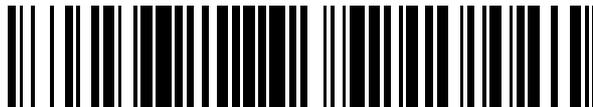


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 783**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05856658 .9**
96 Fecha de presentación: **27.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1756584**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Fracción PGA-55-60 enriquecida y procedimientos para la detección precoz de preñez en animales ungulados**

30 Prioridad:
29.04.2004 US 566282 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

73 Titular/es:
**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MISSOURI 63167, US**

72 Inventor/es:
**MATHIALAGAN, NAGAPPAN;
MCGRATH, MICHAEL y
SCHENKEL, ROBERT**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 2 390 783 T3

DESCRIPCIÓN

Fracción PGA-55-60 enriquecida y procedimientos para la detección precoz de preñez en animales ungulados.

Antecedentes de la invención

I. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la medicina veterinaria, biología reproductora y diagnósticos. Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos mejorados para una detección precisa de la gestación en ungulados (animales con pezuña), incluidos rumiantes como bovinos (p. ej., ganado bovino para leche y para carne) y ovinos. La presente invención también se refiere a anticuerpos, incluidos anticuerpos policlonales que se han generado usando la fracción de proteína enriquecida PAG-55 como inmunógeno.

II. Descripción de la técnica relacionada

15 El diagnóstico de preñez es un componente importante en la gestión buena de la reproducción, en particular en la industria láctea (Oltenu et al., 1990), en la que una proporción elevada de inseminaciones artificiales fallan (Streenan y Diskin, 1986). Durante tiempo se ha estado buscando una prueba de preñez fiable aunque simple para rumiantes, como ganado bovino. Se dispone de varios procedimientos, incluido un ensayo de progesterona en leche (Oltenu et al., 1990; Markusfeld et al., 1990), análisis de sulfato de estrona (Holdsworth et al., 1982; Warnick et al., 1995), palpación rectal (Hatzidakis et al., 1993), ecografía (Beal et al., 1992; Cameron y Malm, 1993), y análisis de sangre para detectar antígenos específicos de preñez. De estos, el ensayo de progesterona en leche es el más rentable para el productor (Oltenu et al., 1990; Markusfeld et al., 1990). El siguiente es la palpación rectal, realizado a los 50 días de la inseminación (Oltenu et al., 1990).

20 Aunque los procedimientos anteriores para el diagnóstico de preñez son potencialmente útiles, todos ellos han fallado en las expectativas en términos de su uso práctico en la granja. Por ejemplo, las determinaciones de la progesterona en leche o suero alrededor del día 18-22 da resultados inaceptablemente altos de falsos positivos (Oltenu et al., 1990; Markusfeld et al., 1990). La presencia de sulfato de estrona en orina o suero proporciona otra prueba, pero solo es útil tras el día 100 cuando las concentraciones aumentan (Holdsworth et al., 1982; Warnick et al., 1995).

30 El descubrimiento de la proteína B específica de preñez (Butler et al., 1982) ha proporcionado un nuevo enfoque al diagnóstico de preñez, ya que podría detectarse en la sangre de vacas preñadas a la cuarta semana de preñez (Sasser et al., 1986; Humblot et al., 1988). Otros dos grupos han desarrollado inmunoensayos que se pueden basar en un antígeno idéntico o inmunológicamente similar (Zoli et al., 1992a; Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994). En un caso, el antígeno (Mr ~67 kDa) se denominó glicoproteína asociada con la preñez bovina (boPAG; ahora boPAG-1) (Zoli et al., 1991, 1992a, 1992b); en el segundo, se diseñó como proteína 60 sérica de la gestación (PSP60) (Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994). El término PAG se refiere, en general, a glicoproteínas asociadas con la gestación o a antígenos asociados a la preñez. Para una revisión reciente de los procedimientos y una caracterización de los miembros actuales de las boPAG, véase Green et al., Theriogenology 63:1481-1503 (2005), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 El inmunoensayo para PSP-B/boPAG1/PSP60 tiene varias ventajas. En primer lugar, puede detectar una preñez relativamente pronto. En segundo lugar, la interpretación de los ensayos no requiere el conocimiento de la fecha exacta del servicio, ya que las moléculas de boPAG-1 inmunorreactivas siempre están presentes en el suero materno de vacas gestantes el día 28, y las concentraciones aumentan a medida que progresa la preñez (Sasser et al., 1986; Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994).

45 No obstante, este procedimiento tiene dos desventajas principales. En primer lugar, el diagnóstico positivo en la cuarta semana de preñez sigue siendo algo incierto porque las concentraciones del antígeno en sangre son bajas y algo variables. En segundo lugar, las concentraciones de boPAG1 se elevan considerablemente a término (Sasser et al., 1986; Zoli et al., 1992a; Mialon et al., 1993) y, debido a la larga semivida en circulación de la molécula (Kiracofe et al., 1993), el antígeno sigue pudiéndose detectar 80-100 días después del parto (Zoli et al., 1992a; Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994; Kiracofe et al., 1993), lo que compromete el diagnóstico de preñez en vacas criadas en el período posparto temprano. Por tanto, la prueba se puede llevar a cabo en vacas de leche el día 30 tras la inseminación artificial (IA) únicamente si la IA se ha realizado a los 80 o más días del parto.

50 Existe una necesidad general de procedimientos fáciles, económicos, sensibles, no invasivos y precisos, y pruebas para detectar los analitos de la preñez en muestras de sangre entera, especialmente los que no requieren ningún equipamiento o sustancias químicas especiales. Estos procedimientos serían particularmente útiles en el escenarios de campo o rurales en los que el equipamiento, de laboratorio, los productos químicos y almacenamiento refrigerado no están disponibles.

55 Específicamente, existe la necesidad en la técnica de una prueba de preñez que se lleve a cabo de un modo fiable y pronto durante la preñez, que podría proporcionar una indicación definitiva en cuanto a si se requiere volver a criar o

5 sacrificar. En general, la IA (inseminación artificial) tiene éxito menos del 50 % de las veces en ganado vacuno y el productor debe depender de las señales abiertas de comportamiento de retorno al estro (que pasan fácilmente inadvertidas) o retrasar la recría hasta que se confirme el fallo de preñez mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente. Dichos retrasos son extremadamente costosos y constituyen una pérdida económica importante para la industria.

Específicamente, en la técnica existe la necesidad de generar una prueba de preñez precisa para ungulados que use sangre entera, que se puede extraer fácilmente del animal. Ser capaz de usar una muestra de sangre entera sin un equipo o tratamiento químico especial facilitaría una detección fiable y precoz de la gestación y permitiría adoptar medidas eficientes cuando se requiere recría o retirada.

10 Las pruebas de preñez por inmunodetección rutinarias implican la detección de un analito en suero sanguíneo. Los procedimientos anteriores para usar suero de sangre entera para este tipo de pruebas implican componentes físicos o matrices adicionales, tales como filtros, fibras de vidrio, agentes absorbentes, papel, vellón, celulosa, lana, fibras de asbestos o una o múltiples etapas de centrifugación necesarias o requieren la adición de agentes químicos, tales como anticuerpos anti-glóbulos rojos, polilisina o lectinas.

15 La sangre entera se obtiene fácilmente de mamíferos, incluidos animales de granja; no obstante, la separación de los constituyentes que interfiere, como los glóbulos rojos, del suero deseado puede suponer un problema en el campo, incluido en las granjas. Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento fácil que no requiera filtros, matrices o etapas de centrifugación adicionales y que permita el uso de sangre entera coagulada para detectar cualquier analito deseado del preñez en suero usando diversas pruebas adecuadas, tales como inmunodetección.

20 En consecuencia, existe la necesidad de una prueba de preñez factible, económica, sensible, no invasiva y precisa para ganado vacuno y otros ruminantes, que tenga niveles bajos de falsos positivos y siga siendo lo bastante sensible para detectar la preñez (o más propiamente dicho la ausencia de la misma) lo bastante pronto como para que el mayoral de rebaño identifique las vacas no gestantes ("abiertas") para recría.

Sumario de la invención

25 La invención proporciona procedimientos para la detección de preñez en un bovino, que comprende medir el nivel de una glicoproteína asociada con la preñez (PAG) en una muestra obtenida de dicho bovino, en los que dicho nivel de PAG comprende PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG, que están presentes en una fracción de proteína ácida derivable de tejido de placenta desde el día 55 al día 60 de dicho bovino, en los que una elevación en dicho nivel de PAG indica que dicho bovino está preñado. Este procedimiento puede comprender además medir el nivel de progesterona en la muestra y en el que niveles elevados de progesterona indican además que dicho animal está preñado. La muestra puede proceder de cualquier material biológico adecuado, incluidos saliva, suero, plasma, sangre, leche u orina. En ciertas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre entera de un ungulado. En ciertas realizaciones de la invención, la muestra se puede obtener del animal cualquier día de la gestación, incluyendo desde aproximadamente el día 15 hasta el día 30 tras la inseminación, incluidos aproximadamente los días 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o posteriores de gestación.

35 En realizaciones adicionales de la invención, el procedimiento puede comprender además: (i) permitir que la sangre entera coagule en presencia de un activador de la coagulación; (ii) dejar que el suero salga de la sangre entera coagulada sin centrifugación; (iii) colocar el suero extruido en comunicación líquida con medios de detección que comprenden un reactante que es indicativo de preñez; y (iv) determinar si al menos un antígeno de la fracción proteica PAG-55 deseado está presente leyendo los medios de detección. Este procedimiento puede incluir usar activadores de la coagulación que se seleccionan del grupo que consiste en trombina, fosfolípidos, caolín, sílice micronizada y calcio.

40 En una realización concreta de la invención, las proteínas PAG-55 que se analizan están presentes en la sangre materna desde aproximadamente el día 15 hasta el final de la gestación.

45 La fracción proteica PAG-55 comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG.

La medición de la presente invención puede comprender la detección inmunológica, incluyendo la detección de los niveles de la fracción proteica PAG.55 con antisuero policlonal, anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos policlonales (fragmentos Fab). En otra realización de la invención, la detección inmunológica comprende detectar la fracción proteica PAG.55 con una preparación de anticuerpo monoclonal.

50 La detección inmunológica de la presente invención se puede llevar a cabo usando cualquier técnica, incluyendo ELISA, RIA, tecnología de flujo lateral (tal como tiras de ensayo o tiras de inmersión) y transferencia de tipo Western. El ELISA puede comprender un ELISA sándwich que comprende formar un inmunocomplejo entre la fracción proteica PAG-55 y una primera preparación de anticuerpo fijada a un sustrato y unir al inmunocomplejo una segunda preparación de anticuerpo marcada con una enzima. En ciertas realizaciones, la enzima es fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano o acetilcolinesterasa.

En ciertas realizaciones de la invención, un nivel elevado de la fracción proteica PAG-55 superior a un punto de corte seleccionado o basal indica o confirma que un animal está preñado. El valor de corte se selecciona de modo que proporcione un número mínimo de resultados falsos positivos y/o de falsos negativos al tiempo que simultáneamente proporcione la detección precoz de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, el nivel de la fracción proteica PAG-55 seleccionado para determinar que un animal está preñado es cualquier nivel detectable superior a aproximadamente 0,0 ng/ml de suero. En general, los niveles basales de la fracción proteica PAG-55 varían de aproximadamente 0,01 ng/ml a aproximadamente 2 ng/ml. Por tanto, en una realización de la presente invención el nivel de corte es aproximadamente 2 ng/ml, haciendo de los niveles elevados de PAG-55 cualquier nivel que sea superior a aproximadamente 2 ng/ml. En ciertas realizaciones, el nivel de la fracción proteica PAG-55 es de aproximadamente 1,0 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml de suero. En otras realizaciones de la invención, el nivel de la fracción proteica PAG-55 es de al menos aproximadamente 2,0 ng/ml a aproximadamente 3,0 ng/ml de suero.

En otra realización, medir los niveles de PAG-55 puede comprender, por ejemplo, la hibridación de ácido nucleico, incluida la transferencia Northern, y en la que la hibridación de ácido nucleico comprende amplificación. La amplificación puede comprender RT-PCR.

Ciertas realizaciones de la invención también incluyen medir el nivel de progesterona en la muestra y en el que niveles elevados de la fracción proteica de PAG-55 y progesterona indican además que dicho animal está preñado. Este procedimiento puede además comprender medir los niveles de progesterona mediante detección inmunológica. Estos procedimientos pueden incluir condiciones en las que la preparación de anticuerpo monoclonal comprende un primer anticuerpo monoclonal anti-PAG-55 y un segundo anticuerpo monoclonal anti-progesterona.

De un modo similar, estos procedimientos pueden incluir condiciones en las que el ELISA es un ELISA sándwich que comprende formar un inmunocomplejo entre la fracción proteica PAG-55 y proteínas de progesterona con una primera preparación de anticuerpo fijada a un sustrato y unir al inmunocomplejo una segunda preparación de anticuerpo marcada con una enzima. En ciertas realizaciones, la enzima es fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano o acetilcolinesterasa. En ciertas realizaciones de la invención, el nivel elevado de progesterona que se detecta es de al menos aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente de suero. En ciertos aspectos preferidos de esta realización, el nivel elevado de progesterona es de al menos aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente de suero.

En ciertas realizaciones de la invención, se medirá el nivel de la fracción proteica PAG-55 y progesterona y niveles elevados de la fracción proteica PAG-55 y de progesterona indican que el animal está preñado. En ciertas realizaciones de estos procedimientos, el nivel elevado de progesterona es superior a aproximadamente 2 ng/ml de suero. En otras realizaciones de la invención, el nivel elevado de progesterona es superior a aproximadamente 3 ng/ml de suero. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen medir los niveles de progesterona que comprende medir los niveles enzimáticos de la vía de la biosíntesis de la progesterona mediante hibridación de ácido nucleico, detección inmunológica o medición de la actividad enzimática.

En ciertas realizaciones de la invención se obtiene una muestra aproximadamente al día 20 a aproximadamente el día 30 tras la inseminación o cualquier día más adelante en la gestación, y los niveles elevados de la fracción proteica PAG-55 son los que son superiores a aproximadamente 0,0 ng/ml de suero e incluyen los superiores a aproximadamente 0,5 ng/ml de suero o superiores a aproximadamente 1 ng/ml de suero o superiores a aproximadamente 2 ng/ml de suero (en una realización determinada, los niveles de la fracción proteica PAG-55 varían de aproximadamente 0,5 ng/ml a 30 ng/ml de suero) y en los que los niveles elevados de progesterona incluyen aquellos de al menos aproximadamente 1 ng/ml de suero (preferentemente aquellos que al menos aproximadamente 2 ng/ml de suero, incluidos los niveles de aproximadamente 3 ng/ml o mayores de aproximadamente 3 ng/ml de suero) o niveles mayores. En un aspecto más concreto de esta realización, la muestra se obtiene entre aproximadamente el día 18 y aproximadamente el día 23 tras la inseminación. En un aspecto todavía más concreto de esta realización, la muestra se obtiene entre aproximadamente el día 18 y aproximadamente el día 20.

En ciertas realizaciones de la presente invención también se puede obtener una muestra control positivo de un animal preñado (como un bovino), como también se puede obtener una muestra control negativo de un animal no preñado (tal como un bovino). El procedimiento puede comprender además medir los niveles de la fracción proteica PAG-55 y progesterona de una segunda muestra del animal en un segundo punto de tiempo.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de tomar una decisión de cría para un bovino que se sospecha que está preñado, que comprende medir el nivel de una glicoproteína asociada con la preñez (PAG) en una muestra obtenida de dicho bovino que se sospecha que está preñado; en el que dicho nivel de PAG comprende PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG, que están presentes en una fracción de proteína ácida derivable de tejido de placenta desde el día 55 al día 60 de dicho bovino, en el que: (i) un nivel elevado de PAG indica que dicho bovino está preñado; o (ii) un nivel no elevado de PAG indica que dicho bovino no está preñado y deberá recibir terapia hormonal de seguimiento para recría.

Estos procedimientos pueden comprender además en la etapa (ii) inyectar al bovino la hormona liberadora de

gonadotropina (GnRH) y, aproximadamente siete días después, inyectar prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF), seguido de la re-inseminación. En ciertas realizaciones, estos procedimientos pueden comprender además en la etapa (iii) inyectar al bovino GnRH y, aproximadamente siete días después, inyectar al bovino PGF, seguido de la re-inseminación. En otras realizaciones, estos procedimientos pueden comprender además en la etapa (iv) inyectar al bovino PGF, seguido de la re-inseminación.

Otras realizaciones de la invención pueden incluir en las etapas (ii), (iii) o (iv), aproximadamente 48 horas después de la inyección de PGF y antes de la re-inseminación, administrar una segunda inyección de GnRH. Adicionalmente, el procedimiento puede comprender también, antes de la etapa (a), inseminar al animal bovino. Realizaciones adicionales de la invención incluyen procedimientos en los que dicha inyección de PGF se administra el día 20 tras la inseminación y en los que la re-inseminación se lleva a cabo el día 28 tras la inseminación. Opcionalmente, las realizaciones de la invención incluyen procedimientos en los que dicha inyección de PGF se administra el día 26 tras la inseminación y en los que la re-inseminación se lleva a cabo el día 28 tras la inseminación.

Varias realizaciones contemplan procedimientos para el diagnóstico de preñez en bovinos y procedimientos para tomar decisiones de cría en bovinos, que implican la detección de los niveles de la fracción proteica de PAG-55 en un muestra biológica por sí misma o en combinación con un segundo antígeno y el segundo antígeno puede ser progesterona o algún otro antígeno específico de la preñez.

Las realizaciones de la presente invención también incluyen una fracción proteica PAG-55 ácida purificada aislada desde aproximadamente el día 55 a aproximadamente el día 60 de la placenta bovina, que comprende PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG.

Las realizaciones de la presente invención también incluyen procedimientos de aislar la fracción proteica PAG-55 ácida que comprende PAG-4; PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19, y Mon-PAG de un animal bovino, que comprende a) obtener y homogeneizar tejido de aproximadamente el día 50 a aproximadamente el día 60 de placentas de un animal bovino; b) aislar una fracción proteica de PAG-55 ácida de dicho tejido realizando cromatografía de afinidad a un pH ácido con dicho homogeneizado y recoger los eluatos ácidos de los mismos; v) purificar la fracción proteica PAG-55 en los eluatos ácidos mediante cromatografía de filtración en gel y recolectar los filtrados; y d) identificar la fracción proteica PAG-55 obtenida en la etapa c) mediante inmunodetección.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y están incluidas para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Las Figuras 1A y 1B muestran SDS-PAGE y una transferencia Western de la fracción proteica PAG 55.

Las Figuras 2A y 2B muestran la precisión de las pruebas de preñez usando la presente invención en comparación con los resultados de la palpación el día 45.

La Figura 3B muestra el retorno rápido de la fracción proteica PAG55 a los niveles de fondo en muestras de suero posparto en comparación con los niveles de PAG posparto detectados mediante el anticuerpo UMC-M4 en la Fig. 3A.

La Figura 4 muestra el fraccionamiento de la fracción proteica PAG55 con cromatografía de filtración en gel Sephacryl.

Las Figuras 5A y 5B muestran un gel de poliacrilamida de la fracción proteica PAG55, en las que la Fig. 5A muestra el gel teñido con plata y la Fig. 5B muestra la transferencia de tipo western usando anticuerpos anti-PAG.

La Figura 6 muestra un análisis en gel de poliacrilamida bidimensional de los antígenos de la fracción proteica PAG del día 55.

La Figura 7 muestra la secuencia nucleotídica parcial y las secuencias de aminoácidos predichas de pMONPAG.

Las Figuras 8A y B describen el contenido peptídico de las manchas del análisis en gel 2D de la fracción proteica PAG 55.

La Figura 9 muestra tiras de ensayo que contienen anticuerpos de PAG-55 expuestos a muestras de sangre coagulada.

La Figura 10 muestra tiras de ensayo que contienen anticuerpos de PAG-55 expuestos a muestras de sangre sin coagular.

