

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 465**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04292296 .3**

96 Fecha de presentación: **24.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1518863**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

54 Título: **ANTICUERPOS QUE MODULAN LA ACTIVIDAD DE GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA.**

30 Prioridad:
26.09.2003 EP 03292365

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)
147, RUE DE L'UNIVERSITE
75007 PARIS CEDEX 07, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) y
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS DE TOURS**

72 Inventor/es:
**Maurel, Marie-Christine;
Roy, Francois;
Herve, Virginie;
Bertin, Jean y
Guillou, Florian**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

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).

ES 2 371 465 T3

DESCRIPCION

Anticuerpos que modulan la actividad de gonadotropina coriónica equina

- 5 La invención se refiere al uso de anticuerpos dirigidos frente a la gonadotropina coriónica equina (eCG), para modular la actividad de dicha hormona.

10 Las gonadotropinas juegan un papel importante en el control de las actividades gametogénicas y endocrinas de las gónadas. Estas glicoproteínas complejas están compuestas de dos α o β disimiles, cuya asociación no covalente es necesaria para sus actividades biológicas. Las gonadotropinas pertenecen a la familia de hormonas de glicoproteínas y comprenden hormona luteinizante hipofisaria (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) y gonadotropina coriónica humana (hCG) y equina (eCG). Las gonadotropinas se usan actualmente en medicina humana y veterinaria para mimetizar los mecanismos endocrinos de los ciclos sexuales. En seres humanos, la FSH y la hCG se usan para conducir protocolos de fertilización *in vitro* (FIV) y tratamiento de anovulación. En mamíferos, particularmente rumiantes, se usa comúnmente la eCG, en asociación con un progestógeno, en la inducción y sincronización del estro y tratamientos de ovulación y en tratamientos de súper ovulación.

20 La gonadotropina coriónica equina (eCG) se secreta por las células trofoblásticas en la yegua entre los días 36 y 120 de la gestación (ALLEN and MOOR, J. Reprod. Fertil. 29: 313-316, 1972). De forma curiosa, en las especies equinas la eCG dimerica se une únicamente al receptor de LH (GUILLOU and COMBARNOUS, Biochim. Biophys. Acta 755: 229-236, 1983; COMBARNOUS et al., Ann. Endocr. Paris 45: 261-268, 1984) mientras que la misma muestra actividad de FSH pronunciada adicionalmente a su actividad de LH en especies diferentes a la equina (PAPKOFF, Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 397-404, 1974; COMBARNOUS et al., FEBS Lett. 90: 65-68, 1978; LICHT et al., J. Endocrinol. 83: 311-322, 1979). Cada subunidad está compuesta de una parte peptídica conectada a un resto glicánico (cadenas N- y O-). La eCG es la hormona glicoprotéica más pesadamente glicosilada, con una mayoría de glicanos de bi-antena que terminan principalmente en ácidos siálicos que juegan un papel importante en la semi-vida hormonal *in vivo* (MATZUK et al., Endocrinol. 126: 376-383, 1990). Las cadenas de glicano también están implicadas en la estabilidad de la hormona heterodimérica (HEIKOOP et al., Eur. J. Biochem. 253: 354-356, 1998) y son necesarias para la eficacia de la transducción de señal (MATZUK et al., J. Biol. Chem. 264: 2409-2414, 1989; SAIRAM and JIANG, Mol. Cell Endocrinol. 85: 227-235, 1992). La actividad doble de eCG, su semi-vida prolongada y su disponibilidad en grandes cantidades hace que esta gonadotropina única será una hormona exógena conveniente en los tratamientos para inducir y sincronizar el estro y la ovulación.

35 Sin embargo, se ha indicado que el uso repetido de tratamientos de eCG para inducción de ovulación generalmente viene seguido por una fertilidad disminuida que puede disminuir desde el 60 % al 40 % (BARIL et al., Theriogenol. 40: 621-628, 1993; BARIL et al., Reprod. Domest. Anim. 27: 161-168, 1992) y este fenómeno se explicó mediante respuestas inmunológicas indeseadas (ROY et al., Biol. Reprod. 60: 805-813, 1999). La presencia de anticuerpos anti-eCG (anticuerpos anti-eCG) en el plasma de cabras y ovejas tratadas con eCG se ha demostrado (BARIL et al., 1993, mencionado anteriormente; BARIL et al., 1992, mencionado anteriormente; ROY et al., 1999, mencionado anteriormente; ROY et al., Biol. Reprod. 61: 209-218, 1999). Un estudio con 2500 hembras (ovejas y cabras) demostró que una inyección de 500 UI de eCG induce una cinética de respuesta inmune humoral rigurosamente similar (RIH) con una concentración de anticuerpo anti-eCG máxima entre 10 y 17 días después de la inyección (ROY et al., 1999, mencionado anteriormente; ROY et al., 1999, mencionado anteriormente). Aproximadamente el 65 % de las hembras tratadas desarrollaron anticuerpos frente a eCG pero los niveles de anticuerpo anti-eCG fueron altamente variables entre los individuos. Informes previos mostraron una asociación significativa entre las hembras que presentan fenotipos de respuesta anti-eCG altos o bajos y alelos de microsatélite particulares localizados dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II (ROY et al., 1999, mencionado anteriormente; ROY et al., 1999, mencionado anteriormente). Los anticuerpos anti-eCG, que ya están presentes para el momento de la inyección de eCG y que se producen como resultado de la respuesta inmune previa frente a eCG un año antes, se definen como: "anticuerpos anti-eCG residuales". Las hembras con una concentración de anticuerpos anti-eCG residuales elevada mostraron una fertilidad significativamente menor después de la inseminación artificial (IA), debido al retardo tanto en la aparición del estro como en el pico de LH preovulatorio (ROY et al., 1999, mencionado anteriormente; ROY et al., 1999, mencionado anteriormente).

55 De forma sorprendente, algunas hembras presentaron una fertilidad significativa después de la IA a pesar de los niveles elevados de anticuerpos anti-eCG residuales. Por lo tanto, para abordar el mecanismo de interferencia inmune sobre la función reproductora inducida por eCG, los inventores han ensayado el impacto de anticuerpos anti-eCG en las bioactividades tanto de LH como de FSH de la eCG. Los inventores han encontrado que los anticuerpos anti-eCG que reconocen principalmente el resto glicánico de eCG, fueron capaces de modular independientemente las bioactividades de LH y FSH, es decir, de estimular las actividades tanto de LH como de FSH o de estimular sólo una de ellas mientras que no tenían efecto o un efecto inhibitorio sobre la otra. También han observado en particular que los anticuerpos anti-eCG capaces de estimular la bioactividad de FSH de la eCG (mientras que no tienen efecto o un efecto estimulador sobre la actividad de LH) mejoraban enormemente la fertilidad después de la inseminación artificial.

65 La presente invención se refiere a un anticuerpo policlonal anti-gonadotropina coriónica equina (anti-eCG) capaz de mejorar la bioactividad de FSH de gonadotropina coriónica equina (eCG), en el que dicho anticuerpo policlonal tiene las siguientes características:

- el mismo reconoce la eCG glicosilada nativa y no reconoce eCG desglicosilada;
- el mismo no reconoce LH equina;
- el mismo reacciona de forma cruzada moderadamente o marcadamente con la subunidad β de eCG;
- el mismo relaciona de forma cruzada débilmente con la subunidad α de eCG.

La expresión "anticuerpo policlonal" incluye molécula de inmunoglobulina completas así como fragmentos de la misma que conservan la especificidad de reconocimiento de antígeno. Esto comprende en particular fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.

Un anticuerpo en el presente documento se define como que "no reconoce" una forma o subunidad de eCG dada, cuando el porcentaje de reacciones cruzadas de dicho anticuerpo con dicha forma o subunidad es igual a o inferior al 2 % en un ELISA competitivo hacia eCG glicosilada nativa. De la misma manera, un anticuerpo se define como que "reacciona de forma cruzada débilmente" cuando el porcentaje de reacciones cruzadas es mayor del 2 % e igual o inferior del 10 %; como: "reacciona de forma cruzada moderadamente" cuando el porcentaje de reacciones cruzadas es mayor del 10 % e igual o inferior del 25 % y como: "relaciona de manera cruzada de forma marcada" cuando el porcentaje de reacciones cruzadas es mayor del 25 %.

De acuerdo con una realización preferida de un anticuerpo policlonal anti-eCG de la invención, adicionalmente es capaz de mejorar la bioactividad LH de gonadotropina coriónica equina y reacciona de forma cruzada marcadamente con la subunidad de eCG.

Preferiblemente, los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención no reaccionan de forma cruzada con una isoforma de eCG que tiene un contenido de ácido siálico igual o inferior a aproximadamente el 4,7 %.

