



Organización y
Digitalización CSA Ltda

CSA836265

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



PCT

[Handwritten signature]

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

EN VISTA DE LA BASE NACIONAL
10-85345

21. EXPEDIENTE No.

COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DEL ELIZASO

54. TITULO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

MONSANTO TECHNOLOGIES, LLC, THE CURATORS OF THE
UNIVERSITY OF MISSOURI

DOMICILIO

ST. LOUIS MO USA COLLEGE MO, US

74. APODERADO

JUAN PABLO GADENA SARMENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

T. K. A. C.
13-07-2010

AS: 114.248

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep. 2020 DIR NULVASCH
Tra. 11 PATENTLIYII Eje: 378 FASLNACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: MONSANTO TECHNOLOGY LLC y
THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURIDirección: 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis,
MO 63167, US y 475 McReynolds Hall,
Columbia, MO 65211-2015, US.Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América.Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70ª #4 - 41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura
de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: Nagappan MATHIALAGAN, R. Michael ROBERTS, Michael F.MCGRATH,
Jonathan GREEN.Dirección: 800 N. Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167, US; 2213 Hominy Branch
Court Columbia, MO 65201, US; 800 N. Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167, US;
2107 Limestone Columbia, MO 65203, US (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2008/086674

Fecha

12.12.2008

Publicación Internacional No

WO 2009/076632 A1

Fecha

18.06.2009

6 Título (54): COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DEL EMBARAZO

(Folio 132)

7 Clasificación Internacional (51): G01 N 33/53, C07 K 16/18

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

13.12.2007

61/013,603

SI ☒NO ☐

9 Comprobante de pago No. 10-45.647; 10-29.229; 10-39.603; 10-36.470

Fecha 02-07-2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

PI02-F06 (2009-12-04)

1142483

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep: 2020 DIR.NULVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 168

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,647
FECHA : JUNIO 3 DE 2010

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
FRIGARD A CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662326	03/06/2010	39,365,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 29,229
FECHA : ABRIL 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep. 2020 DIR.NULVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	90662271	15/04/2010	44,633,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 520,000.00

SON: QUINIENTOS VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 38,603

FECHA : MAYO 12 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep. 2020 DIR NULVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80845365	12/05/2010	56,110,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114248 6

~~000004~~

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 36,470
FECHA : MAYO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345-00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep. 2020 DIR NULVASCH
Tra 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CRISARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	354692074	05/05/2010	29,820,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI
			TOTAL : \$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HANSON, Robert, E.
Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP
7800 Sears Tower
233 South Wacker Dr.
Chicago, IL 60606-6404
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
29 June 2009 (29.06.2009)Applicant's or agent's file reference
MONS:108WOInternational application No.
PCT/US2008/086674

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
12 December 2008 (12.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

ROBERTS, R., Michael
2213 Mominy Branch Court
Columbia, MO 65201
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

ROBERTS, R., Michael
2213 Mominy Branch Court
Columbia, MO 65201
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Storni Pedro

Facsimile No. +41 22 338 71 30

e-mail pt09.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 09

8

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/088674

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
HANSON, Robert, E. Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP 7500 Sears Tower 233 South Wacker Dr. Chicago, IL 60606-6404 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 29 June 2009 (29.06.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MONS:108WO	
International application No. PCT/US2008/088674	International filing date (day/month/year) 12 December 2008 (12.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI 475 McReynolds Hall Columbia, MO 65211-2015 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI 475 McReynolds Hall Columbia, MO 65211-2015 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Storni Pedro e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 June 2009 (18.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/076632 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(74) Agent: HANSON, Robert, L.; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, 7300 Sears Tower, 233 South Wacker Dr., Chicago, IL 60606-6404 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2008/086674

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BP, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CP, CU, CZ, DE, DF, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GE, GD, GF, GH, GM, GT, HN, HP, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LF, LS, LT, LU, LY, MA, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, QA, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SH, SI, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
12 December 2008 (12.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/013,603 13 December 2007 (13.12.2007) US

(71) Applicants (for all designated States except US): MON-SANTO TECHNOLOGY LLC [US/US]; 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI [US/US]; 475 Meraynolds Hall, Columbia, MO 65211-2015 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): AFIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, EG, FZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MP, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MATHIALAGAN, Nagappan [US/US]; 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). ROBERTS, R., Michael [US/US]; 2213 Morniny Branch Court, Columbia, MO 65201 (US). NIC-GRATH, Michael, F. [US/US]; 800 N. Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). GREEN, Jonathan [US/US]; 2107 Limestone, Columbia, MO 65203 (US).

Published:
— with international search report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

WO 2009/076632 A1

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS

(57) Abstract: Disclosed are antibodies and methods for detecting pregnancy in an animal. In certain aspects antibodies used binds immunologically to at least two PAGs selected from PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 and PAG21. Antibody encoding nucleic acids are also provided, as are kits, methods of use and additional antibody related compositions.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
18 de Junio de 2009 (18.06.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/076632 A1

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
C07K 16/18 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)

(21) **Numero de Solicitud Internacional:**
PCT/US2008/086674

(22) **Fecha de Presentación Internacional:**
12 de diciembre de 2008 (12.12.2008)

(25) **Lenguaje de entrega:** Inglés

(26) **Lenguaje de Publicación:** Inglés

(30) **Datos de la Prioridad:**
61/013,603 13 de diciembre de 2007 (13.12.2007) EU

(71) **Solicitante** (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): **MONSANTO TECHNOLOGY LLC** [EU/EU]; 800 N. Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167 (EU). **THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI** [EU/EU]; 475 McReynolds Hall Columbia, MO 65211-2016 (EU).

(72) **Inventores; e**

(75) **Inventores/Solicitantes** (solo para los Estados Unidos): **MATHIALAGAN, Nagappan** [EU/EU]; 800 N. Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167 (EU). **ROBERTS, R., Michael** [EU/EU]; 2213 Hominy Branch Court Columbia, MO 65204 (EU). **MCGRATH, Michael, F.** [EU/EU]; 800 N. Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167 (EU). **GREEN, Jonathan** [EU/EU]; 2107 Limestone Columbia, MO 65203 (EU).
- (74) **Agente:** **HANSON, Robert, E.**; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP 7800 Sears Tower 232 South Wacker Dr. Chicago, IL 60606-6404 (EU).

(81) **Estados Designados** (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BF, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LF, LG, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, EG, FZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GE, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

 - con el informe internacional de búsqueda
 - con el listado de secuencias como parte de la descripción publicado por separado en forma electrónica y disponible bajo requerimiento a la Oficina Internacional.

(54) **Título:** COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DEL EMBARAZO

(57) **Resumen:** Se describen anticuerpos y métodos para detectar el embarazo en un animal; en ciertos aspectos, los anticuerpos utilizados se unen inmunológicamente al menos a dos PAGs seleccionadas de PAG PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21; también se proveen los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, así como los kits, métodos de uso y composiciones adicionales relacionadas con el anticuerpo.

COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DEL
EMBARAZO

REFERENCIA RECIPROCA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5

Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud provisional de E.U.A. No. de Serie 61/013,603 (presentada el 13 de diciembre del 2007), la descripción completa de la cual se incorpora en al presente invención como referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15

La presente invención se refiere generalmente a los campos de medicina veterinaria, biología reproductiva y diagnóstico. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones para la detección del embarazo en las primeras etapas.

TECNICA ANTERIOR RELACIONADA

El diagnóstico del embarazo permite un buen manejo reproductivo en la industria láctea y de la carne. En general, la inseminación artificial es exitosa
5 menos del 50% de las veces y el productor debe, ya sea basarse en los signos evidentes de retorno al estro (que son fáciles de perder) o retrasar la recría hasta que se confirme la falla en el embarazo por uno de los métodos anteriormente descritos. Dichos retrasos son extremadamente costosos y constituyen una gran pérdida económica a la industria.

10 Por mucho tiempo se ha buscado una prueba de embarazo precisa para el ganado, que se pueda realizar temprano y que tenga pocos falsos positivos. Varias pruebas de embarazo están disponibles, incluyendo un ensayo de progesterona en leche (Olteneacu et al., 1990; Markusfeld et al., 1990), análisis de sulfato de estrona (Holdsworth et al., 1982; Warnick et al., 1995), palpación
15 rectal (Hatzidakis et al., 1993), ultrasonido (Beal et al., 1992; Cameron y Malmo, 1993), y exámenes de sangre para los antígenos específicos del embarazo.

Cada uno de estos procedimientos no ha satisfecho por completo las expectativas en cuanto a su uso práctico, en la granja. Por ejemplo, las

mediciones de progesterona en leche o en suero aproximadamente al día 18-22 producen tasas inaceptablemente altas de falsos positivos (Oltenacu et al., 1990; Markusfeld et al., 1990). La palpación rectal se puede utilizar para detectar un embarazo tan temprano como al día 35, pero este procedimiento puede conducir a una mortalidad embrionaria del 5-10% o mayor (Oltenacu et al., 1990; Hatzidakis et al., 1993). La palpación rectal al día 50 causa menos daño a los embriones, pero solamente tiene valor económico marginal debido a su etapa tardía (Oltenacu et al., 1990). El ultrasonido tiene una ventaja sobre la palpación rectal en cuanto a precisión, particularmente antes del día 45 (Beal et al., 1992; Cameron y Malmo, 1993), pero el instrumento es costoso, su uso requiere de un entrenamiento considerable, y hay un riesgo finito a los animales. Un procedimiento relacionado, la ultrasonido Doppler, es más precisa que la palpación rectal (Cameron y Malmo, 1993), pero una vez más, necesita de personal bien entrenado. La presencia de sulfato de estrona en la orina o suero provee otra prueba, pero solamente es útil después de 100 días a medida que las concentraciones aumentan (Holdsworth et al., 1982; Warnick et al., 1995).

El descubrimiento de la proteína B específica del embarazo (PSP-B) (Butler et al., 1982) provee un nuevo método para el diagnóstico del embarazo, ya que podría detectarse en la sangre de vacas preñadas en la cuarta semana del

embarazo (Sasser et al., 1986; Humblot et al., 1988). Otros han desarrollado inmunoensayos que se pueden basar en un antígeno idéntico o inmunológicamente similar (Zoli et al., 1992a; Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994). En un caso, el antígeno (Mr. ~67 kDa) fue llamado glicoproteína asociada al

5 embarazo de bovino (boPAG, actualmente boPAG-1) (Zoli et al., 1992a), en el segundo caso, fue designada como la proteína 60 en suero por embarazo (PSP60) (Mialon et al., 1993; Mialon et al., 1994). Los inmunoensayos para PSP-B/boPAG1/PSP60 tienen ciertas desventajas. Primero, un diagnóstico positivo en la cuarta semana del embarazo sigue siendo un tanto incierto debido a que las

10 concentraciones del antígeno en la sangre son bajas y variables en cierta medida. En segundo lugar, las concentraciones de boPAG1 se elevan notablemente a término (Sasser et al., 1986; Zoli et al., 1992a; Mialon et al., 1993) y, debido a la larga vida-media de la molécula en circulación (Kiracofe et al., 1993), el antígeno aún puede detectarse 80-100 días después del parto (Zoli et al., 1992a; Mialon et

15 al., 1993; Mialon et al., 1994; Kiracofe et al., 1993), comprometiendo el diagnóstico del embarazo en vacas reproducidas en el período postparto temprano. Por lo tanto, la prueba se puede llevar a cabo en vacas lecheras a los 30 días solamente si la inseminación artificial ("AI") se lleva a cabo en o después de 70 días postparto.

Las glicoproteínas asociadas al embarazo (PAGs) están estructuralmente relacionadas con la pepsina. Se cree que se limitan a los mamíferos con pezuña (ungulados) y se caracterizan por ser expresadas específicamente en la capa de la célula epitelial externa (corion/trofectodermo) de la placenta (Green et al., 2000; Hughes et al., 2003; Xie et al., 1997). Al menos algunas PAGs son catalíticamente inactivas como proteinasas, aunque cada una parece tener una hendidura capaz de unirse a los péptidos (Guruprasad et al., 1996). Se estima que las reses, ovejas, y muy probablemente todos los rumiantes Artiodactila poseen docenas de genes PAG. Las PAGs son altamente diversas en su secuencia, con regiones de hipervariabilidad confinadas en gran medida a los bucles expuestos en la superficie.

Las glicoproteínas asociadas al embarazo de bovino (boPAGs/PSPB/PSP60) fueron descubiertas en los intentos por desarrollar pruebas de embarazo para el ganado (Butler et al., 1982; Sasser et al., 1986; Zoli et al., 1991; Zoli et al., 1992a). En cada intento, los conejos fueron inyectados con extractos de los cotiledones de la placenta, y los anticuerpos no dirigidos contra antígenos placentarios se removieron por adsorción con extractos de tejido de animales que no están embarazados. Los antisueros resultantes proveyeron la

base de una prueba de embarazo precisa para el ganado y ovejas tan pronto como un mes después de la inseminación.

Incluso en los estudios iniciales (Butler et al., 1982; Zoli et al., 1991; Xie et al., 1991; Xie et al., 1994; Xie et al., 1996), estaba claro que las boPAGs eran heterogéneas en peso molecular y carga, y conforme más isoformas son purificadas, se vuelve evidente que difieren en sus secuencias amino terminal (Atkinson et al., 1993; Xie et al., 1997a). La selección adicional de la biblioteca ha revelado transcritos adicionales en los rumiantes (Xie et al., 1994; Xie et al., 1995; Xie et al., 1997b) y la existencia de PAGs en especies no rumiantes, tal como el cerdo (Szafranska et al., 1995). Las proteínas semejantes a PAG (también conocidas como "pepsinógeno F" o "pepsina F") se han descrito en el caballo y el gato (Green et al., 1999; Guruprasad et al., 1996). Entre las PAGs de bovino que se han descrito están boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v; boPAG9v; boPAG15; boPAG16; boPAG17; boPAG18; boPAG19; boPAG20 y boPAG21 (Patente de E.U.A. 6,869,770). La información sobre los métodos para el diagnóstico de embarazo temprano mediante análisis para dichas PAGs se puede encontrar en, por ejemplo, la Patente de E.U.A. 6,869,770 y Solicitud de Patente de E.U.A. No. de Pub. 20050100975.

La mayoría de las pruebas disponibles para detectar el embarazo en el ganado son menos precisas antes del día 30 después de la reproducción. Además, para muchas de las pruebas existentes, se requiere personal especializado. Por lo tanto, existe la necesidad de una prueba de embarazo precisa y sensible en el ganado que se pueda realizar de forma rápida y fácil antes del día 30 después de la reproducción.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención provee una prueba sensible y precisa para el embarazo temprano. La presente invención provee, en una modalidad, una prueba de embarazo temprano en la que se puede detectar un polipéptido específico que incluye un dominio que es altamente específico para una PAG con un alto grado de sensibilidad y especificidad antes del término de la cuarta semana de embarazo. La capacidad para diagnosticar un embarazo en una etapa tan temprana es especialmente útil en la industria láctea, donde los animales suelen estar confinados al menos durante parte del día y en donde se

practica un manejo intensivo. Además, las modalidades de la presente invención encontrarán su uso en programas de reproducción para otros animales.

En otro aspecto, la invención provee métodos para detectar el embarazo en un animal que comprende: (a) obtener una muestra del animal; (b) 5 poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un anticuerpo 2D9 o un fragmento o variante del mismo, y (c) detectar el contacto del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, con al menos un antígeno asociado al embarazo (PAG) en la muestra, en donde la detección de la PAG indica que el animal está 10 embarazado. En una modalidad, un anticuerpo utilizado comprende un dominio que tiene más de 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más de 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el animal es un miembro del suborden Ruminantia. En modalidades específicas, la Ruminantian es un miembro de la familia Bovidae. En otras modalidades, el animal 15 es una cabra, una oveja, un miembro del orden Perissodactyla, un caballo, un rinoceronte, un canino, una especie de felino, un humano, o un oso panda.

Una línea celular de hibridoma que produce 2D9 fue depositada ante el Depositario de Patentes de la American Type Culture Collection (ATCC),

Manassas, Va., 20110-2209 el 2 de agosto del 2007 y se le asignó el No. de Depósito de Patente PTA-8566 (Referencia para Identificación MON-PAG-2D9). El depósito se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en materia de Patentes. Este depósito ha sido realizado exclusivamente para la comodidad de aquellos con conocimientos en la técnica y no son una admisión de que se requiere un depósito bajo 35 USC § 112.

En ciertas modalidades, el dominio tiene 96% o más de identidad de secuencias a la SEQ ID NO: 1, incluyendo 99% o más de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 1. En modalidades adicionales, el dominio comprende SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el dominio tiene 92% o más de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 2, incluyendo al menos 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% o más de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades específicas, el dominio comprende SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se define adicionalmente como un anticuerpo que comprende al menos una cadena ligera y por lo menos una cadena pesada. En modalidades específicas, la cadena

ligera puede tener más de 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En modalidades adicionales, la cadena pesada tiene más del 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En más modalidades particulares, la cadena pesada tiene más del 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En otras modalidades, la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 2.

En algunas otras modalidades 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.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal 2D9.

La PAG detectada puede ser cualquier PAG, tales como boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 y boPAG21. En una modalidad, la PAG es boPAG6.

En modalidades adicionales, la invención se refiere a los métodos para detectar el embarazo en un animal bovino que comprenden: (a) obtener una muestra del animal; (b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal 2D9, y (c) detectar el contacto del anticuerpo con uno o más de boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 o

boPAG21 en la muestra, en donde la detección de la PAG(s) indica que el animal está embarazado. El método para detección del embarazo, por ejemplo, se puede realizar al 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 que se sabe o que se sospecha que contiene una PAG. En modalidades específicas, la muestra es saliva, suero, plasma, sangre, leche u orina. Cualquier cantidad efectiva de la muestra se puede obtener a partir del animal. Por ejemplo, la cantidad puede ser aproximadamente 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 60 µl, 70 µl, 80
10 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.

 Cualquier método para detección del contacto del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una PAG, que se conoce por aquellos expertos en la
15 técnica, se contempla por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el método puede comprender ELISA o Western blot. En modalidades particulares, la PAG a ser detectada es boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v, boPAG9v, boPAG15, boPAG16, boPAG17, boPAG18, boPAG19,

22

boPAG20 o boPAG21. En modalidades específicas, la PAG es boPAG6. En algunas modalidades de los presentes métodos, se detecta más de una PAG en cada muestra. Cuando se aplica a especies diferentes del ganado, la presente invención permitirá la detección de otras PAGs producidas en el momento en el que el trofoblasto (pre-placenta) comienza ya sea a fijarse o a implantarse en la pared uterina de la madre. Las PAGs "tempranas" en estas especies tienen una reacción inmunológica cruzada con las PAGs útiles en la detección temprana del embarazo en el ganado.

En modalidades particulares, la prueba ELISA es un ELISA intercalado que comprende la unión de una PAG al anticuerpo o fragmento de anticuerpo fijo a un sustrato y una preparación del anticuerpo segundo marcado con una enzima. Por ejemplo, el sustrato sobre el cual se fija el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un tubo, un pozo, un vial, una tira, una tira reactiva, o un biosensor. La enzima, por ejemplo, puede ser la fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano o cualquier enzima para marcado.

La presente invención también se refiere generalmente a un polipéptido aislado y purificado codificado por un dominio que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de

secuencia con SEQ ID NO: 2. En modalidades particulares, el dominio comprende más de 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En modalidades más particulares, el dominio comprende SEQ ID NO: 1. Puede haber uno o más residuos de aminoácidos unidos a sus extremos N-terminal o C-terminal del dominio. En una modalidad particular, el polipéptido es SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el dominio comprende más del 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En modalidades más particulares, el dominio comprende más de 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En una modalidad particular adicional, el polipéptido es SEQ ID NO: 2. En otras modalidades, el polipéptido comprende SEQ ID NO: 3. En modalidades adicionales, el polipéptido comprende SEQ ID NO: 4.

La presente invención también incluye polinucleótidos aislados y purificados que codifican un polipéptido que tiene un dominio que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene más del 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En modalidades particulares, el polinucleótido codifica SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende un dominio que tiene más del 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En

modalidades más particulares, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene un dominio que tiene más del 98% de identidad de secuencia SEQ ID NO: 2. En modalidades más particulares, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene más del 98% de identidad con SEQ ID NO: 5 o más del 95% de identidad con SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades particulares, el polinucleótido es SEQ ID NO: 5, y en más modalidades más particulares, el polinucleótido es SEQ ID NO: 6.

SEQ ID No. 5. Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena ligera

2D9 (SEQ ID NO: 5). El codón de inicio de la forma procesada (aminoácido N-terminal) y el codón de parada se indican en negritas.

```
>2D9 Cadena Ligera
CGGTTCCCTGCTTCCAGCAGGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCT
GCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATTTCTTGCAGATCTAGGCAGAGCATTGTA
CATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTTCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAA
AGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGG
CAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTG
GGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCA
AGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAG
TGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCC
AAAGACATCAATGTCAAGTGGAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGA
ACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAC
GTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAG
ACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGT
CCTGA
```

25

SEQ ID No. 6. Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada
2D9 (SEQ ID NO: 6). El codón de inicio de la forma procesada (aminoácido N-
5 terminal) y el codón de parada se indican en negritas.

