

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 459**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2008 PCT/US2008/086674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009 WO09076632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08860515 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2225274**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el diagnóstico prematuro de la preñez**

30 Prioridad:

**13.12.2007 US 13603 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2017**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (50.0%)  
800 North Lindbergh Boulevard  
St. Louis, MO 63167, US y  
THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF  
MISSOURI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MATHIALAGAN, NAGAPPAN;  
ROBERTS, R., MICHAEL;  
MCGRATH, MICHAEL, F. y  
GREEN, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 623 459 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el diagnóstico prematuro de la preñez

### Antecedente de la invención

#### I. campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en líneas generales, los campos de medicina veterinaria, biología reproductora y diagnóstico. Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para detectar la preñez en fase prematura en un animal bovino.

#### II. Técnica relacionada

- 10 El diagnóstico de la preñez permite una gestión reproductiva juiciosa en la industria láctea y de la carne. En general, la inseminación artificial es satisfactoria menos del 50 % de las veces y el productor debe depender de signos evidentes de retorno al celo (que se omite fácilmente) o el retardo en volver a cruzarse hasta que se confirma un fallo de la preñez por uno de los procedimientos descritos anteriormente. Dichos retardos son extremadamente costosos y constituyen una pérdida económica principal a la industria.

- 15 Una prueba de preñez precisa para ganado bovino que puede realizarse de forma prematura y que tiene bajos falsos positivos se ha buscado desde hace tiempo. Están disponibles varias pruebas de preñez, incluyendo un ensayo de progesterona en la leche (Oltenucu y col., 1990; Markusfeld y col., 1990), análisis de sulfato de estrona (Holdsworth y col., 1982; Warnick y col., 1995), palpación rectal (Hatzidakis y col., 1993), ultrasonidos (Beal y col., 1992; Cameron y Malmo, 1993) y ensayos en sangre para antígenos específicos de preñez.

- 20 Cada uno de estos procedimientos ha quedado corto de expectativas en términos de su uso práctico en granjas. Por ejemplo, las mediciones de progesterona en leche o suero alrededor del día 18-22 producen tasas altamente inaceptables de falsos positivos (Oltenucu y col., 1990; Markusfeld y col., 1990). La palpación rectal puede usarse para detectar la preñez tan pronto como en el día 35, pero este procedimiento conduce a un 5-10 % o mayor de mortalidad embrionaria (Oltenucu y col., 1990; Hatzidakis y col., 1993). La palpación rectal en el día 50 causa menos daño a los embriones, pero tiene un valor económico solamente marginal a causa de su demora (Oltenucu y col., 25 1990). La ultrasonografía tiene una ventaja sobre la palpación rectal en la precisión, particularmente antes del día 45 (Beal y col., 1992; Cameron y Malmo, 1993), pero el instrumento es caro, su uso requiere formación considerable y existe un riesgo limitado para el animal. Un procedimiento relacionado, la sonografía de Doppler, es más preciso que la palpación rectal (Cameron y Malmo, 1993), pero de nuevo requiere personal bien formado. La presencia de sulfato de estrona en orina o suero proporciona otro ensayo, pero es solamente útil después del día 100 cuando suben las concentraciones (Holdsworth y col., 1982; Warnick y col., 1995).

- El descubrimiento de la proteína B específica de preñez (PSP-B) (Butler y col., 1982) proporcionó un nuevo enfoque para el diagnóstico de la preñez ya que podía detectarse en la sangre de vacas preñadas en la cuarta semana de preñez (Sasser y col., 1986; Humblot y col., 1988). Otros han desarrollado inmunoensayos que pueden basarse en un antígeno idéntico o inmunológicamente similar (Zoli y col., 1992a; Mialon y col., 1993; Mialon y col., 1994). En un caso, el antígeno (Mr ~67 kDa) se llamó glucoproteína asociada a preñez bovina (boPAG; ahora boPAG-1) (Zoli y col., 1992a); en el segundo, se denominó como proteína sérica 60 de preñez (PSP60) (Mialon y col., 1993; Mialon y col., 1994). Los inmunoensayos para PSP-B/boPAG1/PSP60 tienen ciertas desventajas. En primer lugar, el diagnóstico positivo en la cuarta semana de preñez sigue siendo algo incierto porque las concentraciones de antígeno en la sangre son bajas y algo variables. En segundo lugar, las concentraciones de boPAG1 suben notablemente a término (Sasser y col., 1986; Zoli y col., 1992a; Mialon y col., 1993) y, debido a la larga semivida en circulación de la molécula (Kiracofe y col., 1993), el antígeno aún puede detectarse 80-100 después del parto (Zoli y col., 1992a; Mialon y col., 1993; Mialon y col., 1994; Kiracofe y col., 1993), comprometiendo el diagnóstico de la preñez en vacas cruzadas en el periodo posparto prematuro. Por tanto, el ensayo puede realizarse en vacas lecheras en el día 30 solamente si se realiza inseminación artificial ("AI") en o después de 70 días posparto.

- 45 Las glucoproteínas asociadas a preñez (PAG) están estructuralmente relacionadas con las pepsinas. Se cree que están restringidas a los mamíferos con pezuñas (ungulados) y se caracterizan por expresarse específicamente en la capa celular epitelial exterior (corion/trofoblasto) de la placenta (Green y col., 2000; Hughes y col., 2003; Xie y col., 1997). Al menos algunas PAG son catalíticamente inactivas como proteinasas, aunque cada una parece poseer una hendidura capaz de unirse a péptidos (Guruprasad y col., 1996). Se estima que el ganado bovino, las ovejas y muy probablemente todos los rumiantes *Artiodactyla* poseen docenas de genes PAG. Las PAG son altamente diversas en secuencia, con regiones de hipervariabilidad confinadas en gran medida a los bucles expuestos a superficie.

- Las glucoproteínas asociadas a preñez bovina (boPAGs/PSPB/PSP60) se descubrieron en intentos por desarrollar pruebas de preñez para el ganado (Butler y col., 1982; Sasser y col., 1986; Zoli y col., 1991; Zoli y col., 1992a). En cada intento, se inyectó a conejos extractos de cotiledones placentarios, y se retiraron los anticuerpos no dirigidos contra los antígenos placentarios por adsorción con los extractos tisulares de animales no preñados. Los antisueros resultantes proporcionaron la base de una prueba de preñez precisa para ganado bovino y ovejas tan pronto como

un mes después de la inseminación.

Incluso en los estudios iniciales (Butler y col., 1982; Zoli y col., 1991; Xie y col., 1991; Xie y col., 1994; Xie y col., 1996), no estaba claro que las boPAG fueran heterogéneas en su peso molecular y carga, y como se han purificado más isoformas ha quedado evidente que difieren en sus secuencias aminoterminales (Atkinson y col., 1993; Xie y col., 1997a). El cribado adicional de bibliotecas ha revelado transcritos adicionales en ruminantes (Xie y col., 1994; Xie y col., 1995; Xie y col., 1997b) y la existencia de PAG en especies no ruminantes tales como los cerdos (Szafranska y col., 1995). Las proteínas de tipo PAG (también conocidas como "pepsinógeno F" o "pepsina F") se han descrito en caballos y gatos (Green y col., 1999; Guruprasad y col., 1996). Entre las PAG bovinas que se han descrito están boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v; boPAG9v; boPAG15; boPAG16; boPAG17; boPAG18; boPAG19; boPAG20 y boPAG21 (patente de Estados Unidos 6.869.770). La información respecto a los procedimientos para diagnosticar la preñez en fase prematura ensayando dichas PAG puede encontrarse, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.869.770 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20050100975.

Se han descrito procedimientos para detectar la preñez en animales bovinos basándose en el uso de los anticuerpos que reconocen una pluralidad PAG (Green y col., 2005).

La mayoría de los ensayos disponibles para detectar la preñez en ganado bovino son menos precisos antes del día 30 después de la reproducción. Además, para muchos de los ensayos existentes, se requiere personal cualificado. Por tanto, existe la necesidad de un ensayo preciso y sensible de preñez en ganado vacuno que pueda realizarse rápida y fácilmente antes del día 30 después de la reproducción.

## **Sumario de la invención**

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un ensayo sensible y preciso para la preñez en fase prematura. La presente invención proporciona una prueba de preñez en fase prematura para animales bovinos en que un polipéptido específico que incluye un dominio que es altamente específico para una PAG puede detectarse con un alto grado de sensibilidad y especificidad antes del final de la cuarta semana de preñez. La capacidad de diagnosticar la preñez en dicha fase prematura es particularmente útil en la industria láctea en la que los animales están habitualmente confinados durante al menos parte del día y en la que es práctica una gestión intensiva. En particular, la invención proporciona un procedimiento para detectar la preñez en un animal bovino, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra obtenida de un animal bovino con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende

- un anticuerpo 2D9 o fragmento o variante del mismo, o
- un anticuerpo que se une específicamente a los antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG 17, PAG 19, PAG20 y PAG21, en el que el dominio de cadena ligera se selecciona de: una secuencia polipeptídica con al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 1, y el dominio de cadena pesada se selecciona de: una secuencia polipeptídica con al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2; y

(b) detectar el contacto del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con al menos un antígeno asociado a preñez (PAG) en la muestra, en el que la detección del PAG indica que el animal está preñado.

Se depositó una línea celular de hibridoma que produce 2D9 en el depósito de patentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, Va., 20110-2209 el 2 de agosto de 2007 y se le asignó el depósito de patente n.º PTA-8566 (referencia de identificación MON-PAG-2D9). El depósito se mantuvo según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Propósitos de Procedimiento de Patente. Este depósito se hizo simplemente como conveniencia para los expertos en la materia y no es una admisión de que el depósito sea necesario según 35 U.S.C. § 112.

En ciertas realizaciones, el dominio de cadena ligera tiene un 98 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, incluyendo el 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En realizaciones adicionales, el dominio de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio de cadena pesada tiene al menos un 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, incluyendo al menos un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones específicas, el dominio de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 2. En realizaciones adicionales, la cadena pesada tiene más del 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En realizaciones más particulares, la cadena pesada tiene más del 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 2.

En algunas otras realizaciones particulares, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 3 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 4. En particular, la invención se refiere a procedimientos para detectar la preñez en un animal bovino que comprende: (a) poner en contacto una muestra obtenida de un animal bovino con el anticuerpo monoclonal 2D9, y (b) detectar el contacto del anticuerpo con uno o más de

boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 o boPAG21 en la muestra, en los que la detección de los PAG indica que el animal está preñado. El procedimiento para detectar la preñez, por ejemplo, puede realizarse en el día 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más después de la inseminación artificial.

- 5 Una muestra puede ser cualquier muestra conocida o sospechosa de contener un PAG. En realizaciones específicas, la muestra es saliva, suero plasma, sangre, leche, u orina. Cualquier cantidad eficaz de muestra puede obtenerse del animal. Por ejemplo, la cantidad puede ser 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 60 µl, 70 µl, 80 µl, 90 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 350 µl, 400 µl, 450 µl, 500 µl, 550 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, 1 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml, 3,5 ml, 4,0 ml, 4,5 ml, 5,0 ml, o más.
- 10 Se contempla cualquier procedimiento de detección del contacto del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con un PAG que sea conocido para los expertos en la materia por los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender ELISA o transferencia de Western. En realizaciones particulares, el PAG a detectarse es boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v, boPAG9v, boPAG15, boPAG16, boPAG17, boPAG18, boPAG19, boPAG20, o boPAG21. En realizaciones específicas, el PAG es boPAG6. En algunas realizaciones de los presentes procedimientos, se detecta más de un PAG en cada muestra. Cuando se aplica a especies diferentes de ganado bovino, es posible la detección de otros PAG producidos en el momento en que comienza el trofoblasto (preplacenta) a fijarse o a implantarse en la pared uterina de la madre. Los PAG "prematuros" en estas especies pueden reaccionar de forma cruzada inmunológicamente con los PAG útiles en la detección de preñez prematura en ganado bovino.
- 20 En realizaciones particulares, el ELISA es un ELISA de tipo sándwich que comprende unir un PAG al anticuerpo o fragmento de anticuerpo fijado a un sustrato y una segunda preparación de anticuerpos marcada con una enzima. Por ejemplo, el sustrato, al que se fija el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un tubo, una pared, un vial, una tira, una varilla graduada o un biodetector. La enzima, por ejemplo, puede ser fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rusticano o cualquier marca enzimática.
- 25 La presente invención también se refiere a un polipéptido aislado que comprende un anticuerpo que se une específicamente a antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG 17, PAG 19, PAG20 y PAG21, en el que el dominio de cadena ligera se selecciona de: una secuencia polipeptídica con al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica que comprenden la SEQ ID NO: 1, y el dominio de cadena pesada se selecciona de: una secuencia polipeptídica con al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2.
- 30 En realizaciones particulares, el dominio comprende más del 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En realizaciones más particulares, el dominio comprende la SEQ ID NO: 1. Puede haber uno o más restos de aminoácido adicionales unidos al extremo N-terminal o el extremo C-terminal del dominio. En una realización particular, el polipéptido es la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio comprende más del 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En más realizaciones particulares, el dominio comprende más del 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En una realización particular adicional, el polipéptido es la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 3. En realizaciones adicionales, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 4. La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado y purificado que codifica un anticuerpo que se une específicamente a los antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21, en el que el dominio de cadena ligera se selecciona de: una secuencia polipeptídica con al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 1, y el dominio de cadena pesada se selecciona de una secuencia polipeptídica con al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene más del 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En realizaciones particulares, el polinucleótido codifica la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la cadena pesada codificada por el polinucleótido es la SEQ ID NO: 3 y/o la cadena pesada codificada por el polinucleótido es la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones particulares, el polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5 y/o la SEQ ID NO: 6. La presente invención también se refiere, en líneas generales a una célula de hibridoma que secreta el anticuerpo monoclonal 2D9.
- 40
- 45
- 50 La presente invención también se refiere a kits para detectar la presencia de un PAG en un animal bovino, en la que el kit incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a los antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21, y comprende una cadena ligera y una cadena pesada como se describe anteriormente. En una realización el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está fijado a un soporte. Por ejemplo, el soporte puede ser una placa de poliestireno, tubo de ensayo, una tira, una varilla graduada o un biodetector.
- 55 En algunas realizaciones, el kit incluye adicionalmente un marcador detectable. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser una marca fluorescente unida al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En otras realizaciones, el marcador detectable es una marca quimioluminiscente. En realizaciones adicionales, el marcador detectable es una enzima, tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rusticano. El kit puede incluir adicionalmente un sustrato para la enzima. En realizaciones adicionales, el kit incluye un tampón o diluyente. El kit también puede incluir
- 60

opcionalmente pipetas desechables. Otros componentes del kit, incluyendo depósitos de reactivo e instrucciones son bien conocidos para los expertos en la materia y también se contemplan para su uso en los kits descritos en el presente documento.

- 5 La presente invención también se refiere en líneas generales, a procedimiento para detectar la preñez en un animal bovino, que comprende: (a) poner en contacto una muestra obtenida del animal bovino con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo proporcionado por la invención; (b) detectar un PAG en la muestra poniéndola en contacto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que la detección de uno o más de boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 o boPAG21, incluyendo todas las posibles combinaciones de los mismos, indica que el animal está preñado.
- 10 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

### **Breve descripción de los dibujos**

15 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

**FIG. 1.** Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de 2D9 (SEQ ID NO: 5). El codón de inicio de la forma procesada (aminoácido N-terminal) y el codón de parada se indican en negrita.

20 **FIG. 2.** Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de 2D9 (SEQ ID NO: 6) el codón de inicio de la forma procesada (aminoácido N-terminal) y el codón de parada se indican en negrita.

**FIG. 3A, 3B.** FIG. 3A - Secuencias peptídicas de boPAG6 (panel superior) y secuencias peptídicas (panel inferior) identificadas en análisis CL-EM-EM (SEQ ID NO: 7-18) que demostraron que las PAG eluidas de perlas magnéticas recubiertas con 2D9 después de inmunoprecipitación de preparación enriquecida con PAG corresponden principalmente a boPAG6. Para identificar todos los componentes de unión a 2D9, se realizó una purificación por cromatografía de inmunoafinidad de la preparación enriquecida con PAG. El material purificado por columna de inmunoafinidad se sometió a análisis CL-EM-EM. Este análisis reveló que boPAG6 es la PAG de unión a 2D9 principal y boPAG-4, boPAG-9, boPAG-20 y boPAG21 son PAG de unión a 2D9 minoritarias. FIG. 3B - Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) y análisis de transferencia de Western de PAG purificadas de cromatografía de inmunoafinidad por 2D9 de extracto tisular preparado a partir de placenta bovina del día 55. Tanto el gel teñido con Coomassie como el análisis de transferencia de Western con anticuerpos policlonales contra PAG mostraron tres bandas de proteína a 67 kDa, 55 kDa y 50 kDa como PAG de unión a 2D9. "Mz" = relación de masa a carga; masa del péptido a la carga del péptido ionizado, menos el agua; "Carga" = estado de carga iónica; "Mr(calc)" = peso molecular calculado del péptido; "Inicio" = aminoácido de inicio de la proteína con que se alinea el péptido; "Final" = aminoácido de parada de la proteína con que se alinea el péptido; "Valor" = medida de la confianza de la secuencia peptídica.

35 **FIG. 4.** SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra PAG de unión a 2D9 purificadas por cromatografía de inmunoafinidad de extractos de tejido de carúncula (endometrio) y cotiledón (placenta). Las bandas de proteínas 1 a 7 se cortaron y sometieron a digestión con tripsina, seguido por análisis de CL-EM-EM (SEQ ID NO: 7-18).

40 **FIG. 5.** Transformación log-logit de la curva patrón de ELIA de PAG desarrollada con placas ELISA recubiertas con anticuerpo 2D9 y PAG purificados por inmunoafinidad como patrones. El ensayo mostró una respuesta lineal desde 0,5 ng/ml hasta 50 ng/ml.

45 **FIG. 6.** Las tablas expuestas muestran la precisión del diagnóstico de preñez en el día 28 usando un ELISA basado en laboratorio en comparación con el diagnóstico de preñez en ultrasonidos en el día 28 en dos sitios de estudio, Wisconsin y California. La rentabilidad de una prueba de preñez en el día 28 en la gestión de la reproducción de vacas lecheras se examinó en este estudio beta. Se usó un ELISA de PAG basado en laboratorio con anticuerpos policlonales para el diagnóstico de la preñez. El sitio de Wisconsin usó reproducción estrictamente sincronizada mientras que el sitio de California usó reproducción sincronizada más reproducción estral. Se usaron aproximadamente 1.000 vacas en el estudio por sitio. Se recogieron muestras de sangre en el día 28, se transportaron al laboratorio para la prueba de preñez. Los resultados se devolvieron a las granjas en 24 h para posibilitar las decisiones de reproducción. El estado de preñez también se determinó por ultrasonidos en el momento de la recogida de sangre en el día 28.

50 **FIG. 7.** Resultados de análisis de parámetros de reproducción en el ensayo del sitio de Wisconsin. Este sitio usó un programa de reproducción estrictamente sincronizado con una prueba de preñez en el día 28 (grupo de resincronización prematura) o con palpación en el día 45 (grupo de control de resincronización tardía). Los resultados muestran una reducción significativa en los días entre la inseminación y los días receptivos en el grupo de resincronización prematura (prueba de preñez en el día 28) en comparación con el grupo de resincronización tardía (grupo de control).

60 **FIG. 8.** Resultados del análisis de los parámetros de reproducción en el ensayo del sitio de California. Este sitio usó reproducción sincronizada más reproducción estral con (grupo de resincronización prematura) y sin (grupo de resincronización tardía) prueba de preñez en el día 28. Los resultados muestran una reducción significativa en los días entre la inseminación, el número de inseminaciones y los días receptivos en comparación al grupo de

resincronización tardía.

**FIG. 9.** Base de ensayo de color. Resultados de inmunoensayo de PAG desarrollado con anticuerpo monoclonal 2D9 como anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal de conejo marcado con biotina como anticuerpo secundario. Las muestras del panel de ensayo de plasma (20 no preñadas y 20 preñadas) recogidas en el día 28 y el día 55 de preñez mostraron una separación completa de vacas no preñadas (azul) en comparación con vacas preñadas (rosa). El valor de PAG cerca de cero obtenido para vacas no preñadas sugirió que puede no ser necesario un patrón de PAG para la detección cualitativa de PAG inmunorreactiva en el plasma de ensayo.