De acuerdo con realizaciones preferidas:

- los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención capaces de mejorar tanto la bioactividad LH como FSH de gonadotropina coriónica equina reaccionan de forma cruzada débilmente con una isoforma de eCG que tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente el 9,5 % y reaccionan de forma cruzada marcadamente con una isoforma de eCG que tiene un contenido de ácido siálico igual a o mayor de aproximadamente el 17,3 %;
- los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención capaces de mejorar la bioactividad FSH y que no tienen efecto sobre la actividad LH de gonadotropina coriónica equina no reaccionan de forma cruzada con una isoforma de eCG que tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente el 9,5 % y reaccionan de forma cruzada débilmente con una isoforma de eCG que tiene un contenido de ácido siálico igual a o mayor de aproximadamente el 17,3 %.

Los anticuerpos policlonales anti-eCG se pueden obtener fácilmente a partir de plasmas o sueros de animales que han recibido al menos una inyección de eCG. Para la producción de anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención, la preparación de eCG usada para inmunización preferiblemente es una preparación que tiene una actividad de aproximadamente 500 UI a 4000 UI/mg de proteína.

Una preparación de este tipo se puede obtener a partir del suero de yegua preñada mediante métodos conocidos en los mismos tales como el método descrito por GOSPODAROWICZ y PAPKOFF, (Endocrinology, 80, 699-702, 1967). De forma provechosa la misma puede ser una preparación comercial de gonadotropina coriónica equina, que tiene una actividad de aproximadamente 1500 UI a 4000 UI/mg de proteína, tales como las que se usan en tratamientos para inducir y sincronizar el estro y la ovulación. Los ejemplos de preparaciones comerciales adecuadas son CHRONOGEST®-PMSG comercializada por INTERVET o SYNCHRO-PART®-PMSG comercializada por CEVA.

La dosis de eCG usada para inmunización generalmente es de aproximadamente 1,5 a 4,5 μ g de proteína/kg/inyección. Por ejemplo, en el caso de cabras y ovejas, se puede administrar una dosis de 125 a 350 μ g (correspondientes a 400 a 600 UI de eCG) por animal. Una inyección única es suficiente para inducir la producción de anticuerpos policlonales anti-eCG, que se pueden recoger tan pronto como 7 días después de la inyección; sin embargo, debido a que, como se ha indicado anteriormente, la concentración de anticuerpo policlonal anti-eCG máxima se alcanza entre los días 10 y 17 después de la inyección, se prefiere recoger dichos anticuerpos 10 a 25 días después de la inyección. El intervalo entre la inyección de eCG y la recuperación de los anticuerpos puede ser, sin embargo, mayor, hasta 12 a 15 meses: los inventores han observado, de hecho, que los anticuerpos policlonales anti-eCG capaces de estimular la FSH y/o bioactividad de eCG se encontraron frecuentemente entre los anticuerpos anti-eCG residuales que se producían como resultado de una inyección de eCG un año antes.

Provechosamente, los anticuerpos policlonales anti-eCG se pueden recuperar de sueros o plasma de hembras que han recibido eCG durante un tratamiento convencional para inducir y sincronizar el estro y la ovulación. En este caso, las hembras pueden ser nulíparas, primíparas o múltiparas en el momento del tratamiento. Se pueden usar hembras que se están tratando por primera vez o que ya hayan recibido el mismo tratamiento previamente (generalmente un año). Sin embargo las mismas no deben haber recibido tratamientos previos mediante gonadotropinas diferentes a la eCG.

Los sueros o plasma que contienen los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención se pueden seleccionar en base a sus propiedades para estimular al menos la bioactividad FSH de eCG y preferiblemente las bioactividades FSH y LH de eCG, usando por ejemplo los ensayos descritos en los ejemplos más adelante. Si se desea la fracción de IgG se puede purificar, por medios conocidos en los mismos, por ejemplo mediante cromatografía definida.

Los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención se pueden purificar adicionalmente a partir de los plasmas o sueros seleccionados, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad en base a su reconocimiento de eCG glicosilada nativa y de su carencia de reconocimiento de eCG desglicosilada y de LH equina. Provechosamente, los mismos se pueden purificar adicionalmente en base a su carencia de reconocimiento de isoformas de eCG que tienen un contenido de ácido siálico igual o inferior a aproximadamente el 4,7 %.

Los anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención permiten modular la actividad biológica de eCG inyectada exógenamente. Los mismos son útiles en particular en los tratamientos de inducción y sincronización de ovulación para disminuir la cantidad de eCG inyectada y aún así obtener una fertilidad elevada. Tales anticuerpos son particularmente interesantes y tienen aplicaciones en particular para la cría de animales, especialmente para bovinos, ovinos, caprinos, roedores tales como murinos o conejos, etc., así como potencialmente para tratamiento de infertilidad humana y técnicas de reproducción asistida en las que se usan intensivamente las gonadotropinas exógenas. Los mismos son particularmente útiles en especies en los que los tratamientos para inducir y sincronizar el estro y la ovulación son de uso frecuente, tales como ovinos y caprinos.

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-eCG policlonal de la invención para preparar una composición para aumentar la eficacia de eCG para la inducción y sincronización de estro y ovulación.

La invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en la inducción y sincronización de estro y ovulación en un mamífero, en la que dicha composición comprende un anticuerpo de la invención.

De acuerdo con una realización preferida de una composición farmacéutica de la invención, la misma comprende adicionalmente eCG.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de anticuerpos policlonales anti-eCG de la invención. Sin embargo, se ha de apreciar que estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ninguna manera una limitación de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparaciones de plasma y hormona

Plasmas de cabras se obtuvieron a partir de un estudio previo (ROY et al, Biol. Reprod. 60: 805-813, 1999) conducido en hembras tratadas en varios rebaños (n= 350) y en una granja experimental de INRA, Domaine de Galle, Avord, Francia (n= 200). En todos los casos, las hembras se trataron durante 11 días con progestógeno (esponja vaginal impregnada de 45 mg de acetato de fluorogestona) y recibieron una inyección intramuscular de 500 UI de eCG (Syncro-part®, lote 13054A1; CEVA, Libourne, Francia), 48 h antes de la retirada de la esponja. Se realizó IA de manera rutinaria 43 h después de que se retiró la esponja. Las muestras de plasma se recogieron inmediatamente antes del tratamiento de eCG (día 0) y 10 días después (día 10). Todas las muestras de plasma se almacenaron a -20°C. Los anticuerpos anti-eCG, presentes el día 0 y que se produjeron como resultado de la respuesta inmune previa frente a eCG un año antes, se definieron como los anticuerpos anti-eCG residuales.

Para el presente estudio se seleccionaron 37 cabras que mostraron la concentración de anticuerpos anti-eCG más elevada en el día 0 de 3 µg/ml a 22 µg/ml y el día 10 de 6 µg/ml a 70 µg/ml. El número de tratamientos previos por cabra varía de uno a cinco, dependiendo de la edad de la hembra. El control de plasma corresponde a un grupo de plasmas de cabras no tratadas con eCG.

La gonadotropina coriónica equina (eCG convencional FL 652), eLH, subunidades α-eCG y β-eCG e isoformas de eCG NZY-01 (LECOMPTE et al., J. Reprod. Fertil. 113:145-150, 1998) las proporcionaron generosamente los Dr. Y. Combarnous y F. Lecompte (INRA, Nouzilly, Francia). La eCG desglicosilada totalmente (GRB-VII-128A) la proporcionó generosamente el Doctor Georges R. Bousfield (Wichita State University, Kansas). Purificación por afinidad de anticuerpo anti-eCG

Los anticuerpos de plasmas seleccionados se purificaron por afinidad en una columna de proteína HiTrap G (Pharmacia, Uppsala, Suecia) que presentaba una capacidad de unión elevada para inmunoglobulinas G (IgG) (AKERSTRÖM y BJÖRCK, J. Biol. Chem. 261: 10240-10247, 1986). En resumen, 5 ml de cada plasma se sometieron a purificación por afinidad, como se ha descrito previamente (ROY et al, Biol. Reprod. 60: 805-813, 1999). Después los anticuerpos purificados se almacenaron a -20°C.

Medición de concentraciones de anticuerpos anti-eCG mediante un ELISA cuantitativo

Las concentraciones de anticuerpo anti-eCG en plasmas o fracciones purificadas de IgG se midieron usando un ELISA cuantitativo específico como se ha descrito previamente (ROY et al, Biol. Reprod. 60: 805-813, 1999). La concentración de anticuerpo anti-eCG se expresó en µg/ml de plasma.

Bioensayo *in vitro* de LH

El bioensayo *in vitro* de LH se basa en la estimulación de producción de testosterona mediante células de Leydig de ratas aisladas como se ha descrito previamente (GUILLOU et al., FEBS Lett. 184: 6-9, 1985). Diferentes concentraciones de eCG (100 µl) se preincubaron durante una noche a temperatura ambiente, con o sin plasma no diluido (9 µl) o la fracción de IgG correspondiente, con 91 µl de medio Leibowitz L15 añadidos. Las células de Leydig (15.10⁴ células en 200 µl de L15) se combinaron con las muestras preincubadas durante 4 h a 34°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se almacenaron a -20°C. Las concentraciones de testosterona se ensayaron mediante un RIA específico (HOCHEREAU-DE-REVIERS et al., Anim. Reprod. Sci., 23:21-32, 1990).