Descripción detallada de la invención

- La invención supera las limitaciones de la técnica anterior proporcionando un ensayo fiable para el diagnóstico precoz de la preñez y procedimientos de uso del mismo. Durante tiempo se ha estado buscando una prueba de preñez fiable aunque simple para ungulados, especialmente para rumiantes de ganado vacuno. Las pruebas anteriores típicas no han permitido la detección precoz de la preñez o han sufrido una incidencia elevada de resultados falsos positivos o falsos negativos. Las pruebas anteriores, aunque potencialmente útiles, no han cumplido las expectativas en términos de su uso práctico en la granja. Como resultado de estos defectos, el animal permanece "abierto" a dos o tres ciclos de estro. La presente invención minimiza este tiempo "abierto" permitiendo la determinación de la preñez, o no preñez, ya en el primer estro tras un intento de cría.
- 5 Varias realizaciones de la presente invención superan las limitaciones de la técnica anterior detectando la presencia y el nivel de una fracción proteica ácida desde aproximadamente el día 55 al día 60 de la placenta de bovino ungulado, en una muestra biológica de un bovino que se sospecha que está preñado. Esta fracción de PAG ácida, aislada de aproximadamente el día 55 a aproximadamente el día 60, está enriquecida para más "proteínas PAG tempranas" o antígenos en comparación con las fracciones purificadas desde aproximadamente el día 80 a aproximadamente el día 100 de la placenta bovina y comprende PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG. Por tanto, esta fracción enriquecida se denomina "PAG-55", "proteínas PAG-55", "antígenos PAG-55", o "fracción proteica PAG-55" y abarca las proteínas y antígenos presentes en esta fracción ácida. Aunque estos antígenos PAG-55 se aíslan, preferentemente, desde aproximadamente el día 55 a aproximadamente el día 60 de la placenta bovina, es posible que los antígenos PAG-55 puedan estar presentes en tejido placentario temprano. El intervalo de aproximadamente el día 55 a aproximadamente el día 60 de la placenta de ungulado es preferible para aislar la fracción proteica PAG-55, ya que hay una cantidad deseable de tejido placentario presente en esta etapa de la preñez. La fracción enriquecida en PAG-55 se usa para generar anticuerpos policlonales monoclonales adecuados para detectar la preñez en vacas criadas desde el día 45 posparto. Los anticuerpos policlonales monoclonales que se generan usando la fracción proteica ácida enriquecida en PAG-55 como inmunógeno será útil para detectar la preñez antes del día 30 (desde aproximadamente el día 15 hasta el final de la gestación) y tendrán el beneficio añadido de ser capaz de detectar con precisión la gestación en vacas criadas desde el día 45 posparto.
- 10 La presente invención también facilitará la detección de proteínas PAG-55 en suero o en muestras de sangre entera que se dejan coagular. El suero extruído de la sangre coagulada se usó después en un procedimiento de inmunodetección deseado para evaluar la presencia y/o la cantidad de las proteínas PAG-55 en la muestra con el fin de determinar si el bovino está o no preñada.
- 15 La fracción proteica PAG-55 se puede analizar por sí misma para determinar el estado de preñez del bovino que se sospecha que está preñada. En un aspecto particularmente preferido de la presente realización de la invención, los niveles de la fracción proteica PAG-55 se analizan inmunológicamente detectando los niveles de la fracción proteica PAG-55 con al menos un anticuerpo, o varios anticuerpos, policlonales o monoclonales, producidos frente a la fracción proteica PAG-55 (bien contra fragmentos o contra proteínas PAG-55 de longitud completa o antígenos peptídicos sintéticos, bien la proteína nativa o la recombinante). En un aspecto todavía más preferido de estas realizaciones, el anticuerpo reconoce específicamente epítomos específicos de proteínas PAG-55 o proteínas PAG-55 de longitud completa. En una realización preferida, la presencia de la fracción proteica PAG-55 detectable por encima de los niveles de fondo en la circulación materna indica la presencia de un cigoto en el útero.
- 20 Como alternativa, en otras realizaciones de la presente invención, los niveles de la fracción proteica PAG-55 presentes en las muestras biológicas se pueden determinar junto con la determinación de los niveles de uno o más de otros compuestos específicos de la preñez.
- 25 En una realización preferida, el nivel de la fracción proteica PAG-55 se determina junto con una determinación del nivel de progesterona en una muestra biológica del mismo animal con el fin de proporcionar un diagnóstico precoz y preciso de la preñez en bovinos y otros rumiantes. Analizando la progesterona y la fracción proteica PAG-55, el diagnóstico de preñez es posible con un elevado grado de precisión. Esto es porque la prueba combinada mide un componente proteico producido por el cigoto y un componente materno, progesterona, todos ellos elevados tras el establecimiento de una preñez con éxito en especies rumiantes tal como ganado bovino. Este hallazgo es significativo porque el diagnóstico de preñez es un componente importante en el tratamiento de la reproducción de ganados, particularmente en la industria láctea en la que una elevada proporción de inseminaciones artificiales falla y días abiertos adicionales reducen el ingreso de operaciones neto para el productor.
- 30 Varias realizaciones de la presente invención comprenden un procedimiento para el diagnóstico de preñez o no preñez en un animal que se sospecha que está en las primeras etapas de preñez. En el aspecto más preferido de esta realización, el animal es una novilla de leche, una vaca de leche o una vaca de carne.
- 35 En algunas realizaciones de la presente invención, el diagnóstico de preñez o no preñez se realiza analizando una muestra biológica del animal que se sospecha que está en las primeras etapas de preñez. El análisis se realiza detectando la presencia de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, la cantidad de progesterona en la muestra biológica de animales, incluidos bovinos, que se sospecha que están en las primeras etapas de preñez. En varias realizaciones, la muestra biológica comprende suero, plasma, sangre, saliva, orina, leche o cualquier otra muestra

adecuada del animal sujeto, siempre que la muestra sea compatible con la presente invención. En una realización particularmente preferida, la muestra biológica es de sangre, suero o plasma.

5 En varias realizaciones de la invención, la muestra biológica se obtiene del animal que se sospecha que está preñada desde 15 a 30 días tras la cría natural o la inseminación artificial. Preferentemente, la muestra se puede recoger a cualquiera de los días 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o el día 30 tras la cría, o incluso más tarde. Más preferentemente, la muestra se puede recoger aproximadamente de 20 a 30 días tras la cría e incluso más preferentemente 20-25 días después de la cría.

10 En varias realizaciones de la invención, la prueba de preñez se lleva a cabo detectando la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona mediante procedimientos inmunológicos. Por ejemplo, usando anticuerpos monoclonales o policlonales producidos contra la fracción proteica PAG-55 intacta (o, como alternativa, los anticuerpos contra péptidos que comprenden epítomos inmunorreactivos de la proteína/s PAG-55). En un aspecto preferido de esta realización, los anticuerpos (monoclonales o policlonales) se producen contra proteína/s PAG-55 nativas de longitud completa o recombinantes de longitud completa. Más preferentemente, el inmunógeno es proteína/s PAG-55 bovina de longitud completa y los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

15 Para análisis de progesterona inmunológica, están disponibles los kit de ensayo disponibles comercialmente que se pueden usar para medir los niveles en suero de progesterona. Usando un ensayo de la fracción proteica PAG-55 y el ensayo comercial de progesterona, se encontró que, en general, la detección de la preñez ya podía realizarse a aproximadamente el día 23 en ganado vacuno o durante la peri-implantación en rumiantes. Adicionalmente, la presente invención es beneficiosa en cuanto a que tiene como resultado una tasa muy baja (< 5 %) de resultados
20 positivos y de falsos negativos.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de que las proteínas PAG.55 en combinación con progesterona se expresan en las primeras etapas de preñez es útil para la detección de la preñez en una etapa temprana. En ganado vacuno, la detección de proteínas PAG-55 se puede usar de forma individual o en
25 combinación con otros procedimientos diagnósticos para proporcionar una evaluación diagnóstica de la preñez. Se ha pensado que fracciones enriquecidas en PAG-55 de otras especies también serán útiles, solas o en combinación, para fines similares.

La concentración de progesterona en suero en vacas preñadas es de aproximadamente 3 ng/ml o superiores el día 16 y continúa aumentando después. Si una vaca no está preñada, la concentración de progesterona en suero disminuye significativamente desde el día 16 en adelante y desciende por debajo de 3 ng/ml (en la mayoría de los
30 casos por debajo de 1,0 ng/ml) al día 19 hasta el día 23 (Santos y col., 2002; Ayalon, 1978; Weibold, 1988).

Chandrasekaran y col., 1990 han demostrado que los niveles de progesterona en la leche se correlacionan con los niveles de progesterona en suero, aunque son tres veces menores, lo que sugiere que el análisis de los niveles de progesterona en la lecha también es aplicable para usar de acuerdo con la presente invención.

35 Una realización de la presente invención está dirigida a un procedimiento que comprende una prueba combinada para la fracción proteica PAG-55 y la progesterona usada para determinar el estado de preñez de una vaca. De acuerdo con un aspecto concreto de esta realización, la presencia de la fracción proteica PAG-55 por encima de un nivel umbral de cero (p. ej., > 0,0 ng/ml) junto con un valor de progesterona en suero superior a 2 ng/ml indican que una vaca está preñada. En un aspecto especialmente preferido de esta realización, el nivel de progesterona en suero es de aproximadamente 3 ng/ml o mayor. En contraste con ello, si la fracción proteica PAG-55 está ausente
40 en el suero o presenta a un nivel por debajo del "nivel umbral" y el animal tiene un valor de progesterona en suero por debajo de aproximadamente 2-5 ng/ml y, preferentemente, por debajo de aproximadamente 3 ng/ml, se considera que el animal no está preñado o "abierto". La Tabla 1 muestra cómo se usarán los niveles en la muestra para diagnosticar o predecir el estado de preñez.

45 La especificidad del diagnóstico de preñez con la prueba de combinación probablemente mejoraría cuando la prueba se realiza desde el día 16 hasta el final de la gestación, ya que los valores de progesterona en suero de ~ 80 % de las vacas de leche abiertas están por debajo de 2 ng/ml desde los días 20 a 23.

TABLA 1

Niveles de la muestra	Estado de preñez predicho
Fracción proteica PG-55 positiva (+, por encima del nivel basal) progesterona 3 ng/ml o superior	Preñez positiva
Fracción proteica PG-55 negativa, progesterona por debajo de 3 ng/ml	Preñez negativa

Es probable que la especificidad y la sensibilidad de la prueba combinada varíe de 75 a 100 % cuando la prueba se

realiza desde aproximadamente el día 23 hasta el fin de la gestación.

Aspectos concretos de esta realización incluyen la determinación de la fracción proteica PAG-55 o la detección de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, los niveles de progesterona usando procedimientos inmunológicos y/o basados en ácido nucleico. Estos diversos procedimientos de detección son bien conocidos y muy usados en la técnica.

A. Detección inmunológica de la fracción proteica PAG-55 y/o Progesterona.

Realizaciones contempladas de la presente invención incluyen las que emplean el uso de anticuerpos en la detección inmunológica de la fracción proteica PAG-55 o detección de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona. En la literatura científica se han descrito varios procedimientos de inmunodetección útiles, tales como, por ejemplo Nakamura y col., (1987). Immunoassays, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión. Ciertas realizaciones preferidas pueden incluir el uso de inmunoensayos, incluidos varios tipos de ensayos de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), biosensores o el uso de sistemas diagnósticos basados en tecnología de flujo lateral. La detección inmunohistoquímica usando secciones tisulares también se contempla como útil para la presente invención. No obstante, se apreciará que la detección no está limitada a dichas técnicas, y la transferencia Western, transferencia puntual, análisis FACS y similares también se pueden usar en relación con la presente invención.

En general, los procedimientos de inmunounión incluye obtener una muestra que se sospecha que contiene una proteína, péptido o anticuerpo y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o proteína o péptido de acuerdo con la presente invención, como puede ser el caso en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos. Las muestras preferidas, de acuerdo con la presente invención, son fluidos, tales como leche, orina, sangre, suero, plasma o saliva.

Poner en contacto la muestra biológica seleccionada con la proteína, péptido o anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) es, general, una cuestión de simplemente añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo lo bastante largo para que los anticuerpos formen inmunocomplejos con la fracción proteica PAG-55 o progesterona. Tras este tiempo, la mezcla de anticuerpos de la fracción proteica PAG-55 o progesterona se lavarán para eliminar cualquier especie de anticuerpo unido no específicamente, de modo que se detectan los anticuerpos específicamente unidos dentro de los complejos inmunitarios primarios.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejo es bien conocida en la técnica y se puede conseguir mediante la aplicación de numerosos enfoques. En general, estos procedimientos se basan en la detección de un indicador o marcador, tal como cualquier indicación o marcador radioactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso estándar en la técnica. Las patentes de EE.UU. que conciertan el uso de dichos indicadores incluyen 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario, tal como un segundo anticuerpo o una disposición de unión a ligando con biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

Normalmente, los complejos inmunitarios primarios se pueden detectar por medio de un segundo ligando de unión que tiene una afinidad de unión por el primer anticuerpo específico de PAG-55 o progesterona. En estos casos, el segundo ligando de unión puede estar unido a un indicador detectable. El segundo ligando de unión es en sí mismo a menudo un anticuerpo, que, por tanto, puede denominarse anticuerpo "secundario". Los complejos inmunitarios primarios están en contacto con el ligando de unión secundario marcado, o anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios secundarios. Los complejos inmunitarios secundarios en general se lavan para eliminar cualquier anticuerpo o ligando secundario específico marcado unido de forma no específica y después se detecta el marcador restante en los complejos inmunitarios secundarios.

Otros procedimientos incluyen la detección de complejos inmunitarios primarios mediante un enfoque de dos etapas. Un segundo ligando de unión, como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión por el anticuerpo frente a PAG-55 o progesterona se usa para formar complejos inmunitarios secundarios, como se ha descrito anteriormente. El segundo ligando de unión contiene una enzima capaz de procesar un sustrato hasta un producto detectable y, por tanto, amplificar la señal en el tiempo. Después de lavar, los complejos inmunitarios secundarios se ponen en contacto con sustrato, lo que permite la detección.

La progesterona también se puede detectar de acuerdo con la invención usando varios kits de detección disponibles comercialmente. Por ejemplo, el kit de progesterona COAT-A-COUNT™ usado por los inventores, que está disponible en Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, CA). Ejemplos de otros ensayos que se han descrito incluyen la técnica inmunoenzimática descrita por, por ejemplo, Stefanakis y col., (1994) y por Stanley y col., (1986) y los ensayos del nivel de progesterona en la saliva descritos por, por ejemplo, Lu y col., (1997) y Vienravi y col., 1994.

B. ELISA

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 detectados es la fracción proteica PAG-55 bovina que, junto con la progesterona, se detectan usando anticuerpos monoclonales o policlonales frente a la fracción proteica PAG-55 o a la progesterona como parte de un ELISA.

Por tanto, como parte de la práctica de la presente invención, se pueden usar los principios ampliamente conocidos y bien entendidos de un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). El ELISA lo introdujo por primera vez Engvall y Perlmann (1971) y se ha convertido en una potente herramienta analítica usando diversos protocolos (Engvall, 1980; Engvall, 1976; Engvall, 1977; Gripenberg y col., 1978; Samgadharan y col., 1984). El ELISA permite que las sustancias se adsorban de forma pasiva a soportes sólidos, tales como plástico, para permitir la fácil manipulación en condiciones de laboratorio. Para un tratamiento exhaustivo sobre el ELISA, se remite al experto al "ELISA; Theory and Practice" (Crowther, 1995).

La sensibilidad de los procedimientos de ELISA depende del recambio de la enzima usada y de la facilidad de detección del producto de la reacción enzimática. La potenciación de la sensibilidad de estos sistemas de ensayo se puede conseguir mediante el uso de sustratos fluorescentes y radioactivos para las enzimas. Inmunoensayos abarcados por la presente invención incluyen, entre otros, los descritos en la patente de EE.UU. nº 4.367.110 (ensayo de tipo sándwich doble con anticuerpo monoclonal) y la patente de EE.UU. 4,452,901 (transferencia western). Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En una realización particularmente preferida, la invención comprende un ELISA de tipo "sándwich", en el que los anticuerpos anti-PAG-55 se inmovilizan sobre una superficie seleccionada, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno o una tira reactiva. Después, una composición de ensayo que se sospecha que contiene la fracción proteica PAG-55, por ejemplo una muestra clínica, tal como sangre o suero, se pone en contacto con la superficie. Después de la unión y el lavado para eliminar los inmunocomplejos unidos no específicamente, el antígeno unido se puede detectar mediante un segundo anticuerpo a PAG-55.

En otro ELISA de ejemplo, los polipéptidos de la muestra se inmovilizan sobre una superficie y después se ponen en contacto con los anticuerpos anti-PAG-55. Después de la unión y el lavado para eliminar los inmunocomplejos unidos no específicamente se detecta el anticuerpo unido. Cuando los anticuerpos iniciales se unen a un marcador detectable, los inmunocomplejos primarios se pueden detectar directamente. Como alternativa, los inmunocomplejos se pueden detectar usando un segundo anticuerpo que tenga afinidad de unión por el primer anticuerpo, estando el segundo anticuerpo unido a un marcador detectable.

Otro ELISA en el que PAG-55 está inmovilizada implica el uso de la competencia de anticuerpos en la detección. En este ELISA, los anticuerpos marcados se añaden a los pocillos y se dejan unir a PAG-55, y se detectan por medio de su marcador. La cantidad de fracción proteica PAG-55 en una muestra se determina mezclando la muestra con los anticuerpos marcados antes o durante la incubación con pocillos revestidos. La presencia de la fracción proteica PAG-55 en la muestra actúa reduciendo la cantidad de anticuerpo disponible para la unión al pocillo y, por tanto, reduce la última señal.

Con independencia del formato empleado, los ELISA tienen ciertas características en común, tal como revestimiento, incubación o unión, lavar para eliminar las especies unidas no específicamente y detectar los inmunocomplejos unidos. Al revestir una placa con antígeno o anticuerpo, en general se incubarán los pocillos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, durante la noche o durante un periodo de horas especificado. Los pocillos de la placa se lavarán después para eliminar el material adsorbido de forma incompleta. Después, todas las superficies restantes disponibles de los pocillos se "recubren" con una proteína inespecífica antigénicamente neutra con respecto al antisuero de prueba. Estos incluyen suero de conejo normal, seroalbúmina bovina (BSA), caseína y soluciones de polvo de leche. El recubrimiento permite bloquear los sitios de adsorción inespecífica sobre la superficie de inmovilización y, por tanto, reduce el fondo causado por la unión inespecífica de los antisueros a la superficie.

En los ELISA, probablemente es más habitual usar un medio de detección secundario o terciario en lugar de un procedimiento directo. Por tanto, tras la unión de una proteína o anticuerpo al pocillo, el recubrimiento con un material no reactivo para reducir el fondo y lavar para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra de cáncer humano control y/o clínica o biológica que se va a analizar en condiciones eficaces para permitir la formación del inmunocomplejo (antígeno/anticuerpo). A continuación, la detección del inmunocomplejo requiere un ligando de unión o anticuerpo secundario marcado o un ligando de unión o anticuerpo secundario junto con un anticuerpo terciario o tercer ligando de unión terciario marcado.

"En condiciones eficaces para permitir la formación del inmunocomplejo (antígeno/anticuerpo)" significa que las condiciones incluyen, preferentemente, diluir los antígenos y anticuerpos con soluciones tales como suero normal de conejo, BSA, gammaglobulina bovina (BGG), leche evaporada o en polvo y solución salina tamponada con fosfato (PBS)/TWEEN™. Estos agentes añadidos también tienden a ayudar en la reducción del fondo no específico.

Las condiciones "adecuadas" también significan que la incubación se produce a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Normalmente, los tiempos de las etapas de incubación varían desde aproximadamente 1 hora (h) a 2 horas e incluso hasta aproximadamente 4 horas, a temperaturas preferentemente del orden de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C o incluso durante la noche a aproximadamente 4 °C.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá un marcador asociado para permitir la detección. Preferentemente, este será una enzima que generará desarrollo de color tras la incubación con un sustrato cromogénico adecuado. Por tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto e incubar el primero o el segundo inmunocomplejo con un anticuerpo conjugado con ureasa, glucosa, oxidasa, fosfatasa alcalina o peroxidada de hidrógeno durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de otro inmunocomplejo o formación de inmunocomplejos (p. ej., incubación durante 2 h a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-Tween).

Tras la incubación con el anticuerpo marcado y después de lavar para eliminar el material no unido, la cantidad de marcador se cuantifica mediante, por ejemplo, incubación con un sustrato cromogénico, tal como urea y púrpura de bromocresol o ácido 2,2'-azido-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico [ABTS] y H₂O₂. Después, la cuantificación se consigue midiendo el grado de generación de color, por ejemplo usando un espectrofotómetro visible.

Una variante del ELISA es el ensayo de coagulación ligado a enzimas o ELCA (patente de EE.UU. 4,668,621), que usa la cascada de coagulación combinada con la enzima de marcaje RVV-XA (activador del factor X del veneno de víbora Russell) como un sistema de detección universal. La ventaja de este sistema para la presente invención es que las reacciones de coagulación se pueden realizar a PH fisiológico en presencia de una amplia variedad de tampones. Por tanto, es posible retener la integridad de los analitos del complejo.

C. Detección de ácido nucleico

En algunas realizaciones de la presente invención será deseable detectar ácidos nucleicos (ARNm o ADNc) que codifiquen cualquier componente antigénico de la fracción PAG-55 y/o que codifican las proteínas implicadas en la biosíntesis de la progesterona para determinar los niveles de las correspondientes proteínas. Dichos procedimientos incluyen ensayos de protección con RNAsa, ensayos de transferencia Northern y RT-PCR. A continuación se describen procedimientos relevantes para la detección y cuantificación de dichos ácidos nucleicos.

1. Hibridación

El uso de una sonda o cebador de entre 13 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 17 y 100 nucleótidos de longitud o, en algunos aspectos de la invención, hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Generalmente se prefieren moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tiras contiguas de más de 20 bases de longitud par aumentar la estabilidad y/o la selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. En general, se preferirá diseñar moléculas de ácido nucleico para hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas cuando se desee. Dichos fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante, por ejemplo, síntesis directa del fragmento por medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

De acuerdo con esto, las secuencias nucleotídicas de la invención se pueden usar por su capacidad para formar de un modo selectivo moléculas dúplex con tiras complementarias de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para amplificación de ADN o ARN de las muestras. En función de la aplicación ideada, se desearía emplear condiciones variables de hibridación para conseguir varios grados de selectividad de la sonda o los cebadores para la secuencia diana.

Para las aplicaciones que requieren una selectividad alta, normalmente se deseará usar condiciones de rigurosidad relativamente altas para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de bajo nivel de sales y/o temperatura alta, como las proporcionadas por NaCl de 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Dichas condiciones de rigurosidad alta toleran poco, si lo hacen, apareamientos erróneos entre la sonda o los cebadores y el molde o hebra diana y serían particularmente adecuados para aislar genes específicos o para detectar transcritos de ARNm, específicos. En general se aprecia que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

Las condiciones se pueden hacer menos rigurosas incrementando la concentración de sales y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigurosidad media se podría proporcionar mediante NaCl a aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que una condición de rigurosidad baja se podría proporcionar mediante sal de aproximadamente 0,15M a aproximadamente 0,9M, a temperaturas que varían desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. Las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente en función de los resultados deseados.

En otras realizaciones, la hibridación se puede conseguir en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotretitol 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20°C a aproximadamente

37°C. Otras condiciones de hibridación usadas podrían incluir Tris-HCl aproximadamente 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, a temperaturas que varían desde aproximadamente 40°C a aproximadamente 72°C.

En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio adecuado, tal como un marcador, para determinar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia variedad de medios indicadores adecuados, incluidos ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos y otros, tales como avidina/biotina, que se pueden detectar. En realizaciones preferidas, se puede desear usar un marcador fluorescente o una enzima marcadora tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radioactivos o de otro tipo no deseados para el medio ambiente. En el caso de las enzimas marcadoras, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden usar para proporcionar un medio de detección que es detectable visible o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios.

En general se ha previsto que las sondas o cebadores descritos en el presente documento sean útiles como reactivos en la hibridación en solución, como en PCR™, para la detección de la expresión de los correspondientes genes, así como en realizaciones que usan una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o ARN) de ensayo se adsorbe o, de otro modo, se fija a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico monocatenario fijado se somete después a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias concretas (en función de, por ejemplo, el contenido en G+C, el tipo de ácido nucleico diana, la fuente de ácido nucleico, el tamaño de la sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación concreta de interés es bien conocida para los expertos en la técnica. Después de lavar las moléculas hibridadas para eliminar las moléculas sonda unidas no específicamente, la hibridación se detecta y/o cuantifica determinando la cantidad de indicador unido. Los procedimientos de hibridación en fase sólida representativas se divulgan en las patentes de EE.UU. 5,843,663, 5,900,481 y 5,919,626. Otros procedimientos de hibridación que se pueden usar en la práctica de la presente invención se divulgan en las patentes de EE.UU. 5,849,481, 5,849,486 y 5,851,772.