**FIG. 10.** Resultados del diagnóstico de preñez bovino realizado con muestras de sangre completa en el ensayo de color. Los resultados se leen visualmente. Los tubos que muestran solución de reacción de color azul (tubos 1, 3, 6, 9, 10, 14 y 15) son un resultado positivo para el estado de preñez y los tubos que muestran un fondo transparente (tubos 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 y 16) son negativos (no preñadas) para el estado de preñez. Para la lectura en un espectrofotómetro, puede añadirse un volumen igual (0,4 ml) de solución de parada (HCl 1 N) a cada tubo. La adición de solución de parada cambiará el color a amarillo. Después, pueden medirse las densidades ópticas (DO) de cada muestra en un espectrofotómetro a 630 nm.

**FIG. 11A, 11B.** Resultados del ensayo de color realizado con tubos de plástico recubiertos con 2D9. FIG. 11A - Panel de plasma del día 28. FIG. 11B - Panel de plasma del día 55. Todas las muestras de vacas no preñadas en los paneles de ensayo del día 28 y el día 55 produjeron una intensidad de color de 0,2 DO o menos mientras que las muestras de plasma de las preñadas produjeron una intensidad de color tan alta como de 1,0 unidad DO. En este ensayo, las muestras de plasma del día 28 mostraron una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % cuando la intensidad del color de 0,2 DO se establecía como punto de corte. En el mismo punto de corte de intensidad de color, las muestras de plasma del día 55 mostraron una sensibilidad del 95 % y una especificidad del 100 % en el ensayo de tubos de plástico.

**FIG. 12.** Comparación de la prueba de preñez de muestras frescas de plasma con ELISA de tipo sándwich de PAG realizado con anticuerpos policlonales (poli:poli, panel superior) y anticuerpo monoclonal 2D9 y anticuerpo policlonal (mono:poli, panel inferior). Obsérvese una clara separación de las muestras de vacas no preñadas fácilmente distinguidas usando una intensidad de color de punto de corte de 0,2 DO. Todas las muestras de vacas preñadas tenían una intensidad de color >0,2 unidades DO. El ensayo mono:poli tuvo una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % en este experimento.

**FIG. 13.** Ensayo de campo del ensayo de color con muestras de sangre. Se ensayaron 54 muestras de sangre recogidas de los días 33-34 después de la reproducción y el color se leyó visualmente por 3 personas. No hubo desacuerdos observados en la valoración visual de los resultados entre los tres individuos-

**FIG. 14.** Resultados del ensayo de campo del ensayo de color en comparación con los resultados de ultrasonidos de 54 muestras. El ensayo identificó todas las vacas preñadas (sensibilidad del 100 %) con un resultado falso positivo en comparación con los resultados de ultrasonidos. Hubo dos muestras con resultados no concluyentes en el ensayo de color que posteriormente se encontraron que eran vacas "no preñadas". Sin embargo, el ensayo de color identificó 37 de 40 vacas no preñadas (especificidad del 92,5 %) en comparación con los ultrasonidos.

**FIG. 15.** Grupos de la secuencia proteica de la isoforma de PAG generados por el paquete de análisis Neighbor Phylogenetic Tree de PROTDIST (v. 3.5c), en BioEdit (v. 7.0.5.3; [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html); Hall, 1999).

**FIG. 16.** Alineación directa de las isoformas de PAG 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21. Las secuencias proteicas para las isoformas de PAG y las variantes se dan en las SEQ ID NO: 51-62, derivadas de los accesos UniProt Q29432, 046492, 046494, A5PJW4, 046497, A4FV16, Q9TTV8, Q9TTV7, A7MBA4, Q9TTV5, Q9TTV4 y Q9TTV3.

**FIG. 17.** Gel de SDS-PAGE de lotes de PAG purificadas (5 µg cada uno) teñidos con azul de Coomassie, que ilustra las tres bandas de PAG (bandas superior, central e inferior) entre 50 y 75 kDa. 1) Patrones de proteína (Bio-Rad Cat. n.º 161-0374); 2) carúncula d55; 3) cotiledón d55; 4) carúncula y cotiledón d55 combinados; 5) carúncula d215; 6) cotiledón d215; 7) carúncula y cotiledón d215 combinados; 8) patrones de proteínas (Bio-Rad Cat. n.º 161-0374).

## **Descripción detallada de realizaciones ilustrativas**

A pesar de la disponibilidad de varios ensayos para detectar la preñez, sigue existiendo una necesidad de proporcionar ensayos mejorados para una detección precisa y prematura de la preñez, especialmente en ganado bovino que se reproduce en dos a tres meses posparto o antes. Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos de determinación del estado de preñez de una vaca realizando un ensayo de color para medir la unión de una PAG en una muestra obtenida del animal con un polipéptido, tal como el anticuerpo monoclonal 2D9, un anticuerpo que se une a PAG indicativas de preñez bovina. El ensayo de color puede realizarse de forma prematura, tal como 26 días después de la inseminación. El ensayo de color puede usarse en cualquiera de una diversidad de formatos, tal como con tubos de ensayo o placas ELISA. En realizaciones particulares, el ensayo utiliza un principio de inmunoensayo de tipo sándwich que usa un anticuerpo secundario. Un color, tal como un color azul, indica un ensayo positivo, mientras que tubos que están transparentes indican un ensayo negativo. Las realizaciones de los presentes procedimientos pueden realizarse de forma prematura antes de 30 días después de la inseminación artificial, y son altamente sensibles y específicas. Además, múltiples muestras pueden analizarse fácil y rápidamente de forma concurrente, lo que mejora adicionalmente el valor de los presentes procedimientos.

También se proporcionan anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a los antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21 que comprenden ciertos novedosos polipéptidos de unión a PAG que pueden aplicarse en procedimientos para detectar la preñez en un sujeto, y polinucleótidos que codifican los polipéptidos expuestos en el presente documento. La divulgación restante describe diversas características de la invención y su implementación.

## I. Polipéptidos

Algunas realizaciones de la invención expuestas en este documento se refieren a polipéptidos aislados que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21 y que incluyen un dominio de unión a PAG que tiene más del 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y más del 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el dominio de unión a PAG tiene más del 97,1 %, 97,3 %, 97,5 %, 97,7 %, 97,9 %, 98,1 %, 98,3 %, 98,5 %, 98,7 %, 98,9 %, 99,1 %, 99,3 %, 99,5 %, 99,7 %, 99,9 %, o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio de unión a PAG tiene más del 92,2 %, 92,6 %, 93,0 %, 93,4 %, 93,8 %, 94,2 %, 94,6 %, 95,0 %, 95,4 %, 95,8 %, 96,2 %, 96,6 %, 97,0 %, 97,4 %, 97,8 %, 98,2 %, 98,6 %, 99,0 %, 99,4 %, 99,8 %, o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Un "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de aminoácidos consecutivos de cualquier longitud. En algunas realizaciones de los presente procedimientos, los polipéptidos empleados en los mismos son secuencias de aminoácidos consecutivos que tienen al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Un experto en la materia entendería el modo de generar dicho polipéptido en vista de la divulgación expuesta en el presente documento usando cualquiera de varios procedimientos experimentales bien conocidos para los expertos en la materia.

La expresión "porcentaje de identidad de secuencia", como se sabe en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, que se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según pueda ser el caso, que se determina por la coincidencia entre hebras de dichas secuencias. La "identidad" y "similitud" pueden calcularse fácilmente por procedimientos conocidos, incluyendo los descritos en: Computational Molecular Biology (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (1987); y Sequence Analysis Primer (1991). Los procedimientos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mejor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los procedimientos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Las alineaciones de secuencia y los cálculos del porcentaje de identidad pueden realizarse usando el programa Megalign del paquete de cálculo de bioinformática de LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Pueden realizarse múltiples alineaciones de las secuencias usando el procedimiento de alineación Clustal (Higgins y Sharp (1989) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN POR HUECO = 10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO = 10). Los parámetros por defecto para alineaciones por pares usando el procedimiento Clustal son KTUPLO 1, PENALIZACIÓN POR HUECO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES EVITADAS = 5.

Es bien sabido por los expertos en la materia que, inherente en la definición de un "polipéptido", está el concepto de que hay un límite en la cantidad de cambios que pueden hacerse dentro de una parte definida de la molécula y aún producir una molécula con un nivel aceptable de identidad de secuencia o función, por ejemplo, capacidad de unirse a una PAG.

Se contempla una secuencia de aminoácidos de cualquier longitud dentro de la definición de polipéptido expuesta en el presente documento, siempre que el polipéptido retenga la identidad de secuencia indicada. El dominio de unión a PAG de los polipéptidos expuestos en el presente documento puede tener aminoácidos adicionales en cualquier extremo C-terminal o N-terminal. Por ejemplo, el equivalente polipeptídico puede incluir 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o más ácidos nucleicos adicionales unidos a cualquiera del extremo C-terminal o extremo N-terminal del dominio de unión a PAG.

Por supuesto, puede prepararse fácilmente una pluralidad de polipéptidos distintos con diferentes sustituciones y usarse de acuerdo con la invención.

La presente invención puede utilizar polipéptidos purificados de una fuente natural o de material producido de forma recombinante. Los expertos en la materia conocerían el modo de producir estos polipéptidos a partir de material producido de forma recombinante. Este material puede usar los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de forma natural, o un o más aminoácidos modificados o inusuales. Generalmente, "purificado" se referirá a una composición polipeptídica que se ha sometido a fraccionamiento para retirar otras diversas proteínas, polipéptidos o péptidos, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad. La purificación puede ser sustancial, en que el polipéptido es la especie predominante, o hasta homogeneidad, cuyo nivel de purificación permitiría una secuenciación precisa por degradación.

Los mutantes de secuencia de aminoácidos están incluidos por la presente invención, y se incluyen dentro de la definición de "polipéptido". Los mutantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido pueden ser mutantes de

sustitución o mutantes de inserción. Los mutantes de inserción típicamente implican la adición de material en un punto no terminal en el péptido. Esto puede incluir la inserción de unos pocos restos; un epítipo inmunorreactivo; o simplemente un único resto. El material añadido puede modificarse, tal como por metilación y acetilación. Como alternativa, pueden añadirse restos adicionales a los extremos N-terminal o C-terminal del péptido.

- 5 Las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga y tamaño. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina, lisina e histidina son todos restos cargados positivamente; que la alanina, glicina y serina son todos de un tamaño similar; y que la fenilalanina, triptófano y tirosina todos tienen una forma generalmente similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, la arginina, lisina e histidina; la alanina, glicina y serina; y la fenilalanina, triptófano y tirosina se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Al hacer cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Cada aminoácido tiene un índice hidropático asignado basado en su hidrofobicidad y características de carga. Estas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). La importancia del índice hidropático del aminoácido al conferir una función biológica interactiva a la proteína generalmente está entendida en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o valor hidropático similar y aún retienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en +2, aquellos que están en +1 son particularmente preferidos y aquellos en +0,5 son incluso más particularmente preferidos.

Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aún obtener una proteína biológicamente equivalente. Como se detalla en la patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 + 1); glutamato (+3,0 + 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 + 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están en +2, aquellos que están en +1 son particularmente preferidos y aquellos en +0,5 son incluso más particularmente preferidos.

## II. Polinucleótidos

Diversos aspectos de la presente invención se refieren a polinucleótidos que codifican un polipéptido que incluye un dominio de cadena ligera con al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y un dominio de cadena pesada con al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. También se divulgan polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene más del 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o más del 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. La SEQ ID NO: 5 se refiere a la secuencia de ácido nucleico del ADNc que codifica la cadena ligera de 2D9 y la SEQ ID NO: 6 se refiere a la secuencia de ácido nucleico del ADNc que codifica la cadena pesada de 2D9.

Los polinucleótidos pueden obtenerse de fuentes naturales o sintetizarse químicamente usando cualquier procedimiento conocido para los expertos en la materia. La presente invención también abarca mutantes sintetizados químicamente de estas secuencias.

En ciertas realizaciones, se puede desear emplear construcciones que incluyen otros elementos, por ejemplo, aquellos que incluyen C-5 propina pirimidinas. Los oligonucleótidos que contienen análogos C-5 propina de uridina y citidina han demostrado unirse a ARN con alta afinidad (Wagner y col., 1993). En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica uno o más segmentos adicionales de aminoácidos que pueden unirse a una PAG.

## III. Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo

Realizaciones particulares de la presente invención implican anticuerpos o fragmento de anticuerpo. El término "anticuerpo" se usa para hacer referencia a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tenga una región de unión a antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos de un único dominio (DAB), Fv y scFv (Fv de cadena sencilla). Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones y fragmentos basados en anticuerpo son bien conocidas en la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

También se contemplan "minianticuerpos" o "minicuerpos" para su uso con la presente invención. Los minicuerpos son cadenas polipeptídicas sFv que incluyen dominios de oligomerización en sus extremos C-terminales, separados del sFv por una región de bisagra. Pack y col. (1992). El dominio de oligomerización comprende hélices alfa de autoasociación, por ejemplo, cremalleras de leucina que pueden estabilizarse adicionalmente por enlaces disulfuro

adicionales. El dominio de oligomerización se diseña para que sea compatible con el plegamiento vectorial a través de una membrana, un procedimiento que se cree que facilita el plegamiento *in vivo* del polipéptido en una proteína de unión funcional. Generalmente, los minicuerpos se producen usando procedimientos recombinantes bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pack y col. (1992); Cumber y col. (1992).

- 5 Los peptidomiméticos de unión de tipo anticuerpo (ABiPS) como se describe por Liu y col., 2003, son péptidos que actúan como anticuerpos recortados y tienen ciertas ventajas de semivida en suero más larga, así como procedimientos de síntesis menos problemáticos.

Se reconoce que los anticuerpos monoclonales (MAb) tienen ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, y su uso generalmente es preferido. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de origen humano, murino, de mono, de rata, de hámster, de conejo e incluso de pollo. Debido a la facilidad de preparación y fácil disponibilidad de los reactivos, a menudo se preferirán los anticuerpos monoclonales murinos.

10 Sin embargo, también se contempla los anticuerpos "humanizados", que son anticuerpos quiméricos de ratón, rata u otra especie que albergan dominios de región constante y/o variable humanos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos recombinantes y modificados por ingeniería y fragmentos de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región flanqueante humana y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina no humana (habitualmente de ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se llama "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región flanqueante se llama "acceptora". Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y de cadena pesada humanizada.

15 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) contra anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los anticuerpos expuestos en el presente documento son capaces de unirse a una PAG.

20 Los "anticuerpos policlonales" se definen en el presente documento para hacer referencia a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con el antígeno. Estos diferentes anticuerpos pueden reconocer varios epítopos en el mismo antígeno. Un "anticuerpo monoclonal" contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para los antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. Los mAb pueden obtenerse por procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975; patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Ausubel y col., 1992); Harlow y Lane 1988; Colligan y col., 1993. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. Puede cultivarse un hibridoma que produce un mAb de la presente invención *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. La producción de altos títulos de mAb *in vivo* o *in situ* hace que este sea el procedimiento de producción actualmente preferido.

25 Los "anticuerpos quiméricos" son moléculas, diferentes partes de las cuales se obtienen de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, que se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en su aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción. Los anticuerpos quiméricos y procedimientos para su producción son conocidos en la técnica. Se describen procedimientos ejemplares de producción en Cabilly y col., 1984; Boulianne y col., 1984; y Neuberger y col., 1985.

30 Un "anticuerpo antiidiotípico" (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo anti-Id puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como fuente de mAb con el mAb para el que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Un procedimiento ejemplar de producción de dichos anticuerpos se encuentra en la patente de Estados Unidos n.º 4.699.880.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir al menos una cadena pesada y al menos una ligera que se unen específicamente a los antígenos asociados a preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG 17, PAG 19, PAG20 y PAG21.

#### IV. Procedimientos de detección y formatos de ensayo

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos de detección de preñez en un animal bovino que implica poner en contacto una muestra obtenida del animal bovino con el anticuerpo proporcionado en el presente documento y detectar al menos un antígeno asociado a preñez en la muestra, en el que la detección de la PAG indica que el animal está preñado. Puede usarse cualquier procedimiento conocido para los expertos en la materia para detectar el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo unidos a una PAG en la muestra.

En la presente invención, por lo tanto, proporciona el uso de anticuerpos en la detección inmunológica de PAG. Se han descrito diversos procedimientos útiles de inmunodetección en la bibliografía científica, tales como, por ejemplo, Nakamura y col. (1987). Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos son ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA). La detección inmunohistoquímica usando secciones tisulares también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no está limitada a dichas técnicas, y también puede usarse transferencia de Western, transferencia puntual y análisis FACS en relación con la presente invención.

En general, los procedimientos de inmunounión incluyen obtener una muestra sospechosa de contener una proteína, péptido o anticuerpo, y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o proteína o péptido de acuerdo con la presente invención, según pueda 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 o saliva.

En realizaciones particulares, el anticuerpo se une a un soporte sólido, tal como la pared interna de un tubo o pocillo y la muestra sospechosa de contener la PAG se aplicará al anticuerpo inmovilizado.

Se describen sistemas de tubo recubiertos con anticuerpo en la patente de Estados Unidos n.º 3.646.346 y el documento WO 98/16832. Entonces puede detectarse la presencia de complejos de PAG-anticuerpo en condiciones específicas. Opcionalmente, dichos complejos inmunitarios pueden cuantificarse.

El contacto de la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios (complejos inmunitarios primarios) es generalmente una cuestión de añadir simplemente la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunitarios con, es decir, se unan a, cualquier PAG presente en la muestra. Después de este tiempo, la muestra-composición de anticuerpo generalmente se lava para retirar cualquier especie de anticuerpo unido de forma no específica, permitiendo que solamente aquellos anticuerpos unidos específicamente dentro de los complejos inmunitarios primarios se detecten.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en la técnica y puede conseguirse a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos procedimientos generalmente se basan en detección de un marcador o señal, tal como cualquiera de las marcas radiactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las patentes de Estados Unidos que se refieren al uso de dichos marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Pueden encontrarse procedimientos para la determinación inmunológica de proteínas y kits para realizar el procedimiento en la patente de Estados Unidos 5.721.105.

El procedimiento puede implicar el uso de un ligando de unión secundario tal como un anticuerpo secundario y/o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, como se sabe en la técnica. El anticuerpo secundario empleado en la detección puede estar por sí mismo unido a un marcador detectable, en el que simplemente tendría entonces que detectarse este marcador, permitiendo de ese modo determinar la cantidad de los complejos inmunitarios primarios en la composición. Los procedimientos para la detección de una biomolécula en una muestra de ensayo usando inmunocaptura, amplificación de biotina/avidina y producción de color con peroxidasa de rábano rústico pueden encontrarse en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/508381.

Habitualmente, los complejos inmunitarios primarios pueden detectarse mediante un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por la PAG o el primer anticuerpo específico de PAG. En estos casos, el segundo ligando de unión puede unirse a un marcador detectable. El segundo ligando de unión a menudo es en sí mismo un anticuerpo, que puede llamarse, por tanto, anticuerpo "secundario". Los complejos inmunitarios primarios se ponen en contacto con el ligando de unión o anticuerpo secundario marcado, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios secundarios. Los complejos inmunitarios secundarios después generalmente se lavan para retirar cualquier anticuerpo o ligando secundario marcado unido de forma no específica, y entonces se detecta el marcador restante en los complejos inmunitarios secundarios.

Procedimientos adicionales incluyen la detección de complejos inmunitarios primarios por un enfoque de dos etapas. Un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión por la PAG o anticuerpo anti-PAG se usa para formar complejos inmunitarios secundarios, como se describe anteriormente. El segundo ligando de unión contiene una enzima capaz de procesar un sustrato en un producto detectable y, por tanto, amplificar la señal en el tiempo. Después del lavado, los complejos inmunitarios secundarios se ponen en contacto con el sustrato, permitiendo la detección.

En una realización de la invención, puede usarse inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Véase, por ejemplo, Engvall, 1980; Engvall, 1976; Engvall, 1977; Gripenberg y col., 1978; Makler y col., 1981; Sarangadharan y col., 1984. El ELISA permite que las sustancias se adsorban de forma pasiva en soporte sólidos tales como plástico para posibilitar una fácil manipulación en condiciones de laboratorio. Para un tratado exhaustivo sobre ELISA se remite al experto en la materia a "Theory and Practise" (Crowther, 1995).