>2D9 Cadena Pesada
GCTACAGGTGTCCACT**CCC**AGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAG
CCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACATATTCAGTAACTAC
TGGATGGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATT
TTACCTGGAAGTGATATTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTC
ACTGCAGATTCATCCTCCAACACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAG
GACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGCTGGGAGTGGTTACTACGGGGTATATTAC
TATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG
ACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATG
GTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG
AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGAC
CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACC
GTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTG
CCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGTCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTC
TTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTC
ACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTT
GTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAAC
AGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAAGTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGC
AAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCC
AAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTC
CCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAG
AACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAAT
GTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAG
GGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGATCC
CAAAGTCCTTGGAGCCCTCTGGTCCCTACAGGACTACTGCAGGTGTCCACTCCCCTCA
AACA

10

15

5 La presente invención también se refiere generalmente a una célula de hibridoma que segrega anticuerpo monoclonal 2D9.

La presente invención también se refiere a los kits para detectar la presencia de una PAG en un animal, en donde el kit incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 3. En modalidades adicionales, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un soporte. Por ejemplo, el soporte puede ser una placa de poliestireno, tubo de ensayo, una tira, una tira reactiva, o un biosensor.

En algunas modalidades, el kit incluye además una marca detectable. Por ejemplo, la marca detectable puede ser una marca fluorescente

27

unida al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En otras modalidades, la marca detectable es una marca quimioluminiscente. En modalidades adicionales, la marca detectable es una enzima, tales como la fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano. El kit puede incluir además un sustrato para la enzima. En modalidades adicionales, el kit incluye un regulador de pH o diluyente. El kit también puede incluir opcionalmente pipetas desechables. Otros componentes del kit, incluyendo depósitos de reactivos, instrucciones y demás son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y también se contemplan para el uso en los kits descritos en la presente invención.

La presente invención también se refiere generalmente a los métodos para detectar el embarazo en un animal que comprende: (a) obtener una muestra del animal; (b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo provisto por la invención, y (c) detectar una PAG en la muestra mediante el contacto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde la detección de una o más de boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 o boPAG21, incluyendo todas las combinaciones posibles de las mismas, indican que el animal está embarazado.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, al tiempo que indican las modalidades preferidas de la invención, se proporcionan solamente de manera ilustrativa, puesto que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las siguientes figuras forman de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor con referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas en la presente invención.

Figura 1. Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE) y análisis por Western blot de PAGs purificadas a partir de la cromatografía de inmutaafinidad de 2D9 de extracto de tejido preparado a partir de placenta de

bovino a los 55 días. Ambos análisis de gel teñido con Coomassie y de Western blot con anticuerpos policlonales a PAG mostraron tres bandas de proteínas a 67 kD, 55 kD y 50 kD como PAGs de unión a 2D9. "Mz" = relación de masa a carga: masa peptídica para cargar el péptido ionizado, menos agua, "Carga" = estado de carga del ión, "Mr(calc)"= peso molecular calculado para el péptido; "Inicio" = aminoácido de inicio de la proteína que se alinea con el péptido, "Fin" = aminoácidos de paro de la proteína que se alinee con el péptido, "Puntaje" = medida de la confianza de la secuencia del péptido.

Figura 2. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra PAGs que se unen a 2D9 purificado por cromatografía de inmunoafinidad de extractos de tejidos de carúncula (endometrio) y de cotiledón (placenta). Las bandas de proteínas 1 a 7 se cortaron y se sometieron a digestión por tripsina seguida de un análisis LC-MS-MS (SEQ ID NOS: 7-18).

Figura 3. Transformación log-logit de la curva ELISA estándar para PAG desarrollada con placas de ELISA recubiertas con el anticuerpo 2D9 y PAGs purificadas mediante inmunoafinidad como estándares. El ensayo mostró una respuesta lineal de 0.5 ng/ml a 50 ng/ml.

Figura 4. Ensayo a base de color. Los resultados del inmunoensayo de PAG se desarrollaron con anticuerpo 2D9 monoclonal como anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal de conejo marcado con biotina como anticuerpo secundario. Las muestras del Ensayo de panel de plasma (20 abiertas -no embarazadas- y 20 embarazadas) recolectadas al día 28 y 55 de embarazo mostraron una separación completa de las vacas abiertas (azul) en comparación con las vacas preñadas (rosa). El valor de la PAG cercano a cero se obtuvo para las vacas abiertas sugiriendo que un PAG estándar puede no ser necesario para la detección cualitativa de la PAG inmunorreactiva en el plasma de prueba.

Figura 5. Los resultados del diagnóstico del embarazo de bovino se realizaron con muestras de sangre entera en la prueba de color. Los resultados se leyeron visualmente. Los tubos que mostraron la solución de reacción de color azul (tubos 1, 3, 6, 9, 10, 14 y 15) son resultado positivo para el estado de embarazo y los tubos que mostraron un fondo claro (tubos 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 y 16) son negativos (no embarazadas) para el estado de embarazo. Para la lectura en un espectrofotómetro, se pueden agregar un volumen igual (0.4 ml) de solución de paro (HCl 1N) a cada tubo. La adición de solución de paro virará el color a amarillo. A continuación, las densidades ópticas (DO) de cada muestra se pueden medir en un espectrofotómetro a 630 nm.

Figuras 6A, 6B. Resultados de las pruebas de color realizadas con tubos de plástico recubierto con 2D9. Figura 6A - panel de plasma al día 28. Figura 6B panel de plasma al día 55. Todas las muestras de vaca abierta en los paneles de prueba al día 28 y día 55 produjeron una intensidad de color de 0.2 DO o menos mientras que las muestras de plasma de animales embarazados produjeron una intensidad de color tan alta como de 1.0 unidad de DO. En este ensayo, las muestras de plasma al día 28 mostraron una sensibilidad del 100% y 100% de especificidad cuando la intensidad del color 0.2 OD se fijó como límite. En la misma intensidad de color límite, las muestras de plasma al día 55 mostraron sensibilidad del 95% y 100% de especificidad en el tubo de ensayo de plástico.

Figura 7. Comparación de la prueba de embarazo de las muestras de plasma fresco con ELISA intercalado de PAG con anticuerpos policlonales (Poli:Poli, panel superior) y anticuerpo monoclonal 2D9 y anticuerpo policlonal (Mono:Poli, panel inferior). Tenga en cuenta que hay una clara separación de las muestras de vaca abierta que se distingue por el uso de una intensidad de color límite de 0.2 DO. Todas las muestras de vacas embarazadas tuvieron una intensidad del color > 0.2 unidades de DO. El ensayo Mono:Poli tuvo una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% en este experimento.

Figura 8. Ensayo de campo de la prueba de color con muestras de sangre. Se analizaron cincuenta y cuatro muestras de sangre recolectadas a partir de 33-34 días después de la reproducción y el color se leyó visualmente por 3 miembros del personal. No hubo discrepancias observadas en la puntuación visual de los resultados entre los 3 individuos.

Figura 9. Agrupamientos de secuencias de isoformas protéicas de PAG generados por el paquete de análisis de Arbol Filogenético de Vecinos de PROTDIST (v. 3.5c), dentro de BioEdit (v. 7.0.5.3; www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html; Hall, 1999).

Figura 10. Alineamiento directo de las isoformas de PAG 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21. Las secuencias protéicas para las isoformas y variantes de PAG se proporcionan en las SEQ ID Nos: 51-52, derivadas de los accesos UniProt Q29432, Q46492, Q46494, A5PJW4, Q46497, A4FV16, Q9TTV8, Q9TTV7, A7MBA4, Q9TTV5, Q9TTV4 y Q9TTV3.

Figura 11. Gel de SDS-PAGE de los lotes de PAGs purificadas (5 µg cada una) teñidas con azul de Coomassie que ilustran las tres bandas de PAG (bandas superior, media, e inferior) entre 50 y 75 kD. 1) estándares de proteína (Bio-Rad cat. # 161-0374), 2) carúncula D55, 3) cotiledón D55; 4) carúncula y

cotiledón D55 combinadas; 5) carúncula d215; 6) cotiledón d215; 7) carúncula y cotiledón d215 combinadas; 8) estándares de proteínas (Bio-Rad cat. # 161-0374).

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

5

A pesar de la disponibilidad de varios ensayos para detectar el embarazo, sigue habiendo una necesidad de proporcionar pruebas mejoradas para detección precisa y temprana del embarazo, especialmente en el ganado que se crían en dos a tres meses después del parto o antes. Algunas modalidades de la presente invención pertenecen a los métodos de determinación del estado de embarazo de una vaca al llevar a cabo una prueba de color para medir la unión de una PAG en una muestra obtenida del animal, con un polipéptido, tal como un anticuerpo monoclonal 2D9, un anticuerpo que se une a las PAGs indicativas de embarazo del bovino. La prueba de color se puede realizar al inicio, tales como a los 26 días después de la inseminación. La prueba de color se puede utilizar en cualquiera de una variedad de formatos, tales como con tubos de ensayo o placas de ELISA. En modalidades particulares, la prueba utiliza un principio de inmunoensayo en sándwich que utiliza un segundo anticuerpo. Un color, tal como

10

15

74

un color azul, indica un resultado positivo, mientras que los tubos que son claros indican un resultado negativo. Las modalidades de los presentes métodos se pueden realizar fácilmente antes de 30 días después de la inseminación artificial, y son altamente sensibles y específicos. Además, múltiples muestras pueden ser
5 fácilmente y rápidamente analizadas de manera simultánea, lo que mejora aún más el valor de los presentes métodos.

También se proveen ciertos polipéptidos novedosos de unión a PAG que se pueden aplicar en los métodos para detectar el embarazo en un sujeto, y polinucleótidos que codifican los polipéptidos establecidos en la presente
10 invención. La descripción remanente describe varias características de la invención y su implementación.

I. Polipéptidos

Algunas modalidades de la invención establecidas en la presente
15 invención pertenecen a polipéptidos aislados y purificados, que incluyen un dominio de unión a PAG, que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el dominio de unión a PAG tiene más del 97.1%, 97.3%,

78

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 con la secuencia SEQ ID NO: 1. En algunas
modalidades, 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%,
5 97.4%, 97.8%, 98.2%, 98.6%, 99.0%, 99.4%, 99.8% o 100% de identidad de
secuencia con SEQ ID NO: 2.

Un "polipéptido" como se utiliza en la presente invención, se refiere a
un segmento de aminoácidos consecutivos de cualquier longitud. En algunas
modalidades de los presentes métodos, los polipéptidos empleados en éstos son
10 un aminoácido consecutivo que incluye, dentro de su secuencia, una secuencia de
aminoácidos que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1
o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO : 2. Un experto en la
técnica podría entender cómo generar dicho polipéptido en vista de la descripción
establecida en la presente invención, utilizando cualquiera de una serie de
15 métodos experimentales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

El término " identidad de secuencia porcentual", como se conoce en
la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más
secuencias polinucleotídicas, como se determina mediante la comparación de las

secuencias. En la técnica, la "identidad" también significa el grado de relación de la secuencia entre las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, como sea el caso, como se determina por la coincidencia entre las cadenas de dichas secuencias. La "identidad" y "similitud" se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo, pero no limitados a aquellos descritos en: Computational Molecular Biology (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I (1994), Sequence Analysis in Molecular Biology (1987) y Sequence Analysis Primer (1991). Los métodos preferibles para determinar la identidad están diseñados para dar la mejor coincidencia entre las secuencias de prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en los programas de computadora disponibles al público. Las alineaciones de secuencia y cálculos de identidad porcentual se pueden realizar utilizando el programa de the LASERGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). El alineamiento múltiple de las secuencias se puede realizar utilizando el método Clustal de alineamiento (Higgins y Sharp (1989) con los parámetros por omisión (SANSION POR ESPACIO = 10, SANSION POR LONGITUD DE ESPACIO = 10). Los parámetros por omisión para alineamientos de pares utilizando el método Clustal

son KTUPLE 1, OMISION POR ESPACIO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES SALVADAS = 5.

Se sabe bien por el experto en la técnica que, inherente a la definición de un "polipéptido", se encuentra el concepto de que existe un límite en el número de cambios que se puede hacer dentro de una porción definida de la molécula y aún así resulta en una molécula con un nivel aceptable de identidad de secuencia o función, por ejemplo, la capacidad de unirse a una PAG.

Una secuencia de aminoácidos de cualquier longitud se contempla dentro de la definición del polipéptido como se estableció en la presente invención, siempre y cuando el polipéptido retenga la identidad de secuencia mencionada. El dominio de unión a PAG de los polipéptidos establecidos en la presente invención puede tener aminoácidos adicionales ya sea en el extremo C-terminal o N-terminal. Por ejemplo, el polipéptido equivalente 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 ya sea al extremo C-terminal o extremo N-terminal del dominio de unión a PAG.

Por supuesto, una pluralidad de distintos polipéptidos con diferentes sustituciones se puede crear fácilmente y utilizar de conformidad con la invención.

La presente invención puede utilizar polipéptidos purificados de una fuente natural o material producido de manera recombinante. Aquellos expertos en la técnica podrían saber cómo producir estos polipéptidos a partir del material producido de manera recombinante. Este material puede utilizar los 20 aminoácidos comunes en las proteínas naturalmente sintetizadas, o uno o más aminoácidos modificados o inusuales. Generalmente, "purificado" se referirá a una composición polipeptídica que se ha sometido a fraccionamiento para remover muchas otras proteínas, polipéptidos, o péptidos, y dicha composición sustancialmente mantiene su actividad. La purificación puede ser sustancial, en la que el polipéptido es la especie predominante, o hasta homogeneidad, cuyo nivel de purificación podría permitir una secuenciación degradativa exacta.

Los mutantes de la secuencia de aminoácidos se abarcan por la presente invención, y se incluyen en la definición de "polipéptido". Los mutantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido pueden ser mutantes sustitutivos o mutantes de inserción. Los mutantes de inserción típicamente incluyen la adición de material en un punto no terminal en el péptido. Esto puede incluir la inserción de unos pocos residuos; un epítipo inmunorreactivo, o simplemente un residuo único. El material añadido se puede modificar, tal como mediante metilación,

acetilación, y los similares. Alternativamente, los residuos adicionales se pueden añadir a los extremos N-terminal o C-terminal del péptido.

Las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y los similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina, lisina e histidina son todos residuos positivamente cargados, 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, alanina, glicina y serina, y la fenilalanina, triptófano y tirosina; se definen en la presente invención como equivalentes biológicamente funcionales.

Al hacer los cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático con base en su hidrofobicidad y características de carga, éstas 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 de aminoácidos en conferir una función biológica interactiva sobre una proteína generalmente se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado por referencia en la presente invención). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntaje hidropático similar y todavía retienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +2, aquellos que están dentro de +1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de +0.5 son aún más particularmente preferidos.

Se entiende que un aminoácido puede ser sustituido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aun así se obtiene una proteína biológicamente equivalente. Como se detalla en Patente de E.U.A. 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los residuos de aminoácidos: 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 se encuentran dentro de +2, aquellos que están dentro de + 1 son particularmente preferidos, y aquellos de +0.5 son aún más particularmente preferidos.

II. Polinucleótidos

Varios aspectos de la presente invención corresponden a polinucleótidos que codifican un polipéptido que incluye un dominio que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Otras modalidades establecidas en la presente invención pertenecen a polinucleótidos aislados y purificados que codifican un polipéptido que tiene un dominio que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. También se describen polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene más del 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o mayor del 95% de identidad de secuencia con 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 SEQ ID NO: 6 se refiere a la secuencia de ácido nucleico del ADNc que codifica la cadena pesada de 2D9.

En algunas modalidades, el polinucleótido tiene 98.1%, 98.2%,
 5 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%,
 99.3%, 99.4%, 99.5 %, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, o 100% de identidad de
 secuencia con SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el polinucleótido tiene más
 del 95.2%, 95.4%, 95.6%, 95.8%, 96.0%, 96.2%, 96.4%, 96.6%, 96.8%, 97.0%,
 97.2%, 97.4%, 97.6%, 97.8%, 98.0%, 98.2%, 98.4%, 98.6%, 98.8%, 99.0%,
 10 99.2%, 99.4%, 99.6%, 99.8% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:
 6.

Los polinucleótidos se pueden obtener de fuentes naturales o se
 pueden sintetizar químicamente utilizando cualquier método conocido por aquellos
 expertos en la técnica. La presente invención también abarca mutantes
 15 químicamente sintetizados de estas secuencias.

En ciertas modalidades, uno puede desear emplear construcciones
 que incluyen otros elementos, por ejemplo, aquellos que incluyen C-5 propino
 pirimidinas. Los oligonucleótidos que contienen análogos C-5 propino de la uridina

y citidina que se ha demostrado que se unen con alta afinidad al ARN (Wagner et al., 1993). En algunas modalidades, el polinucleótido codifica uno o más segmentos adicionales de aminoácidos que pueden unirse a una PAG.

5 III. Anticuerpos y fragmentos del anticuerpo

Las modalidades particulares de la presente invención incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpo" se utiliza para referirse a cualquier molécula similar al anticuerpo que tiene una región de unión al antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', Fab, F(ab')₂,
10 anticuerpos del dominio único (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena única), y los similares. Las técnicas para preparar y utilizar diversas construcciones y fragmentos a base del anticuerpo se conocen bien en la técnica. Los medios para la preparación y caracterización de anticuerpos también se conocen bien en la técnica (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
15 Laboratory, 1988; incorporado en la presente invención como referencia).

Los "mini-anticuerpos" o "minibodies" también se contemplan para uso con la presente invención. Los minibodies son cadenas polipeptídicas de sFV que incluyen dominios de oligomerización en sus extremos C-terminales,

separados de la sFV por una región bisagra. Pack et al. (1992). El dominio de oligomerización comprende las hélices alfa de auto-asociación, por ejemplo, los zippers de leucina, que se pueden estabilizar adicionalmente por enlaces disulfuro adicionales. El dominio de oligomerización está diseñado para ser compatible con el plegamiento vectorial a través de una membrana, un procedimiento que se cree que facilita el plegamiento *in vivo* del polipéptido hacia una proteína de unión funcional. Generalmente, los minibodies se producen utilizando métodos recombinantes bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Pack et al. (1992); Cumber et al. (1992).

10 Los peptidomiméticos de unión semejante al anticuerpo también se contemplan en la presente invención. Liu et al., 2003, describe "peptidomiméticos de unión semejante al anticuerpo " (ABiPs), que son péptidos que actúan como anticuerpos aparejados-hacia abajo y tienen ciertas ventajas de vida-media más larga en suero, así como métodos de síntesis menos problemáticos.

15 Se reconoce que los anticuerpos monoclonales (Mab) tienen ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, y generalmente se prefiere su uso. Por lo tanto la invención provee anticuerpos monoclonales de origen humano, de ratón, mono, rata, hámster, conejo e incluso de pollo. Debido a

la facilidad de preparación y fácil disponibilidad de los reactivos, los anticuerpos monoclonales de murino a menudo serán preferidos.

Sin embargo, los anticuerpos "humanizados" también se contemplan, así como los anticuerpos quiméricos de ratón, rata, o de otras especies, que contienen dominios de la región constante y/o variable de humano, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos recombinantes y diseñados y fragmentos de los mismos. Como se utiliza en la presente invención, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de marco de lectura de humano y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de una inmunoglobulina no de humano (usualmente de ratón o de rata). La inmunoglobulina no de humano que provee las CDR se denomina el "donante" y la inmunoglobulina de humano que provee el marco de lectura se denomina el "aceptor". Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) a los anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o unida, así como

fragmentos, regiones o derivados de los mismos, provistos por cualquier técnica conocida, tales como, pero no limitadas a, digestión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los anticuerpos establecidos en la presente invención son capaces de unirse a una PAG.

5 Los "anticuerpos policlonales" se definen en la presente invención para referirse a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. Estos diferentes anticuerpos pueden reconocer varios epítopes en el mismo antígeno. Un "anticuerpo monoclonal" contiene una población sustancialmente homogénea de
10 anticuerpos específicos al antígeno, cuya población sustancialmente contiene sitios de unión al epítope similares. Los MAbs se pueden obtener por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975; Patente de E.U.A. No. 4,376,110; Ausubel et al., 1992); Harlow y Lane, 1988; Colligan et al., 1993, los contenidos de los cuales se incorporan
15 específicamente en la presente invención como referencia. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Un hibridoma productor de mAb de la presente invención se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de

altos títulos de mAbs *in vivo* o *in situ* hace a éste el método de producción actualmente preferido.

Los "anticuerpos quiméricos" son porciones de diferentes moléculas las cuales se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que
5 tienen regiones variables derivadas de un mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina de humano, que se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para incrementar los rendimientos en la producción. Los anticuerpos quiméricos y métodos para su producción son conocidos en la técnica. Los métodos de producción ejemplares se describen en
10 Cabilly et al., 1984; Boulianne et al., 1984, y Neuberger et al., 1985, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en la presente invención en su totalidad.

Un "anticuerpo anti-idiotípico" (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar mediante la inmunización de un
15 animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuente del mAb con el mAb al cual se prepara un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante mediante la producción de un anticuerpo a estos determinantes

idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Un método ejemplar para la producción de dichos anticuerpos se encuentra en la Patente de E.U.A. No. 4,699,880, que se incorpora totalmente como referencia en la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir al menos una cadena pesada, al menos una cadena ligera, una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y/o una región constante de cadena ligera, en donde un Ab policlonal, Ab monoclonal, fragmento y/o regiones de los mismos, incluyen al menos una región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera que une una porción de una PAG.

Algunas modalidades de la presente invención pertenecen a los métodos para detectar el embarazo en un animal que incluye obtener una muestra a partir del animal y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio que se une a uno o más de boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y/o boPAG21 y detectar el contacto del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con PAG(s) en la muestra, en donde la detección de la PAG(s) indica que el animal está embarazado. Cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica

se puede utilizar para identificar un anticuerpo que se une a PAG. Los ejemplos de referencias que se refieren a los métodos para definir las regiones variables de la IgG incluyen Mo et al. (1993) y Leibiger et al. (1999), en la presente invención se incorporan específicamente como referencias.