2. Amplificación de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos usados como molde para amplificación se pueden aislar de las células, tejidos u otras muestras de acuerdo con metodologías estándar encontradas en Sambrook y col., 1989, Sambrook y col., 2001 y Ausubel y col., 2002. En ciertas realizaciones, el análisis se realiza con homogeneizados de células enteras o de tejido o muestras de fluidos biológicos sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN de células enteras o fraccionado. Cuando se usa ARN, se puede desear convertir primero el ARN en un ADN complementario.

Con el término "cebador", como se usa en el presente documento, se quiere abarcar cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos de diez a veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero se pueden usar secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria.

Los pares de cebadores diseñados para hibridar de forma selectiva con los ácidos nucleicos correspondientes a un segmento, porción o región íntegra que codifica cualquiera de las proteínas PAG-55 inmunogénicas útiles ara detectar preñez se pueden poner en contacto con un ácido nucleico muestra/de ensayo en condiciones que permitan la hibridación selectiva. En función de la aplicación deseada se pueden seleccionar condiciones de hibridación de alta rigurosidad que solo permitan la hibridación a secuencias que sean completamente complementarias a los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación se puede producir con rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más apareamientos erróneos con las secuencias cebadoras. Una vez hibridados, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos", hasta que se produzca una cantidad suficiente del producto de amplificación.

El producto de la amplificación se puede detectar o cuantificar. En ciertas aplicaciones, la detección se puede realizar por medios visuales. Como alternativa, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, gammagrafía radioactiva del radiomarcador incorporado o marcador fluorescente o incluso a través de un sistema que usa señales de impulsos eléctricas y/o térmicas (tecnología Affymax; Bellus, 1994).

Se dispone de una serie de procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias oligonucleotídicas presentes en una muestra de molde dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR™), que se describe con detalle en las patentes de EE.UU. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, y en Innis y col., 1988.

Se puede realizar un procedimiento de amplificación por PCR™ acoplado a transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Los procedimientos de transcripción inversa del ARN en ADNc son bien conocidos (véase Sambrook y col., 1989). Procedimientos alternativos para la transcripción inversa usan ADN polimerasas

termoestables. Estos procedimientos se describen en el documento WO 90/07641. Las metodologías de la reacción en cadena de la polimerasas son bien conocidas en al técnica. Procedimientos representativos de RT-PCR se describen en la patente de EE.UU. Patent 5,882,864.

5 Otro procedimiento de amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR") divulgada en la solicitud europea nº 320 308, la patente de EE.UU. 4,883,750 describe un procedimiento similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia Diana. También se puede usar un procedimiento basado en PCR™ y el ensayo de la oligonucleótido ligasa (OLA) divulgado en la patente de EE.UU. 5,912,148.

10 Procedimientos alternativos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana que se pueden usar en la práctica de la presente invención se divulgan en las patentes de EE.UU. nº 5,843,650, 5,846,709, 5,846,783, 5,849,546, 5,849,497, 5,849,547, 5,858,652, 5,866,366, 5,916,776, 5,922,574, 5,928,905, 5,928,906, 5,932,451, 5,935,825, 5,939,291 y 5,942,391, solicitud de GB Nº 2 202 328, y en la solicitud de PCT Nº PCT/US89/01025.

15 Qbeta Replicase, descrita en la solicitud de Nº WO87/06270, también se puede usar como procedimiento de amplificación en la presente invención. En este procedimiento, en presencia de una ARN polimerasa, a una muestra se añade una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria a la de una diana. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que después se puede detectar.

20 Un procedimiento de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para alcanzar la amplificación de moléculas diana que contienen el nucleótido 5'-[alfa-tio]-trifosfatos en una hebra de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención (Walker y col., 1992). La Amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), divulgada en la patente de EE.UU. 5,916,779, es otro procedimiento de llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, que implica múltiples rondas de desplazamiento de hebra y síntesis, es decir traducción por desplazamiento de mella.

25 Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), incluida la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh y col., 1989; Gingeras y col., solicitud de PCT WO 88/10315). La solicitud europea Nº . 329 822 divulga un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente el ARN monocatenario ("ssRNA"), ssDNA y AND bicatenario (dsDNA), que se puede usar de acuerdo con la presente invención.

30 La solicitud de PCT WO 89/06700 divulga un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico en base a la hibridación de una secuencia cebadora/región promotora a un AND monocatenario ("ssDNA") diana, seguido de transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros procedimientos de amplificación incluyen "carrera" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara y col., 1989).

3. Detección de ácidos nucleicos.

35 Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de la amplificación del molde y/o del exceso de cebador. En una realización, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poli(acrilamida) usando procedimientos estándar (Sambrook et al., 1989). Los productos de amplificación separados se pueden cortar y eluir del gel para manipulación adicional. Usando geles de agarosa de punto de fusión bajo, la banda separada se puede eliminar mediante calentamiento del gel, seguido de extracción del ácido nucleico.

40 La separación de los ácidos nucleicos también se puede efectuar mediante técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que se pueden usar en la práctica de la presente invención, incluidas la cromatografía de adsorción, partición, intercambio iónico, hidroxilapatita, tamiz molecular, columna de fase inversa, papel, de capa fina y de gases, así como HPLC.

45 En ciertas realizaciones se visualizan los productos de amplificación. Un procedimiento de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas bajo luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación están marcados de forma íntegra con nucleótidos marcados radioactiva o fluorométricamente, los productos de amplificación separados se pueden exponer a película de rayos X o visualizar en los espectros excitatorios adecuados.

50 En una realización, tras la separación de los productos de amplificación, una sonda de ácido nucleico marcada se pone en contacto con la secuencia marcadora amplificada. Preferentemente, la sonda se conjuga con un cromóforo, pero puede estar marcada radioactivamente. En otra realización, la sonda se conjuga con una pareja de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otra pareja de unión portadora de un resto detectable.

55 En realizaciones concretas, la detección se realiza mediante transferencia Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en la transferencia Southern son bien conocidas en la técnica (véase Sambrook y col., 1989). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de EE.UU. 5,279,721, que divulga un aparato y procedimiento para la electroforesis automática y la transferencia de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y transferencia sin manipulación externa del gel e idealmente es adecuado para llevar a cabo

procedimientos de acuerdo con la presente invención.

Otros procedimientos de detección de ácido nucleico que se pueden usar en la práctica de la presente invención se divulgan en las patentes de EE.UU. ,840,873, 5,843,640, 5,843,651, 5,846,708, 5,846,717, 5,846,726, 5,846,729, 5,849,487, 5,853,990, 5,853,992, 5,853,993, 5,856,092, 5,861,244, 5,863,732, 5,863,753, 5,866,331, 5,905,024, 5,910,407, 5,912,124, 5,912,145, 5,919,630, 5,925,517, 5,928,862, 5,928,869, 5,929,227, 5,932,413 y 5,935,791.

4. Kits

Todos los materiales esenciales y/o reactivos requeridos para detectar la fracción proteica PAG-55 o la detección de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, a progesterona en una muestra se puede ensamblar juntos en un kit. En general, esto comprenderá una sonda o cebadores diseñados para hibridar específicamente con ácidos nucleicos individuales y/o anticuerpos capaces de reconocer específicamente las moléculas de interés en la práctica de la presente invención. También pueden incluirse encimas adecuadas para detectar la interacción de los anticuerpos con los antígenos y/o enzimas diana para amplificar ácidos nucleicos, incluidas varias polimerasas (transcriptasa inversa, Taq, etc.), desoxinucleótidos y tampones, para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para amplificación. Dichos kits pueden también incluir enzimas y otros reactivos adecuados para la detección de proteínas/compuestos específicos o ácidos nucleicos o productos de amplificación y/o para detectar interacciones anticuerpo/ligando. Dichos kits comprenderán, en general, en medios adecuados, contenedores distintos para cada reactivo o enzima individual así como para cada sonda, par de cebadores y/o anticuerpo.

Todos los materiales y/o reactivos esenciales requeridos para detectar cualquiera de los analitos deseados, incluido cualquier analito que sería indicativo de preñez, especialmente en ungulados, por ejemplo una fracción proteica PAG o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona en una muestra de sangre entera, se pueden ensamblar juntos en un kit. En general esto comprenderá un tubo colector de suero u otros medios para recoger y contener la muestra de sangre y dejar que se produzca la coagulación. Los tubos colectores de suero típicos incluyen los tubos de Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ) BD Vacutainer® Plus Plastic Serum que están revestidos de sílicona y partículas de sílice micronizada para acelerar la coagulación. Un revestimiento de sílicona reduce la adherencia de los glóbulos rojos a las paredes del tubo. Otro tubo colector de suero es un "tubo de gel", tal como el tubo BD Vacutainer® SST™ Serum Separation.

Además de las partículas de sílice que actúan como activador de la coagulación, el tubo SST™ Serum Separation contiene un gel que forma una barrera física entre el suero o el plasma y las células sanguíneas. Tras la recogida de la muestra de sangre, los tubos BD Vacutainer® SST™ Serum Separation Tubes se invertirán aproximadamente cinco veces y después se dejarán separar durante al menos aproximadamente 10, y preferentemente aproximadamente 30 minutos, dando tiempo para la coagulación de la muestra de sangre entera. En la presente invención se ha determinado que no es necesaria ninguna etapa de centrifugación. Una vez que el tubo se ha invertido, el tiempo permitido para la coagulación es cualquier tiempo entre al menos aproximadamente 10 minutos y 30 minutos. Es importante el hecho de que se observan resultados buenos, fácilmente legibles de acuerdo con la presente invención en ausencia de centrifugación de la muestra, con resultados sorprendentemente limpios. Por último, el tubo BD Vacutainer® SST™ Serum Separation Transport Tube contiene el doble de la cantidad de gel usado en los tubos SST™ regulares. Esto proporciona una barrera más espesa entre el suero y el plasma que permanece intacta durante el transporte, de modo que se mantiene la calidad de la muestra para el análisis de laboratorio. Este tubo también se puede usar de un modo similar al descrito para los tubos SST™ regulares.

Otro tipo de tubo que podría ser útil en la presente invención incluye el tubo de recolección de sangre evacuada de cristal BD Vacutainer™ Hemogard™ Thrombin (BD Thrombin) que contiene trombina como activador de la coagulación. Este tubo también se puede usar sin la centrifugación de muestras, un beneficio importante en el escenario de granjas.

Otro tipo de tubo que podría ser útil en la presente invención incluye el tubo BD Vacutainer™ con EDTA como anticoagulante (tapa púrpura) para obtener sangre o plasma sin coagular para detectar proteínas PAG-55.

III. Programas de cría de ganado.

Un avance de la presente invención es que permite la detección precoz de la preñez con una incidencia baja de resultados falsos positivos. La detección precoz de la preñez es importante porque permite la recría de animales que no están preñados, de modo que se minimiza el periodo durante el cual el animal está "abierto". Una incidencia baja de falsos positivos es necesaria para permitir la implementación de un protocolo de recría eficaz. Normalmente, las pruebas de preñez anteriores no podrían detectar de un modo eficaz la preñez precoz o exhibían una incidencia elevada de falsos positivos.

Un tipo de prueba de preñez precoz que se ha usado es la detección de antígenos asociados con la preñez (PAG). Una ventaja de esta prueba es que se puede realizar desde el día 23 hasta el final de la gestación. Antes de la presente invención, las proteínas PAG usadas para la detección de la preñez seguían siendo detectables al menos hasta el día 65 en la vaca posparto, lo que conduce a falsos positivos y días adicionales de estar "abierta". La Figura 3 muestra los niveles de la proteína PAG detectados mediante el anticuerpo (de la University of Missouri) de

aproximadamente 10 ng/ml hasta el día 65 posparto. En contraste con esto, el nivel de la fracción proteica PAG-55 detectado mediante los anticuerpos anti-PAG-55 de la presente invención descendieron de aproximadamente 7 ng/ml el día 3 posparto a 2 ng/ml el día 45 posparto. Por tanto, la presente fracción proteica PAG-55 y los anticuerpos anti-PAG-55 representan un procedimiento mejorado para la detección de la preñez precoz en vacas que se crían dentro del periodo posparto.

Adicionalmente, los inventores han descubierto que analizando los niveles de progesterona además de los niveles de la fracción proteica PAG-55, se puede obtener una incidencia muy baja (<5 %) de falsos positivos. Esta combinación de pruebas proporciona un procedimiento para una detección precisa de la preñez en situaciones en las que el embrión ha muerto o no es viable, y sigue habiendo algún nivel bajo de fracción proteica PAG-55 detectable en las muestras. Dado que el cuerpo lúteo involuciona poco después de la muerte del embrión, un nivel bajo de progesterona junto con un nivel más alto de la fracción proteica PAG-55 indicarían que la vaca es portadora de un embrión no viable. Por tanto, una vaca con un embrión moribundo puede tener fracción proteica PAG-55 detectable el día 25, pero un nivel bajo de progesterona. Dado que la progesterona es un requisito absoluto para establecer la preñez, una vaca con bajos niveles de progesterona en suero no pueden mantener la preñez.

Otra clase de realizaciones de la presente invención proporciona procedimientos de tomar decisiones sobre la cría para animales bovinos unguados. Más preferentemente, los animales son ganado de carne o de leche.

Los procedimientos de la presente invención comprenden obtener una muestra biológica de un animal bovino unguado que se sospecha que está preñado. Preferentemente, la muestra biológica comprende una muestra de sangre, suero, plasma, leche, orina o saliva, pero también se contempla cualquier otra muestra biológica adecuada para usar con la presente invención. En el caso del ganado, la muestra se recoge, preferentemente, aproximadamente 15-30 días una vez que se ha producido la cría natural o la inseminación artificial (en conjunto "cría). Más preferentemente, la muestra es suero recogido aproximadamente a los 25 - 30 días de la cría y más preferentemente la muestra se recoge a los 23 días del final de la gestación. Después, la muestra se analiza para determinar los niveles de fracciones proteicas PAG-55 y, opcionalmente, la progesterona presente en la muestra. Si el nivel de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 está elevado en comparación con los controles no preñados, se determina que el animal está preñado y no se debe tomar ninguna medida adicional. De un modo similar, si el nivel de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y de progesterona están elevados en comparación con los controles no preñados, se determina que el animal está preñado y no se debe tomar ninguna medida adicional.

Los beneficios de la presente invención incluyen que permite una detección precoz fácil y precisa de la preñez, no requiere equipamiento, tal como centrífugas o la adición de agentes químicos, y se puede llevar a cabo rápida y fácilmente en una granja. Los presentes procedimientos que usan sangre coagulada permiten pruebas más precisas que se pueden realizar más fácilmente en una granja sin equipamiento especial.

Preferentemente, la muestra biológica comprende sangre entera recogida en un tubo de muestras y la muestra sin centrifugar se ha dejado coagular en presencia de uno o más agentes de coagulación, tal como trombina, fosfolípidos, caolín

(p. ej., material de arcilla), sílice micronizado (p. ej., polisiloxano) y calcio. Dejando que la muestra de sangre entera coagule, el suero se extraerá o separará de ciertos componentes líticos de la sangre, incluidos los glóbulos rojos. Estos componentes líticos y glóbulos rojos normalmente interfieren con los resultados de los ensayos de inmunodetección, ya que se absorben sobre la membrana de la prueba y producir manchas a lo largo de la región en la que aparecen los resultados de la prueba. Dejando que la muestra de sangre coagule, el suero se elevará a la parte superior de la muestra y la tira o membrana de inmunodetección deseada se pueden colocar en comunicación o contacto fluido con esta porción de suero de la muestra (la porción amarillenta clara de la parte superior de la muestra). El suero carece sustancialmente de componentes líticos o de glóbulos rojos que interfieran, y el suero se absorbe y fluye a lo largo de la tira o membrana de la prueba, de modo que se produce un resultado fácil de leer. Los presentes procedimientos que implican dejar que la sangre coagule con un agente de coagulación en un tubo de muestras son más fáciles y más prácticos para las granjas, ya que no son necesarios ni equipamiento ni agentes químicos adicionales. Como alternativa, la tira de prueba se podría colocar en una muestra de sangre sin coagular, en la que la tira filtra las células y permite el flujo de plasma a lo largo de la tira o membrana de prueba, de modo que se produce un resultado fácil de leer. Los procedimientos alternativos previos implicaban centrifugación, agitación, calentamiento y otras etapas de separación física que requerían equipamiento caro o agentes químicos adicionales. Los presentes procedimientos solo requieren un tubo que pueda funcionar como tubo separador de suero (p. ej., tubos SST o tubos de recogida de sangre evacuada de vidrio Hemogard Thrombin (BD)) y un medio de inmunodetección, tal como una tira de flujo lateral.

En el caso del ganado, la muestra de sangre entera se puede recoger en cualquier momento durante la gestación y normalmente se recoge aproximadamente 15-30 días una vez que se ha producido la cría natural o la inseminación artificial (en conjunto "cría). Más preferentemente, la muestra es suero recogido aproximadamente a los 25 - 30 días de la cría y más preferentemente la muestra se recoge a los 23 días del final de la gestación. Después, tras dejar que la muestra de sangre entera coagule, la muestra se analiza mediante cualquier medio de inmunodetección

5 adecuado para determinar los niveles de la fracción proteica PAG-55 o para determinar los niveles de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, de progesterona presente en la muestra. Si el nivel de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 está elevado en comparación con los controles no preñados, se determina que el animal está preñado y no se debe tomar ninguna medida adicional. De un modo similar, si el nivel de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y de progesterona están elevados en comparación con los controles no preñados, se determina que el animal está preñado y no se debe tomar ninguna medida adicional.

10 Si ni los niveles de fracción proteica PAG-55 ni de progesterona están elevados, indica que el animal no está preñado y se requiere la adopción de medidas adicionales. En primer lugar, se puede inyectar al animal hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y, aproximadamente siete días después, inyectar prostaglandina F2 α (PGF), seguido de la re-inseminación.

15 Si el nivel de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 está elevado, pero los niveles de progesterona no están elevados, se indica que el animal no está preñado, debido a la pérdida temprana del embrión o al fallo del reconocimiento materno de la gestación. En este caso, se deberá inyectar al animal GnRH y después, aproximadamente siete días después, inyectar PGF, seguido de la re-inseminación.

Si el nivel de la fracción proteica PAG-55 no está elevado, pero el nivel de progesterona está elevado, indica que el animal no está preñado. Se deberá inyectar al animal PGF, seguido de re-inseminación.

20 En aspectos preferidos de esta realización de la invención, aquéllos en los que uno solo o los niveles de la fracción proteica PAG-55 (o los componentes antigénicos de la misma) y de progesterona no están elevados, el procedimiento comprende además administrar una (segunda) dosis de GnRH aproximadamente 48 horas después de la inyección de PGF y antes de repetir la inseminación

25 En una realización particularmente preferida de la presente invención, una inyección de GnRH el día 26 es seguida de una inyección de PGF administrada a los 33 días de la inseminación y una inyección de GnRH y la re-inseminación se llevan a cabo a los 35 días de la inseminación.

A. Estro y ovulación.

30 Las vacas de leche entran en celo aproximadamente una vez cada 21 días. Las vacas muestran comportamientos característicos durante el celo. Los trabajadores con vacas de leche identifican a las vacas en celo mediante estas conductas características. Las vacas ovulan un huevo aproximadamente 28 horas después de iniciado el estro. La mayoría de las vacas de leche se inseminan artificialmente aproximadamente 12 horas después del inicio del estro, de modo que los espermatozoides están en el tracto reproductor cuando la vaca ovula.

B. Eficiencia de la reproducción en vacas de leche.

35 Las vacas de leche lactantes se monitorizan para detectar el celo. Son inseminadas cuando entran en celo de modo que se puedan preñar y tener otro ternero. La eficiencia con la que se detectan vacas en celo es baja. Solo aproximadamente el 50 % de las vacas en celo es detectado por los productores. De las vacas detectadas en celo e inseminadas, solo aproximadamente el 30 % quedarán preñadas. Por tanto, solo aproximadamente el 15 % (50 % x 30 %) de las ovulaciones dan lugar a una preñez. Por tanto, la reproducción en el ambiente lácteo puede ser ineficiente porque no siempre se detectan las vacas en celo y las inseminadas no siempre se preñan. Aunque la mayoría de las vacas podrían, en teoría, ser inseminadas artificialmente una vez cada 21 días, el intervalo verdadero de inseminación en las granjas es, normalmente, de una vez cada de 40 a 60 días. Este tiempo perdido tiene como resultado un impacto negativo sobre los ingresos por lácteos porque el periodo "abierto" extendido reduce la eficiencia económica como resultado del extenso periodo entre terneros y la reducida producción de leche durante la fase justo antes del secado (el ganado vacuno de leche alcanzan la lactación máxima de 85 a 115 días después del parto). Por tanto, es más rentable que el ganado vacuno se preñe lo antes posible. Además, la eficiencia de la reproducción ha empeorado desde 1951 (Butler, 1998) debido a la consolidación de la industria láctea por el mayor potencial genético para la producción de leche. Las granjas más grandes y la falta de trabajo han tenido como resultado una reducción de la cantidad de tiempo que se observa a los animales y una consiguiente reducción de la detección del estro. Esto es un problema significativo, ya que la reproducción de ganado de leche es la clave para el éxito de una granja láctea. De hecho, la razón más habitual para sacrificar vacas es que no se preñan y se consideran estériles.

C. Cuerpo lúteo y progesterona.

55 Una vez que una vaca ovula, se forma un cuerpo lúteo (CL) en el ovario y el CL secreta la hormona progesterona. La progesterona se puede detectar en la sangre de la hembra y es necesaria para mantener la preñez. Si el huevo es fertilizado y el embrión crece y sobrevive, el cuerpo lúteo se mantiene hasta el final de la gestación (aproximadamente 280 días). Si el huevo no se fertiliza o el embrión muere, el cuerpo lúteo remite y la vaca volverá a entrar en el ciclo del estro.

D. Fracción proteica PAG-55 y prueba de preñez.

Tras la concepción, el cigoto produce antígenos en la fracción proteica PAG-55. Las proteínas PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la Fracción proteica PAG-55 se pueden detectar en la sangre de la hembra aproximadamente a los 23 días del final de la gestación. En una realización preferible, la fracción proteica PAG-55 se detecta desde aproximadamente 25 a 30 días de la preñez en bovinos. La prueba de preñez PAG-55 y los procedimientos de la presente invención se han diseñado para detectar la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 en sangre, suero o plasma de la hembra. Una vaca preñada también tendrá niveles altos de progesterona en sangre porque tendrá un cuerpo lúteo. Por tanto, las vacas preñadas tendrán niveles detectablemente altos de la fracción proteica PAG-55 o de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y de progesterona en su sangre, suero o plasma.