La sensibilidad de los procedimientos ELISA depende del recambio de la enzima usada y la facilidad de detección del producto de la reacción enzimática. La potenciación de la sensibilidad de estos sistemas de ensayo puede

conseguirse por el uso de sustratos fluorescentes o radiactivos para las enzimas. Los inmunoensayos incluidos por la presente invención incluyen, los descritos en la patente de Estados Unidos 4.367.110 (ensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo monoclonal) y la patente de Estados Unidos 4.452.901 (transferencia de Western). Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, ambos *in vitro* e *in vivo*.

5 En una realización, la invención comprende un ELISA "de tipo sándwich", donde los anticuerpos anti-PAG de la presente invención se inmovilizan en una superficie seleccionada, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno, un tubo o una varilla graduada. Después, una composición de ensayo sospechosa de contener PAG, por ejemplo, una muestra clínica, se pone en contacto con la superficie. Después de la unión y el lavado para retirar los inmunocomplejos unidos de forma no específica, el antígeno unido puede detectarse por un segundo anticuerpo  
10 contra la PAG.

En otro ELISA ejemplar, se inmovilizan polipéptidos de la muestra en una superficie y después se ponen en contacto con los anticuerpos anti-PAG. Después de la unión y el lavado para retirar los complejos inmunitarios unidos de forma no específica, se detecta el anticuerpo unido. Cuando los anticuerpos iniciales se unen a un marcador detectable, los complejos inmunitarios primarios pueden detectarse directamente. Como alternativa, los complejos  
15 inmunitarios pueden detectarse usando un segundo anticuerpo que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo, estando unido el segundo anticuerpo a un marcador detectable.

Otro ELISA en que las PAG se inmovilizan, implica el uso de competición de anticuerpos en la detección. En este ELISA, se añaden anticuerpos marcados a los pocillos, que se deja que se unan a las PAG, y se detectan mediante su marcador. La cantidad de PAG en una muestra se determina mezclando la muestra con los anticuerpos  
20 marcados antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de PAG en la muestra actúa reduciendo la cantidad de anticuerpo disponible para la unión al pocillo, y por tanto reduce la señal final.

Independientemente del formato empleado, los ELISA tienen ciertas características en común, tales como recubrimiento, incubación o unión, lavado para retirar las especies unidas de forma no específica y detección de los complejos inmunitarios unidos. Al recubrir una placa con antígeno o anticuerpo, generalmente se incubarán los  
25 pocillos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, durante una noche o durante un periodo especificado de horas. Los pocillos de la placa después se lavarán para retirar el material adsorbido de forma incompleta. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos después se "recubre" con una proteína no específica que es antigénicamente neutra con respecto al antisuero de ensayo. Esta puede incluir albumina sérica bovina (BSA), caseína, soluciones de leche en polvo u otras proteínas antigénicamente neutras. El recubrimiento  
30 permite el bloqueo de los sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y, por tanto, reduce el fondo causado por la unión no específica de los antisueros en la superficie.

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

Las condiciones "adecuadas" también indican que la incubación es a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las etapas de incubación típicamente son de aproximadamente 1 h a 2 h a 4 h, a temperaturas preferentemente del orden de 25 °C a 27 °C, o pueden ser durante una noche a 4 °C.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá un marcador asociado para permitir la detección. A menudo, este será una enzima que generará desarrollo de color tras la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto e incubar el primero o segundo  
40 complejo inmunitario con un anticuerpo conjugado con ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa de hidrógeno durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorecen el desarrollo de la formación de inmunocomplejos adicionales (por ejemplo, incubación durante 2 h a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-TWEEN). Después de la incubación con el anticuerpo marcado, y después del lavado para retirar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marcador, por ejemplo, por incubación con un sustrato cromogénico tal como urea y púrpura de bromocresol o ácido 2,2'-ácido-di-(3-etil-benciazolina-6-sulfónico [ABTS] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en el caso de peroxidasa como marcador enzimático. La cuantificación entonces se consigue midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro en el espectro visible. Una variante de  
50 ELISA es el ensayo de coagulación ligado a enzimas, o ELCA (patente de Estados Unidos 4.668.621), que usa la cascada de coagulación combinada con la enzima de marcaje RVV-XA como sistema de detección universal. La ventaja de este sistema para la presente invención es que las reacciones de coagulación pueden realizarse a pH fisiológico en presencia de una amplia diversidad de tampones. Es posible, por lo tanto, retener la integridad de los analitos complejos.

55 También puede usarse inmunohistoquímica (IHC) de acuerdo con la presente invención en la identificación de PAG. Esto implica ensayar bloques tisulares incrustados en parafina, tanto congelados en fresco como fijados en formalina preparados a partir del estudio por IHC. Por ejemplo, cada bloque tisular consiste en 50 mg de tejido placentario "pulverizado" residual. El procedimiento de preparación de bloques tisulares a partir de estas muestras particuladas se ha usado satisfactoriamente en estudios de IHC previos de diversos factores de pronóstico, por ejemplo, en

mama, y es bien conocido para los expertos en la materia (Brown y col., 1990; Abbondanzo y col., 1990; Allred y col., 1990).

En resumen, pueden prepararse secciones congeladas rehidratando 50 mg de tejido placentario "pulverizado" congelado a temperatura ambiente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en pequeñas cápsulas de plástico; sedimentando las partículas por centrifugación; resuspendiéndolas en un medio de incrustación viscoso (OCT); invirtiendo la cápsula y sedimentando de nuevo por centrifugación; congelando inmediatamente en isopentano a -70 °C; cortando la cápsula de plástico y retirando el cilindro congelado de tejido; fijando el cilindro de tejido en un mandril de micrótopo de criostato; y cortando 25-50 secciones en serie que contienen un promedio de 500 células placentarias notablemente intactas.

Las secciones permanentes pueden prepararse por un procedimiento similar que implica la rehidratación de los 50 mg de muestra en un tubo de microfuga de plástico; sedimentación; resuspensión en formalina al 10 % durante 4 h de fijación; lavado/sedimentación; resuspensión en agar caliente al 2,5 %; sedimentación; refrigeración en agua enfriada con hielo para endurecer el agar; retirada del bloque de tejido/agar del tubo; infiltración e incrustación del bloque en parafina; y corte de hasta 50 secciones permanentes en serie.

#### 15 **V. Purificación de proteínas**

Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia. Estas técnicas implican, a un nivel, el fraccionamiento en bruto del medio celular en fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. Habiendo separado el polipéptido de otras proteínas, el polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir una purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad). Los procedimientos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; enfoque isoelectrico. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso HPLC.

La expresión "polipéptido, proteína o péptido purificado", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una composición, que se puede aislar de otros componentes, en la que la proteína o péptido se purifica a cualquier grado respecto a su estado obtenible de forma natural. Una proteína o péptido purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido, libre del entorno en el que puede producirse de forma natural. Generalmente, "purificada" se referirá a una composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para retirar otros diversos componentes, y reteniendo sustancialmente dicha composición su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta denominación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de las proteínas en la composición.

Diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas serán bien conocidas para los expertos en la materia. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato amónico, PEG y anticuerpos o por desnaturalización por calor o pH ácido de las proteínas contaminantes, seguido por centrifugación; etapas de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, cromatografía en hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se sabe generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que ciertas etapas pueden omitirse y aún producir un procedimiento adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

No existen requisitos generales de que el polipéptido siempre tenga que proporcionarse en su estado más purificado. De hecho, se contempla que tendrán utilidad productos sustancialmente menos purificados en ciertas realizaciones. La purificación parcial puede conseguirse usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente producirá una purificación de mayor "factor" que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los procedimientos que muestran un grado menor de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

#### **VI. Kits**

En más realizaciones adicionales, la presente invención proporciona kits para su uso con los procedimientos de inmunodetección descritos anteriormente para la detección de PAG, tal como un kit de inmunodetección para diagnosticar la preñez en un bovino. En realizaciones específicas, se incluye un anticuerpo que comprende un dominio de cadena ligera con al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y un dominio de cadena pesada con al menos un 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 en el kit. El kit puede incluir uno o más recipientes. El recipiente, por ejemplo, puede ser un vial, un tubo, un matraz o una jeringa.

5 En realizaciones particulares, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 2D9. En realizaciones particulares, el kit incluye uno o más tubos o pocillos de una placa de microtitulación con anticuerpo preunido. Como alternativa, el kit puede incluir anticuerpo preunido a una matriz de columna. El kit puede permitir el ensayo de una única muestra, o más de una muestra. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad de placas de microtitulación o tubos recubiertos con anticuerpo que permiten la inmunodetección de numerosas muestras de forma concurrente o consecutiva.

10 Los reactivos de inmunodetección del kit pueden adoptar una cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo los marcadores detectables que se asocian con y/o unen al anticuerpo dado. También se contemplan marcadores detectables que se asocian con y/o unen a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios ejemplares son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión por el primer anticuerpo.

15 Los kits pueden incluir un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede unirse o no a un marcador detectable. El kit puede incluir adicionalmente un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando unido el tercer anticuerpo a un marcador detectable. Como se indica anteriormente, se conocen varios marcadores ejemplares en la técnica y/o todos estos marcadores pueden emplearse en relación con la presente invención.

Los kits pueden incluir opcionalmente una composición dividida adecuadamente en alícuotas de una PAG para proporcionar un control positivo. Los componentes de los kits pueden basarse en medios acuosos y/o en forma liofilizada.

## VII. Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la materia que en los siguientes ejemplos se representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica

### Ejemplo 1

#### 25 Identificación de PAG que se unen a 2D9

Se emprendieron estudios para identificar las proteínas de unión a 2D9, para caracterizar y secuenciar el anticuerpo 2D9, y para ubicar los sitios de unión de PAG a 2D9. Para conseguir esto, se emprendieron dos enfoques (descritos a continuación).

#### Materiales y procedimientos

30 Inmunoprecipitación de PAG con perlas magnéticas recubiertas con 2D9. Se acopló 2D9 purificado a perlas magnéticas Dynal activadas con tosilo de acuerdo con las directrices del fabricante (Dynal). Las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo se incubaron con 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG (obtenida de placenta del día 55) durante 30 min en PBS 1x y se lavaron ampliamente con el mismo tampón. Las proteínas unidas se eluyeron usando ácido acético pH 3,0 y se sometieron a análisis en gel y de transferencia de Western. La transferencia de Western se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteína inmunorreactiva se cortaron del SDS-PAGE y se sometieron a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina (FIG. 3).

40 Cromatografía de inmunoafinidad de extractos tisulares preparados a partir de tejidos de carúncula (endometrio) y cotiledón (placenta) del día 55 de preñez bovina. En resumen, se acopló 2D9 purificado (10 mg) a un gramo de sepharose activado con CNBr de acuerdo con las directrices del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina de afinidad por 2D9 (aproximadamente 5,0 ml) se incubó con 25 ml de extracto tisular a pH 7,0, durante una noche para la unión. El siguiente día, la resina se compactó en una columna y se lavó con PBS 1x para retirar los materiales no unidos y se eluyó con ácido acético pH 3,0. El pH del material eluido se neutralizó con Tris 1 M inmediatamente después de la elución hasta pH 7,0. El material eluido se sometió a análisis en gel y de transferencia de Western. La transferencia de Western se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteína 1 a 7 se cortaron del SDS-PAGE y se sometieron a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina (FIG. 4). Las identidades de las secuencias peptídicas se determinaron usando análisis BLAST.

50 La afinidad de unión de PAG por 2D9 se determinó por transformación log-log de los datos de ELISA (FIG. 5) revelados con el antígeno de unión a 2D9 como patrones de PAG (purificados por cromatografía de inmunoafinidad). El ensayo se realizó con una serie de patrones de PAG que variaban de 0,05 ng/ml a 50 ng/ml (0,083 nM a 8,3 nM). El ensayo ELISA se repitió 8 veces. Los datos se analizaron con SoftMax™ (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA).

**Resultados**

- 5 Inmunoprecipitación de PAG con perlas magnéticas acopladas a 2D9. El análisis de SDS-PAGE y transferencia de Western del material eluido de las perlas magnéticas mostró una única banda de proteína a 67 kDa. La huella peptídica y el análisis CL-EM-EM identificó esta banda de proteína como boPAG6 (FIG. 3). Sin embargo, este análisis no reveló todas las PAG que se unen a 2D9 ya que el análisis usó 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG para el experimento de inmunoprecipitación. Este material se aisló por cromatografía de afinidad por pepstatina de extracto de tejido placentario a pH 5,0, seguido por elución a pH 9,5. Esta preparación también se llamó "PAG ácidas", una preparación enriquecida de antígenos PAG prematuros. Para identificar todas PAG que se unen a 2D9, se realizó cromatografía de inmunoafinidad con extractos tisulares (véase a continuación).
- 10 Análisis de PAG purificadas de extractos tisulares con cromatografía de inmunoafinidad por 2D9. La tinción con azul de Coomassie del material eluido de la columna de inmunoafinidad mostró 3 bandas de proteína con pesos moleculares de 67 kDa, 55 kDa y 50 kDa. Se descubrió que las tres bandas de proteína también eran inmunorreactivas en análisis de transferencia de Western con anticuerpos de conejo anti-PAG. Basándose en estos resultados, todas las bandas de proteínas se cortaron después de SDS-PAGE (FIG.4) y se sometieron a huella peptídica y CL-EM-EM. Las identidades de las secuencias peptídicas resultantes se determinaron por análisis BLAST. La tabla 1 muestra un resumen de los resultados de secuencia peptídica y su identificación como PAG correspondientes a secuencias de boPAG-4, boPAG-6, boPAG-9, boPAG-20 y boPAG21 por análisis BLAST. Para los significados de los parámetros de la Tabla 1, véase la descripción de la FIG.3.
- 15

**Tabla 1.** Resumen de los resultados de secuencia peptídica

<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas 3, 5, 6 y 7</b>						
Glucoproteína 4 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi28603710)						
Mz	Carga	Mr (calculado)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
494,7897	2	969,5647	323	331	97,72 %	VPGQAYILK (SEQ ID NO: 19)
523,7799	2	1027,5127	362	369	99,00 %	LYFSVFDR (SEQ ID NO: 20)
544,7657	2	1069,5193	127	136	98,95 %	TFSITYGSGR (SEQ ID NO: 21)
608,8262	2	1197,6216	232	241	94,10 %	GELNWIPLMK (SEQ ID NO: 22)
671,695	3	1994,0513	195	212	99,00 %	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO: 23)
820,4574	3	2440,2678	172	194	87,95 %	FDGVLGLSYTNISPSGAIPFIYK (SEQ ID NO: 24)
<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas 1, 2, 4 y 5</b>						
Glucoproteína 6 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi28603714)						
Mz	Carga	Mr (calculado)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
886,4235	2	1752,8722	196	211	88,08 %	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO: 25)
881,9394	2	1743,8865	147	162	95,46 %	IGDLVSTDQPFGGLCLK (SEQ ID NO: 26)
809,7131	3	2408,1736	231	250	91,77 %	GELNWWPLIQVGDWVHMDR (SEQ ID NO: 27)
671,6718	3	1994,0513	194	211	97,94 %	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO: 28)
615,3026	2	1210,6022	183	193	98,74 %	TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO: 29)
592,9321	3	1757,8154	212	227	99,00 %	DKQEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO: 30)
511,9066	3	1514,6936	214	227	90,49 %	QEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO: 31)
467,2242	2	914,4286	362	368	91,26 %	YFSVFDR (SEQ ID NO: 32)

20

(continuación)

<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas 2 y 5</b>						
Glucoproteína 9 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi28603720)						
Mz	Carga	Mr (calculado)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
467,2146	2	914,4286	362	368	99,00 %	YFSVFDR (SEQ ID NO: 33)
521,2636	2	1022,5185	138	146	99,00 %	GFLAYDTVR (SEQ ID NO: 34)
653,9534	3	1940,8727	214	230	96,15 %	QEGSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO: 35)
654,80054	2	1289,5962	126	137	97,70 %	TFTITYGSGSMK (SEQ ID NO: 36)
660,8375	2	1301,6768	350	360	94,72 %	ETWILGDAFLR (SEQ ID NO: 37)
734,6413	3	2183,0105	212	230	87,19 %	NKQEGSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO: 38)
739,9147	2	1459,8439	307	319	99,00 %	YLPSITFIINGIK (SEQ ID NO: 39)
817,7423	3	2432,2222	147	169	99,00 %	IGDLVSTDQPFGLSVVEYGLEGR (SEQ ID NO: 40)
875,3999	3	2605,2012	256	280	83,62 %	TVIACSDGCEALVHTGTSHIEGPGR (SEQ ID NO: 41)
<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas 1 y 4</b>						
Glucoproteína 20 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi28603736)						
Mz	Carga	Mr (calculado)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
671,6718	3	1994,0513	195	212	97,94 %	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO: 42)
758,8157	2	1497,7511	215	228	80,98 %	QKGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO: 43)
886,4235	2	1752,8722	197	212	88,08 %	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO: 44)
<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas 3, 5 y 7</b>						
Glucoproteína 21 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi28603738)						
Mz	Carga	Mr (calculado)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
516,7575	2	1013,497	362	369	99,00 %	VYFSVFDR (SEQ ID NO: 45)
544,7657	2	1069,5193	127	136	98,95 %	TFSITYGSGR (SEQ ID NO: 46)
694,3238	3	2061,9712	258	277	98,47 %	VVACSDGCEAVVDTGTSLIK (SEQ ID NO: 47)
753,6964	3	2240,1	148	168	99,00 %	IGDLVSTDQPFGLSVSEYGFK (SEQ ID NO: 48)
892,1082	3	2655,2744	171	194	99,00 %	AYDGILGLNYPDESFEAIPFDK (SEQ ID NO: 49)
915,4483	2	1810,8889	346	361	81,37 %	FSSSTETWLLGDAFLR (SEQ ID NO: 50)

Este análisis mostró que cada una de las 3 bandas de proteína, tienen más de una PAG. (Tabla 1). La banda de 67 kDa contenía péptidos correspondientes a boPAG6 y boPAG20. La banda de proteína de 55 kDa contenía péptidos que pertenecen a boPAG6 y boPAG9. La banda de proteína de 50 kDa correspondía a boPAG4 y boPAG21 con boPAG9 como componente minoritario. Estos resultados muestran que el anticuerpo monoclonal 2D9 se une a boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21. Este anticuerpo monoclonal se une epítomos comunes a las 5 PAG. La comparación de secuencia mostró un alto grado de identidad de secuencia entre estas PAG.

Los resultados de ELISA de PAG (FIG. 5) obtenidos usando PAG de unión a 2D9 como patrones se usaron para calcular el valor Kd usando SoftMax™. El valor Kd de 2D9 se determinó en 0,9 nM (FIG. 5). Por tanto, 2D9 es un anticuerpo monoclonal de alta afinidad para PAG. Estos resultados muestran que 2D9, un anticuerpo monoclonal contra PAG, se une a boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21 de extractos tisulares de placenta del día 55. Las identidades de las secuencias peptídicas obtenidas por CL-EM-EM correspondían a secuencias previamente caracterizadas de estas 5 PAG (boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21).

**Ejemplo 2****Secuenciación de proteína y ARNm**

5 Secuenciación de proteína de 2D9 purificado. La secuenciación de 2D9 se realizó para identificar las secuencias de unión al antígeno PAG de 2D9. La secuenciación de 2D9 se consiguió por procedimientos de secuenciación de proteína y ADN. En primer lugar, se separaron las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2D9 por electroforesis en gel desnaturante. Las bandas del gel se escindieron y se sometieron a digestiones con enzima tripsina y quimotripsina, por separado. Los péptidos resultantes se separaron y secuenciaron por el procedimiento CL-EM-EM (cromatografía líquida-espectrometría de masas- espectrometría de masas). Los péptidos con un valor de confianza de >90 % en el análisis de masa y secuencia se seleccionaron. Las secuencias peptídicas resultantes se usaron para ensamblar ~80 % de la secuencia de la cadena ligera y ~50 % de la secuencia de la cadena pesada.