Bioensayo *in vitro* de FSH

El bioensayo *in vitro* de FSH se basa en la estimulación de producción de progesterona mediante la línea celular YI obtenida a partir de un tumor de corteza adrenal de ratón que expresaba de forma estable el receptor de FSH humano (un regalo amable de Ares Serono, Ginebra, Suiza) como se ha descrito previamente (KELTON et al. Mol. Cell Endocrinol. 89: 141-151, 1992). Diferentes concentraciones de eCG (500 µl), se preincubaron durante una noche a temperatura ambiente, con o sin 45 µl de plasma no diluido, o la fracción de IgG correspondiente, a los que se añadieron 455 µl de medio de cultivo. Después, 15.10⁴ células YI se estimularon con 400 µl de muestras preincubadas durante 4 h a 37°C. Los medios se recogieron, sometieron a ebullición, se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron y ensayaron para determinar progesterona mediante un RIA específico (SAUMANDE et al., Theriogenol. 23: 719-731, 1985).

Sensibilidad de bioensayos *in vitro* de LH y FSH

Las sensibilidades de los dos ensayos biológicos obtenidos con células YI y células de Leydig se analizaron con eCG que variaba de 6 ng/ml a 50 ng/ml. La secreción de progesterona varió entre 6,93 ng/ml y 33,49 ng/ml y la secreción de testosterona entre 9,34 ng/ml y 25,67 ng/ml. La secreción de progesterona y testosterona comienza con la misma concentración de eCG, es decir 6 ng/ml. Por lo tanto, se usó el mismo intervalo de estimulación de eCG para ambos ensayos biológicos *in vitro*.

Medición de plasmas anti-eCG y efectos de IgG sobre actividades LH y FSH de eCG

En ambos ensayos biológicos, se usaron dos controles. El primero determina el nivel basal de la producción de hormona mediante las células de Leydig y las células YI. El segundo determina el nivel de la producción de hormona mediante las células Leydig y mediante las células YI y, en presencia de plasma de control o de la fracción de IgG correspondiente desprovista de anticuerpos anti-eCG.

Los resultados se expresan como el porcentaje de bioactividad de eCG: $100 \times [(A - B)/(C - D)]$, A es la cantidad de progesterona o testosterona secretada durante la estimulación con concentración definida de eCG preincubado con un plasma o IgG de hembras tratadas, B es la cantidad de progesterona o testosterona secretada durante la estimulación con plasma preincubado o con IgG de hembras tratadas sin eCG, C es la cantidad de progesterona o testosterona secretada durante la estimulación con una concentración definida de eCG preincubada con un plasma de control o con IgG de control de hembras no tratadas y D es la cantidad de progesterona o testosterona secretada durante la estimulación únicamente con plasma de control o con IgG de control de hembras no tratadas.

Ensayo de receptor de radioligando

Únicamente las fracciones de IgG purificadas a partir de plasmas anti-eCG se analizaron. La capacidad de IgG anti-eCG de modular la actividad de unión de eCG a los receptores de LH y FSH de rata se analizó usando un ensayo de receptor de radioligando (RRA), realizado como se ha descrito previamente (GUILLOU et al., 1985, mencionado anteriormente). Se prepararon fracciones de membrana con altos contenidos en receptores a partir de testículos de rata. Para el ensayo de unión, se preincubaron 5 ng/ml a 10 µg/ml de eCG durante una noche a temperatura ambiente con 6,5 µg/ml de anticuerpos anti-eCG. Después, 100 µl de cada muestra preincubada se incubaron durante 4 h a 34°C, con 50 µl de tampón que contenía CaCl₂ 36 mM, 50 µl de la hormona marcada radiactivamente con yodo (40.000 cpm) y 100 µl de membranas testiculares. La reacción se detuvo añadiendo 2 ml de Tris-HCl 10 mM frío, pH 7,4 a 4°C y los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 40 min. La radiactividad unida se midió en un contador gamma (Packard Instrument, Francia).

Medición de afinidad de anticuerpos anti-eCG mediante Resonancia de Plasmón Superficial (RPS)

La interacción entre los anticuerpos anti-eCG y eCG se midió mediante RPS usando un sistema Biacore 1000 (Biacore International, Uppsala, Suiza). Las mediciones de afinidad se realizaron con plasmas diluidos o IgG purificados por afinidad correspondientes recogidos el día 0 o el día 10. Las microplacas sensoras, el kit de acoplamiento de amina y el tampón HBS se suministraron por Biacore.

eCG (35 μ l) preparado a 100 μ g/ml en acetato de sodio 10 mM pH 4, se acopló covalentemente sobre una microplaca sensora de dextrano carboximetilado CM5 para IgG purificados o microplaca sensora F1 para análisis de plasmas, usando un kit de acoplamiento de amina como se ha descrito por el fabricante. Las microplacas sensoras F1 son muy adecuadas para muestras de plasma debido a que su matriz de dextrano es más corta que CM5 y reduce la unión inespecífica cuando se inyectan plasmas diluidos. El nivel de inmovilización de eCG fue 6500 UR en microplacas CM5 y 1600 UR en F1.

Las mediciones de cinética de interacción de anticuerpos anti-eCG sobre eCG acoplado se realizaron con HBS como tampón de desarrollo (20 μ l/min) y de dilución, a 23°C. La concentración de anticuerpos anti-eCG de fracción de IgG inyectada (35 μ l) varió de 1,2 nM a 64 nM. Los plasmas inyectados (35 μ l) se diluyeron de 1/10 a 1/80. Para evitar las interacciones inespecíficas en la superficie recubierta, las IgG y plasmas purificados se preincubaron durante 30 min a 37°C en HBS al que se añadió 1 mg/ml de CM-dextran (Fluka, Francia) antes de la inyección. La regeneración de la superficie acoplada se realizó inyectando NaOH 10 mM (10 μ l). La curva de unión obtenida con el plasma de control o la fracción de IgG purificada se usó para la sustracción de unión inespecífica.

El cálculo de las constantes cinéticas y de afinidad se analizó usando software BIA Evaluation (versión 2.2.4). Este software Biacore permite calcular las constantes cinéticas (k_{on} y k_{off}) con desviación típica y un ensayo de validación estadística (chi cuadrado). La constante de afinidad se calculó como la proporción de k_{on}/k_{off} y la constante de disociación como la proporción de k_{off}/k_{on} .

Especificidad de anticuerpos anti-eCG

Las regiones de eCG reconocidas por anticuerpos anti-eCG se determinaron usando un ELISA competitivo descrito previamente (MAUREL et al., Biochim. Biophys. Acta 1159: 74-80, 1992). Antes del ensayo, los plasmas de cabra recogidos el día 0 o el día 10 se incubaron durante una noche con concentraciones crecientes (desde 50 ng/ml hasta 10 μ g/ml) de eCG FL652 convencional, subunidades α -eCG y β -eCG aisladas, eLH, eCG completamente desglicosilada (dg eCG), eCG tratado con neuraminidasa (eCG SA4 – 1% de ácido siálico) y tres isoformas de eCG NZY-01 (15) : isoforma eCG con el 17% de ácido siálico (eCG SA1), isoforma de eCG con el 9,5% de ácido siálico (eCG SA2), isoforma de eCG con el 4,7% de ácido siálico (eCG SA3). El 100% de la reacción cruzada se obtuvo con eCG FL652 convencional.

Análisis estadísticos

Los valores promedios se representan como las medias $\pm$ ETM. Las diferencias en las secreciones de progesterona y testosterona se determinaron mediante el ensayo *t* de Student o ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas para valores de *p* de 0,05 o menos.

EJEMPLO 1: PLASMAS DE CABRAS TRATADAS CON eCG MODULAN DE FORMA DIFERENTE**LAS BIOACTIVIDADES LH Y FSH DE eCG.**

37 plasmas con concentraciones elevadas de anticuerpos anti-eCG, que se recogen inmediatamente antes de la inyección de eCG (día 0) y 10 días después de la inyección (día 10), se analizaron para determinar sus efectos sobre las bioactividades LH y FSH de eCG, basándose respectivamente en la modulación de la producción de testosterona y progesterona, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Para este propósito, eCG que variaba de 6 ng/ml a 50 ng/ml se preincubó durante una noche con medio o plasmas de hembras no tratadas (plasma de control), o con plasmas diferentes de cabras tratadas con eCG. Después, las secreciones de testosterona y progesterona se midieron mediante RIA después de 4 h de incubación a 34°C y 37°C, respectivamente.

Los efectos de tres plasmas representativos de cabras tratadas con eCG sobre las secreciones de testosterona (A) y progesterona (B) inducidas por eCG ensayadas en bioensayos *in vitro* tanto de LH como de FSH se representan en la Figura 1.

