 52: 1067-1078, 1999). Presynch implica dos inyecciones de prostaglandina. Algunos de los métodos mencionados anteriormente se utilizan también en vacas que no están con el ciclo para inducir el ciclo, tal como en vacas lecheras lactantes. Sin embargo, estos protocolos no inducen la ciclicidad, sólo lo hace el cebado por progesterona. El único programa de sincronización que induce realmente la ciclicidad en vacas lactantes está utilizando un dispositivo de liberación interna controlada de drogas (CIDR) que libera la progesterona o el acetato de melengestrol (MGA), que es ilegal en vacas lecheras lactantes). Después de la sincronización estral precisa, los animales no necesitan ser monitoreados en su estro comportamental y se pueden reproducir por cita. Algunos animales

pueden necesitar presincronización estral antes de la sincronización estral. El acetato de melengesterol (MGATM) en la alimentación (Imwalle, D.B. y col., (1998) "Effects of melengesterol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers" Biol. Repro. 58:1432-1436) o implantes (Publicación de patente de Estados Unidos N° 2001/0041697, publicada a 15 de noviembre de 2001) se puede utilizar para presincronizar el estro en novillas. Resynch es un programa por medio del cual se sincronizan y reproducen los animales, y luego estos animales que son determinados como abiertos (no embarazados) se vuelven a sincronizar y a reproducir.

Una investigación previa ha mostrado resultados contradictorios sobre los ciclos reproductores y velocidades de concepción de las vacas que reciben hCG (Eduvie and Seguin (1982) Theriogenology 17:415-422; Helmer and Britt (1986) Theriogenology 26:683-695; Sianangama and Rajamahendran (1992) Theriogenology 38:85-96; Diaz y col., (1998) J. Anim. Sci. 76:1929-1936; Sianangama and Rajamahendran (1996) Theriogenology 45:977-990; Schmitt y col., (1996) J. Anim. Sci. 74:1074-1083; y Schmitt y col., (1996) J. Anim. Sci. 74:1915-1929).

Thatcher y col., (2001 Theriogenology 55:75-89) describen los efectos de tratamientos hormonales sobre el rendimiento reproductor del ganado. Los tratamientos hormonales incluyen la administración de somatotrofina bovina (bST) y hCG. D'Occhio y col., (2000 Anim. Reprod. Sci. 60-61:433-442) describen varias estrategias para la gestión del vacuno por medio de implantes de agonistas de la GnRH. De Rensis y col., (2002 Theriogenology 58(9):1675-1687) describen el efecto sobre las vacas lecheras de la administración de GnRH o hCG antes de la inseminación artificial. Martinez y col., (1999 Anim. Reprod. Sci. 57:23-33) describen la capacidad de la hormona luteinizante porcina (LH) y de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para inducir emergencia de la onda folicular en novillas bovinas los Días 3, 6 y 9 del ciclo estral, después de la ovulación (Día 0), sin inseminación. Santos y col., (2001 J. Animal Science 79:2881-2894) describen el efecto sobre el rendimiento reproductor de la administración intramuscular de 3.300 IU de gonadotropina coriónica humana (hCG) a vacas lecheras altamente productoras el Día 5 después de la inseminación artificial. Lee y col., (1983 Am. J. Vet. Res. 44(11):2160-2163) describen el efecto sobre vacas lecheras de la administración de GnRH en el momento de la inseminación artificial (AI). Las patentes de Estados Unidos N° 5.792.785 (publicada a 11 de agosto de 1998) y 6.403.631 (publicada a 11 de junio de 2002) describen métodos y composiciones para administrar melatonina antes y después de la inseminación para mejorar el éxito de embarazo en un animal. Chagas e Silva y col., (2002 Theriogenology 58(1):51-59) describen perfiles de progesterona plasmática después de la transferencia embrionaria en ganado lechero. Weems y col., (1998 Prostaglandins and other Lipid Mediators) describen los efectos de las hormonas sobre la secreción de la progesterona por el cuerpo lúteo (CL) procedente de vacas embarazadas y no embarazadas. La patente de Estados Unidos N° 4.780.451 (publicada a 25 de octubre de 1988) describe composiciones y métodos que utilizan la LH y la hormona foliculo estimulante (FSH) para producir la superovulación en el ganado. Farin y col., (1988 Biol. Reprod. 38:413-421) describen el efecto sobre el peso luteal ovino de la administración intravenosa de 300 IU de hCG los Días 5 y 7,5 del ciclo estral, sin inseminación. Hoyer y Niswender (1985 Can. J. Physiol. Pharmacol. 63(3):240-248) describen la regulación de la esteroidogénesis en células luteales ovinas. Juengel y Niswender (1999, J. Reprod. Fértil. Suppl. 54:193-205) describen la regulación molecular de la progesterona luteal en rumiantes domésticos. La patente de Estados Unidos N° 5.589.457 (publicada a 31 de diciembre de 1996) describe métodos para sincronizar la ovulación en el ganado por medio de la GnRH, LH y/o hCG y PGF 2α .

Las gonadotropinas forman una familia de hormonas glicoproteicas estructuralmente relacionadas. Los elementos incluyen la gonadotropina coriónica (CG), la hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), también conocida como lutropina y la hormona estimulante del tiroides (TSH). FSH, LH y TSH están presentes en la mayoría de las especies vertebradas y son sintetizadas por la glándula pituitaria. Se ha encontrado la CG solamente en primates, incluidos los humanos, y en caballos, y es sintetizada por los tejidos placentarios. Las gonadotropinas son heterodímeros de dos subunidades, α y β , que están asociadas con enlaces no covalentes. Dentro de una especie, la subunidad α es esencialmente idéntica a cada elemento de la familia de gonadotropinas. Las subunidades β son diferentes para cada elemento, pero son similares en su estructura. La subunidad β de hCG es sustancialmente más grande que las otras subunidades β , en lo que contiene 34 aminoácidos adicionales en el extremo terminal C de la proteína.

Los efectos de la LH dependen del sexo del organismo. En hembras sexualmente maduras, la LH estimula el foliculo para que secrete estrógenos en la primera mitad del ciclo menstrual. Una sobrecarga de LH desencadena la finalización de la meiosis I del huevo y la liberación del huevo (ovulación) en la mitad del ciclo estimula el foliculo ahora vacío para que se desarrolle en el cuerpo lúteo, que secreta la progesterona durante la segunda mitad del ciclo menstrual. En machos, la LH actúa en las células intersticiales de los testículos estimulándolos para que sinteticen y secreten la hormona sexual masculina, la testosterona. La LH en machos es conocida también como hormona estimulante de las células intersticiales.

La GB 1274492 describe un método para aumentar el embarazo y el porcentaje de nacimientos vivos en el que se administra gonadotropina en las 24 horas que siguen el inicio del estro, siendo inseminada la vaca 24 horas después de entrar en estro.

La producción de LH recombinante bovina se describe en WO 90/02757 (publicada a 22 de marzo de 1990), la patente de Estados Unidos N° 6.455.282 (publicada a 24 de septiembre de 2002); la patente de Estados Unidos N° 5.639.639 (publicada a 17 de junio de 1997), la patente de Estados Unidos N° 5.767.251 (publicada a 16 de junio de 1998), Nilson (1987) J. Reprod. Fértil. Suppl. 34:227-36, Boime y col., (1992) Seminars in Reprod. Endocrin. 10:45-50, y Kaetzel (1985) PNAS USA 82:7280-7283. Se describe un proceso para la purificación de la LH recombinante

ES 2 358 245 T3

en WO 01/62774 (publicada a 30 de agosto de 2001). La patente de Estados Unidos N° 5.929.028 (publicada a 27 de julio de 1999) describe gonadotropina líquida que contiene formulaciones que pueden incluir LH. Otieno y col., (2002, *Reproduction* 123(I):155-162) describe la expresión de los genes de LH en cigotos bovinos.

5 Existe la necesidad en la técnica de una terapéutica segura para mantener el embarazo de vacas post-inseminadas.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad hasta tal punto que no sean incoherentes con la presente divulgación. La cita de los documentos anteriores no pretende ser una admisión de que uno cualquiera de los anteriores sea una técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones sobre la fecha o la representación sobre el contenido de estos documentos se basa en la caracterización subjetiva de la información de la que dispone el solicitante, y no constituye admisión alguna de la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona la utilización expuesta en la reivindicación 1.

El embarazo se mantiene mediante la administración de cantidades eficaces de la hormona luteinizante (LH). La LH se puede utilizar sola o en combinación con la gonadotropina coriónica (CG) o en combinación con la hormona del crecimiento (GH) o la hormona folículo estimulante (FSH). Las hormonas se administran alrededor del Día 4 hasta alrededor del Día 7 después de la inseminación. Las cantidades eficaces de LH oscilan entre aproximadamente 10 microgramos hasta aproximadamente 25 miligramos y las de CG oscilan entre alrededor de 100 IU (unidades internacionales) y alrededor de 2000 IU. Los mamíferos tratables con las utilizaciones de esta invención incluyen los ungulados y mamíferos relacionados, incluidos los bovinos. Los kits proporcionados por esta divulgación incluyen cantidades eficaces de una o varias hormonas, un dispositivo para la administración de la(s) hormona(s) e instrucciones.

25 Esta divulgación proporciona asimismo un método para sincronizar la ovulación en un rebaño de animales hembras, comprendiendo dicho método: la administración de la hormona luteinizante a los animales de dicho rebaño, preferentemente mediante inyección intramuscular. La sincronización de la ovulación puede sincronizar el estro; sin embargo, los animales pueden reproducirse, por ejemplo, mediante inseminación artificial, sin que se observen señales de estro. Preferentemente, la hormona luteinizante se utiliza en un método de sincronización del estro conocido en la técnica en lugar de la hormona de liberación de gonadotropina (GnRH). En protocolos típicos de sincronización, se utilizan aproximadamente 100 mg de gonadotropina. Se describe una cantidad de métodos de sincronización del estro conocidos en la técnica en la Descripción Detallada al respecto. Preferentemente, la cantidad de hormona luteinizante administrada se sitúa entre aproximadamente 2 mg y aproximadamente 10 mg. Estos métodos inducen la ovulación de manera más fiable que los métodos de sincronización del estro que utilizan la GnRH; sin embargo, se puede utilizar también una combinación de hormona luteinizante y de GnRH, por ejemplo, en cualquier relación de hormona luteinizante con respecto a la GnRH entre aproximadamente 99:1 y 1:99, preferentemente la relación empleada se sitúa entre aproximadamente 25:75 y aproximadamente 75:25.