10 Secuenciación del ARNm de cadena pesada y ligera de 2D9. En un segundo enfoque, se secuenció el ARNm correspondiente a las cadenas pesada y ligera de 2D9 usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) con el ARN total preparado a partir de células de hibridoma de PAG 2D9.

15 En resumen, se cultivaron células de hibridoma que producen anticuerpo monoclonal contra PAG en medio de cultivo tisular sin suero para producir  $1 \times 10^6$  células. Las células se centrifugaron y el sedimento celular resultante se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. El sedimento celular se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. El primer ADN de hebra complementaria (ADNc) se produjo usando el kit Cell-to-cDNA II adquirido de Ambion, Inc., Austin, TX. El ARN en las células de hibridoma se transcribió de forma inversa para producir el ADNc sin una etapa de extracción de ARN diferente. El molde de ADNc resultante se usó para amplificar las cadenas ligera y pesada usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un conjunto de cebadores diseñado para amplificar todas las subclases de cadenas pesadas y ligeras de ratón (Chardes y col., 1999). El producto de PCR resultante se secuenció. Los datos de secuencia se reunieron con el paquete de software DNA STAR™. El estudio completo se repitió para asegurar la precisión de la secuencia. La segunda repetición de la amplificación de PCR y la secuenciación incluyeron cebadores adicionales para aumentar la cobertura.

25 El análisis de secuencia mostró que la cadena pesada de 2D9 se obtenía de la subclase IgG1 gamma de ratón y la cadena ligera se obtenía del tipo kappa. La cadena pesada consistía en 448 restos de aminoácido y la cadena ligera consistía en 219 restos de aminoácido. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2D9 se expone como SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2D9 se expone como la SEQ ID NO: 4. La secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de 2D9 se expone como la SEQ ID NO: 5 (FIG. 1). La secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de 2D9 se expone como la SEQ ID NO: 6 (FIG. 2).

**Ejemplo 3****Estudios de viabilidad de una prueba de preñez basada en inmunoensayo en ganado bovino**

35 Se realizó un estudio a gran escala para evaluar la rentabilidad de ensayar la preñez de forma prematura en el día 28 en la gestión reproductiva de vacas lecheras. Los animales de estudio estaban localizados en dos sitios diferentes, uno en California y uno en Wisconsin. Se asignaron 1.050 animales por sitio. La reproducción inicial se siguió por realización de una prueba de preñez basada en inmunoensayo como se describe a continuación, o por palpación convencional. Las muestras se transportaron al laboratorio durante la noche. El estudio usó un ELISA de tipo sándwich optimizado con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. El ELISA de PAG usó un punto de corte de 1,7 ng/ml, basado en un estudio de ensayo. Las muestras de sangre se recogieron en el día 28 y se transportaron al laboratorio para la prueba de preñez. El diagnóstico de preñez se consiguió por ELISA de PAG y se generó un informe de los resultados, y estaban disponibles en 24 horas para el personal de la granja. Las decisiones de reproducción se tomaron basándose en los resultados del diagnóstico de preñez del ensayo de PAG para el grupo de resincronización prematura. Las decisiones de reproducción para el grupo de resincronización tardía (control) se tomaron basándose en la palpación en los días 35 a 45. Los resultados de los dos sitios se muestran en las FIG. 6-8.

50 La FIG. 6 muestra la precisión de un diagnóstico de preñez basado en laboratorio con ELISA de PAG comparado con el diagnóstico de preñez basado en ultrasonidos. La FIG. 6 muestra la precisión del diagnóstico de preñez en el día 28 usando un ELISA basado en laboratorio en comparación con el diagnóstico de preñez con ultrasonidos en el día 28 en los dos sitios de estudio, Wisconsin y California. La rentabilidad de una prueba de preñez en el día 28 en la gestión de la reproducción de vacas lecheras se examinó en este estudio beta. Se usó un ELISA de PAG basado en laboratorio con anticuerpos policlonales para el diagnóstico de preñez. El sitio de Wisconsin usó reproducción estrictamente sincronizada mientras que el sitio de California usó reproducción sincronizada más reproducción estral. Se usaron aproximadamente 1000 vacas en el estudio por sitio. Las muestras de sangre se recogieron en el día 28, se transportaron al laboratorio para la prueba de preñez. Los resultados se devolvieron a las granjas en 24 horas para posibilitar las decisiones de reproducción. El estado de preñez también se determinó por ultrasonidos en el momento de la recogida de sangre en el día 28.

55 La FIG 7. y FIG. 8 muestran los resultados de los parámetros de reproducción usados para determinar la rentabilidad de la detección prematura de la preñez en la gestión reproductora de vacas lecheras en dos esquemas

diferentes de reproducción. Los resultados muestran claramente que hay una reducción significativa en los días receptivos en 10 a 15 días en el grupo de resincronización prematura en comparación con los controles. Además, se observó una reducción en los días entre las inseminaciones en ambos sitios.

5 Estos resultados muestran que el ensayo prematuro de la preñez con ELISA de PAG después de 27-30 días desde la inseminación permitía una reproducción prematura en comparación con la palpación. El ensayo prematuro de la preñez reducía significativamente los "días receptivos" en la reproducción repetida de las vacas. Además, el ensayo prematuro de la preñez reducía significativamente los días entre inseminaciones. La estrategia de reproducción estral con el ensayo prematuro de la preñez mostró que reducía la cantidad de inseminaciones por concepción.

#### Ejemplo 4

##### 10 Conceptos de ensayo en granja: prueba de preñez bovina (tiras)

Se realizó un estudio adicional para evaluar la viabilidad de usar 2D9 en el desarrollo de una prueba de preñez "en granja" con tiras de ensayo. Las tiras de ensayo usaron tecnología de flujo lateral, que es la misma tecnología usada en las pruebas de preñez para el hogar. Las tiras de ensayo de flujo lateral tienen anticuerpo conjugado a oro coloidal en el extremo de aplicación de la muestra y un anticuerpo de captura colocado como línea de ensayo en el centro de la tira. Si hay antígeno de ensayo (PAG) presente en la muestra, entonces el anticuerpo conjugado con oro se unirá al antígeno y el complejo resultante migrará hacia la línea de ensayo. En la línea de ensayo, el anticuerpo de captura (también creado contra PAG) se unirá a este complejo y se concentrará en la línea. Cuando se retienen complejos suficientes en la línea de ensayo como un sándwich de anticuerpos, aparecerá una línea purpura visible debido al anticuerpo marcado con oro coloidal unido al antígeno de ensayo. Se produjeron y ensayaron tiras de flujo lateral con más de 40 combinaciones de anticuerpos (incluyendo 2D9 como anticuerpo de captura). Ninguna de las combinaciones de tira de flujo lateral produjo sensibilidad y especificidad aceptables. Como resultado, se evaluaron otros formatos de ensayo de diagnóstico rápidos para desarrollar un ensayo "en granja". Entre los formatos evaluados, los tubos de plástico con aletas internas mostraron resultados prometedores. A causa de esto, el formato de tubo se seleccionó para optimización adicional como ensayo de color.

#### 25 Ejemplo 5

##### Conceptos de ensayos en granja: prueba de preñez bovina (placas de múltiples pocillos)

En un estudio adicional, se usaron muestras de plasma recogidas de vacas preñadas confirmadas en el día 28 para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo de color. Se determinó la intensidad de color transfiriendo la solución de muestra a una placa de múltiples pocillos recubierta con 2D9. La placa se leyó en un lector de placas (SpectraMax, Molecular Devices, Inc., CA). El panel de plasma consistía en 20 muestras de vacas preñadas y 20 muestras de vacas receptivas (no preñadas). Cada muestra se ensayó por duplicado. Basándose en la densidad óptica de las intensidades de color obtenidas de las 40 muestras, usando un punto de corte de 0,2 unidades DO como color de fondo, el ensayo mostró una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % (FIG. 9).

#### Ejemplo 6

##### 35 Conceptos de ensayo en granja: prueba de preñez bovina de color (tubos de plástico)

Materiales y procedimientos. El siguiente protocolo describe el procedimiento optimizado para ensayar la preñez con tubos de plástico recubiertos con 2D9. El ensayo puede realizarse con muestras de sangre completa recogidas con tubos de recogida de sangre K3EDTA o con muestras de plasma.

40 Materiales. Se adquirieron tubos con nervaduras internas (n.º 214-2131-010) de Evergreen Scientific Company, Los Ángeles, California. El anticuerpo monoclonal contra PAG 2D9 y los anticuerpos policlonales de conejos se purificaron por cromatografía de afinidad por proteína G. El marcaje con biotina de los anticuerpos policlonales de conejo se consiguió usando el kit de marcaje con biotina de Roche (n.º 1-418-165, Roche Applied Science, Indianápolis, Indiana) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se adquirió estreptavidina-PoliHRP20® n.º RDI-PHRP20-SA) que se adquirió de Research Diagnostics, Inc, Concord, MA. El Sure Blue Reserve® (n.º 53-00-03) se adquirió de KPL, Inc, Gaithersburg, MD. SuperBlock con TWEEN20® (n.º 37516) se adquirió de Pierce Biotech, Rockford, IL. El anticuerpo monoclonal 2D9 purificado en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) con concentración conocida; tampón de recubrimiento: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,3; tampón de lavado: PBS 1x con Tween20 al 0,05 %; tampón de dilución: SuperBlock™ al 10 % en tampón de lavado.

50 Marcaje con biotina de anticuerpos policlonales. El anticuerpo policlonal de conejo purificado (1 mg) se usó para el marcaje con biotina de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante del kit (Roche). En resumen, se añadieron 7,6 µl de reactivo de biotina activado en DMSO a 1 ml de anticuerpo en 1,0 ml de solución de PBS en un tubo de 1,5 ml. El tubo se colocó en un agitador giratorio con un ajuste de 45 r.p.m. durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esta etapa, los contenidos se transfirieron a un Slide-A-lyzer™ de diálisis (Pierce Biotech, n.º 63380) y se dializaron frente a PBS 1x a 4 °C durante 16 horas con 2 cambios de tampón. La IgG marcada con biotina se recuperó del Slide-A-lyzer y se almacenó como una solución madre diluida 1:100 con BSA al 1 % en PBS. Esta solución se diluyó hasta 1:2000 con tampón de dilución para el ensayo de la preñez antes de su uso.

5 Recubrimiento con anticuerpo de los tubos. El anticuerpo monoclonal purificado, 2D9 se diluyó en tampón carbonato  
sódico 0,1 M (pH 9,3) hasta una concentración de 1,25 µg/ml para recubrir los tubos. Los tubos se recubrieron con  
0,5 µg de anticuerpo en 0,4 ml de tampón carbonato sódico durante 16 a 18 horas a 4 °C para el recubrimiento. Para  
la incubación, los tubos se colocaron dentro de un recipiente de plástico con una tapa hermética cerrada fuertemente  
10 más una toalla de papel húmeda para la humedad y se mantuvo a 4 °C. Después de la incubación, la solución de  
anticuerpo se retiró y los tubos se lavaron dos veces con tampón de lavado. Los tubos después se bloquearon con  
0,4 ml de superbloc-TWEEN20 durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el superbloc y los  
tubos se secaron colocándolos en una cámara seca durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esta  
etapa, los tubos se sellaron y almacenaron a 4 °C en un recipiente de plástico sin humedad hasta su uso. Los tubos  
recubiertos se podían usar durante 6 meses con pérdida mínima en el rendimiento de ensayo.

15 Recogida de muestras. Las vacas se reprodujeron en un estro sincronizado usando un protocolo de sincronización  
OvSynch. Se usaron aproximadamente 200 vacas para cada reproducción sincronizada. Se reprodujo un total de  
815 vacas por inseminación artificial (AI) y el día de AI fue el día 0. Se recogieron muestras de sangre de 800 vacas  
en tubos con anticoagulante K3EDTA (BD n.º 366643) para vacas en los días 26 y 28 y se transportaron al  
laboratorio en hielo por transporte durante una noche. Las muestras de sangre se usaron directamente en el ensayo  
de color tras recibirlas. Las vacas se comprobaron para el estado de preñez por ultrasonidos en el día -29 y se  
reconfirmo por palpación rectal en el día -60. Los datos de diagnóstico de la preñez de las 797 vacas estuvieron  
disponibles al final del estudio y se usaron para el análisis de la precisión del ensayo.

#### Procedimiento de ensayo de color:

20 Las muestras de sangre se mezclaron por inversión hasta 10 veces para facilitar la fácil transferencia de la muestra.  
Se transfirieron cuatrocientos microlitros (0,4 ml) de sangre a cada tubo y los tubos se incubaron en un baño de  
agua a 37 °C durante 15 min. Después de esta incubación, la muestra de sangre se aspiró y los tubos se llenaron  
con tampón de lavado (PBS 1x con Tween20 al 0,05 %). El tampón de lavado se aspiró y los tubos se lavaron 2  
veces adicionales con tampón de lavado. Después del tercer lavado, se añadieron 0,4 ml de anticuerpo policlonal  
25 anti-PAG marcado con biotina diluido 1:2000 en tampón de dilución (SuperblockT20™ al 10 % en tampón de lavado)  
a cada tubo y se incubaron durante 15 min a 37 °C en un baño de agua. Después de la incubación, los tubos se  
aspiraron y se lavaron dos veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron 0,4 ml de estreptavidina-  
PoliHRP20 (1:30000) en tampón de dilución a cada tubo y se incubaron durante 15 min a 37 °C en un baño de agua.  
Después de la tercera incubación, el contenido de cada tubo se aspiró y el tubo se lavó dos veces con tampón de  
30 lavado. A continuación, se añadieron 0,4 ml del sustrato de HRP, SureBlueReserve™, y se incubaron a temperatura  
ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, se observó un color azul oscuro en los tubos que recibieron  
muestras de vacas preñadas (FIG. 10). Los tubos que recibieron muestras de animales no preñados permanecieron  
transparentes (FIG. 10). El color puede leerse visualmente para inferir el estado de preñez. Sin embargo, para  
cuantificar el color en el laboratorio, se añadió un volumen igual (0,4 ml) de solución de parada (HCl 1 N) a cada  
35 tubo que cambió de color azul a amarillo. Después se transfirió un alícuota (0,2 ml) de cada muestra a una placa  
ELISA y se registró la densidad óptica a 430 nm. Los valores de DO por encima o iguales a 0,2 se consideraron  
"preñada" y valores por debajo se consideraron "no preñadas". El punto de corte de la intensidad de color de 0,2 DO  
se estableció previamente con las muestras del panel del ensayo de plasma que se usó para el diagnóstico de  
preñez.

40 Lo siguiente es un breve resumen de las etapas para el procedimiento del ensayo en tubo:

1. Añadir 400 µl de muestra, 15 min a 37 °C
2. Lavar 3x para sangre, 2x para plasma
3. Añadir 400 µl de marcador biotina, 15 min a 37 °C
4. Lavar 2x
- 45 5. Añadir 400 µl de Poli-HRP20, 15 min a 37 °C
6. Lavar 2x
7. Añadir 400 µl de SureBlue Reserve™
8. Leer - 5 min-15 (azul = preñada; transparente = receptiva (no preñada))

#### Definiciones de los parámetros del análisis de ensayo:

50 **Sensibilidad:** Capacidad del ensayo de sangre de identificar vacas preñadas como preñadas

**Especificidad:** Capacidad del ensayo de sangre de identificar vacas receptivas (no preñadas) como vaca no  
preñada

55 **Ventajas del ensayo de color:** Los suministros del ensayo incluyen un tubo de sangre de tapón púrpura (3,0 ml con  
K<sub>2</sub>EDTA) para la recogida de sangre, tubos prerrecubiertos, reactivos, frasco con atomizador y pipetas de  
transferencia. Se requiere una incubadora a 37 °C/retorno de agua/bloqueo. A diferencia del ELISA en placa, este  
ensayo no requiere una centrifuga para separar el plasma ya que puede usarse sangre completa directamente en el  
ensayo. El ensayo tampoco requiere equipos como agitador de placa, equipo para el lavado (lavadora de placas) o  
lectura (lector de placas). El lavado puede conseguirse con los frascos con atomizador y las pipetas de transferencia

se usan para la eliminación de la solución de tampón de lavado entre los lavados. El color puede leerse visualmente. Sin embargo, en el laboratorio, al final del ensayo de color (después de la etapa 8), se añaden 0,4 ml de solución de parada HCl 1 N a todos los tubos y se transfiere una alícuota (0,2 ml) a una placa ELISA y se registra la intensidad del color en un lector de placas. El tiempo de ensayo total es de aproximadamente 2 horas en comparación con un ELISA convencional en placa (4 horas). Este ensayo de color puede combinarse opcionalmente, tal como con placas de 96 pocillos, 48 pocillos o 24 pocillos.

**Resultados.** Los resultados del ensayo de color con el panel de ensayo de plasma del día 28 (20 muestras no preñadas y 20 preñadas) se muestran en la FIG. 11A, y los resultados del ensayo con el panel de ensayo de plasma del día 55 (20 muestras no preñadas y 20 preñadas) se muestran en la FIG. 11B. Todas las muestras no preñadas tienen un valor de intensidad de color  $\leq 0,2$  DO mientras que las muestras preñadas muestran intensidad de color  $> 0,2$  DO.

Usando este valor de punto de corte, ambos paneles de ensayo (FIG. 11A y 11B) mostraron  $>95$  % de sensibilidad y especificidad. También se ensayó un conjunto de plasma fresco en este sistema y demostró proporcionar una clara separación de las vacas no preñadas y las vacas preñadas (FIG. 12).

### Ejemplo 7

#### Conceptos de ensayo en granja: prueba de preñez bovina de color (tubos de plástico)

El ensayo se realizó "en granja" como se describe usando un baño de agua a 37 °C y sin equipo adicional. En este ensayo de campo, se ensayaron 58 muestras de sangre. El ensayo de color se realizó con 0,4 ml de muestras de sangre (FIG. 13) y la confirmación de la preñez se consiguió por ultrasonidos (FIG. 14). El color se leyó por tres personas y no hubo desacuerdo en la valoración visual de los resultados del ensayo. El ensayo de color era capaz de identificar las 14 vacas preñadas. Los 3 individuos valoraron "no concluyentes" 2 muestras debido a un fondo azul y las muestras se encontraron que eran "no preñadas". Este ensayo de campo demostró una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92,5 % (37/40) en comparación con ultrasonidos.

### Ejemplo 8

#### Prueba de preñez de color basada en inmunoensayo de tipo sándwich (tubos de plástico)

**Materiales y procedimientos.** Se desarrolló un ensayo basado en inmunoensayo de tipo sándwich usando el anticuerpo monoclonal contra PAG 2D9 anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal de conejo marcado con biotina, anticuerpo secundario. El anticuerpo monoclonal contra PAG se recubre dentro de un tubo de plástico transparente o pocillo y sirve como trampa. Los tubos usados eran tubos internamente acanalados para aumentar el área superficial para el recubrimiento con anticuerpo (Evergreen Scientific, Los Ángeles, CA). El complejo se detecta con el sistema de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano rústicano)/sustrato de HRP. Se obtuvo estreptavidina-Poli-HRP20 de Research Diagnostics Inc., Concord, MA, y la peroxidasa de rábano rústicano se obtuvo de KPL, Inc., Gaithersburg, MD. La detección del complejo se indica por un color (azul o amarillo) en el tubo o pocillo, que indica la presencia de PAG en la muestra. La información respecto al establecimiento general de un ELISA para la detección de PAG en el suero de vacas preñadas y novillas puede encontrarse en Green y col., 2005. El patrón de ensayo fue 0,5 ng a 6,0 ng. El ensayo tarda aproximadamente 4 horas en completarse.

El ensayo puede realizarse con suministros simples de laboratorio en una granja o sitio comparable. En este ejemplo, una incubadora a 37 °C y pipetas son los únicos componentes necesarios además de los suministros de reactivos. El concepto de ensayo de color puede combinarse con Ovsynch, Resynch e inseminación artificial temporizada (TAI) como parte de una herramienta de tratamiento reproductor para ganado vacuno. El concepto de ensayo también se amplió a otros análisis, tales como progesterona y otros antígenos de preñez para aumentar la precisión del diagnóstico y para una detección anticipada de preñez antes del día 26. La combinación puede realizarse usando, por ejemplo, placas de 96 pocillos o 48 pocillos o usando múltiples tubos.