E. Prueba de preñez en vacas de leche.

El problema con la manipulación reproductora en ganado vacuno de leche es que la detección de la preñez se ha realizado anteriormente normalmente de 35 a 60 días después de la cría. Las pruebas de preñez de la presente invención se pueden realizar aproximadamente 12 a 46 días antes que la prueba de preñez tradicional y en solo las vacas con CL se tiene que inyectar PGF. En las vacas que no tienen CL (y no responderán a PGF) se inyectará GnRH y serán tratadas con PGF en el momento adecuado (Fricke, P.M., 2002). Implementado este plan, los productores sabrán qué vacas están preñadas e inseminarán las vacas no preñadas en aproximadamente 28 días desde su primera inseminación. El intervalo de 20—30 días desde la cría a la detección de la preñez es más corto que los procedimientos actuales y el intervalo de 28 días desde la primera cría hasta la segunda cría para vacas no preñadas es mucho más corto que la media en la industria (normalmente el día 45).

Las pruebas de preñez en vacas de leche normalmente se han realizado mediante palpación rectal (sentir manualmente un embrión en el útero). La prueba manual normalmente se realiza de 35 a 60 días después de la cría. En las granjas de leche grandes, a menudo hay un veterinario el 100 % del tiempo para realizar pruebas de preñez manuales. La única alternativa a la prueba manual es la ecografía. Aunque la detección por ultrasonidos se puede realizar a los 28 días de la cría, no es una rutina porque el equipamiento es caro y las pruebas requieren más tiempo que la palpación rectal. Los procedimientos de la presente invención serán al menos tan precisos y a menudo más precisos que la palpación rectal tradicional, como indican los resultados mostrados en la Figura 2, que comparan la precisión y las sensibilidades del procedimiento de palpación con las de los procedimientos de detección de la fracción proteica PAG-55.

Las Figuras 2A-B muestran las curvas de operación del receptor (ROC) para predecir los resultados de la palpación a los 45 días. Las curvas comparan la sensibilidad y 1 menos la especificidad de los días indicados. La Figura 2A compara las muestras recogidas los días 23, 25, 27, 29, y 45 usando el anticuerpo M4 (preparado desde el día 80 de proteínas PAG). La Figura 2B compara las muestras recogidas los días 26, 27, y 28 usando la sangre combinada 6 y 7 de anticuerpos anti-PAG-55 policlonales de la presente invención (que es anti-PAG bovina de conejo).

En la Tabla 2 se indican los cortes de PAG que maximizan la sensibilidad y especificidad cada día de la obtención. También se muestran los rendimientos con los cortes de PGA establecidos para , ng/ml a 1.25 ng/ml.

TABLA 2

Corte de PAG (ng/ml)	Días tras la inseminación	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Maximiza Sens/Espec.			
0,33	26	94,8	94,7
0,93	27	95,9	95,8
0,9	28	95,8	95,8
Cortes fijados			
0	26	95,9	89,3
	27	98,0	87,5
	28	99,0	88,1

(continuación)

Corte de PAG (ng/ml)	Días tras la inseminación	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0,25	26	94,8	93,5
	27	98,0	89,9
	28	99,0	91,0
0,5	26	92,8	96,4
	27	96,9	92,9
	28	97,9	92,3
0,75	26	88,7	97,0
	27	95,9	94,0
	28	96,9	95,2
1,00	26	83,5	97,6
	27	93,9	95,8
	28	93,8	96,4
1,25	26	79,4	98,2
	27	87,8	97,0
	28	91,7	97,0

F. Fármacos usados para manipular los ciclos reproductores en vacas de leche.

5 En las vacas de leche se puede inyectar la prostaglandina F_{2α} (PGF) para que el cuerpo lúteo involucre y produzca el estro. La PGF solo tiene efecto si la vaca tiene cuerpo lúteo. Las vacas que no tienen cuerpo lúteo no responden a PGF. En su lugar, en las vacas de leche sin cuerpo lúteo se puede inyectar hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para producir la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo. Un procedimiento típico para manipular las vacas de leche sin un cuerpo lúteo es inyectar GnRH, esperar 7 días (permite que se forme el CL), inyectar PGF y esperar al siguiente celo de la vaca. Tanto la PGF como la GnRH son baratas y normalmente se usan en rebaños de 10 vacas de leche (solas o combinadas). Otro enfoque es inyectar GnRH, esperar siete días e inyectar PGF, y, después, esperar dos días e inyectar GnRH (Fricke, P.M., 2002). Este protocolo (protocolo de Ovsynch) es popular porque se puede inseminar a las vacas tras la segunda GnRH sin tener que detectar el estro).

G. Implementación de mejores pruebas de preñez en programas de cría.

15 Usando los nuevos ensayos hay cuatro posibles resultados con respecto a los resultados de la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y progesterona. +/+, +/-, -/+ y -/-. En función de los resultados se desean varias etapas para implementación de programas de cría. Las diferentes posibilidades y la evolución deseada probable se fijan en a Tabla 3.

Tabla 3: Plan reproductor implementado 21 días tras la cría

Resultado de la prueba con PAG-55	Resultado de la prueba de progesterona	Resultado de la preñez	Acción del granjero
Positiva	Positiva	La vaca está preñada	No se requiere ninguna acción adicional.

(continuación)

Resultado de la prueba con PAG-55	Resultado de la prueba de progesterona	Resultado de la gestación	Acción del granjero
Positiva	Negativa	El embrión sufrió una muerte embrionaria precoz y la vaca no está preñada.	La vaca no tiene CL (según los niveles bajos de progesterona). Inyectar GnRH (produce ovulación), esperar siete días, inyectar PGF (remite el CL). El productor puede criar durante el estro o una alternativa sería dar oreo inyección de GnRH a las 48 de que la PGF indujera la ovulación y la cría (ricke, P.M., 2002).
Negativa	Positiva	La vaca no está preñada	La vaca tiene CL pero no embrión. Inyectar PGF para remitir el CL. El granjero puede criar durante el estro o una alternativa sería dar oreo inyección de GnRH a las 48 de que la PGF indujera la ovulación y la cría.
Negativa	Negativa	La vaca no está preñada	La vaca no tiene CL (y no tiene un embrión. Inyectar GnRH (produce ovulación), esperar siete días, inyectar PGF El granjero puede criar durante el estro o una alternativa sería dar oreo inyección de GnRH a las 48 de que la PGF indujera la ovulación y la cría.

H. Tipos de ensayos usados

- 5 De acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, los ensayos para detectar los niveles de progesterona se pueden llevar a cabo con muestras biológicas recogidas el mismo día o con muestras biológicas recogidas en días diferentes, como sea cómodo y/o más eficaz. En un aspecto preferido de esta realización, los ensayos para determinar los niveles de la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, los niveles de progesterona se determinan en una muestra o muestras que se recogen el mismo día.
- 10 En un aspecto particularmente preferido de esta realización, los ensayos son ELISA u otro ensayo basado en anticuerpos (tal como el ensayo con tiras basado en la tecnología de flujo lateral), en los que los anticuerpos funcionan por separado. Por ejemplo, se pueden localizar en posiciones separadas en el dispositivo de ensayo o el ensayo puede usar un dispositivo distinto para la detección de la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y otro para la detección de progesterona. En un aspecto
- 15 todavía más preferido de esta realización de la invención, el procedimiento para la determinación de la fracción proteica PAG-55 o la detección de cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 y de los niveles de progesterona en las muestras biológicas comprende el uso de uno o más dispositivo(s) del "Ensayo de Flujo Lateral", en el que al menos dos antígenos se detectan por separado.
- 20 De acuerdo con la presente invención, un "Ensayo de Flujo Lateral" significa una determinación inmunocromatográfica de la presencia o ausencia de un antígeno en una muestra biológica de un animal mediante:
- 25 a) combinación de la muestra con un anticuerpo acoplado a un agente colorante, específico del antígeno; b) dejando que la combinación resultante migre hacia una primera región que contiene un segundo anticuerpo frente al antígeno, que no está acoplado a un agente colorante de modo que la aparición del color en la primera región indica que el antígeno está presente en la muestra; y c) dejando que la combinación migre desde la primera región a una segunda región que contiene un anticuerpo frente al primer anticuerpo, de modo que la aparición del color en la segunda región sirve como control, lo que indica que el anticuerpo frente al antígeno está presente pero que no está

presente el antígeno; d) dejando que el complejo antígeno-anticuerpo migre desde la primera región a una segunda región en la que se detecta mediante un biosensor o cualquier otro sistema de detección electrónica. Los procedimientos de flujo lateral típicos se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 6.656.744.

IV. Muestras de endometrio y fracción proteica PAG-55

5 La placenta es la característica de los mamíferos euterios. Más que ser el órgano de mamíferos más conservado en términos anatómicos, discutiblemente es el más diverso (Haig, 1993). La placenta varía desde el tipo hemocorial invasivo, como en el ser humano, en el que la superficie del trofoblasto está en contacto directo con la sangre materna, al tipo epiteliochorial (p. ej., el cerdo), en el que el epitelio del útero no se erosiona (Amoroso, 1952). No solo la estructura de la placenta es altamente variable, sino que las hormonas polipeptídicas que produce la placenta también varían entre especies (Haig, 1993; Roberts y col., 1996). Por ejemplo, ningún grupo de mamíferos aparte de los primates superiores posee un homólogo de la gonadotropina coriónica de hCG para soporte lúteo en la preñez temprana y solo los rumiantes ungulados producen interferón de tipo I como hormona antiluteolítica (Roberts y col., 1996).

15 La placenta en rumiantes, como ganado vacuno o ovino, es superficial, relativamente no invasiva, y se conoce como sinepiteliocorial cotiledonaria. "Sinepiteliocorial" describe el sincitio materno-fetal formado mediante la fusión de células binucleadas del trofoblasto y células epiteliales uterinas, mientras que "cotiledonaria" describe la estructura macroscópica de la placenta y, específicamente, los mechones de los trofoblastos villosos (cotiledones) que se insinúan en las criptas de los carúnculos maternos. Estas regiones de carúnculos maternos y cotiledonarios fetales interdigitados y parcialmente fusionados son los placentotas y son los principales sitios del intercambio de gases y nutrientes en la placenta. Las células binucleadas, que componen aproximadamente el 20 % del epitelio de superficie (trofotodermo), migran y se fusionan con células epiteliales del útero materno y liberan sus productos de secreción directamente en el sistema materno. Entre los productos están los lactógenos placentarios y las glicoproteínas asociadas con la preñez (PAG). (Xie y col., 1994, 1996, 1997a, 1997b).

A. Purificación de las proteínas

25 Puede ser deseable purificar la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55 para usar como el antígeno para la generación de anticuerpos policlonales o monoclonales, o por otros motivos. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto de los medios celulares en el polipéptido y las fracciones no polipeptídicas. Habiendo separado el polipéptido de otras proteínas, el polipéptido (o polipéptidos) de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación hasta la homogeneidad). Ciertos procedimientos analíticos adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; enfoque isoeléctrico. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso la HPLC.

35 Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de una proteína o péptido codificados. La expresión "pepticuerpo o péptido purificado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, que puede aislarse de otros componentes, en la que la proteína o péptido está purificado hasta un grado con respecto al estado en que puede obtenerse de manera natural. Por tanto, una proteína o péptido purificado también se refiere también a un péptido que está libre del entorno en el que puede producirse de manera natural. Generalmente, "purificado" se referirá a una proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes y que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada.

45 Los expertos en la técnica conocerán diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de los polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, comparar la actividad con la actividad específica del extracto inicial y, por tanto, calcular el grado de pureza, evaluado en la presente memoria descriptiva mediante un "veces el número de purificación" (es decir, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 1.000 veces etc.). Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán por supuesto, de la técnica de ensayo concreta elegida para seguir la purificación y si la proteína o péptido expresada exhibe o no una actividad de unión detectable.

55 Los expertos en la técnica conocerán bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o mediante desnaturalización térmica o con pH ácido, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en gel; y combinaciones de tales y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse o que ciertas etapas puedan omitirse, y todavía de como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

- No existe ningún requisito general de que la proteína o péptido se proporcionen siempre en su estado más purificado. De hecho se contempla que productos purificados menos sustancialmente tendrán utilidad en ciertas realizaciones. Puede realizarse la purificación parcial usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando formas diferentes del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado, generalmente, una purificación “tantas veces” mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los procedimientos que muestran un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.
- Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE y de acuerdo como la extensión de su glicosilación (Capaldi 1977). Por tanto, se apreciará que, en condiciones de electroforesis diferentes, pueden variar los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión purificados o parcialmente purificados.
- La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con una extraordinaria resolución de los picos. Esto se consigue mediante el uso de partículas muy finas y presión alta para mantener un caudal adecuado. La separación se puede conseguir en cuestión de minutos, o como máximo de una hora. Además, solo se necesita un muy pequeño volumen de la muestra porque las partículas son tan pequeñas y están tan empaquetadas que el volumen del hueco es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Asimismo, la concentración necesaria de la muestra no tiene que ser muy grande porque las bandas son tan estrechas que existe muy poca dilución de la muestra.
- La cromatografía en gel, o la cromatografía en tamiz molecular, es un tipo especial de cromatografía de partición que se basa en el tamaño molecular. La teoría que subyace a la cromatografía en gel es que la columna, que se prepara con partículas muy pequeñas de una sustancia inerte que contiene poros pequeños, separa las moléculas más grandes de las moléculas más pequeñas a medida que atraviesan o rodean los poros, en función de su tamaño. Siempre que el material del cual están hechas las partículas no adsorba las moléculas, el único factor que determina la velocidad del flujo es el tamaño. Por tanto, las moléculas se eluyen de la columna en tamaño decreciente, siempre que la forma sea relativamente constante. La cromatografía en gel no tiene igual para la separación de moléculas de diferente tamaño, ya que la separación es independiente de todos los demás factores, tales como el pH, la resistencia iónica, la temperatura etc. Asimismo, no hay prácticamente adsorción, menos diseminación en zona y el volumen de elución está relacionado con el peso molecular.
- La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que depende de la afinidad específica entre una sustancia que se va a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Esta es una interacción de tipo receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza acoplado de forma covalente una de las parejas de unión a una matriz insoluble. El material de la columna puede adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución se produce cambiando las condiciones en las que no se producirá la unión (alterar el pH, la fuerza iónica, la temperatura etc.).
- Un tipo concreto de la cromatografía de afinidad útil en la purificación de compuestos que contienen hidratos de carbono es la cromatografía de afinidad en lectina. Las lectinas son una clase de sustancias que se unen a diversos polisacáridos y glicoproteínas. Normalmente, las lectinas se acoplan a agarosa mediante bromuro de cianógeno. La conconavalina A acoplada a agarosa fue el primer material de este tipo en usarse y se ha usado ampliamente en el aislamiento de polisacáridos y glicoproteínas aparte de lectinas que se han incluido lectinas de lenteja, aglutinina de germen de trigo que ha sido útil en la purificación de residuos de N-acetilglucosaminilo y lectina de *Helix pomatia*. Las propias lectinas se purifican usando cromatografía de afinidad con ligandos de hidratos de carbono. Se ha usado lactosa para purificar lectinas de semillas de ricino y cacahuetes; la maltosa ha sido útil en la extracción de lectinas de lentejas y fabes; la N-acetil-D-galactosamina se usa para purificar lectinas de semilla de soja; la N-acetilglucosaminilo se une a las lectinas del germen de trigo; la D-galactosamina se ha usado en la obtención de lectinas de almejas y la L-fucosa se unirá a las lectinas de loto.
- La purificación de las proteínas PAG-55 de la presente invención obtiene ventajas de las características generales de unión a la pepstatina de las PAG (Xie y col. 1991). Todas las proteínas que pertenecen a la familia de proteínas de las aspártico proteinasas se unen fuertemente a la pepstatina, un inhibidor de las aspártico proteinasas. La cromatografía de afinidad por pepstatina se ha usado con éxito para aislar y caracterizar la fracción proteica PAG-55 de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos que implican el uso de pepstatina e incluyen los de Huang y col. 1979. La pepstatina agarosa A para cromatografía se puede obtener comercialmente en empresas tales como Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri. La unión de las PAG a la matriz de pepstatina difiere en función del pH. La preparación de PAG-55 se une a la matriz de pepstatina a un pH ácido.
- En general, la matriz de la cromatografía debería ser una sustancia que en sí misma no adsorba moléculas en ninguna medida significativa y que tenga un amplio abanico de estabilidad química, física y térmica. El ligando se acoplará de un modo tal que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también deberá proporcionar una unión relativamente íntima. Y deberá ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando. Una de las formas más frecuentes de cromatografía de afinidad es la cromatografía de inmovilización. La generación de anticuerpos que sería adecuada para usar de acuerdo con la presente invención se trata más adelante.

B. Composiciones antigénicas

Un modo usa una fracción proteica PAG-55, proteínas o fragmentos peptídicos de las mismas como antígenos para la generación de antisueros policlonales y/o para anticuerpos monoclonales para usar en la detección de cualquier antígeno deseado de la fracción proteica PAG-55 en una muestra biológica como parte de una prueba para el diagnóstico de preñez. Se ha ideado que ciertas fracciones proteicas PAG-55 o componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55, o porciones de las mismas, se acoplarán, unirán, fijarán, conjugarán o unirán químicamente a uno o más agentes a través de ligadores, poliligadores o aminoácidos derivados. Esto se puede realizar de un modo tal que se produce una composición o vacuna biespecífica o multivalente. También se prevé que los procedimientos usados en la preparación de estas composiciones serán familiares para los expertos en la técnica y deberán ser adecuados para la administración a animales, es decir farmacéuticamente aceptables. Agentes preferidos son los vehículos tales como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o la glutatión-S-transferasa. Como alternativa, las proteínas PAG-55 se podrían fraccionar usando SDS-PAGE y se podrían cortar bandas en gel correspondientes a la inmunoreactividad de PAG y usar para inmunización.

Con el fin de formular antígenos de PAG-55 o proteínas para inmunización, en general se emplearán sales y tampones adecuados para hacer que los polipéptidos sean estables. Las proteínas PAG-55 se mezclan con adyuvantes y se usan para inmunización. Los protocolos generales usados para la preparación de mezclas de antígeno/adyuvante son bien conocidos.

El antígeno de PAG-55, mezclado con adyuvante completo o incompleto, se puede administrar intradérmicamente, intramuscularmente, intraperitonealmente o de acuerdo con otros procedimientos de inmunización generales.

V. Generación de preparaciones de anticuerpos que son reactivas con proteínas PAG-55 y/o progesterona.

Se contempla que anticuerpos (policlonales, monoclonales o mezclas de los mismos) específicos de la fracción proteica PAG-55 o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55, o cualquier fragmento de los mismos, se puede producir contra una fracción proteica PAG-55 de cualquier animal rumiante. En un aspecto más preferido, la fracción proteica PAG-55, o cualquiera de los componentes antigénicos de la fracción proteica PAG-55, se aísla de bovinos. En un aspecto particularmente preferido, la fracción proteica enriquecida en PAG-55 de bovino se usa como antígeno para producir los anticuerpos deseados. La fracción proteica enriquecida en PAG-55 puede incluir construcciones recombinantes que codifican las proteínas PAG-55 y las técnicas de ADN recombinantes, que son bien conocidas para los expertos en la técnica.

Dicha preparación de anticuerpos puede ser una composición de anticuerpos policlonales o monoclonales, cualquiera de ellos o ambos contemplados para usar con realizaciones preferidas de la presente invención. Una realización de dicha preparación de anticuerpos abarca una mezcla de anticuerpos policlonales generados usando la fracción proteica enriquecida en PAG-55 bovina como antígeno para producir los anticuerpos deseados. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, 1988). La realización preferida de la presente invención es generar anticuerpos frente a la fracción proteica PAG-55 y a la progesterona por separado.

En resumen, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando un animal con un inmunógeno que comprende un péptido/s o polipéptido/s de la presente invención y recogiendo el antisuero de dicho animal inmunizado. Para la producción de antisuero se puede usar un amplio abanico de especies animales. Habitualmente, un animal usado para la producción de anti-antisuero es un animal no humano, incluidos conejos, ratones, ratas, hámsters, pollos, cerdos, burros o caballos. Dado el relativamente grande volumen de sangre de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, específicos de isoformas del antígeno se pueden preparar usando técnicas de inmunización convencionales, como generalmente conocerán los expertos en la técnica. Se puede usar una composición que contiene los epítopos antigénicos deseados de los compuestos de la presente invención para inmunizar uno o más animales experimentales, tales como un conejo o ratón, que después pasarán a producir anticuerpos específicos contra los compuestos de la presente invención. Se puede obtener antisuero policlonal después de dejar tiempo para la generación de anticuerpos, simplemente extrayendo sangre del animal y preparando muestras de suero de sangre entera.

Se ha propuesto que los anticuerpos monoclonales de la presente invención encontrarán aplicación útil en procedimientos inmunoquímicos estándar, tal como ELISA y procedimientos de transferencia Western y en procedimientos inmunohistoquímicos, tales como tinción tisular, así como en otros procedimientos que pueden usar anticuerpos específicos de los antígeno/s y/o epítopos relacionados con la fracción proteica PAG-55. Adicionalmente, se ha propuesto que los anticuerpos monoclonales (maB) específicos de las proteínas PAG-55 concretas de diferentes especies se pueden usar en otras aplicaciones útiles.

En general, tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales contra la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona, se pueden usar en diversas realizaciones. Por ejemplo, se pueden usar en protocolos de clonación de anticuerpos para obtener ADNc o genes que codifican anticuerpos frente a la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, proteínas implicadas en la biosíntesis de la progesterona. También se pueden usar en estudios

de inhibición para analizar los efectos de los péptidos relacionados con PAG-55 y, opcionalmente, de los compuestos relacionados con la progesterona en células o animales. Los anticuerpos anti-PAG-55 y, opcionalmente, los anticuerpos contra las enzimas de la vía de la progesterona, también serán útiles en estudios de inmunolocalización para analizar la distribución de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, enzimas que participan en la biosíntesis o metabolismo de la progesterona durante varios acontecimientos celulares, por ejemplo para determinar la distribución específica de célula o de tejido de la fracción proteica PAG-55 o la biosíntesis o metabolismo de la progesterona en diferentes puntos del ciclo celular. Una aplicación particularmente útil de dichos anticuerpos está en purificar la fracción proteica PAG-55 nativa o recombinante usando, por ejemplo, una columna de afinidad de anticuerpos.