Leyenda de la Figura 1: A: Testosterona; B: progesterona; eCG preincubada con plasmas de cabras tratadas con eCG ($\square$, $\circ$, $\blacklozenge$) o con un plasma de control (A).

Las curvas de estimulación-respuesta muestran tres efectos diferentes sobre las bioactividades de FSH y LH: uno de los plasmas tiene un efecto inhibitor sobre las bioactividades tanto de LH como de FSH (-o-), otro no tiene efecto en las

bioactividades tanto de LH como de FSH ($\square$ -), el tercero tiene un efecto hiperestimulante en las bioactividades tanto de LH como de FSH ($\blacklozenge$ -).

Para cada ensayo, se usó eCG preincubado con medio o con un plasma de control como referencia. Ambos controles condujeron a secreción de testosterona y progesterona idéntica cuando la estimulación se realizó con una concentración similar de eCG. Cuando eCG se preincubó con plasmas que contenían anticuerpos anti-eCG, se observaron tres efectos diferentes sobre las bioactividades LH y FSH de eCG. En primer lugar, algunos plasmas no presentaron efectos sobre las bioactividades LH y FSH e indujeron la misma producción de testosterona y progesterona que la obtenida con el plasma de control. En segundo lugar, algunos plasmas mostraron un efecto inhibitor sobre las bioactividades de LH y/o FSH. Estos plasmas indujeron secreción de progesterona y testosterona menor para todas las concentraciones de eCG ensayadas que el plasma de control. Y en el último caso, algunos plasmas mostraron un efecto hiperestimulador sobre las bioactividades LH y/o FSH, conduciendo a secreción de testosterona y progesterona más elevada para todas las concentraciones de eCG ensayadas que el plasma de control. Por el contrario, cuando se incubaron sin eCG, todos estos plasmas no tuvieron un efecto significativo sobre la secreción basal de progesterona y testosterona.

Entre los 37 plasmas que contienen anticuerpos anti-eCG que se ensayaron, 10 plasmas no tuvieron efecto sobre las bioactividades de eCG (datos no mostrados) mientras que 27 sí modularon las bioactividades de eCG.

Para comprobar los efectos de estos últimos 27, las bioactividades de LH y FSH se determinaron después de una preincubación durante una noche a concentraciones de eCG que variaban de 12,5 ng/ml a 100 ng/ml. La secreción de testosterona y progesterona se midió como anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Los resultados se expresaron en porcentaje de bioactividad LH ($\square$) o bioactividad FSH ($\blacksquare$) de eCG. La línea oscura que corresponde al 100% de bioactividad se obtuvo con plasma de control de hembras no tratadas, desprovistos de anticuerpos anti-eCG (-). Los diferentes histogramas representan: (A) un plasma que muestra un efecto inhibitor sobre las bioactividades tanto de LH como FSH; (B) un plasma que muestra un efecto inhibitor únicamente sobre la bioactividad FSH; (C) un plasma que muestra un efecto inhibitor únicamente sobre la bioactividad LH; (D) un plasma que muestra un efecto hiperestimulante en las bioactividades tanto LH como FSH; (E) un plasma que presenta un efecto hiperestimulante únicamente sobre la bioactividad FSH y (F) un plasma que muestra un efecto hiperestimulante únicamente sobre la bioactividad LH. **Diferencia significativa en porcentaje de bioactividad ($p < 0,05$). NS: no significativo.

El plasma de control usado como referencia representa el 100% de bioactividades LH y FSH. Seis conjuntos de plasmas se observaron. Tres conjuntos incluyeron plasmas que mostraban un efecto inhibitor sobre las bioactividades de eCG ($n=17$): 11 plasmas inhibieron hasta 10 veces las bioactividades tanto FSH como LH (Figura 2A), 2 plasmas inhibieron hasta 10 veces únicamente la bioactividad FSH (Figura 2B) y 4 plasmas inhibieron hasta 2 veces únicamente la bioactividad LH (Figura 2C). De forma sorprendente, otros tres conjuntos incluyeron plasmas que mostraban un efecto hiperestimulador sobre las bioactividades de eCG ($n=10$): 2 plasmas hiperestimularon hasta 1,5 veces las bioactividades tanto LH como FSH (Figura 2D), 4 plasmas hiperestimularon hasta 2 veces únicamente la bioactividad FSH (Figura 2E) y 4 plasmas hiperestimularon hasta 2 veces únicamente la bioactividad LH (Figura 2F). Estos resultados demuestran que los plasmas de las hembras tratadas con eCG que contienen anticuerpo anti-eCG pueden modular de forma diferente sólo una o ambas bioactividades de eCG.

EJEMPLO 2: LAS INMUNOGLOBULINAS G SON RESPONSABLES DE LA MODULACIÓN DE BIOACTIVIDADES LH Y FSH DE eCG.

Para asegurar que los efectos se debieron a anticuerpos anti-eCG y no a los contaminantes en plasma, los efectos de diferentes plasmas sobre las bioactividades se compararon con aquellos mostrados por su fracción de IgG purificada respectiva. Un plasma hiperestimulador y un plasma inhibitor de ambas bioactividades de eCG se analizaron, así como un plasma de control recogido de una hembra no tratada. Las fracciones de IgG se obtuvieron mediante cromatografía de afinidad en Proteína G como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los plasmas y sus correspondientes fracciones de IgG se ensayaron a las mismas concentraciones de anticuerpo anti-eCG. Se usaron fracciones de IgG control y ensayadas a concentración similar de IgG total. Los plasmas y las fracciones de IgG se preincubaron durante una noche con medio de cultivo en solitario o con 100 ng/ml de eCG añadidos. Las secreciones de testosterona y progesterona se midieron mediante RIA.

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Leyenda de la Figura 3: A y B: Testosterona; C y D: progesterona; Plasmas y fracciones de IgG, preincubadas con medio de cultivo en solitario ($\square$) o preincubados con medio de cultivo con 100 ng/ml de eCG añadidos ($\blacksquare$);** Diferencia significativa en secreción de testosterona o progesterona ($p < 0,05$) o * ($p < 0,1$). NS: no significativo.

Cuando el plasma inhibitor o su fracción de IgG purificada se preincubaron con 100 ng/ml de eCG, la secreción de testosterona disminuyó hasta el 28% (Figura 3A) y el 46% (Figura 3B) del nivel de control respectivamente y la secreción de progesterona hasta el 20% (Figura 3C) y el 53% (Figura 3D) del nivel de control respectivamente. Cuando

el plasma hiperestimulador o su fracción de IgG purificada se preincubaron con 100 ng/ml de eCG, la secreción de testosterona aumentó hasta el 145% y el 242% (Figura 3A, B) del nivel de control respectivamente y la secreción de progesterona hasta el 144% (Figura 3C) y el 171% (Figura 3D) del nivel de control respectivamente. El equivalente no-IgG de los plasmas no modificó las bioactividades LH y FSH (datos no mostrados).

En conclusión, las IgG preincubadas con eCG provocaron los mismos efectos sobre las bioactividades LH y FSH que sus plasmas correspondientes. Estos resultados demuestran claramente que las IgG anti-eCG presentes en el plasma son responsables de la inhibición o hiperestimulación de bioactividades LH y FSH de eCG.

EJEMPLO 3: LA MODULACIÓN DE BIOACTIVIDAD LH O FSH DE eCG MEDIANTE ANTICUERPOS ANTI-eCG AFECTA DE FORMA DIFERENTE LA FERTILIDAD DE CABRAS TRATADAS

Para este estudio, se usaron muestras de plasma anti-eCG de 37 cabras tratadas previamente. Los plasmas se recogieron el día 0, inmediatamente antes de la inyección de eCG y mostraron una concentración de anticuerpo anti-eCG elevada. El objetivo era diferenciar qué efecto de los plasmas anti-eCG sobre las bioactividades LH y FSH tenía el impacto más importante sobre la fertilidad de cabras tratadas después de IA. Se comparó el efecto del plasma sobre 12,5 ng/ml de eCG, que apenas corresponde con la cantidad de eCG inyectado (50 µg) tomando en cuenta el volumen de sangre de una cabra (4 litros). El efecto de los plasmas anti-eCG de cabras tratadas sobre las bioactividades de eCG se analizó de acuerdo con sus resultados de fertilidad después de la IA: 11 cabras no quedaron preñadas y 26 quedaron preñadas y parieron. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Los efectos de anticuerpo anti-eCG sobre las bioactividades LH o FSH de eCG se simbolizan por (0) para sin efecto, (+) para efecto hiperestimulante y (-) para efecto inhibidor.