5

IV. Métodos de detección y formatos de ensayo

Ciertas modalidades de la presente invención pertenecen a los métodos de detección del embarazo en un animal que implica poner en contacto una muestra obtenida a partir de un animal con un anticuerpo provisto en la presente invención y detectar al menos un antígeno asociado al embarazo en la muestra, en donde la detección de la PAG indica que el animal está embarazado. Cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica se puede utilizar para detectar anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a una PAG en la muestra.

Por lo tanto, la presente invención se provee para el uso de anticuerpos en la detección inmunológica de las PAGs. Se han descrito varios métodos de inmunodetección útiles en la literatura científica, tales como, por ejemplo, Nakamura et al. (1987). Los inmunoensayos, en su sentido más simple y

directo, son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos son ensayos de inmunoabsorción asociados a enzima (ELISAs) y radioinmunoensayos (RIA). La detección inmunohistoquímica utilizando secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a dichas técnicas, y a los análisis de Western blot, dot blot, FACS, y los análisis similares también se pueden utilizar en conexión con la presente invención.

En general, los métodos de inmunounión incluyen la obtención de una muestra sospechosa de contener una proteína, péptido o anticuerpo, y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o proteína o péptido de conformidad con la presente invención, según sea el caso, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejos. Las muestras preferidas, de conformidad con la presente invención, son fluidos, tales como la leche, orina, sangre, suero o saliva.

En modalidades particulares, el anticuerpo está unido a un soporte sólido, tal como la pared interior de un tubo o pozo, y la muestra sospechosa de contener la PAG se aplicará al anticuerpo inmovilizado.

Los sistemas de tubos recubiertos con anticuerpos se describen en Patente de E.U.A. 3,646,346 y WO 98/16832, cada una de las cuales se incorpora

específicamente en la presente invención como referencia. La presencia de complejos de PAG-anticuerpo se puede detectar bajo condiciones específicas. Opcionalmente, dichos complejos inmunes pueden ser cuantificados.

5 Poner en contacto la muestra biológica elegida con el anticuerpo bajo condiciones efectivas y por un período de tiempo adecuado para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) es generalmente una cuestión de simple adición de la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla por un período de tiempo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunes con, es decir, se unan a cualquier PAG
10 presente en la muestra. Después de este tiempo, la composición de la muestra-anticuerpo generalmente se lavará para eliminar cualquier especie de anticuerpo no específicamente unido, permitiendo que se detecten solamente aquellos anticuerpos específicamente unidos en los complejos inmunes primarios.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos se
15 conoce bien en la técnica y se puede lograr mediante la aplicación de numerosos métodos. Estos métodos generalmente se basan en la detección de una marca o un marcador, tales como cualquiera de aquellas marcas radiactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las Patentes de E.U.A. sobre el uso de dichas marcas

incluyen 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241, cada una incorporada en la presente invención como referencia. Los métodos para la determinación inmunológica de las proteínas y los kits para llevar a cabo el método se pueden encontrar en la Patente de E.U.A. 5,721,105, específicamente incorporada en la presente invención como referencia.

En modalidades particulares, el método incluye el uso de un ligando secundario, tal como un segundo anticuerpo y/o un arreglo de unión al ligando de biotina/avidina, como se sabe en la técnica. El anticuerpo secundario empleado en la detección puede estar asociado con una marca detectable, en donde uno podría entonces simplemente detectar esta marca, permitiendo así la presencia de la cantidad de los complejos inmunes primarios en la composición a ser determinada. Los métodos para la detección de una biomolécula en una muestra de prueba utilizando inmunocaptura, amplificación con biotina/avidina, y producción de color por peroxidasa de rábano se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de E.U.A. No. de Publicación 2003/508381.

Usualmente, los complejos inmunes primarios pueden ser detectados por medio de un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión para la PAG o el anticuerpo primario específico a PAG. En estos casos, el segundo

53

ligando de unión puede estar asociado con una marca detectable. El segundo ligando de unión es a menudo un anticuerpo, que puede ser denominado entonces como un anticuerpo "secundario". Los complejos inmunes primarios están en contacto con el ligando de unión secundario, marcado, o anticuerpo, bajo condiciones efectivas y por un período de tiempo adecuado para permitir la formación de complejos inmunes secundarios. Los complejos inmunes secundarios son entonces generalmente lavados para eliminar cualesquiera anticuerpos secundarios o ligandos marcados no específicamente unidos, y se luego detecta la marca remanente en los complejos inmunes secundarios.

10 Los métodos adicionales incluyen la detección de complejos inmunes primarios mediante un método de dos pasos. Un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión para la PAG o anticuerpo anti-PAG se utiliza para formar complejos inmunes secundarios, como se describió anteriormente. El segundo ligando de unión contiene una enzima capaz de procesar un sustrato hacia un producto detectable y, por tanto, amplificar la señal con el tiempo. Después del lavado, los complejos inmunes secundarios están en contacto con sustrato, lo que permite la detección.

En una modalidad de la invención, se puede utilizar el inmunoensayo asociado a enzima (ELISA). Véase, por ejemplo, Engvall, 1980; Engvall, 1976; Engvall, 1977; Gripenberg et al., 1978; Makler et al., 1981; Sarangadharan et al., 1984. El ELISA permite que las sustancias se adsorban pasivamente en soportes sólidos tal como el plástico para permitir el fácil manejo bajo condiciones de laboratorio. Para un amplio tratado sobre la prueba de ELISA el experto en la técnica se puede referir a "ELISA; Theory and Practise" (Crowther, 1995).

La sensibilidad de los métodos de ELISA depende del recambio de la enzima utilizada y la facilidad de detección del producto de la reacción enzimática.

La mejora en la sensibilidad de estos sistemas de ensayo se puede lograr mediante el uso de sustratos fluorescentes y radiactivos para las enzimas. Los inmunoensayos comprendidos por la presente invención incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en la Patente de E.U.A. 4,367,110 (ensayo intercalado doble de anticuerpo monoclonal) y en la Patente de E.U.A. 4,452,901 (Western blot). Otros ensayos incluyen la inmunoprecipitación de los ligandos marcados y la inmunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En una modalidad, la invención comprende un ELISA en "sándwich", en donde los anticuerpos anti-PAG de la presente invención están inmovilizados

SS

sobre una superficie seleccionada, tal como un pozo en una placa de poliestireno para microtitulación, un tubo o varilla reactiva. Entonces, una composición de prueba sospechosa de contener PAGs, por ejemplo, una muestra clínica, se pone en contacto con la superficie. Después de unirse y lavarse para retirar los

5 inmunocomplejos no específicamente unidos, el antígeno de unión se pudo detectar por un segundo anticuerpo a la PAG.

En otro ELISA ejemplar, los polipéptidos de la muestra se inmovilizaron sobre una superficie y luego se pusieron en contacto con los anticuerpos anti-PAG. Después de la unión y el lavado para retirar los complejos

10 inmunes no específicamente unidos, se detectó el anticuerpo unido. Cuando los anticuerpos iniciales se asocian con una marca detectable, los complejos inmunes primarios se pueden detectar directamente. Alternativamente, los complejos inmunes se pueden detectar utilizando un segundo anticuerpo que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo, con el segundo anticuerpo estando unido a una

15 marca detectable.

Otro ELISA en el que las PAGs se inmovilizan incluye el uso de la competencia del anticuerpo en la detección. En esta prueba de ELISA, los anticuerpos marcados se agregan a los pozos, permitiendo unirse a la PAG, y

detectarla por medio de su marca. La cantidad de PAG en una muestra se determina mediante la mezcla de la muestra con los anticuerpos marcados antes o durante la incubación con los pozos recubiertos. La presencia de PAG en la muestra actúa para reducir la cantidad de anticuerpo disponible para unión al pozo, y por lo tanto reduce la señal final.

Independientemente del formato empleado, los ELISAs tienen algunas características en común, tales como recubrimiento, incubación o unión, lavado para retirar especies no específicamente unidas, y detección de los complejos inmunes unidos. Al recubrir una placa con cualquier antígeno o anticuerpo, uno generalmente incubará los pozos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, ya sea durante la noche o durante un período especificado de horas. A continuación, los pozos de la placa serán lavados para eliminar el material incompletamente adsorbido. Cualesquiera superficies disponibles remanentes de los pozos se "recubren" entonces con una proteína no específica que es antigénicamente neutral con respecto a los antisueros de prueba. Estos pueden incluir la albúmina de suero de bovino (BSA), caseína, soluciones de leche en polvo u otras proteínas antigénicamente neutras. El recubrimiento permite bloquear los sitios de adsorción no específica en la superficie de inmovilización y

por lo tanto reduce el fondo causado por la unión no específica del antisuero sobre la superficie.

"Bajo condiciones efectivas que permitan la formación del complejo inmune (antígeno/anticuerpo)" significa que las condiciones preferiblemente incluyen diluir los antígenos y anticuerpos con soluciones tales como BSA, 5 gammaglobulina de bovino (BGG), leche evaporada o en polvo, y solución con pH regulado con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes añadidos también tienden a contribuir a la reducción del fondo no específico.

Las condiciones "adecuadas" también significan que la incubación es 10 a una temperatura y durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión. Los pasos de incubación son típicamente de aproximadamente 1h a 2h hasta 4 h, preferentemente a temperaturas en el orden de 25°C a 27°C, o puede estar toda la noche a aproximadamente 4°C o menos.

Para proveer un medio de detección, el anticuerpo secundario o 15 terciario tendrá una marca asociada para permitir la detección. A menudo, esta será una enzima que generará el desarrollo del color después de incubar con un sustrato cromogénico apropiado. Por lo tanto, por ejemplo, uno deseará poner en contacto e incubar el primer o segundo complejo inmune con un anticuerpo

conjugado a la ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa ácida por un período de tiempo y bajo las condiciones que favorecen el desarrollo de la formación adicional del inmunocomplejo (por ejemplo, la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-TWEEN).

Después de la incubación con el anticuerpo marcado, y subsecuente al lavado para eliminar el material no unido, la cantidad de marca se cuantifica, por ejemplo, mediante incubación con un sustrato cromogénico tales como la urea y bromocresol púrpura o ácido 2,2'-azido-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico [ABTS] y H_2O_2 , en el caso de la peroxidasa como la marca enzimática. Por lo tanto, la cuantificación se logra al medir el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

Una variante de ELISA es el ensayo de coagulación asociada a enzima, o ELCA (Patente de E.U.A. 4,668,621), que utiliza la cascada de coagulación combinada con la enzima para marcado RVV-XA como un sistema de detección universal. La ventaja de este sistema para la presente invención, es que las reacciones de coagulación se pueden realizar a pH fisiológico en la presencia

de una gran variedad de reguladores de pH. Por tanto, es posible mantener la integridad de los analitos complejos.

La inmunohistoquímica (IHC) también se puede utilizar de conformidad con la presente invención en la identificación de PAGs. Esto incluye

5 las pruebas de ambos bloques de tejido embebidos en parafina congelados en fresco y fijados en formalina preparados a partir del estudio por IHC. Por ejemplo, cada bloque de tejido consiste de 50 mg de tejido placentar "pulverizado" residual. El método de preparación de los bloques de tejido a partir de estos especímenes en partículas se ha utilizado con éxito en anteriores estudios de IHC de diversos

10 factores pronósticos, por ejemplo, en mama, y es bien conocido por aquellos expertos en la técnica (Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990).

Brevemente, las secciones congeladas se pueden preparar al rehidratar 50 mg del tejido placentar "pulverizado" congelado a temperatura

15 ambiente en solución salina con pH regulado con fosfato (PBS) en las pequeñas cápsulas de plástico; concentrando las partículas mediante centrifugación, resuspendiéndolas en un medio de inclusión viscoso (OCT), invirtiendo la cápsula y concentrándola de nuevo por centrifugación; congelando de manera instantánea

a -70°C en isopentano; cortando la cápsula de plástico y retirando el cilindro de tejido congelado; asegurando el cilindro de tejido en un mandril de microtomo del criostato, y cortando 25-50 secciones en serie que contienen un promedio de aproximadamente 500 células placentales remarcablemente intactas.

- 5 Las secciones permanentes se pueden preparar mediante un método similar que incluye la rehidratación de la muestra de 50 mg en un tubo de plástico para microcentrífuga; concentrando; resuspendiendo en formol al 10% para la fijación por 4 horas; lavando/concentrando; resuspendiendo en agar caliente al 2,5%; concentrando; enfriando en agua con hielo para endurecer el agar, retirando
10 el tejido/bloque de agar del tubo; infiltrando y embebiendo en el bloque de parafina, y cortando hasta 50 secciones permanentes en serie.

V. Purificación de Proteínas

- Ciertas modalidades pertenecen a un polipéptido aislado o purificado, o a los métodos que emplean un polipéptido aislado o purificado. Las técnicas de
15 purificación de proteína son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Estas técnicas incluyen, en un nivel, el fraccionamiento en crudo del medio celular hasta fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. Tras haber separado el polipéptido de otras proteínas, el polipéptido de interés puede ser purificado

adicionalmente utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o total (o la purificación hasta homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en
5 gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque. Un método particularmente eficiente de purificación de péptidos es cromatografía rápida líquida de proteínas o incluso HPLC.

Algunos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en modalidades particulares, a la purificación sustancial, de una
10 proteína o polipéptido codificado. El término "polipéptido, proteína o péptido purificado" como se utiliza en la presente invención, se pretende que se refiera a una composición, forma que se puede aislar a partir de otros componentes, en donde la proteína o péptido se purifica hasta cualquier grado relativo a su estado que se obtiene de manera natural. Por lo tanto, una proteína o péptido purificado
15 también se refiere a una proteína o péptido, libre del entorno en el que se presenta de manera natural.

Generalmente, "purificado" se referirá a una composición protéica o peptídica que ha sido sometida a fraccionamiento para eliminar varios otros

componentes, y cuya composición sustancialmente retiene su actividad biológica expresada. Cuando se utiliza el término "sustancialmente purificado", esta designación hará referencia a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye de

5 aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o más de las proteínas en la composición.

Varias técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas se conocerán bien por aquellos expertos en la técnica. Estos incluyen,

10 por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos, y los similares, o mediante desnaturalización por calor o por pH ácido de las proteínas contaminantes, seguido por centrifugación; pasos de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase reversa, cromatografía con hidroxapatita y de afinidad; isoelectroenfoque, electroforesis en gel, y combinaciones de dichas

15 técnicas y de otras técnicas. Como generalmente se sabe en la técnica, se cree que el orden para llevar a cabo los diversos pasos de purificación puede ser modificado, o que ciertos pasos se pueden omitir, y aún así resultar en un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

No hay un requisito general con respecto a que el polipéptido siempre se provea en su estado más purificado. De hecho, se contempla que los productos menos sustancialmente purificados tendrán utilidad en ciertas modalidades. La purificación parcial se puede lograr mediante el uso de menos pasos de purificación en combinación, o mediante la utilización de diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico que se lleva a cabo utilizando un aparato de HPLC generalmente resultará en una mayor purificación en cierto número de "veces" que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía a presión baja. Los métodos que exhiben un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto protéico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

VI. Kits

En incluso modalidades adicionales, la presente invención provee kits para uso con los métodos de inmunodetección anteriormente descritos para la detección de PAGs, tal como un kit de inmunodetección para diagnosticar el embarazo en un bovino. En modalidades específicas, un anticuerpo que

comprende un dominio que tiene más del 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o más del 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 se incluyen en el kit. El kit puede incluir: uno o más contenedores. El contenedor, por ejemplo, puede ser un vial, un tubo, un frasco, un vial o una jeringa.

- 5 En modalidades particulares, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal 2D9. En modalidades particulares, el kit incluye uno o más tubos o pozos de una placa para microtitulación con el anticuerpo previamente unido. Alternativamente, el kit puede incluir anticuerpo previamente unido a una matriz para columna. El kit puede permitir el ensayo de una muestra única, o más de una muestra. En
- 10 algunas modalidades, el kit incluye una pluralidad de placas para microtitulación o tubos recubiertos con anticuerpo que permiten la inmunodetección de numerosas muestras de manera concurrente o consecutiva.

- Los reactivos del kit para inmunodetección pueden tomar cualquiera de una variedad de formas, incluyendo aquellas marcas detectables que están
- 15 asociadas con y/o asociadas al anticuerpo dado. También se contemplan las marcas detectables que están asociadas con y/o están unidas a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios ejemplares son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión para el primer anticuerpo.

En algunas modalidades, los kits incluyen un anticuerpo secundario que tienen afinidad por el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede o no estar unido a una marca detectable. En algunas modalidades adicionales, el kit incluye un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, el tercer anticuerpo estando unido a una marca detectable. Como se señaló anteriormente, numerosas marcas ejemplares son conocidas en la técnica y/o todas esas marcas podrán ser empleadas en conexión con la presente invención.

Los kits pueden incluir opcionalmente una composición adecuadamente alicuotada de una PAG para proveer un control positivo. Los componentes de los kits pueden ser empaquetados ya sea en medios acuosos y/o en la forma liofilizada.

VII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Se debe apreciar por aquellos expertos en la técnica, que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y

por lo tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica debe, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y aún así obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Identificación de las PAGs de unión a 2D9

Se llevaron a cabo estudios para identificar las proteínas de unión a 2D9, para caracterizar y secuenciar el anticuerpo 2D9, y mapear los sitios de unión de PAG a 2D9. Para lograr esto, se llevaron a cabo dos métodos (descritos a continuación).

Materiales y métodos

Inmunoprecipitación de PAGs con lechos magnéticos recubiertos con 2D9. 2D9 purificada se acopló a lechos magnéticos Dynal activados por Tosilo de conformidad con las instrucciones del fabricante (Dynal). Los lechos magnéticos

recubiertos con anticuerpo se incubaron con 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG (obtenida a partir de placenta al día 55) durante 30 minutos en PBS 1x y se lava exhaustivamente con el mismo regulador de pH. Las proteínas unidas se eluyeron mediante el uso de ácido acético pH 3.0 y se sometieron a análisis en gel o análisis de Western blot. El Western blot se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de proteínas inmuno-reactivas se cortaron a partir de SDS-PAGE y se sometieron a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina (Cuadro A).

En este cuadro, las secuencias peptídicas de boPAG6 (panel superior) y secuencias peptídicas (panel inferior), identificadas en el análisis de LC-MS-MS (SEQ ID NOs: 7-18) mostraron que las PAGs eluidas de partículas magnéticas recubiertas con 2D9 después de la inmunoprecipitación de la preparación enriquecida con PAG que principalmente corresponde a boPAG6. Con el fin de identificar todos los componentes de unión a 2D9, se llevó a cabo una purificación por cromatografía de inmunoafinidad de la preparación enriquecida con PAG. El material purificado por columna de inmuno-afinidad se sometió a análisis LC-MS-MS. Este análisis reveló que boPAG6 es la principal

PAG de unión a 2D9 y boPAG 4-, boPAG-9, boPAG-20 y boPAG21 son PAGs menores de unión a 2D9.

CUADRO A

Identificación del antígeno PAG de unión a 2D9 por Análisis LC-MS-MS

Bos Taurus (NM176617) Glucoproteína 6 asociada al embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	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%	TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:8)
886.4468	2	1752.872	196	211	98.95%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:9)
592.9523	3	1757.815	212	227	89.57%	DKQEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:10)
767.3938	3	2281.195	266	287	90.78%	ALVDTGTSDIVGPSTLVNNIWK (SEQ ID NO:11)
467.2134	2	914.4286	362	368	99%	YFSVFDR (SEQ ID NO:12)
Antígeno PAG de union a 2D9						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	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%	TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:14)
886.4475	2	1752.872	196	211	99.00%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:15)
592.966	3	1757.815	212	227	95.84%	DKQEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:16)
767.404	3	2281.195	266	287	97.54%	ALVDTGTSDIVGPSTLVNNIWK (SEQ ID NO:17)
467.235	2	914.4286	362	368	84.44%	YFSVFDR (SEQ ID NO:18)

70

Cromatografía por inmunoafinidad de extractos de tejido preparados a partir de carúncula (endometrio) y tejidos cotiledonales (placenta) a partir del día 55 del embarazo del bovino. Brevemente, 2D9 purificado (10 mg) se acopló a 1 gramo de sefarosa activada por CNBr de conformidad con las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina por afinidad a 2D9 (aproximadamente 5.0 ml) se incubó con 25 ml del extracto de tejido a pH 7.0, durante toda la noche para unión. Al día siguiente, la resina se empaquetó en una columna y se lavó con PBS 1x para eliminar los materiales no unidos y se eluyó con ácido acético pH 3.0. El pH del material eluido se neutralizó con Tris 1M inmediatamente después de la elución a pH 7.0. El material eluido se sometió a análisis en gel y Western blot. El Western blot se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de proteínas 1 a 7 fueron cortadas a partir del SDS-PAGE y se sometieron a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina (Figura 2). Las identidades de las secuencias peptídicas se determinaron mediante análisis BLAST.

La afinidad de unión de PAG con respecto a 2D9 se determinó mediante transformación log-log de los datos de ELISA (Figura 3) desarrollada con el antígeno de unión 2D9 como PAGs estándares (purificada mediante

inmunocromatografía por afinidad). El ensayo se realizó con una serie de estándares de la PAG con un intervalo de 0.05 ng/ml a 50 ng/ml (0.083 nM a 8.3 nM). El análisis de ELISA se repitió 3 veces. Los datos fueron analizados con SoftMax™ (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA).