**Tabla 2.** Reactivos de ensayo, suministros e información del proveedor

Artículo	Reactivos/suministros de ensayo	Propósito	Información del proveedor
1	Anticuerpo monoclonal 2D9	Anticuerpo de recubrimiento	
2	Anticuerpo policlonal de conejo	Anticuerpo marcado con biotina	
3	Estreptavidina-Poli peroxidasa de rábano rústicano (HRP) 20	Amplificación de señal	Research Diagnostics Inc., Concord, MA
4	Sure Blue Reserve™	Sustrato de color para HRP	KPL Inc, Gaithersburg, MD
5	Super Block	Usado en tampón de bloque, tampón de lavado y tampón de dilución	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL

(continuación)

Artículo	Reactivos/suministros de ensayo	Propósito	Información del proveedor
6	Tubos internamente acanalados, tubo de 12 x 75 mm, de poliestireno con 6 nervaduras inferiores.	Tubo usado para el ensayo	Evergreen Scientific, Los Ángeles, CA
7	Solución salina tamponada con fosfato	Medio tamponante para el recubrimiento, bloqueo, lavado y dilución de biotina-IgG, reactivos de HRP.	Roche
8	Kit de marcaje con biotina (5 reacciones) y kit de diálisis, Slide-A-Lyzer™	Preparación de IgG marcado con biotina	Roche
9	Tween 20	Detergente usado en tampón para recubrimiento, bloqueo, lavado y dilución de biotina-IgG, reactivos de HRP a concentración del 0,05 %.	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.
10	Carbonato sódico	Tampón de recubrimiento con anticuerpo	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

**Resultados.** Se evaluaron las pruebas de preñez de 797 muestras de sangre recogidas de animales del día 26 y el día 28, para la sensibilidad y especificidad comparando con los resultados de ultrasonidos del día 29 y de palpación rectal en el día 60. Se obtuvieron muestras de plasma. Un punto de corte de 0,2 unidades DO para el diagnóstico de preñez. La Tabla 3 muestra la precisión del ensayo de sangre en comparación con el diagnóstico de preñez basado en ultrasonidos del día 29 y palpación rectal del día 60.

**Tabla 3.** Análisis de la precisión del ensayo de sangre en comparación con ultrasonidos en el día 29 (US) y palpación rectal en el día 60

Día del ensayo de sangre	Día 26		Día 28	
	Número de vacas ensayadas	357	357	797
Comprobación de preñez	US del día 29	Palpación del día 60	US del día 29	Palpación del día 60
Sensibilidad	97,4 %	97,5 %	99,3 %	99,3 %
Especificidad	90,1 %	91,2 %	90,9 %	91,2 %

Estos resultados muestran que una prueba de preñez bovina desarrollada con anticuerpo monoclonal contra PAG, 2D9, proporciona precisión comercialmente aceptable con bajos resultados falsos negativos. Este anticuerpo puede aplicarse en el desarrollo de formatos de ensayo rápido para detectar el estado de preñez de vacas tan pronto como en el día 26 después de la reproducción con alta sensibilidad y especificidad. Análisis adicionales mostraron que la precisión del ensayo puede mejorarse hasta una sensibilidad del 99 % y una especificidad del 94 % ajustando el valor de punto de corte a 0,35 unidades de DO.

### Ejemplo 9

#### Aislamiento de un subgrupo de proteínas PAG prematuras adecuadas para desarrollar una prueba de preñez bovina

**Recogida de tejido.** Se recogió tejido de cotiledón fetal de vacas preñadas prematuras de 50 a 60 días después de la inseminación. De cincuenta a sesenta días de preñez es un periodo preferido en la gestación porque el subgrupo de proteínas PAG prematuras representa un alta porcentaje de las proteínas PAG totales en o aproximadamente esta fase de gestación. Pero mientras el porcentaje de la proteína PAG prematura deseable es alto en o aproximadamente 50 a 60 días después de la inseminación, las proteínas totales y la cantidad de tejido disponible es pequeña. En o aproximadamente 61 a 250 después de la inseminación, las proteínas PAG totales y la cantidad de tejido cotiledón y carúncula fetales es mucho mayor.

**Procedimientos que pueden emprenderse para identificar las proteínas que se unen a 2D9 y para ubicar los sitios de unión de PAG a 2D9.** Hay cuatro enfoques que pueden adoptarse para identificar las proteínas que se unen a 2D9, para caracterizar y secuenciar el anticuerpo 2D9, y para ubicar los sitios de unión a 2D9. Se realizó el

siguiente estudio:

**1. Inmunoprecipitación de PAG (obtenidas de placenta del día 55) con perlas magnéticas recubiertas con 2D9.** Se acopla 2D9 purificado a perlas magnéticas Dynal activadas con tosilo de acuerdo con las directrices del fabricante (Dynal). Las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo se incubaron con 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG durante 30 minutos en PBS 1x y se lavaron ampliamente con el mismo tampón. Las proteínas unidas se eluyeron usando ácido acético pH 3,0 y se sometieron a análisis en gel y de transferencia de Western. El análisis de Western se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteínas inmunorreactivas se cortaron del SDS-PAGE y se sometieron a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina.

El siguiente procedimiento es un procedimiento de inmunoprecipitación alternativo que puede realizarse:

**2. Inmunoprecipitación de PAG (obtenidas de placenta del día 61 a 250) con perlas magnéticas recubiertas con 2D9.** Puede acoplarse 2D9 purificado a perlas magnéticas Dynal activadas con tosilo de acuerdo con las directrices del fabricante (Dynal). Las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo pueden incubarse con 100 µg de preparación de PAG durante 30 min en PBS 1x y pueden lavarse ampliamente con el mismo tampón. Las proteínas unidas pueden eluirse usando ácido acético pH 3,0 y pueden someterse a análisis en gel o de transferencia de Western. La transferencia de Western puede revelarse con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteínas inmunorreactivas después pueden cortarse de SDS-PAGE y someterse a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina. Puede purificarse una preparación altamente purificada del subgrupo de proteínas PAG prematuras (específicamente PAG 4, 6, 9, 20 y 21) usando este procedimiento.

Se realizó el siguiente estudio:

**3. Cromatografía de inmunoafinidad de extractos tisulares preparados a partir de tejidos de carúncula (endometrio) y cotiledón (placenta) del día 55 de preñez bovina.** En resumen, se acopló 2D9 purificado (10 mg) a 1 g de sepharose activado con CNBr de acuerdo con las directrices del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina de afinidad por 2D9 (aproximadamente 5,0 ml) se incubó con 25 ml de extracto tisular a pH 7,0 durante una noche para la unión. El siguiente, la resina se compactó en una columna y se lavó con PBS 1x para retirar los materiales no unidos y se eluyó con ácido acético pH 3,0. El pH del material eluido se neutralizó con Tris 1 M inmediatamente después de la elución hasta pH 7,0. El material eluido se sometió a análisis en gel o de transferencia de Western. La transferencia de Western se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteínas 1 a 7 se cortaron del SDS-PAGE y se sometieron a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina. Las identidades de las secuencias peptídicas se determinaron usando análisis BLAST.

Lo siguiente es un procedimiento cromatográfico alternativo que puede realizarse:

**4. Cromatografía de inmunoafinidad de extractos tisulares preparados a partir de tejido de carúncula (endometrio) y cotiledón (placenta) del día 61 a 250 de preñez bovina.** En resumen, puede acoplarse 2D9 purificado (10 mg) a 1 gramo de sepharose activado con CNBr de acuerdo con las directrices del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina de afinidad por 2D9 (aproximadamente 5,0 ml) puede incubarse con 25 ml de extracto tisular a pH 7,0 durante una noche para la unión. El siguiente día, la resina puede compactarse en una columna y lavarse con PBS 1x para retirar los materiales no unidos y puede eluirse con ácido acético pH 3,0. El pH del material eluido puede neutralizarse con Tris 1 M inmediatamente después de la elución hasta pH 7,0. El material eluido puede someterse a análisis en gel o de transferencia de Western. La transferencia de Western puede revelarse con anticuerpos policlonales de conejo anti-PAG. Las bandas de proteínas 1 a 7 pueden cortarse del SDS-PAGE y someterse a análisis CL-EM-EM después de digestión con tripsina. Las identidades de las secuencias peptídicas entonces pueden determinarse usando análisis BLAST. Puede purificarse una preparación altamente purificada del subgrupo de proteínas PAG prematuras (específicamente PAG 4, 6, 9, 20 y 21) usando este procedimiento.

## Ejemplo 10

### Identificación de PAG adicionales de unión a 2D9

Se descubrió que el MAb 2D9 reconoce cinco isoformas de PAG (4, 6, 9, 20 y 21) como se resumen en el Ejemplo 1. Estas isoformas se identificaron por secuenciación de péptidos por CL/EM/EM de muestras de PAG purificadas obtenidas de tejidos placentarios recogidos 55 días después de la reproducción. El MAb 2D9 se utilizó adicionalmente para la purificación e identificación de PAG por acoplamiento del anticuerpo a una resina activada con CNBr para crear una columna de inmunoafinidad. Las PAG presentes en una muestra purificada pueden unirse (reconocerse) por 2D9. De una manera similar, las PAG presentes en muestras de sangre completa o plasma bovino en el ELISA de PAG pueden unirse por 2D9 y provocar una respuesta ELISA positiva, indicando preñez. La elución de las PAG purificadas durante el procedimiento de inmunopurificación se modificó ajustando el pH de 3,0 a 2,5 con neutralización inmediata hasta pH 7,0 durante la recogida del eluyente. La visualización de las PAG purificadas por SDS-PAGE con muestras purificadas se realizó esencialmente como se describe anteriormente (por ejemplo, Ejemplo 1). Se observaron patrones de bandas similares, con tres bandas principales entre 50 y 75 kDa.

Además de los tejidos placentarios recogidos de vacas 55 días después de la reproducción, las PAG también se purificaron de tejidos placentarios recogidos de vacas 215 días después de la reproducción. Ciertos miembros de la familia de proteínas PAG (isoformas) se expresan de forma más prematura en la gestación que otros. El conjunto de PAG expresadas de forma prematura en la gestación se menciona comúnmente como PAG prematuras y el conjunto de PAG expresadas posteriormente en la gestación, se menciona comúnmente como PAG tardías. Los tejidos placentarios de 55 días después de la reproducción son representativos de una fase de gestación que expresa PAG prematuras, mientras que los tejidos placentarios de 215 días después de la reproducción son representativos de una fase de gestación que incluye la expresión de PAG tardías. La visualización de las PAG purificadas por SDS-PAGE de tejidos placentarios del día 55 y el día 215 muestra las mismas tres bandas entre 50 y 75 kDa para ambos, sin embargo, la proporción (intensidad) de la banda de peso molecular mayor es mayor de tejidos placentarios del día 215.

Los péptidos de muestras de PAG para tejidos placentarios tanto del día 55 como del día 215 se purificaron con una columna de inmovilización por afinidad por 2D9 y se analizaron por secuenciación de péptidos por CL/EM/EM para identificar la isoforma o isoformas de PAG presentes en las muestras. Las secuencias peptídicas se compararon con las secuencias de la isoforma de PAG obtenidas de la base de datos UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) enumeradas en la Tabla 4. La Tabla 5 muestra un resumen de los resultados de secuencia peptídica y su identificación como PAG correspondientes a secuencias de boPAG-16, boPAG-17 y boPAG-19 por análisis BLAST. "Carriles" y "bandas" (parte inferior, centro) mencionadas en la Tabla 5 se muestran en la FIG. 17. Se muestra un resumen de las isoformas de PAG caracterizadas en las muestras de PAG purificadas en la Tabla 6.

**Tabla 4.** Isoformas de PAG con los números de acceso a UniProt (SEQ ID NO: 51-62)

Isoforma de PAG	Número de acceso
1	Q29432
4	046492
6	046494, A5PJW4
9	046497, A4FV16
16	Q9TTV8
17	Q9TTV7, A7MBA4
19	Q9TTV5
20	Q9TTV4
21	Q9TTV3

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de secuencia peptídica (incluyendo las SEQ ID NO: 63-74). "MH+" = masa a carga del péptido más agua; "Carga" = estado de carga iónica; "P(pep)" = probabilidad de secuencia peptídica; "Inicio" = aminoácido de inicio de la proteína con la que se alinea el péptido; "Final" = aminoácido de parada de la proteína con la que se alinea el péptido.

<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas del Carril 2 (parte inferior), Carril 3 (centro), Carril 6 (centro), Carril 7 (centro y parte inferior)</b>					
Glucoproteína 16 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi75074836)					
MH+	Carga	Inicio	Final	P(pep)	Secuencia peptídica
1389,65796	2	215	229	2,54E-05	REGSVVMFGGVDHRY (SEQ ID NO: 63)
1046,53052	2	361	370	6,28E-04	RLYFSVFDRLG (SEQ ID NO: 64)
1770,90613	2	197	212	7,51E-06	NQGAISDPIFAFYLSK (SEQ ID NO: 65)
<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas del Carril 2 (parte inferior), Carril 3 (parte inferior), Carril 4 (parte inferior), Carril 5 (parte inferior), Carril 6 (parte inferior), Carril 7 (parte inferior)</b>					
Glucoproteína 17 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi75074835)					
MH+	Carga	Inicio	Final	P(pep)	Secuencia peptídica
1389,65796	2	215	229	2,54E-05	REGSWMFGGVDHRY (SEQ ID NO: 66)
1035,58337	2	138	148	1,69E-05	KGLLVYDTRVRI (SEQ ID NO: 67)
1046,53052	2	361	370	6,28E-04	RLYFSVFDRLG (SEQ ID NO: 68)
1771,89014	2	196	213	7,53E-07	KNEGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO: 69)

(continuación)

<b>N.º de banda de proteína: Presente en las bandas del Carril 3 (centro), Carril 4 (centro), Carril 5 (centro), Carril 6 (centro)</b>					
Glucoproteína 19 asociada a preñez de <i>Bos taurus</i> (gi75051662)					
MH+	Carga	Inicio	Final	P(pep)	Secuencia peptídica
1760,83850	3	212	229	1,00E-06	KDKQEGSVVMFGGVDHRY (SEQ ID NO: 70)
1088,53711	2	126	137	4,36E-06	KTFSITYGSGRI (SEQ ID NO: 71)
2243,06616	3	213	231	1,32E-03	DKQEGSVVMFGGVDHRYR (SEQ ID NO: 72)
1046,53052	2	361	370	9,55E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO: 73)
1770,90613	2	196	213	6,03E-09	KNQGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO: 74)

**Tabla 6.** Isoformas de PAG caracterizadas en tejidos placentarios del día 55 y el día 215

Tipo de tejido del día 55	Isoformas de PAG	Tipo de tejido del día 215	Isoformas de PAG
carúncula	4, 6, 9, 16, 17, 21	carúncula	4, 6, 9, 17, 19, 21
cotiledón	4, 6, 9, 16, 17, 19, 21	cotiledón	4, 6, 9, 16, 17, 19, 21
carúncula/cotiledón	4, 6, 9, 17, 19	carúncula/cotiledón	4, 6, 9, 16, 17, 21

- 5 Las secuencias polipeptídicas mostradas en la Tabla 4 se alinearon usando PROTDIST v. 3.5c, por ejemplo, del paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989). Se usó el paquete de análisis Neighbor Phylogenetic Tree de PROTDIST sobre las secuencias alineadas para generar el árbol mostrado en la FIG. 15. Las alineaciones de las PAG se muestran en la FIG. 16. Este análisis de las isoformas 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21 de PAG se realizó para visualizar la relación de las isoformas basándose en sus regiones de similitud y diferencia. De acuerdo con el análisis, las PAG 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21 se agrupan juntas, dejando aparte PAG1.

### Referencias

- Patentes de Estados Unidos 3.646.346; 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.275.149; 4.277.437; 4.366.241; 4.367.110; 4.376.110; 4.452.901; 4.668.621; 4.699.880; 5.721.105; y 6.869.770.
- Publicaciones de patente de Estados Unidos 2003/508381 y 20050100975.
- 15 Abbondanzo y col., *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.
- Allred y col., *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(149), 1990.
- Atkinson y col., *J. Biol. Chem.*, 268(35):26679-26685, 1993.
- Ausubel y col., en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994; 1992.
- 20 Beal y col., *J. Anim. Sci.*, 70:924-929, 1992.
- Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith (Ed.), Academic Press, NY, 1993.
- Boulianne y col., *Nature*, 312:643-646, 1984.
- Brown y col., *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 192 (n.º 191), 1990.
- Butler y col., *Biol. Reprod.*, 26:925-933, 1982.
- Cabilly y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3273-3277, 1984.
- 25 Cameron y Malmo, *Austr. Vet. J.*, 70:109-111, 1993.
- Capaldi y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Chardes y col., *FEBS Lett.*, 452(3):386-394, 1999.
- Colligan y col., en: *Current Protocols in Immunology*, Greene Publ. Assoc. Wiley Interscien, NY, 1993.
- 30 Computational Molecular Biology, Lesk (Ed.), Oxford University Press, NY, 1988.
- Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin y Griffin (Eds.), Humana Press, NJ, 1994.
- Cumber y col., *J. Immunology*, 149B:120-126, 1992.
- Engvall, *Lancet*, 2(8000):1410, 1976.
- Engvall, *Med Biol.*, 55(4):193-200, 1977.
- Engvall, *Methods Enzymol*, 70(A):419-39, 1980.
- 35 Felsenstein, *Cladistics* 5:164-166, 1989.
- Green y col., *Theriogenology*, 63(5):1481-1503, 2005.
- Green y col., *Biol Reprod* 62:1624-1631, 2000.
- Green y col., *Biol Reprod* 60:1069-1077, 1999.
- Gripenberg y col., *Scand J Immunol.*, 7(2):151-7, 1978.
- 40 Guruprasad y col. *Protein Eng* 9:849-856, 1996.
- Hall, *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

- Harlow y Lane, en: *Antibodies, a Laboratory, Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 139-281, 1988.  
 Hatzidakis y col., *J. Reprod Fertil.*, 98:235-240, 1993.  
 Higgins y Sharp *CABIOS*. 5:151-153 (1989)  
 Holdsworth y col., *J. Endocrin.*, 95:7-12, 1982.  
 5 Hughes y col., *Mol Biol Evol.* 20:1940-1945, 2003.  
 Humblot y col., *Theriogenol.*, 30:257-268, 1988.  
 Kiracofe y col., *J. Anim. Sci.*, 71:2199-2205, 1993.  
 Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.  
 Leibiger y col., *Biochem J.*, 338:529-538, 1999.  
 10 Liu y col. *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.  
 Makler y col., *Transfusion*, 21(3):303-312, 1981.  
 Markusfeld y col., *Br. Vet. J.*, 146: 504-508, 1990.  
 Mialon y col., *Reprod Nutr. Dev.*, 33:269-282, 1993.  
 Mialon y col., *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:65-72, 1994.  
 15 Mo y col., *Eur. J. Immunol.*, 23:2503-2510, 1993.  
 Nakamura y col., en: *Handbook of Experimental Immunology* (4.<sup>a</sup> Ed.), Weir y col. (Eds.), 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.  
 Neuberger y col., *Nature*, 314:268-270, 1985.  
 Oltenacu y col., *J. Dairy Sci.*, 73:2826-2831, 1990.  
 20 Pack y col., *Biochem.*, 31:1579-1584, 1992.  
 Documento WO 98/16832  
 Sarngadharan y col., *Princess Takamatsu Symp.*, 15:301-8, 1984.  
 Sasser y col., *Biol. Reprod.*, 35:936-942, 1986.  
*Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje (Ed.), Academic Press, 1987.  
 25 *Sequence Analysis Primer*, Gribkov y Devereux (Eds.), Stockton Press, NY, 1991.  
 Szafranska y col., *Biol. Reprod.*, 53:21-28, 1995.  
 Wagner y col., *Science*, 260(5113):1510-1513, 1993  
 Warnick y col., *Theriogenol.*, 44:811-825, 1995.  
 Xie y col., *Biol. Reprod.*, 51:1145-1153, 1994.  
 30 Xie y col., *Biol. Reprod.*, 54: 122-129, 1996.  
 Xie y col., *Biol. Reprod.*, 57:1384-1393, 1997.  
 Xie y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10247-10251, 1991.  
 Xie y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12809-12816, 1997.  
 35 Zoli y col., *Biol. Reprod.*, 45:1-10, 1991.  
 Zoli y col., *Biol. Reprod.*, 46:83-92, 1992.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC MATHIALAGAN, NAGAPPAN ROBERTS, R. MICHAEL McGRATH,  
 MICHAEL F. GREEN, JONATHAN  
 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO PREMATURO DE LA GRAVIDEZ  
 <130> MONS:108WO (37-21(54290))  
 45 <140> DESCONOCIDO  
 <141> 12-12-2008  
 <150> 61/013.603  
 <151> 13-12-2007  
 50 <160> 74  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 55 <210> 1  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de cadena ligera de fragmento de anticuerpo artificial  
 <400> 1