Los expertos en la técnica conocerán la operación de todas estas técnicas inmunológicas a la luz de la presente divulgación.

Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, 1988). Ejemplos más específicos de preparación de anticuerpos monoclonales se proporcionan en los ejemplos siguientes.

Como se conoce en la técnica, una composición dada puede variar en términos de inmunogenicidad. Por tanto, a menudo es necesario reforzar el sistema inmunológico del huésped, como se puede conseguir acoplado un péptido o polipéptido inmunógeno a un vehículo. Ejemplos y vehículos preferidos son hemocianina de lapa californiana (KLH) y seroalbúmina bovina (BSA). Otras albúminas, tales como ovoalbúmina, seroalbúmina de ratón o seroalbúmina de conejo, también se pueden usar como vehículos. En la técnica se conocen bien los medios para conjugar un polipéptido a una proteína transportadora e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, Carbodiimida y bencidina nis-biatzotizada.

También como es bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunógena concreta se puede potenciar mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Ejemplos y adyuvantes preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertas), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición inmunogénica usada en la producción de anticuerpos policlonales varía con la naturaleza del inmunógeno, así como con el animal usado para inmunización. Se pueden usar varias vías para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa, e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales se puede monitorizar mediante obtención de muestras de sangre del animal inmunizado en varios puntos tras la inmunización. También se puede administrar una segunda inyección de refuerzo. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se puede extraer sangre del animal inmunizado y aislar y almacenar el suero y/o el animal se puede usar para generar mAb.

Los Mab se pueden preparar fácilmente mediante el uso de técnicas bien conocidas, tales como los ejemplos en la patente de EE.UU. 4,196,265. Normalmente, esta técnica implica inmunizar un animal adecuado con una composición inmunogénica seleccionada, por ejemplo una fracción proteica PAG-55 purificada o parcialmente purificada o progesterona. La composición de inmunización se administra de un modo eficaz para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son los animales preferidos, aunque el uso de células de conejo, oveja o rana también es posible. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, 1986), pero se prefieren los ratones, siendo el ratón BALB/c el más preferido y este se usa de forma más rutinaria y, en general, da un porcentaje superior de fusiones estables.

Tras la inmunización, las células somáticas con el potencial de producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B) se seleccionan para usar en el protocolo generador de anticuerpos monoclonales. Estas células se pueden obtener de bazo, amígdalas o ganglios linfáticos sometidos a biopsia o de una muestra de sangre periférica. Se prefieren las células de bazo y las células de sangre periférica, las primeras porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpos que están en la etapa de plasmoblasto en división y las últimas porque la sangre periférica es fácilmente accesible. A menudo se habrá inmunizado a un panel de animales y se extraerá el bazo del animal con el título de anticuerpos más alto y se obtendrán los linfocitos de bazo mediante homogeneización del bazo con una jeringa. Normalmente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente 5×10^7 a 2×10^8 linfocitos.

Los linfocitos B productores de anticuerpos del animal inmunizado se fusionan con células de una célula de mieloma inmortal, en general una de la misma especie que el animal que se inmunizó. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para usar en procedimientos de fusión productores de hibridoma son, preferentemente, no productores de anticuerpos, tienen una elevada eficiencia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de únicamente las células fusionadas deseadas (hibridomas).

Se puede usar una cualquiera de una serie de células de mieloma, como son conocidas por los expertos en la

técnica (Goding, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede usar P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas se puede usar R210,RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 son todos ellos útiles en relación con fusiones celulares.

- 5 Los procedimientos para generar híbridos de células de bazo o de ganglios linfáticos productoras de anticuerpos y células de mieloma normalmente comprenden mezclar células somáticas con células de mieloma en una proporción 2:1, aunque la proporción puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1: 1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que estimulan la fusión de membranas celulares. Se han descrito procedimientos de fusión que usan el virus Sendai (Kohler y Milstein, 1975; 1976) y los que usan polietilenglicol (PEG), tal como el 37 % (v/v) de PEG, de Gefter y col., (1977). El uso de procedimientos de fusión inducidos eléctricamente también es adecuado (Goding, 1986).

- 15 Las proteínas de fusión normalmente producen híbridos viables a frecuencias bajas, alrededor de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . No obstante, esto no supone un problema, ya que los híbridos fusionados viables se han diferenciado de las células parentales no fusionadas (particularmente las células de mieloma sin fusionar que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) cultivando en un medio selectivo. El medio selectivo es, en general, uno que contiene un agente que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos en el medio de cultivo tisular. Ejemplos y agentes preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea únicamente la síntesis de purinas. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, el medio se suplementa con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se usa azaserina, el medio se suplementa con hipoxantina.

- 20 El medio de selección preferido es HAT. Solo las células capaces de operar en vías nucleotídicas salvajes son capaces de sobrevivir en medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la vía salvaje, por ejemplo la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) y no pueden sobrevivir. Las células B pueden actuar en esta vía, pero tienen un ciclo de vida limitado en cultivo y generalmente mueren en un plazo de aproximadamente dos semanas. Por tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son las híbridas formadas a partir de células de mieloma y B.

- 25 Este cultivo proporciona una población de hibridomas de los que se seleccionan hibridomas específicos. Normalmente, la selección de hibridomas se realiza cultivando las células mediante dilución de un único clon en placas de titulación, seguido de pruebas en los sobrenadantes clonales individuales (tras aproximadamente de dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo deberá ser sensible, simple y rápido, tal como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, ensayos de citotoxicidad, ensayos en placas, ensayos de inmunounión puntual y similares.

- 30 Los hibridomas seleccionadas se diluirían en serie y se clonarían en líneas celulares productoras de anticuerpos individuales, en las que los clones se pueden propagar indefinidamente para proporcionar mAb. Las líneas celulares se pueden explotar para la producción de mAb de dos formas básicas. Una muestra del hibridoma se puede inyectar (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se usó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores secretoras del anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, tal como suero o fluidos ascíticos, se pueden aprovechar para proporcionar mAb en una concentración elevada. Las líneas celulares individuales también se podrían cultivar *in vitro*, cuando los mAb se secretan de forma natural en el medio de cultivo del que se pueden obtener fácilmente a concentraciones elevadas. Los mAb producidos por cualquier medio se pueden purificar, si se desea, usando filtración, centrifugación y varios procedimientos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

A. Desarrollo de inmunoensayo para PAG-55 policlonal.

- 45 La sección siguiente describe el desarrollo de un ensayo basado en anticuerpos policlonales para detectar la fracción proteica PAG-55. Se pueden preparar proteínas antigénicas y de anticuerpos y se aíslan por cualquier medio conocido para los expertos en la técnica. Este ensayo se puede usar para determinar la viabilidad de la detección de la fracción proteica PAG-55 o cualquier componente antigénico de la fracción proteica PAG-55 durante la preñez temprana usando varios anticuerpos policlonales.

- 50 Un inmunoensayo desarrollado con anticuerpos reactivos con los componentes inmunogénicos nativos de longitud completa de la fracción proteica PAG-55 o la fracción proteica PAG-55 bovina recombinante detectará una fracción proteica PAG-55 presente en una muestra biológica tal como suero, plasma, saliva, orina o sangre con una elevada especificidad y sensibilidad. Un inmunoensayo específico de PAG-55 se puede desarrollar produciendo en primer lugar un anticuerpo frente a fracciones PAG-55 ácidas purificadas, tales como las aisladas desde el día 55 a aproximadamente el día 60 del cigoto bovino. Como alternativa, se pueden producir ciertos antígenos PAG-55 recombinantes purificados en levaduras o bacterias y se pueden usar como antígeno.

Los anticuerpos se pueden generar en conejos de acuerdo con cualquier protocolo estándar, que normalmente usa la fracción proteica PAG-55 purificada en adyuvante completo de Freund. Tras un intervalo de dos semanas, estos

conejos se pueden reforzar con el antígeno y el adyuvante incompleto. Los conejos se pueden reforzar después cada dos semanas, hasta recoger el suficiente antisuero y almacenar a -20 °C. Después, los anticuerpos policlonales se pueden purificar por afinidad usando cromatografía de proteína A y se dializan en PBS. Los anticuerpos purificados se alicuotan y almacenan a -20°C.

5 **B. Diseño de una prueba de preñez precoz de combinación con PAG-55/progesterona y resultados previstos.**

Se puede diseñar un formato de ensayo que analiza los niveles de progesterona y de la proteína PAG-55. Adicionalmente, debido a una incidencia elevada de pérdida precoz de embriones en ganado vacuno, una detección combinada de una proteína inducida por la preñez, tal como PAG-55, y un componente materno tal como progesterona diagnosticaría con más precisión el estado de preñez de un animal de lo que lo haría una prueba para solo un analito. Se puede formular una serie de niveles de corte designados de la fracción proteica PAG-55 y de progesterona para la determinación de la gestación en base a concentraciones dadas de PAG-55 y progesterona. Para cada día tras la inseminación se puede realizar una serie de análisis para determinar los niveles de corte adecuados para los niveles de suero (u otra muestra) de la fracción proteica PAG-55 en vacas.

Por ejemplo, se pueden realizar estudios que determinen los niveles en suero de la fracción proteica PAG-55 y progesterona en un número estadísticamente significativo de vacas los días tras la inseminación artificial o la no inseminación como control. Mediante un gráfico de los niveles de fracción proteica PAG-55 en suero y progesterona en dichos vacunos, posteriormente identificados como preñados mediante otros procedimientos (tal como palpación rectal o ecografía) se puede calcular estadísticamente un patrón que proporciona un nivel basal de la fracción proteica PAG-55 y progesterona, por debajo del cual se considerará que la vaca no está preñada y por encima de la cual una vaca se considerará preñada.

Usando estos valores se puede realizar una prueba para proporcionar la indicación adecuada de un resultado positivo para la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona únicamente cuando los niveles de dichos compuestos en la muestra biológica están por encima del nivel determinado.

Los mismos datos también se pueden usar para determinar la ventana óptima para la detección precoz de la preñez, que proporciona una sensibilidad y precisión aceptables y un diagnóstico lo bastante pronto para permitir la cría con el fin de minimizar el tiempo en el que la vaca está abierta.

Por ejemplo, para la progesterona se han determinado dos intervalos de corte (3 ng/ml y 2 ng/ml). Los intervalos de corte se seleccionaron en base a: a) el historial de preñeces de las vacas, y b) los niveles de progesterona durante el ciclo del estro y la preñez en vacas.

30 Cabe esperar que los resultados alcanzados mediante el procedimiento descrito anteriormente proporcionen una prueba de detección de la preñez de combinación de PAG-55/progesterona que sea tanto precisa como sensible. Además, esta prueba proporcionará información crucial, lo que permite a los jefes de rebaño optimizar los beneficios minimizando la cantidad de tiempo durante el cual los animales del baño permanecen abiertos.

C. Diagnóstico de preñez/no preñez en un bovino que se sospecha que está preñado.

35 Los anticuerpos se pueden producir respectivamente contra antígenos de PAG-55 y contra progesterona. Estos anticuerpos se pueden usar después para preparar un kit que comprende, entre otros, los componentes necesarios para proporcionar ensayos ELISA de tipo sándwich o para proporcionar tiras de ensayo basadas en tecnología de flujo lateral para detectar la presencia de la fracción proteica PAG-55 y, opcionalmente, progesterona en una muestra biológica.

40 Una tira de inmunodetección puede tener al menos una flecha cerca de la porción superior de la tira para indicar qué extremo de la tira introducir en el medio (p. ej., sangre). Normalmente, la sangre sube por la tira mediante capilaridad. Una tira de prueba típica tendrá una primera zona indicadora (una línea de prueba) que, si hay una línea en esta primera zona indicadora indica que el animal está preñado (ensayo de tipo sándwich) o no hay una línea en la zona indicadora (un ensayo de tipo competitivo) si el animal está preñado. Una tira de prueba típica también puede tener una segunda línea (línea inferior), que es una línea control que indica que la prueba se ha realizado correctamente. Normalmente será el caso en el que todas las tiras exhibirán una reacción positiva con la línea control, que funciona como control positivo.

El estado de preñez de un bovino puede determinarse después recogiendo una muestra biológica tras cría natural o inseminación artificial. La muestra biológica, como suero tomado desde el día 23 hasta el final de la gestación, se puede analizar después para determinar los niveles de la fracción proteica PAG-55 o cualquier componente antigénico de la misma y progesterona en la muestra. Los niveles umbral se pueden establecer individualmente, que se determinarán como un resultado "positivo" (un resultado positivo significa que el animal está preñado) para los ensayos ELISA con la fracción proteica PAG-55 y progesterona. De acuerdo con un aspecto de la presente invención se ha determinado que para ciertas aplicaciones, un nivel de corte adecuado para designar como "resultado positivo" para la fracción proteica PAG-55 es cualquier nivel detectable por encima de cero ng/ml o superior y para la progesterona el nivel es de aproximadamente 2 ng/ml o superior.

D. Resincronización de las vacas de leche y novillas tras la detección de PAG-55 y progesterona para el diagnóstico de preñez.

El siguiente es un procedimiento para criar vacas y novillas con un diagnóstico de no preñadas tras una prueba de PAG-55/progesterona. En general, se realizan pruebas con el ganado vacuno para PAG-55/progesterona de 16 a 28 días tras la cría natural o la inseminación artificial y se diagnostican preñadas o no preñadas. El procedimiento de resincronización se implementa en vacas no preñadas de 0 a 2 días después de la prueba de PAG-55/progesterona. Los animales son tratados en la secuencia siguiente: (i) inyectar prostaglandina F2α (PGF2α; una hormona causante de la regresión del cuerpo lúteo); (ii) esperar dos días, inyectar hormona liberadora de gonadotropina (GnRH; hormona causante de la ovulación); (iii) esperar de 0 a 8 horas, (iv) inseminar artificialmente.

En las vacas de leche y las novillas se analiza la reactividad con los anticuerpos policlonales o monoclonales PAG-55 de 16 a 28 días después de la primera inseminación artificial. El ganado vacuno con un diagnóstico de no preñado se trata con 5 ml de Lutalyse (25 mg de PGF2α), dos días después fueron tratados con 2 ml de Cystorelin (100 µg GnRH), y se les inseminó de 0 a 8 horas después de la GnRH. El tratamiento de resincronización se administra de 0 a 2 días después de la prueba de PAG-55 (de 16 a 30 días después de la primera inseminación). La preñez se determina de 30 a 60 días tras la inseminación.

VI. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se han incluido para demostrar las formas de realización preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. No obstante, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de la fracción proteica enriquecida en PAG-55

El siguiente diagrama de flujo describe la purificación de la fracción PAG-55 ácida, enriquecida para PAG tempranas, aislada de tejido cotiledonario bovino de 55-60 días (que es un término descriptivo para la estructura macroscópica de la placenta y, específicamente, los mechones de los trofoblastos villosos (cotiledones) que se insinúan en las criptas de los carúnculos maternos). A continuación se muestran las etapas de la purificación y varias composiciones también.



En general, el proceso de purificación anterior usa la característica de unión a la pepstatina de las PAG. En base a las características de unión a la pepstatina de las PAG a diversos pH diferentes, las PAG se pueden fraccionar o separar en tres categorías. PAG neutras (las PAG se unen a la pepstatina a pH neutro), PAG ácidas (las PAG se unen a la pepstatina a pH ácido) y PAG básicas (las PAG se unen a la pepstatina a pH básico). La fracción usada en las pruebas de preñez de la presente invención es la fracción PAG ácida que comprende PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG.

A. Recolección, purificación y homogeneización de tejido.

El tejido cotiledonario bovino se recogió desde el día 55 a 60 de la placenta y se almacenó congelado a -20 °C hasta que se llevó a cabo el procedimiento de purificación. Normalmente, un procedimiento de purificación comenzará con aproximadamente 15-20 gramos de material tisular, aislado de aproximadamente tres a cuatro animales que son rendimientos combinados típicos de tejido de cotiledón de aproximadamente 2 gramos a aproximadamente 10 gramos por animal.

1. **Purificación.** Se preparó una solución al 20 % de tejido cotiledonario (es decir, se añaden 20 ml de tejido a 80 ml de tampón) en tampón de homogeneización (fosfato 10mM, pH 7,0; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM, PMSF 0,2 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), NaN_3 al 0,02 % p/v) y se homogeneizó usando un homogeneizador Polytron® en un volumen de alícuotas de 25-30 ml en un tubo de 50 ml en hielo. La suspensión tisular se homogeneizó durante un minuto a 15.000 rpm y, después, dos minutos adicionales a 20.000 rpm. El homogeneizado se vertió después en un contenedor aparte y el proceso se repitió hasta que toda la suspensión estuviera completa. A continuación, el homogeneizado se centrifugó (en tunos de 35 ml con tapón de rosca) en un rotor Sorvall® SS34 a 15.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos.

B. Diálisis a pH 8 y pH 7 del homogeneizado.

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación descrita anteriormente se dializó en una bolsa de diálisis de peso molecular de corte 50 kD u otros tubos adecuados, contra un tampón de diálisis a pH 8,0 (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM) durante 12-16 horas, cambiando el tampón cada 4-6 horas (normalmente 2 cambios totales de tampón con tampón a pH 8). Después de esta etapa (tras la tercera diálisis con cambio de tampón a pH 8), la diálisis del homogeneizado continuó con tampón a pH 7,0 (Tris 20 mM, (pH 7,0), NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM) durante 12-26 horas adicionales, cambiando el tampón aproximadamente cada 4 horas, lo que tiene como resultado 3 cambios de tampón. Todas las etapas de diálisis/tampón se realizaron a 4 °C.

C. Unión neutra a pepstatina.

Una vez completada la diálisis a pH 7,0, el dializado se transfirió a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 15.000 X g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se vertió en un frasco de centrifuga de 250 ml que contiene 50 ml de resina de agarosa pepstatina previamente equilibrada (que está en tampón de: Tris 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM). El frasco de centrifuga se introdujo en un rotador y la suspensión de la resina se rotó a 4 °C a una velocidad fijada de aproximadamente 10-20 rpm durante de 16 a 20 horas.

D. Unión de pepstatina-agarosa a pH neutro.

Después de la etapa de unión anterior, la suspensión de resina de pepstatina agarosa del frasco de centrifuga se transfirió a una columna (2,5 cm x 15 cm) a 4 °C con un orificio de salida para recoger la solución del flujo en un batidor de vidrio limpio de 500 ml. La columna se lavó con 5 volúmenes de lecho del mismo tampón (Tris 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM). Los lavados se combinaron con la solución total en el batidor de 500 ml. La combinación de la solución de lavado y de flujo continuo en la columna se dializó contra tampón a Ph 5,0 (citrato 20 mM, pH 5,0, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM) durante aproximadamente 12-16 horas a 4 °C con 3 cambios de tampón. Tras la diálisis, la solución dializada se transfirió a tubos de centrifuga con tapa de rosca y se centrifugaron a 15.000 X g a 4 °C durante 30 minutos a 4 °C.

E. Unión de pepstatina-agarosa a pH ácido.

El sobrenadante de la etapa D anterior se transfirió después a un frasco de centrifuga de tapa de rosca de 250 ml que contiene 50 ml de resina de pepstatina-agarosa previamente equilibrada en tampón a pH 5,0 (citrato 20 mM, pH 5,0, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 mM). El frasco de centrifuga con la suspensión de la resina de pepstatina agarosa se introdujo en un rotador y se rotó a 4 °C con una velocidad fijada de aproximadamente 10-20 rpm durante de 16 a 20 horas. Después de esta etapa, la resina de pepstatina-agarosa (que es ácida) se transfirió en una columna (2,5 cm X 20 cm) y se lavó con tampón de lavado a pH 5 (citrato 20 mM, pH 5,0, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 Mm Y 0,1 % de Triton-X-100) hasta que la densidad óptica del flujo continuo de la columna (absorbancia) a DO280 fuera $\leq 0,001$, después la columna se eluyó con tampón de elución a pH 9,5 (Tris 20 mM, pH 9,5, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, 0,02 % de NaN_3 y 2-mercaptoetanol 0,1 Mm y 0,1 % de Triton-X-100). Cuarenta fracciones de 2 ml se recogieron e tubos que contenían 0,2 ml de Tris 1M a pH 7,0.

F. Combinación y concentración de los eluatos de PAG-55 ácidos.

Las fracciones eluidas se analizaron mediante análisis de inmunotransferencia puntual con anticuerpos policlonales frente a PAG-55. En resumen, 8 μl de cada fracción de eluato se mezclaron con 1 μl de SDS y se pasaron a un filtro de nitrocelulosa. Tras bloquear con 5 % de leche desecada desgrasada, el filtro se incubó con anticuerpos policlonales PAG para cada hora a temperatura ambiente. Después de lavar el filtro, la transferencia se incubó con anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Después de lavar, la transferencia se desarrolló con BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato /nitroazul de tetrazolio) sustrato de desarrollo de color (como lo que se encuentra en los kits cromogénicos con fosfatasa alcalina) durante aproximadamente 15 minutos o el tiempo suficiente para ver las manchas del eluato. La solución con sustrato para desarrollo de calor se vertió en un contenedor adecuado para su eliminación.

Las fracciones inmunorreactivas de PAG del primer pico de elución se combinan y concentran con solución salina

tamponada con fosfato en concentradores Millipore Centricon® Plus 30kD MWCO hasta un volumen de 1,0 ml. La fracción concentrada se almacenó congelada a -20 °C hasta que se usó para la cromatografía de filtración en gel.

G. Cromatografía de filtración en gel de los eluatos de PAG-55 ácidos.

5 La fracción de PAG-55 ácida eluida de pepstatina-agarosa se fraccionó después con cromatografía de filtración en gel usando una columna de 40 cm X 1,5 cm de resina Sephacryl S-100 preequilibrada con PBS. La columna de filtración e gel se cargó con aproximadamente 1 mg de la fracción proteica purificada de PAG-55 ácida concentrada purificada de la columna de pepstatina ácida eluida, como se describe en la parte F anterior. La columna de Sephacryl se eluyó con solución salina tamponada con fosfato a un caudal de 0,25 ml a 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de cincuenta y un ml y la DO₂₈₀ de cada fracción se comprobó, registró y se representó. La Figura 4 muestra un periodo de elución típico de la fracción proteica PAG-55 ácida concentrada purificada de la columna de pepstatina ácida. EN base al análisis de las fracciones, el primer pico de proteína y las fracciones entre el primero y el segundo pico se combinaron y se concentraron en PBS. Las fracciones del primer pico de proteínas de la fracción de PAG-55 ácida se muestran en la Figura 4. En la Figure 4., las fracciones 9-18 se combinaron y se concentraron hasta aproximadamente 1 mg/ml y este material concentrado se denomina fracción o antígeno/s proteica PAG-55. El material concentrado, también denominado la fracción PAG-55 ácida, se almacena congelado a -20 °C hasta su uso. Este material también se sometió a análisis por electroforesis con geles al 10 % de poliacrilamida y análisis de transferencia Western.