40 Algunos métodos de sincronización del estro implican la administración de prostaglandina a dichos animales en una cantidad situada entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 35 mg después de la administración de GnRH. En estos métodos, se puede utilizar la hormona luteinizante (o una mezcla de hormona luteinizante y GnRH) en lugar de GnRH, en las dosificaciones descritas en el párrafo anterior. Otros métodos de sincronización del estro implican la administración de GnRH, luego la prostaglandina, y luego GnRH adicional; y de nuevo, en estos métodos se puede utilizar la hormona luteinizante (o una mezcla de hormona luteinizante y GnRH) en lugar de GnRH en las dosificaciones descritas en el párrafo anterior. La programación de administración de hormona luteinizante y prostaglandina en estos métodos de sincronización de la ovulación es tal como se describe en la técnica para la programación de administración de GnRH y prostaglandina en los métodos de sincronización del estro. Preferentemente, se administra la prostaglandina entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 días, y preferentemente alrededor de 7 días después de la administración de la primera hormona luteinizante, es decir, un tiempo suficiente para provocar la regresión del folículo dominante. Preferentemente, se administra una segunda dosis de hormona luteinizante entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 horas, y preferentemente alrededor de 48 horas después de la administración de la prostaglandina, es decir, un tiempo suficiente para permitir la suficiente maduración del folículo para producir un ovario de buena calidad, pero no tan largo como para dejar que el animal ovule espontáneamente (ya que la reproducción debería hacerse antes de la ovulación).

55 Los métodos de sincronización de esta divulgación pueden comprender asimismo la reproducción de los animales por medios conocidos en la técnica, preferentemente mediante inseminación artificial. La reproducción puede realizarse inmediatamente después de la administración de la dosis final de hormona, es decir, dentro de un período de un día, y preferentemente en aproximadamente 16 horas, de modo que la reproducción puede realizarse antes de que tenga lugar la ovulación.

60 Los métodos de sincronización de la ovulación de esta divulgación pueden aplicarse a animales seleccionados del grupo compuesto de bovinos, ovejas, cabras, yacs, búfalos de agua, bisontes, antílopes, gacelas, ciervos canadienses, renos, alces, muflones, jirafas, y camélidos incluidos los camellos y dromedarios, llamas, cerdos, caballos, alpacas, y vicuñas. Preferentemente, el animal es un bovino.

Los métodos de sincronización de la ovulación de esta divulgación se pueden utilizar en combinación con los métodos de presincronización conocidos en la técnica.

ES 2 358 245 T3

Esta divulgación proporciona también un método para tratar el quiste folicular en un mamífero que comprende la administración a un mamífero con diagnóstico de quiste folicular de una cantidad eficaz de hormona luteinizante. La hormona luteinizante se administra preferentemente de forma intramuscular, y en una cantidad situada entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg. De nuevo, se puede aplicar el tratamiento a un mamífero seleccionado del grupo compuesto de bovinos, ovejas, cabras, yacs, búfalos de agua, bisontes, antílopes, gacelas, ciervos canadienses, renos, alces, muflones, jirafas, y camélidos incluidos los camellos y dromedarios, llamas, cerdos, caballos, alpacas, y vicuñas, preferentemente bovinos.

La hormona luteinizante recombinante se puede utilizar en una cualquiera de las utilidades de esta invención. La hormona luteinizante recombinante se puede elaborar por cualquier medio conocido en la técnica, y se puede elaborar mediante nuevos métodos descritos aquí. La hormona luteinizante recombinante es más eficaz a dosis más bajas que la hormona luteinizante purificada a partir de las glándulas pituitarias debido a que está glicosilada adecuadamente de forma más uniforme. La cantidad de glicosilación depende de la etapa de producción de la hormona luteinizante en la glándula pituitaria a partir de la cual se está cosechando la hormona. Típicamente, la hormona se cosecha de las glándulas pituitarias en todas las etapas de producción hormonal. La hormona luteinizante que se encuentra subglicosilada tiene una vida media más corta que la hormona luteinizante que está glicosilada adecuadamente. Por lo tanto, la hormona luteinizante recombinante que está glicosilada adecuadamente se puede utilizar en dosificaciones más bajas que la hormona luteinizante aislada de origen natural.

Un método para producir la hormona luteinizante recombinante comprende la expresión de ADN que codifica para dicha hormona luteinizante en células de insectos. La LH recombinante se puede producir también mediante la utilización de animales transgénicos no humanos, tal como se conoce en la técnica. Otro método útil para producir LH recombinante comprende la utilización de un vector en el que las subunidades alfa y beta de las hormonas luteinizantes se fusionan bajo el control de un único promotor. Los métodos para elaborar LH recombinante pueden incluir “métodos de expresión dual”, lo que significa que las subunidades alfa y beta se expresan a partir del mismo plásmido o ADN viral. En este caso, se encuentran bajo el control de promotores individuales en la misma molécula de ADN. Los métodos pueden utilizar la “coexpresión”, lo que significa que las subunidades alfa y beta son codificadas por moléculas individuales de ADN (teniendo cada una un gen de resistencia a antibióticos diferente). Para realizar la coexpresión, se introducen dos plásmidos individuales en una línea celular (de mamífero o de insecto). Se trata la línea celular con dos antibióticos para seleccionar una línea celular que contenga ambos plásmidos. Otro método para elaborar LH recombinante comprende la expresión de ADN que codifica formas de una sola cadena de LH, donde las subunidades alfa y beta están enlazadas de forma covalente.

Esta divulgación proporciona asimismo un dispositivo de inyección para administrar una única dosis de hormona luteinizante recombinante, donde dicha dosis comprende entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg de hormona luteinizante recombinante. El dispositivo de inyección puede formar parte de un kit que incluye también dichos componentes como dispositivos de inyección para administrar dosis únicas de otras hormonas necesarias para la sincronización de la ovulación, y ensayos del embarazo.

40 Referencia a los listados de secuencias

SEQ ID NO:1 es una alfa de LH bovina procedente del Genbank con Número de Acceso X00050.

SEQ ID NO:2 es una beta de LH bovina procedente del Genbank con Número de Acceso M10077.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos para la subunidad alfa de LH bovina procedente del Genbank con Número de Acceso NM_173901.

SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos para la subunidad beta de LH bovina procedente del Genbank con Número de Acceso NM_173930.

Tal como se utiliza aquí, “listo para reproducción” se refiere a un animal que no está preñado. El animal puede haber sido monitoreado en cuanto al estro y que se le haya detectado estro. El animal puede haber sido forzado al estro.

Tal como se utiliza aquí, “vaca” se refiere a bovinos hembras, incluidas las novillas.

Tal como se utiliza aquí, “primer ciclo estral” se refiere al ciclo estral después de la inseminación. En vacas, el primer ciclo estral es aproximadamente 21 días después de un estro previo.

Tal como se utiliza aquí, “estro” se refiere al período durante el cual es muy probable que un animal se preñe.

Tal como se utiliza aquí, “en celo” se refiere a encontrarse en el momento del estro, cuando un animal es sexualmente muy receptivo. En vacas, este período dura aproximadamente 12-18 horas.

Tal como se utiliza aquí, “estro comportamental” se refiere a la demostración comportamental de que un animal está en celo, mostrando incluso que se deja montar.

ES 2 358 245 T3

Tal como se utiliza aquí, “dejarse montar” se refiere al período durante el cual una vaca es receptiva a un toro y se quedará parada para la reproducción o se dejará montar por otras vacas.

5 Tal como se utiliza aquí, “Día 0” es el día en el que un animal se encuentra en estro comportamental o el día de reproducción.

Tal como se utiliza aquí, “estro forzado” se refiere a métodos conocidos en la técnica para forzar el celo. El estro forzado puede incluir períodos de espera, como corresponde.

10 Tal como se utiliza aquí, “ovulación forzada” se refiere a inducir la ovulación, generalmente a un día del tratamiento utilizado para inducir la ovulación.

Tal como se utiliza aquí, “abierto” se refiere a un animal que no está preñado.

15 Tal como se utiliza aquí, “con ciclo” se refiere a un animal que está experimentando un ciclo estral, es decir que no está preñado.

20 Tal como se utiliza aquí, “a la espera de reproducción” se refiere a un momento en el ciclo estral en el que es muy probable que la reproducción resulte en un embarazo.

25 Tal como se utiliza aquí, “reproducción” se refiere a métodos conocidos en la técnica que pertenecen al hecho de hacer que un animal hembra quede preñado. Dichos métodos incluyen la inseminación natural y artificial. Los métodos de reproducción pueden incluir un tiempo de espera después de observar un estro comportamental o después de forzar el estro. En el ganado, el tiempo de espera después de observar el estro comportamental es de 12-18 horas. En el ganado, después de forzar el estro con prostaglandina el Día 17, el tiempo de espera es de 72-80 horas. Después de la última inyección de hormonas utilizada para forzar la ovulación, la reproducción debería tener lugar aproximadamente en 24 horas, por ejemplo entre aproximadamente 0 y aproximadamente 24 horas, y preferentemente alrededor de 16 horas después de aquella inyección, de modo que la reproducción se realizará antes de que tenga lugar la ovulación.

30 Tal como se utiliza aquí, “anticuerpo específico de” se refiere al anticuerpo que no se une significativamente a componentes de muestra distintos del componente deseado.

Tal como se utiliza aquí, “test del embarazo” se refiere a pruebas del embarazo y/o no embarazo.

35 Tal como se utiliza aquí, “sangre total” se refiere a la sangre según se saca. La sangre total contiene una cantidad sustancial de células.

40 Tal como se utiliza aquí, “plasma” se refiere a sangre sin ninguna cantidad sustancial de células. El plasma contiene factores de coagulación.

Tal como se utiliza aquí, “sincronización del estro” se refiere a un proceso mediante el cual se fuerza el estro para un grupo de animales, de modo tal que probablemente cada animal se encuentre en estro dentro de un abanico de aproximadamente 2-5 días.

45 Tal como se utiliza aquí, “sincronización de la ovulación” se refiere a un proceso mediante el cual se fuerza la ovulación para un grupo de animales, de modo tal que probablemente cada animal ovule dentro de un abanico de 3-4 días.

50 Tal como se utiliza aquí, “presincronización del estro” o “presincronización de la ovulación” se refiere a un proceso mediante el cual el ciclo estral, a menudo para un grupo de animales, está bloqueado o forzado en una etapa particular del ciclo, de modo tal que los procedimientos de sincronización del estro o de la ovulación que se deben realizar más tarde, tienen más éxito.

55 Tal como se utiliza aquí, “entorno de la vaca” se refiere a un ambiente en el que se encuentra un animal domesticado, particularmente en contraste con un ambiente de laboratorio.

Tal como se utiliza aquí, “tiempo del ciclo de reproducción” se refiere al tiempo entre una reproducción de un animal y la siguiente reproducción durante el siguiente ciclo estral del mismo animal.

60 Tal como se utiliza aquí, “mamífero embarazado” se refiere a un mamífero que ha sido inseminado y puede estar embarazado o a una pluralidad de mamíferos inseminados, de los cuales algunos probablemente estén embarazados.

65 Tal como se utiliza aquí, “mantener el embarazo” se refiere a incrementar la probabilidad de que un animal que ha sido inseminado dé positivo en el embarazo o dé a luz a un ternero vivo o a incrementar la probabilidad de que una pluralidad de animales que han sido inseminados den positivo en el embarazo o den a luz a un ternero vivo.

Tal como se utiliza aquí, “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de lo que es eficaz para producir el resultado deseado.

ES 2 358 245 T3

Tal como se utiliza aquí, “administración” se refiere a cualquier método de administración conocido en la técnica que produzca aquel resultado deseado. Los ejemplos de administración incluyen pero no se limitan a inyecciones subcutáneas, intramusculares e intravenosas.