5

Resultados

Inmunoprecipitación de PAGs con lechos magnéticos acoplados a

2D9. Los análisis de SDS-PAGE y de Western blot del material eluido a partir del lecho magnético mostró una sola banda de proteína en 67kD. La impresión de los
10 dedos peptídicos y el análisis LC-MS-MS identificaron esta banda de proteína como boPAG6 (Cuadro A). Sin embargo, este análisis no reveló todas las PAGs unidas a 2D9 ya que el análisis utilizó 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG para el experimento de inmunoprecipitación. Este material se aisló mediante cromatografía por afinidad a pepstatina del extracto de tejido de
15 la placenta a un pH de 5.0, seguido por elución a pH 9.5. Esta preparación también se denominó "PAGs-ácidas", una preparación enriquecida con los antígenos PAG tempranos. Con el objeto de identificar todas las PAGs de unión a

2D9, se llevó a cabo una cromatografía por inmunoafinidad con extractos de tejido (véase a continuación).

El análisis de las PAGs purificadas a partir de extractos de tejido con
5 cromatografía por inmunoafinidad de 2D9. La tinción con azul de Coomassie del material eluido con la columna de inmuno-afinidad mostró 3 bandas de proteína con pesos moleculares de 67 kD, 55 kD y 50 kD. También se encontró que las tres bandas de proteína eran inmuno-reactivas en el análisis de Western blot con anticuerpos anti-PAG de conejo. Con base en estos resultados, todas las bandas
10 de proteína se cortaron después de SDS-PAGE (Figura 2) y se sometieron a impresión de huella peptídica y LC-MS-MS. Las identidades de las secuencias peptídicas resultantes se determinaron mediante análisis BLAST. El cuadro 1 muestra un resumen de los resultados de la secuencia peptídica y su identificación como PAG que corresponden a las secuencias boPAG-4, boPAG-6, boPAG-9,
15 boPAG-20 y boPAG21 mediante análisis BLAST. Para el significado de los parámetros en el Cuadro 1, vea la descripción de la Figura 1.

CUADRO 1

Resumen de los resultados de secuencia peptídica

5

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas 3, 5, 6 y 7						
Bos Taurus (gi28603710) Glucoproteína 4 Asociada al Embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia peptídica
494.7897	2	969.5647	523	331	97.72%	VPSQAYILF (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%	TFSITYGSGF (SEQ ID NO:21)
600.8262	2	1197.6216	232	241	94.10%	GELIWIPLMF (SEQ ID NO:22)
671.695	3	1994.0513	195	212	99.00%	LNNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:23)
820.4574	3	2440.2678	172	194	67.95%	FDGVLGLSYTNISPSGAIFIFYK (SEQ ID NO:24)

10

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas 1, 2, 4 y 5						
Bos Taurus (gi28603714) Glucoproteína 6 Asociada al Embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia peptídica
886.4235	2	1752.5722	196	211	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:25)
881.9394	2	1743.8865	147	162	95.46%	IGDLVSTDGPFGLCLK (SEQ ID NO:26)
809.7134	3	2408.1736	231	250	91.77%	GELNWWPLIQVGDFVHMDR (SEQ ID NO:27)
671.6718	3	1994.0513	194	211	97.94%	LNNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:28)
615.3026	2	1210.6022	183	193	93.74%	TFSGAFFIFDK (SEQ ID NO:29)
592.9321	3	1757.8154	212	227	99.00%	DFQEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:30)
511.9066	3	1514.6926	214	227	90.49%	QEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:31)
467.2342	2	914.4286	362	368	91.25%	LYFSVFDR (SEQ ID NO:32)

15

5

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas 2 y 5						
Bos Taurus (gi25603720) Glucoproteína 9 Asociada al Embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia peptídica
467.2146	2	914.4286	362	368	99.00%	TFSEVDFR (SEQ ID NO:33)
521.2636	2	1032.5185	138	148	99.00%	GFLAYDTVF (SEQ ID NO:34)
653.9524	2	1940.8727	214	230	96.15%	QEGSVVMFGGVDHQYTK (SEQ ID NO:35)
654.80054	2	1259.5962	126	127	97.70%	TFTITVGSQSMK (SEQ ID NO:36)
660.9275	2	1301.6763	350	360	94.72%	ETWILGDAFLR (SEQ ID NO:37)
734.6413	2	2183.0105	212	230	87.19%	NHQEGSVVMFGGVDHQYTK (SEQ ID NO:38)
739.9147	2	1459.8439	207	219	99.00%	YLPSTFIINGIK (SEQ ID NO:39)
817.7423	3	2432.2222	147	169	99.00%	IGDLVSTDQPFGLSVVEYGLEGR (SEQ ID NO:40)
875.3999	3	2605.2012	256	250	83.62%	TVIACSDGCEALVHTGTSHIEGPGR (SEQ ID NO:41)

10

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas 1 y 4						
Bos Taurus (gi23602736) Glucoproteína 20 Asociada al Embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia peptídica
671.6718	3	1994.0513	195	212	97.94%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:42)
758.8157	2	1497.7511	215	223	50.93%	QKQSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:43)
886.4235	2	1752.8722	197	212	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:44)

15

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas 3, 5 y 7						
Bos Taurus (gi29803735) Glucoproteína 21 Asociada al Embarazo						
Mz	Carga	Mr(calc)	Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia peptídica
516.7575	2	1013.497	362	369	99.00%	VTFSEVDFR (SEQ ID NO:45)
544.7657	2	1069.5193	127	136	93.95%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:46)
694.3236	3	2081.9712	258	277	93.47%	VVACSDGCEAVVDGTSLIK (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%	AYDGILGLNTPDESFSFAIPIFDK (SEQ ID NO:49)
915.4483	2	1810.8889	246	361	81.27%	FSSSTETWLLGDAFLR (SEQ ID NO:50)

75

Este análisis mostró que cada una de las 3 bandas de proteína tiene
5 más de una PAG (Cuadro 1). La banda de 67kD contenía los péptidos que
corresponden a boPAG6 y boPAG20. La banda de proteína de 55 kD contenía los
péptidos que pertenecen a boPAG6 y boPAG9. La banda de proteína de 50 kD
correspondió a boPAG4 y boPAG21 con boPAG9 como un componente menor.
Estos resultados muestran que el anticuerpo monoclonal de 2D9 se une al
10 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21. Este anticuerpo monoclonal
se une a los epítopes comunes a todas las 5 PAG. La comparación de secuencia
mostró un alto grado de identidad de secuencia entre estas PAGs.

Se utilizaron los resultados del ELISA de PAG (Figura 3) obtenidos
mediante el uso de las PAGs de unión a 2D9 como estándares para calcular el
15 valor Kd mediante el uso de SoftMaxTM. El valor Kd de 2D9 se determinó como 0.9
nM (Figura 3). Por lo tanto, 2D9 es un anticuerpo monoclonal de alta afinidad para
las PAGs. Estos resultados mostraron que 2D9, un anticuerpo monoclonal de
PAG, se une a boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21 a partir de los

extractos de tejido de placenta al día 55. Las identidades de las secuencias peptídicas obtenidas por LC-MS-MS corresponden con las secuencias previamente caracterizadas de estas 5 PAGs (boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 y boPAG21).

5

EJEMPLO 2

Secuenciación de proteína y ARNm

Secuenciación de proteína de 2D9 purificada. La secuenciación de

10 2D9 se realizó con el fin de identificar las secuencias de unión al antígenos de PAG de 2D9. La secuenciación de 2D9 se llevó a cabo por los métodos de secuenciación de proteína y del ADN. En primer lugar, las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2D9 fueron separadas por electroforesis en gel desnaturalizante. Las bandas en gel se escindieron y sometieron a digestiones enzimáticas por

15 tripsina y quimotripsina, por separado. Los péptidos resultantes se separaron y secuenciaron por el método de LC-MS-MS (Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas-Espectrometría de Masas). Los péptidos con > 90% de puntaje de confianza en el análisis de masas y de secuenciación fueron seleccionados. Las

secuencias peptídicas resultantes se utilizaron para ensamblar ~80% de la secuencia de cadena ligera y ~50% de la secuencia de cadena pesada.

Secuenciación de ARNm de cadena pesada y ligera de 2D9. En un

5 segundo método, el ARNm que corresponde a las cadenas pesadas y ligeras de 2D9 se secuenciaron mediante el uso de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), con el ARN total preparado a partir de células del hibridoma de PAG de 2D9.

Brevemente, las células de hibridoma que producen el anticuerpo
10 monoclonal de PAG se cultivaron en el medio de cultivo para tejidos libre de suero para producir 1×10^6 células. Las células se centrifugaron y el concentrado celular resultante se congeló de manera instantánea en nitrógeno líquido. El concentrado celular se almacenó a -80°C hasta su uso. Se produjo la primera cadena complementaria de ADN (ADNc) mediante el uso del kit Cell-to-cDNA II obtenido a
15 partir de Ambion, Inc., Austin, TX. El ARN en las células de hibridoma se retro-transcribió para producir ADNc sin un paso de extracción de ARN separado. El molde de ADNc resultante se utilizó para la amplificación de las cadenas ligeras y pesadas mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con

una serie de iniciadores diseñados para amplificar todas las subclases de cadenas pesadas y ligeras del ratón (Chardes et al., 1999). El producto de PCR resultante se secuenció. Los datos de la secuencia se reunieron con el paquete de software DNA STAR™. El estudio completo se repitió para asegurar la precisión de la secuencia. En segundo lugar, la repetición de la amplificación y secuenciación por PCR incluyeron iniciadores adicionales para aumentar la cobertura.

El análisis de secuencia mostró que la cadena pesada de 2D9 se derivó de la subclase IgG1 gamma de ratón y la cadena ligera se derivó del tipo kappa. La cadena pesada consistió de 448 residuos de aminoácidos y la cadena ligera consistió de 219 residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 2D9 se estableció como SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 2D9 se estableció como SEQ ID NO: 4. La secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 2D9 se estableció como SEQ ID NO: 5. La secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 2D9 se estableció como SEQ ID NO: 6.

EJEMPLO 3

Estudios de viabilidad de una prueba de embarazo basada en inmunoensayo en el ganado vacuno

Se llevó a cabo un estudio a gran escala para evaluar el aspecto económico de la prueba de embarazo temprano a los 28 días en el manejo reproductivo de vacas lecheras. Los animales de estudio se localizaron en dos sitios diferentes, uno en California y uno en Wisconsin. 1,050 animales fueron asignados por sitio. La reproducción inicial fue seguida ya sea por la realización de una prueba de embarazo basada en inmunoensayo como se describe a continuación, o por palpación estándar. Las muestras fueron enviadas al laboratorio durante la noche. El estudio utilizó un ELISA intercalado optimizado con los anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. La prueba de ELISA para PAG utilizó un punto límite de 1.7 ng/ml, basado en un estudio de prueba. Las muestras de sangre fueron recolectadas al día 28 y se enviaron al laboratorio para pruebas de embarazo. El diagnóstico de embarazo se realizó mediante ELISA para PAG y se generó un reporte de los resultados, y se proporcionaron dentro de las primeras 24 horas al personal de la granja. Las decisiones de reproducción se

hicieron con base en los resultados del diagnóstico de embarazo a partir de la prueba para PAG por el grupo de resincronización temprana. Las decisiones de reproducción para el grupo de resincronización tardía (control) se realizaron con base en la palpación a los días 35 a 45. Los resultados a partir de los dos sitios se muestran en las Cuadros B-D.

El Cuadro B muestra la exactitud de un diagnóstico de embarazo basado en el laboratorio con un ELISA para PAG en comparación con el diagnóstico de embarazo basado en ultrasonido. El Cuadro B muestra la exactitud del diagnóstico de embarazo al día 28 mediante el uso de un ELISA basado en laboratorio en comparación con el diagnóstico de embarazo al día 28 utilizando ultrasonido en dos sitios de estudio, Wisconsin y California. El aspecto económico de una prueba de embarazo al día 28 en el manejo reproductivo de vacas lecheras se examinó en este estudio beta. Un ELISA para PAG basado en el laboratorio con anticuerpos policlonales se utilizó para el diagnóstico de embarazo. El sitio Wisconsin utilizó reproducción estrictamente sincronizada mientras que el sitio California utilizó reproducción sincronizada más reproducción en celo. Se utilizaron Aproximadamente 1000 vacas en el estudio por sitio. Las muestras de sangre se recolectaron al día 28, se enviaron al laboratorio para prueba de embarazo. Los resultados se regresaron a las granjas dentro de las 24 horas para permitir la toma

de decisiones con respecto a la reproducción. El estado de embarazo también se determinó mediante ultrasonido en el momento de la recolección de sangre al día 28.

CUADRO B

Resultados del estudio-β:

Datos de PAG y US al día 28

Sitio Wisconsin

	PAGs			
US	Embaraz.	Abiertas	Porcentaje de coincidencia	
Embarazadas	358	11	369	97.0
Abiertas	44	464	508	91.3
	402	475	877	

Sitio California

	PAGs			
US	Embaraz.	Abiertas	Porcentaje de coincidencia	
Embarazadas	391	18	409	95.6
Abiertas	41	419	460	91.1
	432	437	869	

Cuadro C: Comparación de la prueba de embarazo de las muestras de plasma fresco con ELISA intercalado de PAG con anticuerpos policlonales

(Poli:Poli, panel superior) y anticuerpo monoclonal 2D9 y anticuerpo policlonal (Mono:Poli, panel inferior). Tenga en cuenta que hay una clara separación de las muestras de vaca abierta que se distingue por el uso de una intensidad de color límite de 0.2 DO. Todas las muestras de vacas embarazadas tuvieron una intensidad del color > 0.2 unidades de DO. El ensayo Mono:Poli tuvo una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% en este experimento.

CUADRO C

Resultados del estudio-β:

Wisconsin-reproducción sincronizada

Características	Resincronización temprana	Resincronización tardía	importancia
Número disponible después del 1er TAI	228	226	
% de embarazo en la primera inseminación	46.3	47.9	NS
Días entre las inseminaciones	35.1	42.0	P<0.05
Número de inseminaciones (NI)	2.60	2.65	NS
NI/concepción	2.29	2.37	NS
Días para el embarazo (excluya el 1er TAI)	45.2	58.3	P<0.05
% de embarazos (excluya el 1er TAI)	46.1	51.4	NS

* Datos para 30 vacas a ser resueltas

Cuadro D. Ensayo de campo de la prueba de color con muestras de sangre. Se analizaron cincuenta y cuatro muestras de sangre recolectadas a partir de 33-34 días después de la reproducción y el color se leyó visualmente por 3 miembros del personal. No hubo discrepancias observadas en la puntuación visual de los resultados entre los 3 individuos.

CUADRO D

Resultados del estudio-β:

California-TAI + reproducción en celo

Características	Resincronización temprana	Resincronización tardía	Importancia
Número disponible después del 1er TAI	321	335	
% de embarazo en la primera inseminación	27.7	28.7	NS
Días entre las inseminaciones	28.9	32.3	P<0.05
Número de inseminaciones (NI)	2.86	3.05	P<0.05
NI/concepción	2.49	2.77	P<0.05
Días para el embarazo (excluya el 1er TAI)	37.9	48.0	P<0.05
% de embarazos (excluya el 1er TAI)	36.6	36.2	NS

* Datos para 42 vacas a ser resueltas

El Cuadro C y el Cuadro D muestran los resultados de los parámetros de reproducción utilizados para determinar el aspecto económico de la detección temprana del embarazo en el manejo reproductivo de vacas lecheras en dos diferentes esquemas de reproducción. Los resultados claramente muestran que hay una reducción significativa en los días abiertos por 10 a 15 días en el grupo para resincronización temprana en comparación con los controles. Además, se observó una reducción en los días entre inseminaciones en ambos sitios.

Estos resultados muestran que las pruebas de embarazo temprano con ELISA para PAG después de 27-30 días de inseminación permitieron una reproducción temprana en comparación con la palpación. Las pruebas de embarazo temprano redujeron significativamente los "días abiertos" en las vacas para re-reproducción. Además, las pruebas de embarazo temprano redujeron significativamente los días entre la inseminación. La estrategia de reproducción en celo con la prueba de embarazo temprano mostró que se redujo el número de inseminaciones por concepción.

EJEMPLO 4**Conceptos de prueba en granja: prueba de embarazo en bovino (tiras reactivas)**

Se llevó a cabo un estudio adicional para evaluar la factibilidad de uso de 2D9 en el desarrollo de una prueba de embarazo "en granja" con tiras reactivas. Las tiras reactivas utilizaron la tecnología de flujo lateral, que es la misma tecnología utilizada en las pruebas caseras de embarazo. Las tiras de prueba de flujo lateral tienen anticuerpos conjugados a oro coloidal en la muestra de aplicación final y se colocó un anticuerpo de captura en la línea de prueba en el centro de la tira. Si antígeno de prueba (PAG) está presente en la muestra, entonces el anticuerpo conjugado al oro se unirá al antígeno y el complejo resultante migra hacia la línea de prueba. En la línea de prueba, el anticuerpo de captura (también generado en contra de la PAG) se unirá a este complejo y se concentrará en la línea. Cuando se retienen complejos suficientes en la línea de la prueba como en un intercalamiento de anticuerpos, aparecerá una línea visible de color violeta debido al anticuerpo marcado con oro coloidal unido al antígeno de

prueba. Las tiras de flujo lateral con más de 40 combinaciones de anticuerpos (incluyendo 2D9 como el anticuerpo de captura) se ha fabricado y probado. Ninguna de las combinaciones probadas de tira de flujo lateral produjo sensibilidad y especificidad aceptables. Como un resultado, fueron evaluados otros formatos de prueba de diagnóstico rápido para desarrollar una prueba “en la granja”. Entre los formatos evaluados, los tubos de plástico con costillas internas mostraron resultados promisorios. Debido a esto, el formato del tubo se seleccionó para una optimización adicional como una prueba de color.

EJEMPLO 5

Conceptos de prueba en la Granja: prueba de embarazo en bovino (Placas en multi-pozos)

En un estudio adicional, las muestras de plasma a partir del día 28 de vacas embarazadas confirmadas se utilizaron para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de color. La intensidad del color se determinó mediante la transferencia de la solución de la muestra a una placa de multi-pozos recubierta con 2D9. La placa se leyó en un lector de placas (SpectraMax, Molecular Devices,

Inc., CA). El panel de plasma consistió de 20 muestras a partir de animales embarazados y 20 animales abiertos (no embarazados). Cada muestra se analizó por duplicado. Basándose en la densidad óptica de las intensidades de color obtenidas a partir de las 40 muestras, mediante el uso de un límite unitario de DO de 0.2 como un color de fondo, la prueba mostró 100% de sensibilidad y 100% de especificidad (Figura 4).

EJEMPLO 6

Conceptos de prueba en la granja: Prueba de embarazo por color en bovino

(tubos de plástico)

Materiales y métodos. Después del protocolo se describe el procedimiento optimizado para la prueba de embarazo con tubos de plástico recubiertos con 2D9. La prueba se puede realizar con muestras de sangre total recolectadas con tubos para recolección de sangre K3EDTA o con muestras de plasma.

Materiales. Los tubos con costillas internas (#214-2131-010) se obtuvieron a partir de Evergreen Scientific Company, Los Angeles, California. Los anticuerpos monoclonales a PAG, anticuerpos policlonales 2D9 y de conejo se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína G. El marcado con biotina de los anticuerpos policlonales de conejo se llevó a cabo mediante el uso del kit de marcado con biotina de Roche (#1-418-165, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana), de conformidad con las instrucciones del fabricante. La Streptavidin-PolyHRP20® (#RDI-PHRP20-SA) se obtuvo a partir de Research Diagnostics, Inc, Concord, MA. Se adquirió Sure Blue Reserve® (#53-00-03) a partir de KPL, Inc, Gaithersburg, MD. Se obtuvo Superblock con TWEEN20® (#37516) a partir de Pierce Biotech, Rockford, IL. El anticuerpo monoclonal 2D9 purificado en solución salina con pH regulado con fosfato (pH 7.4) con concentración conocida; regulador de pH para recubrimiento: Na_2CO_3 0.1 M, pH 9.3; regulador de pH para lavado: 1xPBS con 0.05% de Tween20; regulador de pH para dilución: 10% de SuperBlock™ en el regulador de pH para lavado.

Marcado con biotina de anticuerpos policlonales. El anticuerpo policlonal purificado de conejo (1 mg) se utilizó para el marcado con biotina de

conformidad con el procedimiento recomendado por el fabricante del equipo (Roche). Brevemente, se añadieron 7.6 μ l del reactivo de biotina activada en DMSO a 1 mg de anticuerpo en 1.0 ml de solución de PBS en un tubo de 1.5 ml. El tubo fue colocado en un agitador rotatorio a 45 rpm ajustado por 2 horas a temperatura ambiente. Después de este paso, los contenidos se transfirieron a un diálisis slide-A lyzer™ (Pierce Biotech, #63360) y se dializó en contra de 1xPBS a 4°C durante 16 horas con 2 cambios de regulador de pH. La IgG marcada con biotina se recuperó a partir de la Slide-A-lyzer y se almacenó como 1:100 de solución de almacenamiento diluido con BSA al 1% en PBS. Esta solución se diluyó a 1:2000 con la dilución del regulador de pH para las pruebas de embarazo antes de su uso.

Recubrimiento de anticuerpo para los tubos. El anticuerpo monoclonal purificado, 2D9, se diluyó en 0.1 M de regulador de pH con carbonato de sodio (pH 9.3) a una concentración de 1.25 μ g/ml para recubrimiento de los tubos. Los tubos fueron recubiertos con 0.5 μ g del anticuerpo en 0.4 ml de regulador de pH con carbonato sódico, durante 16 a 18 horas a 4°C para recubrimiento. Para la incubación, los tubos fueron colocados en el interior de un

recipiente de plástico con una tapa hermética bien cerrada más una toalla de papel húmeda para la humedad y se mantiene a 4°C. Después de la incubación, la solución del anticuerpo se removió y los tubos se lavaron dos veces con el regulador de pH para lavado. Los tubos fueron bloqueados entonces con 0.4 ml de superbloc-TWEEN20 durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se eliminó el superbloc y los tubos se secaron al colocarlos en una cámara seca durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de este paso, los tubos fueron sellados y almacenados a 4°C en un recipiente de plástico libre de humedad hasta su uso. Los tubos recubiertos se usaron por 6 meses con una pérdida mínima en la prueba de rendimiento.