ES 2 623 459 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 2

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia peptídica de cadena pesada de fragmento de anticuerpo artificial

<400> 2

ES 2 623 459 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 3  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia peptídica de cadena ligera de fragmento de anticuerpo artificial

10

<400> 3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

ES 2 623 459 T3

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

Arg

<210> 4

<211> 448

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica de cadena pesada de fragmento de anticuerpo artificial

10

<400> 4

# ES 2 623 459 T3

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

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



ES 2 623 459 T3

	275		280		285														
	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val			
		290					295					300							
	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe			
	305					310					315					320			
	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr			
					325					330					335				
	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile			
				340					345					350					
	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys			
			355					360					365						
	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp			
		370					375					380							
	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp			
	385					390					395					400			
	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser			
					405					410					415				
	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly			
				420					425					430					
	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys			
			435					440					445						

<210> 5

<211> 695

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica cadena ligera de fragmento de anticuerpo 2D9

10

<400> 5

ES 2 623 459 T3

cggttcctgc ttccagcagt gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca 60  
 gtcttggaga tcaagcctcc atttcttgca gatctaggca gagcattgta catagtaatg 120  
 gaaacaccta tttagaatgg ttctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct 180  
 acaaagtttc caaccgattt tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga 240  
 cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct 300  
 ttcaaggttc acatgttccg ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg 360  
 ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag 420  
 gtgcctcagt cgtgtgcttc ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga 480  
 agattgatgg cagtgaacga caaaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca 540  
 aagacagcac ctacagcatg agcagcacc ccaacgttgac caaggacgag tatgaacgac 600  
 ataacagcta tacctgtgag gccactcaca agacatctac ttcaccatt gtcaagagct 660  
 tcaacaggaa tgagtgttag agacaaaggt cctga 695

<210> 6  
 <211> 1429  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica cadena pesada de fragmento de anticuerpo 2D9

10

<400> 6

ES 2 623 459 T3

gctacaggtg tccactccca ggttcagctg cagcagctctg gagctgagct gatgaagcct 60  
 ggggcctcag tgaagatata ctgcaaggct actggctaca tattcagtaa ctactggatg 120  
 gagtgggtaa agcagaggcc tggacatggc cttgagtgga ttggagagat tttacctgga 180  
 agtgatatta ctaactacaa tgagaagtgc aaggacaagg ccacattcac tgcagattca 240  
 tcctccaaca cggcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgccgtctat 300  
 tactgtgcaa gagctgggag tggttactac ggggtatatt actatgctat ggactactgg 360  
 ggtaaggaa cctcagtcac cgtctcctca gccaaaacga caccctcctc tgtctatcca 420  
 ctggccccctg gatctgctgc ccaaactaac tccatgggta ccctgggatg cctgggtcaag 480  
 ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc tggaaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg 540  
 cacaccttc cagctgtcct gcagctctgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc 600  
 ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc acctgcaacg ttgccaccgc gccagcagc 660  
 accaaggtgg acaagaaaat tgtgccagg gattgtgggt gtaagccttg catatgtaca 720  
 gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc ccccaaaagc ccaaggatgt gctcaccatt 780  
 actctgactc ctaaggtcac gtgtgtttgtg gtagacatca gcaaggatga tcccagggtc 840  
 cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag gtgcacacag ctgagacgca accccgggag 900  
 gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 960  
 ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgacg ctttcctctg ccccatcgag 1020  
 aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg aaggctccac aggtgtacac cattccacct 1080  
 cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc 1140  
 cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtggt aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac 1200  
 actcagccca tcatggacac agatggctct tacttctgtct acagcaagct caatgtgcag 1260  
 aagagcaact gggaggcagg aaatactttc acctgctctg tgttacatga gggcctgcac 1320  
 aaccaccata ctgagaagag cctctcccac tctcctggta aatgatccca aagtccttgg 1380  
 agccctctgg tcctacagga ctactgcagg tgtccactcc cctcaaaca 1429

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 7

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

<210> 8  
 <211> 11

ES 2 623 459 T3

<212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 8  
 5  
                   Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys  
                   1                  5                  10  
 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 9  
 10  
                   Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys  
                   1                  5                  10                  15  
 <210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 10  
 15  
                   Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg  
                   1                  5                  10                  15  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 11  
 20  
                   Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu  
                   1                  5                  10                  15  
                   Val Asn Asn Ile Trp Lys  
                                   20  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 12  
 25  
                   Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
                   1                  5  
 <210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 13  
 30  
                   Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys  
                   1                  5                  10                  15  
 <210> 14  
 <211> 11

ES 2 623 459 T3

<212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 14  
 5                    Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys  
                      1                    5                    10  
 <210> 15  
 <211> 16  
 10 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 15  
                   Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys  
 15                    1                    5                    10                    15  
 <210> 16  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 20 <213> *Bos taurus*  
 <400> 16  
                   Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg  
 25                    1                    5                    10                    15  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 30 <213> *Bos taurus*  
 <400> 17  
                   Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu  
                      1                    5                    10                    15  
                   Val Asn Asn Ile Trp Lys  
    20  
 35 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 40 <400> 18  
    Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
    1                    5  
 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 19  
 50                    Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys  
                      1                    5  
 <210> 20  
 <211> 8

ES 2 623 459 T3

<212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 20  
 5 Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
 1 5  
 <210> 21  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 21  
 Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg  
 15 1 5 10  
 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> *Bos taurus*  
 <400> 22  
 Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met Lys  
 25 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 30 <400> 23  
 Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys  
 35 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 40 <400> 24  
 Phe Asp Gly Val Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Pro Ile Phe Tyr Lys  
 20  
 45 <210> 25  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

ES 2 623 459 T3

<400> 25  
Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys  
1 5 10 15

5 <210> 26  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

10 <400> 26  
Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys  
1 5 10 15

15 <210> 27  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

20 <400> 27  
Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln Val Gly Asp Trp Phe Val  
1 5 10 15

His Met Asp Arg  
20

25 <210> 28  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

30 <400> 28  
Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu  
1 5 10 15

Ser Lys

35 <210> 29  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 29  
Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys  
1 5 10

45 <210> 30  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 30  
Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg  
1 5 10 15

50

ES 2 623 459 T3

<210> 31  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

5

<400> 31

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

10

<210> 32  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

15

<400> 32

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
1 5

20

<210> 33  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

25

<400> 33

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
1 5

30

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

35

<400> 34

Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr Val Arg  
1 5

40

<210> 35  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

45

<400> 35

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr  
1 5 10 15

Lys

50

<210> 36  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 36

ES 2 623 459 T3

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr  
 1 5 10 15

Lys

5 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 37

10 Glu Thr Trp Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg  
 1 5 10

15 <210> 38  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 38

Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln  
 1 5 10 15

Tyr Tyr Lys

20 <210> 39  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

25 <400> 39

Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys  
 1 5 10

30 <210> 40  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

35 <400> 40

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

Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg  
 20

40 <210> 41  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

45 <400> 41

ES 2 623 459 T3

Thr Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly  
 1 5 10 15

Thr Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg  
 20 25

5 <210> 42  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 42

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

10 Ser Lys

15 <210> 43  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 43

20 Gln Lys Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg  
 1 5 10

25 <210> 44  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 44

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

30 <210> 45  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

35 <400> 45

Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
 1 5

40 <210> 46  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 46

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

50 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

ES 2 623 459 T3

<400> 47

Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Leu Ile Lys  
20

5 <210> 48  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

10 <400> 48

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

Glu Tyr Gly Phe Lys  
20

15 <210> 49  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

20 <400> 49

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

Glu Ala Ile Pro Ile Phe Asp Lys  
20

25 <210> 50  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 50

30 Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg  
1 5 10 15

35 <210> 51  
<211> 380  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 51

ES 2 623 459 T3

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Leu Lys Thr Met Arg Asn Val Val Ser  
20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Ser Leu  
35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr His Pro Leu Arg  
50 55 60

Asn Ile Lys Asp Leu Val Tyr Met Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp  
85 90 95

Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg  
100 105 110

Phe Arg His Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe  
115 120 125

Arg Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp  
130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asn Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu  
145 150 155 160

Ser Ile Glu Glu Tyr Gly Phe Glu Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Val Leu  
165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
180 185 190

ES 2 623 459 T3

Asp Lys Leu Lys Asn Gln Arg Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe  
 195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
 210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Glu Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile  
 225 230 235 240

Gln Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Ile Glu Arg  
 245 250 255

Lys Ile Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly  
 260 265 270

Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg  
 275 280 285

Leu Ile Gly Ala Ile Pro Arg Gly Ser Glu His Tyr Val Pro Cys Ser  
 290 295 300

Glu Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn  
 305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Gly Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Asp Arg Gly Arg  
 325 330 335

Cys Tyr Thr Thr Phe Gln Glu Asn Arg Val Ser Ser Ser Thr Glu Thr  
 340 345 350

Trp Tyr Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp  
 355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
 370 375 380

<210> 52  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 52

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15

10

ES 2 623 459 T3

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Thr Lys Thr Leu Ser  
 20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Val Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu  
 35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg  
 50 55 60

Asn Ile Arg Asp Phe Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Glu Leu Trp  
 85 90 95

Val Pro Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Lys His Asp Arg  
 100 105 110

Phe Arg His Leu Glu Ser Ser Thr Phe Arg Leu Ser Arg Arg Thr Phe  
 115 120 125

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile Glu Ala Leu Val Val His Asp  
 130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Gln Phe Gly Leu  
 145 150 155 160

Cys Leu Glu Glu Ser Gly Phe Glu Gly Met Arg Phe Asp Gly Val Leu  
 165 170 175

Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
 180 185 190

Tyr Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe  
 195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
 210 215 220

Ala Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met  
 225 230 235 240

Lys Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg  
 245 250 255

Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly



ES 2 623 459 T3

Ala Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Ser Cys Ala Ala His Val Arg Phe  
100 105 110

Arg His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg  
115 120 125

Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp Thr  
130 135 140

Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys  
145 150 155 160

Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Gly Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu Gly  
165 170 175

Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp  
180 185 190

Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr  
195 200 205

Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val  
210 215 220

Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln  
225 230 235 240

Val Gly Asp Trp Phe Val His Met Asp Arg Thr Thr Met Lys Arg Lys  
245 250 255

Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr  
260 265 270

Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys Leu  
275 280 285

Ile Arg Ala Arg Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala  
290 295 300

Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr  
305 310 315 320

Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys  
325 330 335

ES 2 623 459 T3

Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp  
 340 345 350

Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
 355 360 365

Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
 370 375

<210> 54  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 54

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Asn Ala Ile Ser  
 20 25 30

Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Ile Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu  
 35 40 45

Pro Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr His Pro Leu Arg Asn  
 50 55 60

Ile Arg Asp Leu Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro Pro  
 65 70 75 80

Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp Val  
 85 90 95

Ala Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Ser Cys Ala Ala His Val Arg Phe  
 100 105 110

Arg His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg  
 115 120 125

Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp Thr  
 130 135 140

Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys  
 145 150 155 160

Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Gly Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu Gly  
 165 170 175

10

ES 2 623 459 T3

Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp  
 180 185 190

Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr  
 195 200 205

Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val  
 210 215 220

Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln  
 225 230 235 240

Val Gly Asp Trp Phe Val His Met Asp Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys  
 245 250 255

Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr  
 260 265 270

Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys Leu  
 275 280 285

Ile Arg Ala Arg Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala  
 290 295 300

Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr  
 305 310 315 320

Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys  
 325 330 335

Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp  
 340 345 350

Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
 355 360 365

Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
 370 375

<210> 55  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 55

# ES 2 623 459 T3

Met Lys Trp Ile Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Gly Lys Asn Met Leu Lys Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu  
 35 40 45  
 Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg  
 50 55 60  
 Asn Ile Met Asn Leu Val Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
 85 90 95  
 Val Pro Ser Phe Cys Thr Met Pro Ala Cys Ser Ala Pro Val Trp Phe  
 100 105 110  
 Arg Gln Leu Gln Ser Ser Thr Phe Gln Pro Thr Asn Lys Thr Phe Thr  
 115 120 125  
 Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Met Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr  
 130 135 140  
 Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Val Val Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg Asn Tyr Asp Gly Val Leu Gly  
 165 170 175  
 Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp  
 180 185 190  
 Asn Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr  
 195 200 205  
 Leu Ser Lys Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val  
 210 215 220  
 Asp His Gln Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Ile Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Glu Trp Arg Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg Thr

ES 2 623 459 T3

```

                245                250                255
Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly Thr
      260                265                270
Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg Leu
      275                280                285
Ile Arg Thr Arg Pro Phe Asp Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Phe Ala
      290                295                300
Thr Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys Tyr
      305                310                315
Pro Met Thr Ala Arg Ala Tyr Ile Phe Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys
      325                330                335
Tyr Ser Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr Trp
      340                345                350
Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
      355                360                365
Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
      370                375

```

<210> 56  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 56

```

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

```

10

ES 2 623 459 T3

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
85 90 95

Val Pro Ser Phe Cys Thr Met Pro Ala Cys Ser Ala Pro Val Trp Phe  
100 105 110

Arg Gln Leu Gln Ser Ser Thr Phe Gln Pro Thr Asn Lys Thr Phe Thr  
115 120 125

Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Met Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr  
130 135 140

Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser  
145 150 155 160

Val Val Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg Asn Tyr Asp Gly Val Leu Gly  
165 170 175

Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp  
180 185 190

Asn Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr  
195 200 205

Leu Ser Lys Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val  
210 215 220

Asp His Gln Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Ile Glu  
225 230 235 240

Ala Gly Glu Trp Arg Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg Thr  
245 250 255

Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly Thr  
260 265 270

Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg Leu  
275 280 285

Ile Arg Thr Arg Pro Phe Asp Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Phe Ala  
290 295 300

Thr Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys Tyr  
305 310 315 320

ES 2 623 459 T3

Pro Met Thr Ala Arg Ala Tyr Ile Phe Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys  
 325 330 335

Tyr Ser Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr Trp  
 340 345 350

Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg  
 355 360 365

Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val  
 370 375

<210> 57  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 57

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser  
 20 25 30

Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu  
 35 40 45

Ser His Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg  
 50 55 60

Asn Ile Arg Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
 85 90 95

Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg  
 100 105 110

Phe Arg His Phe Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Thr Lys Thr Phe  
 115 120 125

Arg Ile Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Ala His Asp  
 130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asn Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu  
 145 150 155 160

10

ES 2 623 459 T3

Ser Met Ala Glu Tyr Gly Leu Glu Ser Arg Arg Phe Asp Gly Ile Leu  
165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Leu Ser Cys Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
180 185 190

Asp Lys Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Asp Pro Ile Phe Ala Phe  
195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile  
225 230 235 240

Arg Ala Gly Asp Trp Ile Val His Val Asp Arg Ile Thr Met Lys Arg  
245 250 255

Glu Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Ala Ala Leu Val Asp Thr Gly  
260 265 270

Thr Ser Leu Ile Gln Gly Pro Gly Arg Val Ile Asp Asn Ile His Lys  
275 280 285

Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser  
290 295 300

Val Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn  
305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Ala Pro Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Tyr  
325 330 335

Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Glu Gln Arg Val Arg Arg Ser Thr Glu Ser  
340 345 350

Trp Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp  
355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
370 375 380

<210> 58  
<211> 380  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

5

<400> 58

# ES 2 623 459 T3

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Trp Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Thr Tyr Ser Leu  
 35 40 45  
 Ser Gln Ile Ser Ser Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg  
 50 55 60  
 Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
 85 90 95  
 Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met  
 100 105 110  
 Phe Ile His Leu His Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe  
 115 120 125  
 Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp  
 130 135 140  
 Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Cys Ile  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ala Glu Val Gly Phe Asp Gly Ile Pro Phe Asp Gly Val Leu  
 165 170 175  
 Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Met Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
 180 185 190  
 Asp Asn Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe  
 195 200 205  
 Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
 210 215 220  
 Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile



# ES 2 623 459 T3

Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
 85 90 95

Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met  
 100 105 110

Phe Ile His Leu Tyr Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe  
 115 120 125

Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp  
 130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Cys Ile  
 145 150 155 160

Ser Leu Ala Glu Val Gly Phe Asp Gly Ile Pro Phe Asp Gly Val Leu  
 165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Met Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
 180 185 190

Asp Asn Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe  
 195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
 210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile  
 225 230 235 240

Gln Ala Gly Gly Trp Thr Val His Val Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg  
 245 250 255

Lys Ile Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Glu Ala Leu Val Asp Thr Gly  
 260 265 270

Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile Gln Lys  
 275 280 285

Leu Ile Gly Thr Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser  
 290 295 300

ES 2 623 459 T3

Val Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn  
305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Glu Ser His  
325 330 335

Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr  
340 345 350

Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp  
355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
370 375 380

5 <210> 60  
<211> 380  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*  
  
<400> 60

ES 2 623 459 T3

Met Lys Trp Leu Val Val Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Ala Leu Ser  
 20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu  
 35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ser His Pro Leu Arg  
 50 55 60

Asn Ile Lys Asp Leu Val Tyr Leu Ala Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Phe Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp  
 85 90 95

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

Phe Arg His Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe  
 115 120 125

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile Lys Gly Val Val Ala His Asp  
 130 135 140

ES 2 623 459 T3

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Met Ala Glu Tyr Gly Leu Glu His Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu  
165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Val Ser Ser Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe  
180 185 190

Asp Lys Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe  
195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Arg Gly Lys Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile  
225 230 235 240

Gln Ala Gly Asn Trp Ile Ile His Met Asp Ser Ile Ser Ile Glu Arg  
245 250 255

Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Val Ala Phe Val Asp Ile Gly  
260 265 270

Thr Ala Phe Ile Glu Gly Pro Lys Pro Leu Val Asp Asn Met Gln Lys  
275 280 285

Leu Ile Arg Ala Lys Pro Trp Arg Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser  
290 295 300

Ala Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn  
305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Gly Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Arg Arg  
325 330 335

Cys Tyr Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Leu Ser Pro Thr Thr Glu Phe  
340 345 350

Trp Met Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp  
355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val  
370 375 380

ES 2 623 459 T3

<210> 61  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 61

```

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1                               5                               10                               15

Phe Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
                               20                               25                               30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Lys Leu
                               35                               40                               45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg
 50                               55                               60

Asn Ile Trp Asp Ile Phe Tyr Ile Gly Thr Ile Thr Ile Gly Thr Pro
65                               70                               75                               80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp
                               85                               90                               95

Val Pro Ser Ile Ile Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Thr His Val Arg
                               100                               105                               110

Phe Arg His Arg Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe
                               115                               120                               125

Gly Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp
130                               135                               140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
145                               150                               155                               160

Ser Val Ala Glu Tyr Gly Phe Glu Gly Arg Arg Phe Asp Gly Val Leu
                               165                               170                               175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Lys Ala Ile Pro Ile Phe
                               180                               185                               190

Asp Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
195                               200                               205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Gln Lys Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
    
```

ES 2 623 459 T3

```

                210                      215                      220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
225                      230                      235                      240

Arg Ala Gly Asp Trp Ser Val His Val Asp Arg Ile Thr Met Lys Gly
                245                      250                      255

Glu Val Ile Gly Cys Ser Asp Gly Cys Thr Ala Met Val Asp Thr Gly
                260                      265                      270

Ser Ser Asn Ile Gln Gly Pro Gly Arg Val Ile Asp Asn Ile His Lys
                275                      280                      285

Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser
                290                      295                      300

Ala Val Ser Ala Leu Pro Ser Val Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
305                      310                      315                      320

Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Val Leu Lys Asp Phe Thr Gly Asn
                325                      330                      335

Cys Tyr Thr Thr Phe Lys Glu Lys Arg Val Arg Arg Ser Thr Glu Phe
                340                      345                      350

Trp Ile Leu Gly Glu Ala Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
                355                      360                      365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
                370                      375                      380