5 Tal como se utiliza aquí, “aproximadamente un 98% puro” se refiere a la pureza según se mide mediante cualquier método conocido en la técnica, incluido pero no limitado a la electroforesis de proteínas.

Tal como se utiliza aquí, “inseminación” se refiere a introducir semen mediante cualquier método conocido en la técnica, incluido pero no limitado a la inseminación artificial y natural.

10 Tal como se utiliza aquí, “incrementar la probabilidad de concepción” se refiere a incrementar la probabilidad de concepción detectable. Por ejemplo, la concepción se puede detectar en bovinos tan pronto como aproximadamente el Día 15 después de la inseminación mediante la presencia de proteínas inducidas por interferón-tau.

15 Tal como se utiliza aquí, “reducción de la probabilidad de pérdida embrionaria” se refiere a reducir la posibilidad de que un mamífero inseminado dé negativo al embarazo. Tal como se utiliza aquí, “reducción del porcentaje de pérdida embrionaria” con respecto a una pluralidad de mamíferos que han sido inseminados, se refiere a la reducción del porcentaje de dichos animales que den negativo al embarazo.

20 Los sistemas de expresión de baculovirus son bien conocidos en la técnica (O'Reilly y col., (1994) *Baculovirus Expresión Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press).

Existen muchas ventajas de utilización del baculovirus para la expresión heteróloga de genes. Se expresa bien el ADNc heterólogo. El procesamiento transcripcional adecuado de genes con intrones tiene lugar pero la expresión es menos eficaz. Como con otros sistemas de expresión eucarióticas, la expresión del baculovirus de los genes heterólogos permite el plegamiento, modificación post-translacional y oligomerización en formas que son idénticas a menudo a las que tienen lugar en células de mamíferos. El entorno citoplásmico de insectos permite el plegamiento adecuado y la formación de enlaces S-S, a diferencia del ambiente reductor del citoplasma de *E. coli*. Se ha reportado para muchas proteínas el procesamiento post-translacional idéntico al de las células de mamíferos. Estas incluyen la proteólisis adecuada, N y O glicosilación, acilación, amidación, carboximetilación, fosforilación y prenilación. Las proteínas pueden ser secretadas a partir de células o ser dirigidas hacia distintos emplazamientos subcelulares. Se han expresado proteínas con un solo polipéptido, dimericas y triméricas en baculovirus. Finalmente, la expresión de las proteínas heterólogas está bajo el control del promotor polihedrónico fuerte, permitiendo niveles de expresión de hasta un 30% de la proteína celular total.

35 Se utilizan comúnmente células de insectos SF-9, SF-21 y High-Five para la expresión del baculovirus. SF-9 y SF-21 son líneas celulares ováricas procedentes de *Spodoptera frugiperda*. Se cultivan en medio de Grace (o similar) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, lactalbúmina y yeastolato (extracto acuoso de levadura de panadero). Las células High-Five son células de huevos procedentes de *Trichoplusia ni*. Estas células son menos caras de mantener ya que se pueden cultivar sin suero de ternera fetal. Se asegura que expresan niveles más altos de proteínas recombinantes, aunque hemos descubierto que estas diferencias son mínimas. Las tres líneas celulares se pueden cultivar a temperatura ambiente (óptima = 25-27°C) y no requieren incubadores de CO₂. Su tiempo de duplicación es de 18-24 horas. Las proteínas expresadas pueden ser recuperadas por medio de métodos de purificación de proteínas conocidos en la técnica, incluida la utilización de la tecnología de proteínas de fusión, cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de exclusión por tamaños.

50 Las construcciones de ADN preparadas para su introducción en un huésped procarionta o eucariota comprenderán típicamente un sistema de replicación (es decir, un vector) reconocido por el huésped, incluido el fragmento de ADN pretendido que codifica el polipéptido deseado, e incluirán preferentemente también secuencias reguladoras de la iniciación transcripcional y translacional operativamente unidas al segmento de codificación del polipéptido. Los sistemas de expresión (vectores de expresión) pueden incluir, por ejemplo, un origen de replicación o la secuencia de replicación autónoma (ARS) y secuencias de control de la expresión, un promotor, un potenciador y sitios de información sobre procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras transcripcionales, y secuencias estabilizadoras de ARNm. Cuando sea apropiado, se pueden incluir también péptidos de señal procedentes de polipéptidos secretados de los mismos o especies relacionadas, que permiten que la proteína cruce y/o se aloje en membranas celulares o sean secretadas a partir de la célula.

60 Un promotor apropiado y otras secuencias del vector necesarias se seleccionarán para ser funcionales en el huésped. Ejemplos de combinaciones factibles de líneas celulares y vectores de expresión se describen en Sambrook y col. (1989 *Molecular Cloning*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; Ausubel y col. (Eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York; y Metzger y col., (1988) *Nature*, 334:31-36. Numerosos vectores útiles para la expresión en bacterias, levadura, hongos, mamíferos, insectos, plantas u otras células son bien conocidos en la técnica y se pueden obtener de vendedores tales como Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, y demás. Además, la construcción se puede unir a un gen amplificable (por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa DHFR) para poder realizar múltiples copias del gen. Para el potenciador apropiado y otras secuencias de control de la expresión, véase también *Enhancers and Eukaryotic Gene Expresión*, Cold Spring Harbor Press, NY (1983). Aunque dichos vectores de expresión se pueden replicar de forma autónoma, se pueden replicar de forma menos preferente mediante su inserción en el genoma de la célula huésped.

Los vectores de expresión y clonación contendrán probablemente un marcador seleccionable, es decir, un gen que codifica una proteína necesaria para la supervivencia o cultivo de una célula huésped transformada con el vector. Aunque dicho gen marcador puede ser llevado en otra secuencia polinucleotídica co-introducida en la célula huésped, está contenido más a menudo en el vector de clonación. Sólo aquellas células huésped en las que se haya introducido el gen marcador sobrevivirán y/o se desarrollarán en condiciones selectivas. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras sustancias tóxicas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, etc.; (b) complementan las deficiencias auxotróficas; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos. La elección del marcador seleccionable adecuado dependerá de la célula huésped; se conocen en la técnica marcadores apropiados para diferentes huéspedes.

Las células huésped recombinantes, en el presente contexto, son aquellas que han sido modificadas genéticamente para que contengan una molécula de ADN aislada de la presente invención. Se puede introducir el ADN por cualquier medio conocido en la técnica que sea adecuado para el tipo particular de célula, incluidas sin limitación, la transformación, lipofección o electroporación.

Además, los especialistas en la técnica reconocerán que pueden tener lugar variaciones alélicas en las secuencias de ADN, las cuales no cambiarán significativamente la actividad de las secuencias de aminoácidos de los péptidos que las secuencias de ADN codifican. Todas dichas secuencias de ADN equivalentes están incluidas en el alcance de esta invención.

Las técnicas estándar para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para las reacciones enzimáticas que implican la ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, así como varias técnicas de separación son aquellas que son bien conocidas y comúnmente empleadas por los especialistas en la técnica. Se describe una cantidad de técnicas estándar en Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Maniatis y col., (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Wu (ed.) (1993) *Meth Enzymol.* 218, Part I; Wu (ed.) (1979) *Meth. Enzymol.* 68; Wu y col., (eds) (1983) *Meth. Enzymol.* 100 y 101; Grossman and Moldave (eds.) *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Old and Primrose (1981) *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink (1982) *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (ed.) (1985) *DNA Cloning* Vol. I y II, IRL Press, Oxford, UK; Hames and Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; Setlow and Hollaender (1979) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, New York; y Ausubel y col., (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, New York, NY. Las abreviaturas y la nomenclatura, cuando se emplean, se consideran estándar en el campo y se utilizan comúnmente en revistas profesionales tales como las que se mencionan aquí.

Se dice que un polinucleótido codifica un polipéptido si, en su estado nativo o cuando es manipulado mediante métodos conocidos por los especialistas en la técnica, puede ser transcrito y/o traducido para producir el polipéptido o un fragmento del mismo. Se dice también que la hebra antisentido de dicho polinucleótido codifica la secuencia.

Una secuencia nucleotídica está unida operativamente cuando está colocada en una relación funcional con otra secuencia nucleotídica. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor realiza su transcripción o expresión. En general, unido operativamente significa que las secuencias que están unidas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, son contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, es bien sabido que ciertos elementos genéticos, tales como los potenciadores, pueden estar unidos operativamente aún a distancia, es decir, aunque no son contiguos.

Esta invención proporciona métodos y kits para mantener el embarazo en mamíferos. El embarazo se mantiene mediante la administración de cantidades eficaces de hormona luteinizante (LH) o gonadotropina coriónica (CG). Tanto la LH como la CG pueden ser utilizadas solas, en combinación una con otra, o en combinación con la hormona del crecimiento (GH) o la hormona folículo estimulante (FSH). Las hormonas se administran preferentemente alrededor del Día 4 hasta alrededor del Día 7 después de la inseminación. Cantidades eficaces de LH oscilan entre aproximadamente 25 microgramos y aproximadamente 25 miligramos y las de CG oscilan entre aproximadamente 100 IU (unidades internacionales) y aproximadamente 2000 IU. Los mamíferos tratables con los métodos de esta invención incluyen los ungulados y mamíferos relacionados, incluidos los bovinos. Los kits proporcionados por esta invención incluyen cantidades eficaces de una o varias hormonas, un dispositivo para administrar la(s) hormona(s) e instrucciones.

En la práctica de esta invención, las composiciones hormonales de esta invención se administran a mamíferos que están posiblemente preñados como resultado de la inseminación. La inseminación se realiza por medio de cualquier método conocido en la técnica, incluida la inseminación artificial. Preferentemente, la inseminación se realiza mediante inseminación artificial programada después de la sincronización de la ovulación. La sincronización de la ovulación incluye opcionalmente la presincronización de la ovulación y se realiza preferentemente mediante los métodos de esta invención.

En la práctica de esta invención, la hormona luteinizante se administra a uno o varios mamíferos preñados para mantener el embarazo. Un mamífero preñado puede ser un mamífero que está posiblemente preñado desde que ha sido inseminado, preferentemente durante el estro, que puede no estar incluso preñado de forma detectable, y una pluralidad de mamíferos preñados puede ser una pluralidad de mamíferos entre los cuales sólo algunos están preñados.

ES 2 358 245 T3

En una realización de esta invención, la LH es LH recombinante. La LH puede ser producida en un baculovirus o un mamífero u otro sistema de expresión. En una realización, la LH recombinante se recupera de la leche o de claras de huevos de un animal transgénico. Los métodos para producir proteínas recombinantes en animales transgénicos son bien conocidos y han sido descritos en las patentes de Estados Unidos N° 4.873.316, 5.322.775, 6.111.165, 6.472.584 y 6.528.699 así como otros medios conocidos en la técnica.