Tabla 1

Efectos de Anticuerpos anti-eCG sobre bioactividades de eCG	FSH (0)		FSH (+)		FSH (-)	
	Preñada	No preñada	Preñada	No preñada	Preñada	No preñada
Fertilidad de hembra						
Número de hembras (n=37)	16 (76,2%)	5 (23,8%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)
Número de hembras (n = 37)	11 (84,6%)	2 (15,4%)	10 (90,9%)	1 (9,1%)	5 (38,5%)	8 (61,5%)

El 100% de las cabras que tienen anticuerpo anti-eCG con efecto hiperestimulador sobre la bioactividad FSH estaban preñadas. Por el contrario, ninguna de las cabras que tenía anticuerpos anti-eCG inhibidores de la bioactividad FSH quedó preñada. Sin embargo, entre las hembras que tienen anticuerpos anti-eCG inhibidores de la bioactividad LH, únicamente el 38,5% quedaron preñadas. Este resultado contrasta con el 84,6% de las hembras preñadas cuando los anticuerpos anti-eCG no tenían efecto sobre la bioactividad LH. Se puede observar que estas variaciones son importantes en comparación con el índice de preñez normal cuando a las cabras se inyecta eCG por primera vez el cual es en promedio el 65%. Estos resultados demuestran que los plasmas que muestran un efecto hiperestimulador sobre ambas bioactividades únicamente proceden de cabras preñadas y los plasmas que muestran un efecto inhibidor sobre ambas actividades únicamente proceden de cabras no preñadas. Este estudio explica la carencia de preñez de hembras tratadas debido a una inhibición de las bioactividades de eCG mediante los anticuerpos anti-eCG, especialmente anticuerpos inhibidores de la bioactividad FSH. Estos resultados demuestran claramente que la bioactividad FSH de eCG es necesaria para inducir la ovulación en un momento preciso para obtener una fertilidad significativa de hembras tratadas.

EJEMPLO 4: EFECTOS DE LAS FRACCIONES DE IgG PURIFICADAS A PARTIR DE PLASMAS DE CARBAS TRATADAS CON eCG, SOBRE LA UNIÓN DE eCG A LOS RECEPTORES DE LH Y FSH.

Para determinar si la inhibición de las bioactividades LH y FSH se debió a la inhibición de la unión de hormona a sus receptores, se analizaron los efectos de dos fracciones de IgG inhibidoras de ambas bioactividades, sobre la unión de eCG a los receptores de FSH y LH de rata (Figura 4A, B). Las concentraciones crecientes de eCG, que variaban de 5 ng/ml a 10 µg/ml se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con o sin fracciones IgG de anti-eCG. Se ensayaron tres fracciones de IgG purificadas representativas que tenían diferentes efectos sobre ambas bioactividades de eCG: dos fracciones de IgG inhibidoras de ambas actividades y una fracción de IgG hiperestimuladora de ambas actividades. Después de 4 h de incubación, se midió la radiactividad unida al FSH-R o el LH-R.

Los resultados se representan en la Figura 4.

Leyenda de la Figura 4: Radiactividad unida al FSH-R (A) o el LH-R (B); eCG incubado sin fracciones anti-IgG de eCG (-♦-); eCG incubado con dos fracciones de IgG inhibitoras de ambas bioactividades (-▲-, -■-); eCG incubado con una fracción de IgG hiperestimuladora de ambas bioactividades (-○-).

La primera fracción de IgG inhibitora provocó el 48% y el 45% de inhibición de unión a los receptores de FSH y LH respectivamente. La segunda fracción de IgG inhibitora no alteró la unión de eCG a ambos receptores, ya que la curva de unión obtenida era similar con eCG preincubado con medio en solitario. De forma similar, los inventores investigaron el efecto de una fracción de IgG hiperestimuladora sobre ambas bioactividades de eCG, lo cual no alteró la unión de eCG a los receptores de FSH y LH.

EJEMPLO 5: AFINIDAD POR eCG DE LOS PLASMAS QUE CONTIENEN ANTICUERPOS ANTI-eCG O FRACCIONES DE IgG.

Para investigar si los efectos del anticuerpo anti-eCG sobre las bioactividades de eCG estaban correlacionadas con su afinidad por eCG, se determinó la afinidad por eCG de plasmas de hembras tratadas con eCG o de su equivalente de IgG purificado, mediante resonancia de plasmón superficial (RPS). Los análisis cinéticos se condujeron en curvas de unión corregidas para señal inespecífica restando la curva de referencia obtenida con un plasma de control o su fracción de IgG purificada correspondiente sobre eCG inmovilizado. La afinidad se midió con fracciones de IgG purificadas o con plasmas diluidos cuando los volúmenes de muestra eran limitantes. En primer lugar, se verificó que los plasmas y sus fracciones de IgG purificadas correspondientes produjeran constantes cinéticas similares (datos no mostrados). Las curvas de unión de los plasmas que contienen anticuerpos anti-eCG o fracciones de IgG se compararon. Los resultados obtenidos muestran cinética de interacción sorprendentemente diferente, independientemente del efecto sobre las bioactividades de eCG.

La Figura 5 muestra la interacción de un plasma que contiene anticuerpos anti-eCG sin efecto sobre las bioactividades de eCG (A) y un plasma que contiene anticuerpos anti-eCG hiperestimuladores de bioactividad FSH (B). Cada plasma se inyectó a 5,5 nM (a) y 2,7 nM (b) de anticuerpo anti-eCG. Ambos plasmas interaccionaron de forma marcada, con un nivel máximo de 688 y 490 UR respectivamente y ambos mostraron un índice de disociación lento (21% después de 6 mn) sugiriendo que los anticuerpos anti-eCG formaban un complejo de forma estable con eCG recubierto.

Leyenda de la Figura 5: Los sensogramas (A) muestran el reconocimiento de eCG mediante anticuerpos anti-eCG policlonales de cabra, sin efecto sobre las bioactividades de eCG e inyectados a 5,5 nM (a) y 2,7 nM (b) respectivamente. Los sensogramas (B) muestran el reconocimiento de eCG mediante anticuerpo anti-eCG policlonal de cabra, hiperestimulando únicamente la bioactividad FSH e inyectados a 5,5 nM (a) y 2,7 nM (b) respectivamente.

Las mediciones de afinidad de 4 grupos de anticuerpos anti-eCG se resumen en la Tabla 2.

Las constantes de afinidad (K_A) y de disociación (K_D) se calcularon a partir de los índices de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) que se analizaron usando software BIA evaluation. Los efectos de los anticuerpos anti-eCG sobre las bioactividades de eCG se simbolizan mediante (0) para sin efecto, (+) para efecto hiperestimulante y (-) para efecto inhibitor.

TABLA 2

Efectos de anticuerpos anti-eCG sobre bioactividades de eCG				k_{on} (M^{-1}, s^{-1})	k_{off} s^{-1}	K_A M^{-1}	K_D nM
FSH n = 3	(0)	LH	(0)	$1,66 \cdot 10^7$	$1,13 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{10}$	0,068
				$1,33 \cdot 10^6$	$1,41 \cdot 10^{-3}$	$9,4 \cdot 10^8$	1,06
				$2,25 \cdot 10^5$	$1,63 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \cdot 10^8$	7,24
FSH n = 4	(-)	LH	(-)	$1,65 \cdot 10^6$	$9,16 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{10}$	0,05
				$1,89 \cdot 10^5$	$1,54 \cdot 10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^9$	0,61
				$8,67 \cdot 10^5$	$1,74 \cdot 10^{-3}$	$4,98 \cdot 10^8$	2
				$2,32 \cdot 10^5$	$7,31 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \cdot 10^8$	3,15
FSH n = 2	(0)	LH	(0)	$4,87 \cdot 10^5$	$3,37 \cdot 10^{-4}$	$1,44 \cdot 10^9$	0,69
				$2,01 \cdot 10^5$	$9,96 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^8$	4,95
FSH n = 5	(0)	LH	(0)	$1,43 \cdot 10^6$	$3,48 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^9$	0,24
				$1,12 \cdot 10^6$	$1,36 \cdot 10^{-3}$	$8,23 \cdot 10^8$	1,21
				$8,99 \cdot 10^5$	$3,73 \cdot 10^{-3}$	$2,41 \cdot 10^8$	4,14

Efectos de anticuerpos anti-eCG sobre bioactividades de eCG	k_{on} (M^{-1}, s^{-1})	k_{off} s^{-1}	K_A M^{-1}	K_d nM
	$6,11 \cdot 10^5$	$3,29 \cdot 10^{-4}$	$1,85 \cdot 10^9$	5,38
	$9,67 \cdot 10^4$	$1,29 \cdot 10^{-3}$	$7,49 \cdot 10^7$	13,3

Los resultados obtenidos muestran claramente una variabilidad elevada en los valores de las constantes de afinidad (K_A) y de disociación (K_D), independientemente de los efectos de los anticuerpos anti-eCG sobre las bioactividades de eCG. Las constantes de disociación variaron de 0,068 nM a 13,3 nM. Se ha de observar que la mayoría de los plasmas o IgG ensayados presentaron una afinidad elevada por eCG, con un valor de K_A que variaba de 10^{10} a $10^8 M^{-1}$. De forma importante, estos resultados demuestran claramente que la carencia del efecto sobre las bioactividades de eCG no se debió a una afinidad baja de anticuerpos anti-eCG, sino más bien se produjo como resultado de la localización de los epítopos que reconocen sobre la superficie de la hormona. Análogamente, los anticuerpos anti-eCG que mostraban un efecto marcado sobre las bioactividades de eCG no mostraron la constante de afinidad más elevada.