```

<210> 62  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 62

```

Met Lys Trp Val Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
1                      5                      10                      15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
                20                      25                      30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Gly Asn Arg Leu
                35                      40                      45

```

5

10

ES 2 623 459 T3

Ser Lys Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg  
50 55 60

Asn Ile Glu Asp Leu Met Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro  
65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Phe Trp  
85 90 95

Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Asp Cys Ile Thr His Val Arg  
100 105 110

Phe Arg Gln His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe  
115 120 125

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Arg Gly Val Val Val His Asp  
130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu  
145 150 155 160

Ser Val Ser Glu Tyr Gly Phe Lys Asp Arg Ala Tyr Asp Gly Ile Leu  
165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Ser Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ile Phe  
180 185 190

Asp Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Ile Phe Ala Phe  
195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly  
210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile  
225 230 235 240

Glu Glu Gly Asp Trp Ser Val Arg Met Asp Gly Ile Ser Met Lys Thr  
245 250 255

Lys Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly  
260 265 270

Thr Ser Leu Ile Lys Gly Pro Arg Lys Leu Val Asn Lys Ile Gln Lys  
275 280 285

ES 2 623 459 T3

Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Tyr Cys Ser  
 290 295 300

Ala Val Asn Ala Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn  
 305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Arg  
 325 330 335

Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Lys Gln Arg Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr  
 340 345 350

Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp  
 355 360 365

Arg Gly Asn Gly Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val  
 370 375 380

5 <210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 63

10 Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 64

20 Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly  
 1 5 10

25 <210> 65  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 65

30 Asn Gln Gly Ala Ile Ser Asp Pro Ile Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys  
 1 5 10 15

35 <210> 66  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 66

Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr  
 1 5 10 15

ES 2 623 459 T3

<210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 5  
 <400> 67  
  
 Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp Thr Val Arg Ile  
 1 5 10  
  
 10  
 <210> 68  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
  
 15  
 <400> 68  
  
 Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly  
 1 5 10  
  
 20  
 <210> 69  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
  
 25  
 <400> 69  
  
 Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser  
 1 5 10 15  
  
 Lys Asp  
  
 30  
 <210> 70  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
  
 <400> 70  
  
 Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His  
 1 5 10 15  
  
 35  
 Arg Tyr  
  
 40  
 <210> 71  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
  
 <400> 71  
  
 Lys Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile  
 1 5 10  
  
 45  
 <210> 72  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 50  
 <400> 72

ES 2 623 459 T3

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg  
1 5 10 15

Tyr Tyr Arg

5  
<210> 73  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 73

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

15  
<210> 74  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 74

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

20  
Lys Asp

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-8566, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 5 2. Una célula aislada depositada con el número de acceso de la ATCC PTA-8566, o una célula descendiente de la misma que produce el anticuerpo 2D9.
3. Un polinucleótido aislado que codifica un dominio de cadena pesada y ligera del anticuerpo que se une específicamente a los antígenos asociados a la preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21, en el que el dominio de cadena ligera se selecciona de:
- 10 una secuencia polipeptídica con el menos 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 1; y  
el dominio de cadena pesada se selecciona de:
- una secuencia polipeptídica con al menos 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y  
una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2.
4. El polinucleótido de la reivindicación 3, en el que el polinucleótido codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 3 y/o la cadena pesada de la SEQ ID NO: 4.
- 15 5. El polinucleótido de la reivindicación 3, en el que el polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5 y/o la SEQ ID NO: 6.
6. Un polipéptido aislado que comprende un anticuerpo que se une específicamente a los antígenos asociados a la preñez (PAG): PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21, en el que el dominio de cadena ligera de dicho anticuerpo se selecciona de:
- 20 una secuencia polipeptídica con al menos 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 1; y  
el dominio de cadena pesada de dicho anticuerpo se selecciona de:
- 25 una secuencia polipeptídica con al menos 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID NO: 2.
7. El polipéptido de la reivindicación 6, en el que la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 3 y la cadena pesada del anticuerpo tiene el polipéptido de la SEQ ID NO: 4.
8. Un procedimiento para detectar la preñez en un animal bovino que comprende:
- 30 a) poner en contacto una muestra obtenida de un animal bovino con un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 6; y  
b) determinar si la muestra contiene al menos un primer antígeno asociado a la preñez (PAG) que es capaz de unirse específicamente por el anticuerpo o fragmento del mismo, en el que la presencia del PAG en la muestra es indicativa de la preñez.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que:
- 35 i) el anticuerpo o fragmento del mismo es el anticuerpo monoclonal 2D9;  
ii) dicha determinación de si la muestra contiene al menos un primer antígeno asociado a preñez comprende ELISA o transferencia Western;  
iii) dicha determinación de si la muestra contiene al menos un primer antígeno asociado a preñez comprende un ELISA de tipo sándwich que comprende la unión de un PAG al anticuerpo o fragmento del mismo fijado a un sustrato y una segunda preparación de anticuerpo marcada con una enzima;
- 40 iv) el PAG se selecciona de PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21; o  
v) el PAG es PAG6.
10. Un kit que comprende:
- 45 a) un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 6; y  
b) un recipiente para el anticuerpo o fragmento del mismo.
11. El kit de la reivindicación 10, en el que:
- 50 i) el kit se define adicionalmente como que contiene un medio para detectar específicamente la unión entre el anticuerpo o fragmento del mismo y al menos un primer antígeno asociado a la preñez (PAG);  
ii) el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un soporte;  
iii) dicho soporte es una placa de poliestireno, tubo de ensayo o varilla;

- iv) el kit comprende adicionalmente un marcador detectable;
- v) el kit comprende adicionalmente un marcador detectable que es una marca fluorescente o quimioluminiscente;
- vi) el kit comprende adicionalmente un marcador detectable que es una enzima; o
- vii) el kit comprende adicionalmente un marcador detectable que es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rústicano.

5

12. Un procedimiento de purificación de al menos un primer antígeno asociado a la preñez (PAG), que comprende:  
purificar al menos un primer PAG, respecto a una muestra obtenida de un animal bovino que comprende el al menos un primer PAG, basado en la afinidad del PAG por el anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o 6.

10

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que:  
i) la muestra se obtiene de placenta bovina del día 50 a 250;  
ii) la muestra se obtiene de placenta bovina del día 61 a 250; o  
iii) la purificación del PAG respecto a la muestra basada en la afinidad del PAG comprende inmunoprecipitación, transferencia de Western o cromatografía de inmunoafinidad.

15

**Cadena ligera de 2D9**

CGGTTCCCTGCTTCCAGCAGT**G**TGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTT  
GGAGATCAAGCCTCCATTTCTTGCAGATCTAGGCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAG  
AATGGTTCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG  
CGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT  
GAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGTTCACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGC  
TGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC  
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAATTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATT  
GATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCGAACAGTTGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA  
GCATGAGCAGCACCCCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCAC  
TCACAAGACATCTACTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGTCTCTGA

**FIG. 1**

**Cadena pesada de 2D9**

GCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAG  
 TGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACATATTCAGTAACTACTGGATGGAGTGGGTAAGCAGAGGCC  
 TGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGATATTACTAACTACAATGAGAAGTTC  
 AAGGACAAGGCCACATTCACTGCAGATTCATCTCCAACACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACAT  
 CTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGCTGGGAGTGGTTACTACGGGGTATATTACTATGCTAT  
 GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCA  
 CTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCC  
 CTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCT  
 GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTC  
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAATGTGCCAGGGATTGTGGTT  
 GTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCAAGGATGT  
 GCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCAGTGTGTTGTTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTC  
 CAGTTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCA  
 ACAGCACTTTCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAA  
 ATGCAGGTC AACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCG  
 AAGGCTCCACAGGTGTACACCATCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCT  
 GCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGAATGGCCAGCCAGCGGAGAA  
 CTACAAGAACACTCAGCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGCTACAGCAAGCTCAATGTGCAG  
 AAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATA  
 CTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGATCCCAAAGTCCTTGGAGCCCTCTGGTCTACAGGA  
 CTACTGCAGGTGTCCACTCCCCTCAAACA

**FIG.2**

Identificación de antígeno PAG de unión a 2D9 por análisis de CL-EM-EM

Glucoproteína ó asociada a preñez de Bos Taurus (NM176617)						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
853,4334	2	1686,865	147	162	94,87%	IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID NO:7)
615,2964	2	1210,602	183	193	95,45%	TFSGAFFFDK (SEQ ID NO:8)
886,4468	2	1752,872	196	211	98,95%	NEGAISEPVAFYLSK (SEQ ID NO:9)
592,9523	3	1757,815	212	227	89,57%	DKQEGSWMFGGVDHR (SEQ ID NO:10)
767,3938	3	2281,195	266	287	90,78%	ALVDTGTSDIVGSPSTLVNHWK (SEQ ID NO:11)
467,2134	2	914,4286	362	368	99%	YFSVFDR (SEQ ID NO:12)
Antígeno PAG de unión a 2D9						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Final	Valor	Secuencia peptídica
881,9511	2	1743,886	147	162	99,00%	IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID NO:13)
615,311	2	1210,602	183	193	99,00%	TFSGAFFFDK (SEQ ID NO:14)
886,4475	2	1752,872	196	211	99,00%	NEGAISEPVAFYLSK (SEQ ID NO:15)
592,966	3	1757,815	212	227	95,84%	DKQEGSWMFGGVDHR (SEQ ID NO:16)
767,404	3	2281,195	266	287	97,54%	ALVDTGTSDIVGSPSTLVNHWK (SEQ ID NO:17)
467,235	2	914,4286	362	368	84,44%	YFSVFDR (SEQ ID NO:18)

FIG.3A

Purificación por inmunoadfinidad de PAG con anticuerpo monoclonal 2D9

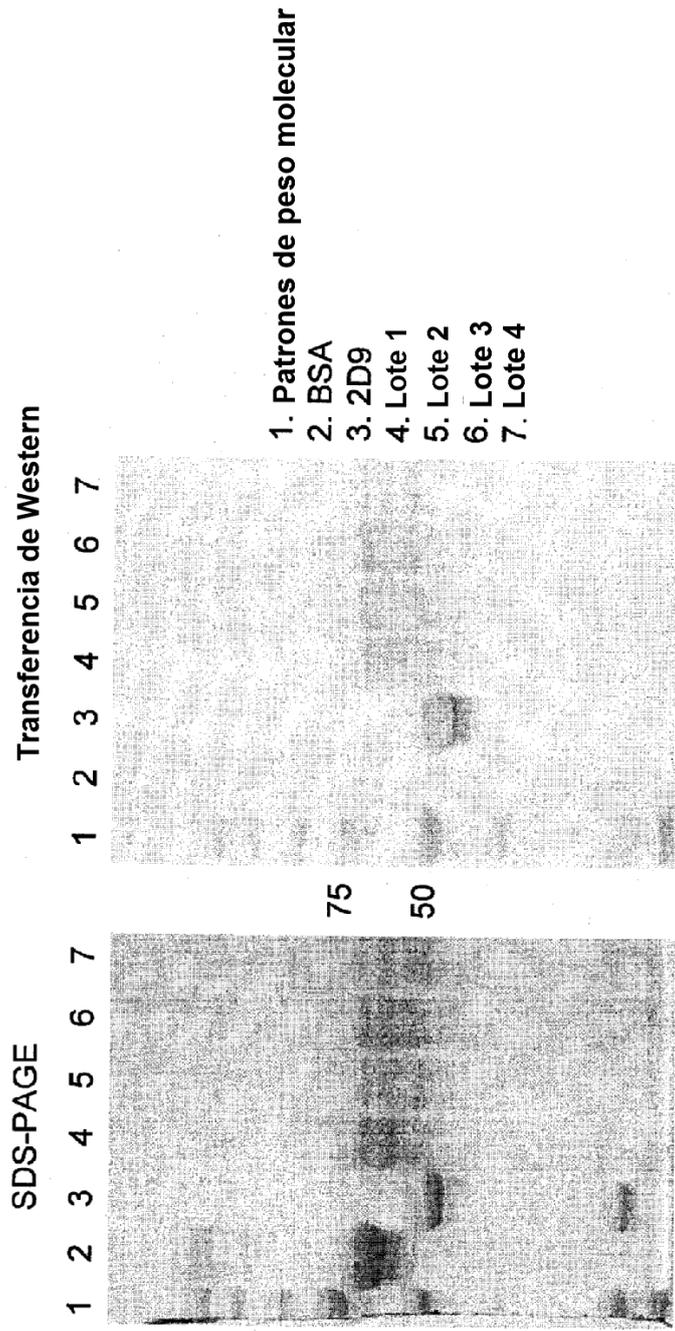
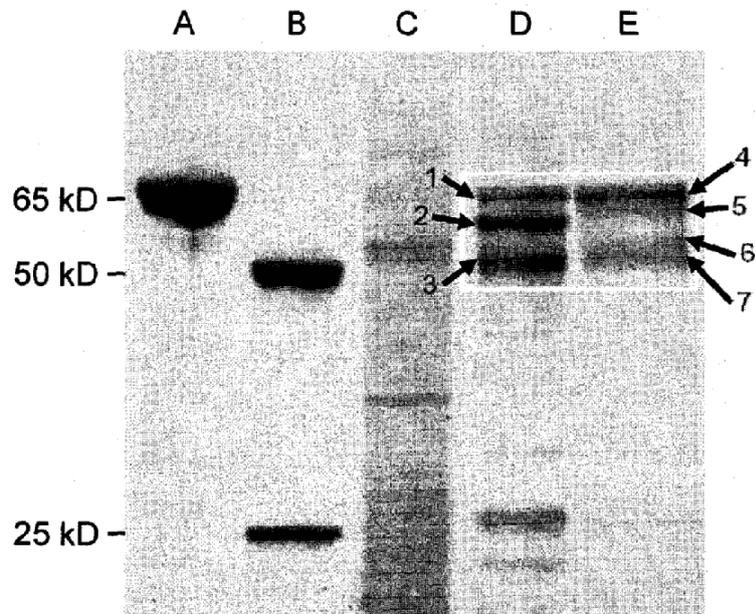


FIG.3B

**Identificación de PAG de unión a 2D9**



- A. Albúmina sérica bovina**
- B. Cadenas pesada y ligera de 2D9**
- C. Fracción enriquecida con PAG**
- D. PAG de carúncula purificado por afinidad con 2D9**
- E. PAG de cotiledón purificado por afinidad con 2D9**

Las bandas 1 a 7 se cortaron y sometieron a digestión con tripsina y CL-EM-EM

**FIG.4**

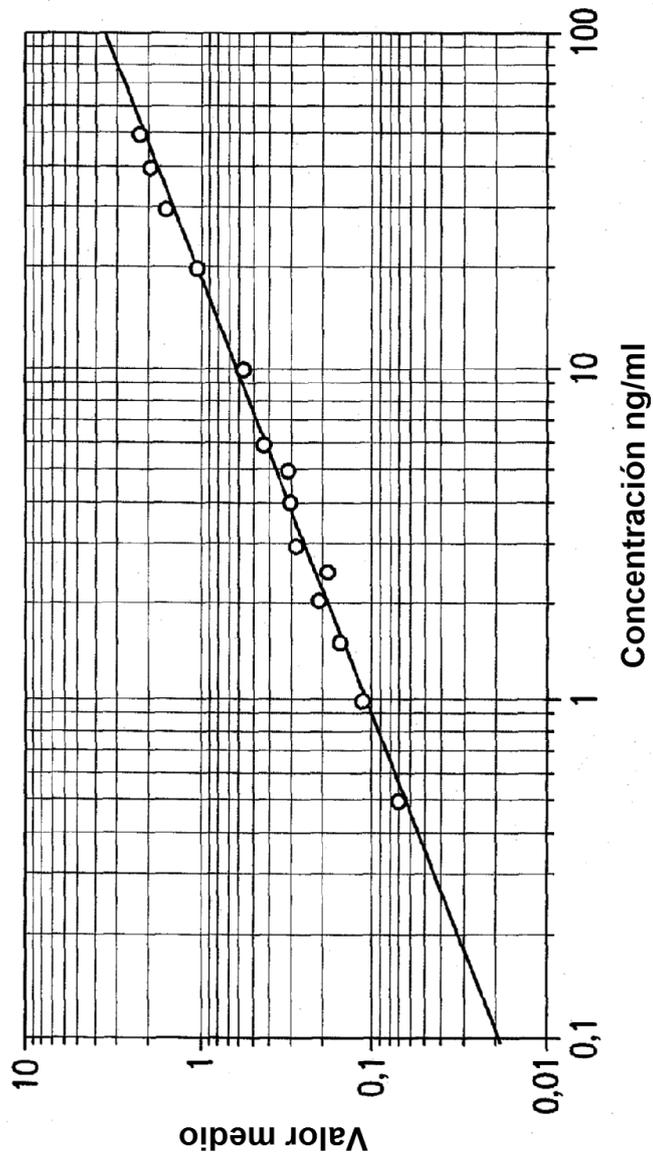


FIG.5

**Resultados del estudio  $\beta$   
PAG del día 28 y datos de US**

**Sitio de Wisconsin**

US	PAG		Porcentaje Coincidentes
	Preñadas	No preñadas	
Preñadas	358	11	369 97,0
No preñadas	44	464	508 91,3
	402	475	877

**Sitio de California**

US	PAG		Porcentaje Coincidentes
	Preñadas	No preñadas	
Preñadas	391	18	409 95,6
No preñadas	41	419	460 91,1
	432	437	869

**FIG.6**

Resultados del estudio  $\beta$ :  
Wisconsin - Reproducción sincronizada

Característica	Resincronización prematura	Resincronización tardía	Significación
Número de disponibles después de la 1. <sup>a</sup> TAI	228	226	
% de preñadas hasta la primera inseminación	46,3	47,9	NS
Días entre inseminaciones	35,1	42,0	P<0,05
Número de inseminaciones (NI) NI/concepción	2,60 2,29	2,65 2,37	NS NS
Días hasta preñez (excluir 1. <sup>a</sup> TAI)	45,2	58,3	P<0,05
% de preñadas (excluir 1. <sup>a</sup> TAI)	46,1	51,4	NS

\*Datos para 30 vacas hasta la resolución

FIG.7

Resultados del estudio  $\beta$   
California - TAI+reproducción estral

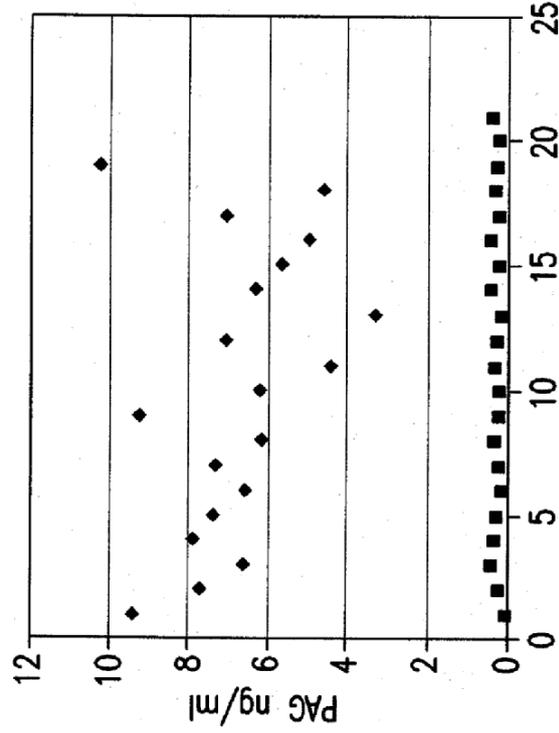
Característica	Resincronización prematura	Resincronización tardía	Significación
Número de disponibles después de la 1. <sup>a</sup> TAI	321	335	
% de preñadas hasta la primera inseminación	27,7	28,7	NS
Días entre inseminaciones	28,9	32,3	P<0,05
Número de inseminaciones (NI) NI/concepción	2,86 2,49	3,05 2,77	P<0,05 P<0,05
Días hasta preñez (excluir 1. <sup>a</sup> TAI)	37,9	48,0	P<0,05
% de preñadas (excluir 1. <sup>a</sup> TAI)	36,6	36,2	NS