En otra realización, la LH se purifica a partir de células pituitarias o tejido pituitario. La LH bovina se puede purificar por medio de métodos conocidos en la técnica, y se dispone en el mercado de LH bovina purificada (AspenBio Inc., Castle Rock, CO, Scripps Laboratories, San Diego, CA y BioTrend, Colonia, Alemania). Se dispone también de LH bovina purificada de NIH National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Torrance, CA). Cuando se utiliza en la práctica de esta invención LH recombinante, la LH recombinante es similar estructuralmente y tiene una actividad similar a la LH purificada, nativa. La LH recombinante se puede elaborar por medio de genes de LH clonados y mutados que codifican péptidos idénticos a la LH nativa, o con al menos alrededor del 80% de homología con la misma, particularmente con al menos aproximadamente un 90% de homología con la misma, y especialmente con al menos aproximadamente un 95% de homología con la misma y siendo capaces también de inducir la ovulación en un mamífero. La LH recombinante se puede elaborar también mediante genes de LH clonados y mutados que codifican péptidos que no son idénticos a la LH nativa, de las especies seleccionadas, siempre que la LH recombinante producida tenga una actividad similar a la LH nativa.

La LH recombinante se puede elaborar también de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo tal como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030059898 cedida a Genzyme por Beck y col., y los números de patentes 6.635.256, 6.242.580, 6.238.890, 6.225.449, 6.103.501, 6.028.177, 5.985.611, 5.958.737, 5.883.073, 5.792.460, 5.759.818, 5.733.735, 5.712.122, 5.705.478, 5.585.345, 5.405.945, 5.338.835 y 5.177.193, así como las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos N° 20020160944 y 20010007757, y otros medios conocidos en la técnica.

En la práctica de esta invención, la hormona gonadotropina coriónica procede de primates, incluidos humanos y caballos. Las hormonas procedentes de las especies que se deben tratar, así como las hormonas procedentes de otras especies son útiles en la práctica de esta invención. Es poco probable que la utilización de hormonas procedentes de las especies que se deben tratar provoque una respuesta inmune en el mamífero tratado.

En una realización de esta invención, la hormona del crecimiento es somatotropina bovina (bST). En una realización de esta invención, la FSH es FSH humana o FSH bovina.

En la práctica de esta invención se somete a prueba el embarazo mediante cualquier test del embarazo conocido en la técnica, incluido por ultrasonidos o sometiendo a prueba las moléculas indicadoras del embarazo, en momentos apropiados para la especie seleccionada, tal como se conoce en la técnica. Cuando el animal tratado es un bovino, se puede someter a prueba el embarazo ensayando la presencia de proteínas inducidas por interferón-tau aproximadamente el Día 15 (Solicitudes de Patentes de Estados Unidos N° 60/377.987; 60/377.166; 60/380.043; 60/377.921; 60/377.165; 60/377.355; 60/377.829; y 60/380.042) y/o por ultrasonidos aproximadamente los Días 28, 45 o 56.

En la práctica de esta invención, si se determina que un mamífero no está preñado después de poner en práctica los métodos de esta invención, se puede forzar el siguiente ciclo de estro mediante métodos conocidos en la técnica.

Los métodos de esta invención son útiles en mamíferos que están en fase de estro por primera vez, que han estado en estro más de una vez, que nunca han tenido cría, que han tenido una o varias crías, a los que no se administró nunca una composición hormonal de esta invención para mantener el embarazo, o a los que se administró anteriormente una composición hormonal de esta invención para mantener el embarazo. Los métodos de esta invención son específicamente útiles en mamíferos a los que se administró anteriormente composiciones hormonales de esta invención con el propósito de mantener el embarazo.

En una realización de esta invención, se administra la LH bovina a un bovino preñado, o una pluralidad de bovinos preñados, aproximadamente el Día 4 hasta aproximadamente el Día 7 después de la inseminación. En una realización de esta invención, se administra la LH bovina a un bovino preñado, o una pluralidad de bovinos preñados, aproximadamente el Día 4 hasta aproximadamente el Día 5 después de la inseminación. En una realización de esta invención, se administra la LH bovina a un bovino preñado, o una pluralidad de bovinos preñados, aproximadamente el Día 2 hasta aproximadamente el Día 10 después de la inseminación.

En una realización de esta invención, se pueden explorar los mamíferos preñados mediante ultrasonidos en busca de la presencia de un folículo suficientemente maduro antes de la administración de una composición hormonal de esta invención. En una realización de esta invención, un folículo maduro de un bovino tiene aproximadamente un diámetro de 10 mm. En una realización de esta invención, después de la administración de LH, se aplican ultrasonidos al mamífero para explorar la ovulación y luteinización (producción de cuerpo lúteo).

En una realización de esta invención, se administra LH bovina en una cantidad que oscila entre aproximadamente 10 microgramos y aproximadamente 25 miligramos, de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 5 miligramos, de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 1 miligramo, de aproximadamente 25 microgramos

ES 2 358 245 T3

a aproximadamente 250 microgramos, de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 175 microgramos, o de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 100 microgramos, o de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 75 microgramos. Una vaca media pesa aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.500 libras. En una realización de esta invención, se administra la LH bovina en una cantidad que corresponde a aproximadamente 10 nanogramos hasta aproximadamente 25 microgramos por libra de vaca.

En una realización de esta invención, se administra la CG humana en una cantidad que oscila entre aproximadamente 100 IU a aproximadamente 2.000 IU, de aproximadamente 100 IU a aproximadamente 1750 IU, o de aproximadamente 250 IU a aproximadamente 1000 IU.

En una realización de esta invención, la composición hormonal que se debe administrar es pura en aproximadamente un 90%, pura aproximadamente en un 95%, pura en aproximadamente un 98%, pura en aproximadamente un 99%, o pura en aproximadamente un 100%, tal como lo determina un ensayo de purificación de proteína conocido en la técnica.

Los mamíferos tratables mediante los métodos de esta invención incluyen ungulados y mamíferos relacionados. Los mamíferos tratables mediante los métodos de esta invención incluyen, pero no se limitan a vacunos, ovejas, cabras, yacs, búfalos de agua, bisontes, antílopes, gacelas, ciervos canadienses, renos, alces, muflones, jirafas, y camélidos incluidos los camellos y dromedarios, llamas, cerdos, caballos, alpacas, y vicuñas.

Preferentemente, una composición hormonal de esta invención deriva de la misma especie que la especie de mamífero al que se debe administrar dicha composición. Si el mamífero es vacuno, la composición hormonal que se debe administrar en la práctica de esta invención comprende preferentemente una o varias hormonas que proceden todas de vacuno o de genes de vacuno.

En una realización de esta invención, una composición hormonal que se debe administrar contiene también otros componentes útiles para la inyección tal como se conoce en la técnica. Otros componentes útiles para inyección incluyen, pero no se limitan a un adyuvante y una solución salina.

En una realización de esta invención, una composición hormonal de esta invención se administra más de una vez después de la inseminación. En una realización de esta invención, se administra más de una composición hormonal de esta invención.

En la práctica de esta invención, el embarazo se mantiene en al menos un cuarenta por ciento aproximadamente, al menos un cuarenta y dos por ciento aproximadamente, al menos un cuarenta y cinco por ciento aproximadamente, al menos un cincuenta por ciento aproximadamente, al menos un cincuenta y cinco por ciento aproximadamente, o al menos un sesenta por ciento aproximadamente de vacas tratadas mediante las composiciones y métodos de esta invención.

Aunque el solicitante no desee estar ligado por una teoría particular, la administración después de la inseminación de la hCG y/o bLH puede actuar mediante la inducción de la formación de cuerpo lúteo accesorio que aumenta la secreción de progesterona e incrementa las concentraciones de progesterona en suero durante el momento crítico en el que el útero debe reconocer el embarazo, lo que resulta en un aumento de mantenimiento de los embarazos.

Los quistes foliculares no tratados en un animal abierto pueden impedir que un animal tenga ciclos normales. Esta invención proporciona asimismo un método útil en el tratamiento de quistes foliculares en mamíferos, en particular, vacas. Se deben inyectar (preferentemente de forma intramuscular) al menos aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 10 mg de hormona luteinizante en una vaca en la que se ha diagnosticado un quiste folicular. Los especialistas en la técnica son capaces de optimizar dosificaciones basadas en el tamaño del animal, así como las enseñanzas de las mismas sin experimentación indebida. La resolución con éxito del quiste puede ser confirmada por ultrasonidos u otros medios conocidos en la técnica. Si el animal está preñado y tiene un cuerpo lúteo normal en presencia del quiste, generalmente no hace falta ningún tratamiento.

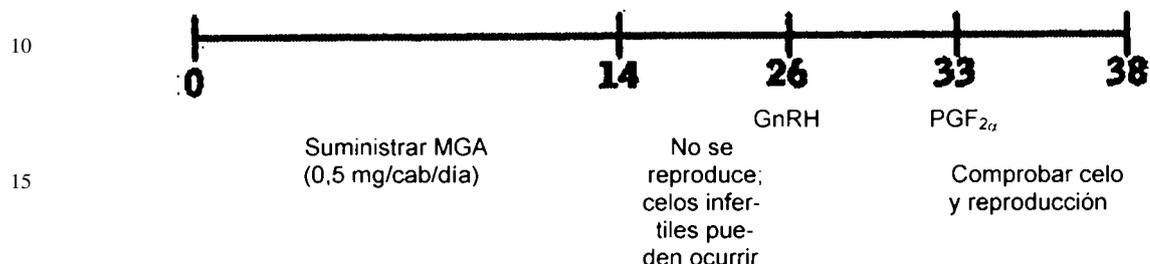
Esta invención proporciona asimismo métodos para sincronizar la ovulación en una pluralidad de animales hembras. Se conocen varias técnicas para sincronizar el estro, muchas de las cuales exigen la utilización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona que es secretada a partir del hipotálamo y afecta a la pituitaria anterior. Esta invención implica la sustitución de la GnRH por la hormona luteinizante. La LH proporciona una sincronización más eficaz que la GnRH. La LH se administra en cantidades eficaces, preferentemente en cantidades situadas aproximadamente entre 2 mg y aproximadamente 10 mg en vacunos. Un especialista en la técnica puede optimizar dosificaciones basadas en el tamaño del animal y su respuesta sin experimentación indebida.

Un sistema de sincronización del estro conocido en la técnica es el Sistema de MGA/GnRH/PGF₂ (Wood, S.L., y col. (2001), "Improved synchrony of estrus and ovulation with the addition of GnRH to a melengestrol acetate-prostaglandin synchronization treatment in beef heifers", J. Anim. Sci. 79:2210-2216). El acetato de melengestrol (MGA) es una progestina sintética oralmente activa que se desarrolló para controlar el estro en novillas de cebadero (Lauderdale y col., 1977). Esta progestina se puede utilizar en la sincronización del estro para imitar la progesterona y puede estimular el estro en novillas. Como se utilizan pequeñas cantidades de MGA, hay que tener cuidado cuando se

ES 2 358 245 T3

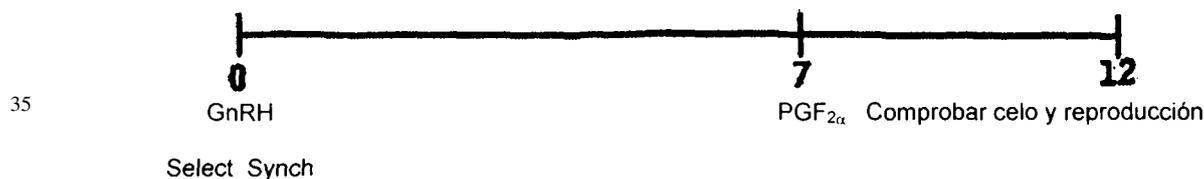
mezclan dosis masivas para asegurar una distribución uniforme por toda la dosis. La PGF_2 es prostaglandina, hormona liberada del útero una vez la hembra reconoce que no está preñada. La prostaglandina provoca que el CL regrese o disminuya y, una vez esto ocurra, las concentraciones de progesterona disminuyen rápidamente.