EJEMPLO 6: ESPECIFICIDAD DE PLASMAS DE CABRAS TRATADAS CON eCG

Para determinar que parte de eCG se reconoce por cada grupo de efecto de anticuerpos anti-eCG, se analizaron 21 plasmas de hembras tratadas con eCG que mostraban un efecto claro sobre las bioactividades de eCG. Cada plasma se preincubó con eCG nativo, con subunidad α -eCG, con subunidad β -eCG, con eCG desglicosilada químicamente (dg eCG) o con eLH. La reacción cruzada se calculó al 50 % del desplazamiento obtenido con eCG nativo purificado como competidor, mediante ELISA competitivo.

La tabla 3 resume la especificidad de los plasmas en relación con sus efectos sobre las bioactividades de eCG. Los efectos de los anticuerpos anti-eCG se simbolizan mediante (0) para sin efecto, (+) para efecto hiperestimulante, y (-) para efecto inhibidor.

TABLA 3

Tamaño de plasma	Efectos de plasma sobre las bioactividades de eCG	Porcentaje de reacción cruzada con los competidores			
		eCG dg	α eCG	β eCG	eLH
n=1	LH (+) FSH (+)	0 %	4 %	44,7 %	0 %
n=1	LH (0) FSH (+)	0 %	4 %	20 %	0 %
n=5	LH (-) FSH (0)	<1 %	<1	<1 %	0 %
n=2	LH (0) FSH (0)	<1 %	<3%	0 %	0 %
n=1	LH (+) FSH (0)	20 %	0 %	0 %	0 %
n=2	LH (-) FSH (-)	<20 %	<9 %	<1,5 %	0 %
n=8	LH (-) FSH (-)	<5 %	<5 %	<1,5 %	0 %
n=1	LH (-) FSH (-)	0 %	1 %	20 %	0 %

La mayoría de los plasmas reconocieron débilmente las subunidades α y β de eCG aisladas y dg eCG. Diecinueve plasmas de 21 reaccionaron de manera cruzada con eCG- α por debajo del 5 % y los otros 2 por debajo del 9 %. Dieciocho plasmas de 21 reaccionaron de forma cruzada con eCG- β por debajo del 1,5 % y los otros 3 entre el 20 % y el 44,7 %. Dieciocho plasmas de 21 no reconocieron dg eCG o lo hicieron muy débilmente, con una reacción cruzada < 5 % y los 3 otros con una reacción cruzada < 20 %. Por lo tanto, los plasmas que contienen anticuerpos anti-eCG preferentemente reconocieron el dímero eCG $\alpha\beta$ y parecen estar influenciados por las cadenas glicánicas de la hormona dimérica.

Los inventores observaron que ningún plasma que tuviera un efecto hiperestimulador sobre la bioactividad FSH de eCG reconocía dg eCG pero los mismos reconocían débilmente (4 %) eCG- α y reaccionaban de forma cruzada claramente con la subunidad eCG- β (entre el 44,7 % y el 20 %). Los plasmas que tienen un efecto inhibidor sobre ambas bioactividades de eCG reconocieron débilmente dg eCG y la subunidad eCG- α . Ninguno de los plasmas que no mostraban efecto sobre ambas bioactividades de eCG reconoció eCG- β . Para otros conjuntos de plasmas, los inventores no observaron una correlación entre la especificidad de la modulación de bioactividades de eCG mediante los anticuerpos anti-eCG.

Para confirmar estas observaciones, se analizó la reacción cruzada con eLH que tiene la misma estructura peptídica que eCG, pero difiere en su composición glicánica. Se observó que los anticuerpos anti-eCG no reconocieron eLH. Estos resultados confirman que diversos anticuerpos anti-eCG reconocieron principalmente el resto glicánico de eCG.

La parte glicánica de eCG está compuesta principalmente de glicanos bi-antena que terminan en ácidos siálicos, al contrario de eLH que termina principalmente en sulfatos. Por lo tanto, la especificidad de plasma hacia eCG completamente desglicosilada y diferentes isoformas desialiladas de eCG se ensayó a continuación.

Para cada plasma, se midió el porcentaje de reactividad cruzada hacia eCG convencional, eCG SA1 (isoforma de eCG con el 17 % de ácidos siálicos), eCG SA2 (isoforma de eCG con el 9,5 % de ácidos siálicos), eCG SA3 (isoforma de eCG con el 4,7 % de ácidos siálicos), eCG tratado con neuraminidasa (eCG SA4 con el 1 % de ácidos siálicos) y eCG desglicosilada (dg de eCG). El 100 % de la reacción cruzada se obtuvo con el eCG convencional. La inhibición de unión del anticuerpo anti-eCG a eCG recubiertos se midió mediante ELISA competitivo, después de la incubación de los plasmas con concentraciones crecientes de cada competidor, que variaban desde 50 ng/ml a 10 µg/ml.

Los resultados se muestran en la Tabla 4: la abreviatura "SA" se empleó para los ácidos siálicos y "ND" para no determinadas.

Estos resultados muestran que la composición de ácido siálico de eCG modula la especificidad de plasma para eCG (tabla 4), que disminuye paralelamente con el contenido de ácido siálico. Adicionalmente, ninguna de las cinco muestras de plasma que se ensayaron reconoce eCG desialilado (1 % de ácidos siálicos).

Los datos demuestran el papel importante de los ácidos siálicos en la inmunogenicidad de eCG. Los mismos refuerzan la importancia de las secuencias glicánicas específicas de eCG y especialmente los ácidos siálicos, en la respuesta inmune humoral inducida por el tratamiento con eCG.

TABLA 4

Número de plasma	Efecto sobre las bioactividades de eCG	Porcentaje de reacción cruzada con los competidores							
		α eCG	β eCG	Dg eCG	eCG SA1	eCG SA2	eCG SA3	eCG SA4	eLH
94019	LH(+) FSH (+)	4 %	44,7 %	0 %	32 %	9 %	0 %	ND	0 %
94062	LH(0) FSH (+)	3 %	20 %	0 %	0,7 %	0 %	0 %	0 %	0 %
93080	LH(-) FSH (+)	0,6 %	0,3 %	0,5 %	100 %	83 %	48 %	ND	0 %
92078	LH(-) FSH (+)	5 %	1,5 %	1,5 %	74 %	65 %	9 %	0 %	0 %
93027	LH(0) FSH (+)	4 %	20 %	0 %	ND	ND	ND	ND	0 %
93019	LH(0) FSH (0)	2,3 %	0 %	0 %	74 %	19 %	7 %	ND	0 %
93059	LH(-) FSH (0)	0 %	0 %	0 %	49 %	29 %	23 %	ND	0 %
92004	LH(+) FSH (0)	0 %	0 %	20 %	87 %	87 %	31 %	ND	0 %
91027	LH(-) FSH (-)	3 %	1 %	1,6 %	56 %	43 %	32 %	0 %	0 %
601	LH(-) FSH (-)	4,5 %	1 %	2 %	52 %	40 %	7 %	0 %	0 %
638	LH(-) FSH (-)	4 %	1 %	3 %	83 %	72 %	60 %	0 %	0 %
93028	LH(-) FSH (-)	0 %	1,3 %	17 %	80 %	61 %	10 %	ND	0 %
92012	LH(-) FSH (-)	1 %	20 %	0 %	80 %	35 %	14 %	ND	0 %

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo policlonal anti-gonadotropina coriónica equina (anti-eCG) capaz de mejorar la bioactividad FSH de gonadotropina coriónica (eCG), en el que dicho anticuerpo policlonal tiene las siguientes características:
 - reconoce eCG glicosilada nativa y no reconoce eCG desglicosilada;
 - no reconoce LH equina;
 - reacciona de forma cruzada moderadamente o marcadamente con la subunidad β de eCG;
 - reacciona de forma cruzada débilmente con la subunidad α de eCG.
2. Un anticuerpo policlonal anti-eCG de la reivindicación 1, **caracterizado por que** el mismo además es capaz de mejorar la bioactividad LH de gonadotropina coriónica y reacciona de forma cruzada marcadamente con la subunidad β de eCG.
3. Un anticuerpo policlonal anti-eCG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para aumentar la eficiencia de eCG para la inducción y sincronización del estro y la ovulación.
4. Una composición farmacéutica para su uso en la inducción y sincronización de estro y ovulación en un mamífero, **caracterizada por que** la misma comprende un anticuerpo policlonal anti-eCG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por que** la misma comprende adicionalmente eCG.