\*Datos para 42 vacas hasta la resolución

FIG.8

Base de ensayo de color: ELISA de PAG - mono ab/ poli ab

Panel de ensayo del día 28  
Sensibilidad - 100 %  
Especificidad 100 %



Panel de ensayo del día 55  
Sensibilidad - 95 %  
Especificidad 100 %

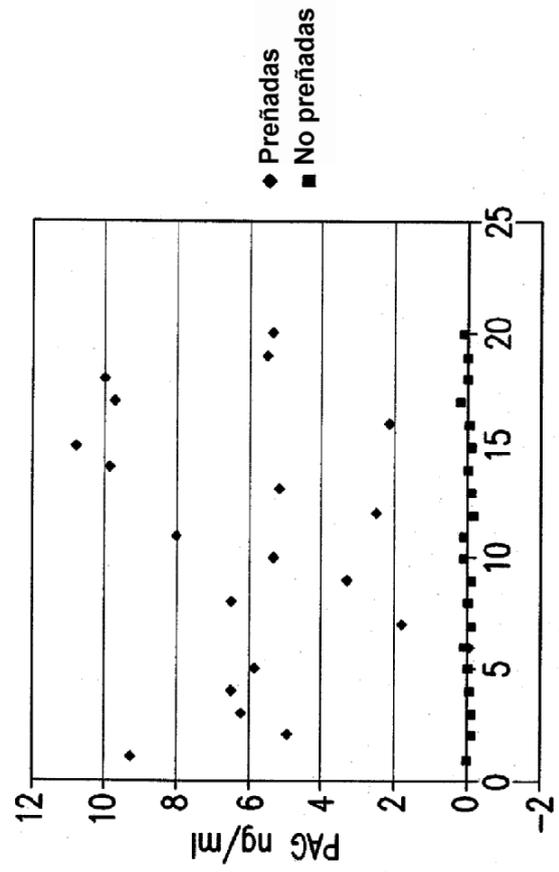
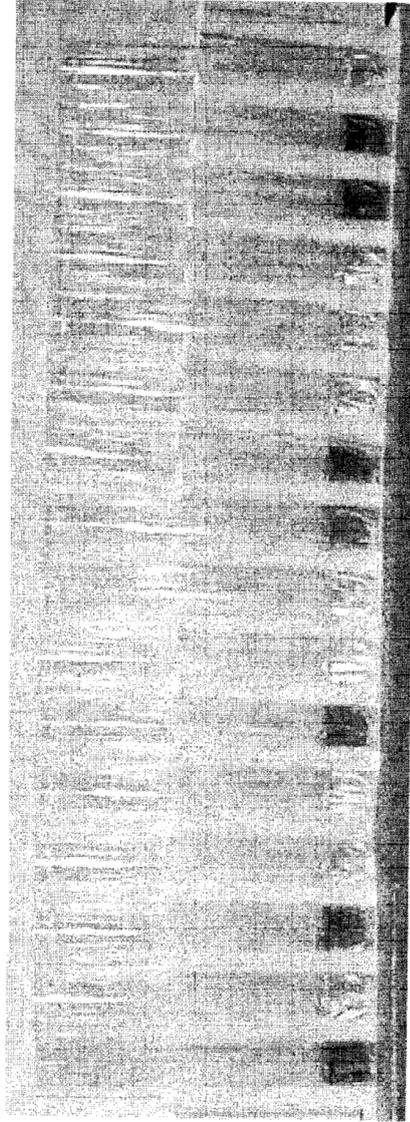


FIG.9

Diagnóstico de preñez bovina con ensayo de color



Azul - preñada  
Transparente - no preñada

FIG.10

Ensayo de color  
Tubo de plástico: Panel de plasma del día 28

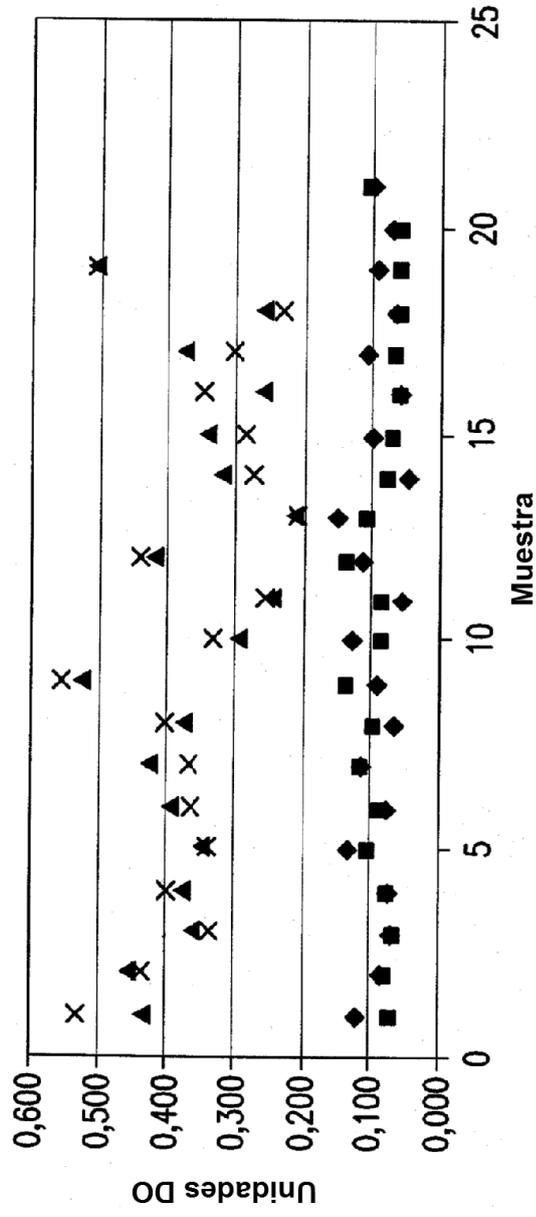


FIG.11A

Ensayo de color  
Tubo de plástico: Panel de plasma del día 55

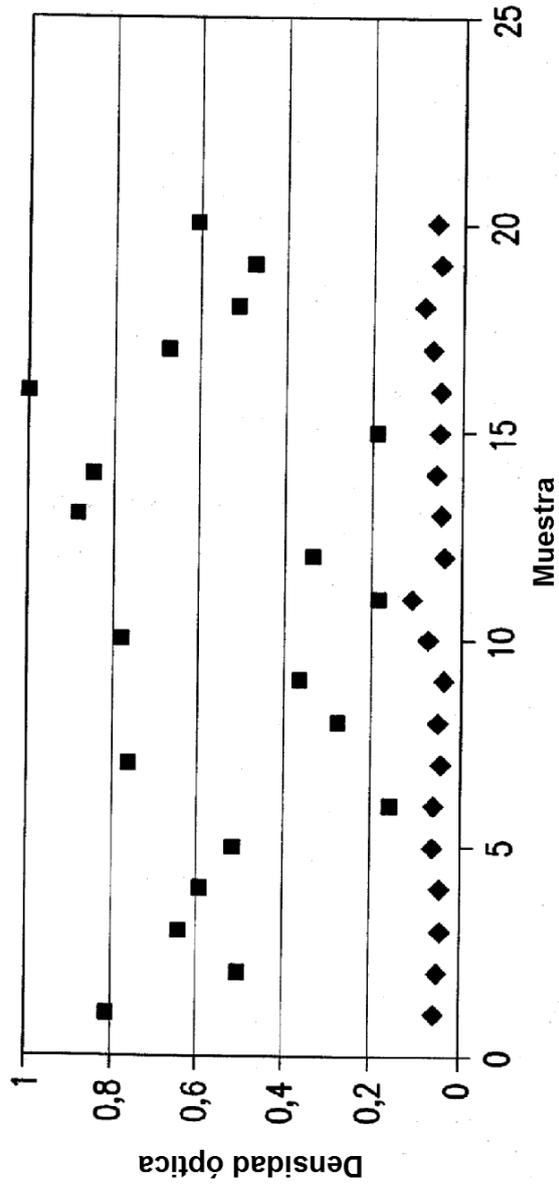
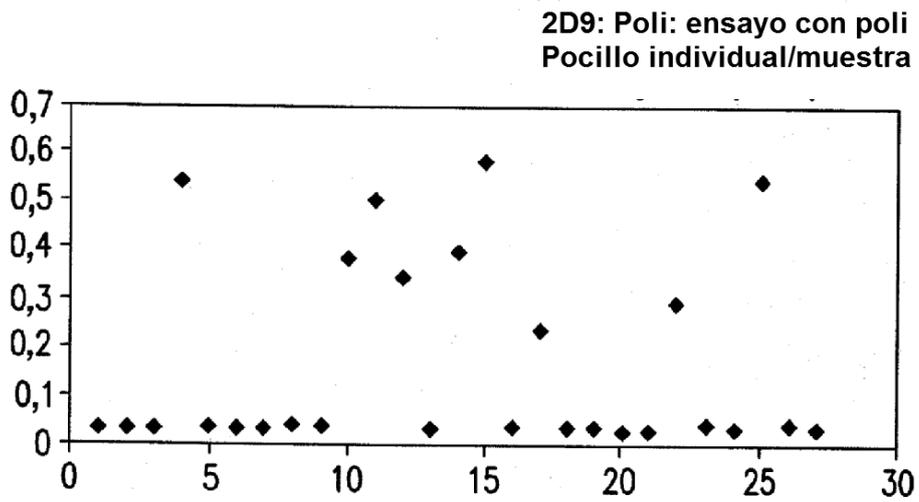
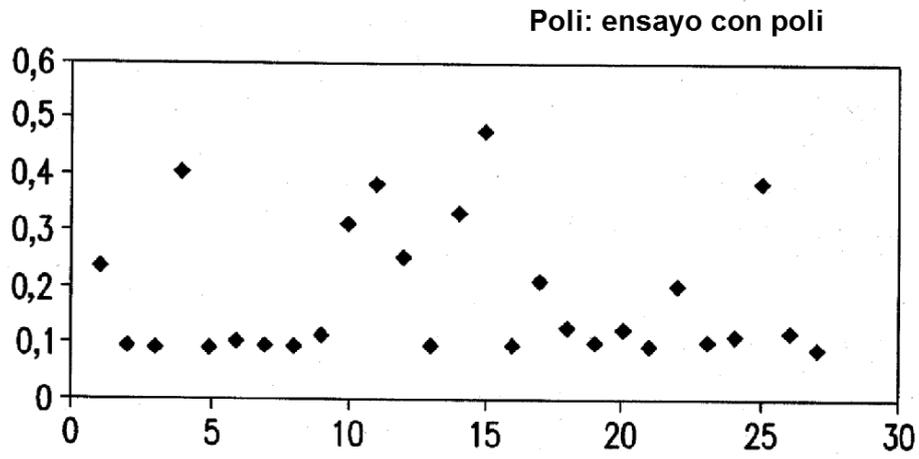


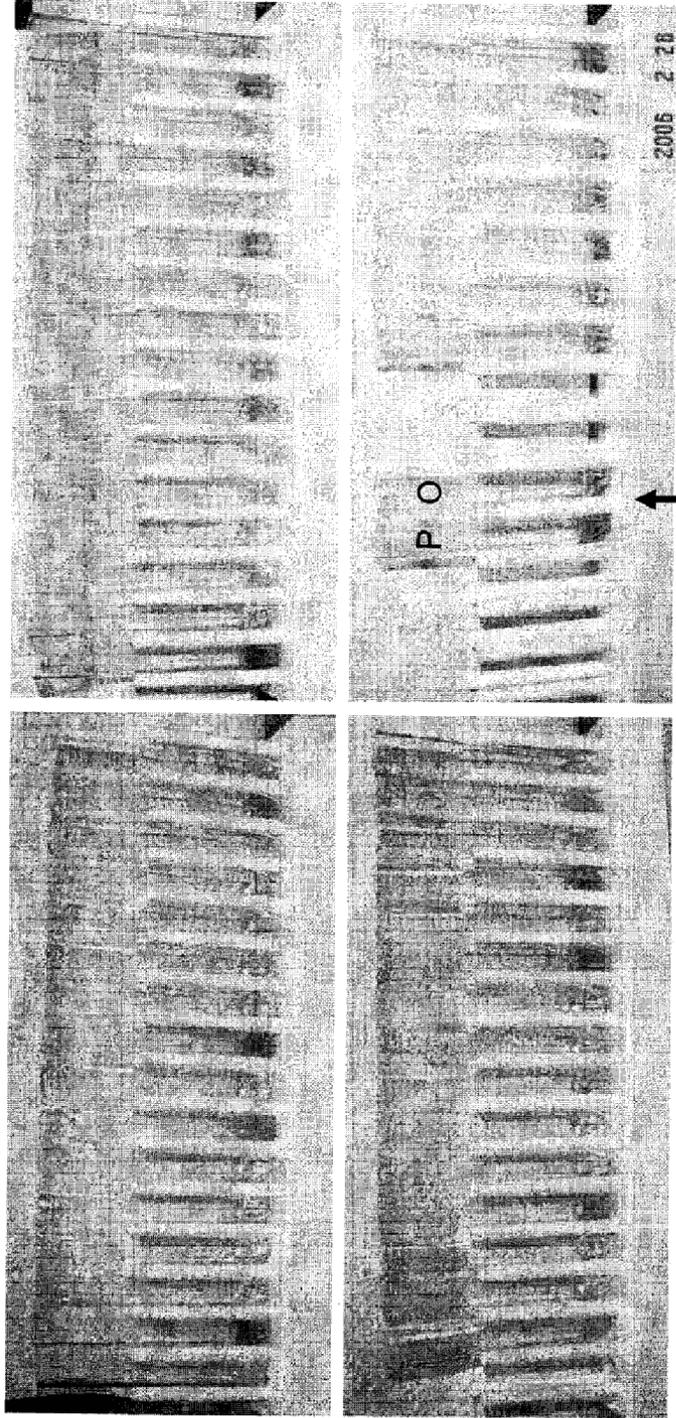
FIG.11B

**Ensayo de color de PAG**  
**Muestras recientes de plasma**



**FIG.12**

Ensayo de color: Ensayo de campo



Controles de plasma  
P- Preñada  
O- No preñada

FIG.13

Ensayo de color: Ensayo de campo  
 Número total de muestras ensayadas: 54  
 Días 33 a 34 después de la reproducción

	Preñadas	No preñadas	Nueva comprobación
PAG	15	37	2
US	14	40	
Coincidentes	14	36	

El ensayo se leyó por 3 personas  
 1 falso positivo en el tubo de ensayo

**FIG.14**

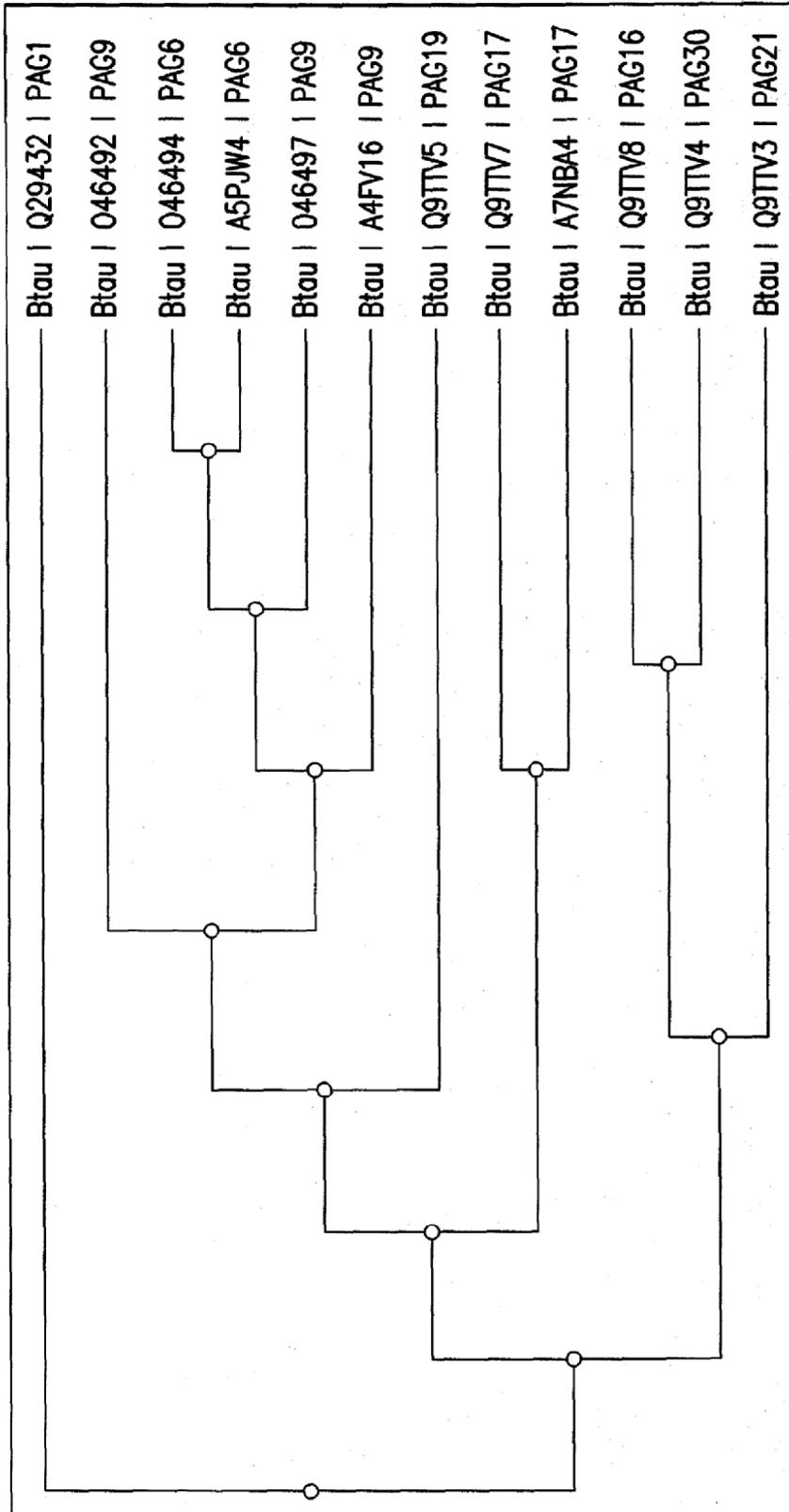


FIG.15







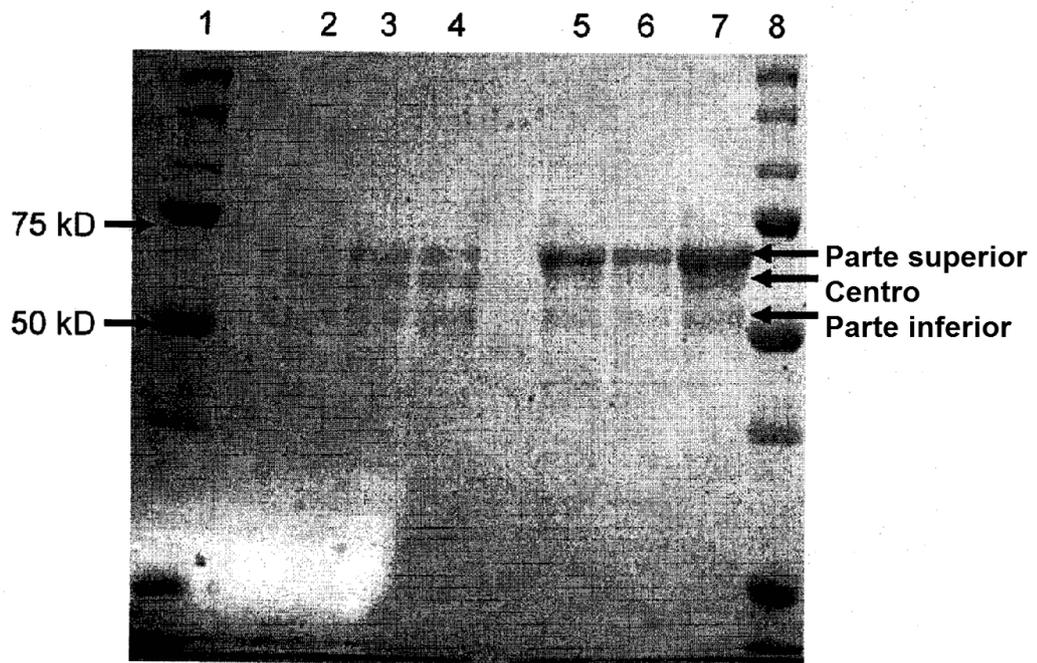


FIG.17