- 5 El sistema de MGA/GnRH/ PGF_2 incluye las siguientes etapas: se suministra MGA durante 14 días a 0,5 mg/cabeza/día. El día 26, se administra una inyección de GnRH I.M.; se sigue, 7 días más tarde (día 33), con una inyección de prostaglandina I.M. Se comprueba el celo y la reproducción del día 33 al día 38.



- 20 En el sistema de esta invención, utilizado para la sincronización de la ovulación, se administra LH en la dosificación descrita anteriormente en lugar de GnRH. Si se desea, el animal se puede reproducir inmediatamente después de este tratamiento. En esta invención, se puede sustituir la progestina por MGA. La utilización de MGA es ilegal en vacas lecheras lactantes, pero el método es útil para productores de carne vacuna.

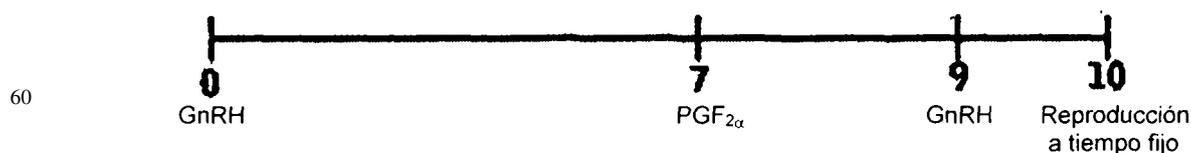
- 25 Otros sistemas de sincronización del estro conocidos en la técnica incluyen el sistema Select Synch. Este sistema comprende las siguientes etapas: se inyecta GnRH intramuscularmente (I.M.) el día 0, seguido de prostaglandina I.M. el día 7. La investigación por Geary and Whittier (Geary, T.W., and J.C. Whittier (1999), "Varios protocolos for synchronization of estrus or ovulation using GnRH and prostaglandin", 1999 Beef Program Report, Department of Anim. Sci., Colorado State University) reporta índices de embarazo del 61 por ciento para ganado reproducido sobre la base de celo constante.



- 40 Otro método de sincronización del estro es el Sistema Co-Synch (Geary, T.W. and J.C. Whittier (1999), "Various protocols for synchronization of estrus or ovulation using GnRH and prostaglandin", 1999 Beef Program Report, Department of Anim. Sci., Colorado State University), que implica las siguientes etapas: se inyecta GnRH I.M. el día 0, seguido de prostaglandina I.M. el día 7. Se vuelve a inyectar GnRH el día 9; luego reproducción a tiempo fijo.



- 50 Otro sistema de sincronización del estro es el Sistema Ov-Synch (Geary, T.W., and J.C. Whittier (1999), "Various protocols for synchronization of estrus or ovulation using GnRH and prostaglandin", 1999 Beef Program Report, Department of Anim. Sci., Colorado State University), que implica las siguientes etapas: se inyecta GnRH I.M. el día 0, seguido de prostaglandina I.M. el día 7. Se vuelve a inyectar GnRH el día 9; luego reproducción a tiempo fijo el día 10.



- 65 Otro programa común de sincronización del estro en ganado lechero se llama Heatsynch que utiliza GnRH (día 0), PGF (día 7), luego cipionato de estradiol (ECP) (día 8). Se observan las vacas en cuanto a su celo y reproducción en cualquier celo. Las vacas que no se descubren en celo son reproducidas a tiempo fijo 48 horas después de la inyección de ECP (día 10).

ES 2 358 245 T3

En los sistemas de esta invención, se sustituye la LH por GnRH en las dosificaciones descritas anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con un propósito ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se reivindica aquí. Cualquier variación en los ejemplos de artículos que le pueda ocurrir al especialista en la técnica pretende formar parte del alcance de la presente invención.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Expresión de bLH Recombinante en un Sistema de Expresión de Baculovirus

15 Las secuencias de ADN que codifican las subunidades alfa y beta de las hormonas luteinizantes bovinas están ligadas en un vector bacteriano de transferencia. Se incluyen opcionalmente insertos para la purificación de proteínas. El inserto está flanqueado por porciones de genes virales para permitir la recombinación homóloga con ADN viral, lineal, defectuoso en la replicación. Se comprueba la dirección de los insertos con relación al promotor polihedónico. Se comprueban opcionalmente las secuencias de los insertos. Se purifican los plásmidos para su transfección en células de insectos.

20 Se cotransfectan las células de insectos con los vectores de transferencia de las subunidades alfa y beta de LH recombinante y el vector viral linearizado. Opcionalmente, se realizan individualmente transfecciones de las subunidades alfa y beta de LH. Los métodos de transfección y transformación son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos de electroporación, de lípidos, y transformación mediada por fosfato de calcio. Los virus replicativos se forman mediante la recombinación intracelular homóloga entre los extremos de las moléculas virales y las partes del vector de transferencia que flanquea las subunidades alfa y beta de LH. Las subunidades alfa y beta de LH bovina se insertan en el virus y complementan el(los) gen(es) viral(es) defectuoso(s) para permitir la replicación viral. Se incluyen opcionalmente proteínas marcadoras y se expresan sobre eventos de inserción seleccionados.

30 Se cosechan los sobrenadantes de células transfectadas. Las células de insectos son infectadas con diluciones del sobrenadante para aislar placas de un solo virus que expresan opcionalmente proteínas marcadoras. Células de insectos adicionales son infectadas con virus procedente de las placas seleccionadas para ampliar la cantidad y titular los stocks virales. Se examina opcionalmente la expresión de proteínas por Western blotting. Se someten a prueba la expresión y actividad de las proteínas mediante bioensayo.

35 Ejemplo 2

Sincronización del Estro y Control de la Inseminación Artificial

40 Se indujo la ovulación en varios cientos de vacas por medio de un protocolo estándar de sincronización del estro, se inseminaron artificialmente, y se les administró por inyección intravenosa agua estéril.

45 Los Días 14 y 21 se recogió suero para el ensayo de progesterona. Estos tiempos de recogida representan el período crítico para que la progesterona mantenga el embarazo, y el tiempo esperado de concentración más baja de progesterona si el animal no está preñado y vuelve al estro. El examen por ultrasonidos de las estructuras ováricas se realizó los Días 14 y 21 para evaluar la correlación del tamaño de CL y la concentración de progesterona, y permitir la comparación de ambas mediciones con el tratamiento y con el resultado de la reproducción. Después de la inseminación los Días 28, 35 y 56, se utilizó el examen por ultrasonidos del útero para determinar el estado del embarazo. El Día 28 es el momento más temprano para visualizar fiablemente un embarazo. Se monitorearon estrechamente los embarazos en estos momentos para determinar los índices de pérdida embrionaria y el resultado final de cada reproducción.

55 Se analizaron los datos por software estadístico (SAS). El rebaño y los efectos estacionales se analizaron mediante ANOVA y análisis de regresión. El Día 56, un 38% de las vacas tratadas estaba preñado.

Ejemplo 3

Administración de 1660 IU de hCG el Día 7 Después de la Inseminación

60 Sobre una base semanal, se indujeron a ovulación vacas al final del período de espera electivo por medio de un protocolo estándar de sincronización del estro, y en el momento de la reproducción, se asignó a cada vaca al tratamiento o al grupo de control (Ejemplo 2) sobre una base alterna. El Día 7, se administraron por vía intramuscular a las vacas en post-reproducción 1.660 IU de hCG. (Se ha determinado por el estándar de la Organización Mundial de la Salud que la actividad de hCG era de aproximadamente 10.000 IU por miligramo).

ES 2 358 245 T3

Los Días 14 y 21 se recogió suero para el ensayo de progesterona. Estos tiempos de recogida representan el período crítico para que la progesterona mantenga el embarazo, y el tiempo esperado de concentración más baja de progesterona si el animal no está preñado y vuelve al estro. El examen por ultrasonidos de las estructuras ováricas se realizó los Días 14 y 21 para evaluar la correlación del tamaño de CL y la concentración de progesterona, y permitir la comparación de ambas mediciones con el tratamiento y con el resultado de la reproducción. Después de la inseminación los Días 28, 35 y 56, se utilizó el examen por ultrasonidos del útero para determinar el estado del embarazo. El Día 28 es el momento más temprano para visualizar fiablemente un embarazo. Se monitorearon estrechamente los embarazos en estos momentos para determinar los índices de pérdida embrionaria y el resultado final de cada reproducción.

Se sometieron a prueba varios cientos de vacas. Los datos se analizaron por software estadístico (SAS). El rebaño y los efectos estacionales se analizaron mediante ANOVA y análisis de regresión. El Día 56, un 50% de las vacas tratadas estaba preñado.

Ejemplo 4

Administración de 830 IU de hCG el Día 7 Después de la Inseminación

Se indujeron a ovulación varios cientos de vacas al final del período de espera electivo por medio de un protocolo estándar de sincronización del estro, y en el momento de la reproducción, se asignó a cada vaca al tratamiento o al grupo de control (Ejemplo 2) sobre una base alterna. El Día 7, se administraron por vía intramuscular a las vacas en post-reproducción 1.660 IU de hCG.

Los Días 14 y 21 se recogió suero para el ensayo de progesterona. El examen por ultrasonidos de las estructuras ováricas se realizó los Días 14 y 21 para evaluar la correlación del tamaño de CL y la concentración de progesterona, y permitir la comparación de ambas mediciones con el tratamiento y con el resultado de la reproducción. Después de la inseminación los Días 28, 35 y 56, se utilizó el examen por ultrasonidos del útero para determinar el estado del embarazo. Se monitorearon estrechamente los embarazos en estos momentos para determinar los índices de pérdida embrionaria y el resultado final de cada reproducción.

Se sometieron a prueba varios cientos de vacas. Los datos se analizaron por software estadístico (SAS). El rebaño y los efectos estacionales se analizaron mediante ANOVA y análisis de regresión. El Día 56, un 52% de las vacas tratadas estaba preñado.

Ejemplo 5

Administración de 830 IU de hCG el Día 5 Después de la Inseminación

Se fuerzan al estro las vacas, se inseminan artificialmente y se les administran por vía intramuscular 830 IU de hCG el Día 5 después de la inseminación. Se recoge suero los Días 14 y 21 y se somete a prueba en busca de progesterona. Se aplican ultrasonidos los Días 14 y 21. Se realiza el examen por ultrasonidos los Días 28, 35 y 56. El Día 56, al menos un 50% aproximadamente de las vacas, está preñado.