20 La Figura 1 muestra SDS-PAGE y una transferencia Western de la fracción antigénica de PAG del día 55 aislada. La Figura 1A es un gel de tinción de plata del antígeno del día 55 de múltiples lotes de purificación (calles 1-10), el antígeno del día 55 almacenado a 4 °C (calle 11), el antígeno PAG del día 80 (calle 12), BSA (calle 13) y marcadores del peso molecular (calle 14). La Figura 1B es una transferencia Western del mismo gel mostrado en la Figura 1A que se ha desarrollado con anticuerpos policlonales producidos contra el antígeno PAG del día 80. Obsérvese que la fracción del antígeno PAG del día 55 muestra inmunorreactividad a 46 kD, 55 kD, y 67-73 kD. En contraste con ello, la fracción del antígeno PAG del día 80 muestra distintas bandas inmunorreactivas a 55 kD, 67 kD y 73 kD.

25 La Figura 5 muestra un gel de tinción de plata del "antígeno PAG" purificado desde la placenta bovina de 55 días en la calle 1. La calle 3 muestra el análisis de transferencia Western del antígeno PAG con anticuerpo anti-PAG. El material sufre proteólisis cuando se almacena a 4 °C (calles 2 y 4, la calle 5 son los marcadores de peso molecular); por tanto, el material purificado deberá almacenarse congelado a -20 °C-

30 La fracción PAG-55 ácida purificada se enriquece para las PAG tempranas. Se ha estimado que aproximadamente del 10 % al 20 % de las proteínas totales de esta fracción purificada corresponden a proteínas PAG. Esta preparación se usó para inmunizar animales como se describe más adelante.

H. Análisis de electroforesis en gel bidimensional del antígeno PAG del día 55.

35 La fracción de antígeno PAG 55 ácida purificada se sometió a análisis en gel bidimensional y análisis de transferencia Western con anticuerpos policlonales producidos contra la fracción proteica PAG-55. Las manchas inmunorreactivas marcadas 1, 2 y 3 en la Figura 6 se cortaron y sometieron a impresión de la huella de la masa peptídica (secuenciación de aminoácidos mediante espectroscopia de masas). Las manchas correspondientes a la inmunorreactividad de PAG se indican con círculos.

La secuenciación peptídica de las manchas 1 y 2 identificó fragmentos peptídicos que corresponden a PAG-6 (también descrito en la Fig. 8A):

40 **Secuencias peptídicas de PAG-6:**

IGDLVSTDQPFGLCLK (SEC ID N° 3)

TFSGAFPIFDK (SEC ID N° 4)

NEGAISEPVFAFYLSK (SEC ID N° 5)

DKQEGSVVMFGGVDHR (SEC ID N° 6)

45 ALVDTGTSDIVGPSTLVNNIWK (SEC ID N° 7)

YFSVFDR (SEC ID N° 8)

La secuenciación peptídica de la mancha 3 dio una mezcla de los péptidos correspondientes a:

Secuencias peptídicas de PAG-4:

TFSITYGSGR (SEC ID N° 12)

50 VPGQAYILK (SEC ID N° 13)

YFSVFDR (SEC ID N° 14)

Secuencias peptídicas de PAG-9:

NQGAISEPVFAFYLSK (SEC ID N° 27)

RYFSVFDR (SEC ID N° 28)

5 **Secuencias peptídicas de PAG-16:**

LNYPNLSCSGAIPFDK (SEC ID N° 19)

EGSVVMFGGVDHR (SEC ID N° 20)

GELNWWPLIR (SEC ID N° 21)

YFSVFDR (SEC ID N° 22)

10 **Secuencias peptídicas de PAG-18:**

NQGAISEPVFAFYLSK (SEC ID N° 9)

AVVDTGTSLIEGPR (SEC ID N° 10)

RYFSVFDR (SEC ID N° 11)

Secuencias peptídicas de PAG-19:

15 TFSITYGSGR (SEC ID N° 23)

NQGAISEPVFAFYLSK (SEC ID N° 24)

EGSVVMFGGVDHR (SEC ID N° 25)

YFSVFDR (SEC ID N° 26)

Secuencias peptídicas de una nueva PAG (MonPAG) (también descrita en la Fig. 8A-B):

20 ISSSGAIPFDK (SEC ID N° 15)

EGSVVMFGGVDHR (SEC ID N° 16)

NOGAISEPVFAFYFSK (SEC ID N° 17)

IGDLVSTDQPFGLSTAIEYGFK (SEC ID N° 18).

25 Las secuencias peptídicas se analizaron mediante el software del análisis proteico PEAKS™ (Bioinformatics Solutions, Inc., Ontario, Canadá). La masa del péptido (Mz), la carga del péptido, el peso molecular calculado, el % de confianza en la secuenciación, la posición del aminoácido inicial y final de la secuencias consenso de PAG para las manchas 1, 2 y 3 se describen en las Figuras 8A y 8B. Parece que una mezcla de PAG-6, PAG-4, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y la nueva Mon PAG forman la fracción PAG-55 ácida y que cualquier combinación de estas proteínas y, preferentemente, todas ellas, serán útiles para generar anticuerpos policlonales para la detección precoz de la preñez.

30 La información sobre la secuencia parcial de una nueva PAG presente en la mancha 3, denominada Mon PAG, se muestra en la Figura 7A.B. Una secuencia parcial de la mancha de Mon PAG mediante impresión de la huella de la masa peptídica (secuenciación) identificó una secuencia EST bovina (BP112041) en la base de datos pública de secuencias. Esta secuencia EST bovina correspondiente a la proteína Mon PAG tiene de número de registro BP112041 (SEC N° 1). La secuencia se publicó como parte de un número grande de secuencias de ST bovina en Molecular Reproduction and Development 65: 9-18, 2003 . La secuencia de aminoácidos predicha de esta EST se muestra en la Figura 7B (SEC ID N° 2). Los residuos de aminoácidos en negrita y subrayados se identificaron mediante impresión de la huella peptídica (secuenciación) del antígeno PAG del día 55 tras análisis en gel 2D.

40 **Ejemplo 2. Generación de anticuerpos policlonales inmunorreactivos con la fracción proteica enriquecida en PAG-55**

Se inmunizó a 10 conejos con la fracción PAG ácida de 55-60 días usando protocolos de inmunización estándar (Es decir con un adyuvante). En las extracciones de sangre mensuales se comprobó el título de anticuerpos y la purificación de la IgG. La fracción de IgG purificadas de los 10 conejos se usó para desarrollar el ELISA de PAG-55. Se usó un panel de pruebas de las muestras de plasma bovino (37 vacas preñadas y 24 abiertas) del día 28 tras la inseminación para determinar la sensibilidad (capacidad para detectar vacas preñadas) y la especificidad (capacidad

para detectar vacas abiertas) en un ELISA de PAG-55 optimizado con anticuerpos de cada conejo. El panel de pruebas tiene como resultado una fracción IgG de la 7^a extracción para cinco conejos se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

RESULTADOS DEL ELISA DE PAG-55					
	#368	#369	#370	#371	#375
Sensibilidad (%)	89	100	100	100	76,5
Especificidad (%)	91	100	100	96	86,5
Corte (ng/ml)	0,8	0	1,5	1,0	0,9

Los resultados de la Tabla 4 muestran que las IgG de conejo de las muestras de prueba n° 368, n° 369, n° 370 y n° 371 podían usarse con éxito para detectar con precisión la preñez en vacas el día 28 de la gestación.

El ensayo de IgG de la 4^a extracción del n° 368 se usó para determinar la inmunorreactividad posparto en 40 vacas de hasta 10 semanas después del parto. Los resultados como se muestran en la Figura 3B ilustran que los valores plasmáticos para los antígenos PAG-55, detectados por el anticuerpo n° 368 (descrito en la Tabla 4) eran inferiores a 2 ng/ml el día 45 después del parto. Las mismas muestras posparto también se analizaron con el anticuerpo UMC-M4 para comparar. Los anticuerpos UMC-M4 se generaron frente a proteínas PAG ácidas que se aislaron desde el día 80-100 de los cigotos. Los resultados mostraron que las proteínas PAG tardía (antígeno PAG ácido del día 80-100) detectadas con el anticuerpo UMC-M4 estaban presentes al nivel de > 20 ng/ml el día 45 posparto y más de 10 ng/ml el día 65 posparto (Fig. 3A). Por tanto, las proteínas PAG-55 exhiben un retorno claramente diferente y más rápido al nivel basal de < 2 ng/ml aproximadamente el día 45 posparto y representan una mejora para la detección de la preñez precoz.

Ejemplo 3: Comparación de sangre entera no coagulada con sangre coagulada no centrifugada para usar en pruebas de preñez a base de PAG para vacas usando tecnología de flujo lateral.

La sangre entera se recogió de trece vacas Holstein de la vena coccígea. La sangre se extrajo en tubos separadores para suero Vacutainer® (Becton Dickinson) de 4 ml (tubo SST que contiene al menos un activador o un gel y activador de la coagulación) o en un tubo para plasma Vacutainer® de 10 ml que contiene K₃ EDTA. Los tubos para plasma se mantuvieron en hielo, mientras que los tubos separadores para suero se mantuvieron a temperatura ambiente. Los activadores de la coagulación incluyen cualquier agente que estimule la formación de coágulos, incluidos, entre otros, trombina, fosfolípidos, caolín (un material de arcilla), sílice micronizado (p. ej., polisiloxano) y calcio. Otros factores que podrían añadirse a los tubos para recogida incluyen agonistas de plaquetas, tales como colágeno o el péptido agonista del receptor de la trombina, SFLLRN, que cabría esperar que aceleren significativamente la coagulación de la sangre entera nativa y que aceleren tanto el inicio y la finalización de la formación de coágulos (es decir, formación de gel de fibrina).

Para comprobar la precisión del uso de sangre entera en un ensayo de inmunodetección basado en PAG-55 en una granja, se extrajeron 400 µl de la muestra de sangre entera del tubo para plasma Vacutainer® que contiene K₃ EDTA y se introdujeron en un tubo de microfuga de ~1 ml. Las tiras de ensayo de flujo lateral anti-PAG-55 bovina diseñadas para detectar la preñez en bovinos se introdujeron en las muestras de sangre entera, de modo que las tiras estaban en comunicación fluida con la muestra de sangre y se dejaron desarrollar durante aproximadamente 5 minutos. Los resultados obtenidos mostraron bandas reactivas que se frotaron y no son fáciles de leer o interpretar a simple vista, como se muestra en la Figura 10, que ilustra tiras de ensayo expuestas a muestras de sangre entera sin coagular. Los malos resultados obtenidos la muestra de sangre entera sin coagular en el tubo para plasma con K₃ EDTA indicaron que los glóbulos rojos, productos líticos o sangre hemolizada de la muestra se extrajeron para la prueba o el área de "lectura" de la tira de flujo lateral. Este material de glóbulos rojos produce "manchas" e interfiere con el resultado de la prueba, lo que hace de la interpretación de los resultados leídos dentro del área de prueba difícil o imposible. La Figura 10, las calles 1, 5, 6, 7, 8 y 11 todas contienen glóbulos rojos que cubren la "línea de prueba", que las convierte en imposibles de leer.

Para comprobar la precisión del uso de muestras de sangre entera no centrifugada en la que el suero se extruye de sangre coagulada, la muestra de sangre entera en los tubos separadores para suero se mantuvo a temperatura ambiente, sin centrifugación, durante un mínimo de 20 minutos para permitir la formación de coágulos. Una vez formado el coágulo y extraído (el suero se la sacado mediante extrusión o exprimiendo el coágulo mediante la acción de contracción de la fibrina, esto se puede confirmar mediante observación visual), las tiras de ensayo de flujo lateral diseñadas para detectar preñez en bovinos con tecnología anti-PAG-55 se colocaron en comunicación fluida, (p. ej., tocando o en contacto con la tira para facilitar la captación del suero) con la capa de suero en los tubos separadores para suero. Las tiras de ensayo estaban en contacto con el suero extruido de los coágulos retraídos; pasando el suero a la tira mediante capilaridad. Se dejó que las tiras se desarrollaran durante aproximadamente 5 minutos. Los resultados obtenidos mostraron claras bandas reactivas fáciles de interpretar a simple vista. La Figura

- 9 muestra tiras de ensayo expuestas a muestras de sangre coagulada. Es importante el hecho de que ninguna de las muestras que usa muestras de sangre coagulada exhibió manchas de glóbulos rojos que interfirieran en la lectura de las líneas de prueba. En su lugar, las muestras de sangre coagulada eran fáciles de leer, con la línea de prueba mostrándose de un modo claro y distinto, como se muestra en las tiras de ensayo en las calles 1-13 de la Figura 9. Adicionalmente, no había necesidad de centrifugar los tubos SST, el proceso de coagulación se produjo mientras que los tubos se mantenían a temperatura ambiente en una gradilla para tubos u otro medio adecuado de soporte de nivel. Cabe destacar que se puede usar cualquier tiempo adecuado para permitir la coagulación de la muestra de sangre entera. Varios factores pueden afectar al tiempo para la coagulación, tales como la temperatura, la humedad y la altitud.
- 5
- 10 Para las Figuras 9 y 10, las calles 1-13 corresponden a las siguientes muestras de vacas: calle 1= muestra 3055; calle 2=muestra 2999; calle 3= muestra 2929; calle 4= 2928; calle 5= 2923; calle 6= 2901; calle 7= 2856; calle 8= 2833; calle 9=2727; calle 10= 2539; calle 11= 2081; calle 12= 1560; calle 13=683. Cada tira se incubó con 400 µl de la muestra de sangre (bien de sangre coagulada para la Figura 1 o bien para sangre entera no coagulada para la Figura 2).
- 15 Aunque los procedimientos y kits de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los procedimientos y kits descritos en el presente documento y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en el presente documento sin desviarse del concepto de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos aspectos que están química y fisiológicamente relacionados se pueden sustituir por los agentes descritos en el presente documento al tiempo que se alcanzan los mismos o similares resultados. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se estiman dentro del alcance y concepto de la invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- 20

REFERENCIAS

- Patente de EE.UU. 3,817,837
- 25 Patente de EE.UU. 3,850,752
- Patente de EE.UU. 3,939,350
- Patente de EE.UU. 3,996,345
- Patente de EE.UU. 4,196,265
- Patente de EE.UU. 4,275,149
- 30 Patente de EE.UU. 4,277,437
- Patente de EE.UU. 4,366,241
- Patente de EE.UU. 4,367,110
- Patente de EE.UU. 4,452,901
- Patente de EE.UU. 4,668,621
- 35 Patente de EE.UU. 4,683,195
- Patente de EE.UU. 4,683,202
- Patente de EE.UU. 4,800,159
- Patente de EE.UU. 4,883,750
- Patente de EE.UU. 5,279,721
- 40 Patente de EE.UU. 5,840,873
- Patente de EE.UU. 5,843,640
- Patente de EE.UU. 5,843,650
- Patente de EE.UU. 5,843,651
- Patente de EE.UU. 5,843,663
- 45 Patente de EE.UU. 5,846,708

- Patente de EE.UU. 5,846,709
- Patente de EE.UU. 5,846,717
- Patente de EE.UU. 5,846,726
- Patente de EE.UU. 5,846,729
- 5 Patente de EE.UU. 5,846,783
- Patente de EE.UU. 5,849,481
- Patente de EE.UU. 5,849,486
- Patente de EE.UU. 5,849,487
- Patente de EE.UU. 5,849,497
- 10 Patente de EE.UU. 5,849,546
- Patente de EE.UU. 5,849,547
- Patente de EE.UU. 5,851,772
- Patente de EE.UU. 5,853,990
- Patente de EE.UU. 5,853,992
- 15 Patente de EE.UU. 5,853,993
- Patente de EE.UU. 5,856,092
- Patente de EE.UU. 5,858,652
- Patente de EE.UU. 5,861,244
- Patente de EE.UU. 5,863,732
- 20 Patente de EE.UU. 5,863,753
- Patente de EE.UU. 5,866,331
- Patente de EE.UU. 5,866,366
- Patente de EE.UU. 5,882,864
- Patente de EE.UU. 5,900,481
- 25 Patente de EE.UU. 5,905,024
- Patente de EE.UU. 5,910,407
- Patente de EE.UU. 5,912,124
- Patente de EE.UU. 5,912,145
- Patente de EE.UU. 5,912,148
- 30 Patente de EE.UU. 5,916,776
- Patente de EE.UU. 5,916,779
- Patente de EE.UU. 5,919,626
- Patente de EE.UU. 5,919,630
- Patente de EE.UU. 5,922,574
- 35 Patente de EE.UU. 5,925,517
- Patente de EE.UU. 5,928,862
- Patente de EE.UU. 5,928,869

- Patente de EE.UU. 5,928,905
Patente de EE.UU. 5,928,906
Patente de EE.UU. 5,929,227
Patente de EE.UU. 5,932,413
5 Patente de EE.UU. 5,932,451
Patente de EE.UU. 5,935,791
Patente de EE.UU. 5,935,825
Patente de EE.UU. 5,939,291
Patente de EE.UU. 5,942,391
10 Patente de EE.UU. 6,656,744
Patente de EE.UU. 6869770
Amoroso, en: Marshall's Physiology of Reproduction, Parkes (Ed.), Little Brown and Co., Boston, 2:127-311, 952, 1952.
Ausubel et al. en: Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 5th Ed., 2002.
15 Ayalon, NJ, J. Reprod. Fert. 54:483-493, 1978.
Beal y col., J. Anim. Sci., 70:924-929, 1992.
Bellus, J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., A31(1): 1355-1376, 1994.
Butler y col., Biol. Reprod., 26:925-933, 1982.
Butler, W.R., J. Dairy Sci. 81:2533-2539, 1998.
20 Cameron and Malmo, Austr. Vet. J., 70:109-111, 1993.
Campbell y col., J. Mol. Biol., 180:1-19, 1984.
Capaldi y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977.
Chandrasekaran et al, Indian Veterinary Journal, 67:87-87, 1990,
Crowther, En: Methods in Molecular Biology, Vol. 42, Humana Press; New Jersey, 1995.
25 Engvall y Perlmann, Immunochem., 8:871-873, 1971.
Engvall, Lancet, 2(8000):1410, 1976.
Engvall, Med Biol., 55(4):193-200, 1977.
Engvall, Methods Enzymol, 70(A):419-39, 1980,
Europea Sol.329 822.
30 Europea Sol.320 308.
Fricke, P.M., J. Dairy Sci., 85(8):1918-1926, 2002.
Frohman, En: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990,
GB App. 2 202 328
Geffer y col., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.
35 Goding, En: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fl, pp 60-61, 71-74, 1986.
Green, Jonathan A. y col., Theriogenology, 63:1481-1503, 2005.

- Gripenberg y col., *Scand J Immunol.*, 7(2):151-7, 1978.
- Haig, *Rev. Biol.*, 68:495-532, 1993.
- Harlow and Lane, In: *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 139-281, 1988.
- Hatzidakis y col., *J. Reprod. Fertil.*, 98:235-240,1993.
- 5 Holdsworth y col., *J. Endocrin.*, 95:7-12, 1982.
- Huang y col., *J. Biol. Chem.*, 254:11405-11417, 1979.
- Humblot y col., *Theriogenol.*, 30:257-268, 1988.
- Innis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 85(24), 9436-9440, 1988.
- Kiracofe y col., *J. Anim. Sci.*, 71:2199-2205, 1993.
- 10 Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kwoh y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173,1989.
- Lu y col., *J. Immunoassay*, 18(2):149-163, 1997.
- Markusfeld y col., *Br. Vet. J.*, 146: 504-508, 1990,
- 15 Mialon y col., *Reprod Nutr. Dev.*, 33:269-282, 1993.
- Mialon y col., *Reprod Nutr. Dev.*, 34:65-72, 1994.
- Nakamura y col., In: *Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.)*, Weir et al. (Eds.), Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1:27,1987.
- Ohara y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.
- 20 Oltenacu y col., *J. Dairy Sci.*, 73:2826-2831, 1990,
- Documento WO 87/06270
- Documento WO 89/09284
- Documento WO 91/09944
- Documento WO 88/10315.
- 25 Documento WO 89/06700,
- Roberts y col., *Biol. Reprod*, 54:294-302, 1996.
- Sambrook y col., En: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed., 1989.
- Sambrook y col., En: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Ed., 2001.
- Santos, JEP y col., *Journal of Dairy Science*, vol. 85 Supplement 1, pp. 265, 2002.
- 30 Samgadharan y col., *Princess Takamatsu Symp.*,15:301-8, 1984.
- Sasser y col., *Biol. Reprod.* 35:936-942, 1986.
- Stanley y col., *Veterinarian Record*, 664-667, 1986.
- Stefanalds y col., *Bull. Hellenic Vet. Med. Soc.*, 45:37-43, 1994.
- 35 Sreenan y Diskin, En: *Embryonic Mortality in FarmAnimals*, Sreenan andDiskin (Eds.), MartinusNijhoff Publishers, 1-11, 1986.
- Vienravi y col., *J. Med. Assoc. Thai.*, 77(3):138-47, 1994.
- Walker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.

Warnick y col., Theriogenol., 44:811-825, 1995.

Wiebold, JL, J. Reprod. Fert. 84:393-399, 1988.

Xie y col., Biol. Reprod, 51:1145-1153, 1994.

Xie y col., Biol. Reprod, 54: 122-129, 1996.

5 Xie y col., Biol. Reprod, 57:1384-1393, 1997a.

Xie y col., Gene, 159:193-197, 1995.

Xie y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 94:12809-12816, 1997b.

Xie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10247-10251, 1991.

Zoli y col., Biol. Reprod., 45:1-10, 1991.

10 Zoli y col., Biol. Reprod., 46:623-629, 1992b.

Zoli y col., Biol. Reprod., 46:83-92, 1992a.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mathialagan, Nagappan

McGrath, Michael F.