Recolección de la muestra. Las vacas fueron criados en celo sincronizado utilizando un protocolo de sincronización Ovsynch. Se utilizaron aproximadamente 200 vacas para cada reproducción sincronizada. Se reprodujeron un total de 815 vacas mediante inseminación artificial (IA) y el día de la IA fue el día 0. Las muestras de sangre a partir de 800 vacas se recolectaron en tubos con anticoagulante K3EDTA (BD #366643) de vacas en los días 26 y 28 y se enviaron al laboratorio en hielo mediante envío nocturno. Las muestras de

sangre se utilizaron directamente en la prueba de color después de la recepción. Las vacas fueron revisadas para estado de embarazo por ultrasonido al día ~29 y se re-confirmó por palpación rectal al día ~60. Los datos del diagnóstico de embarazo de 797 vacas estuvieron disponibles al final del estudio y se utilizaron para el análisis de precisión de la prueba.

Procedimiento de la prueba de color:

Las muestras de sangre se mezclaron por inversión hasta 10 veces para facilitar la fácil transferencia de la muestra. Cuatrocientos microlitros (0.4 ml) de sangre se transfirieron a cada tubo y los tubos se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Después de esta incubación, la muestra de sangre se aspiró y los tubos se llenaron con regulador de pH para lavado (1xPBS con 0.05% de Tween20). El regulador de pH para lavado se aspira y los tubos se lavan 2 veces de manera adicional con el regulador de pH para lavado. Después del tercer lavado, se añadieron 0.4 ml de 1:2000 de anticuerpo policlonal anti-PAG diluido marcado con biotina en un regulador de pH para dilución (10% de SuperblockT20TM en regulador de pH para lavado) a cada tubo y se incubó durante 15 minutos a 37°C en un baño con agua. Después de la incubación, los

tubos fueron aspirados y se lavaron dos veces con regulador de pH para lavado. A continuación, se añadieron 0.4 ml de estreptavidina-PolyHRP20 (1:30,000) en un regulador de pH para dilución a cada tubo y se incubó durante 15 minutos a 37°C en un baño con agua. Después de la tercera incubación, el contenido de cada tubo fue aspirado y el tubo se lavó dos veces con regulador de pH para lavado. A continuación, se añadieron 0.4 ml del sustrato HRP, SureBlueReserve™, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, se observó un color azul profundo en los tubos que recibieron muestras de vacas embarazadas (Figura 5). Los tubos que recibieron muestras de animales que no están embarazados permanecieron claros (Figura 5). El color se puede leer visualmente para inferir en el estado del embarazo. Sin embargo, para cuantificar el color en el laboratorio, se añadió un volumen igual de (0.4 ml) de solución de paro (HCl 1N) a cada tubo virando el color de azul a amarillo. Luego se transfirió una alícuota (0.2 ml) a partir de cada muestra a la placa de ELISA y se registró la densidad óptica a 430 nm. Los valores de DO por encima o igual a 0.2 se consideraron de "embarazo" y los valores por debajo de éste se consideraron "abiertos". La intensidad del color límite de 0.2 DO se estableció previamente con muestras de panel de prueba utilizadas para el diagnóstico de embarazo.

El siguiente es un breve resumen de los pasos para el procedimiento de prueba en tubo:

1. Añadir 400 µl de muestra, 15 minutos a 37°C
2. Lavar 3X para sangre, 2X para plasma
3. Añadir 400 µl de marca de biotina, 15 minutos a 37°C
4. Lavar 2X
5. Añadir 400 µl de Poly-HRP20, 15 minutos a 37°C
6. Lavar 2X
7. Añadir 400 µl de SureBlue Reserve™
8. Leer - 5 minutos-15 minutos (Azul = embarazada; claro = abierta

(no embarazada))

Definiciones de los parámetros del análisis de prueba:

Sensibilidad: Capacidad de la prueba de sangre para identificar las vacas embarazadas como preñadas.

Especificidad: Capacidad de la prueba de sangre para identificar vacas abiertas (no preñadas) como vaca abierta.

Ventajas de la prueba de color: Los suministros de la prueba incluyen un tubo para sangre con tapa de color púrpura (3.0 ml con K₂EDTA) para la recolección de la sangre, tubos pre-recubiertos, reactivos, botella de irrigación, y pipetas de transferencia. Se requiere una incubadora a 37°C/de relujo/en bloque. A diferencia de la placa de ELISA, esta prueba no requiere centrifugación para separar el plasma puesto que la sangre entera se puede utilizar directamente en la prueba. La prueba tampoco requiere de equipo como el agitador de placas, equipos para lavado (lavador de placas) o lectura (lector de placas). El lavado se puede realizar con botellas de irrigación y pipetas de transferencia que se utilizan para la eliminación de la solución del regulador de pH para lavado entre los lavados. El color se puede leer visualmente. Sin embargo, en el laboratorio, al final de la prueba de color (después del paso 8), se añadieron 0.4 ml de solución de paro y HCl 1N a todos los tubos y se transfiere una alícuota (0.2 ml) a una placa de ELISA y la intensidad del color se registró en un lector de placas. El tiempo total del ensayo es de aproximadamente 2 horas, en comparación con la placa de

ELISA convencional (4 horas). Este ensayo de color puede ser, opcionalmente, multiplexado, tal como con placas de 96 pozos, 48 pozos o 24 pozos.

Resultados. Los resultados de la prueba de color con el panel de prueba en plasma al día 28 (20 muestras abiertas y 20 embarazadas) se muestran en la Figura 6A, y los resultados de la prueba con el panel de prueba en plasma al día 55 (20 muestras abiertas y 20 embarazadas) se muestran en la Figura 6B. Todas las muestras abiertas tiene un valor de intensidad del color ≤ 0.2 DO mientras que las muestras de animales embarazados mostraron una intensidad del color >0.2 DO.

Al utilizar este valor límite, ambos paneles de prueba (Figuras 6A y 6B) mostraron $>95\%$ de sensibilidad y especificidad. Una nueva serie de muestras de plasma también fueron probadas en este sistema y mostraron proveer una clara separación de las vacas abiertas y las vacas embarazadas (Figura 7).

EJEMPLO 7

Conceptos de prueba en la granja: Prueba de embarazo por color en bovino

(tubos de plástico)

La prueba se realizó “en la granja” como se describió mediante el uso de un baño de agua a 37°C y sin equipo adicional. En esta prueba de campo, se ensayaron 58 muestras de sangre. La prueba del color se realizó con 0.4 ml de muestras de sangre (Figura 6) y la confirmación del embarazo se realizó por ultrasonido (Cuadro E). El color se leyó por 3 miembros del personal y no hubo desacuerdo en la calificación visual de los resultados de la prueba. La prueba de color es capaz de identificar las 14 vacas embarazadas. Los 3 individuos anotados como “no concluyentes” con 2 muestras, debido al fondo azul y a las muestras resultaron ser “abiertas”. Estas pruebas de campo mostraron 100% de sensibilidad y 92.5% de especificidad (37/40) en comparación con el ultrasonido.

CUADRO E

Prueba de color: Evaluación de campo

Número total de muestras ensayadas: 54

Días 33 a 34 después de la reproducción

	Embarazada	Abierta	Remonitoreo
PAGs	15	37	2
US	14	40	
Coincidencia	14	36	

La prueba se leyó por 3 personas

1 falso-positivo en el tubo de ensayo

En este cuadro se muestran los resultados de prueba de campo de la prueba de color en comparación con los resultados del ultrasonido de 54 muestras. La prueba identificó todas las vacas embarazadas (100% de sensibilidad) con un resultado positivo falso en comparación con los resultados del ultrasonido. Hubo 2 muestras con resultados dudosos en la prueba de color que se constató que eran de vacas "abiertas". Sin embargo, la prueba de color identificó 37 de 40 vacas abiertas (92.5% de especificidad) en comparación con el ultrasonido.

EJEMPLO 8

Prueba de embarazo por color basado en un inmunoensayo intercalado

(tubos de plástico)

Materiales y métodos. Una prueba basada en inmunoensayo intercalado se desarrolló mediante el uso del anticuerpo monoclonal de la PAG, 2D9 como un anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal de conejo marcado con biotina como segundo anticuerpo. El anticuerpo monoclonal de PAG está

recubierto en el interior de un tubo de plástico transparente o pozo y sirve como una trampa. Los tubos utilizados fueron tubos con costillas internas para incrementar la superficie para recubrimiento con el anticuerpo (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA). El complejo se detecta con un sistema de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano)/sustrato de HRP. La Estreptavidina Poly-HRP20 se obtuvo a partir de Research Diagnostics Inc., Concord, MA, y la peroxidasa de rábano se obtuvo de KPL, Inc., Gaithersburg, MD. La detección del complejo se indica por un color (azul o amarillo) en el tubo o pozo, lo que indica la presencia de PAGs en la muestra. La información sobre el establecimiento general de un ELISA para la detección de PAGs en el suero de vacas embarazadas y terneras se puede encontrar en Green et al., 2005. El estándar del ensayo fue de 0.5 ng a 6.0 ng. El examen dura aproximadamente 4 horas para completarse.

La prueba se puede realizar con suministros simples de laboratorio en una granja o un sitio similar. En este ejemplo, una incubadora a 37°C y pipetas son los únicos componentes necesarios además de los suministros de reactivos. El concepto de prueba de color se puede combinar con Ovsynch, Resynch e Inseminación Artificial Programada (ITF) como parte de una herramienta de manejo reproductivo para el ganado. El concepto de prueba también se puede extender a otros analitos tales como la progesterona y otros antígenos para el

embarazo para incrementar la precisión del diagnóstico o para avanzar en la detección del embarazo antes del día 26. La multiplexación se puede realizar mediante el uso de, por ejemplo, bandejas de 96 pozos o de 48 pozos o mediante el uso de tubos múltiples.

CUADRO 2

Reactivos del ensayo, suministros y proveedor de información

Artículo	Reactivo de ensayo/Suministros	Propósito	Información del Proveedor
1	Anticuerpo Monoclonal 2D9	Anticuerpo para recubrimiento	
2	Anticuerpo policlonal de Conejo	Anticuerpo secundario marcado con biotina	
3	Estreptavidina-Poli Peroxidasa de Rábano (HRP) 20	Señal de amplificación	Research Diagnostics Inc., Concord, MA
4	Sure Blue Reserve™	Color del sustrato para HRP	KPL Inc, Gaithersburg, MD
5	Super Block	Utilizado en el regulador de pH para bloqueo, regulador de pH para lavado y regulador de pH para dilución.	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL
6	Tubos con costillas internas, tubo de 12X75 mm, poliestireno con 6 costillas en la parte inferior.	Tubo utilizado para la prueba	Evergreen Scientific, Los Angeles, CA
7	Solución salina para regulador de pH con fosfato	Medio para regulador de pH para recubrimiento, bloqueo, lavado y dilución de los reactivos biotina-IgG, HRP.	Roche
8	Kit marcado con biotina (5 reacciones) y Kit para diálisis, Slide-A-Lyzer™	Preparación de la IgG marcada con biotina	Roche
9	Tween 20	Detergente utilizado en el regulador de pH para recubrimiento, bloqueo, lavado y dilución de reactivos de biotina-IgG, HRP a una concentración al 0.05%.	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.
10	Carbonato de sodio	Regulador de pH para recubrimiento del Anticuerpo	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

Resultados. Las pruebas de embarazo de 797 muestras de sangre tomadas a partir de animales al día 26 y 28 fueron evaluadas para sensibilidad y especificidad al comparar el ultrasonido del día 29 y los resultados de la palpación rectal al día 60. Las muestras de plasma se obtuvieron. Un límite de 0.2 unidades de DO para el diagnóstico de embarazo. El cuadro 3 muestra la exactitud de la prueba de sangre en comparación con el diagnóstico de embarazo basado en ultrasonido al día 29 y palpación rectal al día 60.

CUADRO 3

Análisis de la exactitud de la prueba de sangre en comparación con el ultrasonido al día 29 (US) y la palpación rectal al día 60.

Día de prueba de sangre	Día 26		Día 28	
	Número de vacas ensayadas			
	357	357	797	797
Monitores de embarazo	Día 29 US	Día 60 Palpación	Día 29 US	Día 60 Palpación
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 embarazo de bovino desarrollada con el anticuerpo monoclonal PAG, 2D9, provee una precisión comercialmente aceptable con bajos resultados de falsos negativos. Este anticuerpo se puede aplicar en los formatos de prueba de desarrollo rápido para detectar el estado de embarazo de las vacas tan temprano como al día 26 después de reproducción con alta sensibilidad y especificidad. El análisis adicional mostró que la exactitud de la prueba se puede mejorar al 99% de sensibilidad y 94% de especificidad al ajustar de valor límite a 0.35 unidades de DO.

EJEMPLO 9

Aislamiento de un Sub-grupo de proteínas PAG tempranas adecuadas para el desarrollo de una prueba de embarazo en bovino

Recolección del tejido. El tejido fetal de cotiledón se recolectó a partir de bovinos embarazados en etapas tempranas de 50 a 60 días después de la inseminación. Cincuenta a sesenta días de embarazo es un periodo de embarazo preferido debido a que el sub-grupo de proteínas PAG tempranas representa un alto porcentaje de las proteínas PAG totales en o alrededor de esta etapa de

gestación. Pero aunque el porcentaje de la proteína PAG temprana deseable, es alto en o aproximadamente a los 50 a 60 días después de la inseminación, la proteína total y la cantidad de tejido disponible es pequeña. En o aproximadamente a los 61 a 250 días después de la inseminación, la proteína PAG total y la cantidad de cotiledón fetal y de tejido de carúncula es mucho mayor.

Métodos que se puedan realizar para identificar las proteínas de unión a 2D9 y para mapear los sitios de unión de PAG a 2D9. Existen cuatro métodos que pueden adoptarse con el fin de identificar las proteínas de unión a 2D9, para caracterizar y secuenciar el anticuerpo 2D9, y para mapear los sitios de unión de PAG a 2D9. El siguiente estudio se llevó a cabo:

1. Inmunoprecipitación de las PAGs (obtenidas a partir de placenta al día 55) con lechos magnéticos recubiertos con 2D9. 2D9 purificada se acopló a lechos magnéticos Dynal activados por Tosilo de conformidad con las instrucciones del fabricante (Dynal). Los lechos recubiertos con el anticuerpo se incubaron con 100 microgramos de preparación enriquecida con PAG durante 30

minutos en PBS 1x y se lavan exhaustivamente con el mismo regulador de pH. Las proteínas unidas se eluyeron utilizando ácido acético pH 3.0 y se sometieron a análisis en gel y Western blot. El análisis de Western blot se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de proteínas inmuno-reactivas fueron cortadas de SDS-PAGE y se sometieron a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina.

El siguiente método es un método de inmunoprecipitación alternativa que se pueda llevar a cabo:

2. Inmunoprecipitación de PAGs (obtenidas a partir de placenta al día 61 hasta 250) con lechos magnéticos recubiertos con 2D9. 2D9 purificada se puede acoplar a lechos magnéticos Dynal activados por Tosilo de conformidad con las instrucciones del fabricante (Dynal). Los lechos magnéticos recubiertos con el anticuerpo se pueden incubar con 100 microgramos de preparación de PAG por 30 minutos en PBS 1x y se lavaron exhaustivamente con el mismo regulador de pH. Las proteínas unidas se pueden eluir utilizando ácido acético pH 3.0 y sometiendo a análisis en gel y Western blot. El Western blot se puede desarrollar con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de proteína

inmunoreactiva se pueden cortar entonces a partir del SDS-PAGE y se someten a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina. Una preparación altamente purificada del sub-grupo de proteínas PAG tempranas (específicamente PAGs 4, 6, 9, 20 y 21) se puede purificar utilizando este procedimiento.

Se llevó a cabo el siguiente estudio:

3. Cromatografía por inmunoafinidad de extractos de tejido preparados a partir de carúncula (endometrio) y tejidos cotiledonales (placenta) a partir del día 55 del embarazo de bovino. Brevemente, 2D9 purificada (10 mg) se acopló a 1 gramo de sefarosa activada por CNBr de conformidad con las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina de afinidad 2D9 (aproximadamente 5.0 ml) se incubó con 25 ml de extracto de tejido a pH 7.0, durante la noche para unión. Al día siguiente, la resina se empacó en una columna y se lavó con 1xPBS para eliminar los materiales no unidos y se eluyeron con pH ácido acético 3.0. El pH del material eluido se neutralizó con Tris 1M inmediatamente después de la elución a pH 7.0. El material eluido se sometió a análisis en gel y Western blot. El Western blot se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de proteínas 1 a 7 fueron cortadas

del SDS-PAGE y se sometieron a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina. Las identidades de las secuencias peptídicas se determinó mediante análisis de BLAST.

El siguiente es un procedimiento cromatográfico alternativo que se puede realizar:

4. Cromatografía de inmunoafinidad de extractos de tejido preparados a partir de carúncula (endometrio) y tejidos cotiledonales (placenta) del día 61 a 250 del embarazo en bovino. Brevemente, 2D9 purificada (10 mg) se puede acoplar a 1 gramo de sefarosa activada por CNBr de conformidad con las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis). La resina por afinidad para 2D9 (aproximadamente 5.0 ml) se puede incubar con 25 ml de extracto de tejido a pH 7.0, durante la noche para unión. Al siguiente día, la resina se puede empacar en una columna y se lava con PBS 1x para eliminar los materiales no unidos y se eluye con ácido acético pH 3.0. El pH del material eluido se puede neutralizar con Tris 1M inmediatamente después de la elución a pH 7.0. El material eluido se puede someter a análisis en gel y Western blot. El Western blot se puede desarrollar con anticuerpos policlonales anti-PAG de conejo. Las bandas de

proteínas 1 a 7 se pueden cortar a partir del SDS-PAGE y se someten a análisis de LC-MS-MS después de la digestión con tripsina. Las identidades de las secuencias peptídicas se pueden determinar a continuación mediante análisis BLAST. Una preparación altamente purificada del sub-grupo de proteínas PAG tempranas (específicamente PAGs 4, 6, 9, 20 y 21) se puede purificar mediante este procedimiento.

EJEMPLO 10

Identificación de PAGs adicionales de unión a 2D9

Se encontró que el mAb 2D9 reconoce cinco isoformas PAG (4, 6, 9, 20 y 21) como se resume en el Ejemplo 1. Estas isoformas se identificaron por secuenciación del péptido por LC/MS/MS de las muestras de PAGs purificadas obtenidas a partir de tejidos placentales cosechados al día 55 días después de la reproducción. 2D9 Mab se utilizó adicionalmente para la purificación e identificación de PAGs mediante acoplamiento del anticuerpo a una resina activada por CNBr para crear una columna de inmunoafinidad. Las PAGs presentes en una muestra purificada se pueden unir (reconocer) por 2D9. De

manera similar, las PAGs presentes en las muestras de sangre total o plasma de bovino en las PAGs detectadas por ELISA se pueden unir mediante 2D9 e inducir una respuesta positiva de ELISA, lo que indica embarazo. La elución de las PAGs purificadas durante el procedimiento de inmunopurificación se modificó mediante el ajuste del pH 3.0 a 2.5 con neutralización inmediata a pH 7.0 durante la recolección del eluyente. La visualización de las PAGs purificadas mediante SDS-PAGE con muestras purificadas se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente (por ejemplo, Ejemplo 1). Se observaron patrones de bandeo similares, con tres bandas principales entre 50 y 75 kDa.

Además de los tejidos de placenta cosechados de vacas al día 55 después de la reproducción, las PAGs también se purificaron de tejidos de la placenta cosechados de vacas al día 215 después de la reproducción. Algunos miembros de la familia de las proteínas PAGs (isoformas) se expresan en la gestación antes que otros. El conjunto de PAGs expresadas anteriormente en la gestación se refiere comúnmente como PAGs tempranas y el conjunto de PAGs expresadas más adelante en el embarazo se conocen comúnmente como PAGs tardías. Los tejidos placentales al día 55 después de la reproducción son representativos de una etapa de embarazo que incluye la expresión de las PAGs tempranas, mientras que los tejidos placentarios al día 215 después de la

708

reproducción son representativos de una etapa de embarazo que incluye la expresión de pags tardías. La visualización de pags purificado por sds-page a partir de tejidos placentales al día 55 y 215 muestra las mismas tres bandas entre 50 y 75 kda para ambos días, sin embargo la proporción (intensidad) de la banda de mayor peso molecular es mayor al día 215 a partir de tejidos placentales.

Los péptidos a partir de muestras de PAGs, tanto al día 55 como al día 215 en tejidos placentales se purificaron con una columna de inmunoafinidad 2D9 y se analizaron por secuenciación peptídica con LC/MS/MS para identificar la isoforma PAG(s) presente en las muestras. Las secuencias peptídicas se compararon con las secuencias de isoformas PAG obtenidas a partir de la base de datos Uniprot (www.uniprot.org) que se lista en el Cuadro 4. El Cuadro 5 muestra un resumen de los resultados de secuencia peptídica y su identificación como PAGs que corresponde a las secuencias boPAG-16, boPAG-17, y 19-boPAG mediante análisis BLAST. Las "líneas" y "bandas" (inferior, medio) referidas en el Cuadro 5 se muestran en la Figura 11. Un resumen de las isoformas PAG caracterizadas en las muestras PAG purificadas se muestra en el Cuadro 6.