Ejemplo 6

Administración de 156, 83, 25 y 10 microgramos y de 1,10 y 25 mg de bLH el Día 5 Después de la Inseminación

Se fuerzan al estro las vacas, se inseminan artificialmente y se les administran por vía intramuscular 156, 83, 25 y 10 microgramos o 1, 10 y 25 mg de bLH purificada a partir de pituitaria bovina, el Día 5 después de la inseminación. Se recoge suero los Días 14 y 21 y se somete a prueba en busca de progesterona. Se aplican ultrasonidos los Días 14 y 21. Se realiza el examen por ultrasonidos los Días 28, 35 y 56. El Día 56, se evidencia una mejora en el mantenimiento del embarazo en comparación con las vacas sin administración de bLH u otra hormona, y las vacas con administración de hCG solamente.

Ejemplo 7

Administración de 156, 83, 25 y 10 microgramos y 1,10 y 25 mg de bLH el Día 5 Después de la Inseminación

Se fuerzan al estro las vacas, se inseminan artificialmente y se les administran por vía intramuscular 156, 83, 25 y 10 microgramos o 1, 10 y 25 mg de bLH recombinante, obtenida a partir de un sistema de expresión de baculovirus (Ejemplo 1), el Día 5 después de la inseminación. Se recoge suero los Días 14 y 21 y se somete a prueba en busca de progesterona. Se aplican ultrasonidos los Días 14 y 21. Se realiza el examen por ultrasonidos los Días 28, 35 y 56. El Día 56, se evidencia una mejora en el mantenimiento del embarazo en comparación con las vacas sin administración de bLH u otra hormona, y las vacas con administración de hCG solamente.

ES 2 358 245 T3

Ejemplo 8

Administración Intravenosa de 10 microgramos de bLH el Día 5 Después de la Inseminación

5 Se fuerzan al estro las vacas, se inseminan artificialmente y se les administran por vía intravenosa 10 microgramos de bLH purificada a partir de pituitaria bovina, el Día 5 después de la inseminación. Se recoge suero los Días 14 y 21 y se somete a prueba en busca de progesterona. Se aplican ultrasonidos los Días 14 y 21. Se realiza el examen por ultrasonidos los Días 28, 35 y 56. El Día 56, se evidencia una mejora en el mantenimiento del embarazo en comparación con las vacas sin administración de bLH u otra hormona, y las vacas con administración de hCG solamente.

10

Ejemplo 9

Desarrollo de Cuerpo Lúteo Accesorio

15

Se realizaron pruebas durante un período de tres meses utilizando un total de 31 vacas en ocho pruebas diferentes. Se administró a las vacas la hormona luteinizante bovina a varios niveles de dosificación, desde 0,5 mg hasta 8 mg en solución salina estéril cuatro días después de la inseminación artificial. Las pruebas determinaron que un nivel de dosificación eficaz era de 2 mg, por vía intravenosa, o superior. Utilizando esta dosificación de 2 mg en un ensayo limitado a 15 vacas, fuimos capaces de crear al menos un cuerpo lúteo accesorio en doce vacas (respuesta del 80%). Se examinaron los ovarios por ultrasonidos tanto antes como después del tratamiento por medio de un Sonosite VET180plus con un transductor de sector de banda ancha de 11 mm con un rango de 4-7 mHz. La exploración después del tratamiento se realizó siete días después de la inyección. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

25

TABLA 1

Producción de Cuerpo Lúteo Accesorio mediante Inyección de Hormona Luteinizante Bovina

30

Dosis (mg)	Número de Respuestas*	Número Tratado	Porcentaje de Respuestas
0,5	0	1	0
1	0	3	0
2	12	15	80
3	5	5	100
4	3	3	100
6	2	2	100
7	1	1	100
8	1	1	100

35

40

*Respuesta = desarrollo de al menos un cuerpo lúteo accesorio

Esta respuesta es comparable con la formación del cuerpo lúteo accesorio encontrado después de la administración de una dosis de gonadotropina coriónica humana (hCG) a ganado lechero lactante.

45

Ejemplo 10

Tratamiento de Quistes Foliculares en Ganado

Se examinaron mediante ultrasonidos tres vacas no preñadas, no inseminadas para determinar la presencia de quistes foliculares. Se trataron las vacas con inyecciones de 2 mg de hormona luteinizante en solución salina. Se trataron de la misma forma que anteriormente siete vacas más no preñadas, no inseminadas con un diagnóstico de quistes foliculares. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se examinaron las vacas en busca de la presencia de quistes utilizando ultrasonidos para confirmar que los quistes se habían reducido.

55

Ejemplo 11

60

Sincronización de la Ovulación

Se inyectan I.M. a diez vacas no preñadas que no muestran señales de estar en celo 2 mg de hormona luteinizante. Siete días más tarde, se inyectan I.M. a las vacas 25 mg de prostaglandina. 9 días más tarde, se vuelven a inyectar a las vacas 2 mg de hormona luteinizante. Se inseminan artificialmente las vacas pocas horas después de la segunda inyección de hormona luteinizante, lo que resulta en un índice de embarazo superior a aproximadamente el cuarenta por ciento. En comparación con la utilización de GnRH, la utilización de LH proporciona una sincronización más fiable y un mayor índice de embarazo.

65

ES 2 358 245 T3

Ejemplo 12

Clonación de la subunidad alfa de bLH

5 Se extrajo ARN de 1 glándula pituitaria bovina por medio de Rneasy Midiprep (Qiagen cat# 75142). Se realizó una RT-PCR por medio de RT PCR en una Sola Etapa Superscript con Platinum Taq (Invitrogen cat# 10928-034). Los cebadores utilizados en esta reacción fueron bLH alfa BamHI U (GGATCCATGGGATTACTACAGAAA) y bLH alfa R1 L (GAATTCTTAGGATTTGTGATAATAAC). El producto para la RT-PCR fue purificado en gel por medio de Qia-
10 Quick (Qiagen cat# 28704). El producto purificado se purificó y se ligó en el vector de clonación pCRScript utilizando reactivos del kit (Statagene cat# 211188). La ligación se transformó en *E. coli* electro competente Top 10 (Invitrogen cat#C4040-50) y se colocó en placas sobre agar LB con ampicilina. Se analizaron los transformantes mediante dige-
15 stión con restricción utilizando BamHI (NEB cat#R0136S) y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (MMR).

Ejemplo 13

Clonación de la subunidad beta de bLH

20 Se extrajo ARN de 3 glándulas pituitarias bovinas por medio de Tri-Reagent BD (Sigma cat# T3809). Se sintetizó el ADN por medio del Kit de Síntesis de ADNc iScript (BioRad cat# 170-8890). Se realizó la PCR primaria utilizando el ADNc anterior, ADN Polimerasa Deep Vent (NEB cat#M0258S) y los siguientes cebadores: bLH-B L 9-9-0 (TTTCCAGAGTTAGGATGGGCATGG) y bLH-B U 9-9-03 (CAAGGATGGAGATGTTCCAGGGAC). Se realizó la PCR secundaria utilizando el producto de PCR primaria como plantilla, ADN Polimerasa Deep Vent y los siguientes
25 cebadores: 5' bglMEbLHb (AGATCTATGGAGATGTTCCAGGGACTG) y 3' bLHbetaR1 (GAATTCAGTGGGG CATCCTTAGAGGAAGAG). El producto de PCR secundaria fue purificado en gel por medio de QiaQuick y la reacción por extensión de adenosina se realizó por medio de PCR Master Mix (Promega cat# M7501). El producto fue ligado en el Vector de Clonación pCR2.1 TOPO (Invitrogen cat# K4500-01). La ligación se transformó en *E. coli* químico competente Top 10F' (Invitrogen cat# C3030-03) y se colocó en placas sobre agar LB con ampicilina. Se
30 analizaron los transformantes mediante digestión con restricción utilizando EcoRI (NEB cat#R0101S) y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

Ejemplo 14

Estrategias de Expresión de Insectos

Expresión de Baculovirus

40 Se insertan las subunidades alfa y beta de LH bovina en pBac4x-1 (Novagen cat# 70045-3) separada y conjuntamente para la expresión tanto individual como dual por medio del sistema de Expresión de Baculovirus BacVector (Novagen cat# 70077) en células de insectos Sf9, Sf21, y High Five. Se insertan las subunidades alfa y beta de LH bovina en pFastBack Dual (Invitrogen cat# 10712-024) para la expresión dual en células de insectos Sf9, Sf21 y High Five.

Subunidad alfa de LH bovina en pBac4x-1

45 Las subunidades alfa de bLH en pCRScript y pBac4x-1 fueron digeridas con NotI (NEB cat# R0189S) y XhoI (NEB cat# R0146S). El inserto alfa de bLH y el vector de corte fueron purificados en gel utilizando QiaQuick y se
50 ligaron por medio de ADN Ligasa T4 (NEB cat# M0202S). La ligación se transformó en *E. coli* electro competente Top 10 y se colocó en placas sobre agar LB con ampicilina. Se analizaron los transformantes mediante digestión con restricción utilizando NotI y XhoI y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

Subunidad beta de LH bovina en pBac4x-1

55 Las subunidades beta de bLH en pCR2.1 y pBac4x-1 fueron digeridas con BglII (NEB cat# R0144S) y EcoRI. El inserto beta de bLH y el vector de corte fueron purificados en gel utilizando QiaQuick y se ligaron por medio de ADN Ligasa T4 (NEB). La ligación se transformó en XLI Blue electro competente y se colocó en placas sobre agar
60 LB con ampicilina. Se analizaron los transformantes mediante digestión con restricción utilizando BglII y EcoRI y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

Subunidades alfa y beta de LH bovina en pBac4x-1

65 La subunidad alfa de bLH y la subunidad beta de bLH en pBac4x-1 se cortaron con AgeI (NEB cat# R0552S) y BglII. El fragmento que contenía el inserto alfa y el fragmento que contenía la subunidad beta se purificaron en gel por medio de QIAex II (Qiagen cat#20021). Se ligaron los fragmentos conjuntamente utilizando ADN Ligasa T4

ES 2 358 245 T3

(NEB). La ligación se transformó en *E. coli* químico competente Top 10 y se colocó en placas sobre agar LB con ampicilina. Se analizaron los transformantes mediante digestión con restricción utilizando EcoRI y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

5

Expresión de la Línea Celular de Insectos

Las subunidades alfa y beta de LH bovina se insertan en pIZ/V5-His (Invitrogen cat# V8000-01) y pIB/V5-His (Invitrogen cat# V8020-01) separadamente para su coexpresión por medio del Sistema InsectSelect para la expresión de la línea celular estable en células de insectos Sf9, Sf21 y High Five. Se realizó la coexpresión mediante alfa de bLH/pIZ/V5-His con beta de bLH/pIB/V5-His y también mediante alfa de bLH/pIB/V5-His con beta de bLH/pIZ/V5-His. Las líneas estables que expresan cadenas únicas son infectadas también con el baculovirus que codifica la cadena complementaria.