15 Schenkel, Robert

<120> Fracción PGA-55-60 enriquecida y procedimientos para la detección precoz de la preñez en animales ungulados

<130> 11916.0066.00PC00

<150> 60/566,282

20 <151> 2004-04-29

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 434

25 <212> DNA

<213> BP112041; EST de ADNc de placenta-útero bovino de ORCS ADNc de Bos taurus

<400> 1

ES 2 390 783 T3

```

ggcacgaggc accagtccag cctgttctac acacgttagg ttcagacatc ttcagtcttc      60
caccttccga cctaccaata agaccttcag gatcacctat ggatctggga gaatgaaagg      120
agttgttgct catgacacag ttcggatcgg ggaccttgta agcaactgacc agccgtttgg      180
tctaagcacg gcagaatagc ggtttaagga tatgcctttt gatgggtgtct tgggcttgaa      240
ctaccccaac atatcctctt ctggagcaat ccccatcttt gacaagctga agaatacaagg      300
tgccatttct gagcctgttt ttgccttcta cttcagcaaa gacaagcggg agggcagtgt      360
ggtgatgttt ggtgggggtgg accaccgcta ctacaagga gagctcaagt ggggtaccatt      420
gatccaagcg ggtg                                                                434

```

<210> 2

<211> 145

<212> PRT

5 <213> Secuencia de aminoácidos predicha

<220>

<221> misc_feature

<222> (145)..(145)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <400> 2

```

Ala Arg Gly Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg Phe Arg His
1          5          10          15
Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg Ile Thr
          20          25          30

```

ES 2 390 783 T3

Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Ala His Asp Thr Val Arg
35 40 45

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser Thr Ala
50 55 60

Glu Tyr Gly Phe Lys Asp Met Pro Phe Asp Gly Val Leu Gly Leu Asn
65 70 75 80

Tyr Pro Asn Ile Ser Ser Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp Lys Leu
85 90 95

Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Phe Ser
100 105 110

Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His
115 120 125

Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Lys Trp Val Pro Leu Ile Gln Ala Gly
130 135 140

Xaa
145

<210> 3

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de las manchas 1 y 2; PAG 6

<400> 3

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys
1 5 10 15

<210> 4

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de las manchas 1 y 2; PAG 6

<400> 4

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys
1 5 10

15 <210> 5

<211> 16

<212> , PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de las manchas 1 y 2; PAG 6

<400> 5

20 Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 6

ES 2 390 783 T3

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 18

<400> 11

Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

5 <210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 4

<400> 12

10 Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 4

15 <400> 13

Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 4

<400> 14

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 15

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG

<400> 15

Ile Ser Ser Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 16

30 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG

<400> 16

Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1

5

10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG

<400> 17

Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Phe Ser Lys
1 5 10 15

<210> 18

<211> 21

10 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG

<400> 18

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

Glu Tyr Gly Phe Lys
20

<210> 19

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 16

<400> 19

Leu Asn Tyr Pro Asn Leu Ser Cys Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp
1 5 10 15

Lys

20 <210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 16

<400> 20

25 Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10

<210> 21

<211> 10

ES 2 390 783 T3

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 16

<400> 21

Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Arg
1 .5 10

5 <210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 16

<400> 22

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 19

15 <400> 23

Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 19

<400> 24

Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 25

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 19

<400> 25

Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10

<210> 26

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 19

<400> 26

ES 2 390 783 T3

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 9

<400> 27

Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 28

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos parcial de la mancha 3; PAG 9

<400> 28

Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de la preñez en un bovino, que comprende:
 - 5 medir el nivel de una glicoproteína asociada con la preñez (PAG) en una muestra obtenida de dicho bovino, en el que dicho nivel de PAG comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG, que están presentes en una fracción de proteína ácida derivable de tejido de placenta desde el día 55 al día 60 de dicho bovino, en el que una elevación en dicho nivel de PAG indica que dicho bovino está preñado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende medir el nivel de progesterona en dicha muestra y en el que un nivel elevado de dicha progesterona indica además que dicho bovino está preñado.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra es saliva, suero, plasma, sangre, leche u
 10 orina.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra es sangre entera.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, que además comprende:
 - (i) dejar que la sangre entera coagule en presencia de un activador de la coagulación;
 - (ii) dejar que el suero salga de la sangre entera coagulada sin centrifugar; y
 - 15 (iii) colocar el suero extruido en comunicación líquida con medios de detección que comprende un reactante que es indicativo de la preñez
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el activador de la coagulación se selecciona del grupo que consiste en trombina, fosfolípidos, caolín, sílice micronizada y calcio.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra se obtiene de dicho bovino cualquier día
 20 desde el día 15 al día 30 tras la inseminación.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el bovino es una vaca.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha medición comprende detección inmunológica.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha detección inmunológica comprende usar antisuero
 25 policlonal, una preparación de anticuerpos policlonales o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos policlonales.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la detección inmunológica comprende usar una preparación de anticuerpos monoclonales.
12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha detección inmunológica comprende ELISA, RIA, tiras de
 30 ensayo basadas en tecnología de flujo lateral o transferencia Western.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho ELISA es un ELISA sándwich que comprende formar un inmunocomplejo entre una de las PAG en dicha muestra y una primera preparación de anticuerpo fijada a un sustrato y unir al inmunocomplejo una segunda preparación de anticuerpo marcada con una enzima.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la enzima es fosfastasa alcalina, peroxidasa de rábano o
 35 acetilcolinesterasa.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 7-14, en el que la muestra es suero y en el que el nivel de PAG en suero es superior a 0,0 ng/ml.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el nivel de PAG es de 1,0 ng/ml a 5 ng/ml.
17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el nivel de PAG es de 2,0 ng/ml a 3,0 ng/ml.
- 40 18. El procedimiento de una cualquiera de reivindicación 1 i 2, en el que dicha medición comprende hibridación de ácido nucleico.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha hibridación de ácido nucleico comprende transferencia Northern o amplificación.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha amplificación comprende RT-PCR.
- 45 21. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que medir los niveles de progesterona comprende detección

inmunológica.

22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 7-17, en el que la muestra es suero y en el que el nivel elevado de progesterona en suero es superior a 2 ng/ml.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el nivel de progesterona es de 3 ng/ml.
- 5 24. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que medir los niveles de progesterona que comprende medir los niveles enzimáticos de la vía de la biosíntesis de la progesterona mediante hibridación de ácido nucleico, detección inmunológica o medición de la actividad enzimática.
25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 7-17, en el que dicha muestra es suero y se obtiene desde los días 20-30 tras la inseminación del animal y los niveles de PAG y progesterona en suero son de al menos 0,5 a 30 ng/ml y de 2 a 5 ng/ml, respectivamente.
- 10 26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el nivel de PAG es de al menos 1,0 ng/ml a 5,0 ng/ml.
27. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el nivel de PAG es de al menos 2,0 ng/ml a 3,0 ng/ml.
28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 7-17, en el que dicha muestra es suero y se obtiene los días 20-30 tras la inseminación del bovino y los niveles de PAG y progesterona en suero son de al menos 0,2 ng/ml.
- 15 29. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que además comprende obtener una muestra de control positivo de un bovino preñado.
30. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que además comprende obtener una muestra de control negativo de un bovino preñado.
- 20 31. El procedimiento de la reivindicación 2, que además comprende medir los niveles de PAG y progesterona de una segunda muestra de dicho bovino en un segundo punto de tiempo.
32. Un procedimiento de tomar una decisión sobre la cría para bovinos con sospecha de estar preñados, que comprende:
- 25 medir el nivel de una glicoproteína asociada a la preñez (PAG) en una muestra obtenida de dicho bovino que se sospecha que está preñado.
- en el que dicho nivel de PAG comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG, que están presentes en una fracción proteica ácida derivable desde el tejido placentario del día 55 al día 60 de dicho bovino;
- en el que:
- 30 (i) un nivel elevado de PAG indica que dicho bovino está preñado, o
- (ii) un nivel no elevado de PAG indica que dicho bovino no está preñado y deberá recibir terapia hormonal de seguimiento para la cría,
33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicha terapia hormonal de la condición (ii) comprende inyectar al bovino la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y, siete días después, inyectar prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF), seguido de la re-inseminación.
- 35 34. El procedimiento de la reivindicación 32, que además comprende:
- (c) medir el nivel de progesterona en dicha muestra, en el que:
- (iii) niveles elevados de PAG y progesterona indican que dicho bovino está preñado;
- (iv) niveles no elevados de PAG indican que dicho bovino no está preñado y deberá recibir terapia hormonal de seguimiento para la cría,
- 40 (v) un nivel elevado de PAG y un nivel no elevado de progesterona indican que dicho bovino no está preñado debido a un embrión no viable y deberá recibir terapia hormonal de seguimiento para la cría,
- (vi) un nivel no elevado de PAG y un nivel elevado de progesterona indican que dicho bovino no está preñado y deberá recibir terapia hormonal de seguimiento para la cría,
- 45 35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que dicha terapia hormonal de la condición (iv) comprende inyectar al bovino la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y, siete días después, inyectar prostaglandina $F_{2\alpha}$

(PGF), seguido de la re-inseminación.

36. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que dicha terapia hormonal de la condición (v) comprende inyectar al bovino GnRH y, siete días después, inyectar PGF, seguido de la re-inseminación.
- 5 37. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que dicha terapia hormonal de la condición (vi) comprende inyectar al bovino PGF, seguido de la re-inseminación.
38. El procedimiento de la reivindicación 35 o 36, en el que dicha terapia hormonal de la condición (iv) o (v) comprende además administrar una segunda inyección de GnRH 48 horas después de la inyección de PGF.
39. El procedimiento de la reivindicación 34, que además comprende inseminar a dicho bovino antes de medir el nivel de PAG.
- 10 40. El procedimiento de la reivindicación 35, 36 o 37, en el que dicha inyección de PGF se administra el día 20 tras la inseminación y en el que la re-inseminación se lleva a cabo el día 28 tras la inseminación.
41. El procedimiento de la reivindicación 35, 36 o 37, en el que dicha inyección de PGF se administra el día 26 tras la inseminación y en el que la re-inseminación se lleva a cabo el día 28 tras la inseminación.
- 15 42. Una fracción proteica ácida aislada purificada de placentas bovinas del día 55 al día 60, que comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG.
43. Un procedimiento de aislar una fracción proteica que comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG, que comprende:
- 20 a) preparar un homogeneizado de la placenta bovina desde el día 55 al 60:
- b) realizar cromatografía de afinidad a un pH ácido con dicho homogeneizado y recoger los eluatos ácidos de la misma; y
- c) someter a los eluatos ácidos a cromatografía de filtración en gel y recoger los filtrados;
- en el que dichos filtrados comprenden dicha fracción proteica.
44. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicha terapia hormonal de la condición (ii) comprende inyectar al bovino PGF, seguido de la re-inseminación.
- 25 45. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende medir el nivel de una mezcla de proteínas PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG en una muestra, en el que una elevación del nivel de dichas proteínas indica que el bovino está preñado.
46. El procedimiento de la reivindicación 45, en el que la muestra es suero, plasma o sangre entera.
- 30 47. El procedimiento de la reivindicación 45 o 46, en el que dicha medición se realiza con un anticuerpo policlonal producido contra una fracción proteica ácida derivada de tejido placentario bovino del día 55 al día 60 y que comprende una mezcla de PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18, PAG-19 y Mon PAG.

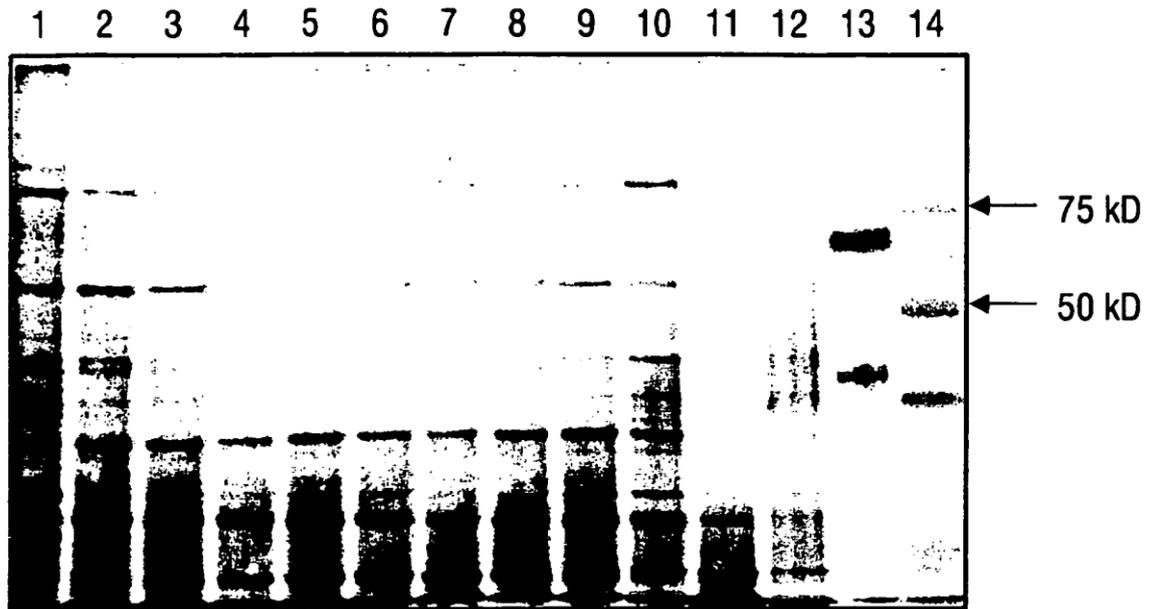


FIG. 1A

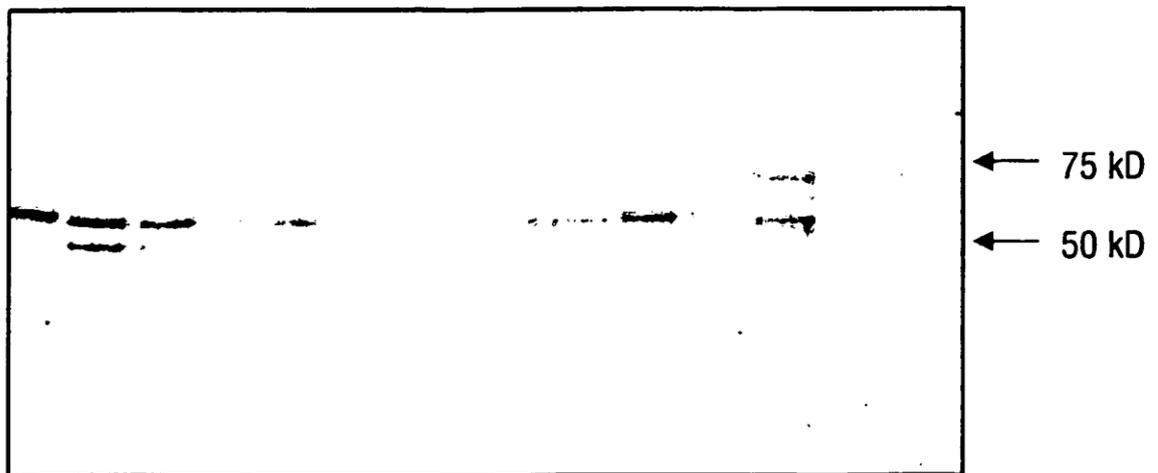
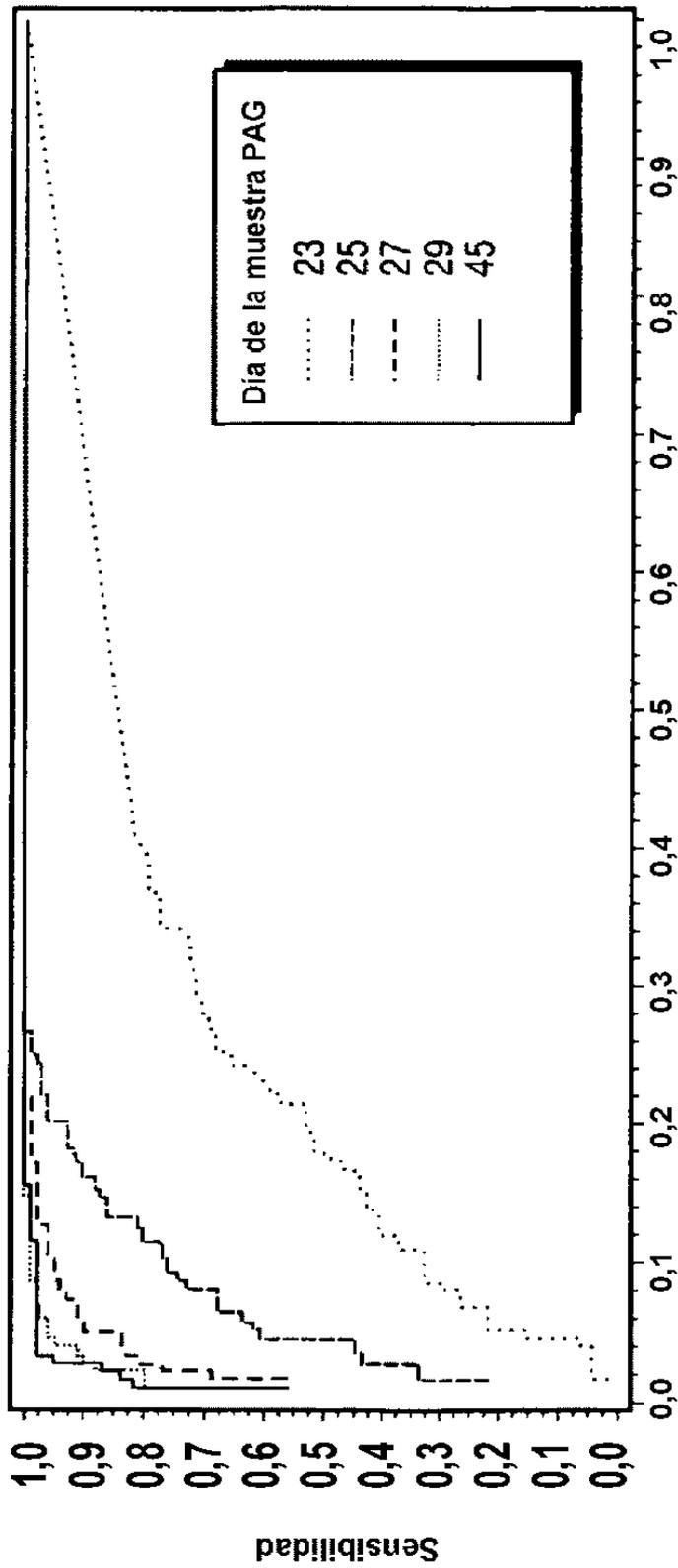


FIG. 1B

Curvas ROC para predecir resultados de palpación a 45 de la preñez



1- Especificidad

FIG. 2A

Curvas ROC de comparación de la sensibilidad y especificidad de muestras a los 26, 27 y 28 días tras la inseminación, de sangre combinada de anti-PAG 6 y 7 bovina de conejo