CUADRO 4
Isoformas de PAG con los números de acceso de UniProt (SEQ ID Nos: 51-62)

Isoforma PAG	Número de Acceso
1	Q29432
4	O46492
6	O46494, A5PJW4
9	O46497, A4FV16
16	Q9TTV8
17	Q9TTV7, A7MBA4
19	Q9TTV5
20	Q9TTV4
21	Q9TTV3

CUADRO 5

Resumen de los resultados de secuencia (incluyendo SEQ ID NO: 63-74).

“MH+” = masa del péptido con respecto a la carga más agua, “Carga” =

estado de carga del ión, “P(pep)”= probabilidad de secuencia peptídica,

“Inicio”= aminoácido de inicio de la proteína que se alinea con el péptido,

“Fin”= aminoácido de paro de la proteína que se alinea con el péptido

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas Línea 2 (inferior), Línea 3 (media), Línea 6 (media), Línea 7 (media e inferior)					
Bos Taurus (gi75074836) Glucoproteína 16 asociada al embarazo					
MH+	Carga	Inicio	Fin	P(pep)	Secuencia peptídica
1389.65796	2	215	229	2.54E-05	REGSVVMFGGVDHPIY (SEQ ID NO:63)
1046.53052	2	361	370	6.28E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:64)
1770.90613	2	197	212	7.51E-06	NQGAISDPIFAFYLSK (SEQ ID NO:65)

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas Línea 2 (inferior), Línea 3 (inferior), Línea 4 (inferior), Línea 5 (inferior), Línea 6 (inferior), Línea 7 (inferior)					
Bos Taurus (gi75074836) Glucoproteína 17 asociada al embarazo					
MH+	Carga	Inicio	Fin	P(pep)	Secuencia peptídica
1389.65796	2	215	229	2.54E-05	REGSVVMFGGVDHPIY (SEQ ID NO:66)
1026.53337	2	138	142	1.69E-05	KGLLVTDVPI (SEQ ID NO:67)
1046.53052	2	361	370	6.28E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:68)
1771.59014	2	196	213	7.53E-07	KNEGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:69)

Banda de Proteína No.: Presente en las Bandas Línea 3 (media), Línea 4 (media), Línea 5 (media), Línea 6 (media)					
Bos Taurus (gi75051662) Glucoproteína 19 asociada al embarazo					
MH+	Carga	Inicio	Fin	P(pep)	Secuencia peptídica
1760.83350	3	212	229	1.00E-06	KDFQEGSVVMFGGVDHPIY (SEQ ID NO:70)
1088.53711	2	126	137	4.36E-06	KTFBITYGSGPI (SEQ ID NO:71)
2243.06616	3	213	231	1.32E-03	DFQEGSVVMFGGVDHPIYF (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	KIQGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:74)

CUADRO 6

Isoformas PAG caracterizadas en tejidos placentales al día 55 y 215

Día 55 Tipo de Tejido	Isoformas PAG	Día 215 Tipo de Tejido	Isoformas 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

Las secuencias polipeptídicas mostradas en el cuadro 4 se alinearon con PROTDIST v. 3.5c, por ejemplo, del paquete PHYLIP (felsenstein, 1989). El paquete de análisis de Arbol Filogenético Vecino de PROTDIST fue utilizado en las secuencias alineadas para generar el árbol que se muestra en la Figura 9. Las alineaciones de PAGs se muestran en la Figura 10. Este análisis de isoformas de PAG 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21 se realizó para visualizar la relación de las isoformas basándose en sus regiones de similitud y diferencia. Según el análisis, PAG 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20 y 21 se agrupan juntas, aparte de PAG1.

Todas las composiciones y los métodos descritos y reclamados en la presente invención se pueden realizar y ejecutar sin llevar a cabo experimentación a la luz de la presente descripción. Mientras que las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que las variaciones se pueden aplicar a las composiciones y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en la presente invención sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están química y fisiológicamente relacionadas podrán ser sustituidos por los agentes descritos en la presente invención, mientras que los resultados iguales o similares que pueden alcanzar. Todos los sustitutos y modificaciones evidentes a aquellos expertos en la técnica se considerarán dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones anexas.

Referencias

Las siguientes referencias, hasta el grado en que provean procedimientos ejemplares u otros detalles suplementarios a aquellos establecidos en la presente invención, se incorporan específicamente en la presente invención como referencias:

113

Patente de E.U.A. 3,646,346

Patente de E.U.A. 3,817,837

Patente de E.U.A. 3,850,752

Patente de E.U.A. 3,939,350

Patente de E.U.A. 3,996,345

Patente de E.U.A. 4,275,149

Patente de E.U.A. 4,277,437

Patente de E.U.A. 4,366,241

Patente de E.U.A. 4,367,110

Patente de E.U.A. 4,376,110

Patente de E.U.A. 4,452,901

Patente de E.U.A. 4,668,621

Patente de E.U.A. 4,699,880

Patente de E.U.A. 5,721,105

Patente de E.U.A. 6,869,770

Patente de E.U.A. No. de Publicación 2003/508381

Patente de E.U.A. No. de Publicación 20050100975

Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.

Allred *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(149), 1990.

- Atkinson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268(35):26679-26685, 1993.
- Ausubel *et al.*, *En: Current Protocols In Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994; 1992.
- Beal *et al.*, *J. Anim. Sci.*, 70:924-929, 1992.
- Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith (ed.), Academic Press, NY, 1993.
- Boulianne *et al.*, *Nature*, 312:643-646, 1984.
- Brown *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 192(#191), 1990.
- Butler *et al.*, *Biol. Reprod.*, 26:925-933, 1982.
- Cabilly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3273-3277, 1984.
- Cameron y malmo, *Austr. Vet. J.*, 70:109-111, 1993.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Chardes *et al.*, *FEBS Lett.*, 452(3):386-394, 1999.
- Colligan *et al.*, *En: Current Protocols in Immunology*, Greene Publ. Assoc. Wiley Interscien, NY, 1993.
- Computational Molecular Biology, Lesk (Ed.), Oxford University Press, NY, 1988.
- Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin And Griffin (Eds.), Humana Press, NY, 1994.

- Cumber *et al.*, *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.
- Felsenstein, *Cladistics* 5:164-166, 1989.
- Green *et al.*, *Theriogenology*, 63(5):1481-1503, 2005.
- Green *et al.*, *Biol Reprod* 62:1624-1631, 2000.
- Green *et al.*, *Biol Reprod* 60:1069-1077, 1999.
- Gripenberg *et al.*, *Scand J Immunol.*, 7(2):151-7, 1978.
- Guruprasad *et al.* *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, pp 139-281, 1988.
- Hatzidakis *et al.*, *J. Reprod. Fertil.*, 98:235-240, 1993.
- Higgins y Sharp *Cabios.* 5:151-153 (1989)
- Holdsworth *et al.*, *J. Endocrin.*, 95:7-12, 1982.
- Hughes *et al.*, *Mol Biol Evol.* 20:1940-1945, 2003.
- Humblot *et al.*, *Theriogenol.*, 30:257-268, 1988.
- Kiracofe *et al.*, *J. Anim. Sci.*, 71:2199-2205, 1993.

- Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Leibiger *et al.*, *Biochem J.*, 338:529-538, 1999.
- Liu *et al.* *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.
- Makler *et al.*, *Transfusion*, 21(3):303-312, 1981.
- Markusfeld *et al.*, *Br. Vet. J.*, 146: 504-508, 1990.
- Mialon *et al.*, *Reprod. Nutr. Dev.*, 33:269-282, 1993.
- Mialon *et al.*, *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:65-72, 1994.
- Mo *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23:2503-2510, 1993.
- Nakamura *et al.*, *En: Handbook of Experimental Immunology* (4^a ed.), Weir *et al.* (eds.), 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Neuberger *et al.*, *Nature*, 314:268-270, 1985.
- Oltenacu *et al.*, *J. Dairy Sci.*, 73:2826-2831, 1990.
- Pack *et al.*, *Biochem.*, 31:1579-1584, 1992.
- Solicitud PCT WO 98/16832
- Sarngadharan *et al.*, *Princess Takamatsu Symp.*, 15:301-8, 1984.
- Sasser *et al.*, *Biol. Reprod.*, 35:936-942, 1986.
- Sequence Analysis in Molecular Biology, Von Heinje (ed.), Academic Press, 1987.

Sequence Analysis Primer, Gribskov y Devereux (eds.), Stockton Press, NY, 1991.

Szafranska *et al.*, *Biol. Reprod.*, 53:21-28, 1995.

Wagner *et al.*, *Science*, 260(5113):1510-1513, 1993

Warnick *et al.*, *Theriogenol.*, 44:811-825, 1995.

Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 51:1145-1153, 1994.

Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 54: 122-129, 1996.

Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 57:1384-1393, 1997.

Xie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10247-10251, 1991.

Xie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12809-12816, 1997.

Zoli *et al.*, *Biol. Reprod.*, 45:1-10, 1991.

Zoli *et al.*, *Biol. Reprod.*, 46:83-92, 1992.

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une inmunológicamente a al menos dos PAG seleccionadas del grupo que consiste de PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21.

2.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une de manera inmunológica a PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21.

3.- Un anticuerpo producido por un hibridoma depositado como el número de acceso ATCC PTA-8566, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

4.- Una célula aislada depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-8566, o una progenie de la célula que produce anticuerpos 2D9.

5.- Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo con dominio de cadena pesada o ligera, en donde el dominio de la cadena pesada o ligera se selecciona del grupo que consiste de:

- a) una secuencia polipeptídica con al menos 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1;

- b) una secuencia polipeptídica con al menos 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2;
- c) una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 1, y
- d) una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 2.

6.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el dominio comprende una secuencia polipeptídica con más de 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

7.- El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el dominio comprende una SEQ ID NO: 1.

8.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el dominio comprende una secuencia polipeptídica con más de 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

9.- El polinucleótido de la reivindicación 8, donde el dominio comprende una SEQ ID NO: 2.

10.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el polinucleótido se define como la codificación la secuencia polipeptídica SEQ ID NO: 3.

11.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el polinucleótido se define como la codificación la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 4.

12.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5.

13.- El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 6.

14.- Un polipéptido aislado que comprende un anticuerpo con dominio de cadena pesada o ligera, en donde el dominio de cadena pesada o ligera se selecciona del grupo que consiste de:

- a) una secuencia polipeptídica con al menos el 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1;
- b) una secuencia polipeptídica con al menos 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2;
- c) una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 1, y
- d) una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 2.

15.- El polipéptido de la reivindicación 14, se define de la manera que comprende una secuencia con al menos 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y una secuencia polipeptídica con al menos 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

16.- El polipéptido de la reivindicación 15, donde el polipéptido se une inmunológicamente a al menos una primera PAG seleccionada del grupo que consiste de PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21.

17.- Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende el polipéptido de la reivindicación 14.

18.- Un método para detectar el embarazo en un animal bovino que comprende:

- a) obtener una muestra de un animal bovino;
- b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento del mismo, de conformidad con la reivindicación 1, y
- c) determinar si la muestra contiene al menos un primer antígeno asociado al embarazo (PAG) que es capaz de estar inmunológicamente unido por el anticuerpo o fragmento del mismo, en donde la presencia de la PAG en la muestra es indicativa de embarazo.

19.- El método de la reivindicación 18, donde el anticuerpo o fragmento del mismo es el anticuerpo monoclonal 2D9.

20.- El método de la reivindicación 18, donde la PAG se selecciona del grupo que consiste de PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21.

21.- El método de la reivindicación 18, donde la PAG es PAG6.

22.- El método de la reivindicación 18, donde se determina si la muestra contiene al menos un primer antígeno asociado al embarazo que comprende ELISA o Western blot.

23.- El método de la reivindicación 22, donde el ELISA es el ELISA intercalado que comprende la unión de una PAG al anticuerpo o fragmento del mismo fijado a un sustrato y una preparación de anticuerpo secundario marcado con una enzima.

24.- El método de la reivindicación 23, donde dicha enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.

25.- Un kit que comprende:

- a) un anticuerpo o fragmento del mismo, de la reivindicación 1, y
- b) un contenedor para el anticuerpo o fragmento del mismo.

26.- El kit de conformidad con la reivindicación 25, definido porque además contiene medios para la detección de unión inmunológica entre el

anticuerpo o fragmento del mismo y al menos un primer antígeno asociado al embarazo (PAG).

27.- El kit de la reivindicación 25, donde el anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un soporte.

28.- El kit de la reivindicación 27, donde dicho soporte es una placa de poliestireno, tubo de ensayo o varilla reactiva.

29.- El kit de la reivindicación 25, definido porque además comprende una marca detectable.

30.- El kit de la reivindicación 25, donde la marca detectable es una marca fluorescente o quimioluminiscente.

31.- El kit de la reivindicación 25, donde la marca detectable es una enzima.

32.- El kit de la reivindicación 31, donde la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.

33.- Un método de purificación de al menos un primer antígeno asociado al embarazo (PAG), que comprende:

- a) obtener una muestra que comprende al menos un primer antígeno asociado al embarazo (PAG), y

b) purificar la PAG relativa a la muestra basada en la afinidad de la PAG al anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1.

34.- El método de conformidad con la reivindicación 33, donde la muestra se obtiene a partir de placenta de bovino al día 50 a 250.

35.- El método de conformidad con la reivindicación 34, donde la muestra se obtiene a partir de placenta de bovino al día 61 a 250.

36.- El método de conformidad con la reivindicación 33, donde purificar comprende inmunoprecipitación, western blot, o cromatografía por inmunoafinidad.

125

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen anticuerpos y métodos para detectar el embarazo en un animal; en ciertos aspectos, los anticuerpos utilizados se unen inmunológicamente al menos a dos PAGs seleccionadas de PAG PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 y PAG21; también se proveen los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, así como los kits, métodos de uso y composiciones adicionales relacionadas con el anticuerpo.

12B

P10/743F

1/21

>2D9 Cadena Liviana

CGGTTCCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCGTGTCAGTCTT
 GGAGATCAAGCCTCCATTTCTTGACAGATCTAGGCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAG
 AATGGTTCCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG
 GGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
 GAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCAGGTTCCGGTCCCTGGGACCAAGC
 TGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
 TGGAGGTGCCCTCAGTCTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATT
 GATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA
 GCATGAGCAGCACCCCTCAGGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCAC
 TCACAAGACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGA

FIG.1

2/21

>2D9 Cadena Pesada

GCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACATATTCAGTAACACTGGATGGAGTGGGTAAAGCAGAGGCC
TGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTACCTGGAAGTGATATTAGTAACTACAATGAGAAGTTC
AAGGACAAGGCCACATTCACTGCAGATTCACTCCCAACACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACAT
CTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGCTGGGAGTGGTTACTACGGGGTATATTACTATGCTAT
GGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAAGACACCCCATCTGTCTATCCA
CTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCGCTGGGATGCCCTGGTCAAGGGTATTTCC
CTGAGCCAGTGACAGTGAAGCTGGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCT
GCAGTCTGAAGCTTACAGTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC
ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTT
GTAAGCCTTGCCATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCTATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGT
GCTCACCATTACTCTGAGTCTTAAGGTCAAGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTC
CAGTTCAAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCA
ACAGCACTTTCCGCTCAGTCAAGTGAAGTTCCTCATGCACCAAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAA
ATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATGGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCT
GCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAA
CTACAAGAAGACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAG
AAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCAACATA
CTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGATCCCAAAGTCTTGGAGCCCTCTGGTCTACAGGA
CTACTGCAGGTGTCCACTCCCTCAAACA

FIG.2

Identificación de antígeno asociado PAG 2D9 — Análisis LC-MS-MS

Bos Taurus (NM176617)		Glucoproteína 6 asociada al embarazo				Secuencia Peptídica	
Mz	Carga	M(cód.)	Inicia	Termina	Resultado		
553.4534	2	1636.865	147	162	94.87%	IGNVSTIQPFQLCLK (SEQ ID NO:7)	
615.2264	2	1210.602	183	193	95.45%	TFSAAPPEIK (SEQ ID NO:8)	
686.4464	2	1752.872	196	211	96.95%	NEGAEPTAFILSK (SEQ ID NO:9)	
592.9523	3	1757.815	212	227	89.57%	DNQEGSVAMFDVMDHR (SEQ ID NO:10)	
767.3938	3	2281.195	266	297	90.78%	ALVDGLDVGPTLVNINIK (SEQ ID NO:11)	
467.2134	2	914.4286	362	368	99%	YFSVFIK (SEQ ID NO:12)	
antígeno asociado PAG 2D9							
Mz	Carga	M(cód.)	Inicia	Termina	Resultado	Secuencia Peptídica	
551.9511	2	1743.886	147	162	99.00%	IGNVSTIQPFQLCLK (SEQ ID NO:13)	
615.211	2	1210.602	183	193	99.00%	TFSAAPPEIK (SEQ ID NO:14)	
686.4475	2	1752.872	196	211	99.00%	NEGAEPTAFILSK (SEQ ID NO:15)	
592.966	3	1757.815	212	227	95.64%	DNQEGSVAMFDVMDHR (SEQ ID NO:16)	
767.404	3	2281.195	266	297	97.54%	ALVDGLDVGPTLVNINIK (SEQ ID NO:17)	
467.235	2	914.4286	362	368	84.44%	YFSVFIK (SEQ ID NO:18)	

FIG.3A

4/21

Imunoafinidad Purificación de PAG con anticuerpo monoclonal 2D9

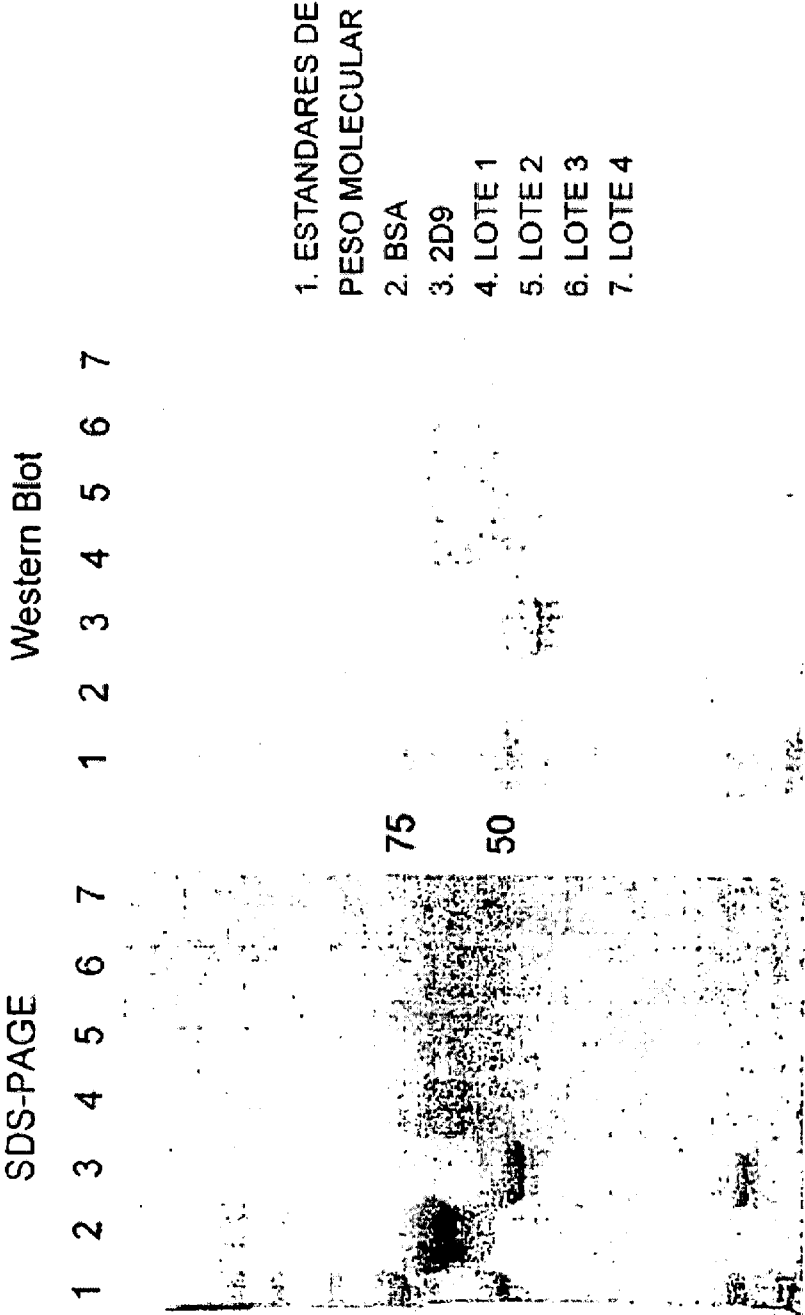
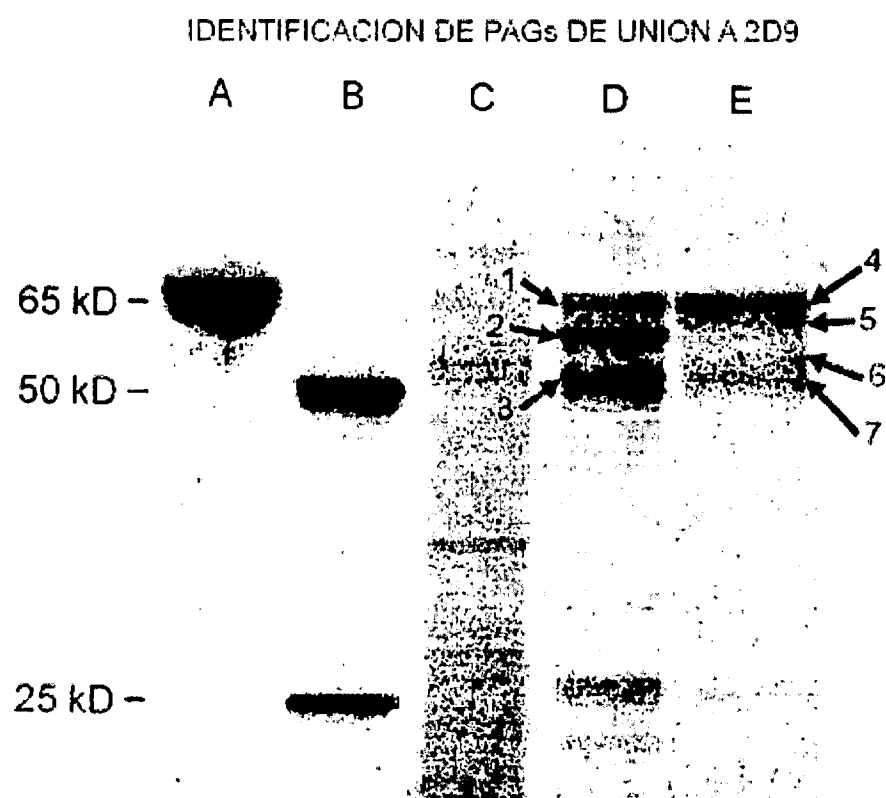