15

Subunidades alfa de LH bovina en pIZ/V5-His

Las subunidades alfa de bLH en pBac4x-1 y pIZ/V5-His fueron digeridas cada una con BamHI y EcoRI. Los fragmentos que contenían las subunidades alfa de bLH y el corte pIZ/V5-His fueron purificadas en gel por medio de QIAex II. Los fragmentos se ligaron conjuntamente utilizando ADN Ligasa T4 (Invitrogen cat# 15224-017). La ligación se transformó en *E. coli* electro competente Top 10 (Invitrogen cat# C664-11) y se colocó en placas sobre agar LB con zeocina. Se analizaron los transformantes mediante digestión con restricción con SacI (NEB cat# R0156) y EcoRI y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

25

Subunidades beta de LH bovina en pIZ/V5-His

Las subunidades beta de bLH en pCR2.1 fueron digeridas con BglII y EcoRI y pIZ/V5-His fue digerida con BamHI y EcoRI. Los fragmentos que contenían las subunidades beta de bLH y el corte pIZ/V5-His fueron purificadas en gel por medio de QIAex II. Los fragmentos se ligaron conjuntamente utilizando ADN Ligasa T4 (Invitrogen). La ligación se transformó en *E. coli* electro competente Top 10 y se colocó en placas sobre agar LB con zeocina. Se analizaron los transformantes mediante digestión con restricción con SacI y EcoRI y la secuencia se confirmó mediante secuenciación del ADN (Lark Technologies).

35

Subunidades alfa de LH bovina en pIB/V5-His y subunidades beta de LH bovina en pIB/V5-His

La estrategia de clonación sigue la pIZ/V5-His excepto que la selección del clon tiene lugar utilizando ampicilina y la selección celular tiene lugar utilizando blasticidina.

40

Ejemplo 15

Estrategias de Expresión en Mamíferos

45

Se insertan las subunidades alfa y beta de LH bovina en pBudCE4.1 (Invitrogen cat# V532-20) para su expresión dual en las células de mamíferos COS7, CHO, 293 y 3T3. Las subunidades alfa y beta de LH bovina se insertan también en pBudCE4.1 y pWE1 (ATCC cat#87 678) separadamente para su coexpresión en las células de mamíferos COS7, CHO, 293 y 3T3. Se realiza la coexpresión por medio de alfa de bLH/pBudCE4.1 con beta de bLH/pWE1 y también por medio de alfa de bLH/pWE1 con beta de bLH/pBudCE4.1.

50

Las subunidades alfa y beta de LH bovina en pBudCE4.1 (Invitrogen cat# V532-20) para la expresión dual en las células de mamíferos COS7, CHO, 293 y 3T3 son como sigue: la subunidad alfa de bLH se inserta en pBudCE4.1 utilizando los sitios de NotI/XhoI. La subunidad beta de bLH se inserta en pBudCE4.1 utilizando los sitios de BamHI/EcoRI. Las subunidades alfa y beta de LH bovina se insertan en pWE1 utilizando BamHI y EcoRI.

55

Ejemplo 16

LH bovina recombinante de una sola cadena

60

Se puede elaborar la LH bovina recombinante de una sola cadena de acuerdo con los métodos descritos en la patente de Estados Unidos 6.242.580, que describe LH recombinante en la que la subunidad beta está unida de forma covalente a la subunidad alfa. Alternativamente, un enlazador está presente entre las subunidades alfa y beta. Las formas de cadena única necesitan solamente un único gen que se debe transcribir durante la producción recombinante y son ventajosas con respecto a las formas diméricas en términos de estabilidad de la proteína. Las SEQ ID NO.1-4 presentan secuencias de nucleótidos para las subunidades alfa y beta de LH bovina. Los vectores de expresión en los que el terminal-C de la subunidad beta de LH bovina está unido al terminal-N de la subunidad alfa de la LH bovina son transfectados en células CHO para su expresión.

65

ES 2 358 245 T3

SEQ ID NO:1

X00050. Bovine mRNA for a...[gi:606]

5 LOCUS BTPASH 713 bp mRNA linear MAM 30-MAR-1995 DEFINITION Bovine mRNA for alpha-subunit of pituitary hormones. (glycoprotein hormones).
ACCESSION X00050 J00009 K00527 V01493
VERSION X00050.1 GI:606
KEYWORDS glycoprotein; hormone; signal peptide.
10 SOURCE Bos taurus (cow)
ORGANISM Bos taurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
Pecora; Bovoidea; Bovidae; Bovinae; Bos.
15 REFERENCE 1 (bases 98 to 661)
AUTHORS Nilson,J.H., Thomason,A.R., Cserbak,M.T., Moncman,C.L. and Woychik,R.P. TITLE Nucleotide sequence of a cDNA for the common alpha subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones. Conservation of nucleotides in the 3'-untranslated region of bovine and human pre-alpha subunit mRNAs
JOURNAL J. Biol. Chem. 258 (8), 4679-4682 (1983)
20 MEDLINE 83161058
PUBMED 6187740
REFERENCE 2 (bases 1 to 713)
AUTHORS Erwin,C.R., Croyle,M.L., Donelson,J.E. and Maurer,R.A. TITLE Nucleotide sequence of cloned complementary
25 deoxyribonucleic acid for the alpha subunit of bovine pituitary glycoprotein hormones
JOURNAL Biochemistry 22 (20), 4856-4860 (1983)
MEDLINE 84024633
PUBMED 6688736
COMMENT Data kindly reviewed (09-MAY-1985) by R.A. Maurer.
FEATURES Location/Qualifiers
30 source 1..713
/organism="Bos taurus"
/db_xref="taxon:9913"
mRNA <1..713
/product="messenger RNA"
35 CDS 78..440
/note="alpha-subunit precursor"
/codon_start=1
/protein_id="CAA24932.1" /db_xref="GI:607"
/db_xref="SWISS-PROT:P01217"
40
/translation="MDYRKYAAVILTILSLFLQILHSFPDGEFTMQGCPECKLKENK
YFSKPDAAIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFTKATVMG
45 **NV**

RVENHTECHCSTCYHKS"
sig_peptide 78..149 /note="signal peptide"
50 mat_peptide 150..437
/product="alpha-subunit"
misc_feature 688..693
/note="polyA signal"
polyA_site 713
55 /note="polyadenylation site"
BASE COUNT 209 a 164 c 133 g 207 t

ES 2 358 245 T3

ORIGIN

1 aaaaactaaa attcttcttc agatccacag tcaactgccc tgactacatt ctgcaaaaat
5 61 ccagaggacg aagagccatg gattactaca gaaaatatgc agctgtcatt ctgaccattt
121 tgtctctggt tctgcaaatt ctccattcct ttctgatgg agagtttaca atgcagggct
181 gtctgaatg caagctaaaa gaaaacaaat acttctccaa gccagatgct gcaatctatc
10 241 agtgcattgg gtgctgcttc tccagggcat acccactcc agcgaggctt aagaagacaa
301 tgttggtccc caagaacatc acctcggaag ctacatgctg tgtggccaaa gcattacca
15 361 aggccacagt gatgggaaat gtcagagtgg agaaccacac cgagtgccac tgcagcactt
421 gttattatca caaatcctaa tagtttcag tgggccttgc tgatgatggc tgacttgctc
20 481 aaaaggaaaa ttaattgtc cagtgtctat ggctttgtga gataaaacct tcctttcct
541 tgccatacca ttttaacct gctttgagaa tatactgcag ctttattgct ttctcctta
25 601 tctacaata taatcagtag tcttgatctt tcatttga atgaaatatg gcatttagca
661 tgaccataaa aagctgattc cactggaaat aaagtctttt aatcatcac tct
//
30 Revised: July 5, 2002.

SEQ ID NO:2

35 M10077. Bovine lutropin (...[gi:163300])
LOCUS BOVLHBX 629 bp mRNA linear MAM 27-APR-1993 DEFINITION Bovine lutropin (LH) beta subunit mRNA,
complete cds.
ACCESSION M10077
40 VERSION M10077.1 GI:163300
KEYWORDS glycoprotein; lutropin.
SOURCE Bos taurus (cow)
ORGANISM Bos taurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;
Ruminantia;
45 Pecora; Bovoidea; Bovidae; Bovinae; Bos.
REFERENCE 1 (bases 1 to 629)
AUTHORS Maurer,R.A.
TITLE Analysis of several bovine lutropin beta subunit cDNAs reveals heterogeneity in nucleotide sequence
JOURNAL J. Biol. Chem. 260 (8), 4684-4687 (1985)
50 MEDLINE 85182575
PUBMED 3838746
COMMENT Original source text: Bovine pituitary lambda gt-11 library, cDNA to mRNA, clones LH[-7,-14,-8,-6].
Variations between the four clone sequences most likely reflects different processing of the precursor mRNAs [1].
Draft entry and sequence [1] in computer-readable form kindly provided by R. Maurer (04-OCT-1985).
55 FEATURES Location/Qualifiers
source 1..629
/organism="Bos taurus"
/db_xref="taxon:9913"
mRNA <1..514
60 /note="LHb mRNA (clone LH-7)"
CDS 2..421
/note="luteinizing hormone beta subunit prepeptide"
/codon_start=1
/protein_id="AAA30623.1"
65 /db_xref="GI:163301"
/translation="MFQGLLLWLLGVAGVWASRGPLRPLCQPINATLAAEKEACPVC
ITFTTSICAGYCPMSKRVLPVILPMPQQRVCTYHELRFASVRLPGCPPGVDPMVSPFV
ALSCHCGSCLSSSTDCGGPRTQPLACDHPPLPDILFL"

ES 2 358 245 T3

sig_peptide 2..55
/note="luteinizing hormone beta subunit signal peptide"
mat_peptide 56..418
/product="luteinizing hormone beta subunit"
5 mRNA <28..629
/note="LHb mRNA (clone LH-14)"
mRNA <31..514
/note="LHb mRNA (clone LH-8)"
10 mRNA <70..514
/note="LHb mRNA (clone LH-6)"
variation 169
/note="c in clones LH[-7,-14,-8]; t in clone LH-6"
variation 178..182
/note="gaagc in clones LH[-7,-14,-6]; gc in clone LH-8"
15 variation 329
/note="t in clone LH-7; c in clones LH[-6,-8,-14]"
variation 447
/note="c in clones LH[-7,-8,-6]; t in clone LH-14"
BASE COUNT 127 a 217 c 144 g 141 t
20 ORIGIN 42 bp upstream of HpaII site.