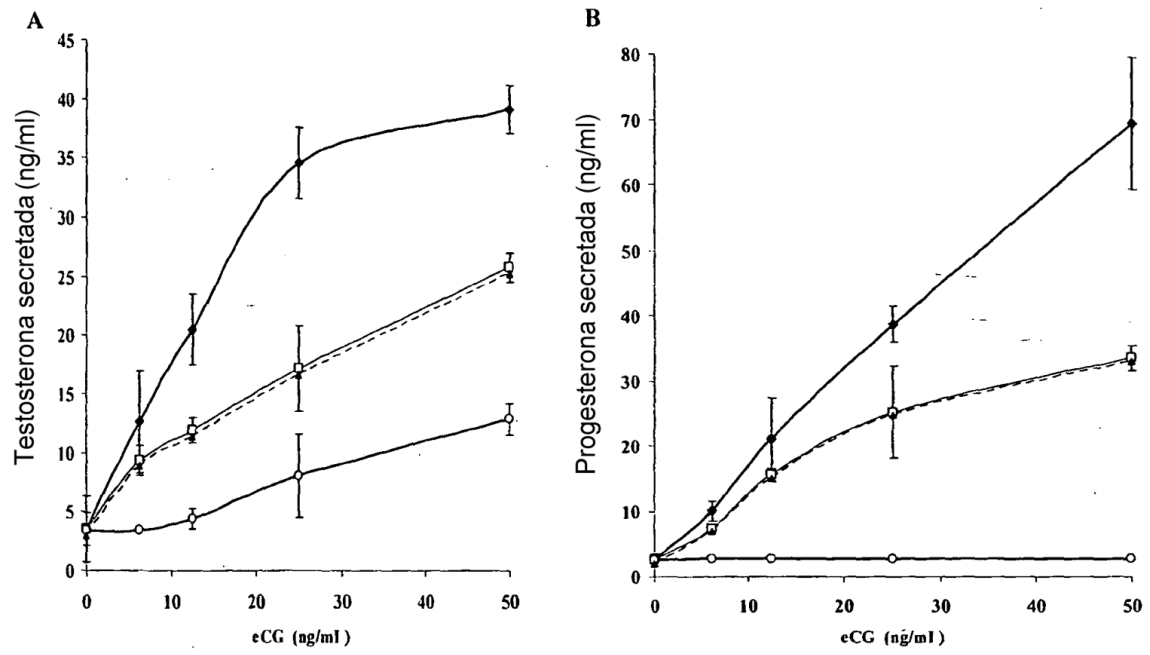


FIG. 1

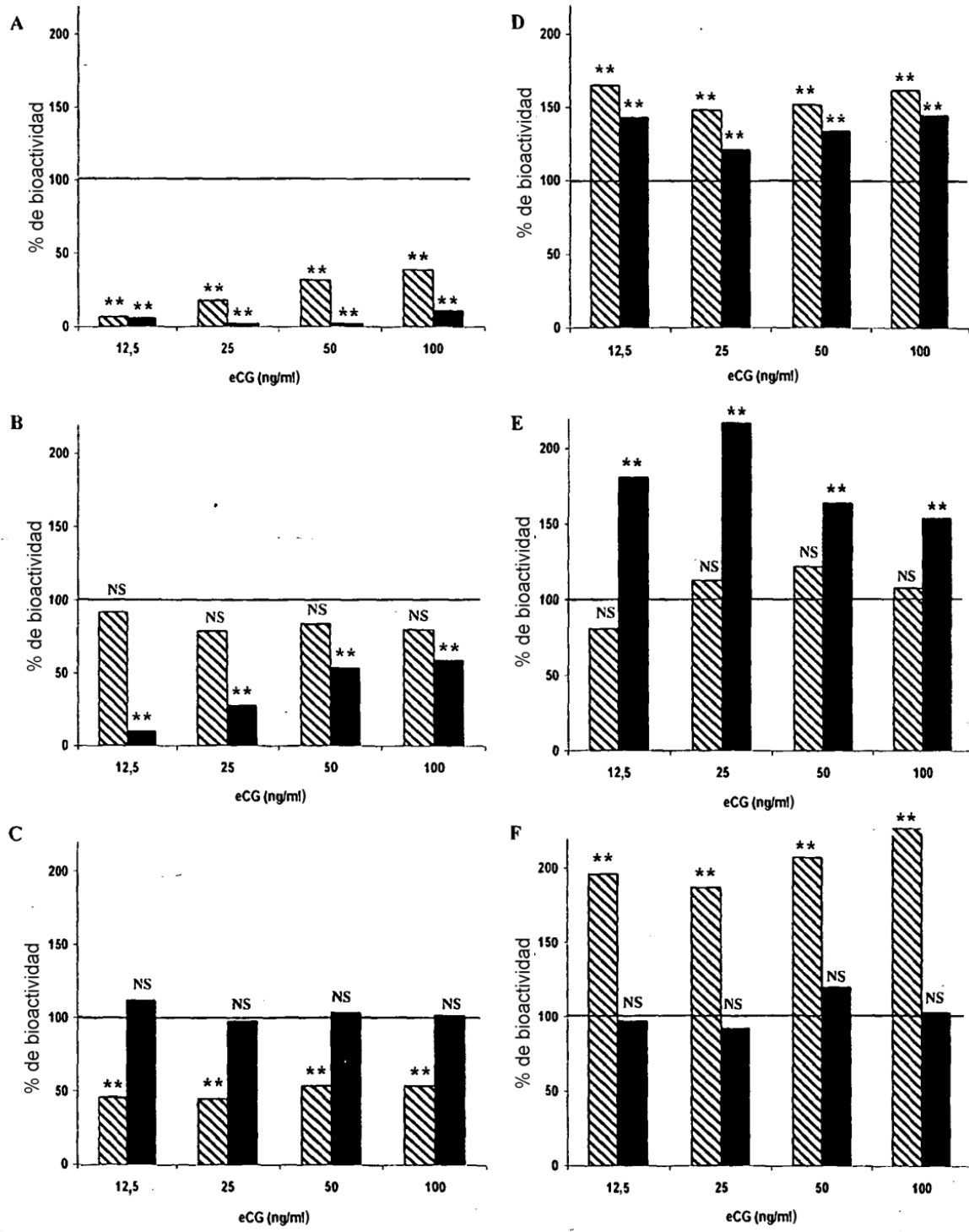
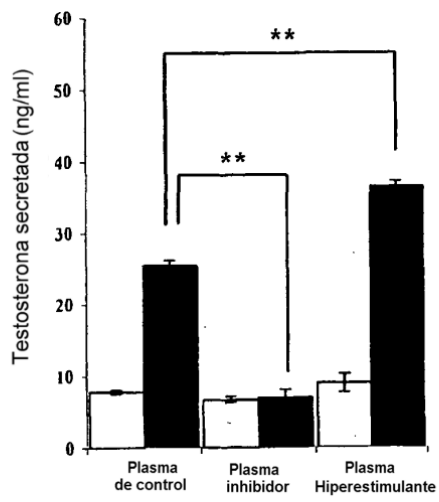
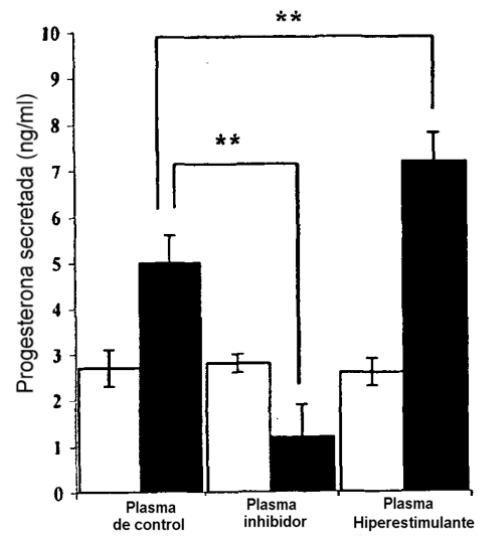