FIG.3B

5/21



A. ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO
B. CADENAS PESADA Y LIGERA DE 2D9
C. FRACCION ENRIQUECIDA CON PAG
D. PAG PURIFICADA POR AFINIDAD A 2D9 A PARTIR DE CARUCULA
E. PAG PURIFICADA POR AFINIDAD A 2D9 A PARTIR DE COTILEDON

LAS BANDAS 1 A 7 SE CORTARON Y SE SOMETIERON A DIGESTION
CON TRIPSINA Y LC-MS-MS

FIG.4

131

6/21

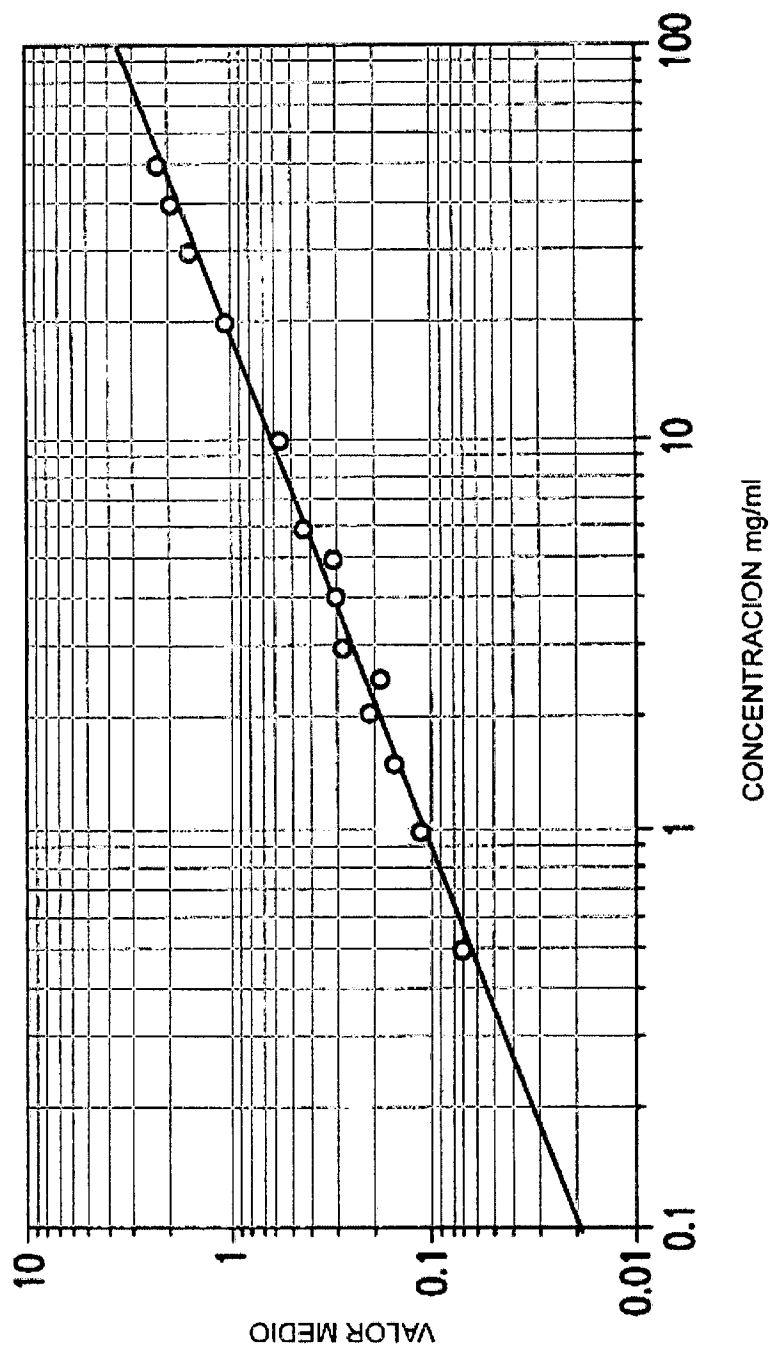


FIG.5

132

7/21

Resultado del Estudio β
Datos de PAG y US Día 28

Sitio Wisconsin				Sitio California					
		PAGs		Percentage				Percentage	
US		Emb.	Abiertas	Coincide	US	Emb.	Abiertas	Coincide	
Emb.	358	11	369	97.0	Emb.	391	18	409	95.6
Abiertas	44	464	508	91.3	Abiertas	41	419	460	91.1
	402	475	877			432	437	869	

FIG.6

Resultados del estudio-β
Wisonsin-reproducción sincronizada

Características	Resincronización temprana	Resincronización tardía	importancia
Numero disponible después del 1er TAI	228	226	
% de embarazo en la primera inseminación	46.3	47.9	NS
Días entre las inseminaciones	55.1	42.0	P<0.05
Numero de inseminaciones (NI)	2.60	2.65	NS
NI/concepción	2.29	2.37	NS
Días para el embarazo (excluya el 1er TAI)	45.2	58.3	P<0.05
% de embarazos (excluya el 1er TAI)	46.1	51.4	NS

* Datos para 30 vacas a ser resueltas

FIG.7

1733

Resultados del estudio-β

California-TAI + reproducción en celo

Características	Resincronización temprana	Resincronización tardía	Importancia
Número disponible después del 1er TAI	321	335	
% de embarazo en la primera inseminación	27.7	28.7	NS
Días entre las inseminaciones	28.9	32.3	P<0.05
Número de inseminaciones (NI) NI/concepción	2.86	3.05	P<0.05
Días para el embarazo (excluya el 1er TAI)	2.49	2.77	P<0.05
% de embarazos (excluya el 1er TAI)	37.9	46.0	P<0.05
	36.6	36.2	NS

* Datos para 42 vacas a ser resueltas

FIG.8

10/21

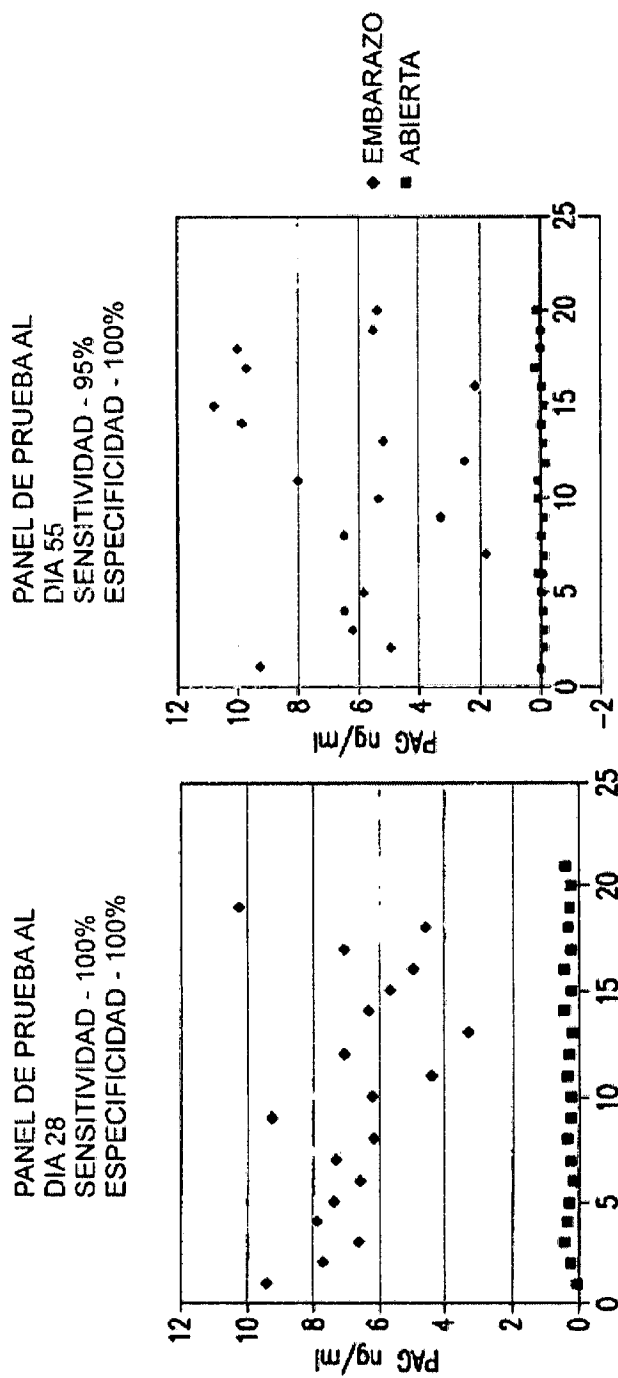
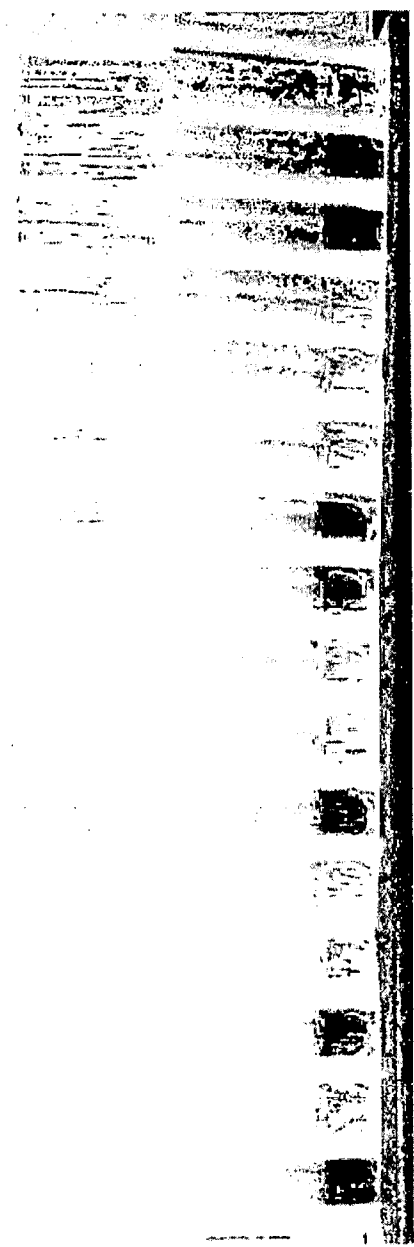


FIG.9

136

11/21

DIAGNOSTICO DE EMBARAZO EN BOVINO CON LA PRUEBA DE COLOR



AZUL - EMBARAZADO
CLARA - NO EMBARAZADO (ABIERTO)

FIG.10

PRUEBA DE COLOR
TUBO DE PLASTICO: PANEL DE PLASMA AL DIA 28

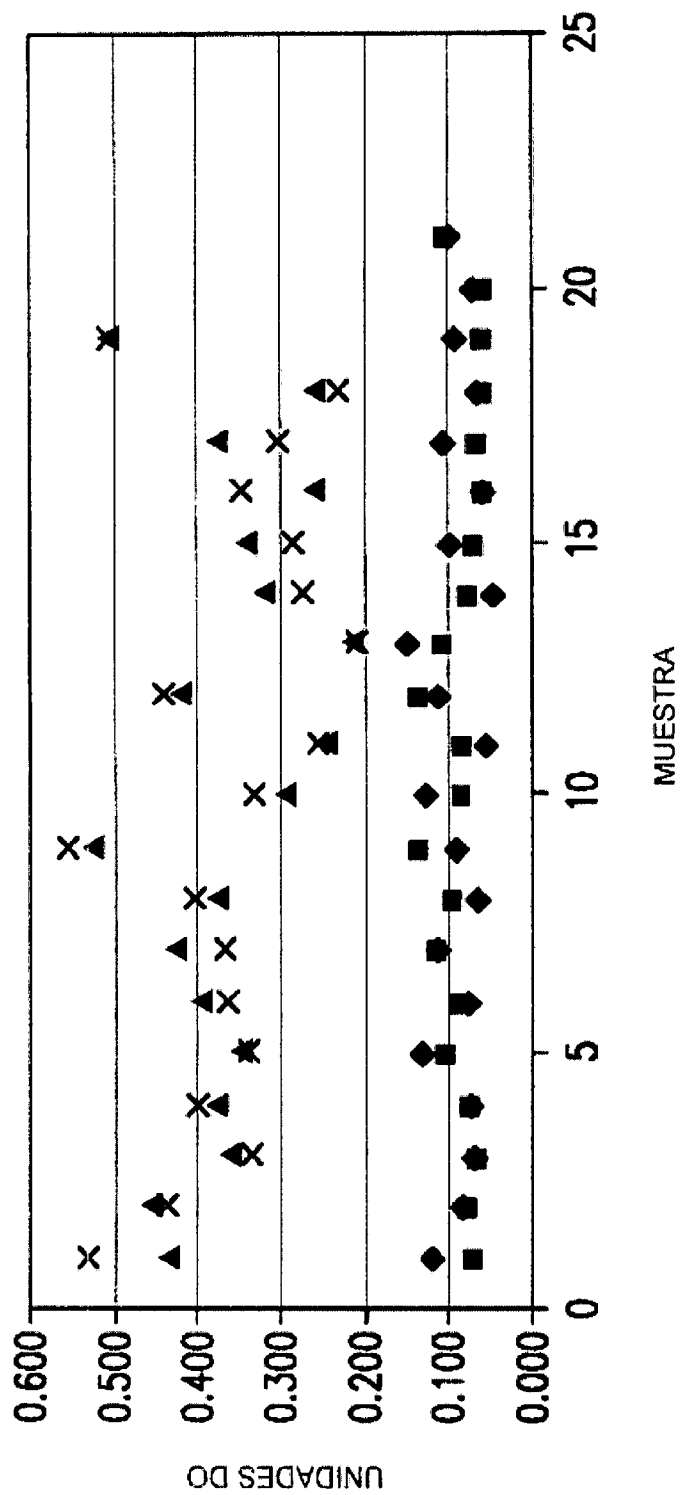


FIG.11A

134

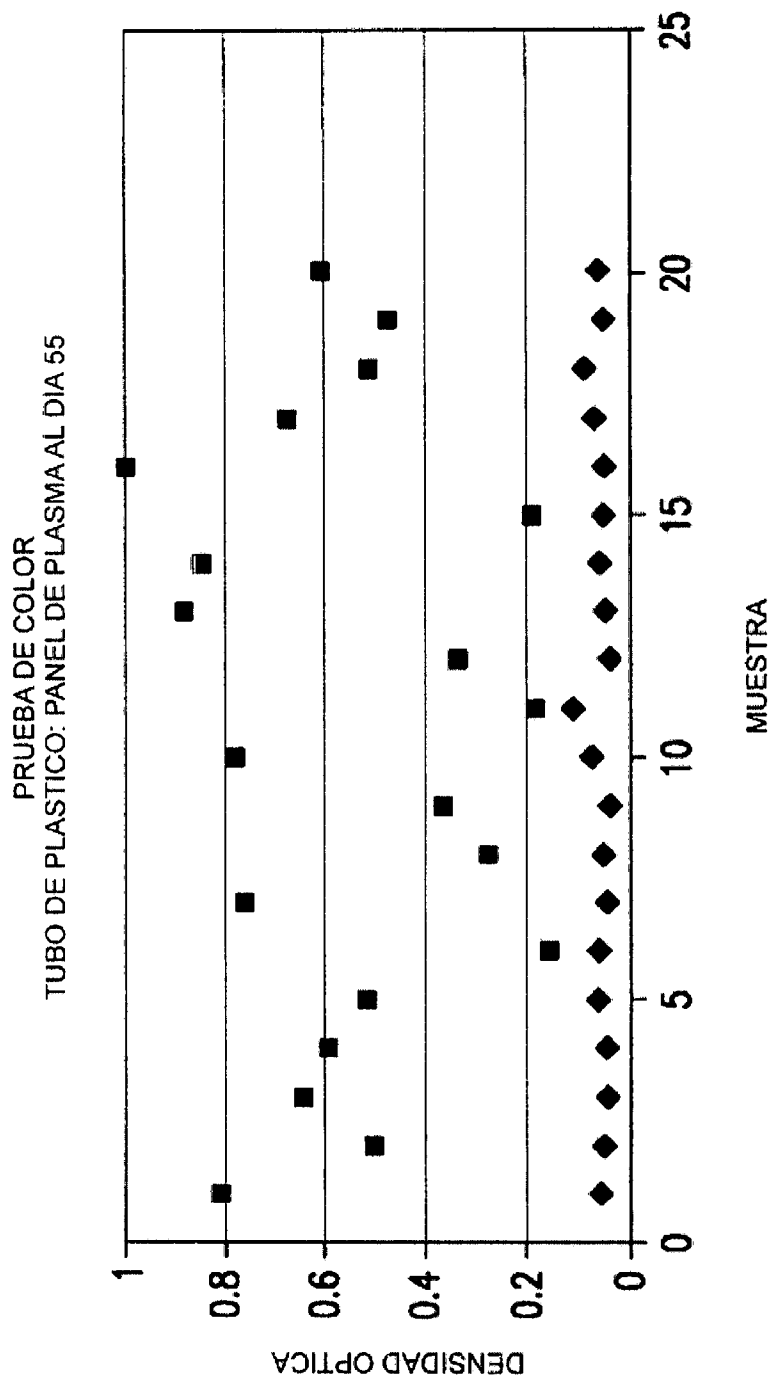


FIG.11B

138

14/21

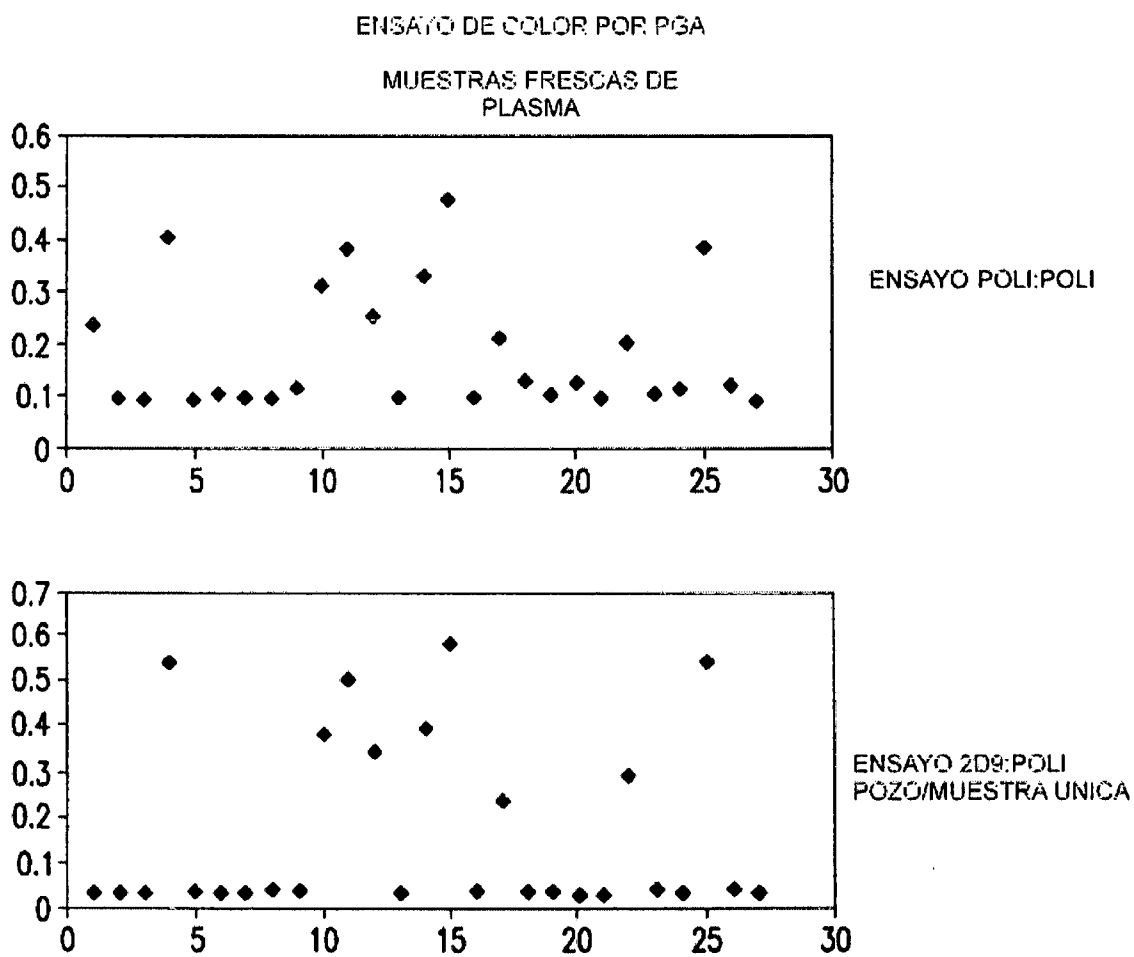
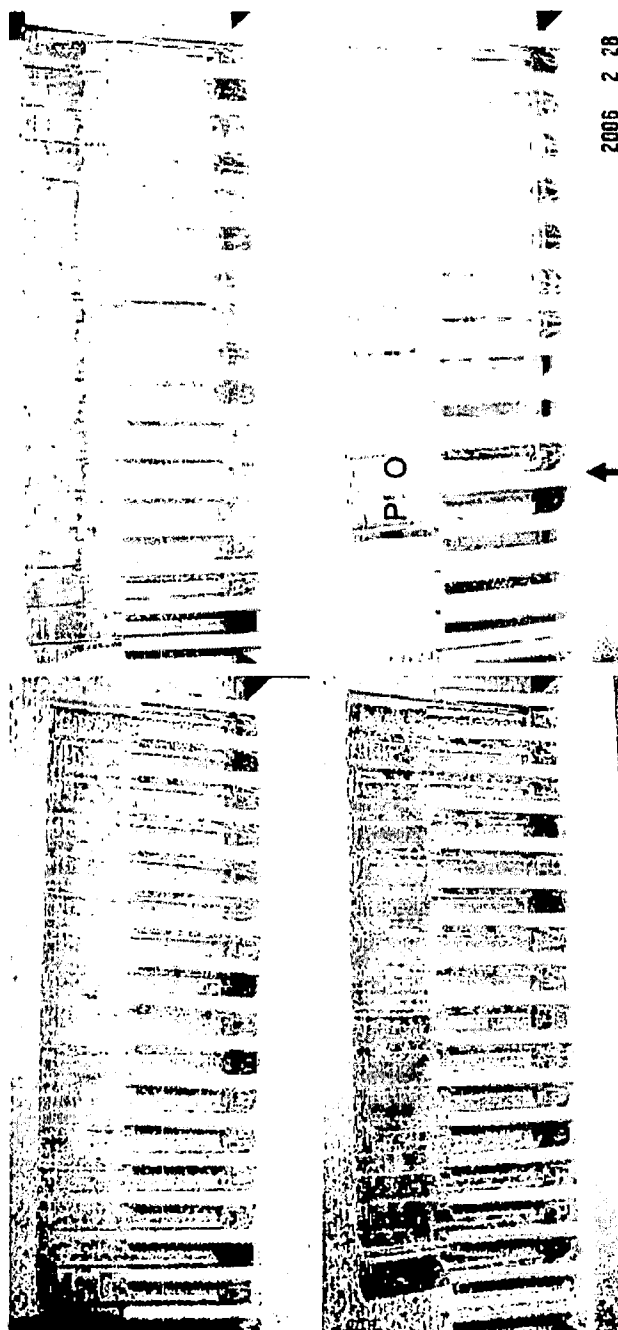