25 1 gatgttcag ggactgctgc tgtggctgct gctgggcgtg gccggggtgt gggcttcag
61 ggggccactg cggccgctgt gccagcccat caacgccacc ctggcggctg agaaggaggc
121 ctgccctgtc tgtatcactt tcaccaccag catctgcgcc ggctactgcc ccagcatgaa
30 181 gcgggtgctg cctgtcatcc tgccgcccat gccccagcgg gtgtgcacct accatgagct
241 gcgettegcc tccgtteggc tccccggctg cccacctgga gtggacccaa tggctctcct
35 301 ccccgtggcc ctcagctgtc actgtggatc ctgccgcctc agcagcactg actgcggggg
361 tcccagaacc caacccttgg cctgtgacca cccccgctc ccagacatcc tcttctcta
40 421 aggatgcccc acttcaacct cccatgccca tcttaactct gaaaccagc agacactctt
481 ccctccctt cccaataaag acttctcaaa ctgcctaggc tggcctaata ataattgtaa
45 541 tcattattaa cccagaagtt ctcaaatat aagattaaaa agatgaacag atataattct
601 tacccttatt aaagacaaaa gagttttct

ES 2 358 245 T3

SEQ. ID. NO:3

NM_173901. Bos taurus glycop...[gi:27806912]

5 LOCUS NM_173901 731 bp mRNA linear MAM 05-OCT-2003
 DEFINITION Bos taurus glycoprotein hormones, alpha polypeptide (CGA), mRNA.
 ACCESSION NM_173901
 VERSION NM_173901.1 GI:27806912
 KEYWORDS.
 10 SOURCE Bos taurus (cow)
 ORGANISM Bos taurus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;
 Ruminantia;
 Pecora; Bovoidea; Bovidae; Bovinae; Bos.
 15 REFERENCE 1 (bases 1 to 731)
 AUTHORS Goodwin,R.G., Moncman,C.L., Rottman,F.M. and Nilson,J.H.
 TITLE Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common alpha subunit of the bovine pituitary
 glycoprotein hormones
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 11 (19), 6873-6882 (1983)
 MEDLINE 84041490
 20 PUBMED 6314263
 REFERENCE 2 (bases 1 to 731)
 AUTHORS Erwin,C.R., Croyle,M.L., Donelson,J.E. and Maurer,R.A.
 TITLE Nucleotide sequence of cloned complementary deoxyribonucleic acid for the alpha subunit of bovine pituitary
 glycoprotein hormones
 25 JOURNAL Biochemistry 22 (20), 4856-4860 (1983)
 MEDLINE 84024633
 PUBMED 6688736
 COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference
 sequence was derived from X00003.1.
 30 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..731
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /chromosome="9"
 /map="9"
 gene 1..731
 /gene="CGA"
 /db_xref="GeneID:280749"
 /db_xref="LocusID:280749"
 40 CDS 101..463
 /gene="CGA"
 /note="chorionic gonadotropin, alpha chain"
 /codon_start=1
 /product="glycoprotein hormones, alpha polypeptide"
 /protein_id="NP_776326.1"
 /db_xref="GI:27806913"
 /db_xref="GeneID:280749"
 /db_xref="LocusID:280749"
 50 /translation="MDYYRKYAAVILAILSLFLQLHSFPDGEFTMQGCPCKLKENK
 YFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMMLVPKNITSEATCCVAKAFTKATVMGN V
 RVENHTECHCSTCYHKS"
 sig peptide 101..172
 /gene="CGA"
 55 misc feature 173..460
 /gene="CGA"
 /note="hormone6; Region: Glycoprotein hormone"
 /db_xref="CDD:pfam00236"
 mat peptide 173..460
 /gene="CGA"
 /product="unnamed"
 /label=pit_mat
 misc feature 200..460
 /gene="CGA"
 65 /note="GHA; Region: Glycoprotein hormone alpha chain
 homologues. Also called gonadotropins. Glycoprotein hormones consist of two glycosylated chains (alpha and
 beta) of similar topology"
 /db_xref="CDD:smart00067"

ES 2 358 245 T3

ORIGIN

5 1 gcagttgctg agaaatcaca agacaaaact aaaattcttc tcagatcca cagtcaactg
61 ccctgactac attctgcaaa aatccagagg acgaagagcc atggattact acagaaaata
121 tgcagctgtc attctggcca tttgtctct gttctgcaa attctccatt cctttcctga
10
181 tggagagttt acaatgcagg gctgtcctga atgcaagcta aaagaaaaca aatacttctc
241 caagccagat gctccaatct atcagtgcac ggggtgctgc ttctccaggg cataccccac
15
301 tccagcgagg tctaagaaga caatgttggc cccaagaac atcacctcgg aagctacatg
361 ctgtgtggcc aaagcattta ccaaggccac agtgatggga aatgtcagag tggagaacca
20
421 caccgagtgc cactgcagca cttgttatta tcacaaatcc taatagtttg cagtgggcct
481 tgctgatgat ggctgacttg ctcaaaagga aaattaattt gtccagtgtc tatggctttg
25
541 tgagataaaa ccctcctttt ccttgccata ccatttttaa cctgctttga gaatatactg
601 cagctttatt gctttctcc ttatcctaca atataatcag tagtcttgat cttttcattt
30
661 ggaatgaaat atggcattta gcatgacat aaaaagctga ttccactgga aataaagtct
721 tttaatcat c

35 SEQ. ID. NO:4

NM_173930. Bos taurus lutein... [gi:27806854]

40 LOCUS NM_173930 426 bp mRNA linear MAM 05-OCT-2003
DEFINITION Bos taurus luteinizing hormone beta polypeptide (LHB), mRNA.
ACCESSION NM_173930
VERSION NM_173930.1 GI:27806854
KEYWORDS.
45 SOURCE Bos taurus (cow)
ORGANISM Bos taurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;
Ruminantia;
Pecora; Bovoidea; Bovidae; Bovinae; Bos.
50 REFERENCE 1 (bases 1 to 426)
AUTHORS Virgin,J.B., Silver,B.J., Thomason,A.R. and Nilson,J.H.
TITLE The gene for the beta subunit of bovine luteinizing hormone encodes a gonadotropin mRNA with an unusually
short 5'-untranslated region
JOURNAL J. Biol. Chem. 260 (11), 7072-7077 (1985)
MEDLINE 85207729
55 PUBMED 2987241
REFERENCE 2 (bases 1 to 426)
AUTHORS Maurer,R.A.
TITLE Analysis of several bovine lutropin beta subunit cDNAs reveals heterogeneity in nucleotide sequence
60 JOURNAL J. Biol. Chem. 260 (8), 4684-4687 (1985)
MEDLINE 85182575
PUBMED 3838746
COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference
sequence was derived from M11506.1.
FEATURES Location/Qualifiers

65

ES 2 358 245 T3

source 1..426
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 5 /chromosome="18"
 /map="18"
 gene 1..426
 /gene="LHB"
 /db_xref="GeneID:280839"
 10 /db_xref="LocusID:280839"
 CDS 1..426
 /gene="LHB"
 /note="precursor"
 /codon_start=1
 15 /product="luteinizing hormone beta polypeptide"
 /protein_id="NP_776355.1"
 /db_xref="GI:27-806855"
 /db_xref="GeneID:280839"
 /db_xref="LocusID:280839"
 20 /translation="MEMFQGLLLWLLLVGAGVWASRGPLRPLCQPINATLAAEKEACP
 VCITFTTSICAGYCPMSMKRVLPVILPMPQVRCTYHELRFASVRLPGCPPGVDPMSF
 PVALSCHCGPCRLLSSTDCGGPRTQPLACDHPPLPDILFL"
 sig peptide 1..60
 25 /gene="LHB"
 mat peptide 61..423
 /gene="LHB"
 /product="luteinizing hormone beta polypeptide"
 misc feature 73..393
 30 /gene="LHB"
 /note="GHB; Region: Glycoprotein hormone beta chain homologues. Also called gonadotropins. Glycoprotein
 hormones consist of two glycosylated chains (alpha and beta) of similar topology"
 /db_xref="CDD:smart00068"
 variation 68
 35 /gene="LHB"
 /note="g in DNA; a in cDNA"
 /replace="a"
 variation 81..82
 40 /gene="LHB"
 /note="gc in DNA; cg in cDNA"
 /replace="cg"

ORIGIN

45 **1 atggagatgt tccagggact gctgctgtgg ctgctgctgg gcgtggccgg ggtgtgggct**
61 tccagggggc cactgcggcc gctgtgccag cccatcaacg ccaccctggc ggctgagaag
 50 **121 gaggcctgcc ctgtctgtat cactttcacc accagcatct gcgccggcta ctgccccagc**

 55 **181 atgaagcggg tgctgcctgt catcctgccg cccatgcccc agcgggtgtg cacctacat**
241 gagctgcgct tcgctccgt tcggetcccc ggctgcccac ctggagtgga cccaatggtc
301 tccttccccg tggccctcag ctgtcactgt ggaccctgcc gcctcagcag cactgactgc
 60 **361 ggggggtccca gaaccaacc ctggcctgt gaccacccc cgtcaccaga catcctcttc**
421 ctctaa

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante en la fabricación de un fármaco para mantener uno o varios embarazos mediante la inducción de la formación de cuerpo lúteo accesorio en uno o varios mamíferos, **caracterizada** porque dicho fármaco se administra a dichos mamíferos el día o entre el Día 2 y el Día 10 después de haber realizado la inseminación en dichos mamíferos, **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 10 microgramos y 25 miligramos.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho fármaco mantiene los embarazos en más de un 40%, y preferentemente en más del 50%, de dichos mamíferos.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque no se administra ninguna otra hormona a dicho uno o varios mamíferos cuando se administra dicho fármaco a dichos mamíferos.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 10 microgramos y 5 miligramos.
- 20 5. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 10 microgramos y 1 miligramo.
- 25 6. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 25 microgramos y 250 microgramos.
- 25 7. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 75 microgramos y 175 microgramos.
- 30 8. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho fármaco se administra el día o entre el Día 4 y el Día 7 después de dicha inseminación.
- 30 9. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha hormona luteinizante se selecciona de entre el grupo compuesto de: hormona luteinizante bovina, hormona luteinizante recombinante y hormona luteinizante recombinante de una sola cadena.
- 35 10. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha hormona luteinizante purificada es pura en al menos un 95%.
- 40 11. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho uno o varios mamíferos son ungulados o bovinos.
- 40 12. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho uno o varios mamíferos se seleccionan de entre el grupo compuesto de: bovinos, ovejas, cabras, yacs, búfalos de agua, bisontes, antílopes, gacelas, ciervos canadienses, renos, alces, muflones, jirafas, y camélidos incluidos los camellos y dromedarios, llamas, cerdos, caballos, alpacas, y vicuñas.
- 45 13. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho uno o varios embarazos se mantienen el Día 15 después de la inseminación.
- 50 14. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho uno o varios embarazos se mantienen el Día 30 después de la inseminación, y preferentemente el Día 56 después de la inseminación.
- 55 15. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la administración de dicho fármaco es por vía intramuscular.
- 55 16. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho fármaco se administra a dicho uno o varios mamíferos el día o entre el Día 4 y el Día 7 después de la inseminación, y **caracterizada** porque dicha cantidad eficaz de hormona luteinizante purificada o recombinante se sitúa entre 75 microgramos y 1 miligramo, preferentemente entre 75 microgramos y 175 microgramos.
- 60 17. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque se administra con dicho fármaco una cantidad eficaz de hormona del crecimiento, hormona folículo estimulante, o gonadotropina coriónica a dicho uno o varios mamíferos.
- 65 18. Utilización según la reivindicación 17, **caracterizada** porque se administra a dicho uno o varios mamíferos menos de 1000 IU de gonadotropina coriónica.
- 65 19. Utilización según la reivindicación 17, **caracterizada** porque dicha gonadotropina coriónica es gonadotropina coriónica humana.