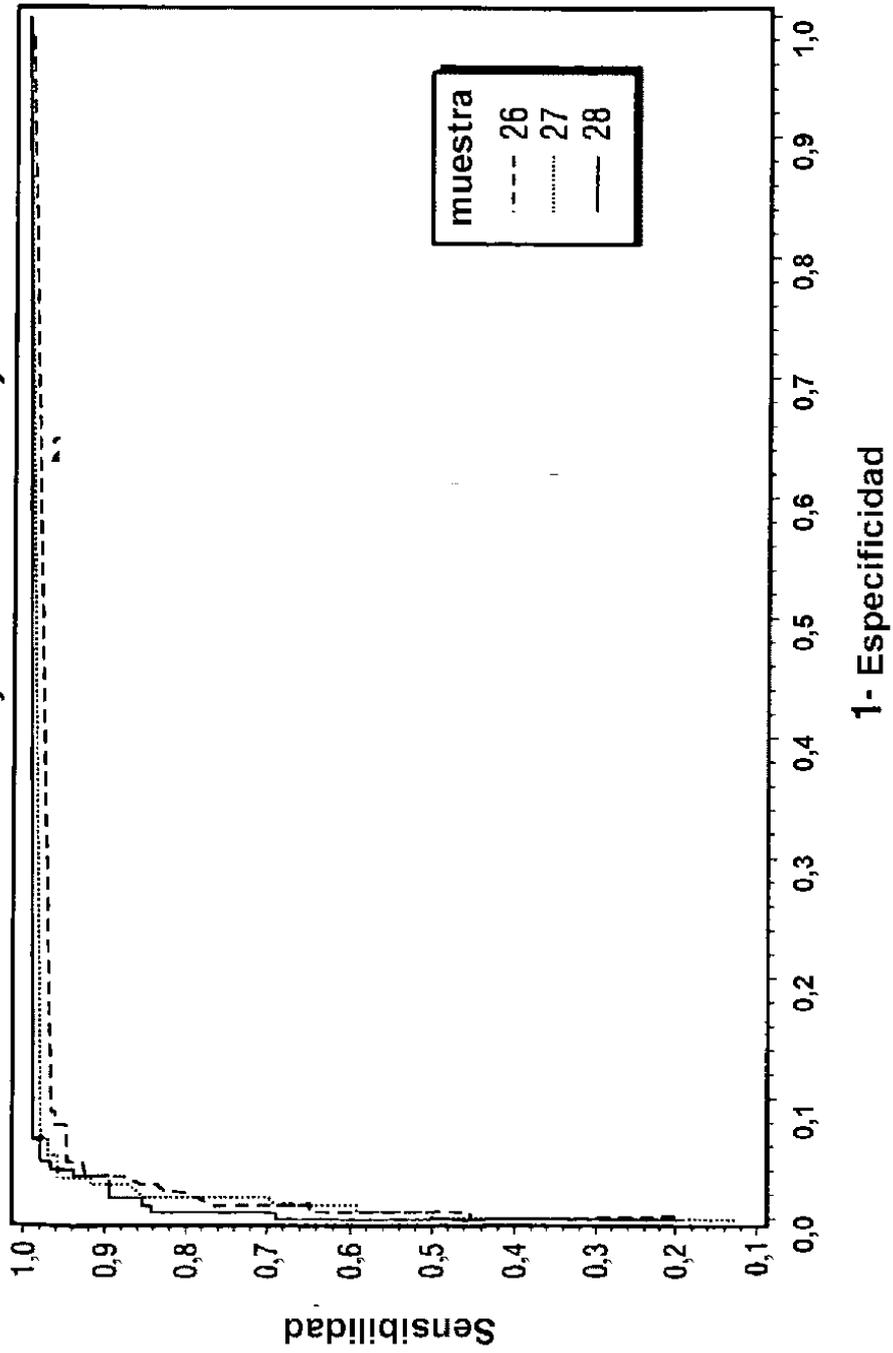


FIG. 2B

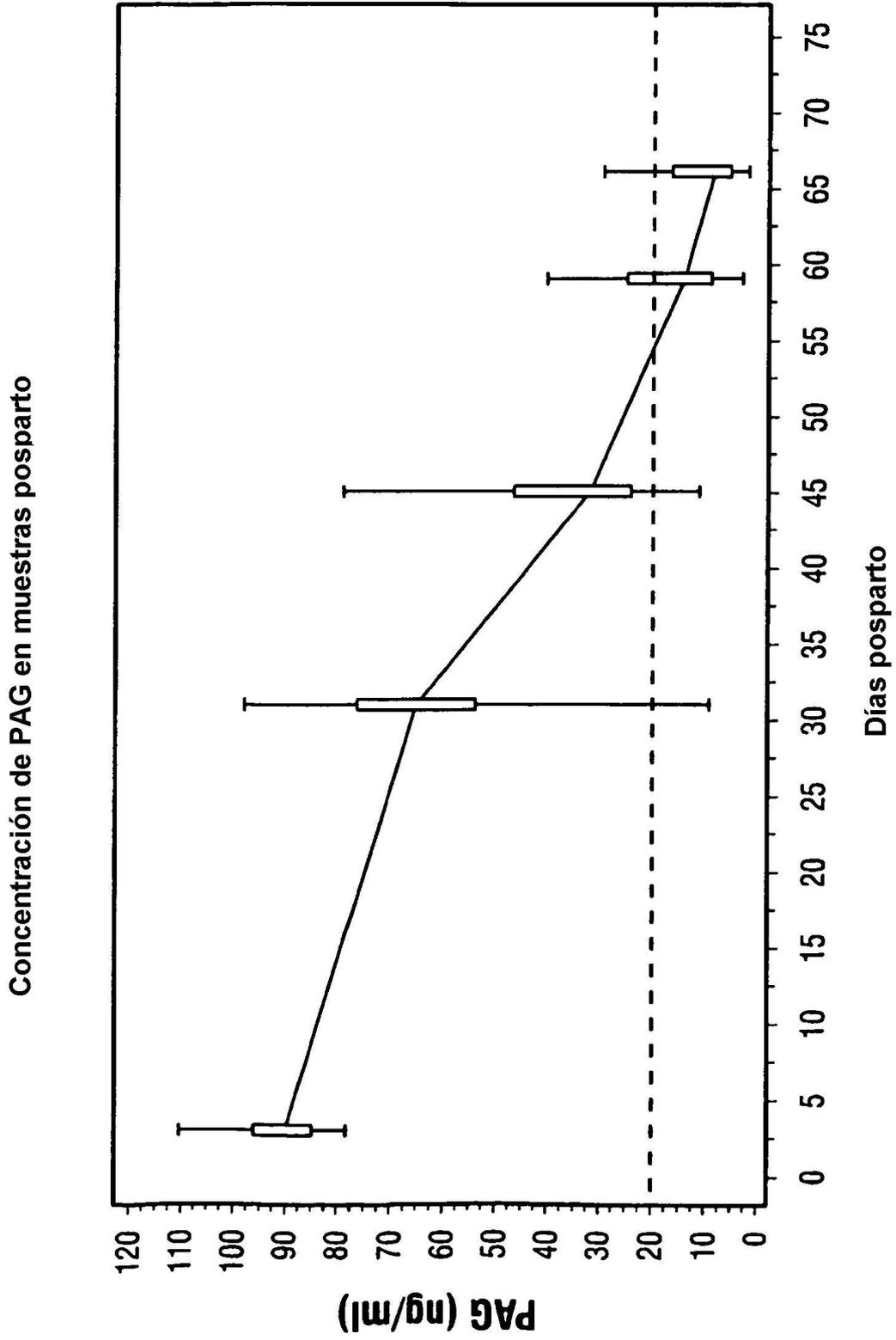


FIG. 3A

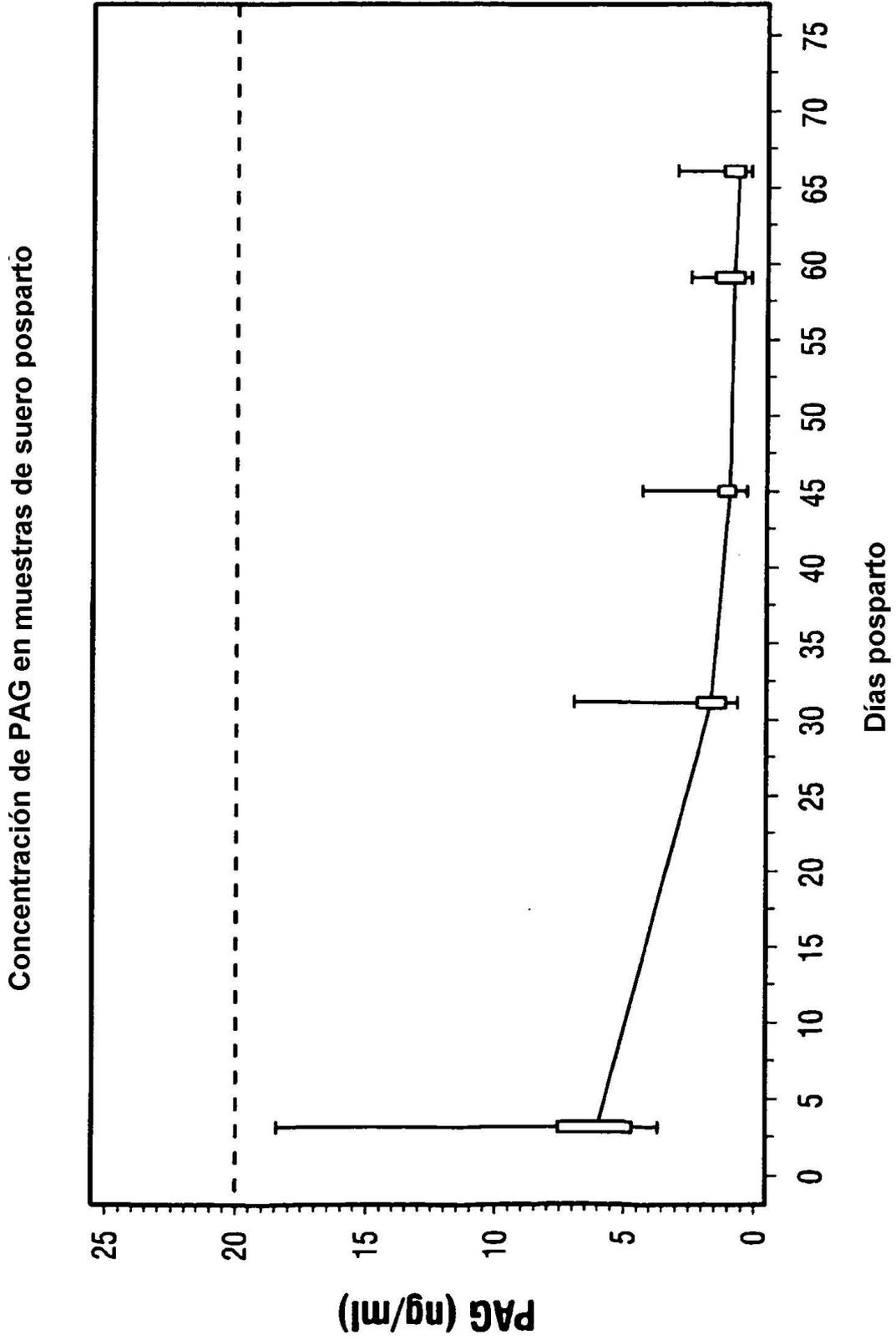


FIG. 3B

Cromatografía de filtración en gel Sephacryl S100

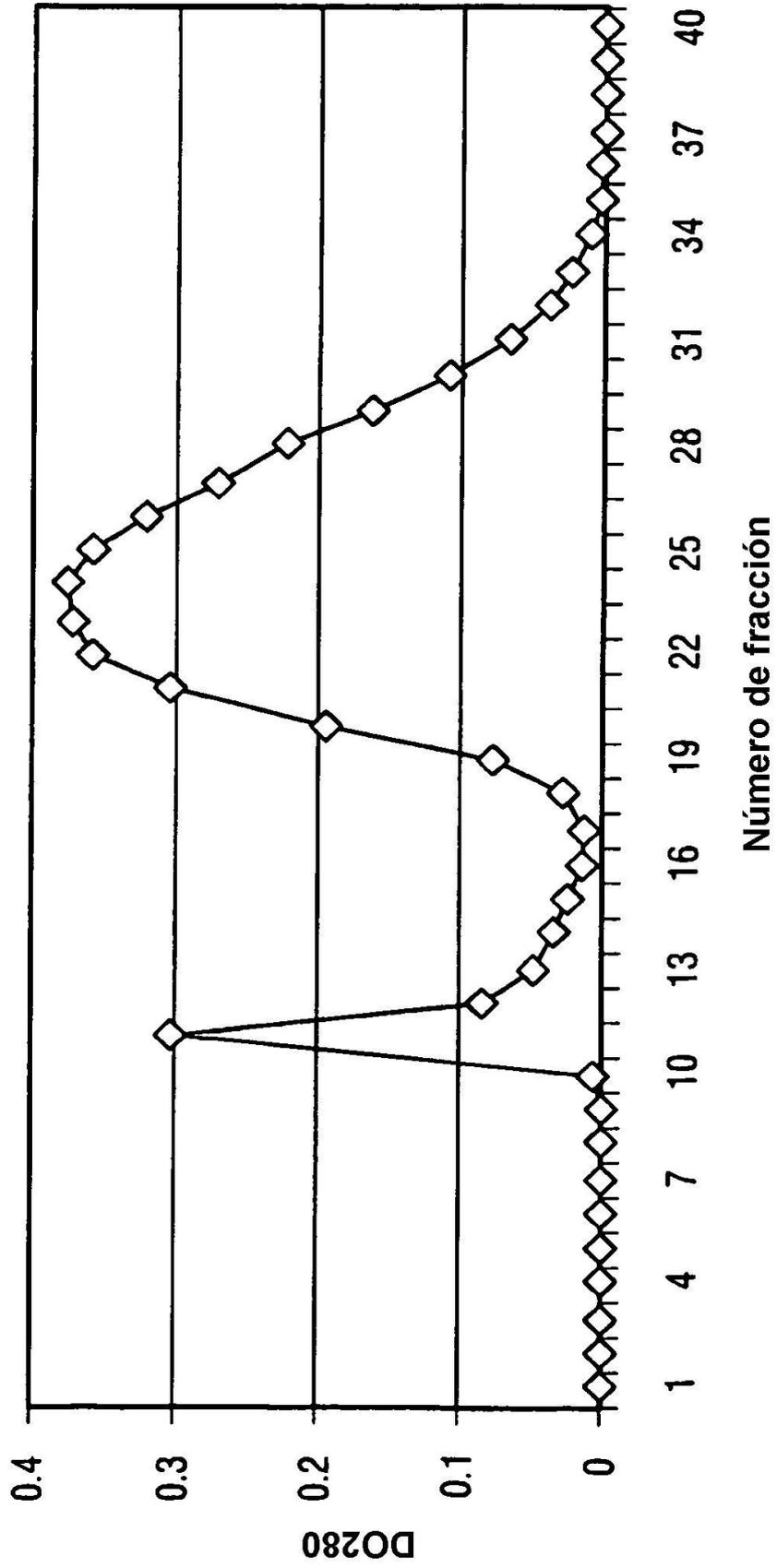


FIG. 4

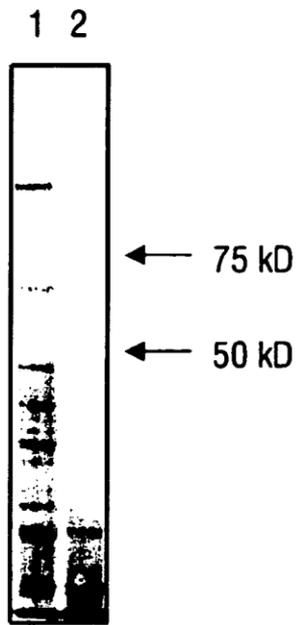


FIG. 5A

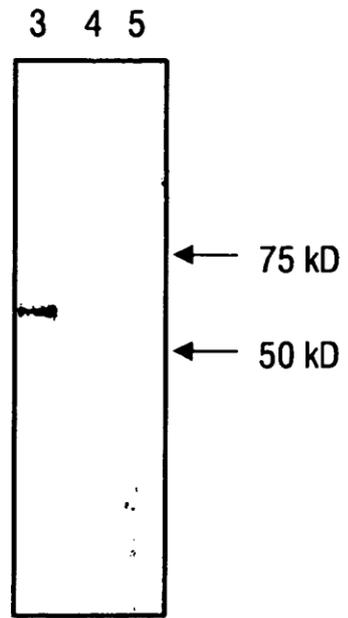


FIG. 5B

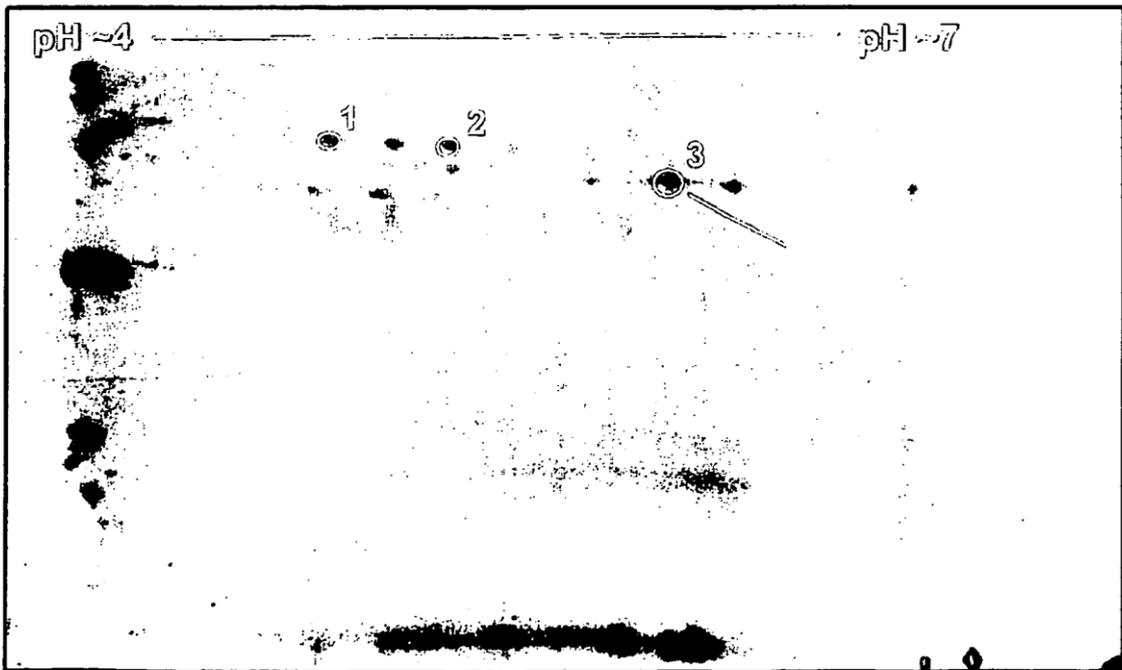


FIG. 6

Bos Taurus (NM176615) glicoproteína asociada con la gestación 4

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(calc)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
544.6	2	1069.52	127	136	83.18%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:12)
494.64	2	969.56	323	331	98.56%	VPGQAYILK (SEQ ID NO:13)
467.08	2	914.43	363	369	97.29%	YFSVFDR (SEQ ID NO:14)

Bos Taurus glicoproteína asociada con la gestación (Mon PAG)\BP112401 (bovineEST)

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(calc)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
617.77	2	1215.65	183	194	99%	ISSSGAIPFDK (SEQ ID NO:15)
695.12	2	1370.64	213	225	85.46%	EGSWMFGGVDHR (SEQ ID NO:16)
902.9173	2	1785.0665	196	211	99%	NQGAISEPVFAFYFSK (SEQ ID NO:17)
1135.79	2	2245.46	147	167	98%	IGDLVSTDQPFGLSTAEYGFK (SEQ ID NO:18)

FIG. 8B

**Bos Taurus (NM176617) glicoproteína asociada con la preñez 6
Manchas 1 y 2**

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(cale)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
853.4334	2	1686.8651	147	162	94,87%	IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID NO:3)
615.2964	2	1210.6022	183	193	95,45%	TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:4)
886.4468	2	1752.8722	196	211	98,95%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:5)
592.9523	3	1757.8154	212	227	89,57%	DKEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:6)
767.3938	3	2281.1953	266	287	90,78%	ALVDTGTSDIVGPSTLVNNWK (SEQ ID NO:7)
467.2134	2	914.4286	362	368	99%	YFSVFDR (SEQ ID NO:8)

53

Mancha 3

Bos Taurus (NM176626) glicoproteína asociada con la preñez 18

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(cale)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
885.67	2	1751.89	197	212	99%	NQGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:9)
707.66	2	1395.74	267	280	99%	AVVDTGTSLEGPR (SEQ ID NO:10)
545.22	2	1070.53	363	370	99%	RYFSVFDR (SEQ ID NO:11)

FIG. 8A

Bos Taurus (AAF05999) Glicoproteína asociada con la preñez 16

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(calc)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
926.5	2	1853.1	178	194	99%	LNYPNLSCSGAIPFDK (SEQ ID NO:19)
695.12	2	1370.64	216	228	86,00%	EGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:20)
598.2	2	1196.41	232	241	89%	GELNWWPLIR (SEQ ID NO:21)
467.08	2	914.43	363	369	97,29%	YFSVFDR (SEQ ID NO:22)

Bos Taurus (AAF06002) Glicoproteína asociada con la preñez 19

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(calc)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
544.6	2	1069.52	127	136	83,18%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:23)
885.67	2	1751.89	197	212	99%	NQGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:24)
695.12	2	1370.64	216	228	86,00%	EGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:25)
467.08	2	914.43	363	369	97,29%	YFSVFDR (SEQ ID NO:26)

Bos Taurus (NM_176620) Glicoproteína asociada con la preñez 9

<u>Mz</u>	<u>Carga</u>	<u>Mr(calc)</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fin</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Secuencia peptídica</u>
685.67	2	1751.89	197	212	99%	NQGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:27)
545.22	2	1070.53	361	368	99%	RYFSVFDR (SEQ ID NO:28)

FIG. 8C

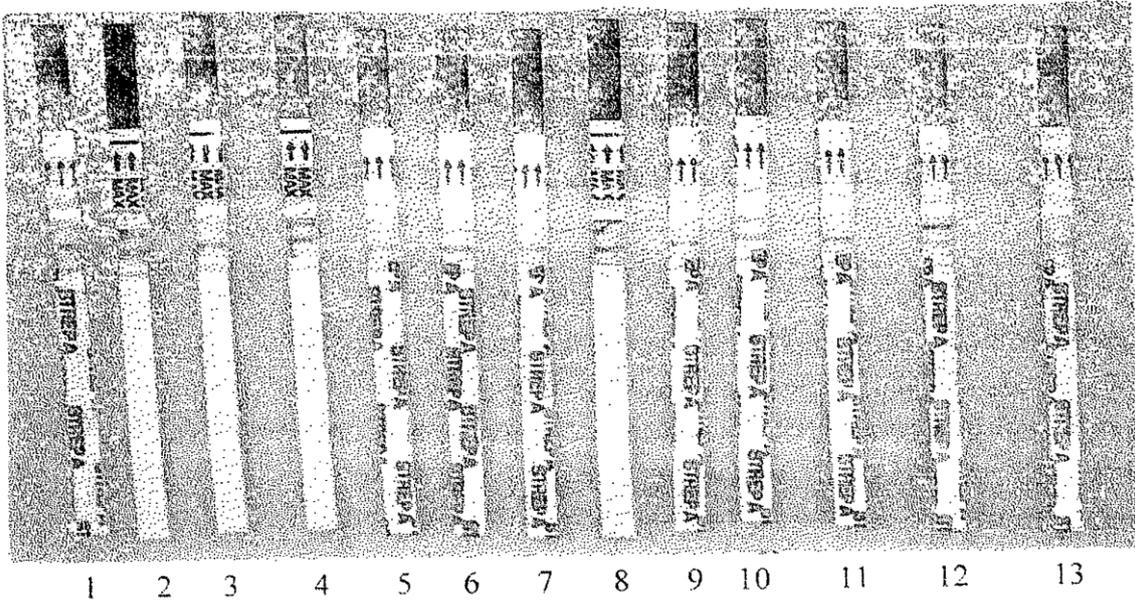


FIG. 9

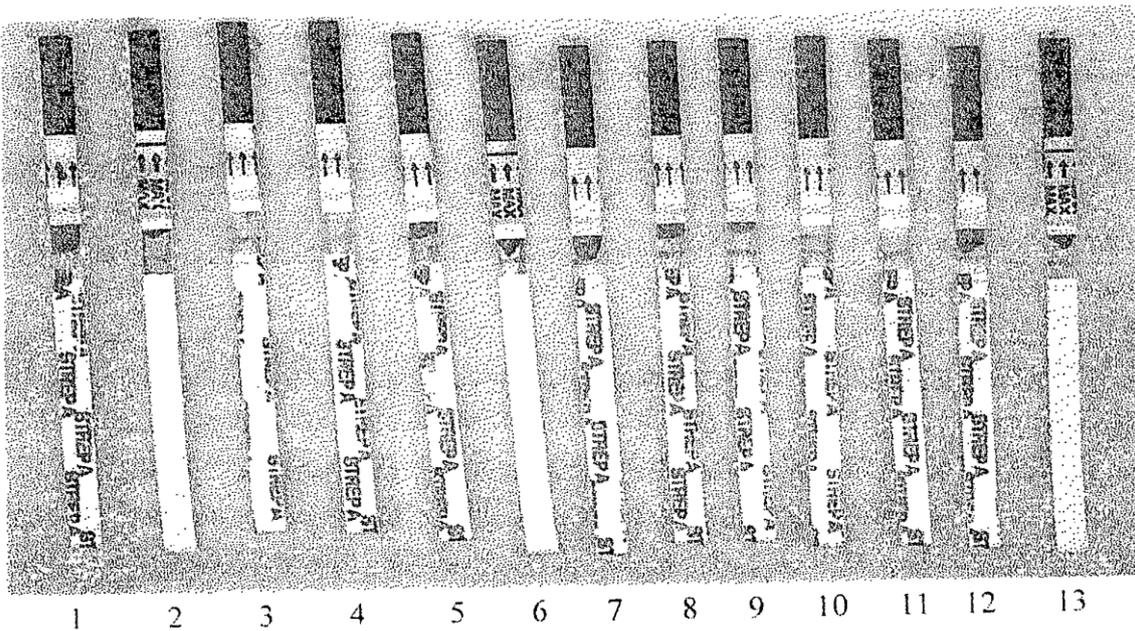


FIG. 10