FIG.12

140

15/21

PRUEBA DE COLOR: EVALUACION DE CAMPO



2005 2 28

CONTROLES DE PLASMA
P-EMBARAZADOS
O-ABIERTOS

FIG. 13

Color Test: Field testing
Total number of samples tested: 54
Days 33 to 34 after breeding

	Pregnant	Open	Recheck
PAGs	15	37	2
US	14	40	
Agreement	14	36	

Test was read by 3 people
1 false-positive in tube test

FIG.14

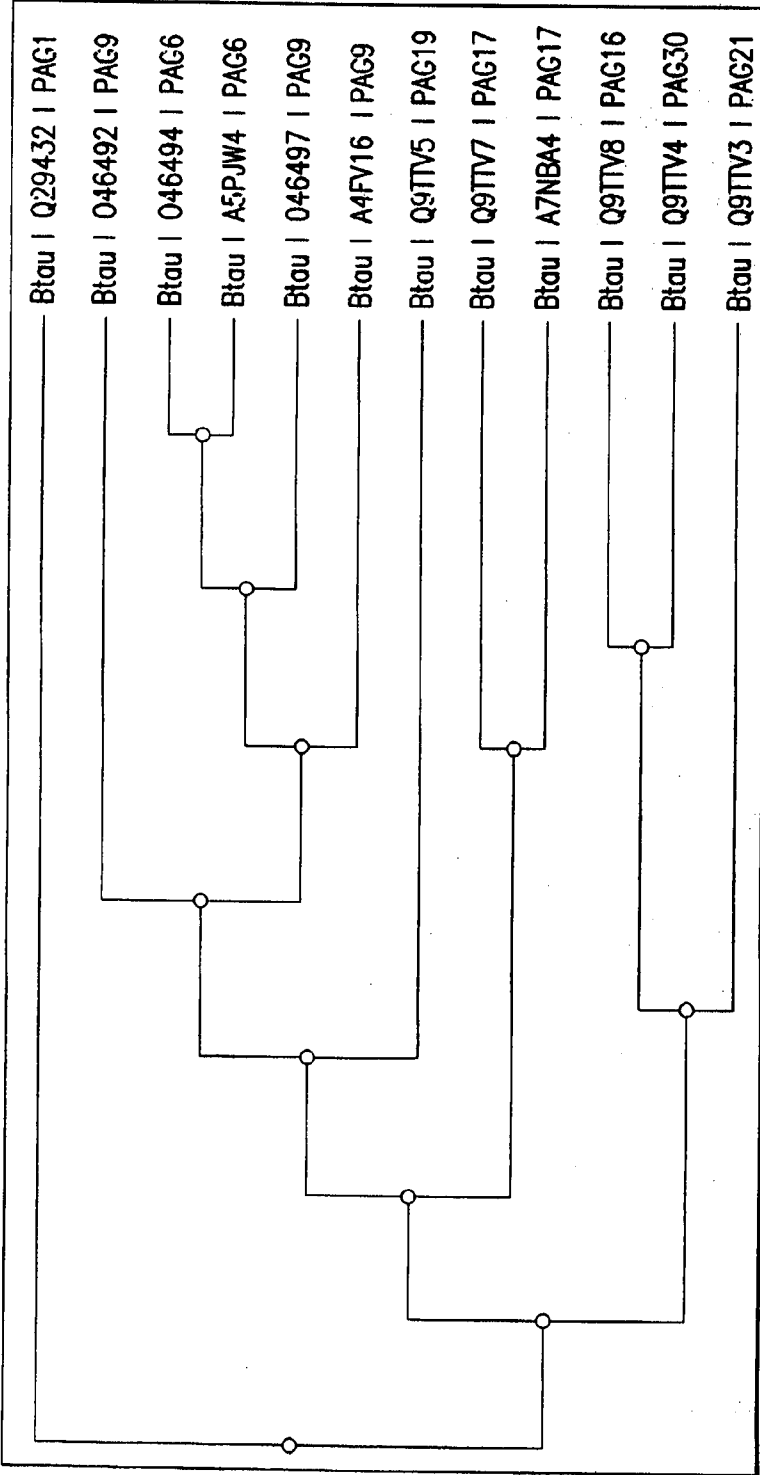


FIG.15

FIG. 16-1

Btau|029432|PAG1
Btau|046492|PAG4
Btau|046494|PAG6
Btau|A5PJW4|PAG6
Btau|A4PV16|PAG9
Btau|046497|PAG9
Btau|09TTV8|PAG16
Btau|09TTV7|PAG17
Btau|A7MBA4|PAG17
Btau|Q9TTV5|PAG19

FIG. 16-2

145

21/21

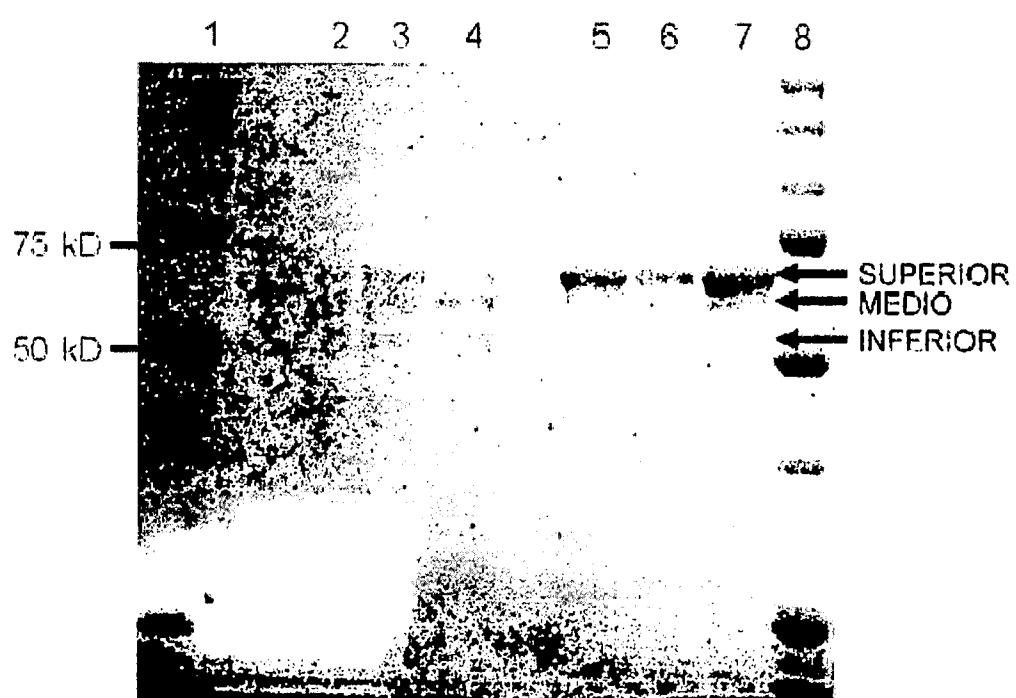


FIG.17

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: MONSANTO TECHNOLOGY LLC
MATHIALAGAN, NAGAPPAN
ROBERTS, R. MICHAEL
McGRATH, MICHAEL F.
GREEN, JONATHAN

<120> Título de la invención: COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DEL EMBARAZO

<130> Número de referencia: MONS:108WO (37-21(54290))

<140> Número de solicitud actual: DESCONOCIDO

<141> Fecha de presentación actual: 2008-12-12

<150> Número de solicitud previa: 61/013,603

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2007-12-13

<160> Números de secuencias: 74

<170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 112

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia peptídica de cadena ligera del fragmento de anticuerpo artificial

<400> Secuencia: 1

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> SEQ ID NO: 2
<211> Longitud: 124
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia peptídica de cadena pesada del
fragmento de anticuerpo artificial

<400> Secuencia: 2

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> SEQ ID NO: 3
<211> Longitud: 193
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia peptídica de cadena ligera del
fragmento de anticuerpo artificial

<400> Secuencia: 3

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

148

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

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> SEQ ID NO: 4
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia peptídica de cadena pesada del
fragmento de anticuerpo artificial

<400> Secuencia: 4

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 Ala Lys Thr Thr
115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
130 135 140

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val
195 200 205

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
210 215 220

Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
245 250 255

150

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
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> SEQ ID NO: 5
<211> Longitud: 695
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la
cadena ligera del fragmento de anticuerpo 2D9

<400> Secuencia: 5
cggttctctgc ttccagcagt gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca 60
gtcttggaga tcaagcctcc atttcttgca gatctaggca gagcattgta catagtaatg 120

gaaacaccta tttagaatgg ttctctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct 180
acaaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggg 240
cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggcctgagga tctgggaggt tattactgct 300
ttcaagggtc acatgttccg ctacagttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg 360
ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc cccatccag tgagcagtta acatctggag 420
gtgcctcagt cgtgtgtctt ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtggg 480
agattgatgg cagtgaacga caaaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca 540
aagacagcac ctacagcatg agcagcacc tcaagttgac caaggacgag tatgaacgac 600
ataacagcta tacctgtgag gccactcaca agacatctac ttcaccatt gtcaagagct 660
tcaacaggaa tgagtgttag agacaaaggt cctga 695

<210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 1429
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada del fragmento de anticuerpo 2D9

<400> Secuencia: 6
gctacagggtg tccactccca gggtcagctg cagcagctctg gagctgagct gatgaagcct 60
ggggcctcag tgaagatatt ctgcaaggct actggctaca tattcagtaa ctactggatg 120
gagtgggtaa agcagaggcc tggacatggc cttgagtggg ttggagagat tttaacctgga 180
agtgatatta ctaactacaa tgagaagttc aaggacaagg ccacattcac tgcagattca 240
tcttccaaca cggcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgccgtctat 300
tactgtgcaa gagctgggag tggttactac ggggtatatt actatgctat ggactactgg 360
ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca gccaaaacga ccccccatc tgtctatcca 420
ctggccctctg gatctgctgc ccaaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtcaag 480
ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc tggaaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg 540
cacaccttcc cagctgtcct gcagttctgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc 600
ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc 660
accaagggtg acaagaaaat tgtgcccagg gattgtgggt gtaagccttg catatgtaca 720
gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc ccccaaagc ccaaggatgt gtcaccatt 780
actctgactc ctaaggtcac gtgtgtttgtg gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc 840
cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag gtgcacacag ctgagacgca accccgggag 900
gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 960

152

ctcaatggca aggagttcaa atgcaggggc aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag 1020
 aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg aaggctccac aggtgtacac cattccacct 1080
 cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc 1140
 cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg 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 tctacagga ctactgcagg tgtccactcc cctcaaaca 1429

<210> SEQ ID NO: 7
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 7

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

<210> SEQ ID NO: 8
 <211> Longitud: 11
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 8

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

<210> SEQ ID NO: 9
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 9

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

<210> SEQ ID NO: 10
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 10

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

153

<210> SEQ ID NO: 11
 <211> Longitud: 22
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 11

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> SEQ ID NO: 12
 <211> Longitud: 7
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 12

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
 1 5

<210> SEQ ID NO: 13
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 13

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

<210> SEQ ID NO: 14
 <211> Longitud: 11
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 14

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

<210> SEQ ID NO: 15
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 15

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

<210> SEQ ID NO: 16
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT

154

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 16

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

<210> SEQ ID NO: 17

<211> Longitud: 22

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 18

<211> Longitud: 7

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 18

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 19

<211> Longitud: 9

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 19

Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys
1 5

<210> SEQ ID NO: 20

<211> Longitud: 8

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 20

Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 21

<211> Longitud: 10

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 21

155

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

<210> SEQ ID NO: 22
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 22

Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met Lys
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 23
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 23

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

Ser Lys

<210> SEQ ID NO: 24
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Longitud: 16
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 25

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

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Longitud: 16
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

756

<400> Secuencia: 26

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

<210> SEQ ID NO: 27

<211> Longitud: 20

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 28

<211> Longitud: 18

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 28

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

Ser Lys

<210> SEQ ID NO: 29

<211> Longitud: 11

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 29

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

<210> SEQ ID NO: 30

<211> Longitud: 16

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 30

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

<210> SEQ ID NO: 31

<211> Longitud: 14

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 31

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

<210> SEQ ID NO: 32

<211> Longitud: 7

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 32

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 33

<211> Longitud: 7

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 33

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 34

<211> Longitud: 9

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 34

Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr Val Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 35

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 35

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

Lys

<210> SEQ ID NO: 36

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 36

158

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

Lys

<210> SEQ ID NO: 37
<211> Longitud: 11
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 37

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

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 38

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

Tyr Tyr Lys

<210> SEQ ID NO: 39
<211> Longitud: 13
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 39

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

<210> SEQ ID NO: 40
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 41
<211> Longitud: 25

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 41

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

<210> SEQ ID NO: 42
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 42

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

Ser Lys

<210> SEQ ID NO: 43
<211> Longitud: 14
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 43

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

<210> SEQ ID NO: 44
<211> Longitud: 16
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 44

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

<210> SEQ ID NO: 45
<211> Longitud: 8
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 45

Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> SEQ ID NO: 46

160

<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 46

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

<210> SEQ ID NO: 47
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 48
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 49
<211> Longitud: 24
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 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

<210> SEQ ID NO: 50
<211> Longitud: 16
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 50

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

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 380
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 51

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

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

162

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> SEQ ID NO: 52

<211> Longitud: 380

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 52

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 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
 260 265 270

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

164

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

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

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

Cys Phe Thr Ala Phe Lys Gly His Gln Gln Ser Ser Ser Thr Glu Met
340 345 350

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

Arg Arg Lys Asp Arg Ile Gly Leu Ala Thr Lys Val
370 375 380

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Longitud: 379
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bos taurus

<400> Secuencia: 53

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

165

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	
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					

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

166

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by CAITLIN E. MACAGY

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. bears the seal/stamp of CAITLIN E. MACAGY-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 28th day of JANUARY, 2002

7. by Matt Blunt, Secretary of State, State of Missouri

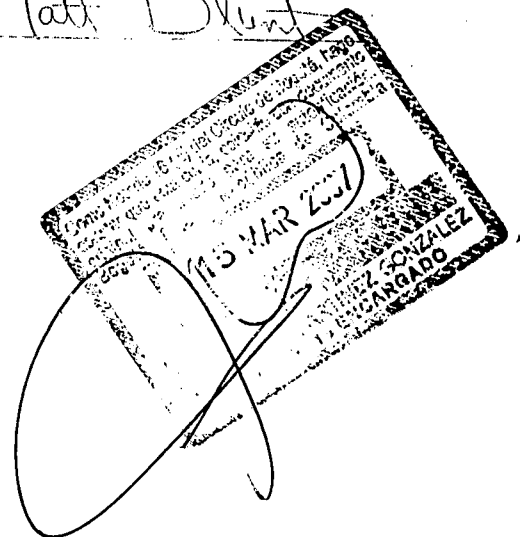
8. No. 70695

9. Seal/Stamp

10. Signature:

Matt Blunt

Comm. 48 (12-2000)



PODER

POWER OF ATTORNEY

El abajo firmado

The undersigned MONSANTO TECHNOLOGY LLC, a Delaware Limited Liability company, located at 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri, United States of America

Nombramos por el presente a

hereby appoint Ramiro Castro-Duque y/o Juan Pablo Cadena Sarmiento y/o Beatriz Jaramillo S.

a los apoderados que él o ellos designen nuestro representante legal y verdadero en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al párrafo 1o, del Artículo 543 del Decreto 410 de 1971, quedando especialmente facultados para representarnos ante las autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la Propiedad Industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones y reclamos; formular descripciones, enmiendas; oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyen conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasar los antecedentes a los tribunales, quedando facultado, para intervenir como demandante o demandado ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a arbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dicho representante y/o los apoderados que el nombre hicieren en nuestro beneficio.

or the agents appointed by him or them, our true and legal representative in Bogota, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1, Article 543 of Decree 410 of 1971, and they are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps to the said end; to file petitions, declarations, claims, cancellations, and administrative injunction proceedings; to draw up specifications; to make amendments, oppositions and appeals, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agent(s) to act on our behalf, as complainant(s) as well as defendant(s), before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal, and, in short, with all such further powers as may be required; and we hereby declare from now on as valid and good all that said representative and/or the agents whom he or she appointed may do for our benefit.

Asimismo, facultamos a los abogados arriba indicados para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que otorguen a nombre nuestro.

We also authorize said attorneys to apply for protocolization of this document and any power of attorney by him conferred in our name, before the Office of Industrial Property, as well as to substitute these presents.

Given and signed at (Dado y firmado en) St. Louis, Missouri, USA

this (a los) 9th day of (dias de) January of (de) 20 02

MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Por (By) Barbara Bunning-Stevens
Título (Title)

Barbara Bunning-Stevens,
Intellectual Property Counsel
Authorized to sign this document for
Monsanto Technology, LLC
by action of sole member,
dated August 1, 2001.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

168

Estados Unidos de América)
Estado de) SS
Condado de)

United States of America)
State of MISSOURI) SS
County of ST. LOUIS)

Hoy de de 20 , compareció , a quien conozco y de

On this 12 day of January of 2002 personally came

Barbara Binning-Stevens

quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that she is the Intellectual Property Counsel

de

of Monsanto Technology LLC

la compañía nombrada en el documento, que antecede, una sociedad debidamente organizada y esixtente conforme a las leves del Estado de

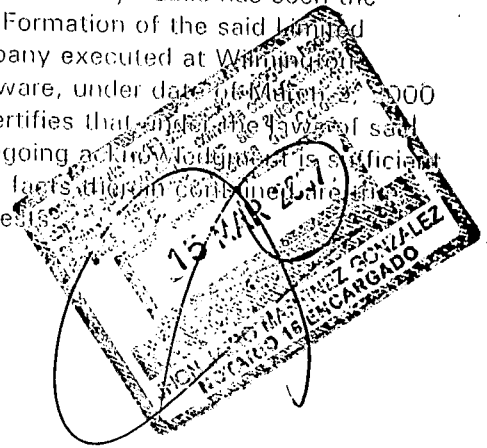
the company named within, a limited liability company organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America, domiciled at the City of Creve Coeur

Estados Unidos de America, domiciliada en la ciudad de Condado de Estado de , Estados Unidos de América y legalmente constituida para un período de duración que aún no ha determinada; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

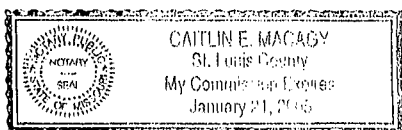
County of St. Louis State of Missouri United States of America, and legally constituted for a period of tenure not yet expired; that the deponent is authorized by said Limited Liability Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Limited Liability Company is the seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Limited Liability Company.

El suscrito notario ha visto los estatutos de incorporación firmados en Estado de con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

The undersigned Notary Public has seen the Certificate of Formation of the said Limited Liability Company executed at Wilmington, State of Delaware, under date of March 2, 2000 and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which she attests.



(Seal)



Caitlin E. Macagy
Notary Public
(Notario Público)



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-085345-00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:35:30 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Lve: 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios: 168

S

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 085345
	Solicitud internacional	PCT/US2008/086674
	Fecha inicio fase nacional	13/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009497

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal E) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título XI de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No. 10 085345


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALICIA CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 JUL 2010
adpa11