FIG. 2

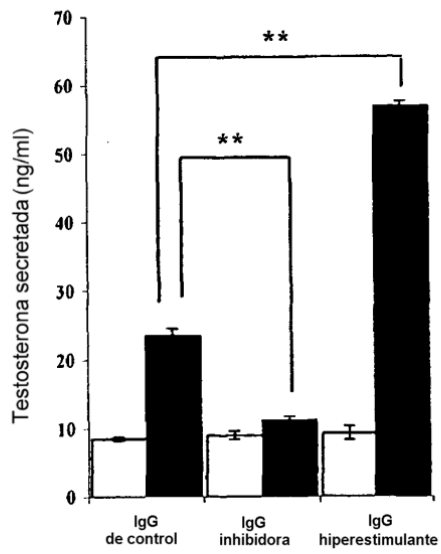
A



C



B



D

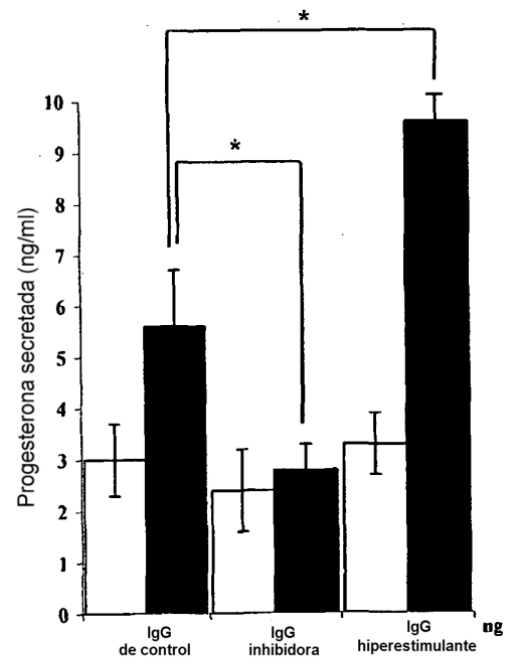


FIG. 3

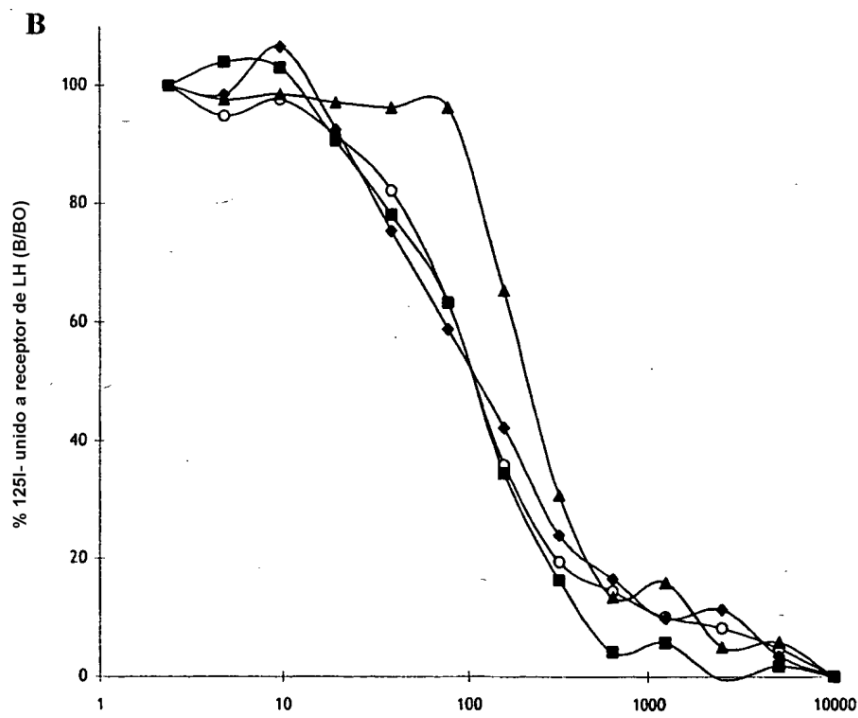
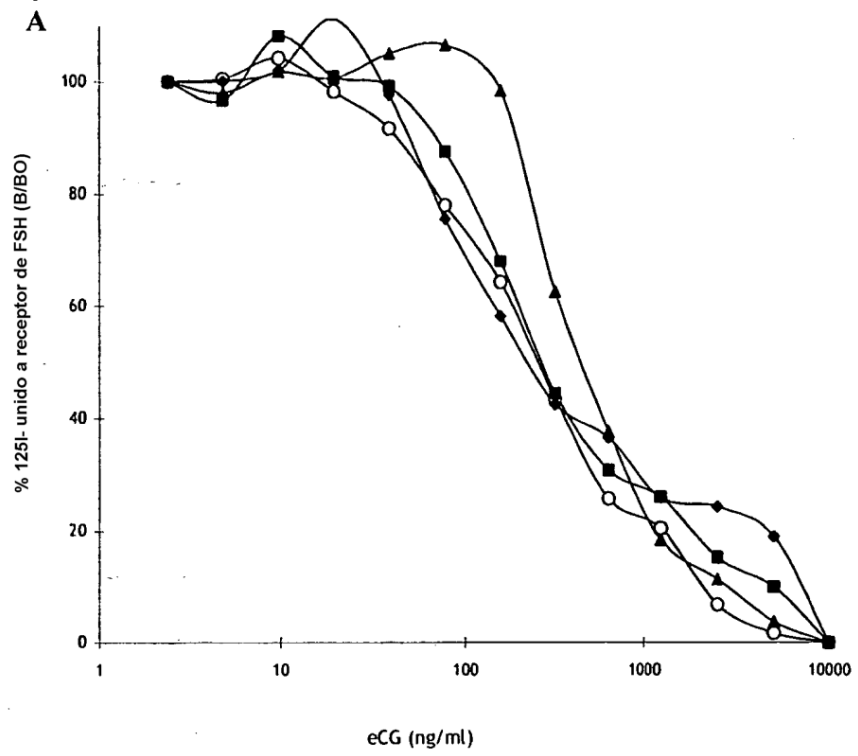


FIG. 4

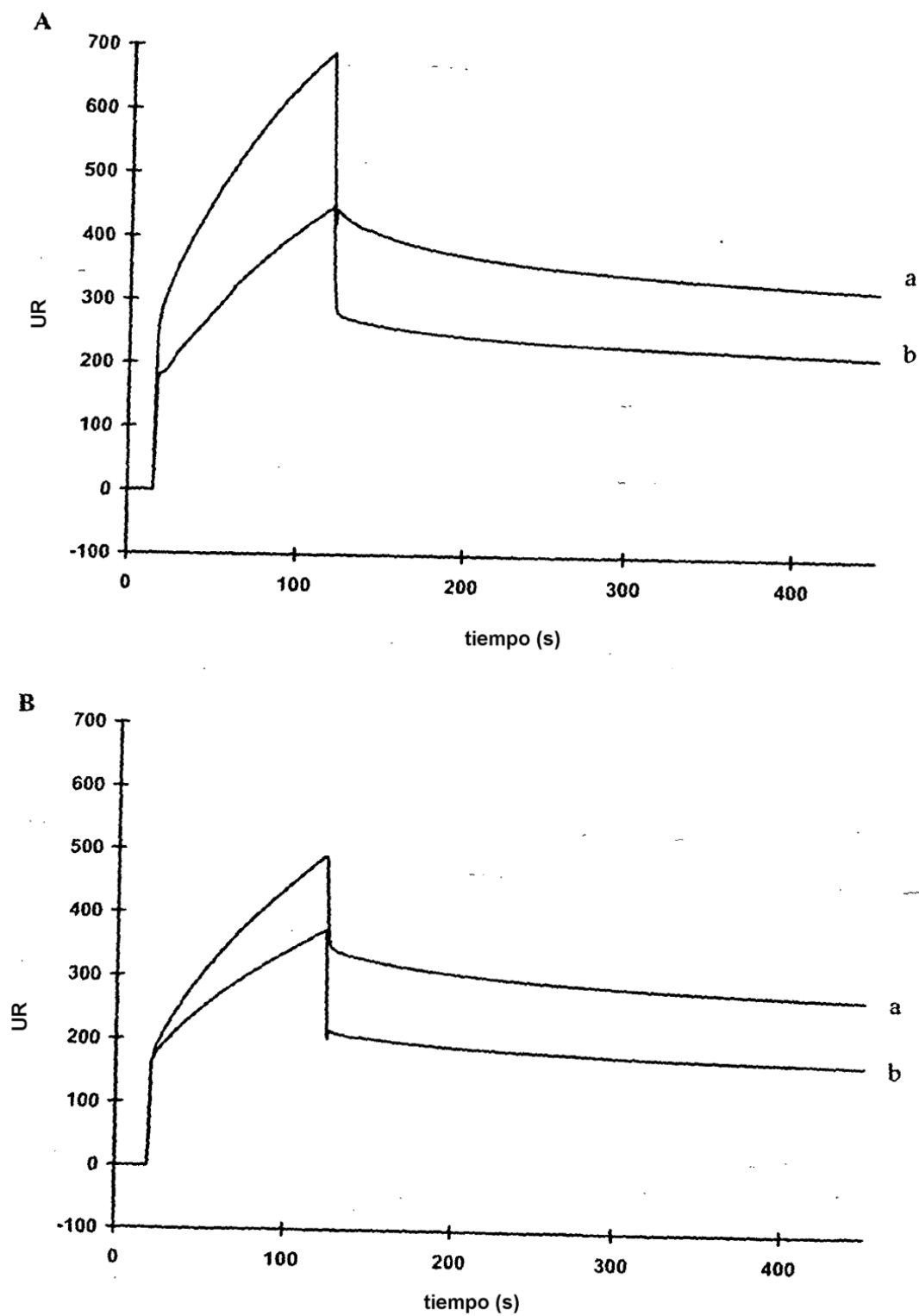


FIG. 5